บทที่ 3

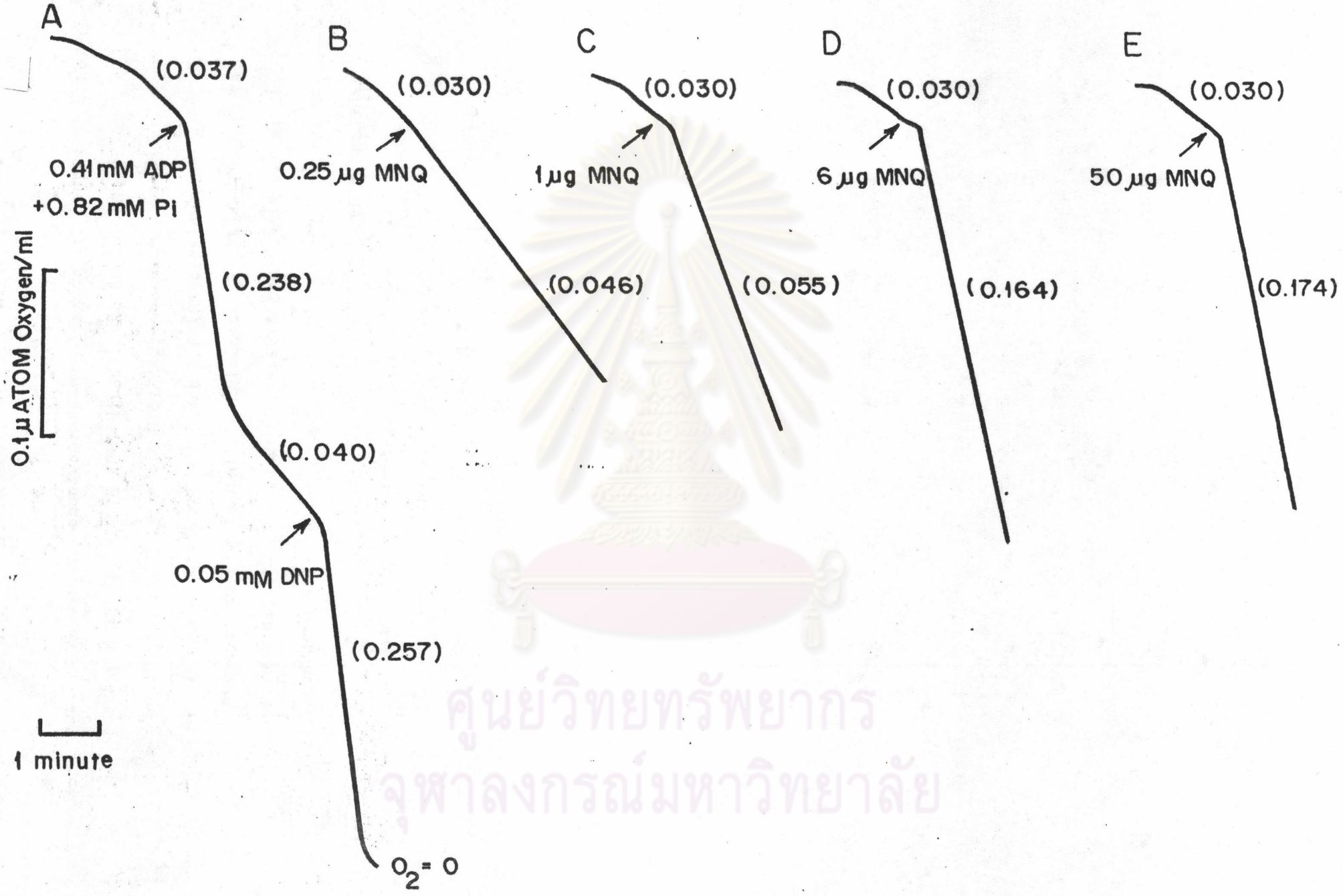
ผลการวิจัย

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

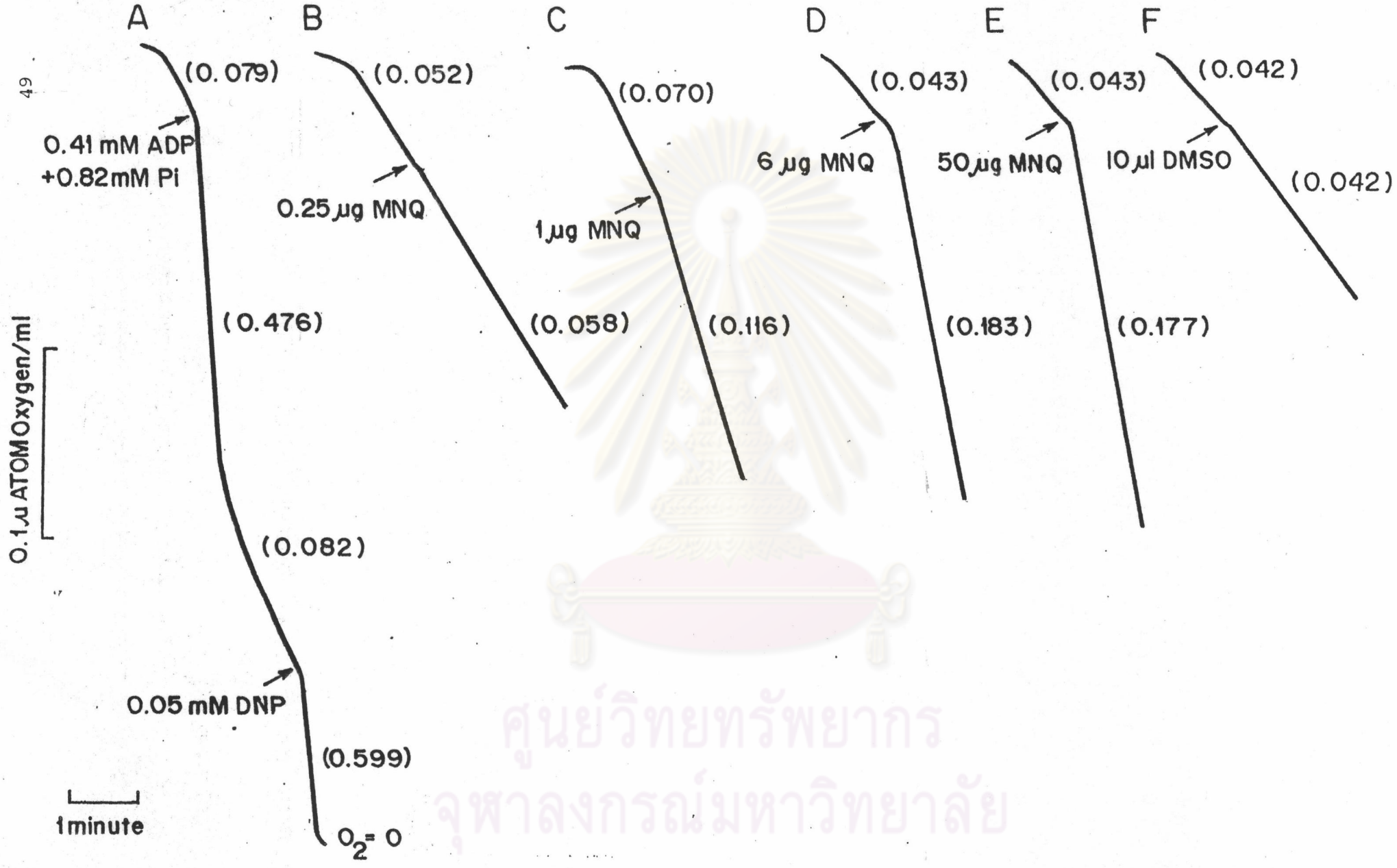
1. ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

1.1 ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาดต่างๆที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ดังแสดงไว้ในรูปที่ 16

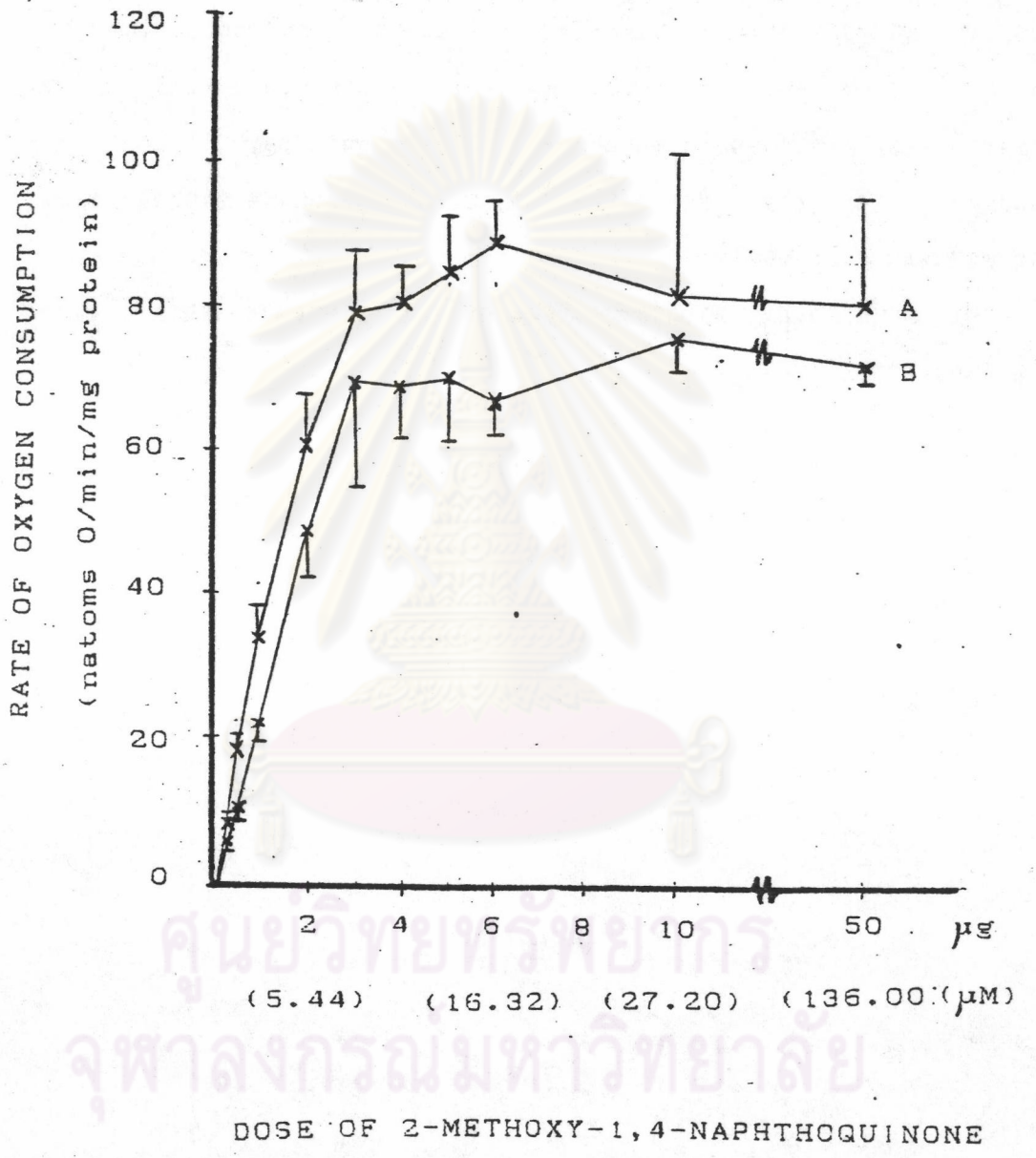
รูปที่ 16 A แสดง respiratory response ตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ คำณวณออกมาเป็น จำนวนมคอ.ออกซิเจน/มล./นาที กำกับอยู่ที่ระยะต่างๆของการหายใจของไมโตคอนเดรีย ในระยะแรกตามรูปที่ 16 A ซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียงไมโตคอนเดรียที่กระจายตัวอยู่ใน incubation medium ที่มีสับสเตรทเป็น glutamate + malate ในปริมาณมากเกินพอ(excess) ที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะ state 4 respiration นี้ยังคงต่ำอยู่(0.037) ซึ่งต่อไปเมื่อมีการเติม ADP+Pi ทำให้ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ดังนั้น ADP+Pi ที่เติมลงไปจะเร่งให้อัตราการหายใจของ state 3 respiration สูงขึ้น(0.238) จนกระทั่ง ADP ถูกใช้ไปหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะช้าลง(0.040) เข้าสู่ state 4 respiration อีกครั้งหนึ่ง (และเรียกการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP ว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) และจะใช้ค่า respiratory control index (RCI) เป็นการบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ค่า RCI จะคำนวนได้จากอัตราการหายใจใน state 3/อัตราการหายใจใน state 4 ในรูปที่ 16 A ค่า RCI = 0.238/0.040 = 5.95 และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้ว่าจะไม่มี ADP (บทที่ 1)เรียกระยะนี้ว่า state 3



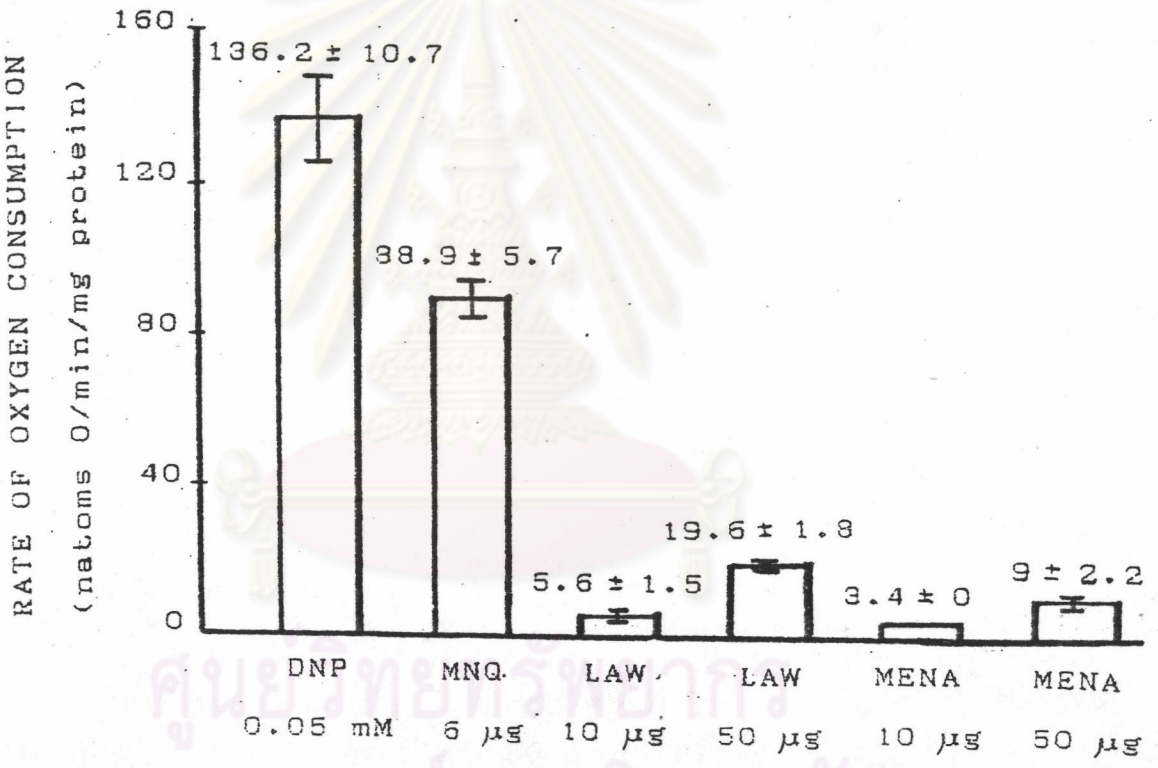
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



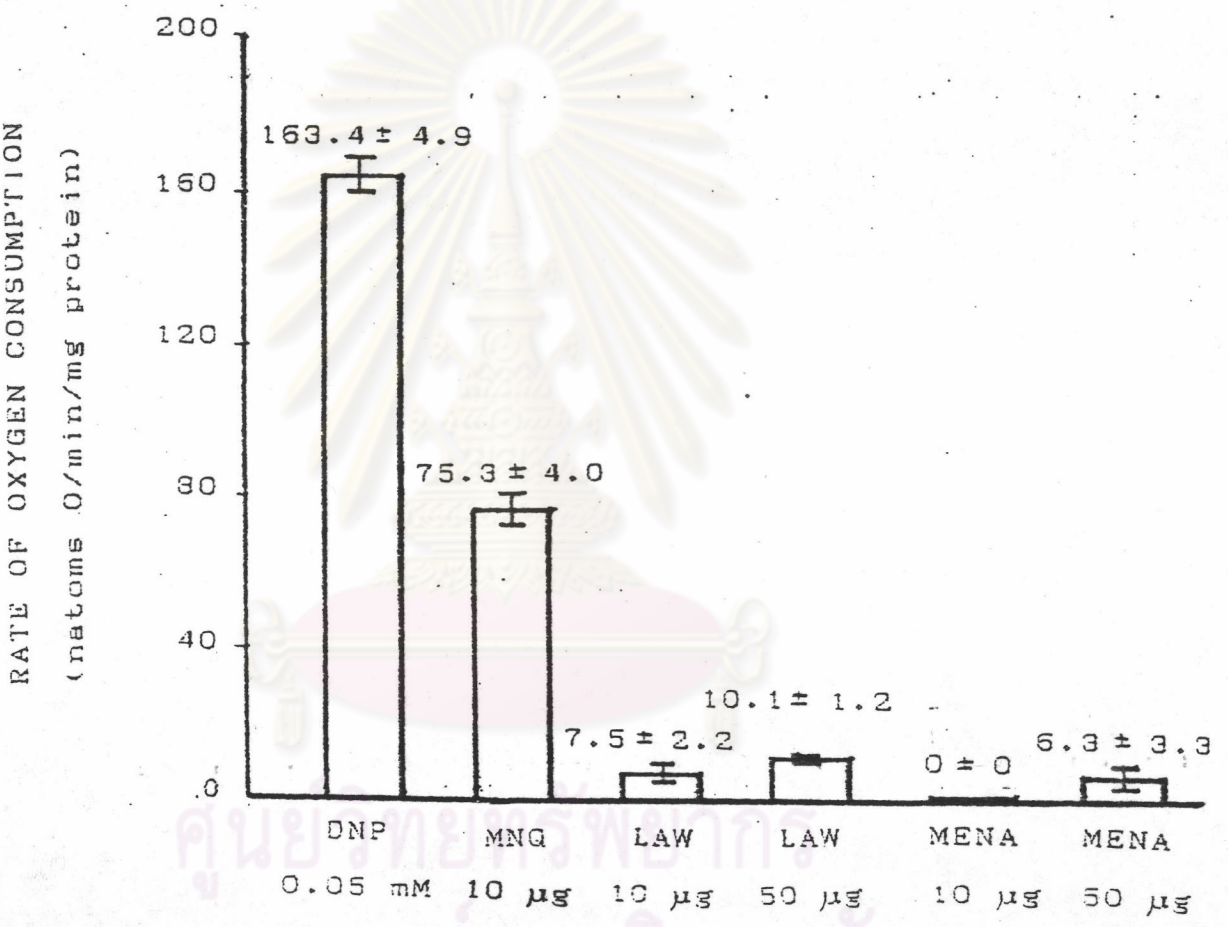
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



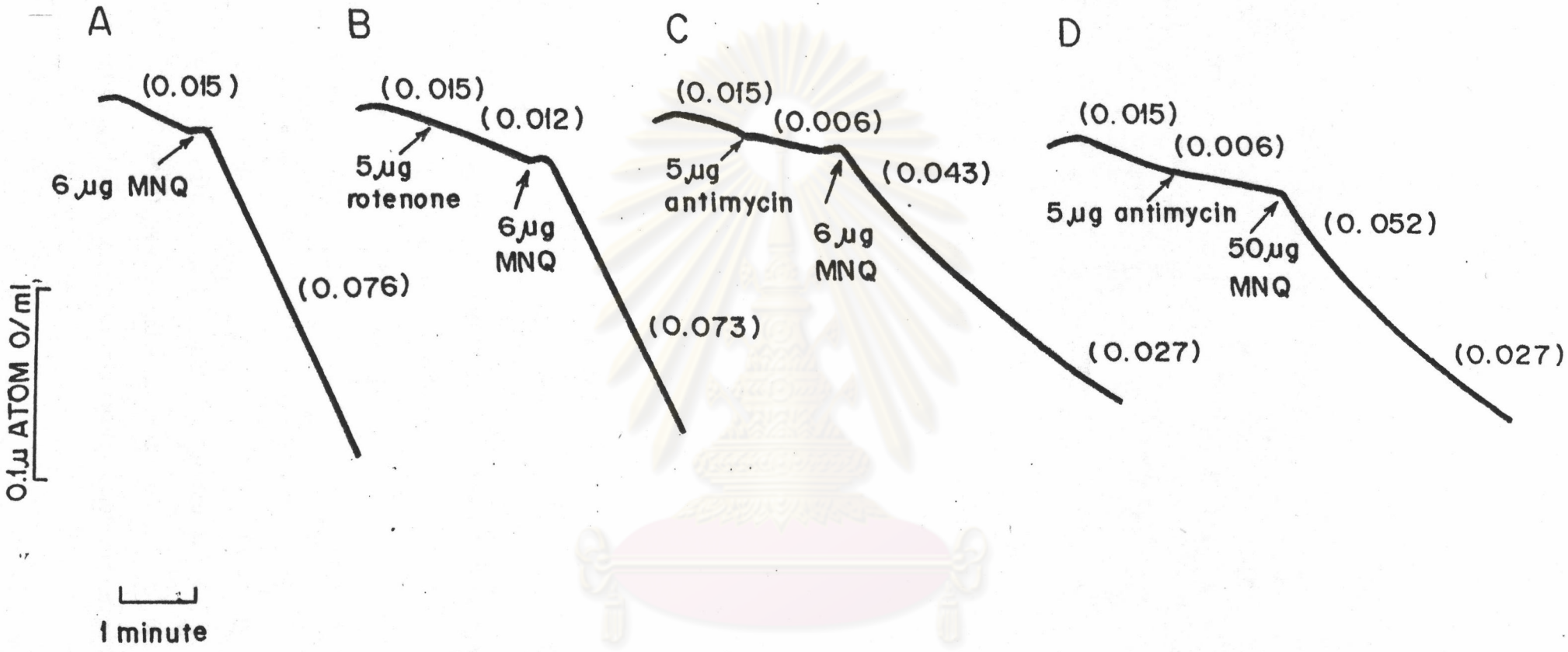
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



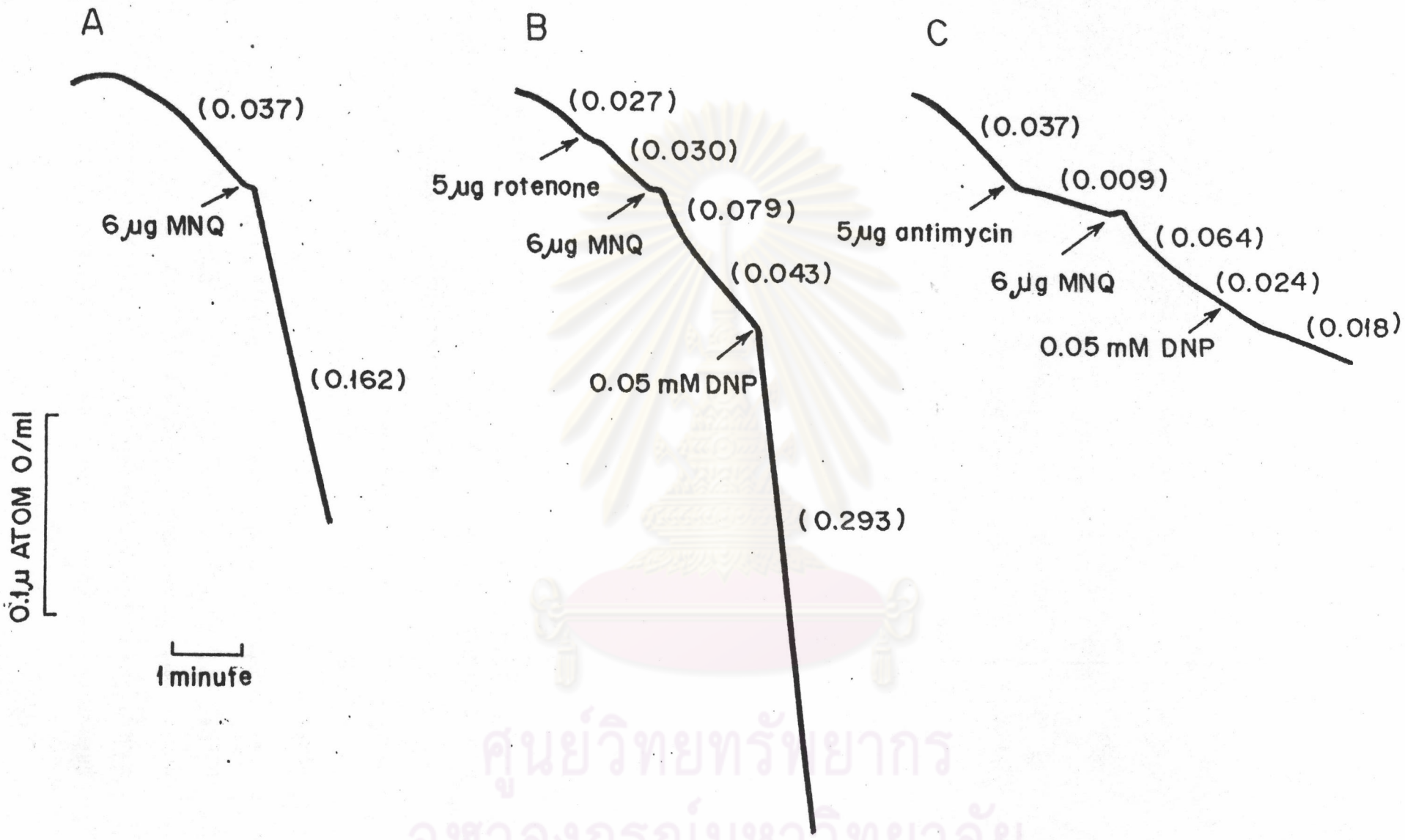
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



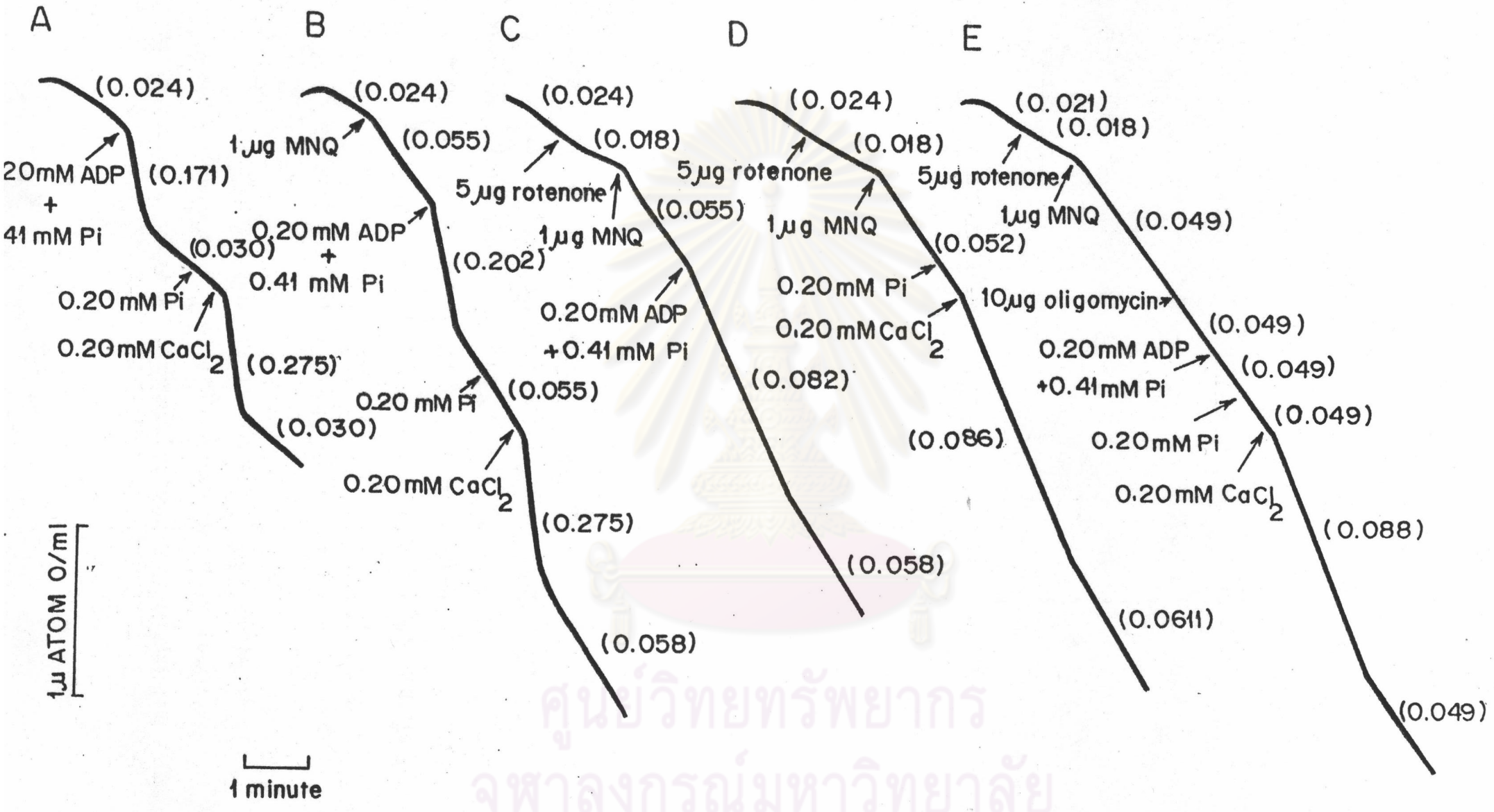
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



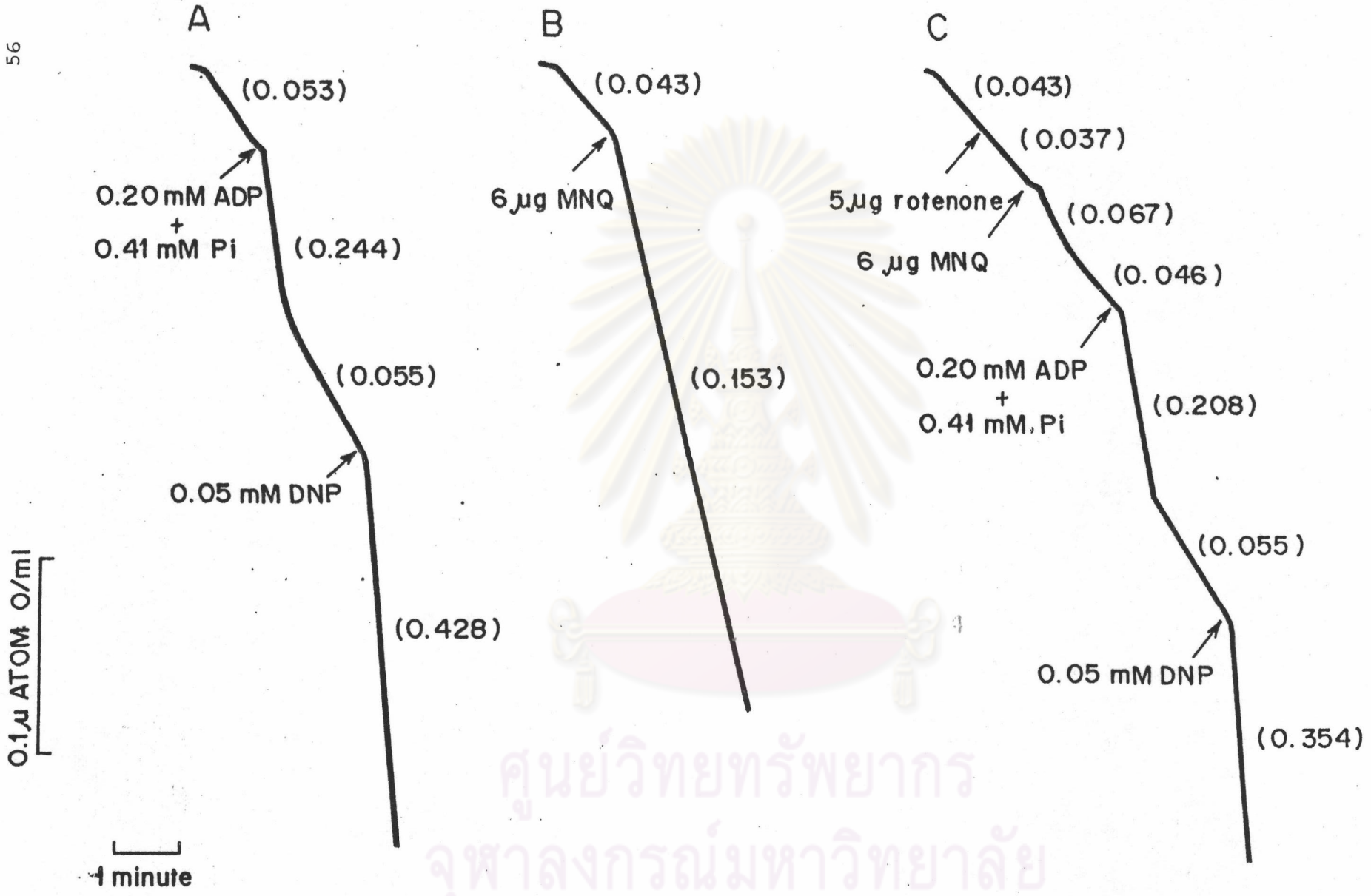
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



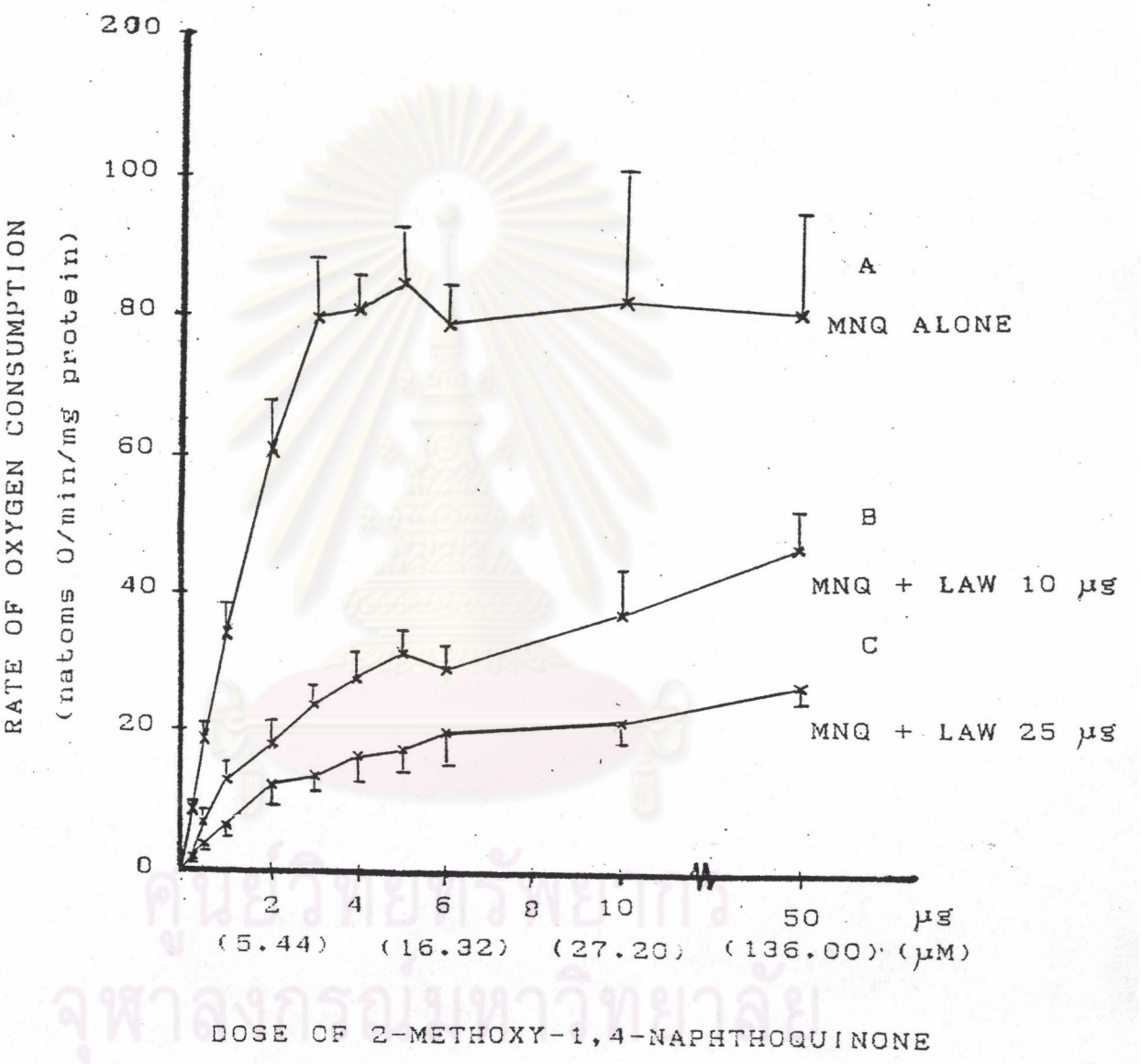
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


RATE OF OXYGEN CONSUMPTION
(natoms O/min/mg protein)
200
100
80
60
40
20
0
A
MNQ ALONE
B
MNQ + LAW 10 µg
C
MNQ + LAW 25 µg
2
4
6
8
10
50
µg
(5.44)
(16.32)
(27.20)
(136.00)
(µM)
DOSE OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว รวมทั้ง % inhibition เมื่อมี 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เพียงชนิดเดียว และเมื่อให้ร่วมกับ lawsone 50 มคก. หรือ menadione 50 มคก.เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.33 mM pH 7.2, $MgCl_2$ 1.87 mM, KCl 85.87 mM, potassium glutamate 5.13 mM, potassium malate 5.13 mM, sucrose 12.82 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.09 มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.95 มล.

ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 4 การทดลอง

Experiment	rate of O_2 consumption (µatom/min/mg protein)	%inhibition
MNQ 6 µg	0.0889 ± 0.0057	0
MNQ 6 µg + lawsone 50 µg	0.0064 ± 0.0014	92.8
MNQ 6 µg + menadione 50 µg	0.0341 ± 0.0009	61.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดง dose-response ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 35.53 pH 7.2, $MgCl_2$ 1.78 mM, KCl 83.85 mM, sucrose 12.69 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.65 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ดังแสดงในตาราง และ ATP 5.08 mM เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone แล้ว 1 นาที

ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 4 การทดลอง ปริมาตรสุดท้ายของการทดลอง 1.97 มล

addition	Pi liberated (µmoles/mg protein/10 min) $\bar{X} \pm SE$
None	0.03±0.01
MNQ 0.5 µg	0.19±0.04 * P < 0.05
MNQ 1 µg	0.19±0.03 * P < 0.05
MNQ 3 µg	0.23±0.05 * P < 0.05
MNQ 5 µg	0.17±0.05 * P < 0.05
MNQ 6 µg	0.16±0.03 * P < 0.05
MNQ 10 µg	0.20±0.04 * P < 0.05
MNQ 50 µg	0.19±0.04 * P < 0.05

* significant เทียบกับ กลุ่ม None

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดง dose-response ของผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆที่มีต่อผลของ DNP-activated ATPase activity เปรียบเทียบกับผลของ oligomycin ในการยับยั้ง DNP-activated ATPase ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

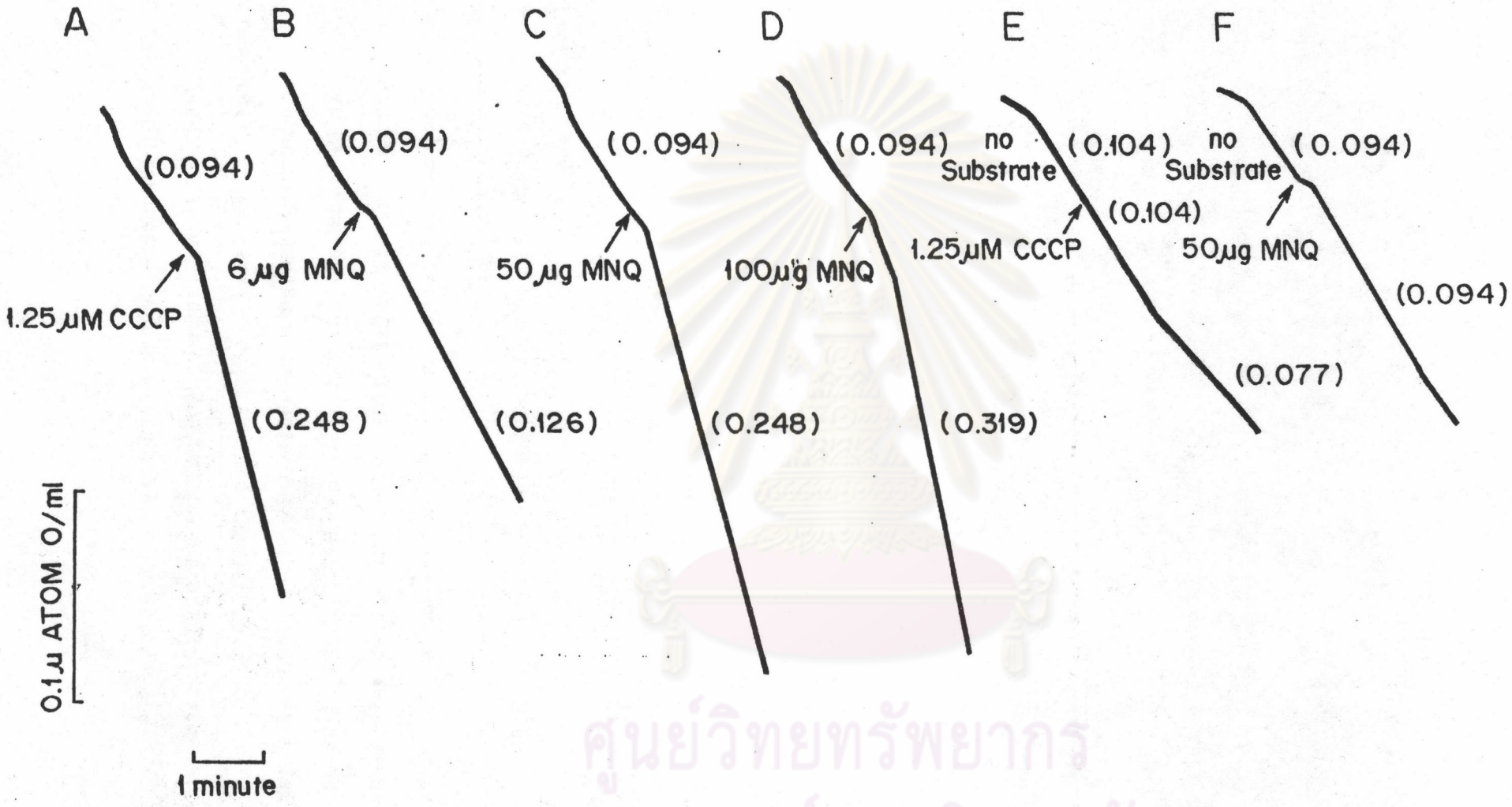
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 35.53 pH 7.2, $MgCl_2$ 1.78 mM, KCl 83.85 mM, sucrose 12.69 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.68 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงในตาราง และ ATP 5.08 mM ปริมาตรทั้งหมด 1.97 มล. เติมตัวยาต่างๆลงไป preincubate ไมโตคอนเดรียตามลำดับดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาทีเติม ATP หลังจากเติมตัวยาต่างๆครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที เช่นกัน

ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 4 การทดลอง ปริมาตรสุดท้ายของการทดลอง 1.97 มล

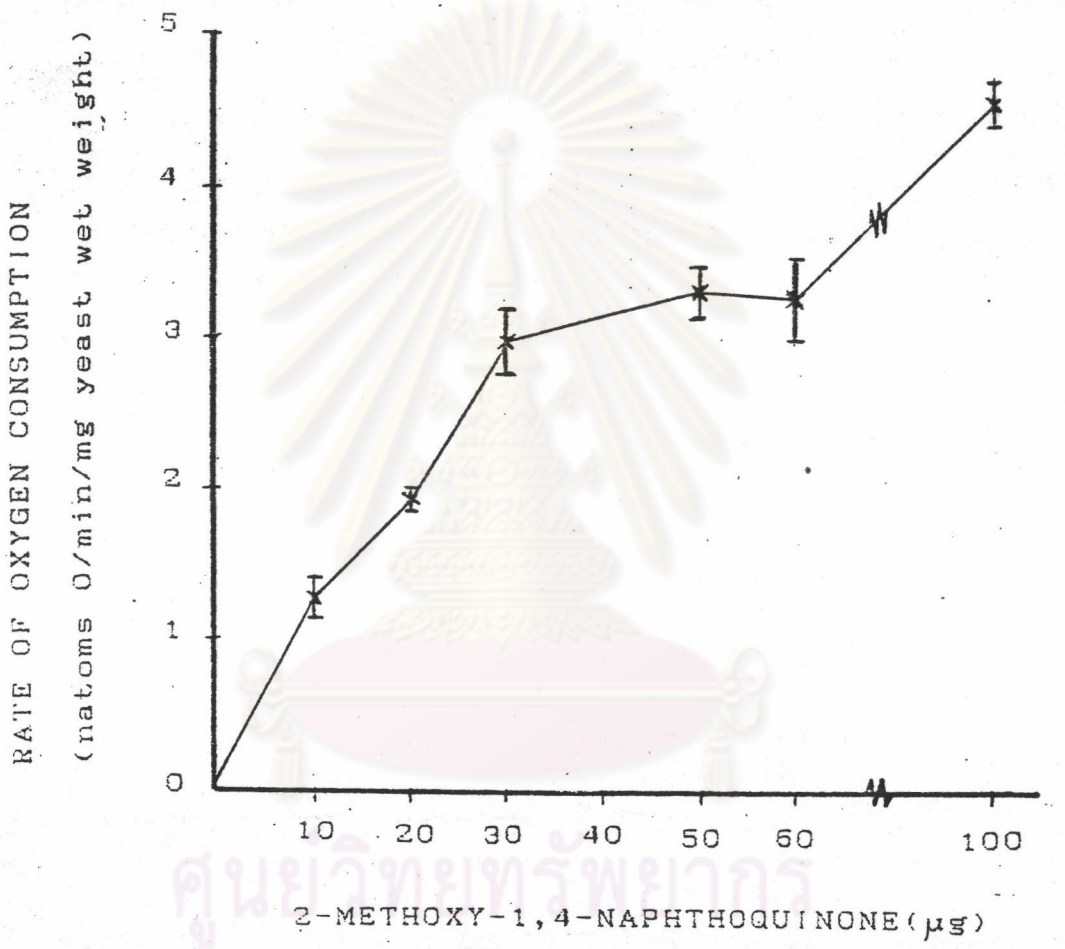
addition	Pi liberated (μmoles/mg protein/10 min) $\bar{X} \pm$ SE	
NONE	0.03± 0.01	
0.1 mM DNP(control)	2.56±0.09	
0.1 mM DNP after oligomycin 10 μg	0.38±0.04	* P < 0.05
0.5 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.31±0.29	NS
1 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.47±0.05	NS
3 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.38±0.15	NS
5 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.34±0.14	NS
6 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.34±0.12	NS
10 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.49±0.11	NS
50 μg MNQ after 0.1 mM DNP	2.37±0.11	NS

* = significant เทียบกับ control DNP alone

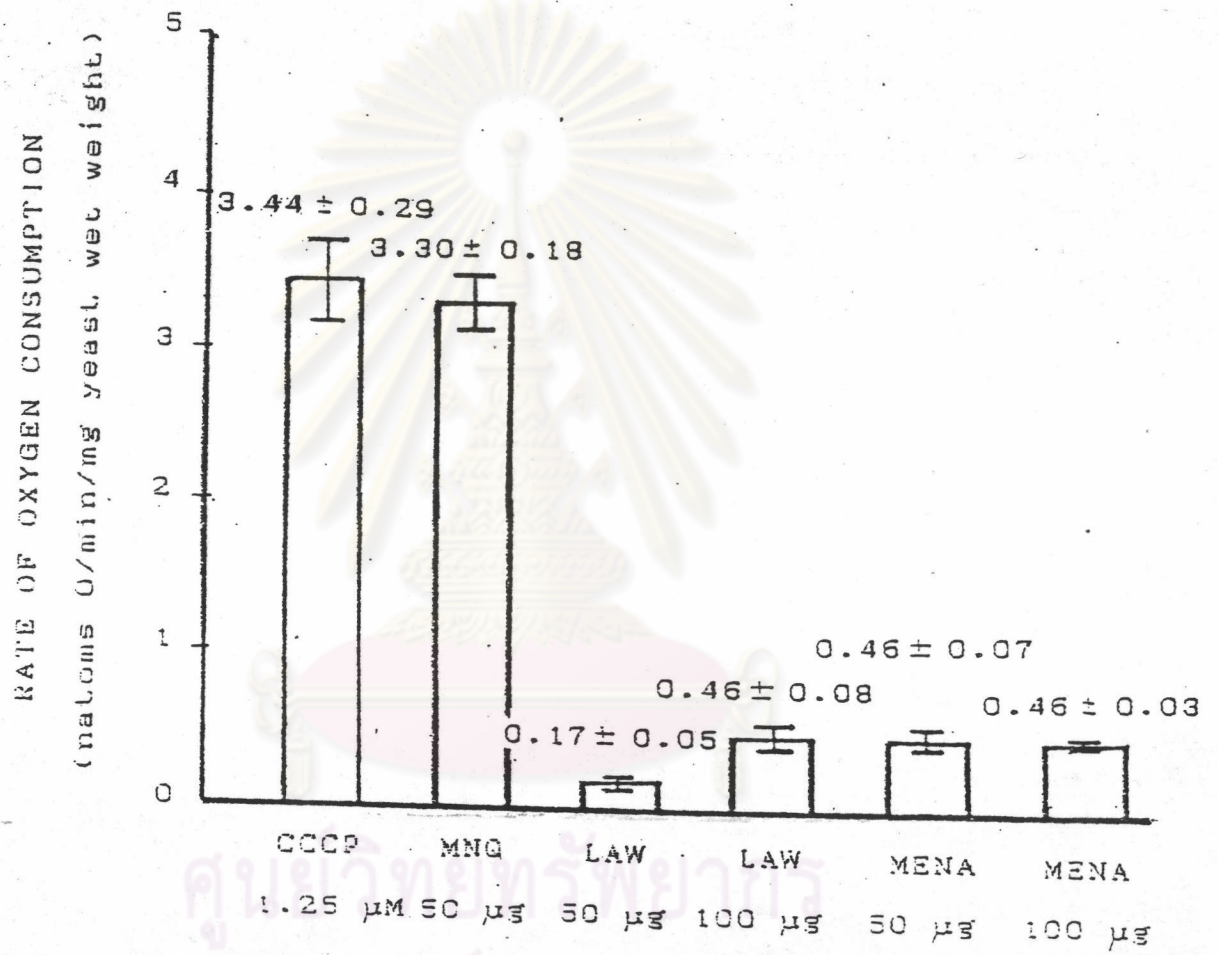
NS = not significant เทียบกับ control DNP alone



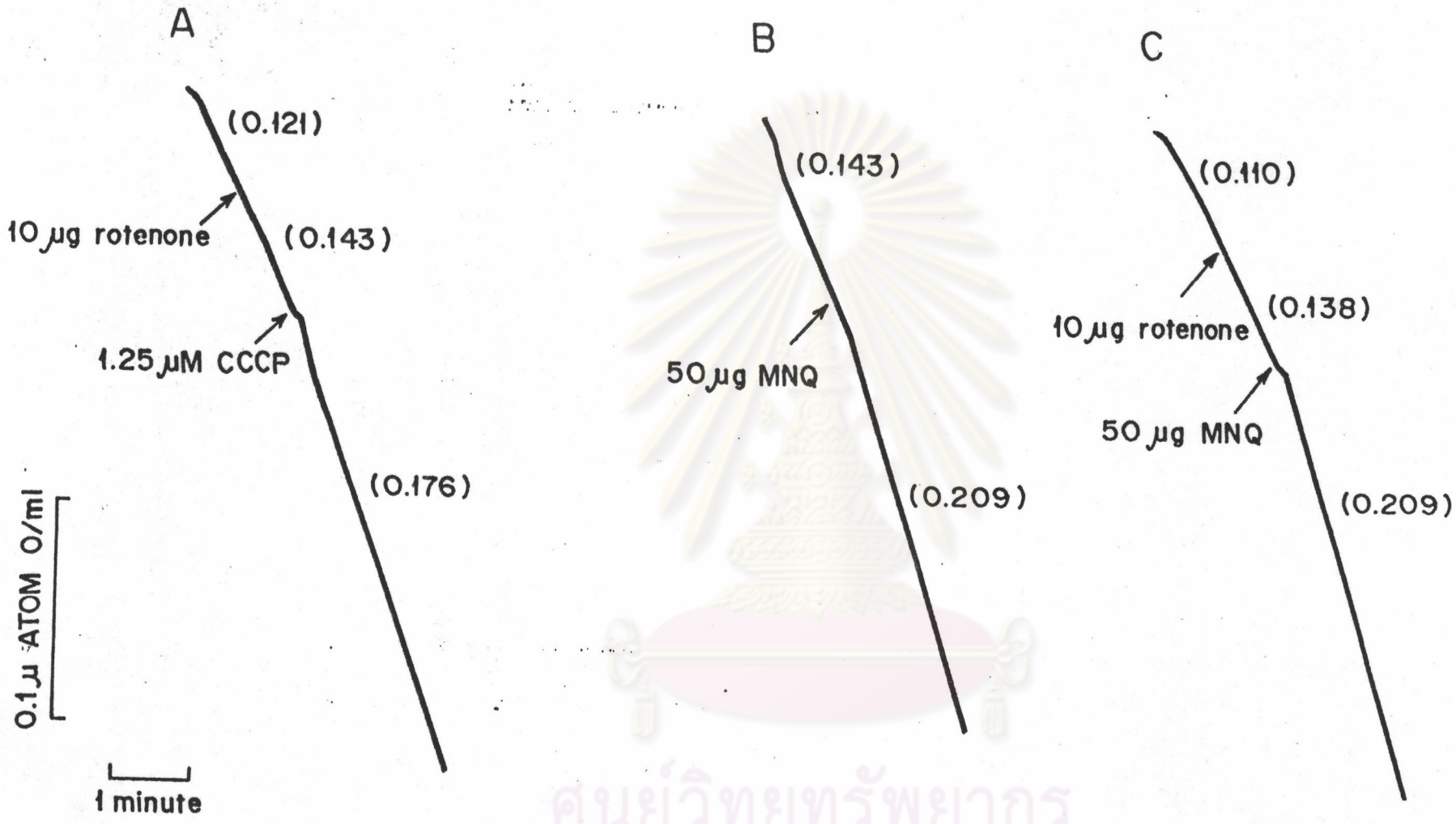
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



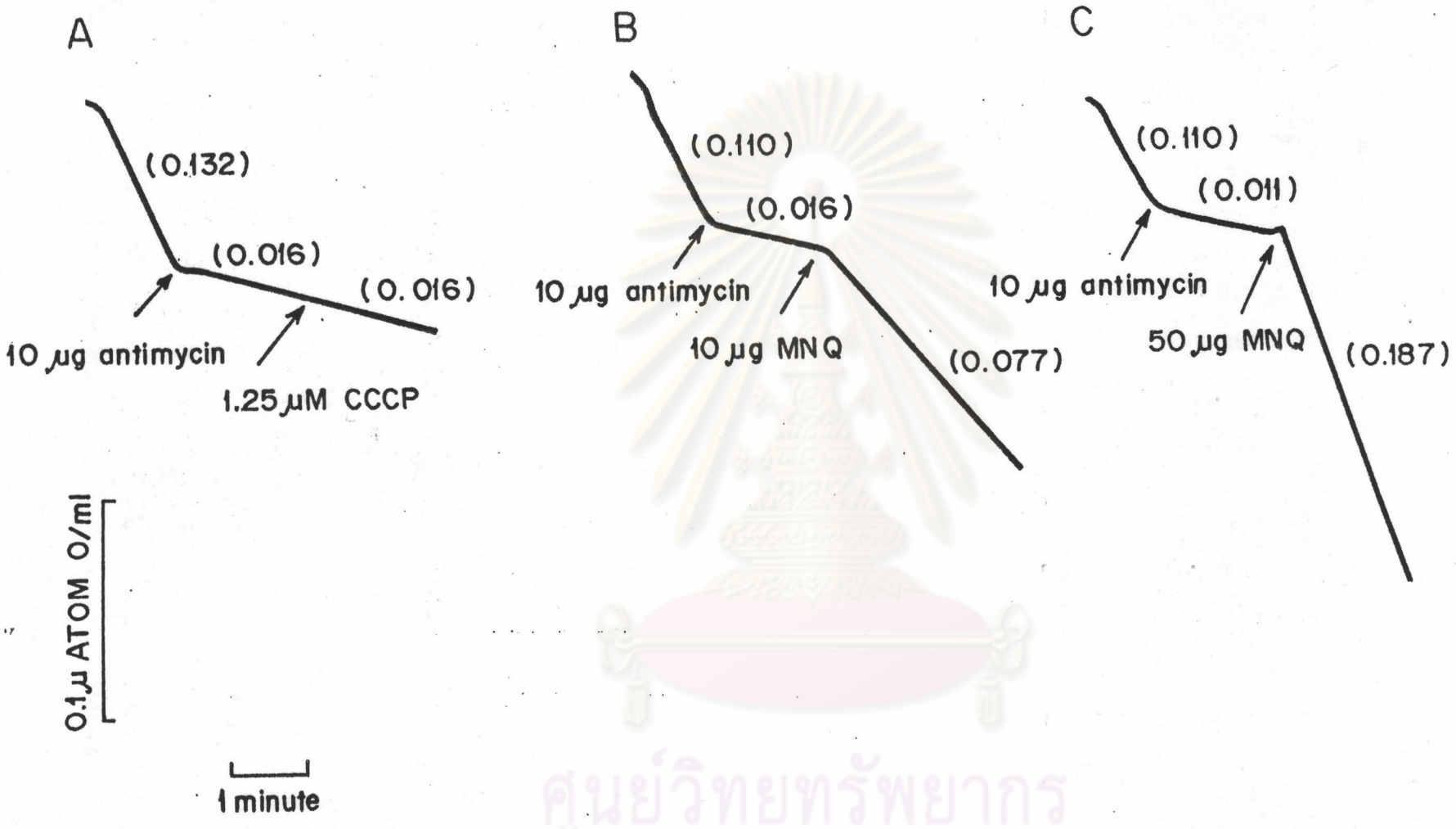
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



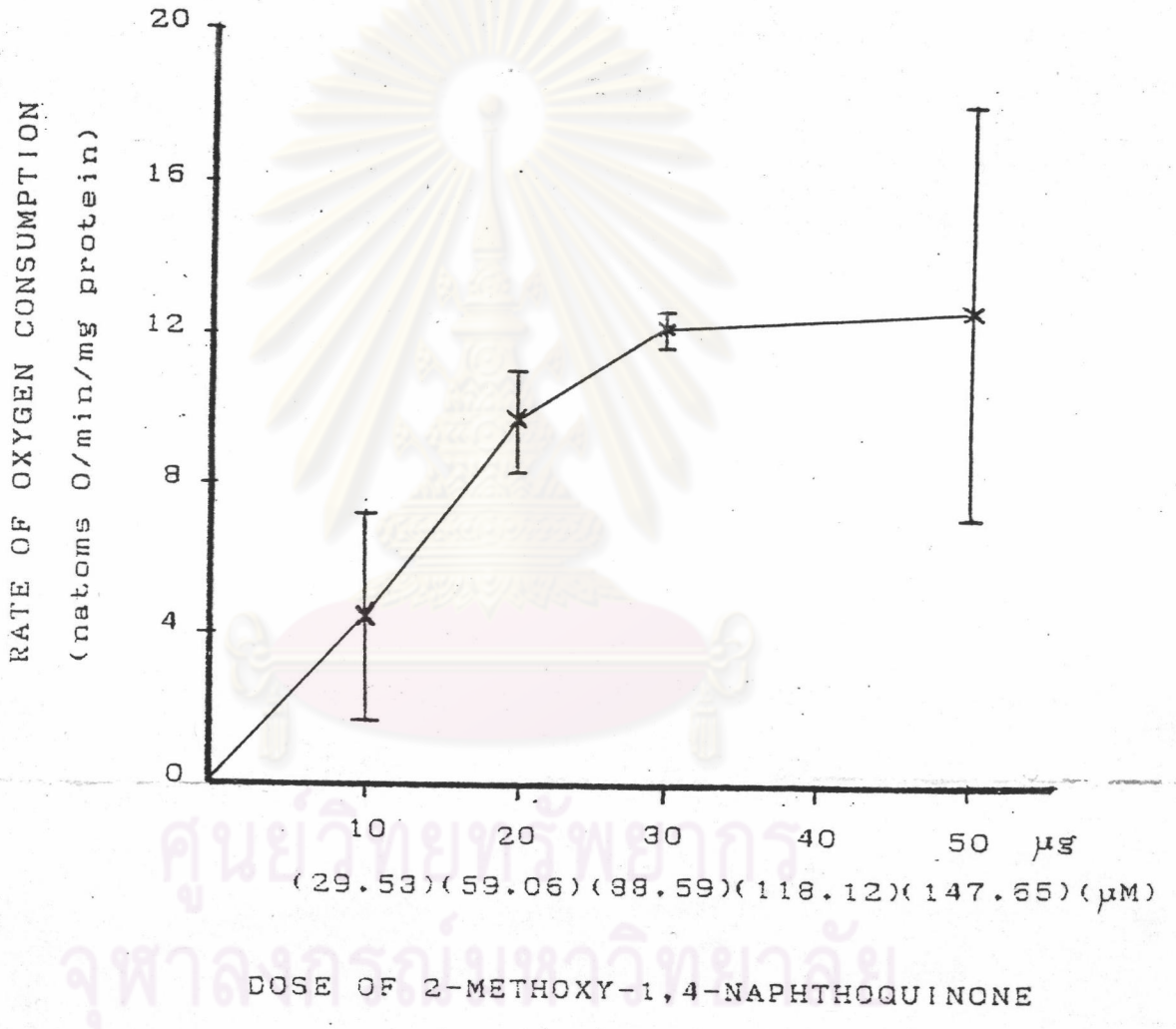
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

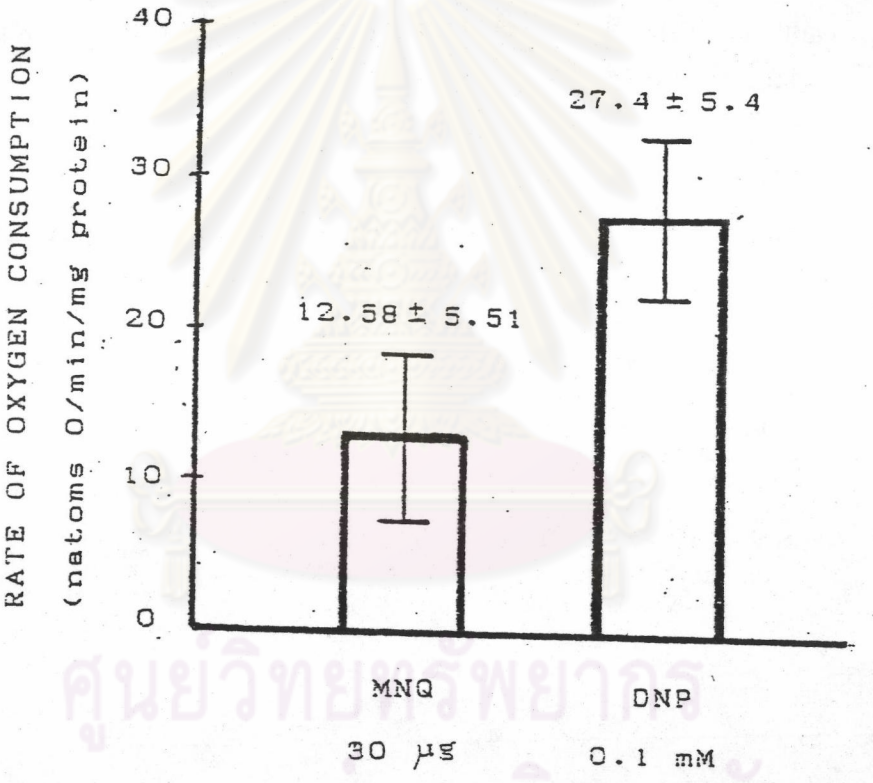


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

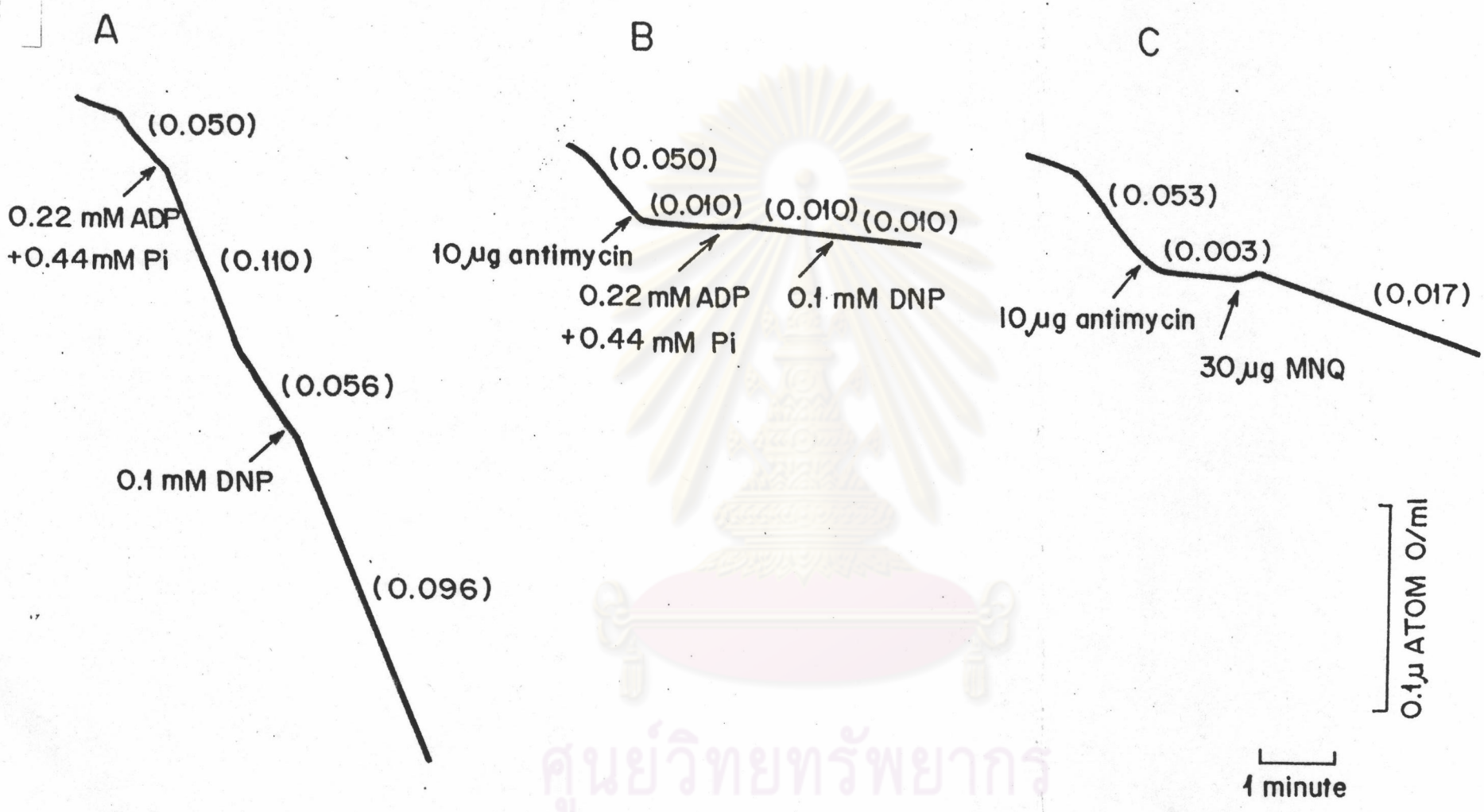


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


RATE OF OXYGEN CONSUMPTION
(natoms O/min/mg protein)
20
16
12
8
4
0
10
20
30
40
50 µg
(29.53)(59.06)(88.59)(118.12)(147.65)(µM)
DOSE OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนจะสูงขึ้นมาก(0.257) และมีการใช้ออกซิเจนติดต่อกันไปจนกระทั่งหมดไปในที่สุด(O_2=0)

ตามรูปที่ 16 B,C,D และ E แสดงให้เห็นว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ก็สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ในลักษณะเดียวกับ DNP คือในภาวะที่ไม่มี ADP และกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้มากขึ้นตามขนาดที่ใช้กล่าวคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 0.25 มคก. สามารถกระตุ้น state 4 respiration ทำให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 0.046 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเพิ่มเป็น 0.055,0.164 และ 0.174 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อเพิ่มขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็น 1,6 และ 50 มคก. ตามลำดับ

ในรูปที่ 17 ทำการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 16 ต่างกันเพียงสับสเตรทที่เปลี่ยนเป็นใช้ succinate ซึ่งผลที่ได้ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาดต่ำๆจะกระตุ้น state 4 respiration น้อย และเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เพิ่มขึ้นจนถึงขนาดสูงสุด ตามรูปที่ 17 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 0.25 มคก. กระตุ้นการหายใจมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 0.058 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อเพิ่ม 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็น 1,6 และ 50 มคก. จะเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของ state 4 respiration เป็น 0.116,0.183 และ 0.177 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับ นอกจากนั้นในรูปที่ 17 F แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เพียงอย่างเดียวไม่มีผลกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นได้

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาดต่างๆ ที่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ดังแสดงไว้ในรูปที่ 18 A state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone จาก 2 มคก.(5.44 มค.โมล่าร์)และสูงสุดเมื่อมีปริมาณ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 6 มคก.(16.32 มค.โมล่าร์) และถ้าใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มากไปกว่านี้ กลับพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของ state 4 respiration จะลดลงในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ succinate

เป็นสับสเตรทตามรูป 18 พบว่า state 4 respiration จะเพิ่มขึ้นและจะสูงสุดเมื่อใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 10 มคก. และถ้าหากใช้ในขนาดที่สูงกว่านี้ อัตราการใช้ออกซิเจนของ state 4 respiration จะลดลง เช่นเดียวกับกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

1.2 <u>ผลการเปรียบเทียบ maximum response เมื่อใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และ DNP รวมทั้งอนุพันธ์ของแนพโทควิโนน คือ lawsone และ menadione ในขนาดต่างๆต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย</u>

ตามรูป ที่ 19 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 6 มคก. สามารถกระตุ้น state 4 respiration ของไมโตคอนเดรียได้ เมื่อเทียบกับอัตราการหายใจที่ถูกกระตุ้นโดย 0.05 mM. DNP แล้ว จะเห็นว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ทำให้มีอัตราการกระตุ้นการหายใจเป็น 88.9 ±5.7 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน ซึ่งน้อยกว่า DNP ซึ่งมีอัตราการกระตุ้นการหายใจเป็น 136.2± 10.7 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน หรือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีความสามารถในการกระตุ้นการหายใจของ state 4 respiration ประมาณ 65.27 % ของ DNP ส่วน lawsone และ menadione ขนาด 10 และ 50 มคก. จะกระตุ้น state 4 respiration คิดเป็น 4.1, 14.29 และ 1.4, 6.5 % ตามลำดับ

และเมื่อทำการเปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate ก็จะพบว่า อัตราเร็วของการกระตุ้นการหายใจใน state 4 respiration ของ 0.05 mM. DNP มีค่า 163.4 ± 4.9, 10 มคก. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็น 75.3±4.0 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ ส่วน lawsone และ menadione ทั้งในขนาด 10 และ 50 มคก. ก็สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 4 respiration มีอัตรา 7.5 ± 2.2, 10.1± 1.2 และ 0± 0, 6.3 ±3.3 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ (ดังรูปที่ 20)

2. <u>ผลของ rotenone และ antimycin ที่มีต่อผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในด้านการกระตุ้นการหายใจ</u>

2.1 ผลของ rotenone และ antimycin ที่มีต่อผลการกระตุ้นการหายใจโดย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตามรูปที่ 21 A แสดงผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 6 มคก. ซึ่งให้ผลการกระตุ้นการหายใจสูงสุด เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท เมื่อใส่ rotenone ซึ่งเป็น inhibitor ที่ site I พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ยังคงสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เท่ากับกรณีที่ไม่มี rotenone ตามรูปที่ 21 B นั่นคือ rotenone ไม่มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก glutamate+malate ไปยังออกซิเจน และจากรูป 21 C และ D เมื่อใส่ antimycin ซึ่งเป็น inhibitor ที่ site II พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ทั้งในขนาด 6 และ 50 มคก. สามารถเพิ่มการใช้ออกซิเจนขึ้น และจะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไป กล่าวคือเมื่อใส่ antimycin 5 มคก. อัตราการใช้ออกซิเจนมีค่า 0.006 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อใส่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 6 มคก. และ 50 มคก. อัตราการใช้ออกซิเจนมีค่า 0.043 และ 0.052 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับ ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนจะค่อยๆลดลงเป็น 0.027 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ทั้งสองกรณี ซึ่งจะต่างจากผลของ rotenone ที่จะไม่มีการลดลงของการกระตุ้นการหายใจเมื่อเวลาผ่านไป แต่อย่างไรก็ตามในการใช้ inhibitor ทั้งสองชนิด ย่อมมีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในวิถีทาง (pathway)ปกติ ในการทดลองนี้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone จะก่อผลได้ต่างจาก DNP ที่ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้ถ้ามี inhibitor ทั้งสองชนิดดังกล่าว

2.2 ผลของ rotenone และ antimycin ที่มีต่อผลการกระตุ้นการหายใจของใจของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ตามรูปที่ 22 A 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 6 มคก. ที่มีผลในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท จากอัตราการใช้ออกซิเจน 0.037 เป็น 0.162 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อมีการ

เติม rotenone ลงไปพบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลกระตุ้นการหายใจเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะแรก(0.079) และลดลงจนเกือบไม่มีฤทธิ์กระตุ้นเลยในเวลาต่อมา (0.043) และเมื่อมีการเติม DNP ซึ่งเป็น uncoupler สามารถมีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้อย่างมาก ตามรูปที่ 22 B แสดงว่าวิถีทางการส่งผ่านอิเลคตรอนโดยปกติไม่ถูกยับยั้งโดย rotenone รูปที่ 22 C เมื่อใช้ inhibitor เป็น antimycin จะได้ผลคล้ายกับการทดลองตามรูป 21 C และ D คือมีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจเพิ่มขึ้นในระยะแรก ต่อมาจะค่อยๆลดลงแต่ต่างกันคือ รูปที่ 22 C จะมีการลดลงของอัตราการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเร็วกว่าในรูปที่ 21 C และ D

3. ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่ำๆที่มีผลต่อการหายใจใน state 3 และการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+}(กรณีที่มี Pi อยู่ด้วย) รวมทั้งผลที่เกิดขึ้นกรณีที่มี rotenone และ oligomycin

3.1 กรณี glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตามรูปที่ 23 A เป็นการแสดงการหายใจตามปกติ ซึ่งในช่วงแรกเป็นการกระตุ้นการหายใจโดยการเติม ADP+Pi ทำให้เกิดการหายใจใน state 3 และ state 4 ตามลำดับ และเมื่อมีการเติม Ca^{2+} (ในภาวะที่มี Pi) Ca^{2+} สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนได้เช่นเดียวกับการเติม ADP+Pi ลงไปในปฏิกิริยา เนื่องจากว่าในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจนั้น จะมีการผลักดันให้ H^+ จาก matrix ไปยัง intermembrane space ทำให้ด้านในของ inner membrane (ด้านที่ติดกับ matrix) มีประจุและความต่างศักย์เป็นลบ ด้านนอกเป็นบวก Ca^{2+} ที่เติมเข้าไปจะจับกับ Ca^{2+} uniporter ที่ด้านนอกของ inner membrane และเคลื่อนที่ผ่าน inner membrane โดยอาศัยแรงดูดระหว่างประจุบวกของ Ca^{2+} กับ negative potential ที่ด้านในของ inner membrane การเคลื่อนที่ดังกล่าวของ Ca^{2+} จะทำให้ potential ของ inner membrane ลดลง เนื่องจาก Ca^{2+} นำประจุบวกเข้าไปและทำให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนเพิ่มขึ้นเพื่อพยายามรักษา potential ของ inner membrane ผลคือมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น พร้อมกับมีการผลัก H^+ ออกซึ่งจากการผลักดัน H^+ ออกไปจาก matrix มากๆนั้นอาจทำให้ภายใน matrix มีสภาพเป็นด่างมากจนเกิดการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนตามมา ดังนั้นจึงมีการใส่ Pi ลงไปเพื่อลดความเป็นด่างดังกล่าวโดยที่ Pi จากด้านนอกสามารถแลกที่กับ OH^- ใน matrix

ทำให้ความเป็นด่างลดลง การส่งผ่านอิเลคตรอนก็จะไม่ถูกยับยั้ง และสุดท้ายเมื่อมีการ transport Ca^{2+} ผ่าน inner membrane หมด การกระตุ้นการใช้ออกซิเจนก็จะช้าลง และตามรูปที่ 23 B จะเห็นว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 1 มคก. สามารถกระตุ้นอัตราเร็วของการหายใจจากอัตรา 0.024 ไปเป็น 0.055 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อเติม 0.20 mM. ADP + 0.41 mM. Pi พบว่ายังคงเกิด state 3 respiration และเมื่อปริมาณของ ADP ถูกใช้ไปหมด การหายใจของไมโตคอนเดรียจะกลับเข้าสู่ state 4 respiration และเมื่อเติม 0.2 mM. Pi และ 0.2 mM. $CaCl_2$ พบว่ามีการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับรูปที่ 23 A และเมื่อทดลองใส่ 5 มคก. rotenone ซึ่งเป็น site I inhibitor แล้วหลังจากนั้นเติม 1 มคก. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone พบว่า อัตราการหายใจเปลี่ยนจาก 0.018 เป็น 0.055 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อเติม 0.2 mM. ADP + 0.41 mM. Pi การหายใจใน state 3 respiration ยังคงเกิดขึ้นได้อยู่ แต่มีอัตราช้าลง กล่าวคือมีอัตราเร็วในการใช้ออกซิเจนเพียง 0.082 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที(ตามรูปที่ 23 C) และการหายใจก็ยังคงถูกกระตุ้นได้ด้วย Pi + $CaCl_2$ แต่มีการใช้ออกซิเจนค่อนข้างช้า (0.086)(ตามรูปที่ 23 D) เช่นเดียวกับผลในรูปที่ 23 C เมื่อทำการทดลองใช้ 10 มคก. oligomycin (ตามรูปที่ 23 E) ลงในการทดลองเช่นเดียวกันกับรูปที่ 23 C และ D พบว่า oligomycin สามารถยับยั้งการหายใจจากการเติม 0.20 mM.ADP + 0.41 mM. Pi (ยับยั้ง state 3 respiration) ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อเติม 0.20 mM.Pi + $CaCl_2$ จะยังพบว่าการหายใจยังคงถูกกระตุ้นได้ กล่าวคืออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเปลี่ยนจาก 0.049 เป็น 0.088 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และกลับเข้าสู่อัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0.049 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการกระตุ้น

รูปที่ 23 E เป็นการแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีทั้ง rotenone และ oligomycin พบว่า rotenone ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในกรณีที่ใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท หลังจากนั้นเมื่อมีการเติม oligomycin ไม่พบว่ามีการยับยั้งผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone แต่มีผลยับยั้งการเกิด state 3 respiration จากการเติม ADP + Pi (ไม่มีการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนแม้ว่าจะเติม ADP+Pi เนื่องจาก oligomycin ยับยั้งการเกิด phosphorylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ couple กับการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ ทำให้การส่งผ่านอิเลคตรอน

เกิดขึ้นไม่ได้เช่นกัน)แต่ในกรณีของ Ca^{2+} (ในภาวะที่มี Pi) สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะ oligomycin ไม่มีผลยับยั้งลูกโซ่การหายใจ และ Ca^{2+} uniporter โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนที่เกิดจากกระตุ้นของ Ca^{2+} เท่ากับในกรณีรูปที่ 23 D

3.2 <u>กรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท</u>

ตามรูปที่ 24 A เป็นการแสดงการหายใจใน state ต่างๆของไมโตคอนเดรียและการตอบสนองต่อการเติม ADP + Pi และ DNP ในกรณีที่เติม ADP + Pi กระตุ้นให้เกิด state 3 และ state 4 respiration รวมทั้งผลของ DNP ที่กระตุ้นให้เกิด state 3_u ตามรูปที่ 24 B จะเป็นผลการกระตุ้นการหายใจของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 6 มคก. อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มจาก 0.043 เป็น 0.153 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเมื่อใส่ rotenone 5 มคก. และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 6 มคก. ซึ่งไม่พบว่ามีการยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration กล่าวคือ ยังเห็นฤทธิ์ในการเพิ่มการหายใจ และเมื่อเติม 0.20 mM. ADP + 0.41 mM. Pi ปรากฏว่ามีการเพิ่มอัตราการหายใจเป็นปกติด้วยอัตรา 0.208 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และไมโตคอนเดรียยังคงตอบสนองด้วยผลที่เป็นปกติ

4. <u>ผลการกระตุ้นการหายใจของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในกรณีที่ให้ร่วมกับ lawsone หรือ menadione</u>

จากรูปที่ 25 แสดง dose-response curve ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เดี่ยวๆ และเมื่อให้ร่วมกับ lawsone ในขนาดต่างๆคือ 10 มคก. (รูปที่ 25 B) และ 25 มคก.(รูปที่ 25 C) พบว่าผลในการกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลง เมื่อมีการให้ร่วมกับ lawsone โดยที่การลดลงจะเพิ่มขึ้น เมื่อให้ร่วมกับ lawsone ในขนาดที่สูงขึ้น (25 มคก.) และเมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่าง 1/ความเข้มข้นของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ใช้ (มีหน่วยเป็น 1/ไมโครโมล) และ 1/อัตราการใช้ออกซิเจน(มีหน่วยเป็น 1/มคอ.ออกซิเจน/นาที) พบว่าผลการยับยั้งของ lawsone ที่มีต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็นลักษณะของการยับยั้งชนิด

competitive และ non-competitive inhibitor รวมกัน

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 3 กรณีคือ กรณีที่ให้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เดี่ยวๆในขนาด 6 มคก., กรณีที่ให้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 6 มคก.ร่วมกับ lawsone 50 มคก. และกรณีที่ให้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 6 มคก. ร่วมกับ menadione 50 มคก. รวมทั้งแสดงการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น %inhibition ของสองกรณีหลังเทียบกับเมื่อให้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เดี่ยวๆ พบว่ากรณีที่ให้ร่วมกับ lawsone จะมีผลในการยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone คิดเป็น %inhibition เท่ากับ 92.8 และกรณีที่ให้ร่วมกับ menadione จะมีค่า 61.6 ซึ่งผลของการยับยั้งของอนุพันธ์ที่ให้ร่วมกันนี้ อาจจะแสดงถึงตำแหน่ง(site) ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และอนุพันธ์แนพโทควิโนน ว่ามีการออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเดียวกันหรือไม่

5. ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

5.1 ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆ

ในตารางที่ 3 แสดงผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาดต่างๆตั้งแต่ 0.5 - 50 มคก. ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยการวัด Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP พบว่า Pi ที่เกิดขึ้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากกรณีที่ไม่มีการเติมสารใด(control) ในทุกขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ใช้ แต่ไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Pi สัมพันธ์กับขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ใช้ นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Pi มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control (ไม่มีการเติมสารใด หมายถึงปริมาณ Pi ที่เกิดจาก endogenous ATPase activity)($P < 0.05$) นั่นคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลในการกระตุ้นATPase activity ได้เล็กน้อย แต่คุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity ไม่สัมพันธ์กับขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ใช้(แสดงว่าผลในการกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นตามขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone

ไม่ได้เกิดเนื่องจากคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity

5.2 ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆที่มีต่อ DNP activated ATPase activity เปรียบเทียบกับผลของ oligomycin ในการยับยั้ง DNP activated ATPase activity

ตารางที่ 4 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ในกรณีที่ไม่ได้เติมสารใดเลย(endogenous ATPase activity) และกรณีที่ใส่ DNP ซึ่งเป็น uncoupler มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity ได้ (20) ทำให้มีการสลายของ ATP ไปเป็น ADP+Pi คือมีผลในทางตรงกันข้ามกับหน้าที่ของไมโตคอนเดรียในการสร้าง ATP (บทที่ 1) ในการศึกษาผลของ DNP ในการกระตุ้น ATPase activityในภาวะที่มี 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆพบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่เติมลงไปไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ Pi ที่สลายตัวจาก ATP ในทุกขนาด($P > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลของ oligomycin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ATPase activity ที่เกิดจากการกระตุ้นของ DNP พบว่า oligomycin สามารถยับยั้งการสลายของ Pi ได้เกือบสมบูรณ์ (Pi ที่สลายออกมาเพียง 0.38 ± 0.04 ไมโครโมล/มก.โปรตีน/10 นาที) เทียบกับกรณีที่ใส่ DNP อย่างเดียว สามารถกระตุ้นการสลายของ ATP ได้อย่างมาก (Pi ที่สลายออกมามีค่าเท่ากับ 2.56 ± 0.09 ไมโครโมล/มก.โปรตีน/10 นาที) ($P < 0.05$)

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อเซลยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1. ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการใช้ออกซิเจนของ intact yeast ในระยะต่างๆ

1.1 ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆที่มีต่อการใช้ออกซิเจนของ *S. cerevisiae* โดยใช้ glucose เป็นสับสเตรท

ในการศึกษาการใช้ออกซิเจนของ *S. cerevisiae* ดังกล่าว ในระยะ (state) ต่างๆนั้น ทำไม่ได้เหมือนกับกรณีที่ทำการศึกษากับไมโตคอนเดรีย เนื่องจาก ADP+Pi ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซล(cell membrane)ของยีสต์ได้รวมทั้งสับสเตรท

ที่ใช้ในกรณีของไมโตคอนเดรีย สาร uncoupler เช่น DNP ก็ผ่านเข้าเซลไม่ได้เช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้สับสเตรทเป็น glucose ซึ่งโดยปกติยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้อยู่แล้ว และ uncoupler จะเปลี่ยนไปใช้ CCCP ซึ่งมีคุณสมบัติที่ non-polar มากกว่า DNP ซึ่งพบว่าสามารถผ่านผนังเซลเข้าไปก่อผลเร่งการใช้ออกซิเจนในเซลยีสต์ได้

ตามรูปที่ 26 A จะเป็นผลของ CCCP ในการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ uncoupler ที่ได้กล่าวมาแล้ว และรูปที่ 26 B,C และ D จะเป็นผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 6, 50 และ 100 มคก. พบว่าทำให้มีการเพิ่มของอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ โดยอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ส่วนใน รูปที่ 26 E และ F จะแสดงผลของ CCCP และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ต่อเซลยีสต์กรณีที่ไม่มีการเติมสับสเตรทคือ glucose ลงไป จะพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ นั่นแสดงให้เห็นว่าการก่อผลของ uncoupler ที่ใช้คือ CCCP และสาร 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์เพิ่มมากขึ้นนั้น จำเป็นต้องมีสับสเตรทซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในเซล ซึ่ง organell ที่สำคัญที่ทำให้เกิดออกซิเดชั่นที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 นั้นก็คือไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่จะเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงานในกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอน และการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ซึ่งจะได้ ATP ที่จะนำไปใช้ในการดำเนินกิจกรรมของเซลต่อไป ซึ่งจากปฏิกิริยาดังกล่าวสุดท้ายจะมีการใช้ออกซิเจนเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำ นั่นคือผลของปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ออกซิเจนใน chamber ลดลง ส่วนแหล่งอื่นๆในเซลที่มีการใช้ออกซิเจนได้แก่ การทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น เอนไซม์ alcohol dehydrogenaseเป็นต้น แต่ก็นับว่ามีการใช้ออกซิเจนในระดับต่ำ ดังนั้นผลการเปลี่ยนแปลงการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ย่อมสะท้อนการใช้ออกซิเจน อันเนื่องมาจากไมโตคอนเดรียเป็นส่วนใหญ่ และจากการเติม uncoupler หรือสารที่ทดสอบคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone นั้น ผลที่เกิดขึ้นย่อมเป็นผลส่วนใหญ่ที่เกิดกับการทำงานของไมโตคอนเดรียเป็นสำคัญ

ในรูปที่ 27 แสดง dose-response curve ของ 2-methoxy-1,4-

naphthoquinone ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ S. cerevisiae เมื่อใช้ glucose เป็นสับสเตรท พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone แต่พบว่าจะเริ่มคงที่ที่ขนาด 30-60 มคก.(ในช่วงของขนาดที่ได้ทำการทดลอง) และเพิ่มอีกครั้งเมื่อใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดสูงเท่ากับ 100 มคก.

1.2 ผลการเปรียบเทียบ maximum response เมื่อใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone , DNP , Lawsone และ Menadione ในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของยีสต์ S. cerevisiae เมื่อใช้ glucose เป็นสับสเตรท

รูปที่ 28 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจน ได้น้อยกว่า CCCP เล็กน้อย กล่าวคือ CCCP กระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนได้ 3.44 ±0.29 และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 3.30 ± 0.18 ส่วนผลของอนุพันธ์อีกสองชนิดคือ lawsone และ menadione ในขนาดที่เท่ากับขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ให้ผลสูงสุดคือ เท่ากับ 50 มคก. และในขนาดสูงคือ 100 มคก.พบว่ามีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือมีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0.17 ± 0.05, 0.46 ± 0.07 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.ยีสต์(wet weight) เมื่อใช้ lawsone และ menadione ในขนาด 50 มคก. และเป็น 0.46 ± 0.08 และ 0.46 ± 0.03 นนอ.ออกซิเจน/นาที/มก.ยีสต์(wet weight) ซึ่งผลดังกล่าวในรูปที่ 28 ก็สอดคล้องกับผลที่ได้ในกรณีที่ทำการศึกษากับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว (รูปที่ 16,17) แต่เมื่อศึกษาในแง่ของปริมาณ (quantitative)พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้สูงมาก เกือบเท่ากับผลของ uncoupler ที่ใช้คือ CCCP ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากขนาดของ uncoupler ที่ใช้ไม่เหมาะสมที่จะก่อให้เกิดผลสูงสุดในการเกิดภาวะอันคับปลิง หรือ CCCP ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลได้มากเพียงพอที่จะก่อฤทธิ์สูงสุด หรือ sensitivity ของลูกโซ่การหายใจของเซลยีสตต่อ CCCP น้อยกว่ากรณีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นกรณีที่เตรียมจากเซลตับของหนูขาว ที่พบว่าในขนาดความเข้มข้นนี้ก่อให้เกิดผลสูงสุด

2. ผลของ mitochondrial respiratory inhibitors ต่อการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์

S. cerevisiae เปรียบเทียบกับ CCCP

รูปที่ 29 A แสดงผลของ rotenone ที่มีต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ CCCP และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ใช้สับสเตรทเป็น glucose พบว่า rotenone 10 มคก.ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นให้มีการเพิ่มการใช้ออกซิเจนจากการใส่ 1.25 uM. CCCP ซึ่งเป็น uncoupler ซึ่งผลก็คือ CCCP ยังคงสามารถเร่งให้เซลยีสต์มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้โดยการสังเกตุจากอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนและหลังการเติม 1.25 uM. CCCP มีค่า 0.143 และ 0.176 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับและผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน (ตามรูปที่29 B) คือมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์เพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อใส่ 10 มคก. rotenone ไม่สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนของยีสต์ได้เมื่อใส่ 50 มคก. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (ตามรูปที่ 29 C) การที่ rotenone ไม่สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนเมื่อเติม CCCP นั้นอาจจะเนื่องมาจาก 2 ประเด็นคือ หนึ่ง rotenone ไม่สามารผ่านผนังเซลของยีสต์ได้ หรือ สองคุณสมบัติของวิถีทางการหายใจ (respiratory pathway)ของยีสต์ไม่ถูกยับยั้งโดย rotenone (rotenone-insensitive) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากสภาวะในการเลี้ยงดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ดังนั้นผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone จึงไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นไม่ถูกยับยั้งโดย rotenone

รูปที่ 30 แสดงผลของ antimycin ซึ่งเป็น inhibitor ที่ site II พบว่าในรูปที่ 30 A 10 มคก. antimycin สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของยีสต์ได้เกือบสมบูรณ์ โดยอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม antimycin และหลังเติมมีค่า 0.132 และ 0.016 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับ และ antimycin ยังสามารถยับยั้งผลของ 1.25 uM. CCCP ในการกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเติม 10 และ 50 มคก. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone กลับพบว่ายีสต์มีการเพิ่มการใช้ออกซิเจนอย่างชัดเจน ตามรูปที่ 30 B และ C ตามลำดับ ถ้าใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 10 มคก.จะกระตุ้นให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนได้เท่ากับ 0.077 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเพิ่มเป็น 0.187 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 50 มคก. นั่นคือ antimycin ไม่สามารถยับยั้งผลในการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์อันเนื่องมาจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งในส่วนนี้จะแสดงให้เห็นถึง วิถีทางในการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก

สับสเตรทไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และส่งต่อให้กับออกซิเจน ว่าอาจจะไม่ใช่วิถีทางปกติที่ใช้ในการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจน และ/หรือกลไกการทำงานของลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรียของเซลยีสต์ต่างจากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ *S. cerevisiae.*

ไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ชนิดดังกล่าว โดยวิธี incubate เซลยีสต์กับเอนไซม์ Lyticase® เพื่อทำลายผนังเซล (cell wall) นั้น คุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ไม่ดีนัก ค่า RCI ในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น succinate มีค่าประมาณ 1.5-2 ส่วนกรณีที่ใช้ pyruvate+malate ค่า RCI ที่ได้มีค่าประมาณ 1.5 เท่านั้น ดังนั้นผลที่จะนำมาแสดงจะแสดงเฉพาะกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรทเท่านั้น และจากการที่คุณภาพของไมโตคอนเดรียที่ได้ไม่ดีนัก ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่จะนำเสนอต่อไป จึงเป็นเพียงผลที่อาจจะเป็นไปได้เท่านั้น ส่วนผลที่แท้จริงควรจะได้มีการศึกษาซ้ำในไมโตคอนเดรียที่มีคุณภาพมากกว่านี้ ซึ่งคงต้องอาศัยเครื่องมือและเทคนิควิธีการอื่นๆ เพื่อให้ได้ไมโตคอนเดรียที่มีคุณภาพ และปริมาณที่มากพอในการศึกษา

1. ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาดต่างๆที่มีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจน

รูปที่ 31 แสดง dose-response curve ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ ในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น succinate พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ โดยจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากขนาดที่ใช้ 10-30 มคก. และจะเริ่มคงที่ที่ขนาด 30-50 มคก. แต่พบว่าที่ขนาด 50 มคก.ให้ผลที่แตกต่างกันมาก(ค่า standard error สูงมาก)

2. ผลการเปรียบเทียบ maximum response เมื่อใช้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และ DNP ต่อการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae.*

รูปที่ 32 ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 50 มคก. ในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนน้อยกว่าผลของ DNP ที่ใช้(ใช้ในขนาด 0.1 mM.) ซึ่งสูงกว่ากรณีที่ใช้กับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาวหนึ่งเท่า เนื่องจากจากการทดลองใช้ DNP ในขนาดความเข้มข้น 0.05 mM. ไม่เห็นผลในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากความไวของลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ต่อ DNP น้อยกว่าของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นเซลตับของหนูขาว หรือเนื่องมาจากคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ไม่ดีจึงไม่ตอบสนองต่อผลของ DNP) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่มีต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาวและผลต่อเซลยีสต์ (intact yeast) (รูปที่ 19,20,28)

3. ผลของ mitochondrial respiration inhibitor site II (antimycin) ต่อการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากยีสต์ *S. cerevisiae* เปรียบเทียบกับ DNP

ในการศึกษาพบว่า rotenone ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรท pyruvate + malate ไปยังออกซิเจนได้(rotenone-insensitive pathway) ซึ่งผลดังกล่าวอาจจะเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์ ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ดังนั้นผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในกรณีที่มี rotenone จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ใดๆได้ จึงไม่ได้แสดงผลไว้

ตามรูปที่ 33 A respiratory control ของไมโตคอนเดรียตามปกติ (ซึ่งมีค่า RCI = 1.94) รูปที่ 33 B พบว่า 10 มคก. antimycin สามารถยับยั้งการหายใจได้สังเกตจากผลที่ได้คือ DNP ซึ่งเป็น uncoupler ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนได้เพิ่มขึ้น ในขณะที่ รูปที่ 33 C 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 30 มคก. มีผลเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ได้แม้ว่าจะมี antimycin ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับผลที่มีต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว แต่ที่ต่างกันก็คือไม่เห็นผลว่ามีการลดลงของอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อ

เวลาผ่านไปเช่นที่เกิดในไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว(รูปที่ 22 C)

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในด้านฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. cerevisiae. โดยวิธี Broth Dilution

ผลการทดลอง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MFC) ของเชื้อ S.cerevisiae โดยวิธี broth dilution (ดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2) แสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MFC) ของเชื้อ S.cerevisiae โดยวิธี broth dilution

test organism	MIC(ug/ml)	MFC(ug/ml)
S. cerevisiae	10	20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย