หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation และการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

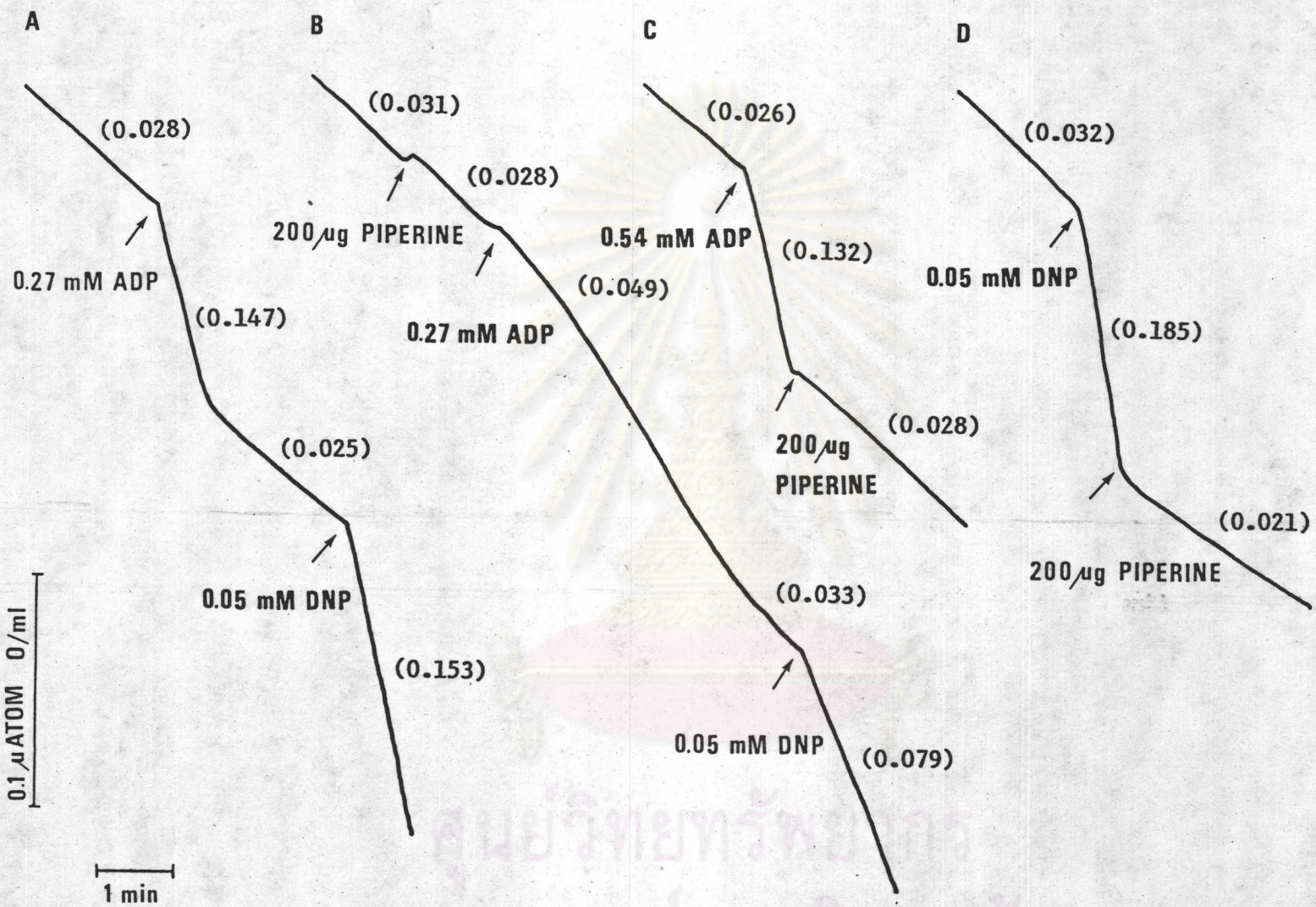
1.1 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation

Oxygraph tracings ซึ่งแสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อ state 3 และการกระตุ้นการหายใจโดย DNP (2,4-dinitrophenol) ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวได้แสดงในรูปที่ 2 ในการทดลองนี้ได้ทำการ suspend ไมโตคอนเดรียใน medium ที่มี glutamate + malate เป็น respiratory substrate และมี inorganic phosphate (Pi) รวมอยู่ด้วย curve A แสดง control response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับหนูขาวเมื่อใส่ ADP และ DNP การเติม ADP จะกระตุ้นการหายใจเมื่อ ADP ถูกเปลี่ยนไปเป็น ATP และต่อมาเกิดการ cut-off (ซึ่งเป็นการเปลี่ยนจาก "state 3" เข้าสู่ "state 4" respiration) เมื่อ ADP ได้ถูก phosphorylate หมดได้ ATP เมื่อเติม DNP จะเกิด uncouple ในไมโตคอนเดรียและมีการกระตุ้นการหายใจซึ่งโดยทั่วไปอัตราของการกระตุ้นการหายใจจะมากกว่าในกรณีของการเกิด state 3 respiration กระบวนการกระตุ้นการหายใจนี้จะดำเนินต่อไปจนกระทั่งออกซิเจนที่ละลายใน incubation medium ถูกใช้ไปหมด จาก curve A อัตราส่วนของ P/O มีค่าเท่ากับ 2.88 และค่าของ RCI (respiratory control index) มีค่าเท่ากับ 6.0 เมื่อทำการ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนขนาด 200 มคก. เป็นเวลานาน 1.5 นาที พบว่าเกิดการยับยั้ง state 3 และ uncoupled respiratory rates ได้เกือบสมบูรณ์ (curve B) และ cut-off ที่เกิดขึ้นเห็นไม่ชัดเท่ากรณีของ control (curve A) ค่า RCI ลดลงจากค่าเดิมโดยเปลี่ยนจาก 6.0 เป็น 1.5 และอัตราส่วน P/O ลดลงเป็น 1.81 จาก curve B จะสังเกตเห็นว่าไพเพอรีนมีผลในการยับยั้ง resting

รูปที่ 2 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.63 mM, KCl 79.16 mM, potassium phosphate 1.91 mM, potassium glutamate 5.45 mM, potassium malate 5.45 mM และ sucrose 6.81 mM ความเข้มข้นของ ADP และ DNP และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 0.95 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.84 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

respiration น้อยมาก เมื่อเติมไพเพอรีนลงใน reaction mixtures ผลการยับยั้งของไพเพอรีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมากโดยดูจากการที่ใส่ไพเพอรีนในระหว่างการเกิด state 3 ซึ่งใส่ ADP ลงไปในขนาดสูง (curve C) และในทำนองเดียวกัน uncoupled respiration (curve D) ก็ถูกยับยั้งเกือบทันทีเมื่อเติมไพเพอรีนในระหว่างที่มีการกระตุ้นการหายใจ

ผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับพลังงานในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวสามารถพบได้เมื่อใช้สารนี้ในปริมาณน้อย ๆ ดังรูปที่ 3 ซึ่งแสดงผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ กัน ที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation ในไมโตคอนเดรียที่มี glutamate + malate เป็น substrate ไพเพอรีนในขนาดต่ำสุดที่ใช้คือ 10 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีนสามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ทั้ง ADP- และ DNP-stimulated respiration ระดับของการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาด 10-40 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน และจะยับยั้งได้สูงสุดเมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาด 100 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ที่มีต่อ ADP- และ DNP-stimulated respiration มีค่า 22 และ 25 มคก. ไพเพอรีนต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีนตามลำดับ

มีการทดลองในทำนองเดียวกันนี้โดยใช้ succinate เป็น respiratory substrate ผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 4 curve A แสดง control respiratory response ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวเมื่อใส่ ADP และ DNP preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนในขนาด 200 มคก. เป็นเวลา 1.5 นาทีก่อนเติม ADP สามารถยับยั้ง state 3 respiration ได้อย่างสมบูรณ์ (curve B) ทำนองเดียวกันไพเพอรีนสามารถลด DNP-stimulated respiration ได้อย่างชัดเจน และยังมีผลลด resting respiration อีกด้วย

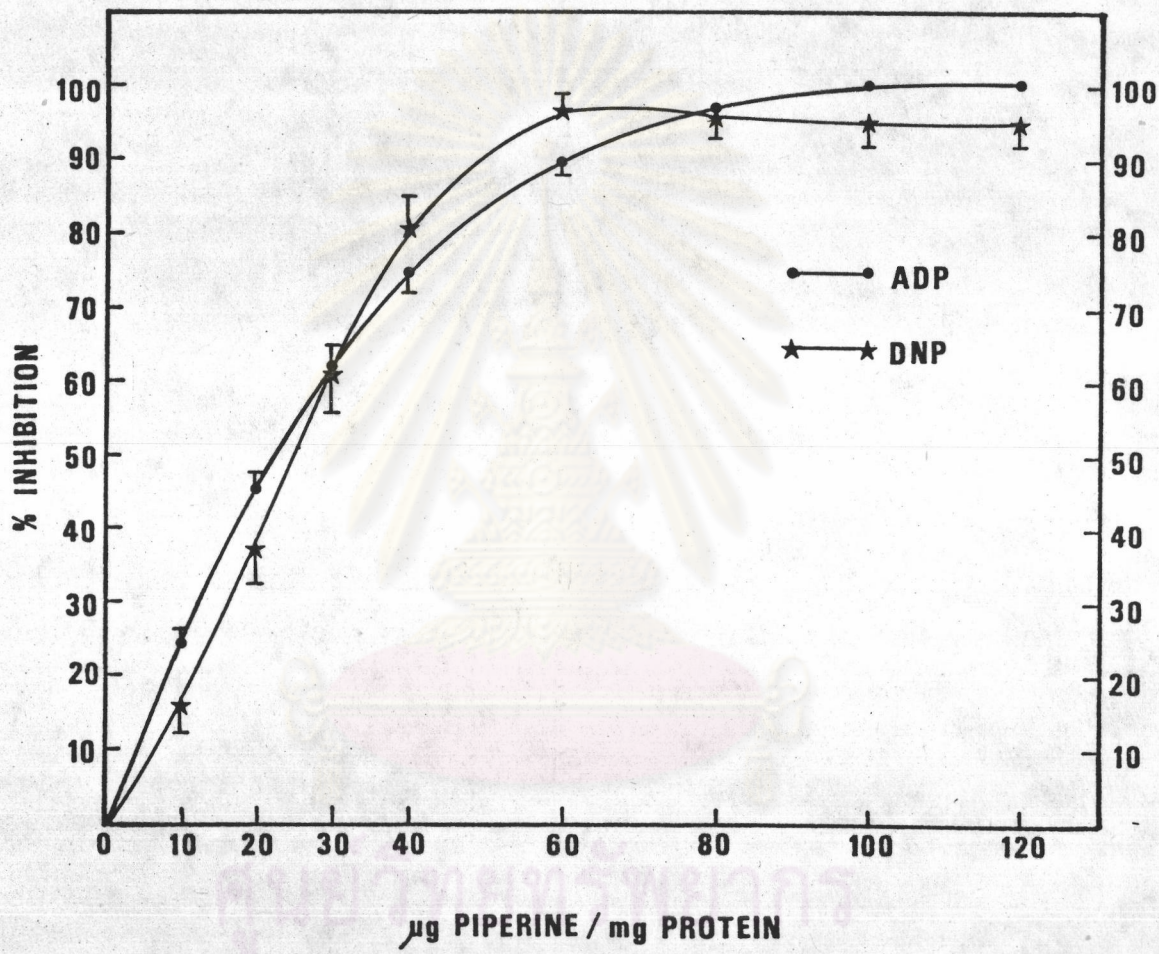
รูปที่ 5 เป็นการแสดง dose-response curve ของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation เมื่อใช้ succinate เป็น respiratory

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 การยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ

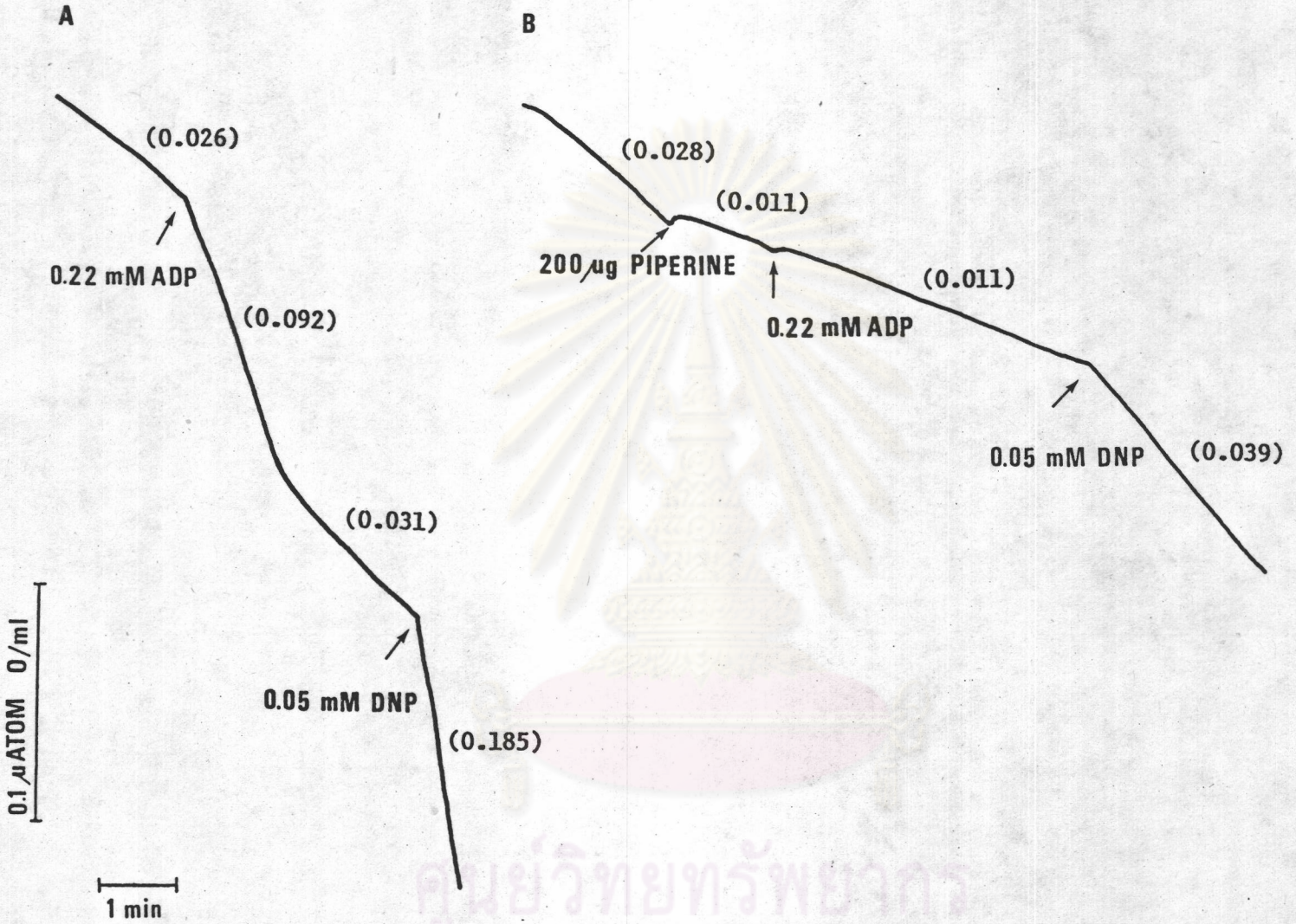
ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.63 mM, KCl 79.16 mM, potassium phosphate 1.91 mM, potassium glutamate 5.45 mM, potassium malate 5.45 mM, sucrose 6.81 mM, ADP 0.27 mM, DNP 0.05 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป เติม ADP หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาที และเติม DNP ในระหว่าง state 4 ปริมาตรทั้งหมด 1.84 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 9 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
60
80
100
120
ADP
DNP
µg PIPERINE / mg PROTEIN

รูปที่ 4 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.17 mM pH 7.4, $MgCL_2$ 7.63 mM, KCl 79.20 mM, potassium phosphate 1.91 mM, potassium succinate 5.45 mM และ sucrose 6.82 mM ความเข้มข้นของ ADP และ DNP และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 0.95 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.83 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

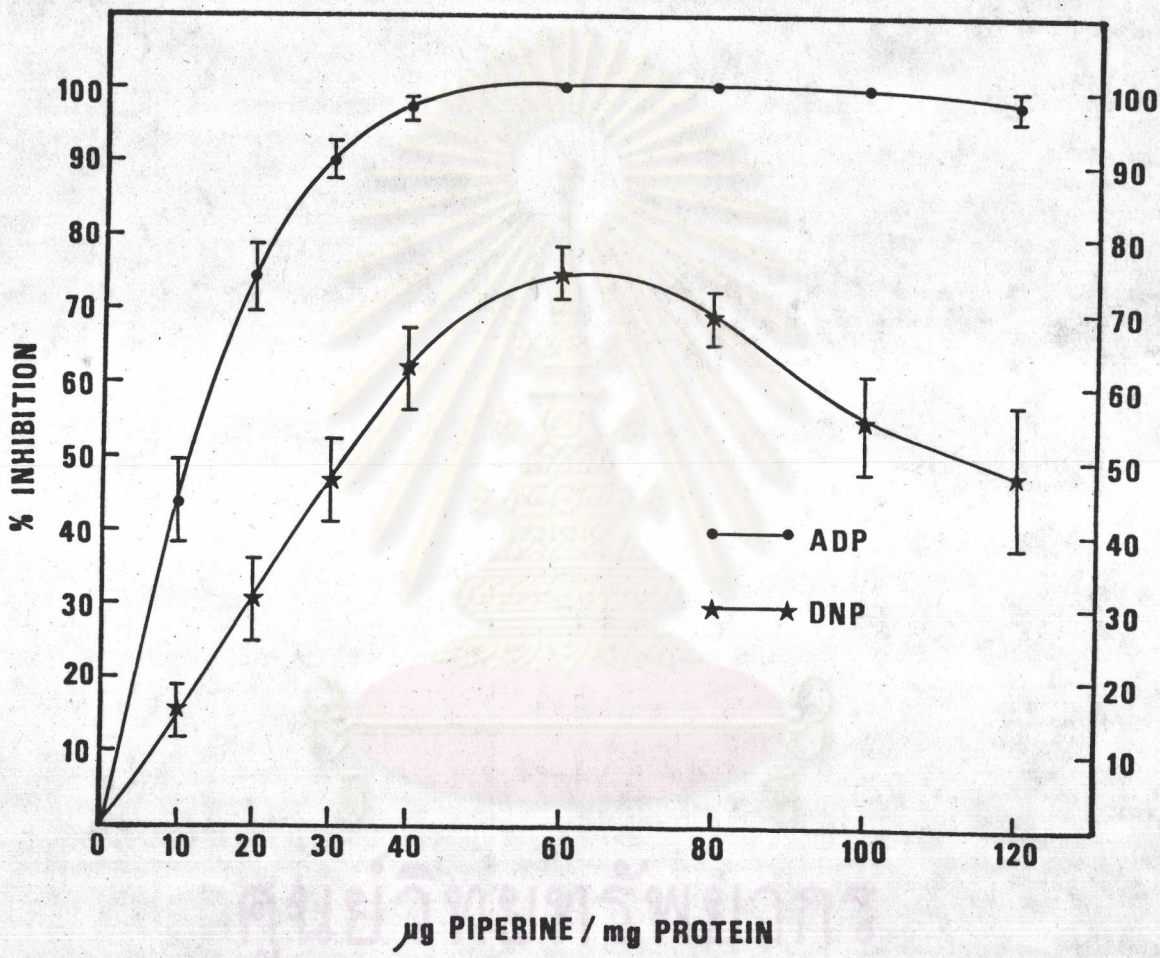


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 การยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว โดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.17 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.63 mM, KCl 79.20 mM, potassium phosphate 1.91 mM, potassium succinate 5.45 mM, sucrose 6.82 mM, ADP 0.22 mM, DNP 0.05 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป เติม ADP หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาทีและเติม DNP ในระหว่าง state 4 ปริมาตรทั้งหมด 1.83 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 9 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
60
80
100
120
ADP
DNP
µg PIPERINE / mg PROTEIN

substrate การใช้ไพเพอรีนในปริมาณน้อย ๆ ก็เริ่มสามารถแสดงผลการยับยั้งอัตราของการตอบสนองการหายใจในไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ ADP และ DNP จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ที่มีต่อ ADP- และ DNP-stimulated respiration มีค่า 12 และ 32 มคก. ไพเพอรีนต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีนตามลำดับ ในกรณีนี้จะเห็นว่า state 3 respiration ไวต่อไพเพอรีนมากกว่า DNP-stimulated respiration อย่างค่อนข้างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกรณี glutamate + malate เป็น substrate นอกจากนี้ในกรณีของ DNP-stimulated respiration เมื่อใช้ succinate เป็น substrate มีข้อแตกต่างจากการใช้ glutamate + malate เป็น substrate กล่าวคือไพเพอรีนสามารถยับยั้ง DNP-stimulated respiration ได้เฉพาะในช่วงแรก ๆ เท่านั้น เมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดเกิน 60 มคก.ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีนพบว่าการยับยั้งของไพเพอรีนที่มีต่อ DNP-stimulated respiration จะลดลง

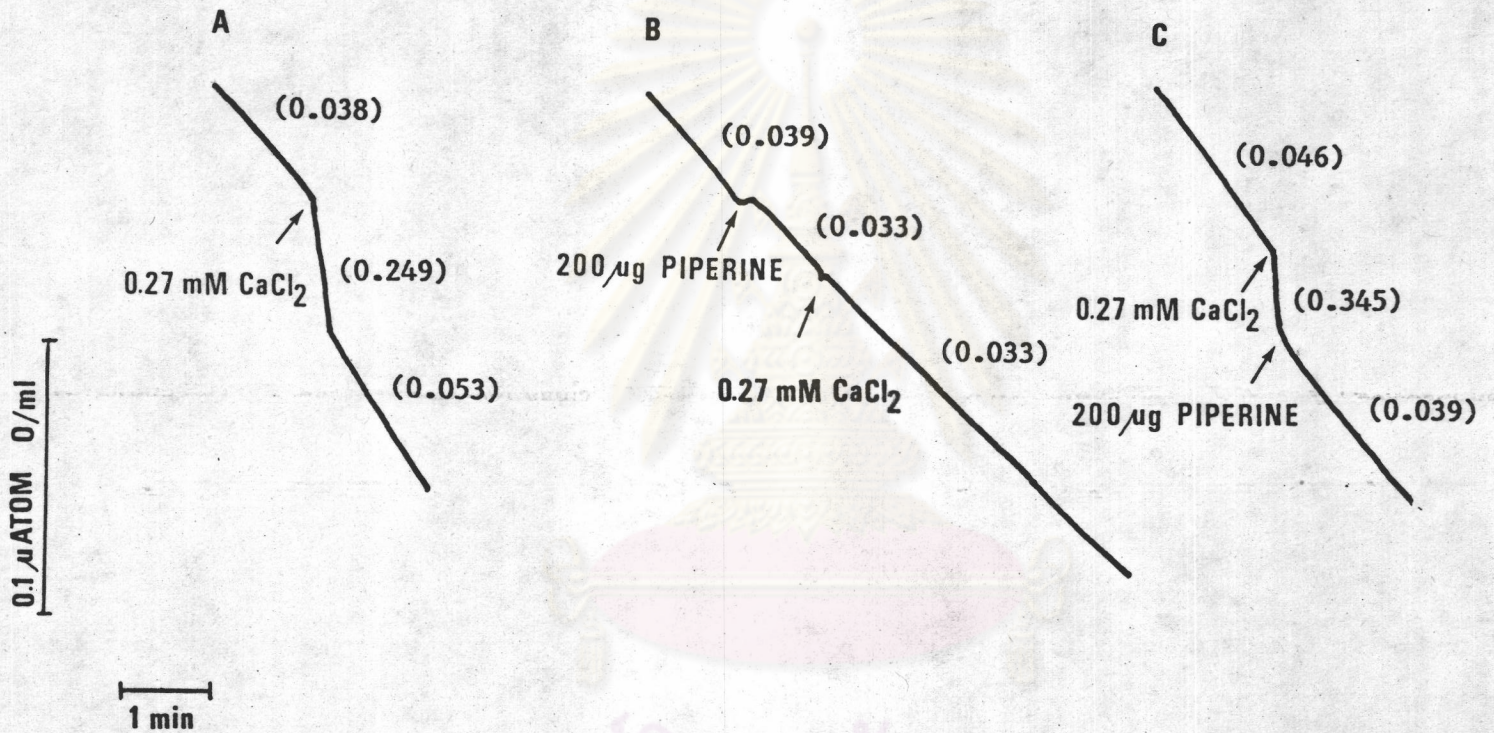
1.2 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าไพเพอรีนสามารถยับยั้งการเกิดทั้ง state 3 และ uncoupled respiration ได้ ซึ่งผลนี้ชี้แนะว่าสารนี้ควรจะมีผลยับยั้งการหายใจที่เกิดจากการเติม $CaCl_2$ ลงไปในไมโตคอนเดรียได้ด้วยเช่นกัน ในรูปที่ 6 curve A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ $CaCl_2$ ซึ่งมี inorganic phosphate (Pi) และ glutamate + malate รวมอยู่ด้วยใน medium การเติม $CaCl_2$ จะกระตุ้นการหายใจในไมโตคอนเดรียอย่างมากเมื่อแคลเซี่ยมถูกขนส่งเข้าไปในไมโตคอนเดรีย และต่อมาจะเกิดการ cut-off เมื่อ $CaCl_2$ ที่เติมลงไปถูกสะสมไว้ในไมโตคอนเดรียหมด preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนขนาด 200 มคก. (curve B)จะยับยั้งอัตราของ calcium-induced respiration ลงได้อย่างสมบูรณ์ และผลการยับยั้งของไพเพอรีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมากโดยดูจากผลของการที่ใส่ไพเพอรีนในระหว่างที่มีการกระตุ้นการหายใจในไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ $CaCl_2$ (curve C)

รูปที่ 6 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.46 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.69 mM, KCl 79.81 mM, potassium phosphate 1.92 mM, potassium glutamate 5.49 mM, potassium malate 5.49 mM และ sucrose 6.87 mM ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.56 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.82 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโตคอนเดรีย เมื่อมี $CaCl_2$ สามารถพบได้เมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดต่ำ ๆ ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยจะเริ่มพบการยับยั้ง respiratory response ของไมโตคอนเดรียต่อ $CaCl_2$ ที่ไพเพอรีนในขนาดต่ำสุดคือ 10 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน ระดับของการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดที่สูงขึ้น และต่อมาจะอยู่ในระดับที่คงที่เมื่อใช้ไพเพอรีนขนาดเกิน 100 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ต่อ calcium-stimulated respiration มีค่า 31 มคก. ไพเพอรีนต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน

ได้ทำการทดลองทำนองเดียวกันนี้โดยใช้ succinate เป็น respiratory substrate ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมได้แสดงในรูปที่ 8 curve A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ $CaCl_2$ ซึ่งมี inorganic phosphate (Pi) รวมอยู่ด้วย และมี succinate เป็นแหล่งของพลังงาน การเติม $CaCl_2$ จะกระตุ้นการหายใจในไมโตคอนเดรียอย่างมาก และต่อมาเกิดการ cut-off (แต่จะเห็นได้ไม่ชัดเท่ากับในกรณีใช้ glutamate + malate เป็น substrate) เมื่อ $CaCl_2$ ที่เติมลงไปถูกสะสมไว้โดยไมโตคอนเดรีย preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนในขนาด 200 มคก. เช่นเดียวกัน (curve B) จะยับยั้งอัตราของ calcium-induced respiration ลงได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับในกรณีใช้ glutamate+malate เป็น substrate ผลการยับยั้งของไพเพอรีนเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากโดยดูผลจากการที่ใส่ไพเพอรีนในระหว่างที่มีการกระตุ้นการหายใจในไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ $CaCl_2$ (curve C)

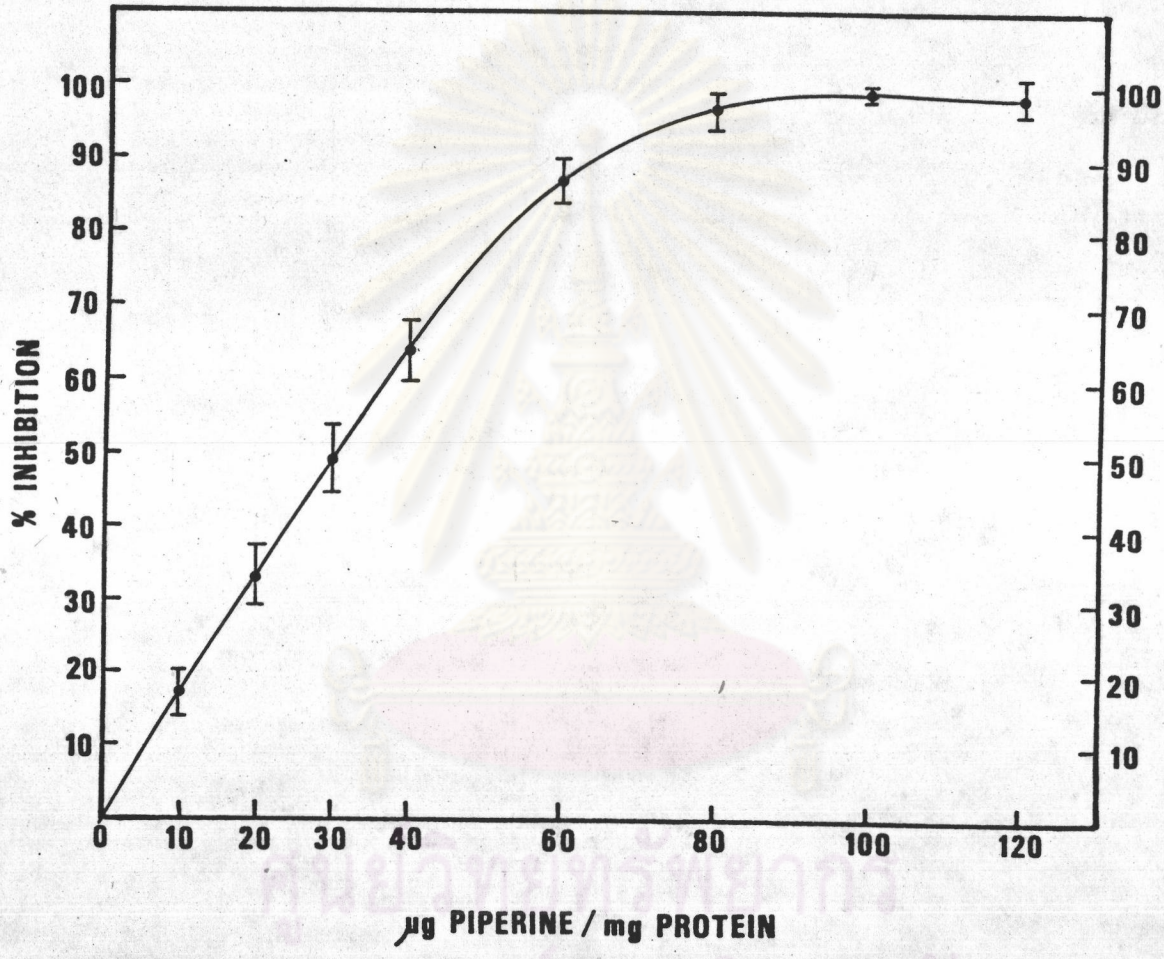
ผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโตคอนเดรียเมื่อมีแคลเซี่ยมและใช้ succinate เป็น substrate สามารถพบได้เมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดต่ำ ๆ ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยจะเริ่มพบการยับยั้ง respiratory response ในไมโตคอนเดรียเมื่อใส่ $CaCl_2$ รวมอยู่ใน medium ที่ไพเพอรีนในขนาดต่ำสุด 10 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน ระดับของการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อใส่ไพเพอรีนในขนาดที่สูงขึ้น และต่อมาจะคงที่เมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดเกิน 80 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ที่มีต่อ calcium-

I 17290813

รูปที่ 7 การยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.46 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.69 mM, KCl 79.81 mM, potassium phosphate 1.92 mM, potassium glutamate 5.49 mM, potassium malate 5.49 mM, sucrose 6.87 mM, $CaCl_2$ 0.27 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม $CaCl_2$ ปริมาตรทั้งหมด 1.82 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 12 การทดลอง

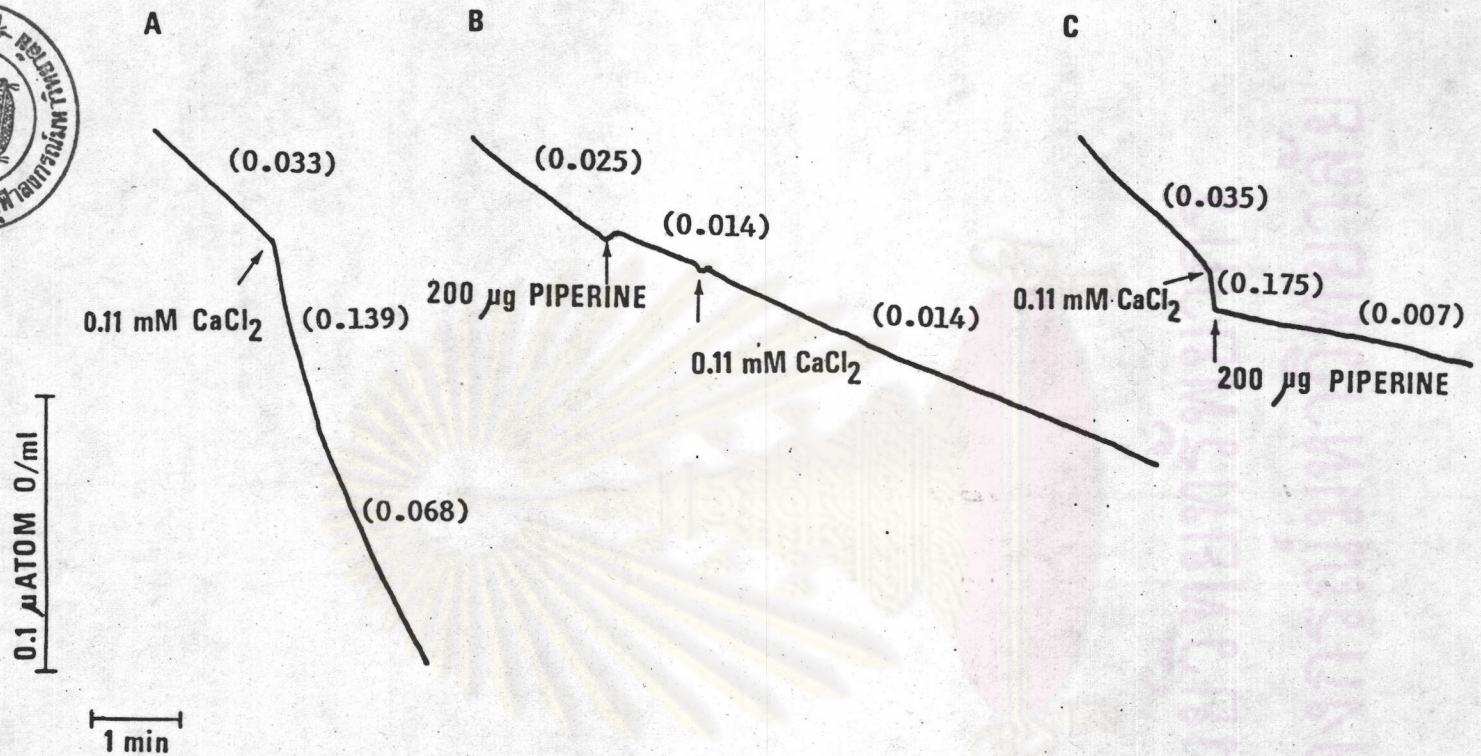
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
60
80
100
120
µg PIPERINE / mg PROTEIN

รูปที่ 8 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate

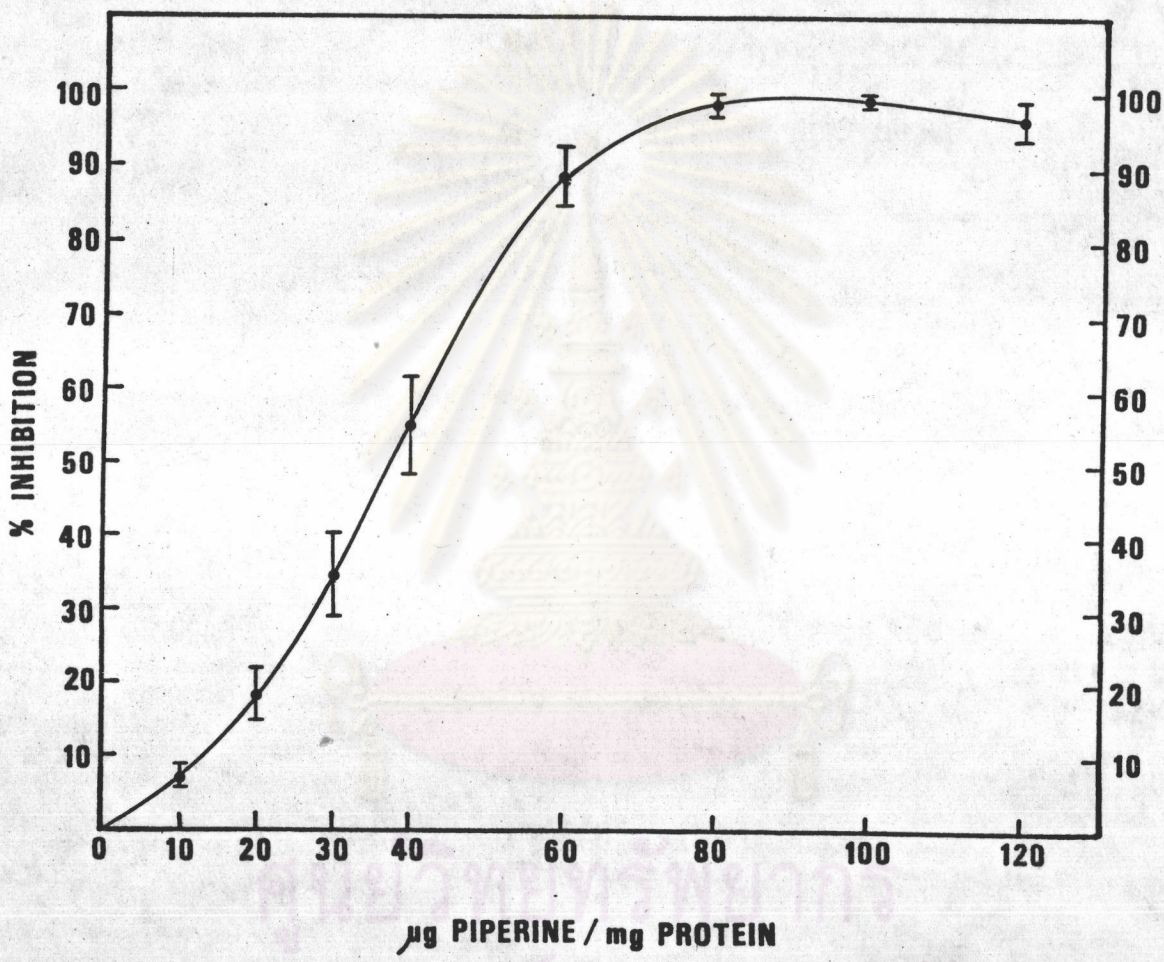
ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.59 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.72 mM, KCl 80.07 mM, potassium phosphate 1.93 mM, potassium succinate 5.51 mM และ sucrose 6.89 mM ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.28 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.81 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
B
C
(0.033)
0.11 mM $CaCl_2$
(0.139)
(0.068)
(0.025)
(0.014)
200 µg PIPERINE
0.11 mM $CaCl_2$
(0.014)
(0.035)
0.11 mM $CaCl_2$
(0.175)
(0.007)
200 µg PIPERINE
0.1 µATOM O/ml
1 min

รูปที่ 9 การยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว โดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.59 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.72 mM, KCl 80.07 mM, potassium phosphate 1.93 mM, potassium succinate 5.51 mM, sucrose 6.89 mM, $CaCl_2$ 0.11 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม $CaCl_2$ ปริมาตรทั้งหมด 1.81 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 8 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
60
80
100
120
µg PIPERINE / mg PROTEIN

stimulated respiration มีค่า 38 มคก. ต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน จากผลการทดลองดังกล่างข้างต้นไม่ว่าจะใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็น substrate จะเห็นว่าการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียนี้สามารถถูกยับยั้งได้โดยไพเพอรีน

2. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondira (HTM) เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrate

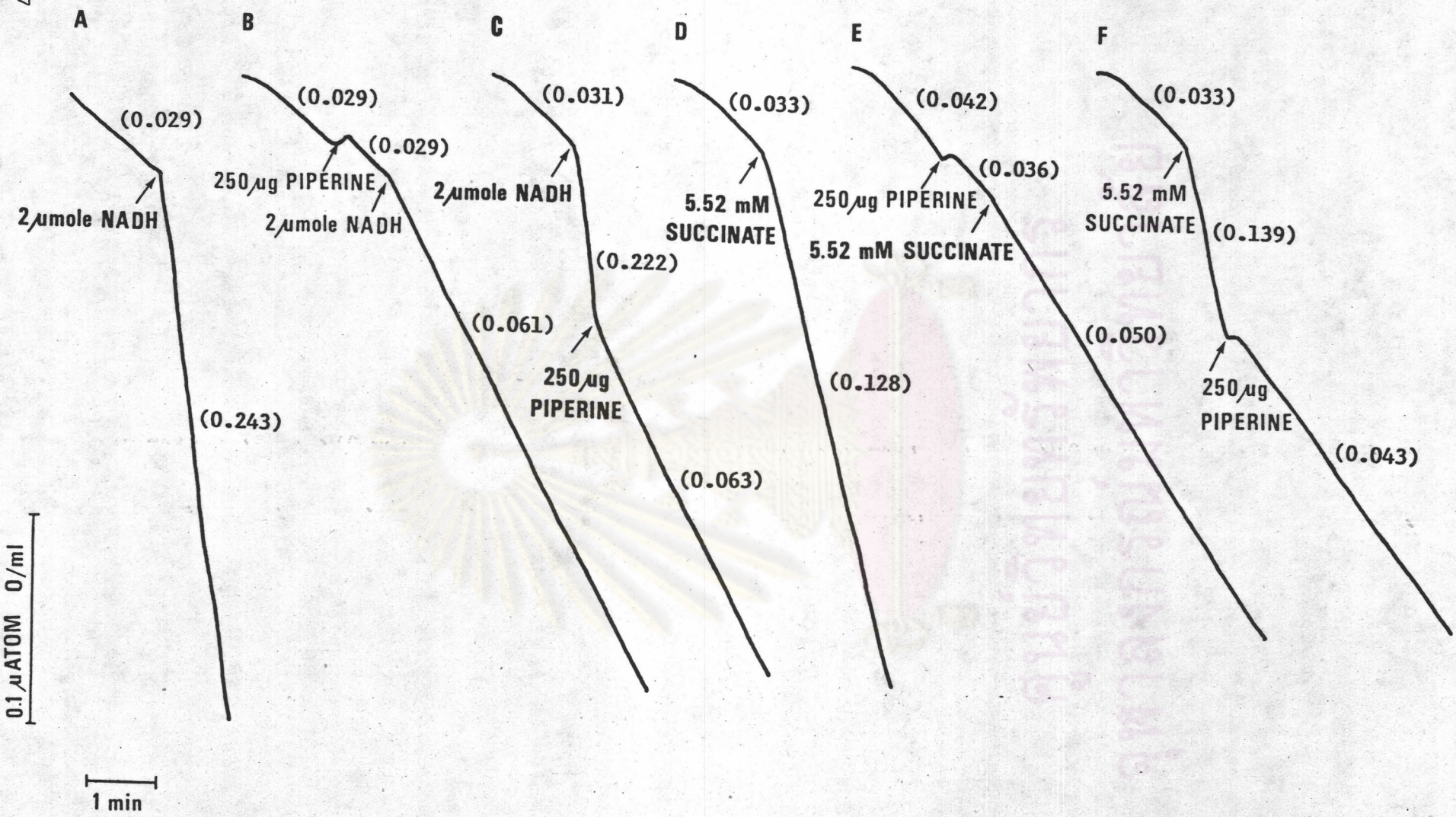
ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของไพเพอรีนที่มีต่อ oxidation ของ exogenous NADH และ succinate ใน HTM (การที่เรานำไมโตคอนเดรียมาแช่ในสารละลาย hypotonic จะทำให้ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียเพิ่ม permeability ต่อ NADH อย่างมาก แต่ในสภาพปกติแล้วจะ impermeable ต่อ external NADH) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 10 curve A แสดง control oxidation ของ exogenous NADH ใน HTM preincubate ด้วยไพเพอรีนเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ขนาดซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ใน intact mitochondria พบว่าเกิดการยับยั้ง oxidation ใน HTM เมื่อใส่ NADH (curve B) ผลการยับยั้งของไพเพอรีนเกิดขึ้นได้รวดเร็วมากโดยดูผลจากการที่ใส่ไพเพอรีนในระหว่างที่มีการ oxidation ของ NADH ใน HTM (curve C) curve D เป็น control oxidation ของ exogenous succinate ใน HTM เมื่อ preincubate ด้วยไพเพอรีนเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ขนาดเดียวกับในกรณี NADH (250 มคก.) พบว่าสามารถยับยั้ง oxidation ของ succinate ใน HTM (curve E) ผลการยับยั้งของไพเพอรีนเกิดขึ้นได้รวดเร็วมากโดยดูผลจากการที่ใส่ไพเพอรีนในระหว่างที่มีการ oxidation ของ succinate ใน HTM (curve F)

ผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่มีต่อ NADH oxidation ใน HTM สามารถพบได้ที่ไพเพอรีนในปริมาณน้อย ๆ รูปที่ 11 แสดงผลการยับยั้งของไพเพอรีนที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราของ respiratory response ของ HTM เมื่อใส่ NADH จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ที่มีต่อ NADH oxidation มีค่า 20.5 มคก. ไพเพอรีนต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีน รูปที่ 12 แสดงผลการยับยั้งของ

รูปที่ 10 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

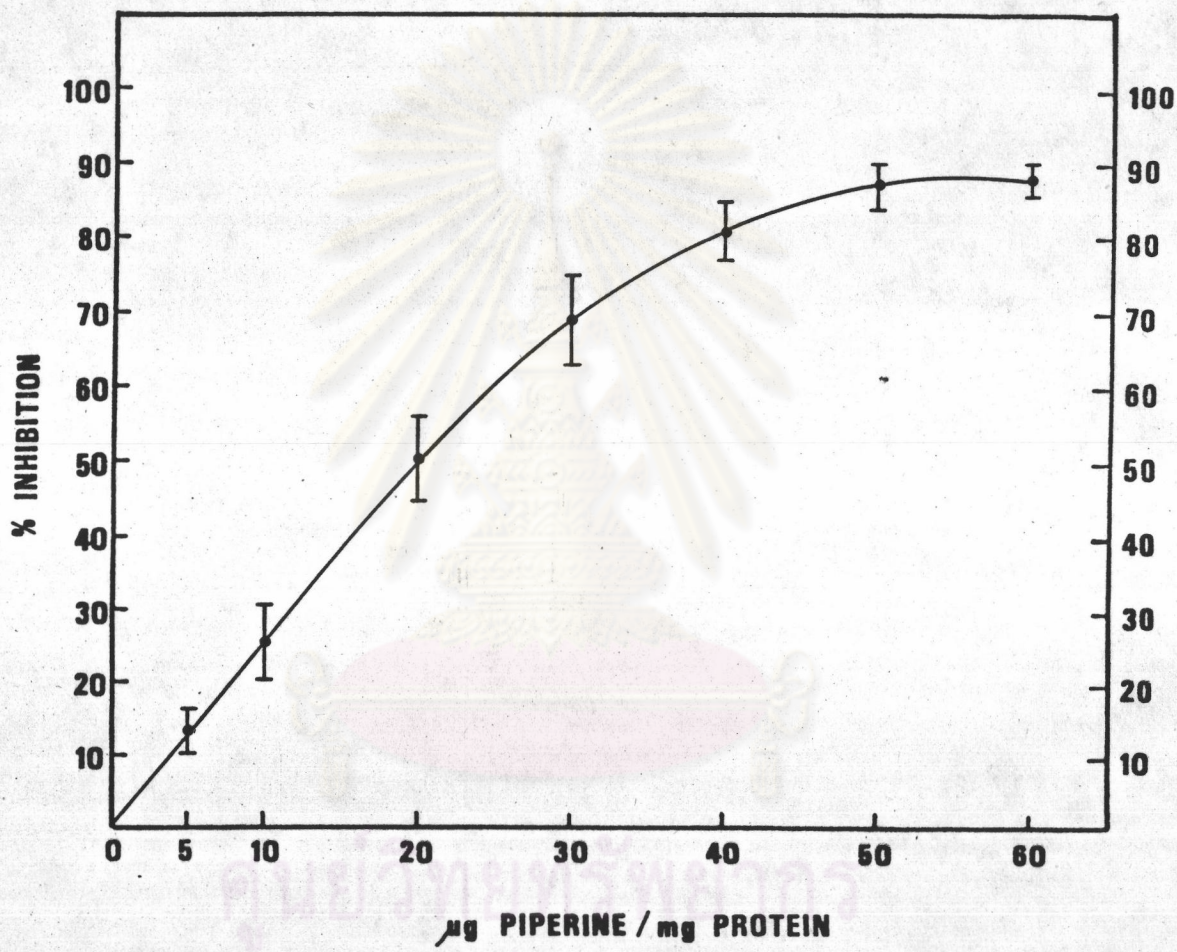
ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 37.78 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.56 mM, KCl 78.39 mM และ sucrose 9.44 mM ความเข้มข้นของ succinate และปริมาณของ NADH และไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 2.27 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.80 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
B
C
D
E
F
(0.029)
2 µmole NADH
(0.243)
(0.029)
250 µg PIPERINE
(0.029)
2 µmole NADH
(0.031)
2 µmole NADH
(0.222)
(0.061)
250 µg PIPERINE
(0.063)
(0.033)
5.52 mM SUCCINATE
(0.128)
(0.042)
250 µg PIPERINE
(0.036)
5.52 mM SUCCINATE
(0.050)
(0.033)
5.52 mM SUCCINATE
(0.139)
250 µg PIPERINE
(0.043)
0.1 µ ATOM O/ml
1 min

รูปที่ 11 Dose-response curve ของผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย NADH ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 37.78 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.56 mM, KCl 78.39 mM, sucrose 9.44 mM, NADH 2 มคม. และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป เติม NADH หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 1.80 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 7 การทดลอง

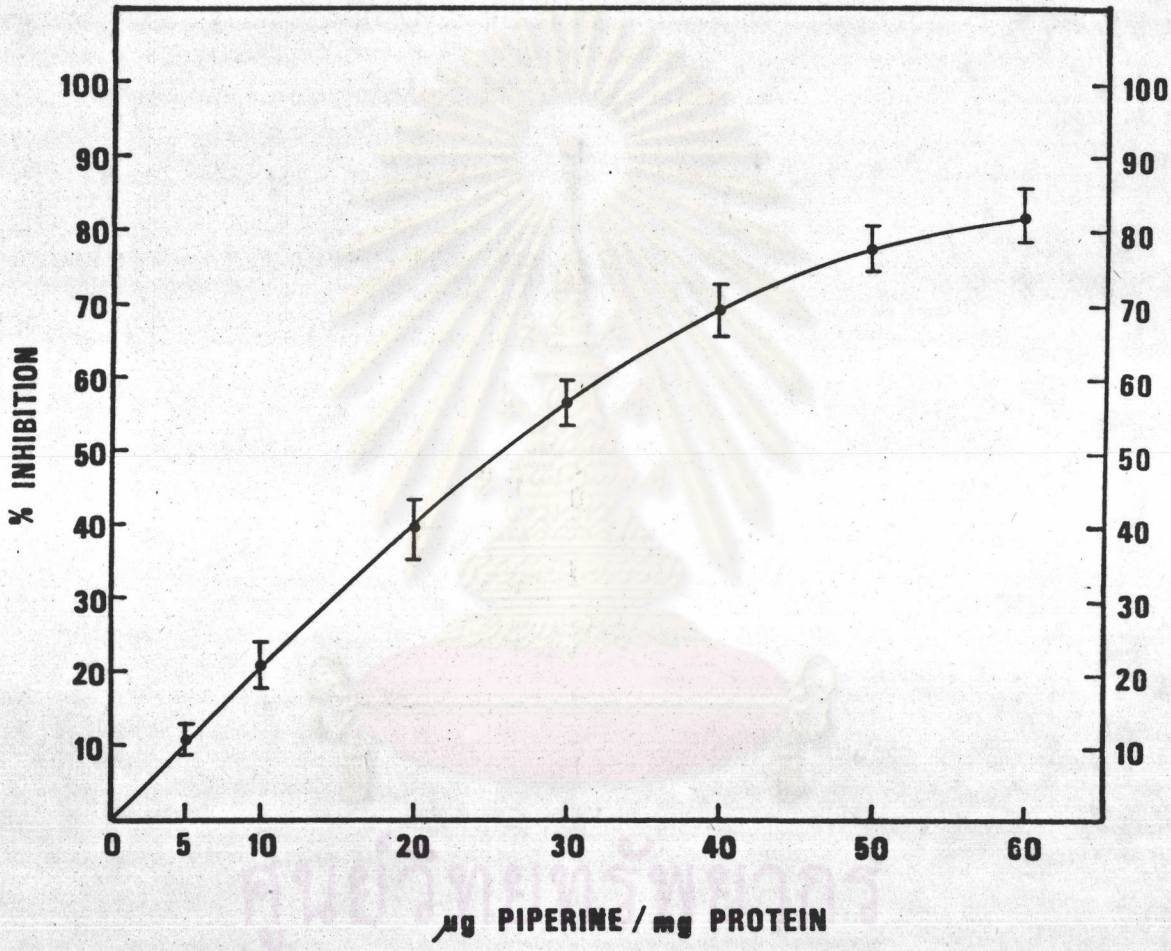
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
20
30
40
50
60
µg PIPERINE / mg PROTEIN

รูปที่ 12 Dose-response curveของผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย succinate ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 37.78 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.56 mM, KCl 78.39 mM, sucrose 9.44 mM, succinate 5.52 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป เติม succinate หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 1.80 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 7 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

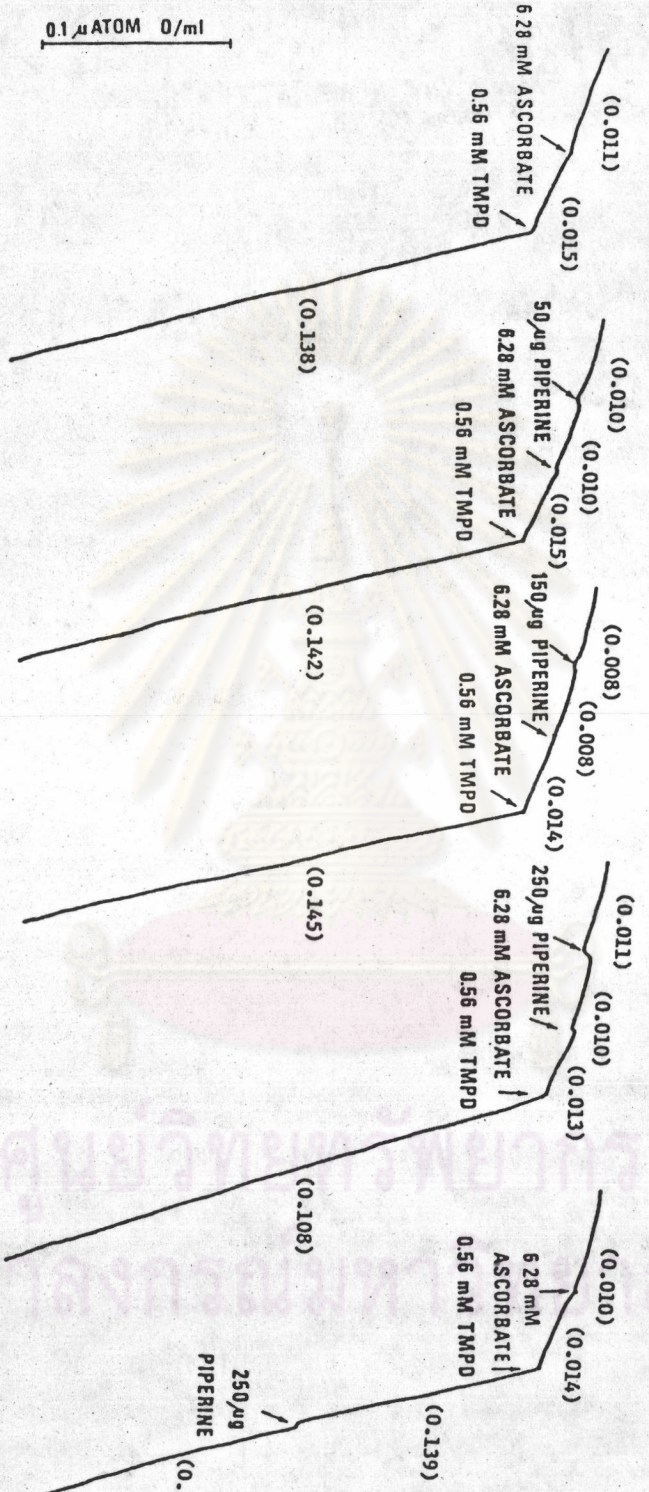

% INHIBITION
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
20
30
40
50
60
µg PIPERINE / mg PROTEIN

ไพเพอรีนที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราของ respiratory response ของ HTM เมื่อใส่ succinate จากการทดลองนี้ปริมาณของไพเพอรีนที่สามารถทำให้เกิดการยับยั้งได้ 50% (I_{50}) ที่มีต่อ succinate oxidation มีค่า 25.5 มคก. ไพเพอรีน ต่อ มก. ของไมโต-คอนเดรียโปรตีน

มีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มขึ้นเพื่อดูตำแหน่งการออกฤทธิ์ของไพเพอรีน ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน โดยทำการทดลองโดยใช้ ascorbate + TMPD (N,N,N',N'-tetra-methyl-p-phenylenediamine) ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอนโดยจะส่งอิเลคตรอนเข้าที่บริเวณ cytochrome c ในลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย ผลของไพเพอรีนที่มีต่อ ascorbate + TMPD oxidation ใน HTM ได้แสดงในรูปที่ 13 curve A แสดง control oxidation ของ ascorbate + TMPD ใน HTM preincubate HTM ด้วยไพเพอรีนเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม ascorbate + TMPD โดยใช้ไพเพอรีนในขนาดต่ำก่อนคือ 50 มคก. (curve B) จะเห็นว่าไพเพอรีนไม่มีผลในการยับยั้ง oxidation ของ ascorbate + TMPD curve C จะ preincubate HTM ด้วยไพเพอรีนในขนาดที่สูงขึ้นโดยใช้ขนาด 150 มคก. เป็นเวลา 1 นาที พบว่าไพเพอรีนไม่มีผลในการยับยั้ง oxidation ของ ascorbate + TMPD เช่นเดียวกัน ส่วน curve D ใช้ไพเพอรีนในขนาดที่สูงสุดคือในขนาด 250 มคก. ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ใน intact mitochondria อย่างเห็นได้ชัดเมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสารให้อิเลคตรอน จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของ ascorbate + TMPD ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ control และ curve E ใช้ไพเพอรีนในขนาดที่สูงสุดคือ 250 มคก. โดยการใส่ไพเพอรีนในระหว่างที่มีการเกิดการ oxidation ของ ascorbate + TMPD พบว่ามีการลดอัตราการใช้ออกซิเจนลงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนใส่ไพเพอรีน เมื่อได้ทำการทดลองโดยใช้ ascorbate + TMPD เป็นตัวให้อิเลคตรอนเช่นเดียวกัน แต่ได้ทำการทดลองใน intact mitochondria ซึ่งไม่ได้แสดงรูปไว้ในที่นี้ พบว่าไพเพอรีนในขนาด 250 มคก. ไม่มีผลต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็น substrate ซึ่งผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับผลของการทดลองดังกล่าวข้างต้น

รูปที่ 13 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ ascorbate รวมกับ TMPD เป็น substrate ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM และ sucrose 9.41 mM ความเข้มข้นของ ascorbate และ TMPD และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.55 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.81 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


0.1 μATOM O/ml
1 min
A
(0.011)
6.28 mM ASCORBATE
(0.015)
0.56 mM TMPD
(0.138)
B
(0.010)
50 μg PIPERINE
(0.010)
6.28 mM ASCORBATE
(0.015)
0.56 mM TMPD
(0.142)
C
(0.008)
150 μg PIPERINE
(0.008)
6.28 mM ASCORBATE
(0.014)
0.56 mM TMPD
(0.145)
D
(0.011)
250 μg PIPERINE
(0.010)
6.28 mM ASCORBATE
(0.013)
0.56 mM TMPD
(0.108)
E
(0.010)
6.28 mM ASCORBATE
(0.014)
0.56 mM TMPD
(0.139)
250 μg PIPERINE
(0.120)

3. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย

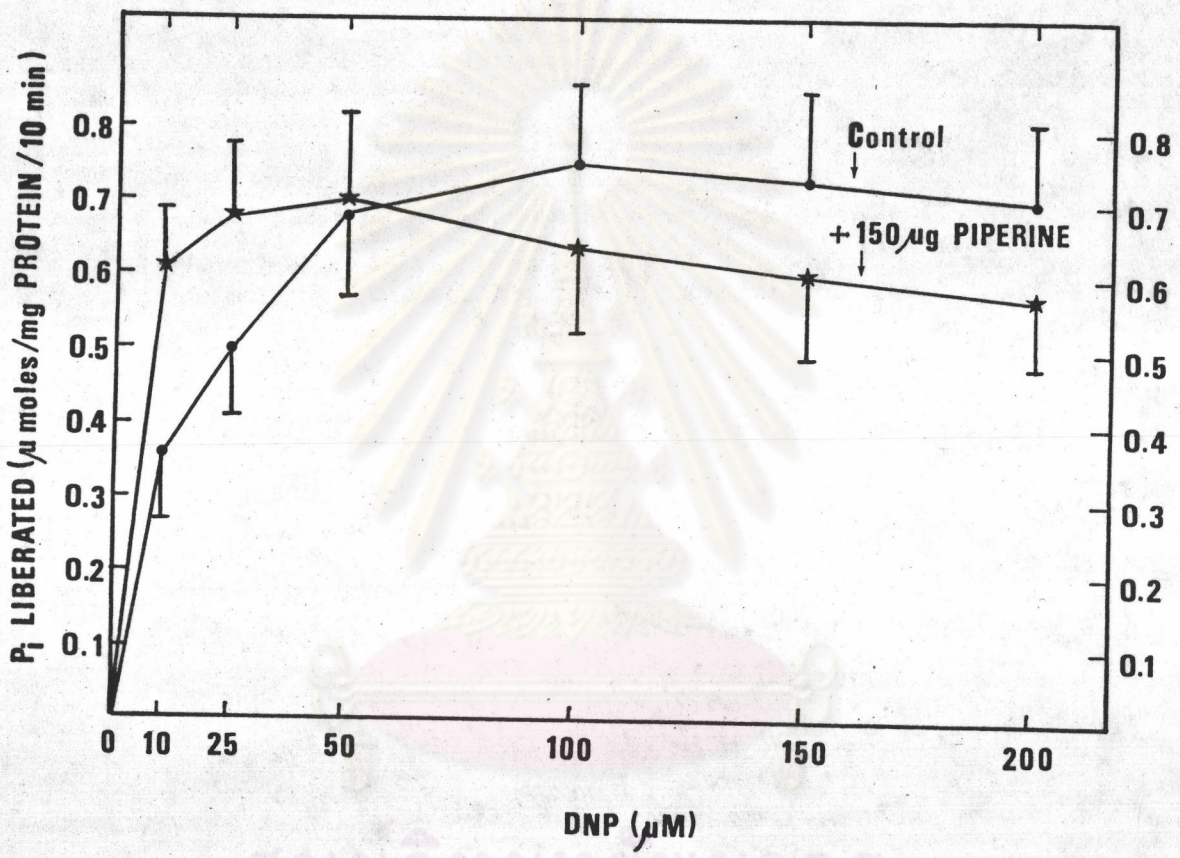
ผลของไพเพอรีนที่มีต่อ DNP-induced ATPase activity ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวได้แสดงในรูปที่ 14 activity ของเอ็นไซม์ ATPase นี้จะวัดในรูปของปริมาณของ inorganic phosphate (Pi) ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP เป็นไมโครโมลต่อ มก. ของไมโตคอนเดรียโปรตีนต่อ 10 นาที จากผลการทดลองจะเห็นว่าไพเพอรีนในขนาด 150 มคก. ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ได้ไม่สามารถยับยั้ง DNP-stimulated ATPase activity ได้ แต่กลับกระตุ้น DNP-stimulated ATPase activityในระยะแรก ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าไพเพอรีนอาจมีฤทธิ์กระตุ้นเอ็นไซม์ ATPaseในไมโตคอนเดรียโดยตัวของมันเอง เพื่อที่จะทดสอบคำกล่าวข้างต้นได้ทำการทดลองโดยใช้เฉพาะไพเพอรีนไม่มี DNP อยู่ใน reaction mixtures ด้วย ผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 15 จะเห็นว่าไพเพอรีนตั้งแต่ขนาด 10 มคก. ก็เริ่มสามารถกระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรีย และระดับของการกระตุ้นเอ็นไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาดที่สูงขึ้น และเมื่อใช้ไพเพอรีนในขนาด 250 มคก. พบว่ามันจะเริ่มยับยั้งเอ็นไซม์ ATPase เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในรูปที่ 14 กับรูปที่ 15 จะพบว่า ไพเพอรีนมีฤทธิ์กระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียที่อ่อนกว่า DNP (เปรียบเทียบจากปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้น)

มีการศึกษาถึงผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวเมื่อมีตัวยับยั้งอยู่ด้วย โดยจะใช้ atractyloside ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง adenine nucleotide translocator และ oligomycinซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นตัวยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งผลของ atractyloside และ oligomycin ในการยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ของไมโตคอนเดรียได้แสดงในรูปที่ 16 ซึ่งจะเห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีผลยับยั้งโดยเฉพาะต่อ state 3 respiration เท่านั้น ตารางที่ 1 แสดงถึงผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อฤทธิ์การกระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียโดยไพเพอรีน ขนาดของ oligomycin และ atractyloside เป็นขนาดที่สามารถยับยั้ง state 3 respiration ได้อย่างสมบูรณ์ จะเห็นว่าทั้ง oligomycin และ atractyloside มีผลยับยั้งฤทธิ์ของไพเพอรีนในการกระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase ได้บ้าง ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มขนาดของ atractyloside

รูปที่ 14 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อ ATPase activity ซึ่งถูกกระตุ้นโดย DNP ที่ความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 35.29 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.06 mM, KCl 73.22 mM, sucrose 16.84 mM, ATP 5.05 mM, ไพเพอรีน 150 มคก. และความเข้มข้นของ DNP ดังที่แสดงในรูป เติม DNP หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนแล้ว 1 นาที เติม ATP หลังจากเติม DNP แล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.97 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 6 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

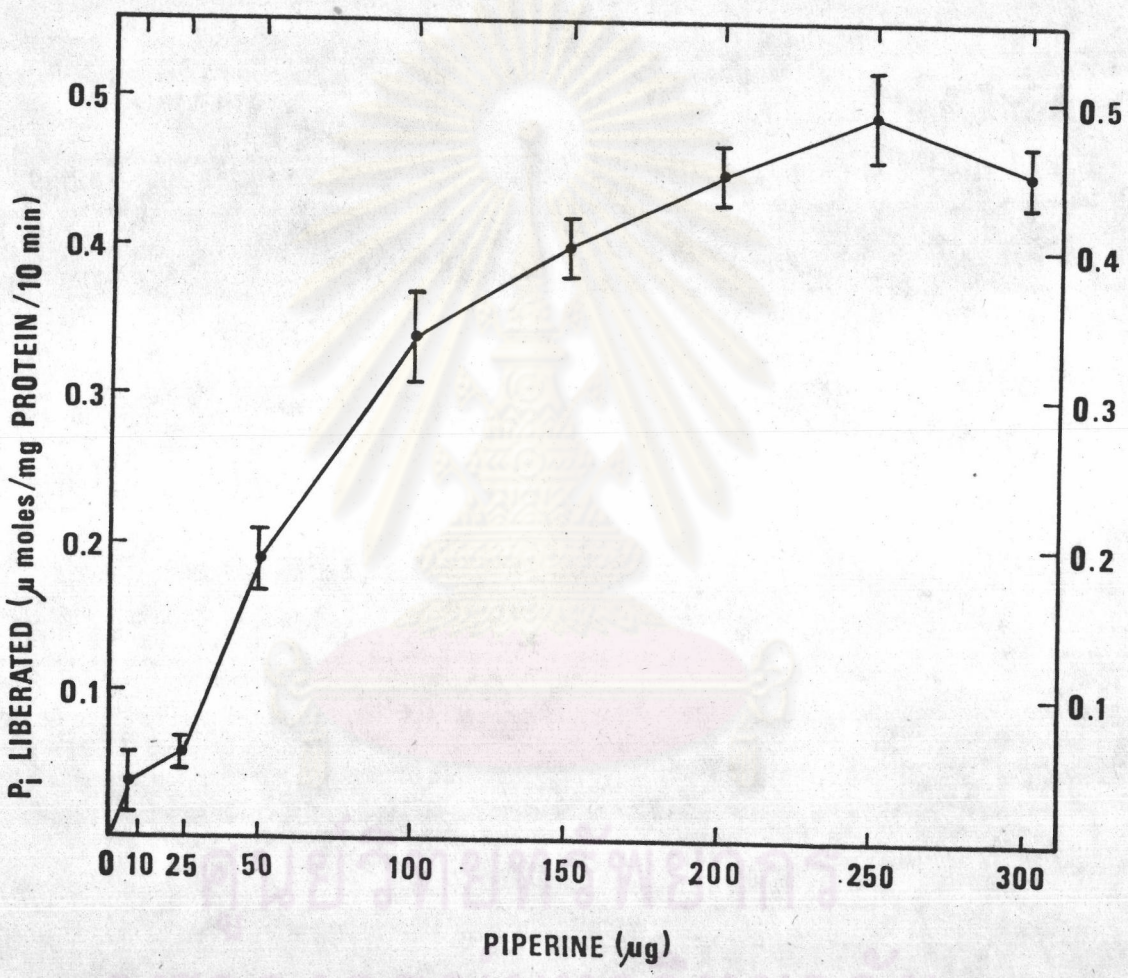


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 การกระตุ้น ATPase activity ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ไพเพอรีนที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 35.29 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.06 mM, KCl 73.22 mM, sucrose 16.84 mM, ATP 5.05 mM และปริมาณของไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยไพเพอรีนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.97 มล. แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จาก 6 การทดลอง

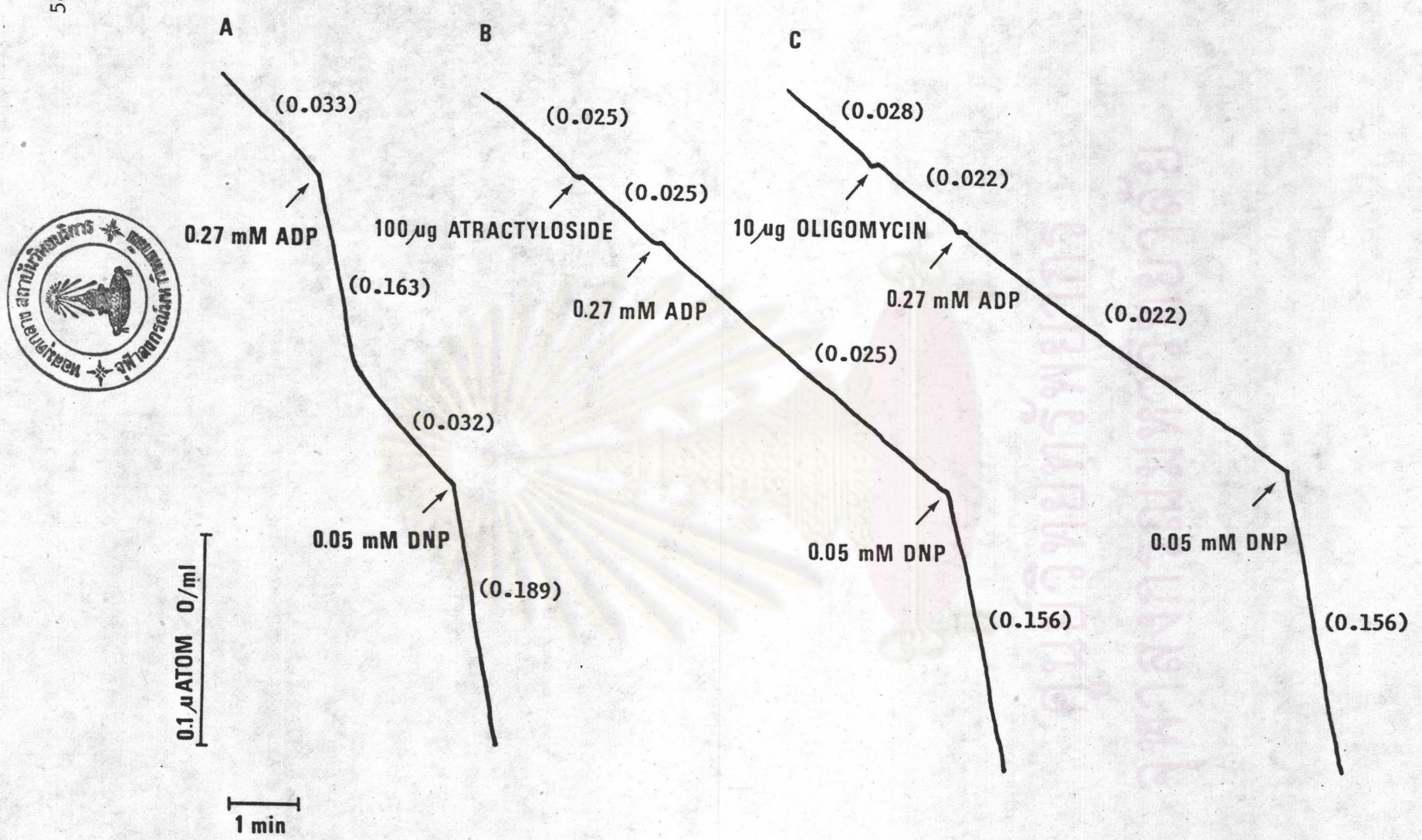
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
P_i LIBERATED (μ moles/mg PROTEIN/10 min)
0 10 25 50 100 150 200 250 300
PIPERINE (μg)

รูปที่ 16 ผลของ atractyloside และ oligomycin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.63 mM, KCl 79.16 mM, potassium phosphate 1.91 mM, potassium glutamate 5.45 mM, potassium malate 5.45 mM และ sucrose 6.81 mM ความเข้มข้นของ ADP และ DNP และปริมาณของ atractyloside และ oligomycin ดังที่แสดงในรูปปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.05 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.84 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
B
C
(0.033)
0.27 mM ADP
(0.163)
(0.032)
0.05 mM DNP
(0.189)
(0.025)
100 µg ATRACTYLOSIDE
(0.025)
0.27 mM ADP
(0.025)
0.05 mM DNP
(0.156)
(0.028)
(0.022)
10 µg OLIGOMYCIN
0.27 mM ADP
(0.022)
0.05 mM DNP
(0.156)
0.1 µATOM O/ml
1 min

ตารางที่ 1

ผลของ oligomycin หรือ atractyloside ที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งถูกกระตุ้นโดยไพเพอรีน

การทดลอง	ปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้น (มคม./โปรตีน (มก.)/10 นาที)	ปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้น (มคม./โปรตีน (มก.)/30นาที)
ไพเพอรีน 250 มคก.	0.54 ± 0.03	0.73 ± 0.04
ไพเพอรีน 250 มคก. + oligomycin 10 มคก.	0.41 ± 0.05	0.41 ± 0.03
ไพเพอรีน 250 มคก. + atractyloside 100 มคก.	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.03

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 35.29 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.06 mM, KCl 73.22 mM, sucrose 16.84 mM, ATP 5.05 mM, ปริมาณของ oligomycin, atractyloside และไพเพอรีนดังที่แสดงในตาราง เติมไพเพอรีนหลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย oligomycin หรือ atractyloside แล้ว 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.67 มล. ค่า Pi ที่เวลา 10 นาที เป็นค่าที่ได้จากค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 5 การทดลอง และค่า Pi ที่เวลา 30 นาที เป็นค่าที่ได้จากค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก 12 การทดลอง

ตารางที่ 2

ผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียเมื่อมี atractyloside ในขนาดต่าง ๆ

ปริมาณของ atractyloside (มคก.) + ไพเพอรีน 250 มคก.	ปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้น (มคม./โปรตีน (มก.)/30 นาที)
50	0.59 ± 0.07
100	0.54 ± 0.07
150	0.52 ± 0.06
200	0.51 ± 0.06
250	0.50 ± 0.05
ไพเพอรีน 250 มคก.	0.66 ± 0.07

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 35.29 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.06 mM, KCl 73.22 mM, sucrose 16.84 mM, ATP 5.05 mM, ปริมาณของ atractyloside และไพเพอรีน ดังที่แสดงในตาราง เติมไพเพอรีนหลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย atractyloside แล้ว 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมไพเพอรีนแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.97 มล. ค่า Pi เป็นค่าที่ได้จากค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จาก 6 การทดลอง

ขึ้นไปอีกถึง 250 มคก. ก็จะมีผลยับยั้งฤทธิ์ของไพเพอรีนเพิ่มขึ้นบ้าง แต่ก็เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

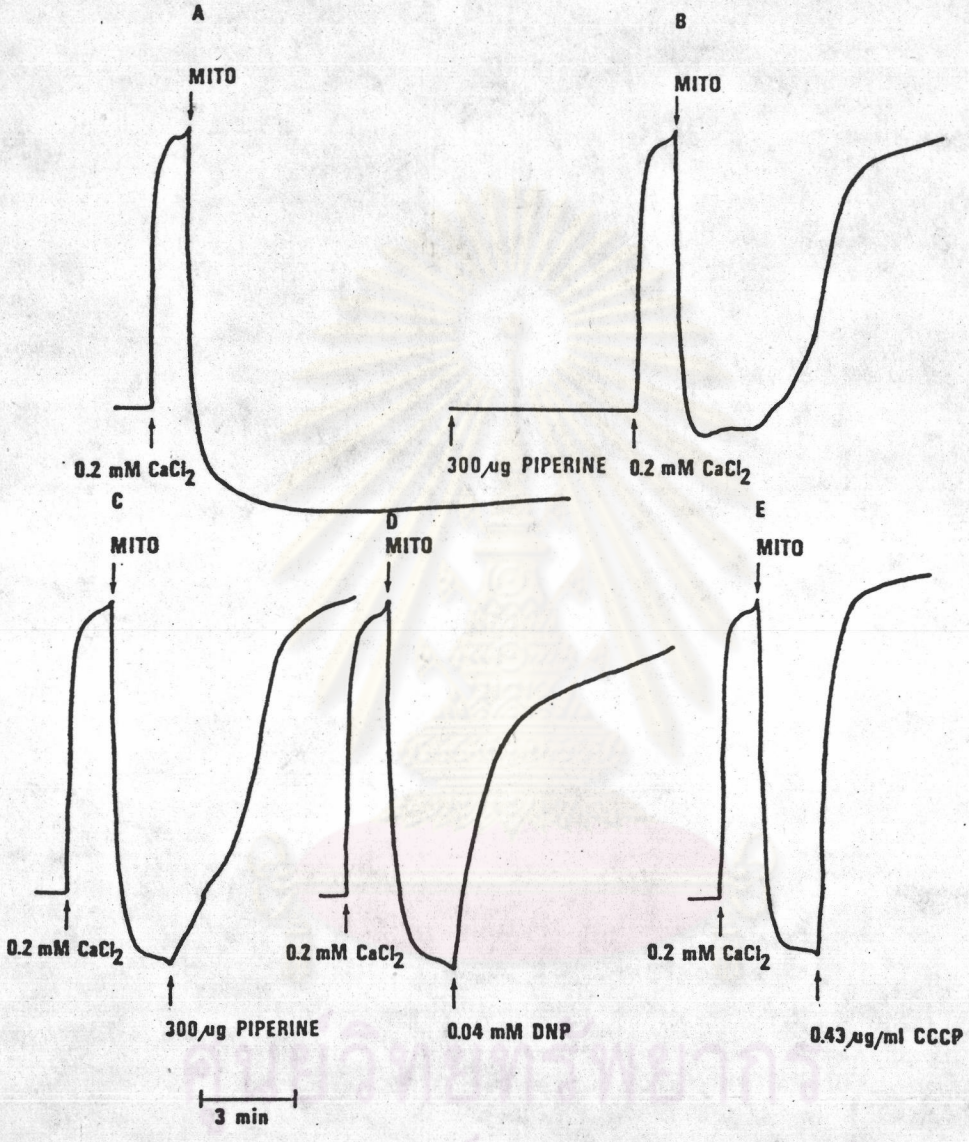
4. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย

จากการที่ไพเพอรีนสามารถยับยั้งกระบวนการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวดังการทดลองที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น ชี้แนะว่าสารนี้ควรจะมีผลยับยั้งการสะสมแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย ดังนั้นจึงมีการทดลองเพิ่มขึ้นเพื่อศึกษาผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรียโดยใช้วิธีวัดระดับแคลเซี่ยมใน medium โดยตรงด้วย calcium-selective electrode ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 17 curve A แสดง control response ซึ่งใช้ glutamate+malateเป็น substrate หลังจากใส่ $CaCl_2$ ในขนาด 0.2 mM ลงใน medium ปริมาณของแคลเซี่ยมใน medium จะสูงขึ้นโดยการวัดด้วย calcium-selective electrode ต่อมาใส่ไมโตคอนเดรีย จะเห็นว่าปริมาณของแคลเซี่ยมใน medium จะลดลง เนื่องจากไมโตคอนเดรียมีการสะสมแคลเซี่ยมเข้าไปไว้ในตัวมัน และไม่มีการปลดปล่อยแคลเซี่ยมถึงแม้จะ incubate เป็นเวลานาน 10 นาที เมื่อ preincubate ด้วยไพเพอรีนในขนาด 300 มคก. (curve B)พบว่าไมโตคอนเดรียเก็บสะสมแคลเซี่ยมได้น้อยลงและจะปลดปล่อยแคลเซี่ยมที่สะสมไว้ออกมา ส่วน curve C ใส่ไพเพอรีนในขนาดเดียวกัน (300 มคก.) หลังจากที่ไมโตคอนเดรียสะสมแคลเซี่ยมไปแล้วเป็นเวลา 2 นาที พบว่าไมโตคอนเดรียจะเริ่มปลดปล่อยแคลเซี่ยมออกมาก่อน 10 นาที ส่วน curve D จะแสดงผลของ DNP ซึ่งทำหน้าที่เป็น uncoupling agent โดยใช้ในขนาด 0.04 mM โดย DNP จะไป uncouple ไมโตคอนเดรีย ทำให้ไมโตคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซี่ยมออกมาจนหมด ทำนองเดียวกันใน curve E ใช้ CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone) ในขนาด 0.43 มคก. ต่อ มล. ซึ่งเป็น uncoupling agent ที่แรงมาก โดยจะไป uncouple ไมโตคอนเดรีย ทำให้ไมโตคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซี่ยมออกมาจนหมดอย่างรวดเร็วมาก

รูปที่ 18 ใช้ succinate เป็น substrate แทน glutamate + malate ซึ่งผลการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 17 แต่ข้อที่พึงสังเกต คือจาก curve B เมื่อ preincubate ด้วยไพเพอรีนในขนาดเดียวกัน (300 มคก.) พบว่าความสามารถของไมโตคอนเดรียในการสะสมแคลเซี่ยมจะลดลงอย่างมากและแคลเซี่ยมที่ถูกสะสมจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็วกว่าเมื่อ

รูปที่ 17 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ glutamate รวมกับ malate เป็น substrate ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 1.91 mM, KCl 87.75 mM, potassium phosphate 0.48 mM, potassium glutamate 5 mM, potaasium malate 5 mM, sucrose 10.22 mM, ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และ DNP และปริมาณของ CCCP และไพเพอรีนดังแสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.88 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 7.34 มล.

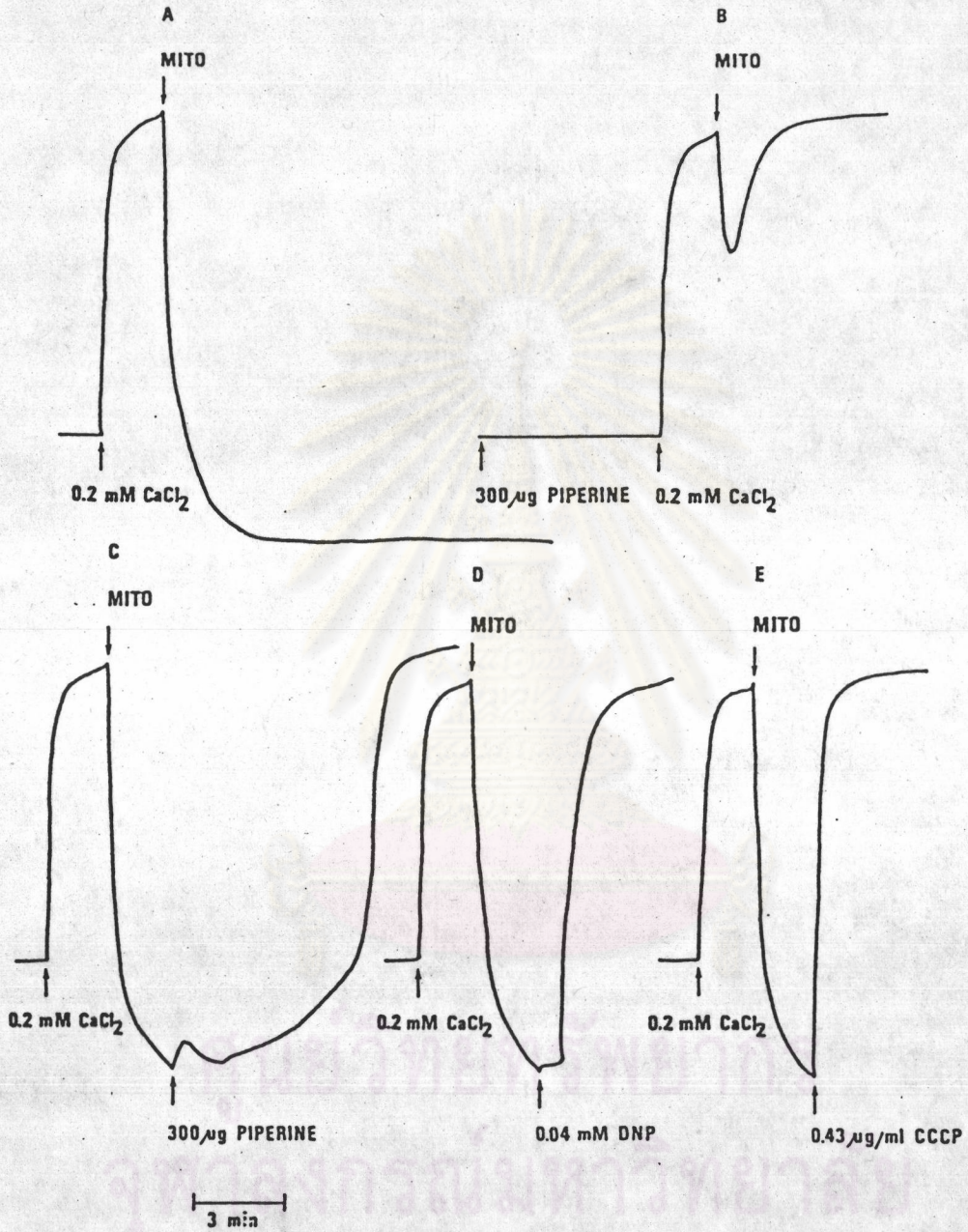
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
MITO
0.2 mM CaCl2
B
MITO
300/ug PIPERINE
0.2 mM CaCl2
C
MITO
0.2 mM CaCl2
300/ug PIPERINE
D
MITO
0.2 mM CaCl2
0.04 mM DNP
E
MITO
0.2 mM CaCl2
0.43/ug/ml CCCP
3 min

รูปที่ 18 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 1.91 mM, KCl 87.75 mM, potassium phosphate 0.48 mM, potassium succinate 5 mM, sucrose 10.22 mM, ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และ DNP และปริมาณของ CCCP และไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.88 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 7.34 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
MITO
0.2 mM $CaCl_2$
B
MITO
300/ug PIPERINE
0.2 mM $CaCl_2$
C
MITO
0.2 mM $CaCl_2$
300/ug PIPERINE
D
MITO
0.2 mM $CaCl_2$
0.04 mM DNP
E
MITO
0.2 mM $CaCl_2$
0.43/ug/ml CCCP
3 min

เปรียบเทียบกับ curve B ในรูปที่ 17 ซึ่งใช้ glutamate + malate เป็น substrate

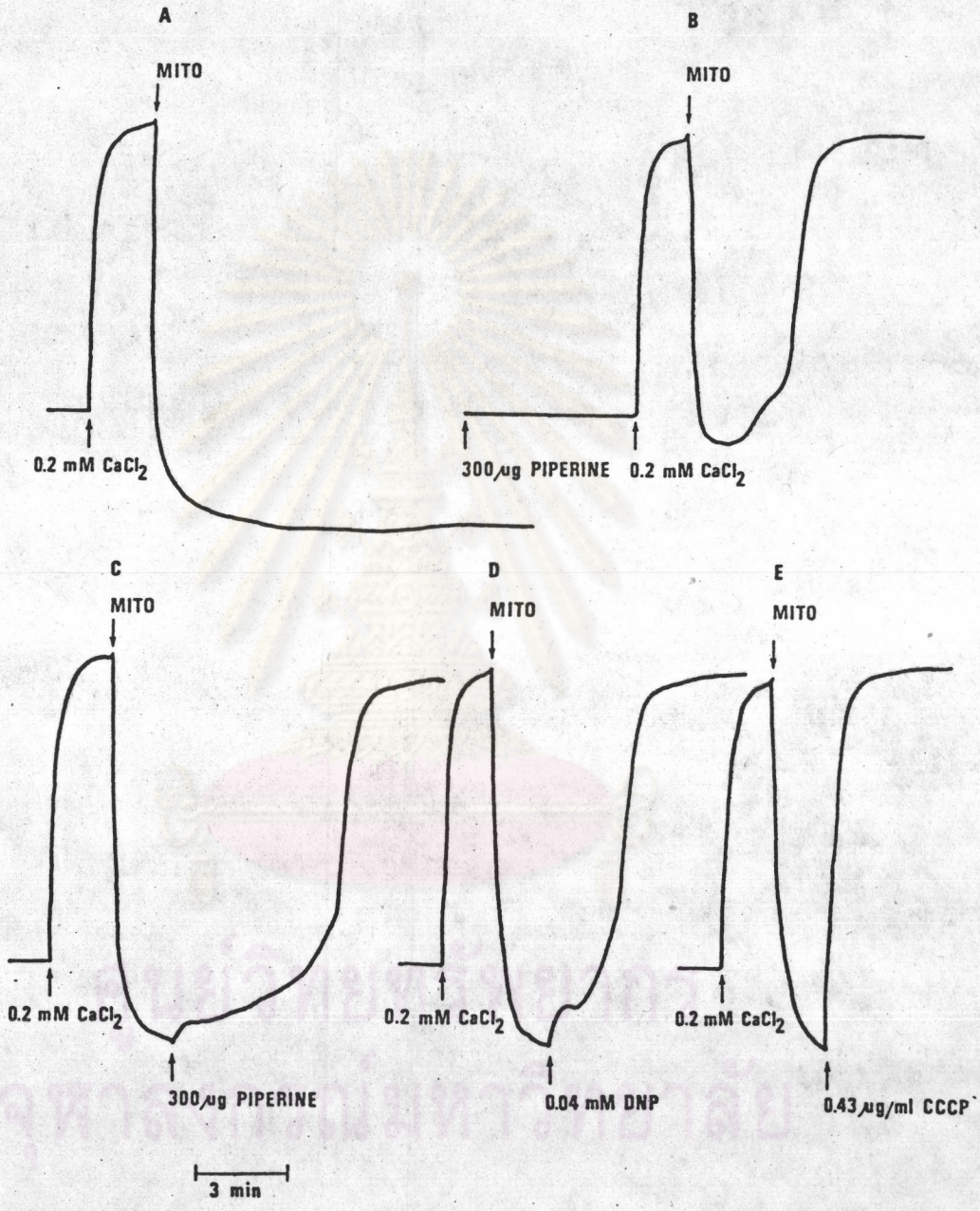
รูปที่ 19 ใช้ ATP แทน substrate ซึ่ง ATP จะทำหน้าที่ให้พลังงานแก่ไมโต-คอนเดรียในการสะสมแคลเซี่ยม ซึ่งผลการทดลองก็ทำนองเดียวกับการใช้ glutamate + malate เป็น substrate แต่จาก curve B จะเห็นว่าการปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย เมื่อมีไพเพอรีนจะช้ากว่ากรณีที่ใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็น substrate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ ATP แทน substrate

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ : HEPES buffer 38.41 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 1.92 mM, KCl 88.35 mM, potassium phosphate 0.48 mM, sucrose 8.57 mM, ATP 2.86 mM, ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และ DNP และปริมาณของ CCCP และไพเพอรีนดังที่แสดงในรูป ปริมาณของไมโตคอนเดรียโปรตีน 1.29 มก./มล. ปริมาตรทั้งหมด 7.29 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A
MITO
0.2 mM CaCl2
B
MITO
300/ug PIPERINE
0.2 mM CaCl2
C
MITO
0.2 mM CaCl2
300/ug PIPERINE
D
MITO
0.2 mM CaCl2
0.04 mM DNP
E
MITO
0.2 mM CaCl2
0.43/ug/ml CCCP
3 min