

ฤทธิ์อันค้ำพลังของแอนติสไตรเทคโตรินต่อกระบวนการหายใจ
และออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย



นายวิบูลย์ วัฒนาธร

ศูนย์วิทยพัทยาการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-683-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014081

11745464

UNCOUPLING ACTION OF ANCISTROTECTORINE ON MITOCHONDRIAL
RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



Mr.Wiboon Wattanatorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-568-683-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์อันค้ำพลังของแอนติส ไตร เทคโนโลยีต่อการบรรเทาการหายใจ
และออกซิเดทีฟ ฟอร์ดฟอร์ดเลชันของไมโครคอนกรีต

โดย

นายวิบูลย์ วัฒนาธร

ภาควิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.ประกร จูทะพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยมีมติเป็นส่วนหนึ่งของการ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

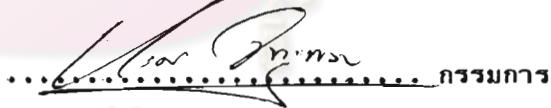
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



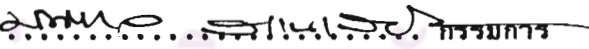
..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกณ์)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกร จูทะพงษ์)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล สงวนเสริมศรี)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)



วิทยุ วัฒนธรร : ฤทธิ์อันค้ำปลิงของแอนซิสโตรเทคโตรินต่อกระบวนการหายใจและ
ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย (UNCOUPLING ACTION OF
ANCISTROTECTORINE ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND OXIDATIVE
PHOSPHORYLATION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกร จุฑะพงษ์, ผศ.วิทยา จันทสูตร, 103
หน้า.

แอนซิสโตรเทคโตรินมีฤทธิ์ที่สำคัญเหมือน classical uncouplers หลายประการ เช่น
สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมกายหายใจ (กระตุ้น state 4 respiration), ทำให้
ไมโทคอนเดรียสร้าง ATP ได้ลดลง (ลดอัตราส่วน ADP/O), สามารถแกกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด
state 3 respiration จากทั้ง oligomycin และ atractyloside ได้อย่างสมบูรณ์, และ
ยังสามารถกระตุ้น ATPase activity ทั้งที่ไวต่อฤทธิ์ของ oligomycin และ atractyloside
ได้ด้วย อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินมีคุณสมบัติทางเคมีและผลการทดลองในการวิจัยนี้หลายประการที่
ต่างไปจากกรณีของ classical uncouplers ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนหลายประการ เช่น พบว่า
แอนซิสโตรเทคโตรินมีคุณสมบัติเป็นค่างและมีผลรบกวนต่อการวัดปริมาณ cations ด้วย pH electrode
และ calcium-selective electrode อย่างมาก, พบว่าแอนซิสโตรเทคโตรินมีฤทธิ์อันค้ำปลิงที่
ค่อนข้างอ่อน (ออกฤทธิ์เป็น uncouplers ได้ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.1-0.5 mM), และเมื่อทดลอง
เปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium (7.0-7.8) ก็พบว่าฤทธิ์อันค้ำปลิงของ
แอนซิสโตรเทคโตรินไม่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น จากการวิจัยนี้เรายังไม่สามารถ
ทราบกลไกการเกิดอันค้ำปลิงในระดับโมเลกุลของแอนซิสโตรเทคโตรินอย่างชัดเจนได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อ
พิจารณาจากสูตรโครงสร้างทางเคมีและผลการทดลองต่าง ๆ ในการวิจัยนี้แล้ว จะพบว่า
แอนซิสโตรเทคโตรินมีแนวโน้มที่จะมีกลไกการเกิดอันค้ำปลิงไปในทำนองเดียวกันกับพวก hydrophobic
amines หรือแม้กระทั่งพวก cationic uncouplers นอกจากนี้ยังได้ทบทวนถึงบทบาทและความสัมพันธ์
ระหว่างฤทธิ์อันค้ำปลิงกับผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของแอนซิสโตรเทคโตริน เท่าที่มี
การศึกษากันในปัจจุบัน ตลอดจนโอกาสที่จะนำเอาฤทธิ์อันค้ำปลิงนี้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ในที่นี้อีก
ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เกษษวิทยา
สาขาวิชา เกษษวิทยา
ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต *Syul Anan.*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Prak J.*

WIBOON WATTANATORN : UNCOUPLING ACTION OF ANCISTROTECTORINE ON
MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION. THESIS
ADVISOR : ASSO.PROF.PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D., ASSIS.PROF.
WITHAYA JANTHASOOT. 103 PP.

Ancistrosectorine exhibits some important characteristics of classical uncouplers of oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria, e.g. it induces loss of respiratory control (stimulates state 4 respiration), hinders ATP synthesis (lowers ADP/O ratio), releases both oligomycin- and atractyloside-inhibited state 3 respiration, and activates both oligomycin- and atractyloside-sensitive ATPase activity. However, the chemical properties and some mitochondrial effects of this agent indicate that it is not a classical uncoupler of the DNP-type, e.g. it has basic property and interferes with both pH electrode and calcium-selective electrode, its uncoupling activity is manifested at relatively high concentrations (0.1-0.5 mM) and is almost unaffected by varying pH of incubation medium from 7.0 to 7.8. The molecular mechanism of uncoupling by ancistrosectorine is unclear but has been discussed to be related to the chemical properties of the drug as has been shown for hydrophobic amines and cationic uncouplers. The possible contribution of this uncoupling action in the pharmacological as well as toxicological activities of ancistrosectorine are discussed.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เกษษวิทยา

สาขาวิชา เกษษวิทยา

ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต Wiboon Wattanatorn

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Assoc. Prof. Prakorn Chudapongse

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภร จุฑะพงษ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่ง ท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ บางส่วนได้รับมาจากทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จึงขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์ หัวหน้าภาควิชา เกษษวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ เกษษวิทยา และ รองศาสตราจารย์ นิจศิริ เรืองรัมย์ แห่งภาควิชา เกษษเวช คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสภักดสารแอนซิสโตรเทคโครีนให้ใช้ตลอดการวิจัย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ เกษษกรหญิง สวง นามประสิทธิ์ หัวหน้าฝ่าย เกษษกรรม 7 โรงพยาบาลธัญญารักษ์, โรงพยาบาลธัญญารักษ์ และกรมการแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนโดยอนุมัติให้ลา ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต และขอขอบคุณ คุณราตรี หุ่นดี พยาบาลวิชาชีพ 5 ฝ่ายวิชาการ โรงพยาบาลธัญญารักษ์ ที่กรุณาเป็นผู้ค้ำประกันในหนังสือสัญญาการลาไปศึกษาต่อ ตลอดจนให้คำแนะนำ เกี่ยวกับขั้นตอนการขอลาศึกษาต่อด้วยไมตรีจิตอันดียิ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
วิบูลย์ วัฒนาธร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ | ฉ |
| สารบัญตาราง | ญ |
| สารบัญรูป | ฎ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ | ฉ |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | 1 |
| ก. แอนซิส ไตรเทค ไตรีน | 1 |
| ข. การหายใจและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริล เลชั่นของไมโตคอนเดรีย | 7 |
| 2 อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย | 15 |
| 1. สัตว์ทดลอง | 15 |
| 2. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว | 15 |
| 3. การ incubate ไมโตคอนเดรีย และ incubation medium | 17 |
| 4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ | 18 |
| 5. การคำนวณค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ | 19 |
| 6. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย | 24 |
| 7. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย | 25 |
| 8. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี | 27 |
| 9. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 28 |
| 3 ผลการวิจัย | 29 |
| 1. ผลของแอนซิส ไตรเทค ไตรีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ | 29 |
| 1.1 ผลของแอนซิส ไตรเทค ไตรีนในขนาดต่าง ๆ | 29 |

สารบัญ (ต่อ)

| บทที่ | หน้า |
|---|------|
| 1.2 ผลการเปรียบเทียบ maximum response เมื่อใช้แอนซิสโตรเทคโดริน, DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 65 |
| 1.3 ผลของแอนซิสโตรเทคโดรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O | 65 |
| 2. ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน medium บางประการ ต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโดริน ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 66 |
| 2.1 ผลของ oligomycin และ atractyloside | 66 |
| 2.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium | 67 |
| 2.3 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium | 68 |
| 2.4 ผลของ DTT และ DTNB | 69 |
| 3. ผลของแอนซิสโตรเทคโดรินที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย | 70 |
| 3.1 ผลของแอนซิสโตรเทคโดรินขนาดต่าง ๆ | 70 |
| 3.2 ผลการเปรียบเทียบ maximum response ระหว่างแอนซิสโตรเทคโดรินกับ DNP | 70 |
| 4. ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน medium บางประการ ต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโดริน ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 71 |
| 4.1 ผลของ oligomycin และ atractyloside | 71 |
| 4.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium | 71 |
| 4.3 ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium | 71 |
| 4.4 ผลของ DTT และ DTNB | 71 |

สารบัญ (ต่อ)

| บทที่ | หน้า |
|--|------|
| 5. ผลที่น่าสนใจอื่น ๆ ของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย | 72 |
| 5.1 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่ออยู่ใน medium ที่มีส่วนประกอบต่างกันหลายกรณี | 72 |
| 5.2 ผลการใช้แอนซิสโตรเทคโตรินกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย แล้ววัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter | 73 |
| 5.3 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อ H^+ uptake โดยไมโทคอนเดรียเมื่อเทียบกับ DNP | 73 |
| 5.4 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 74 |
| 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง | 77 |
| ก. กลไกการเกิดอันคัปปลิงในกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริล เลชัน ที่เกิดเนื่องจากฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน | 77 |
| ข. ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์อันคัปปลิงกับผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของแอนซิสโตรเทคโตรินเท่าที่มีการศึกษากันในปัจจุบัน ... | 89 |
| ค. โอกาสที่จะนำเอาฤทธิ์อันคัปปลิงของแอนซิสโตรเทคโตรินไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ | 90 |
| เอกสารอ้างอิง | 93 |
| ประวัติผู้เขียน | 103 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท | 36 |
| 2 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท | 38 |
| 3 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 42 |
| 4 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 44 |
| 5 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 46 |
| 6 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 47 |
| 7 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 49 |
| 8 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย | 51 |
| 9 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย | 52 |
| 10 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 54 |
| 11 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 55 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 12 | ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ แอนฮิสไตรเทคโตริน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 56 |
| 13 | ผลของ DTNB และ DTT ที่มีต่อฤทธิ์ของแอนฮิสไตรเทคโตรินในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP | 57 |
| 14 | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์อันคับปลิงของตัวอย่าง uncouplers ที่มีฤทธิ์แรง ๆ เท่าที่พบในปัจจุบัน | 84 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของแอนซิสโตรเทคโตริน | 2 |
| 2 แสดงลักษณะทั่วไปของ <u>Ancistrocladus tectorius</u> (Lour.) Merr. ... | 4 |
| 3 แสดงโครงสร้างและเอนไซม์ของไมโตคอนเดรียเฉพาะส่วนที่มีความสำคัญอย่างมาก ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริล เลชัน ตาม chemiosmotic theory ... | 8 |
| 4 แสดงลำดับการขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH ไปมอบให้กับอะตอมของออกซิเจน, ตำแหน่งที่มีการปลดปล่อยพลังงานสำหรับใช้ในการสร้าง ATP, ชนิดต่าง ๆ ของ สับสเตรท และตัวอย่างของ site-specific inhibitors | 8 |
| 5 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรีย สามารถสงวนไว้ และตำแหน่งต่าง ๆ ที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไป ออกฤทธิ์ | 13 |
| 6 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation | 16 |
| 7 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ | 16 |
| 8 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI | 20 |
| 9 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O..... | 20 |
| 10 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ | 20 |
| 11 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินขนาด 100, 200 และ 400 มก. ที่มีต่อการหายใจ ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท | 30 |
| 12 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินขนาด 100, 200 และ 400 มก. ที่มีต่อการหายใจ ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท | 31 |
| 13 dose-response curve ของผลของแอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการ หายใจของไมโตคอนเดรีย | 32 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 14 | ผลการเปรียบเทียบ maximum response โดยใช้แอนติสไตรเทคโครีน, DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท | 33 |
| 15 | ผลการเปรียบเทียบ maximum response โดยใช้แอนติสไตรเทคโครีน, DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท | 34 |
| 16 | ผลของแอนติสไตรเทคโครีนที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท | 35 |
| 17 | ผลของแอนติสไตรเทคโครีนที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท | 37 |
| 18 | ผลของ oligomycin และผลของ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 39 |
| 19 | ผลของ oligomycin และผลของ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโครีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 40 |
| 20 | ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโครีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 41 |
| 21 | ผลการเปลี่ยนแปลง pH ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 43 |
| 22 | ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโครีนและ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 45 |
| 23 | ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโครีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 48 |
| 24 | ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโครีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย | 50 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|--------|--|
| 25 | dose-response curve ของผลของแอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย 52 |
| 26 | ผลการเปรียบเทียบ maximum response ระหว่างแอนซิสโตรเทคโตรินกับ DNP ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย 53 |
| 27 | ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่ออยู่ใน medium ที่มีส่วนประกอบต่างกันหลายกรณี 58 |
| 28 | ผลการใช้แอนซิสโตรเทคโตรินกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย แล้ววัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter 59 |
| 29 | ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อ H^+ uptake โดยไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP 60 |
| 30/ | ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย |
| 1-3 | เมื่อเทียบกับ DNP 61-63 |
| 31 | แสดงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ของการส่ง H^+ ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรียโดย uncouplers ที่เป็นการค่อน 79 |
| 32 | แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ carbocyanide dyes ซึ่งเป็นตัวอย่างของ cationic uncouplers 79 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|-----------------|---|--|
| นน. | = | น้ำหนัก |
| นนอ. | = | นาโนอะตอม |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มคก. | = | ไมโครกรัม |
| มคม. | = | ไมโครโมล |
| มคล. | = | ไมโครลิตร |
| มคอ. | = | ไมโครอะตอม |
| มม. | = | มิลลิเมตร |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| ACTR | = | ancistrotoectarine |
| ADP | = | adenosine-5'-diphosphate |
| ATP | = | adenosine-5'-triphosphate |
| Atract | = | atractyloside |
| °C | = | degree Celsius |
| CCCP | = | carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone |
| DNP | = | 2, 4-dinitrophenol |
| DINB | = | 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate |
| DTT | = | dithiothreitol |
| EtOH | = | Ethanol |
| g | = | centrifugal force unit (gravity) |
| H ⁺ | = | proton |
| HEPES | = | N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid |
| I ₅₀ | = | 50% inhibition |
| K ⁺ | = | potassium ion |
| M | = | molar |
| mg | = | milligram |

| | | |
|------------------|---|---|
| Mg ²⁺ | = | magnesium ion |
| min | = | minute |
| ml | = | milliliter |
| mOsm | = | milliosmolar |
| μatom | = | microatom |
| μg | = | microgram |
| μl | = | microliter |
| μM | = | micromolar |
| N | = | normality |
| NAD ⁺ | = | nicotinamide adenine dinucleotide |
| NADH | = | reduced nicotinamide adenine dinucleotide |
| natom | = | nanoatom |
| nm | = | nanometer |
| O | = | oxygen |
| Oligo | = | oligomycin |
| Pi | = | inorganic phosphate |
| RCI | = | respiratory control index |
| RLM | = | rat liver mitochondria |
| RPM | = | revolution per minute |
| RR | = | ruthenium red |
| TMPD | = | N, N, N, N-tetramethyl-p-phenylenediamine |
| w/v | = | weight by volume |
| / | = | per |
| % | = | percent |

ศูนย์วิทยุโทรทัศน์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 1

บทนำ

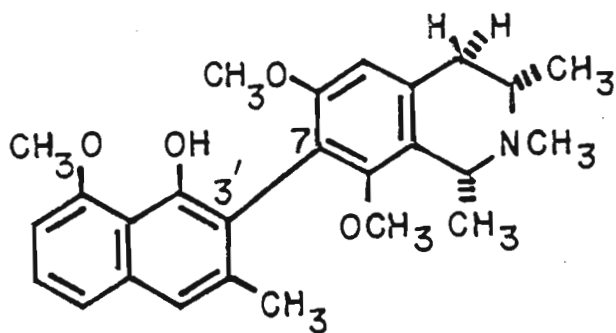
ในฐานะที่เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยสมุนไพรที่ทางภาควิชากำลังให้ความสนใจศึกษาอยู่ วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยนี้ คือ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของแอนซิสโตรเทคโตริน (ancistrotectorine) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะมีความสำคัญสำหรับใช้ประกอบการพิจารณาหาความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารนี้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

ในบทนี้มี เนื้อหาที่สำคัญสองเรื่องคือ ตอนแรกเป็นเรื่องที่เกี่ยวกับการค้นพบและผลการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจของแอนซิสโตรเทคโตริน เท่าที่มีในปัจจุบัน ตลอดจนแนวเหตุผลที่นำไปสู่การวิจัยนี้ ส่วนตอนหลังเป็นเรื่องที่เกี่ยวกับทฤษฎีหรือสมมติฐานที่เกี่ยวกับการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ที่จำเป็นต้องใช้อ้างอิงและอธิบายผลของการวิจัยนี้

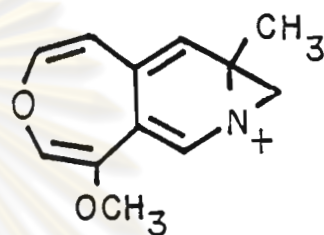
ก. แอนซิสโตรเทคโตริน

แอนซิสโตรเทคโตรินเป็นอัลคาลอยด์ (alkaloid) ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากใบของพืชที่เป็นไม้เถาที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Ancistrocladus tectorius (Lour.) Merr. โดย รศ.นิจศิริ เรืองรังษีและคณะ (1) แห่งภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และยังพบด้วยว่าสารนี้มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น 7,8-linked naphthalene-isoquinoline ชนิดที่สองที่พบตามธรรมชาติ ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 1

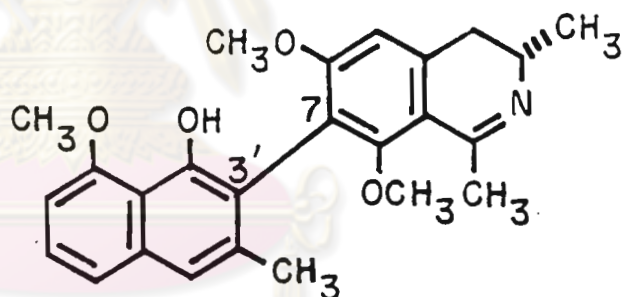
Ancistrocladus tectorius (Lour.) Merr. สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อพื้นบ้านแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น คือค้อนหมาขาว (ภาคกลาง); ค้อนหมาแดง (นครราชสีมา); ค้อนคันทมา (ยะลา); คันทรง, ทองคันทรง (ชลบุรี); หันทรง (ตราด); หางกวาง (นครปฐม); หูกวาง, หูกวง (เพชรบุรี); ลิ่นกวาง, ลิ่นควาย,



(1)



(2)



(3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

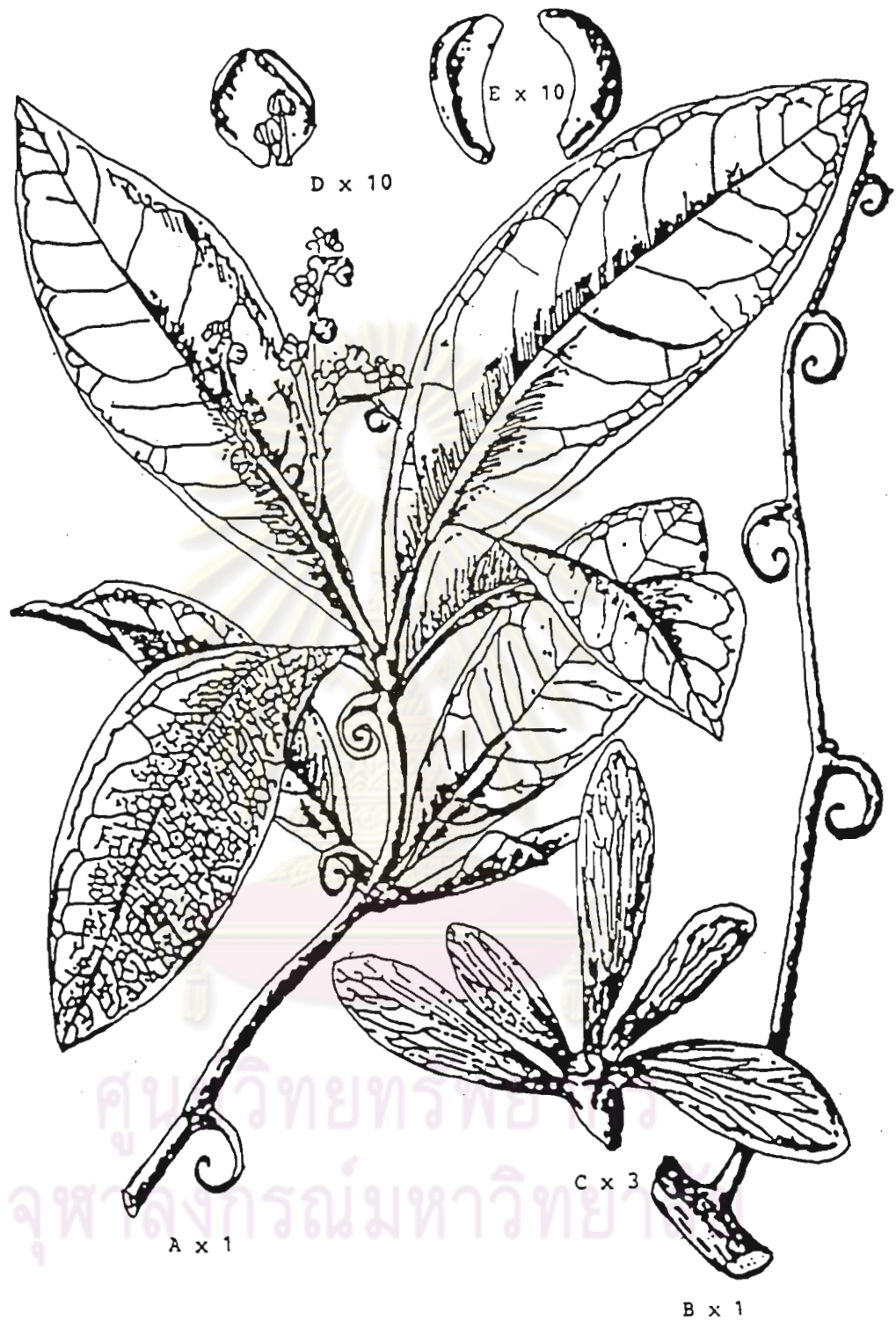
- รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 1) แอนซิสโตรเทคโตริน (นน.โมเลกุล = 421.5)
2) isoquinoline unit ของแอนซิสโตรเทคโตรินสามารถ derived ไปเป็นดังที่
แสดงในรูปนี้ 3) แอนซิสโตรคลาดิดิน (ancistrocladidine) ซึ่งเป็น 7, 3'-
linked naphthalene-isoquinoline ชนิดแรกที่พบตามธรรมชาติ (1)

ชินตะโกพลี (ลำปาง); ขุนมา (สุรินทร์); โคนมะเด็น (สุพรรณบุรี); ยูลง (นราธิวาส)
(2,3)

พืชชนิดนี้มีลักษณะทั่วไป คือ เป็นไม้เถา ขึ้นบนดินปนทรายใกล้ชายฝั่งทะเลอันดามัน อินโดจีนถึงตอนใต้ของจีน คาบสมุทรมลายู และภาคใต้ของเกาะสุมาตรา (4) ในประเทศไทย พบขึ้นตามป่าดงดิบทั่วไป ลักษณะเป็นไม้เถาขนาดใหญ่เลื้อยพาดต้นไม้อื่น ๆ กิ่งก้านเล็ก ๆ เปลี่ยนเป็นมือที่มีลักษณะเป็นขอแข็ง ๆ สำหรับยึดเกาะ ใบของพืชชนิดนี้จะออกเป็นกระจุกที่ปลายกิ่ง ก้านใบสั้นมากหรือไม่มีก้านใบ รูปใบจะมีลักษณะคล้ายรูปหอกกลับหรือรูปรี โดยปลายใบจะแหลมและโคนใบเรียวแหลมค้อย ๆ สอดเข้าหาก้านใบ ตัวใบแข็งกระด้าง เส้นใบเชื่อมกันก่อนถึงขอบใบ ซึ่งมีลักษณะเรียบหรือเป็นคลื่น ขนาดของใบกว้าง 3.5-7 เซนติเมตร ยาว 12-29 เซนติเมตร พืชชนิดนี้จะมีดอกขนาดเล็กสีแดงเข้มเป็นช่อกระจายที่ยอด กลีบดอกมี 5 กลีบ กลีบเลี้ยงของดอกติดกับโคนใบเป็นท่อนสั้น ๆ และปลายแยกเป็น 5 กลีบ ส่วนนี้ต่อไปจะเจริญเป็นปีกหุ้มผล ผลมีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใ้ผลจะมีปีกหุ้มผล 5 ปีก ซึ่งยาวไม่เท่ากันรองรับ (รูปที่ 2) (2,3)

พืชสกุล (genus) นี้ได้นำมาใช้ประโยชน์แตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่นในประเทศพม่าและมาเลเซีย จะนำรากของ Ancistrocladus extensus Wall. มาใช้เป็นยารักษาโรคบิดและไข้จับสั่น (5,6) ในประเทศไทย จะนำใบอ่อนของ Ancistrocladus tectorius นี้มารับประทานเป็นผัก ใบแก่ใช้ยุงหลังคา นอกจากนี้ แพทย์แผนโบราณของไทยทางภาคตะวันออกเฉียงและปราจีนบุรี นำน้ำที่ได้จากการต้มพืชชนิดนี้มาอาบรักษาอาการบวมตามตัวและเม็ดผื่นคันตามผิวหนัง (2,3)

เนื่องจากแอนซิสโตรเทคโตรินเป็นสารใหม่ ที่สามารถสกัดให้บริสุทธิ์ และได้ปริมาณสูงจากใบของ Ancistrocladus tectorius ซึ่งเป็นพืชที่พบได้มากในประเทศไทย อีกทั้งยังไม่มีผู้รายงานการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารนี้เลย รศ.ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์และคณะ (7-9) แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้เริ่มทำการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนี้ เพื่อหาข้อมูลสำหรับประกอบการพิจารณาหาความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารนี้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ ผลการวิจัยที่น่าสนใจเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนี้ จึงถูกรายงานออกมาเป็นระยะ ๆ ส่วนหนึ่งของผลรายงานการวิจัย



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทั่วไปของ Ancistrocladus tectorius (Lour.) Merr. A) ลำต้น และกิ่ง B) กิ่งที่เปลี่ยนเป็นขอเกี่ยว C) ผล D) กลีบ ดอกไม้และช่อเกสรตัวผู้ E) กลีบเลี้ยงของดอกไม้ (จาก Flora Hainanica, Tome 1., 1964 หน้า 515)

ดังกล่าว ได้ผลการทดลองที่เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือสารนี้สามารถลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบที่ถูกแยกออกจากสัตว์ทดลองได้หลายชนิด ทั้งที่เกิดขึ้นเองและที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ (7-9) และยังมีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูขาวและกระต่ายได้เพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่ให้ (dose-dependent) ในขณะที่ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การลดความดันเลือดของแอนฮิสโดร เทคโดรินคาดว่าเกิดจากการขยายตัวของหลอดเลือดเป็นสำคัญ (9)

ปกติสารที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบในทางการวิจัยแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) สารกระตุ้นที่มีรีเซปเตอร์เฉพาะ (specific receptor) บนกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของกล้ามเนื้อ เช่นอะเซทิลโคลีน (acetylcholine), ฮิสตามีน (histamine), ซีโรโตนิน (serotonin), คาร์บาโคล (carbacol), ออกซิโตซิน (oxytocin), นอร์อะดรีนาลีน (noradrenaline), ฟีนิลเลเฟริน (phenylephrine) และ 2) สารกระตุ้นที่ไม่มีรีเซปเตอร์เฉพาะบนกล้ามเนื้อเรียบ เช่น แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) อย่างไรก็ตาม สารกระตุ้นทั้งสองประเภทนี้ มีกระบวนการร่วมกันในการทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ คือทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระ ($free\ Ca^{2+}$) ภายในเซลล์ ซึ่งแคลเซียมอิสระที่เพิ่มขึ้นนี้จะมียับยั้งที่สำคัญในการหดตัวของกล้ามเนื้อ (10-12)

ผลการวิจัยฤทธิ์ของแอนฮิสโดร เทคโดรินที่มีต่อกล้ามเนื้อเรียบที่ถูกแยกออกมาจากสัตว์ทดลอง พบว่า มีฤทธิ์ลดและยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายและหนูตะเภา ทั้งการบีบตัวที่เกิดขึ้นเองและกระตุ้นให้เกิดด้วยสารหลายชนิด เช่น อะเซทิลโคลีน, ฮิสตามีน, ซีโรโตนิน, แบเรียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ การหดเกร็งของมดลูกหนูขาวและหนูตะเภาทั้งที่เกิดขึ้นเองและที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยออกซิโตซินและเซโรโตนินก็ถูกยับยั้งโดยแอนฮิสโดร เทคโดรินเช่นกัน ฤทธิ์การยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบดังกล่าว รุนแรงขึ้นตามขนาดของการให้แอนฮิสโดร เทคโดริน (7) และมีฤทธิ์ลดการหดเกร็งของท่อสุจิ (vas deferens) หนูขาวที่กระตุ้นด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ แบเรียมคลอไรด์ ซีโรโตนินและนอร์อะดรีนาลีน (8) นอกจากนี้ยังพบว่า แอนฮิสโดร เทคโดริน มีฤทธิ์ลดการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) หนูขาว ที่กระตุ้นด้วยฟีนิลเลเฟริน

และลดการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย ที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ได้อีกด้วย

(9) ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่า แอนฮิสโดรเทคโดรินไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ โดยไปยับยั้งที่รีเซปเตอร์ไครีเซปเตอร์หนึ่งโดยเฉพาะ และเป็นแบบ non-competitive ซึ่งมีแนวโน้มว่า สารนี้อาจขัดขวางกระบวนการต่าง ๆ ที่มีผลโดยตรงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ เช่นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ เป็นต้น (7-9, 13)

ในการศึกษาฤทธิ์ของแอนฮิสโดรเทคโดรินต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ในตัวสัตว์ทดลอง พบว่า สารนี้สามารถลดการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายที่ผสมหลังจากฉีดสารนี้ เข้าทางหลอดเลือดดำ และยังสามารลดการหดตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ในหนูถีบจักร หลังจากฉีดสารนี้เข้าทางช่องท้อง (7) ผลการทดลองนี้สนับสนุนสรรพคุณในการรักษาโรคบิด ของพืชสกุลนี้ (5,6)

เมื่อศึกษาผลของแอนฮิสโดรเทคโดรินต่อการหดตัวของท่อสุจิที่ถูกแยกจากหนูขาว เปรียบเทียบกับเวอราปามิล (verapamil) ซึ่งเป็นยาในกลุ่มของ calcium antagonists (สามารถยับยั้งแคลเซียมไม่ให้เข้าไปในเซลล์ทาง slow channel ได้) พบว่าสารทั้งสอง ในขนาดต่ำสามารถลดการหดตัวของท่อสุจิที่เกิดจากการให้โปแตสเซียมคลอไรด์ได้เหมือนกัน โดยที่แอนฮิสโดรเทคโดรินมีความแรงน้อยกว่า แต่เมื่อให้สารทั้งสองในขนาดสูง พบว่า ฤทธิ์ ของเวอราปามิลในการลดการหดตัวของท่อสุจียังคงสามารถต้านได้ด้วยการให้แคลเซียม คลอไรด์ ในขณะที่ฤทธิ์ดังกล่าวของแอนฮิสโดรเทคโดรินไม่สามารถต้านได้ด้วยการให้ แคลเซียมคลอไรด์ (8) ผลของความแตกต่างกันนี้ชี้แนะว่า นอกจากกระบวนการที่ใช้ควบคุม ปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์แล้ว แอนฮิสโดรเทคโดรินยังอาจไปมีผลต่อกระบวนการ อื่น ๆ ที่มีผลโดยตรงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อได้อีกด้วย เช่นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการ สร้างและการใช้พลังงานในการหดตัวของกล้ามเนื้อ เป็นต้น (14)

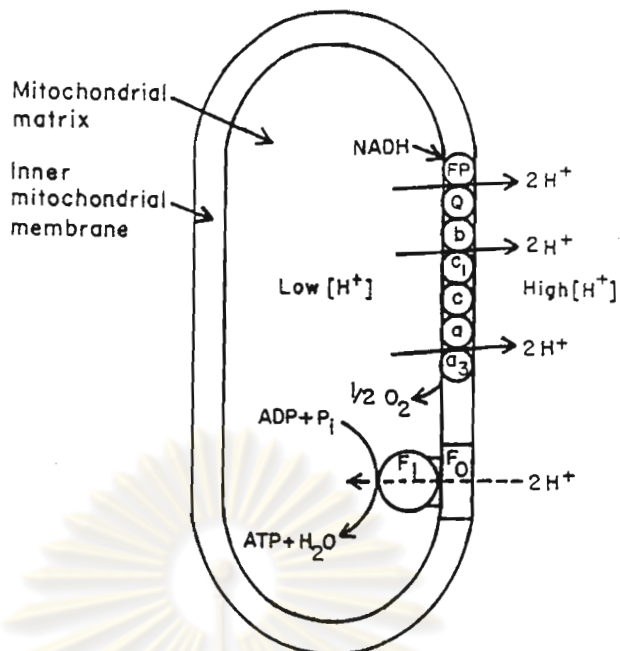
นอกจากสามารถลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว แอนฮิสโดรเทคโดรินยังสามารถลดอัตราการเต้นและลดการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูขาว ที่แยกออกมาได้อีกด้วย (9)

เนื่องจากการหดตัวของกล้ามเนื้อเนื้อทุกชนิด นอกจากจะต้องการแคลเซียมแล้ว ยังต้องการสารพลังงานสูงในรูปของ ATP ด้วยเช่นกัน (15) และไมโทคอนเดรียก็เป็น organelle ที่สำคัญที่สุดของเซลล์ในการสร้าง ATP (16-21) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีส่วนในการควบคุมปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้อีกด้วย (22-23) อีกประการหนึ่ง ก่อนที่เราจะนำเอาสารเคมีต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ จำเป็นต้องศึกษาการออกฤทธิ์ของสารเคมีนั้น ๆ ต่อการทำงานในทุก ๆ ระบบของร่างกาย ให้มีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยามากที่สุดเท่าที่จะทำได้ นอกจากนั้น การศึกษานี้อาจเป็นช่องทางในการนำเอาแอนติสไตรเทคโตรินไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (pharmacological tool) เพื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการศึกษาเกี่ยวกับไมโทคอนเดรียก็ยังสามารถใช้เป็น model สำหรับศึกษา drug-membrane interaction ได้อีกด้วย (24) ดังนั้น การศึกษาผลของแอนติสไตรเทคโตรินที่มีต่อหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรียในการวิจัยนี้ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและมีเหตุผล

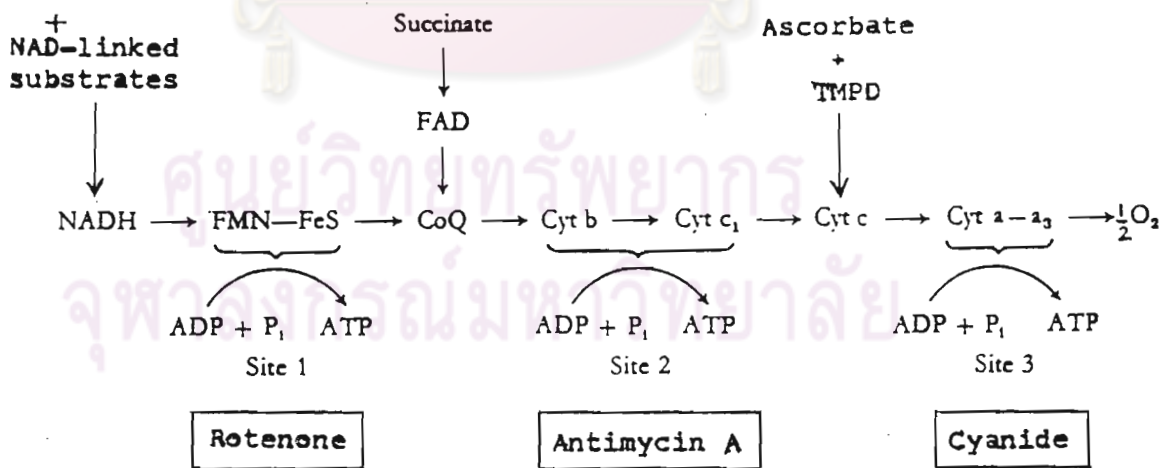
ข. การหายใจและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโทคอนเดรียเป็น organelleที่มีความสำคัญเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ (cell metabolism) เช่น มีเอนไซม์ (enzymes) ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration), เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism), เมตาบอลิซึมของกรดไขมัน (fatty acid metabolism), เมตาบอลิซึมของแอมโมเนีย (ammonia metabolism) และการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (heme biosynthesis) เป็นต้น ทั้งนี้ โครงสร้างและเอนไซม์ของไมโทคอนเดรียมีความสำคัญอย่างมากที่ทำให้ไมโทคอนเดรียสามารถทำหน้าที่สำคัญต่าง ๆ เหล่านี้ได้ (25)

ในการวิจัยนี้ สนใจทดสอบหน้าที่ของไมโทคอนเดรียเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งจะมีการสร้างสารพลังงานสูงในรูปของ ATP จากกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันด้วย โครงสร้างของไมโทคอนเดรียที่มีส่วนสำคัญในการทำหน้าที่นี้ (รูปที่ 3) คือ เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ซึ่ง impermeable ต่อ H^+ (protons)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างและเอนไซม์ของไมโทคอนเดรียเฉพาะส่วนที่มีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันตาม chemiosmotic theory องค์ประกอบต่าง ๆ ของลูกโซ่หายใจ คือ FP = flavoprotein, Q = coenzyme Q, และ b, c₁, c, a, a₃ = cytochrome (18)



รูปที่ 4 แสดงลำดับการขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH ไปมอบให้กับอะตอมของออกซิเจน, ตำแหน่งที่มีการปลดปล่อยพลังงานสำหรับการใช้ในการสร้าง ATP จาก ADP+P_i, ชนิดต่าง ๆ ของยับยั้งและตัวอย่างของ site specific inhibitors (19)

นอกจากนี้บนเยื่อหุ้มชั้นในยังมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีส่วนสำคัญในการทำหน้าที่ดังกล่าวอยู่ด้วย คือ มีองค์ประกอบต่าง ๆ ของลูกโซ่หายใจ (respiratory chain, electron transport chain, oxidative chain) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ (oxidize) NADH และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปให้แก่อะตอมของออกซิเจน และมีเอนไซม์ ATPase (coupling factor 1 หรือ F1) ที่เห็นมีลักษณะเป็นเม็ดกลมหันหัวเข้าไปใน matrix, F1 นี้จะค่ออยู่กับ Fo เป็น F1-Fo complex, Fo ซึ่งฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในจะทำหน้าที่เป็น channel สำหรับการเคลื่อนที่ของ H^+ เข้าไปใน matrix, ตำแหน่งต่าง ๆ (sites) ที่มีการปลดปล่อยพลังงานสำหรับใช้ในการสร้าง ATP จาก ADP และ Pi (inorganic phosphate) อยู่บนลูกโซ่หายใจ ซึ่งสามารถแยกออกได้เป็น 3 ตำแหน่งดังแสดงในรูปที่ 4

สับสเตรท (substrates) ที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์ได้ปกติจะได้จากการสลายตัวของสารอาหารที่รับประทานเข้าไป แล้วผ่านออกมาทางวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 พวกคือ NAD^+ -linked substrates เช่น glutamate และ malate อีกพวกหนึ่งคือ succinate ดังนั้น จากรูปที่ 4 จะเห็นว่า แต่ละโมเลกุลของ NADH เมื่อถูกออกซิไดซ์โดยลูกโซ่หายใจจะมีผลทำให้มีการสร้าง ATP 3 โมเลกุล พร้อมกับ 1 อะตอมของออกซิเจนจะถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา เราเรียกมีอัตราส่วน $ADP/O = 3$ ทำนองเดียวกัน ถ้า succinate ถูกออกซิไดซ์จะทำให้มีการสร้าง ATP 2 โมเลกุล และทำให้มีอัตราส่วน $ADP/O = 2$ นอกจากนี้ถ้าใช้ artificial substrates เช่น ascorbate และ TMPD ซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอนกับ cytochrome c โดยตรง ด้วยวิธีนี้จะทำให้มีการสร้าง ATP 1 โมเลกุลและอัตราส่วน $ADP/O = 1$ (16-21)

ในสภาวะปกติของไมโตคอนเดรีย การเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ของสับสเตรทและการสร้าง ATP จากปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน ($ADP+Pi \rightleftharpoons ATP$) จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) โดยจะเป็นบังคับซึ่งกันและกัน และเพื่อให้แตกต่างจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันในที่อื่น ๆ จึงเรียกปฏิกิริยาที่ต้องเกิดควบคู่กันนี้ว่า ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน การต้องเกิดควบคู่กันนี้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโตคอนเดรีย เราเรียกว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) (24) ในการวิจัยเราสามารถทดลองให้เห็นการควบคู่กันนี้พร้อมกับคำนวณค่าดัชนีการควบคุม

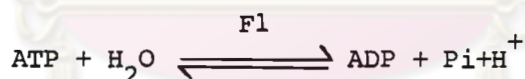
การหายใจ (respiratory control index = RCI) ออกมาได้ ดังจะได้พบในบทที่ 2 และ 3

ในบางสภาวะไมโทคอนเดรียอาจจะเสียการควบคุมการหายใจไปได้ เช่นไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้คุณภาพไม่ดีหรือเก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไม่โทคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น DNP (2,4-dinitrophenol) กรณีเหล่านี้ไมโทคอนเดรียสามารถออกซิโคซ์สเตรทอย่างอิสระ ทำให้มีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไปโดยไม่จำเป็นต้องเกิดความคู่กับปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชันเหมือนในสภาวะปกติ เราเรียกเกิดอันคัปปลิง (uncoupling) และเรียกสารที่ทำให้เกิดกระบวนการนี้ว่า uncouplers หรือ uncoupling agents (16-21)

ในปัจจุบันเรายอมรับกันแน่นอนแล้วว่า การสร้าง ATP ในไมโทคอนเดรียนั้น จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามลูกโซ่หายใจ เพื่อมอบให้กับอะตอมของออกซิเจน และทั้งสองกระบวนการนี้ต้องขึ้นแก่กันและกัน (interdependence) แต่เรายังไม่สามารถทราบแน่ชัดทั้งหมดว่าทั้งสองกระบวนการนี้มีกลไกในการเชื่อมโยงกันได้อย่างไร นักวิจัยเชื่อกันว่า ระหว่างการควบคู่ทั้งสองกระบวนการนี้ พลังงานที่ได้จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามลูกโซ่หายใจ เพื่อมอบให้กับอะตอมของออกซิเจนนั้น ควรจะถูกสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนมากกว่าที่จะนำมาใช้ในการสร้าง ATP เลย ดังนั้น ประเด็นที่สำคัญคือ พลังงานที่ว่านี้จะถูกสงวนไว้ในรูปใด เรื่องนี้มีนักวิจัยเสนอกันไว้หลายแนวความคิด (26) แต่ที่เป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน คือ แนวความคิดที่เรียกว่า chemiosmotic theory ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษที่ชื่อ Peter Mitchell (16-21)

กลไกการเกิดออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ตาม chemiosmotic coupling (26-27) สามารถสรุปสาระสำคัญจากรูปที่ 3 ได้ดังนี้ ชั้นแรก ระหว่างที่สับสเตรทถูกออกซิโคซ์ และมีการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามลูกโซ่หายใจนั้น จะทำให้มีการส่งผ่าน H^+ จาก matrix ออกมาข้างนอก (intermembrane space) เป็นผลทำให้เกิดชั้นที่สอง คือ เกิด H^+ gradient ซึ่งเป็นกรณำเอาพลังงานซึ่งได้จาก redox reactions บนลูกโซ่หายใจมาสงวนไว้ในรูปของ high-energy electrochemical gradient ก่อน และในขั้นสุดท้ายจะมีการสร้าง ATP จาก ADP และ P_i โดย H^+ จากด้านนอก จะกลับเข้าไปในไมโทคอนเดรียทาง F_o

แล้วมีผลผลักดันให้ F1 กระตุ้นปฏิกิริยาการสร้าง ATP, F1-Fo complex จึงเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างมากในปฏิกิริยาการสร้าง ATP ส่วนการเข้าและออกของ H^+ ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียจะเป็นตัวเชื่อมโยงกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนบนลูกโซ่หายใจและปฏิกิริยาการสร้าง ATP ดังนั้น กระบวนการต่อเนื่องต่าง ๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ใน intact mitochondria ที่สามารถควบคุมการเข้าและออกของ H^+ ได้ดี และกลไกการเกิดอันคัปปลิงของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ก็เกิดเนื่องจาก H^+ gradient ของไมโทคอนเดรียถูกทำลาย (collapsed) ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง เช่น โครงสร้างของเยื่อหุ้มชั้นในบางส่วนถูกทำลายในกรณีของ aging mitochondria หรือกรณีของ DNP ซึ่งเป็นกรดอ่อน เราคิดว่า DNP มีฤทธิ์อันคัปปลิงได้ เพราะมีคุณสมบัติเป็น H^+ ionophore คือสามารถพาเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปใน matrix โดยไม่ต้องผ่าน F1 - Fo complex ได้อย่างต่อเนื่องจนไมโทคอนเดรียไม่สามารถสร้าง H^+ gradient ได้ ทำให้มีการสร้าง ATP ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย ในขณะที่ไมโทคอนเดรียยังคงสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทและใช้ออกซิเจนได้ในอัตราที่สูงกว่าปกติด้วย นอกจากนี้ในสภาวะดังกล่าวยังพบด้วยว่า F1 ซึ่งปกติจะใช้กระตุ้นให้มีการสร้าง ATP นั้นกลับกระตุ้นให้มีการสลายตัวของ ATP (ATP hydrolysis) เพิ่มมากขึ้น ดังนี้



ผลการกระตุ้นการสลายตัวของ ATP นี้เรียก ATPase activity ซึ่งในสภาวะปกติจะพบว่ามีน้อยมาก (19) ดังนั้น ทางหนึ่งที่เราสามารถวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้ก็คือ วัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP ดังจะได้พบในบทที่ 2 และ 3

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียนอกจากประเภทที่มีฤทธิ์อันคัปปลิงแล้ว ในปัจจุบันยังพบว่ามีอีกหลายพวกหลายชนิดด้วยกัน (28) ที่จะขอกกล่าวเพิ่มเติมในที่นี้มีอีก 2 ประเภทคือ

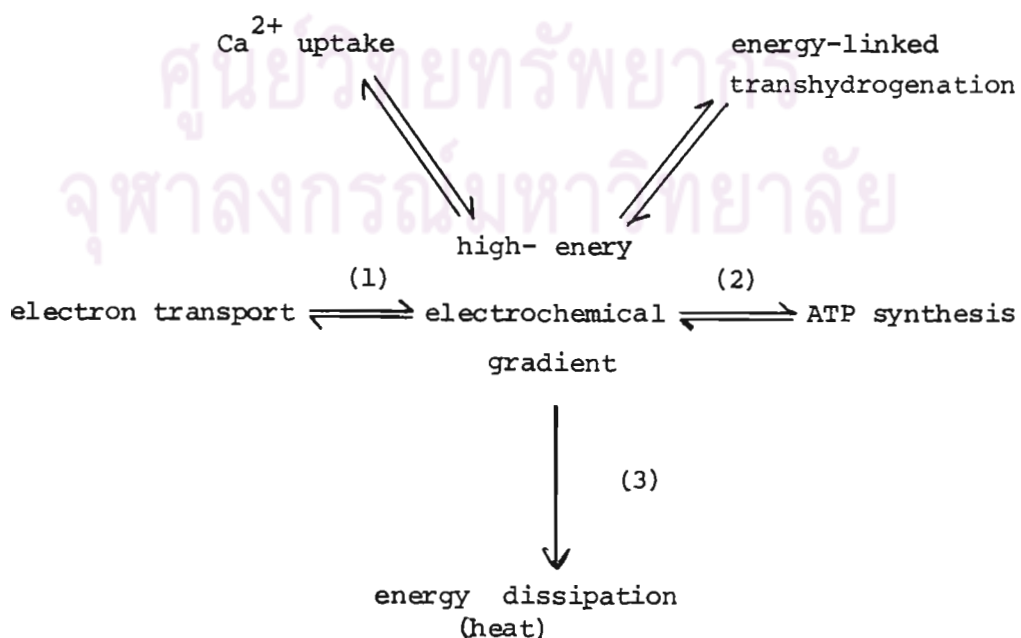
ประเภทแรกได้แก่พวกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน ($ADP + Pi \rightleftharpoons ATP$) ในกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน เช่น oligomycin, atractyloside

และ DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) โดยมีกลไกการเกิดแตกต่างกันคือ oligomycin มีผลยับยั้งเอนไซม์ ATPase ที่ใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาทั้งในการสร้างและการสลายตัวของ ATP โดยตรง (29) และ atractyloside จะมีผลยับยั้งที่ adenine nucleotide translocator (30) ทำให้ไม่สามารถขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้ จึงทำให้เสมือนกับการขาด ADP สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา ส่วน DTNB ซึ่งเป็น aromatic disulfide สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยานี้ได้โดยไปทำปฏิกิริยากับ SH groups (sulfhydryl groups) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย แล้วทำให้มีผลยับยั้งการส่งผ่าน Pi จากภายนอกเข้าไปในไมโทคอนเดรีย (31) จึงทำให้เสมือนกับการขาด Pi สำหรับทำปฏิกิริยา ฤทธิ์ยับยั้งของ DTNB นี้สามารถแก้ไขและป้องกันได้ด้วย DTT (dithiothreitol) ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันและแก้ไขการออกซิเดชันของ SH groups (32-33)

อีกประเภทหนึ่งได้แก่พวกที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการออกซิเดชันของฟอสฟอริลเลชัน โดยสามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนลูกโซ่หายใจได้อย่างเฉพาะเจาะจง (site specific inhibitors) เช่น rotenone, antimycin A และ cyanide ตำแหน่งเฉพาะต่าง ๆ ที่สารเหล่านี้ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนบนลูกโซ่หายใจดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจงนี้ทำให้สารต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาแตกต่างกัน คือ rotenone ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q ทำให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถสร้าง ATP ที่ site I แต่ rotenone ไม่สามารถยับยั้งการเกิด 2 ATP การใช้ succinate เป็นสับสเตรตได้ ทำนองเดียวกัน ถ้าเราใช้ antimycin A ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการออกซิโคไซท์ cytochrome b โดย cytochrome c คือยับยั้งการสร้าง ATP ที่ site II แต่ antimycin A จะไม่สามารถยับยั้งการเกิด 1 โมเลกุลของ ATP จากการใช้อะสคอร์เบต และ TMPD เป็นสับสเตรตได้ นอกจากนี้ ถ้าเราใช้ cyanide ซึ่งจะไปจับกับ cytochrome $a+a_3$ และยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome ไปยังอะตอมของออกซิเจน จึงทำให้ไม่สามารถใช้ออกซิเจนมาใช้ในการสร้าง ATP ได้เลย ไม่ว่าจะใช้สับสเตรตชนิดใด คือทำให้มีผลคล้ายกับการขาดออกซิเจน (anoxic) (16-21)

ดังได้กล่าวแล้วว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันในระบบการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันเป็นปฏิกิริยาที่ต้องเกิดควบคู่กัน โดยเป็นปัจจัยซึ่งกันและกัน ดังนั้น เมื่อไมโตคอนเดรียได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งก็จะมีผลกระทบไปถึงอีกปฏิกิริยาหนึ่งด้วย เช่นถ้าไมโตคอนเดรียได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน (oligomycin, atractyloside, DTNB) ก็จะมีผลทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันถูกยับยั้งไปด้วยเช่นกัน ดังเราจะได้เห็นจากการทดลองในบทที่ 2 และ 3 ว่าในกรณีที่ไมโตคอนเดรียได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน จะมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนในปฏิกิริยาออกซิเดชันพลอยถูกยับยั้งตามไปด้วย

ประเด็นสุดท้ายที่จะขอก้าวในบทนี้ คือเรื่องเกี่ยวกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ ดังได้กล่าวแล้วว่า เมื่อไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์สับสเตรท พลังงานที่ได้จะถูกสงวนไว้ในรูปของ high-energy electrochemical gradient ก่อนที่จะนำไปใช้ในการผลักดันให้มีการสร้าง ATP นอกจากนี้ ไมโตคอนเดรียยังสามารถใช้พลังงานที่สงวนไว้ได้เ็นำไปใช้สำหรับการขนส่งไอออนต่าง ๆ (ions) เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย การสะสมแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรียรวมทั้งปฏิกิริยา transhydrogenation ซึ่งเป็นปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของ NADP^+ โดย NADH ก็จำเป็นต้องใช้พลังงานที่สะสมไว้นี้ด้วยเช่นกัน (16-21) ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ เหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 5 ดังนี้



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ และตำแหน่งต่าง ๆ ที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไปออกฤทธิ์ (1) สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนบนลูกโซ่หายใจ เช่น rotenone, antimycin A และ cyanide (2) สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP+Pi เช่น oligomycin, atractyloside และ DTNB (3) สารที่มีฤทธิ์อันคับปลิง เช่น DNP และ CCCP



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ซึ่งจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.นครชัยศรี จ. นครปฐม

2. การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับของหนูขาว

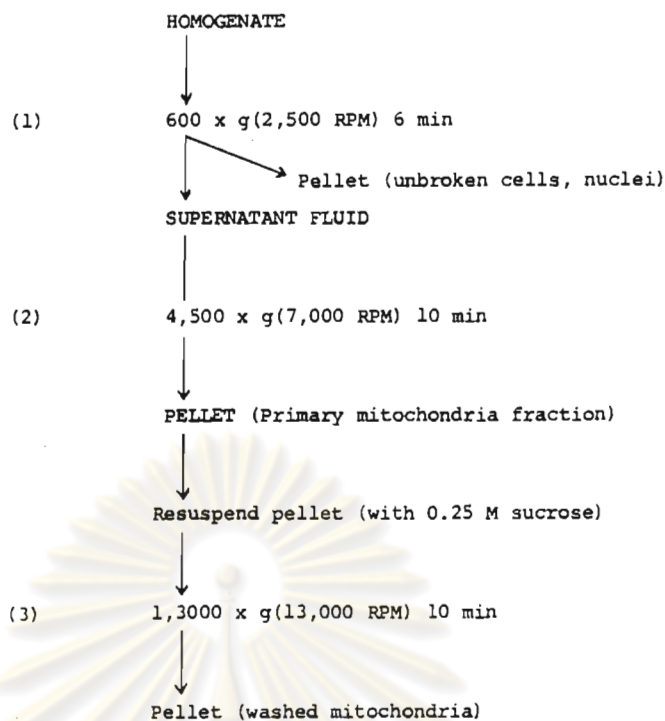
ใช้วิธีของ Hogeboom (34) ซึ่ง Myers and Slater (35) เป็นผู้บรรยายไว้ โดยดัดแปลงเล็กน้อย

ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโทคอนเดรียจะถูกเก็บโดยแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง ให้เย็นอยู่ตลอดเวลา (ice-cold) ส่วนขณะปั่นแยกไมโทคอนเดรียด้วย refrigerated centrifuge ตั้งอุณหภูมิของเครื่องไว้ที่ 2°C

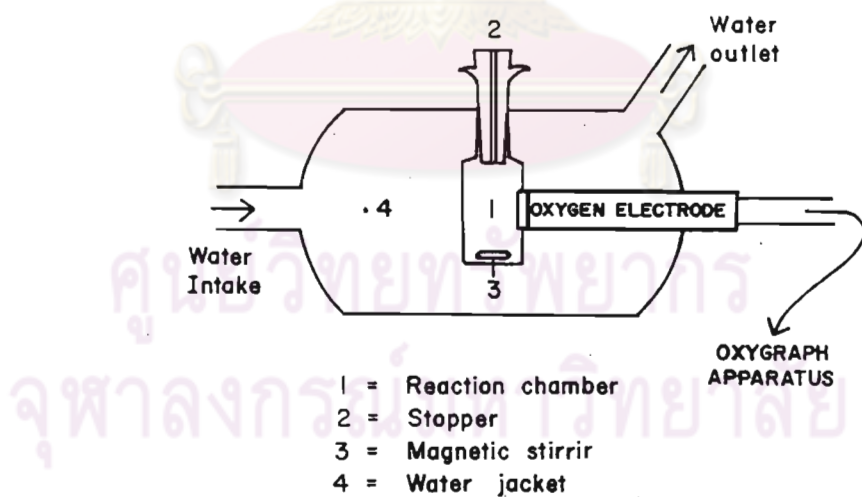
ขั้นตอนในการเตรียมแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

ขั้นแรก ทำให้หนูตายอย่างทันทีทันใดด้วยการตีที่หัวแล้วทำ cervical dislocation รีบตัดตับมาล้างและแช่ใน medium ที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES buffer (pH 7.4) และ 1mM EGTA (pH 7.4) ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยการกรไกร แล้วนำไป homogenize ด้วย glass homogenizer เพื่อให้เซลล์ตับแตก ในขั้นแรกนี้ผลที่ได้คือ liver homogenate ประมาณ 60 มล./หนู 1 ตัว

ขั้นที่สอง ปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate โดยใช้ Hitachi Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge, Model 20 PR-52 D, Rotor Model RPR 20-3 786 ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภาพในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation



รูปที่ 7 แสดง incubation chamber ซึ่งมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลออกมาได้ทันทีทาง oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

จากรูปที่ 6 pellet ที่ได้จากการปั่นครั้งสุดท้ายจะเห็นเป็นสองชั้น ชั้นบนเป็น ลีซมพูเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ คือชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างเกาะกัน แน่นและสีเข้มกว่า คือชั้นของไมโทคอนเดรีย เมื่อริน supernatant fluid และชะ ส่วนไมโครโซมออกแล้ว resuspend ไมโทคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose โดยการ homogenize ด้วยมืออย่างเบา ๆ สุดท้ายจะได้เป็น mitochondrial suspension สำหรับใช้ทดลองในการวิจัยนี้ จำนวนประมาณ 4-5 มล. ความเข้มข้นคิดเป็นปริมาณโปรตีน ของไมโทคอนเดรียประมาณ 30-40 มก./มล. และเมื่อใช้ glutamate+malate เป็น สับสเตรทจะได้ค่า RCI อยู่ระหว่าง 5-8

3. การ incubate ไมโทคอนเดรียและ incubation medium

3.1 สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย

การ incubate ไมโทคอนเดรียเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ในสภาวะต่าง ๆ กระทำใน Gilson reaction chamber (รูปที่ 7) โดยปรับอุณหภูมิ ของการทดลองให้คงที่ ที่ 26°C

incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการวิจัยนี้ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (pH 7.4), MgCl_2 8 mM, KCl 83 mM และ KH_2PO_4 (Pi) 2 mM (เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsmolar)

incubation medium ที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน เพียงแต่ปรับ pH ของ HEPES buffer ไว้ที่ 7.0, 7.4 และ 7.8 เท่านั้น

ส่วน incubation medium ที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ส่วนประกอบก็คล้ายกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน แต่ไม่ใส่ MgCl_2 ลงไปเลย แล้วปรับความเข้มข้นของ KCl ขึ้นเป็น 95 mM เพื่อให้ได้ isotonic buffer ที่มีสารละลายรวม 250 mOsmolar เท่าเดิม

3.2 สำหรับการวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

การ incubate ไมโทคอนเดรียเพื่อวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย กระทำในภาชนะทรงสูงขนาดเล็ก (ความจุประมาณ 5-10 มล.) โดยให้ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath เพื่อปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 26°C

ส่วนประกอบของ incubation medium ทั้งที่ใช้เป็นมาตรฐาน, ที่มีการเปลี่ยนแปลง pH และที่ไม่มี Mg^{2+} ใน medium คล้ายกับที่ใช้ในการวัดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เพียงแต่ไม่มีการเติม KH_2PO_4 (Pi) ลงไปใน medium ด้วยเท่านั้น

4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

ในการวิจัยเพื่อทดสอบหน้าที่ในการหายใจของไมโทคอนเดรีย หรือการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ในทางการทดลองก็คือ การทดสอบความสามารถของไมโทคอนเดรียในการออกซิโคซ์สับสเตรทเพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ในการสร้าง ATP และเนื่องจากไมโทคอนเดรียมีความจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิโคซ์สับสเตรท ดังนั้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ จึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย (24, 25)

ในการวิจัยนี้ วัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิควิธีที่เรียก polarographic oxygen electrode technique (24, 25) เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ Gilson reaction chamber (รูปที่ 7) ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2 มล. และมีฝาจุก (stopper) สำหรับเปิดและปิดได้ ใช้สำหรับ incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ นอกจากนี้ตรงกลางฝาจุกยังมีรูเล็ก ๆ สำหรับให้เข็มของ microsyringe สอดลงไปในการเติมสารต่าง ๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโทคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรวมกับออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลองได้ เมื่อไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง เราสามารถติดตามอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้โดยมี oxygen electrode (Clark type) ต่อเข้าไปใน reaction chamber (รูปที่ 7) คอยติดตามผลของปฏิกิริยา ข้อมูลจาก oxygen electrode จะถูกส่งไปเข้าเครื่อง biological oxygen monitor (YSI Model 53) ที่หน้าบดเครื่องจะมีเข็มชี้บอก

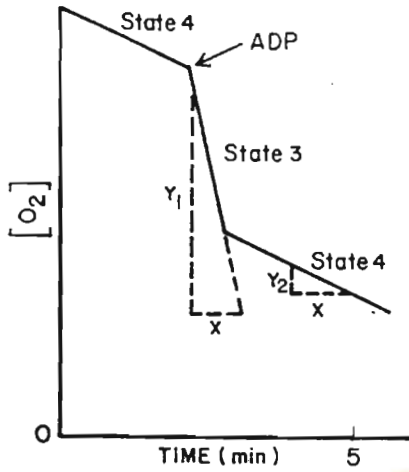
ถึงปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ในขณะนั้น ๆ ว่ามีอยู่มากน้อยเท่าใด ทำให้เราสามารถทราบอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ได้ นอกจากนี้เรายังสามารถบันทึกผลอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ออกมาทันที โดยต่อ output เข้ากับเครื่อง Gilson recorder (model N2) ซึ่งจะมีปากกา (recorder pen) คอยบันทึกผลที่ได้ลงในกระดาษกราฟที่กำลังเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วคงที่, tracing ที่ปรากฏบนกระดาษกราฟ โดยวิธีนี้เราเรียก oxygen-electrode tracing (polarographic tracing, oxygraph tracing) ซึ่งมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ผลการทดลองเป็นอย่างมาก

ระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียและระหว่างที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนส่วนประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยา (reaction mixture) ใน reaction chamber ให้เข้ากันคืออยู่ตลอดเวลา และสามารถควบคุมอุณหภูมิของการทดลองต่าง ๆ ใน reaction chamber ให้คงที่ ที่ 26 °C อยู่ตลอดเวลา โดยใช้ น้ำที่อุณหภูมิให้คงที่ ที่ 26 °C ไหลเข้าและออกอยู่ใน chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งล้อมรอบ reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง (รูปที่ 7) น้ำที่มีอุณหภูมิ 26 °C นี้จะวนเวียน หล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก reaction chamber ตลอดเวลา ทำให้อุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber คงที่ ที่ 26 °C ตามไปด้วย

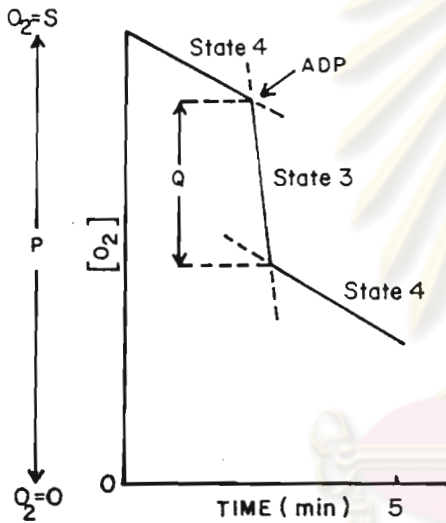
5. การคำนวณค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

5.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (respiratory control index) การเรียกชื่อระยะต่าง ๆ (states) ของการหายใจของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งวิธีคำนวณค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI) กระทำตามวิธีของ Chance and Williams (36) ดังนี้

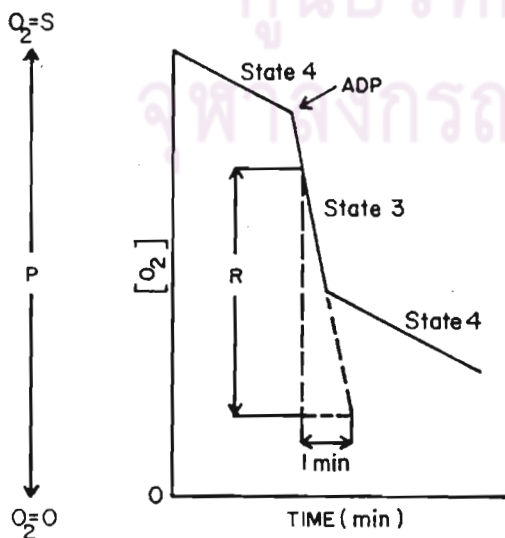
$$RCI = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4}}$$



รูปที่ 8 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 9 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 10 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

$$= \frac{\text{ความชันของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชันของ tracing ใน state 4}}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 8 ในการหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 นั้น ถ้าเราลากแกน X ให้ยาวเท่ากัน ทั้งใน state 3 และ state 4 จะทำให้ค่า $RCI = Y_1/Y_2$

5.2 การคำนวณอัตราส่วน ADP/O

ใช้วิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (37) ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

$$ADP/O = \frac{\text{จำนวน มคม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา}}{\text{จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$

จำนวน มคม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา เราสามารถคำนวณได้จาก ความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เราเติมลงไปทำปฏิกิริยา ส่วนจำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 9 สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3} = \frac{Q}{P} \times S$$

ในที่นี้ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโทคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่เราให้ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือถ้ามี reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่า เมื่ออุณหภูมิสูง

หอสมุดกลาง สถาบันวิจัยประชากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการวิจัยนี้ ความคมอุณหภูมิการทดลองให้คงที่ ที่ 26°C ทำให้มีออกซิเจนละลาย อิ่มตัวอยู่ได้เต็มที่ 0.522 มคอ. ออกซิเจน/มล. ในการทดลองที่อุณหภูมิอื่น ๆ สามารถหา ข้อมูลเกี่ยวกับการละลายอิ่มตัวของออกซิเจนเพิ่มเติมได้จาก Estabrook (37) เมื่อเราทราบ อัตราการละลายของออกซิเจนและปริมาตรของ reaction mixture เราก็สามารถคำนวณค่า S ได้ ทำให้คำนวณค่าจำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และ ADP/O ได้ในที่สุด

นอกจากนี้ การคำนวณค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายใน 1 มล. ของ incubation mixture อาจทำได้ดังนี้

$$A = \frac{S}{V} \times \frac{P}{100} \times N \times 10^6 \quad \text{มคอ. ออกซิเจน/มล.}$$

ในที่นี้ A = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม (absorption coefficient) ที่ 26°C (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตร เมื่อความดันของ ก๊าซเท่ากับ 760 มม.) เท่ากับ 0.02783

P = จำนวนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรของก๊าซ (ที่ 0°C และ 760 มม.) เทียบเท่ากับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ $22,400$ มล.

แทนค่าเหล่านี้ลงในสมการข้างต้น คำนวณหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายใน reaction mixture 1 มล. ที่ 26°C ได้เท่ากับ 0.522 มคอ. ออกซิเจน/มล.

5.3 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่าง oxygraph tracing

ในรูปที่ 10 สามารถคำนวณได้ดังนี้

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $\frac{R}{P} \times S$ นนอ.ออกซิเจน/นาที

ในที่นี้ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน นนอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา ค่า S นี้หาได้ตามวิธีที่กล่าวแล้วในหัวข้อ 5.2

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่มีหน่วยเป็น จำนวน นนอ.ของออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะอื่น ๆ ของ oxygraph tracings ก็สามารคำนวณได้ในทำนองเดียวกันนี้

นอกจากนี้ ยังอาจคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ออกมาในหน่วยของ จำนวน มคอ.ของออกซิเจน/มล./นาที ได้ดังนี้

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 10 เช่นกัน

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $\frac{R}{P} \times A$ มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

ในที่นี้ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ในน้ำ 1 มล.

ค่า A นี้หาได้ตามวิธีที่กล่าวแล้วในหัวข้อ 5.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 26 °C ค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 0.522 มคอ.ออกซิเจน/มล.

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะอื่น ๆ ของ oxygraph tracing ให้ออกมาในหน่วยนี้ ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

6. การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ในการวิจัย เราสามารถวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้สองวิธีคือ โดยใช้ pH meter วัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium (38) อีกวิธีหนึ่ง โดยการวัดจำนวน Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (39)

เนื่องจากในการวิจัยนี้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ของ medium หลายสภาวะ เช่นต้องเปลี่ยนแปลง pH หรือไม่เติม Mg^{2+} ลงไปใน medium การวัด ATPase activity โดยการวัด Pi ที่เกิดขึ้นจึงสะดวกและได้ผลแน่นอนกว่าการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นในการวิจัยนี้จึงวัด ATPase activity โดยการวัด Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP เป็นหลัก โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญคือ

ขั้นแรก incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่ต้องการจะดูผลใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วหยุดปฏิกิริยาทันที โดยการดูด reaction mixture ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) ที่มี 20 % นน./ปริมาตร trichloroacetic acid อยู่ก่อน แล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นที่สอง นำ sample ที่ได้จากขั้นแรกไปวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (40) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex โดย Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15 % sodium bisulfite 97.5 มล., 20 sodium sulfite 2.5 มล. และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบเวลาที่กำหนดแล้ว นำสารละลายซึ่งเกิดสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ULTROSPEC II) โดยใช้น้ำกลั่นที่ปริมาตรเท่า sample เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ครอบคลุมค่าของ sample

วิธีการหาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น สรุปจากการปฏิบัติได้ดังนี้

1. เติม incubation medium 2.63 มล. ลงในภาชนะทรงสูงเล็ก ๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath และปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ $26^{\circ}C$ พร้อมกับมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันคืออยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 มล. ตามลงไป
 3. เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบตามลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจข้ามไปทำข้อ 4 เลย หรือเติม solvent ที่ละลายด้วยยาปริมาณเท่ากันลงไปแทน)
 4. เติม 0.1M ATP 150 มล. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
 5. ตูด reaction mixture มาเป็น sample 1 มล. แล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20 % นน./ปริมาตร trichloroacetic acid 1 มล. อยู่ก่อนหน้าแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
 6. นำไป centrifuge ประมาณ 10 นาที
 7. ตูดส่วน supernatant มา 1 มล. (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ P_i ใช้ 1 มล. ของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1, 1.5 และ 2 mM แทน) แล้วใส่ลงไปหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 มล. อยู่ก่อนหน้าแล้ว
 8. เติม 2.5 % นน./ปริมาตร ammonium molybdate 0.8 มล.ตามลงไป
 9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 มล.ตามลงไป เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
 10. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm
 11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณ P_i จาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ $3 \times 2 = 6$) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นและปริมาณของ P_i ที่เกิดขึ้นตามต้องการ
- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ l-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายได้ไม่หมด จึงกรองออกโดยใช้กระดาษกรอง แล้วเก็บ Fiske Subbarow reducing agent นี้ในขวดสีชา และเก็บไว้ใช้ไม่เกินหนึ่งเดือน

7. การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมมาสำหรับใช้ในการทดลอง เราดูที่ปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Lowry และ คณะ (41) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (42) เป็นการหาปริมาณของโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายต่าง จะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper และอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain แล้วเกิดเป็นสีน้ำเงิน เมื่อนำสารละลายสีน้ำเงินนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง ULTROSPEC II โดยใช้น้ำกลั่นที่ปริมาตรเท่า sample เป็น blank แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย สรุปจากการปฏิบัติได้ดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension (1: 300) ด้วยน้ำกลั่น
2. เติม alkaline copper reagent 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่มี mitochondrial suspension ที่เจือจางแล้วจำนวน 1 มล. อยู่ก่อนหน้าแล้ว (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. ถ้าเป็นการทำ standard curve ใช้น้ำกลั่น 1 มล. ของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มก./มล. แทนการใช้ mitochondrial suspension ที่เจือจางแล้ว) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin phenol reagent (dilution 1: 10) 3 มล. ตามลงไป
4. นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 50°C เป็นเวลา 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 300) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียตามต้องการ

alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5% CuSO_4 ที่ละลายอยู่ใน 1 % นน./ปริมาตร potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10 % NaCO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

Folin phenol reagent (dilution 1: 10) เตรียมได้จากการเจือจาง Concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 โดยปริมาตร/ปริมาตร และจะเตรียมเฉพาะเท่าที่จะใช้ครั้งต่อครั้งเท่านั้น

8. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

8.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง

ปกติจะละลายด้วยยาและสารเคมีต่าง ๆ ด้วยน้ำที่ถูกกั่นสามครั้ง (tri-distilled water) ในกรณีที่ต้องปรับสารละลายให้ได้ pH 7.4 จะทำโดยใช้สารละลายของ KOH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นหลัก ถ้าจำเป็นจึงจะใช้สารละลายของ HCl ช่วย เมื่อด้วยยาหรือสารเคมีใดละลายในน้ำได้น้อยมาก จึงจะนำไปละลายในเอทานอล (absolute ethanol) โดยพยายามใช้เอทานอลในปริมาณที่น้อยที่สุดเท่าที่ทำได้

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของด้วยยาและสารเคมีที่ละลายในน้ำกลั่น เช่น 1M glutamate+1M malate (pH 7.4) ขนาด 10 มล., 1M succinate (pH 7.4) ขนาด 10 มล., 0.1M ADP (pH 7.4) ขนาด 5-10 มล., 0.01M DNP ขนาด 10-20 มล., 10 มก./มล. atractyloside ขนาด 10 มล., 0.1 M DTNB ขนาด 3 มล., 1.5 M DTT ขนาด 2 มล., 0.1 M ATP (pH 7.4) ขนาด 150 มล., 0.25M sucrose, 0.1M EGTA (pH 7.4), 0.5 M HEPES buffer (pH 7.0, 7.4 และ 7.8), 0.4 M $MgCl_2$, 0.75 M KCl และ 0.1M KH_2PO_4 (pH 7.4)

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของด้วยยาและสารเคมีที่ละลายในเอทานอล เช่น 20 มก./มล. แอนติสไตรเทคโคโรน ขนาด 2-40 มล., และ 10 มก./มล. oligomycin ขนาด 1 มล.

8.2 แหล่งที่มาของด้วยยาและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยมีดังต่อไปนี้

แอนติสไตรเทคโคโรน สกัดให้บริสุทธิ์โดย รศ.นิจศิริ เรืองรังษี แห่งภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.1154 N HCl ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการเทียบหาจำนวน H^+ ได้รับจากภาควิชาเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical คือ sucrose, HEPES, L-glutamic acid, malic acid, succinic acid, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, sodium sulfite, sodium bisulfite, potassium chloride, cupric sulfate, sodium hydroxide, potassium hydroxide, DNP, ATP, ADP, 2.5 % W/V ammonium molybdate, atractyloside, oligomycin, potassium phosphate, bovine serum albumin, Folin-Ciocalteu Phenol reagent

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท E.Merck, Darmstadt คือ magnesium chloride, sodium carbonate, sulfuric acid, hydrochloric acid

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Analyticals Carlo Erba คือ Potassium tartrate

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Riedel-De Haen AG Seelze-Hannover คือ absolute ethanol

9. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

9.1 oxygraph tracings ลอกจาก oxygraph tracings ที่ได้จากการทดลอง อัตราการใช้ออกซิเจนที่แสดงในวงเล็บมีหน่วยเป็น จำนวน มคอ. ของออกซิเจน/มล./นาที

9.2 rate of extra oxygen consumption ที่พบในตารางที่ 3-8 คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เพิ่มมากขึ้นจากปกติ หาได้โดยนำเอาอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ไปหักออกจากอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะที่ถูกกระตุ้นด้วย uncouplers

9.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้ the two-tailed paired Student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม กับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง

ผลการวิจัย

รูปและตารางที่ได้จากการทดลองทั้งหมดแสดงอยู่ในหน้า 30-63 โดยเรียงลำดับตามหัวข้อที่อยู่ในสารบัญ

1. ผลของแอนซิสโตรเทคโคโรนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

1.1 ผลของแอนซิสโตรเทคโคโรนในขนาดต่าง ๆ ที่แสดงเป็น oxygraph tracings ในรูปที่ 11 ได้จากการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดย polarographic oxygen electrode technique ดังรายละเอียดในบทที่ 2

tracing 11A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของทุก oxygraph tracing ในการวิจัยนี้คือค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดยคำนวณออกมาเป็นจำนวนมคอ.ของออกซิเจน/มล./นาที ในระยะแรกของ tracing 11A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียงไมโตคอนเดรียที่ถูก incubate อยู่ใน medium ที่มี glutamate+ malate เป็นสับสเตรท และมี Pi (inorganic phosphate) ละลายรวมอยู่ด้วย ปริมาณของสับสเตรทและ Pi ที่ใช้นี้นี้อยู่มากเกินพอ (excess) ที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรกนี้ (0.032) ยังต่ำอยู่ เราเรียกระยะ (state) ที่ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาเพียงแค่นี้ (ไมโตคอนเดรีย + ออกซิเจน + สับสเตรท + Pi; ขาดแต่เพียง ADP) ว่า state 4 respiration ระยะต่อไปของ tracing 11A เริ่มต้นเมื่อมีการเติม ADP ลงไปทำปฏิกิริยาคด้วย จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะนี้ (0.248) สูงขึ้นมาก จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา (มีการสร้าง ATP จากปฏิกิริยา $ADP+Pi \rightleftharpoons ATP$) อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจึงได้กลับช้าลง (0.033) คืนสู่ state 4 ตามเดิม เราเรียกระยะที่ไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วเนื่องจากการเติม ADP ลงไปนี้ว่า state 3 respiration หรือ active

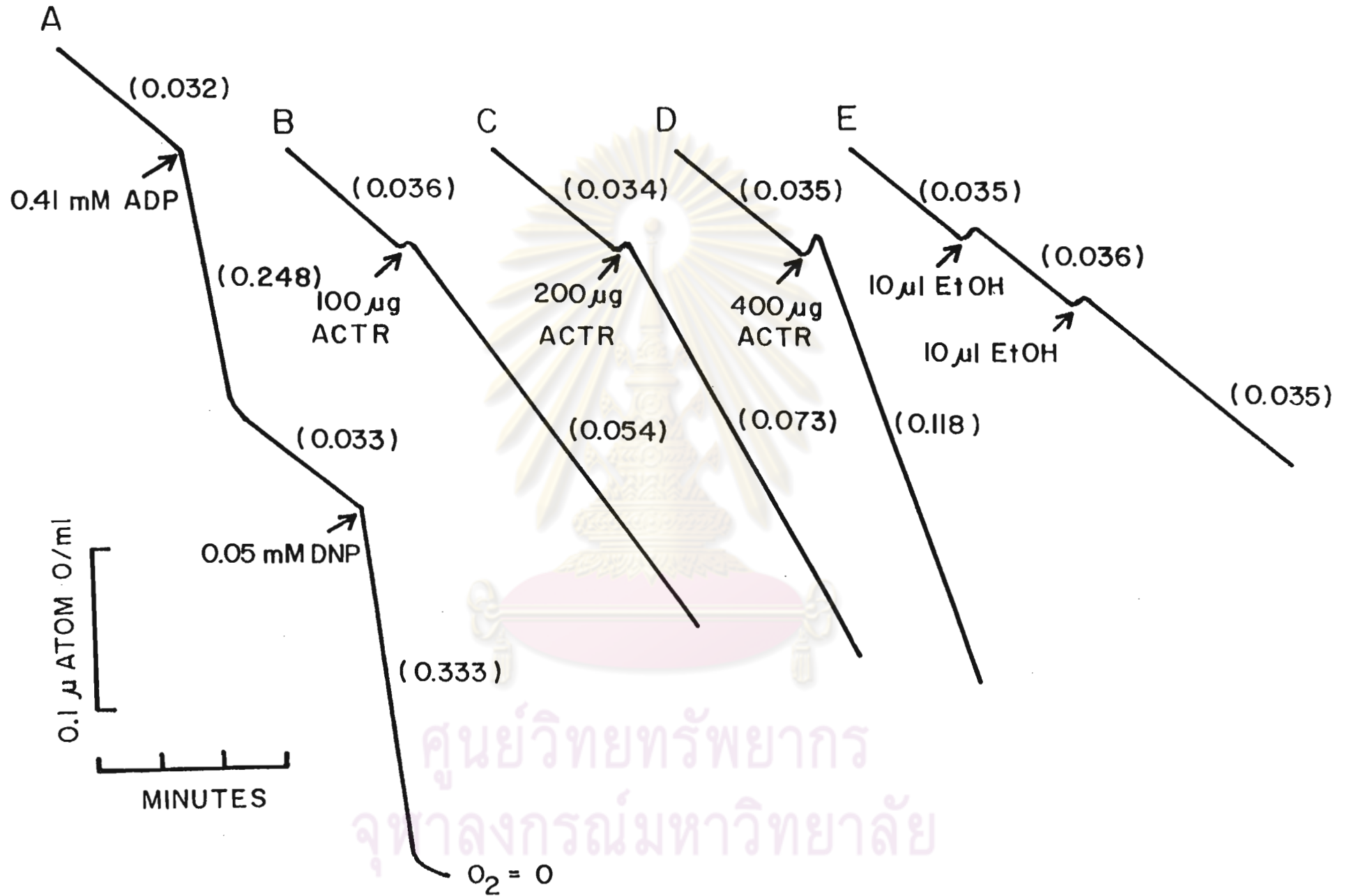
รูปที่ 11 ผลของแอนติสไตรเทคโครีนขนาด 100, 200 และ 400 มคก. ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรีย 1.83 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP, แอนติสไตรเทคโครีน และ เอทธานอล ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ของออกซิเจน/มล./นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



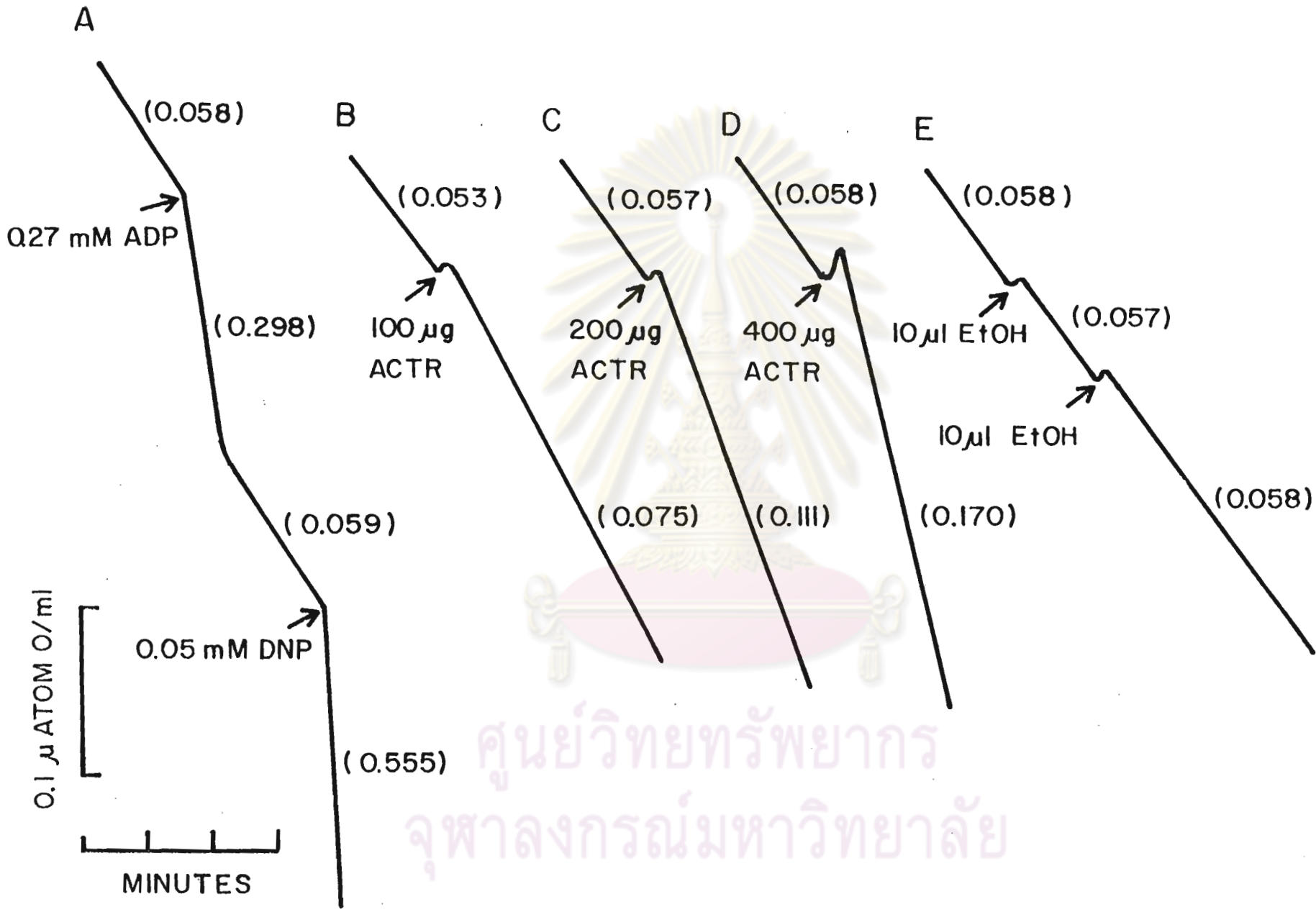
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรีนขนาด 100, 200 และ 400 มคก. ที่มีต่อการ
หายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$
7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium
succinate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรีย 1.43 มก. โปรตีน/มล.
ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, แอนซิสโตรเทคโตรีนและ
เอทานอล ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



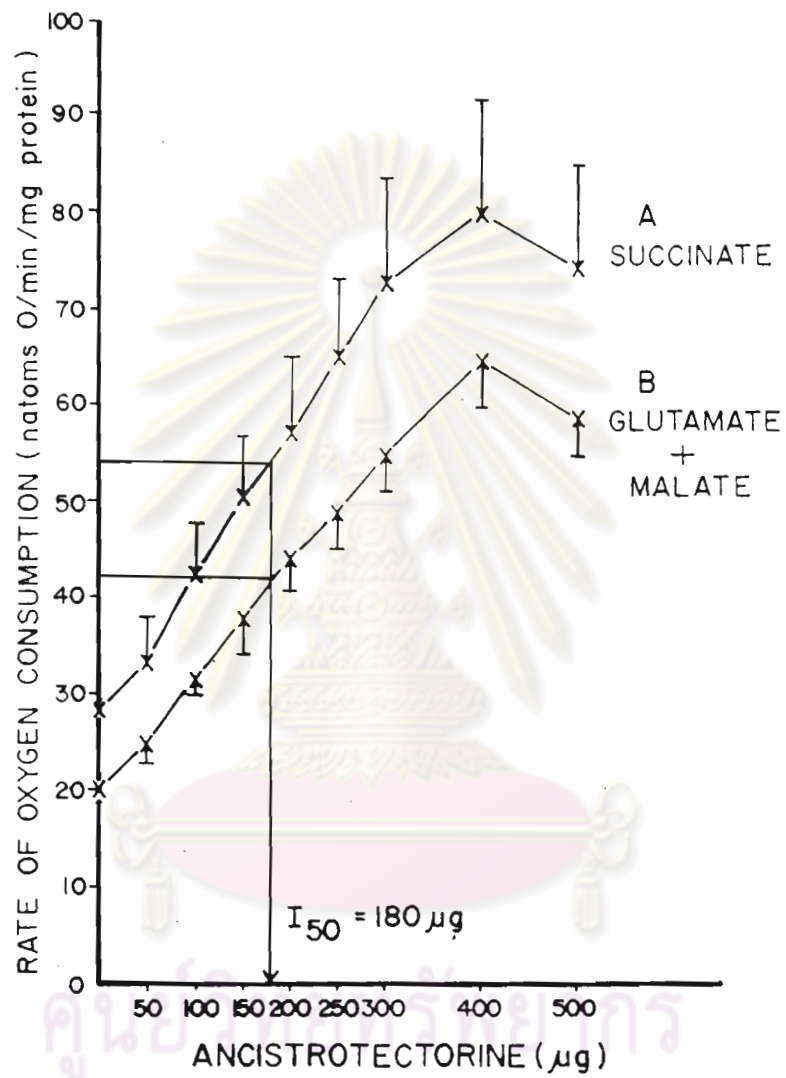
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 dose-response curve ของผลของแอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate (curve A) และ glutamate + malate (curve B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium succinate 5.38 mM (เฉพาะกรณีของ curve A), potassium glutamate 5.38 mM+potassium malate 5.38 mM (เฉพาะกรณีของ curve B), sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.63 มก. โปรตีน/มล. (กรณีของ curve A), 1.54 มก. โปรตีน/มล. (กรณีของ curve B) ปริมาณแอนซิสโตรเทคโตรินขนาดต่าง ๆ ที่เติมตามลงไปอีกแสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 5 การทดลอง ปริมาณของแอนซิสโตรเทคโตรินที่สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้เร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด คือ 180 มคก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



คุณปรัชญ์กร พงษ์กร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

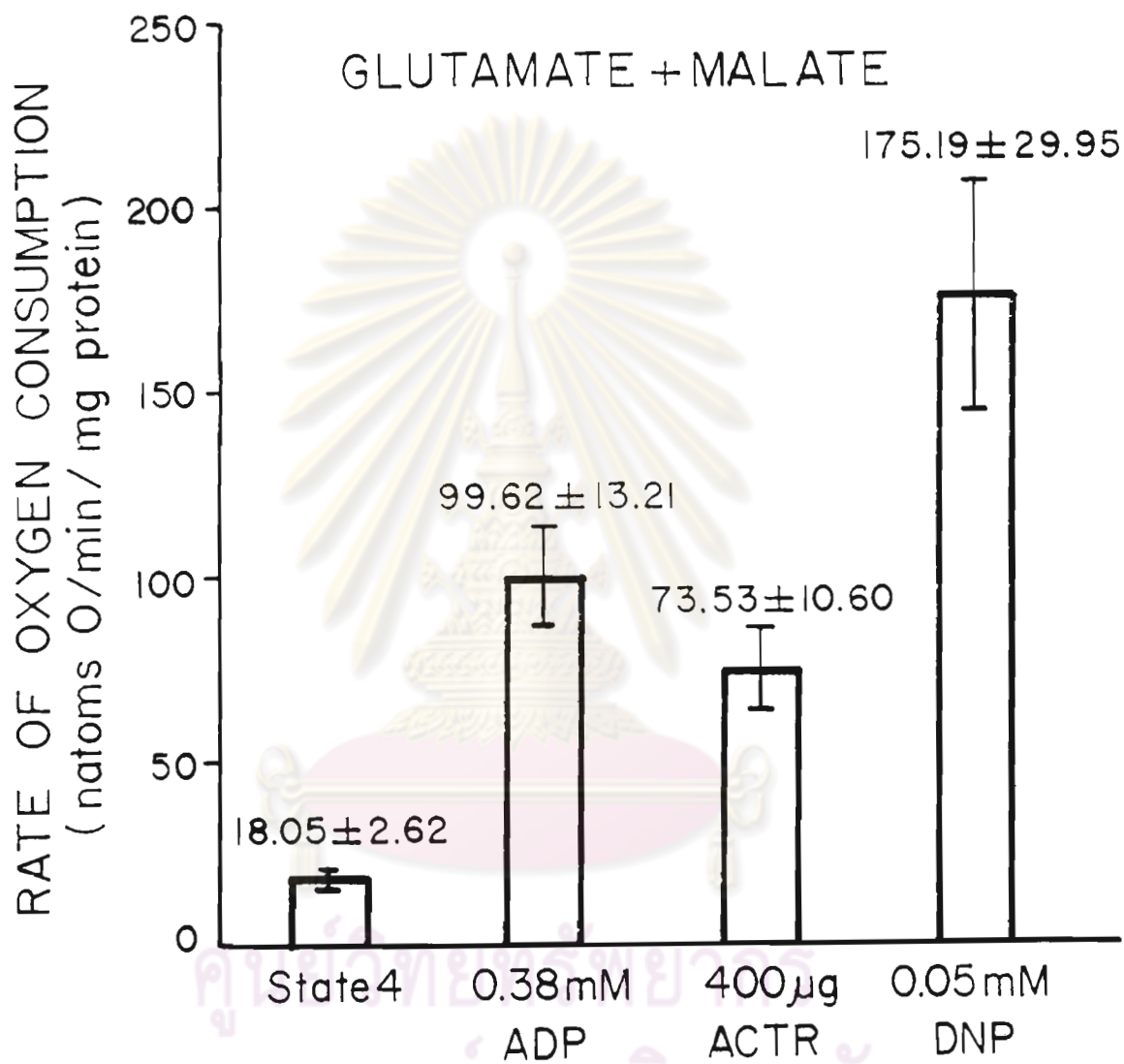
รูปที่ 14 ผลการเปรียบเทียบ maximum response โดยใช้แอนฮิสไตรเทคโครีน, DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.55 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของแอนฮิสไตรเทคโครีนและความเข้มข้นของ DNP, ADP ที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจแสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 5 การทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

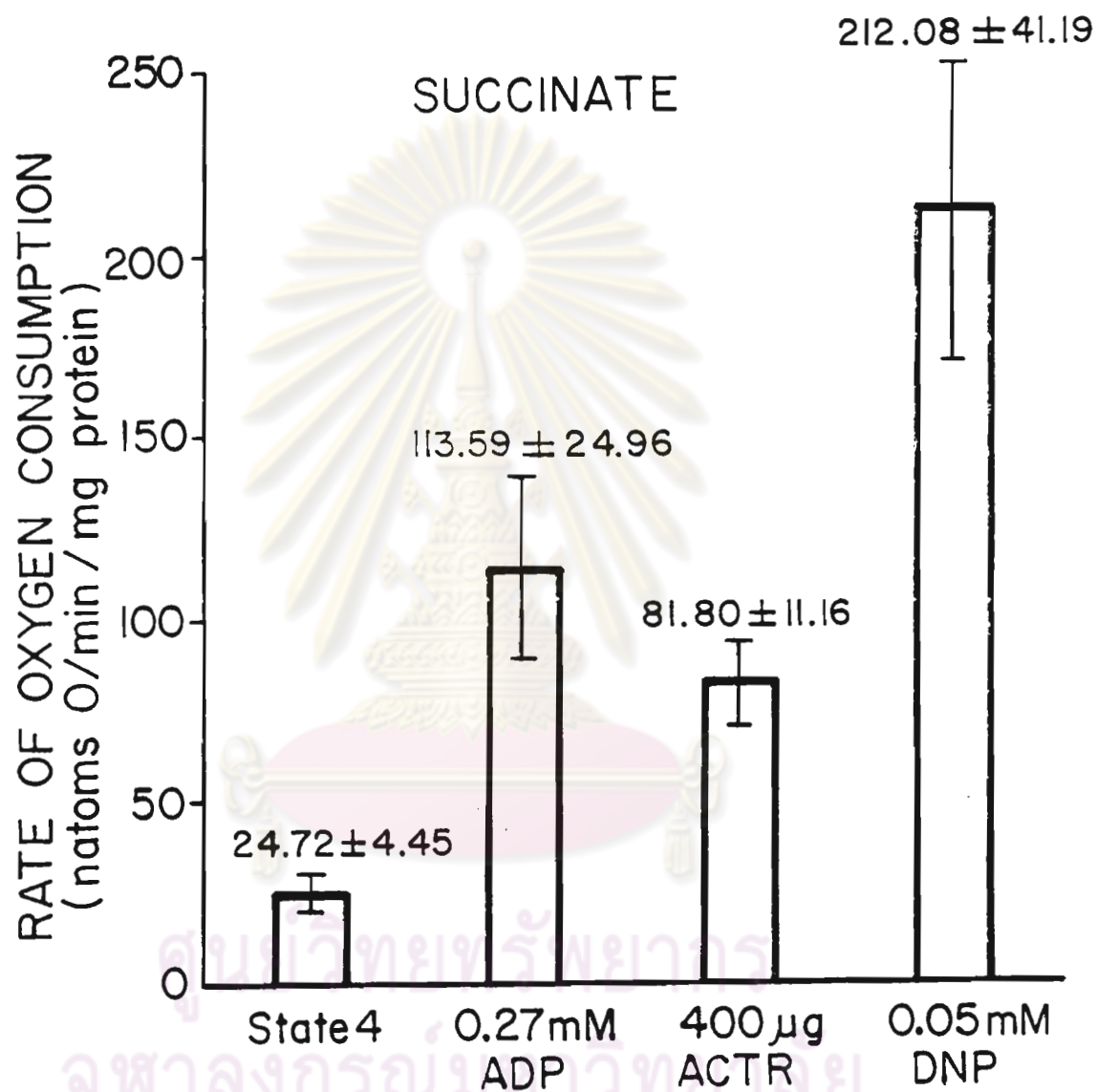
รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบ maximum response โดยใช้แอนฮิสไตรเทคโตริน, DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น สับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium succinate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรีย เฉลี่ย 1.55 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของแอนฮิสไตรเทคโตรินและความเข้มข้นของ DNP, ADP ที่เติมตาม ลงไปกระตุ้นการหายใจแสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 5 การทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



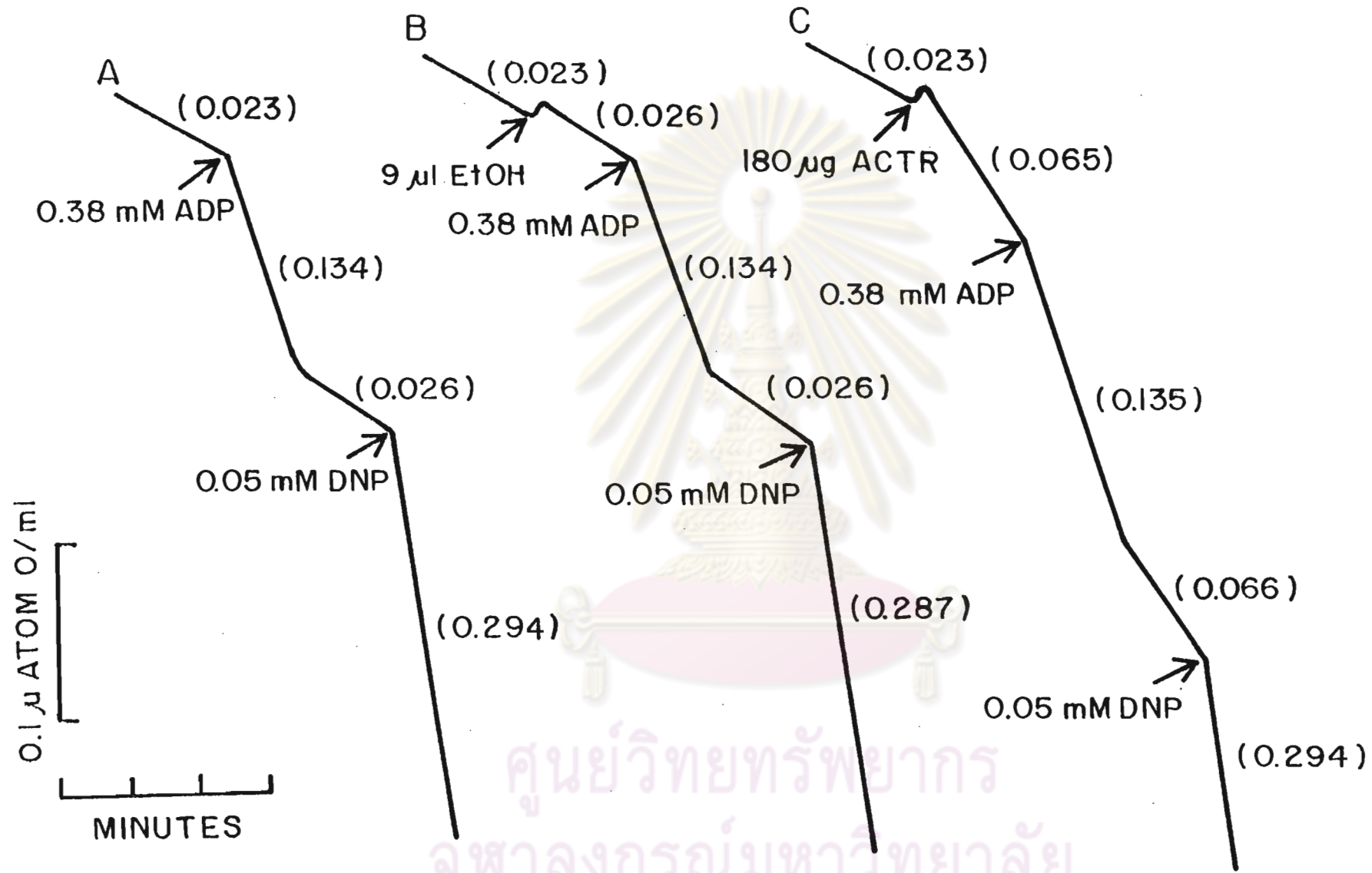
รูปที่ 16 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกตั้งแสดงในรูป คือ ADP, DNP, เอทานอล และแอนซิสโตรเทคโตริน ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางดังนี้

| | A | B | C |
|--|-------|-------|-------|
| ดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI) | 5.15 | 5.15 | 2.05 |
| จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ.ออกซิเจน/มก.โปรตีน) | 60.05 | 59.78 | 85.90 |
| อัตราส่วน ADP/O | 2.92 | 2.93 | 2.04 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11715-1864

ตารางที่ 1 ผลของแอนติสไตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้แอนติสไตรเทคโตริน (control) parameters ที่ใช้เปรียบเทียบ คือดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O

| Experiments | RCI | State 3 oxygen consumption (natoms O/mg protein) | ADP/O |
|-------------------|------------|--|------------|
| Control | 5.51±0.24 | 81.46±10.11 | 2.89±0.03 |
| After 180 µg ACTR | 2.04±0.08* | 109.05±11.01** | 2.13±0.05* |
| % Change | -62.95 | +33.87 | -26.21 |

* P < 0.001; **P < 0.02

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, MgCl₂ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, Potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.86 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ ADP 0.38 mM และปริมาณของแอนติสไตรเทคโตรินดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

10 การทดลอง

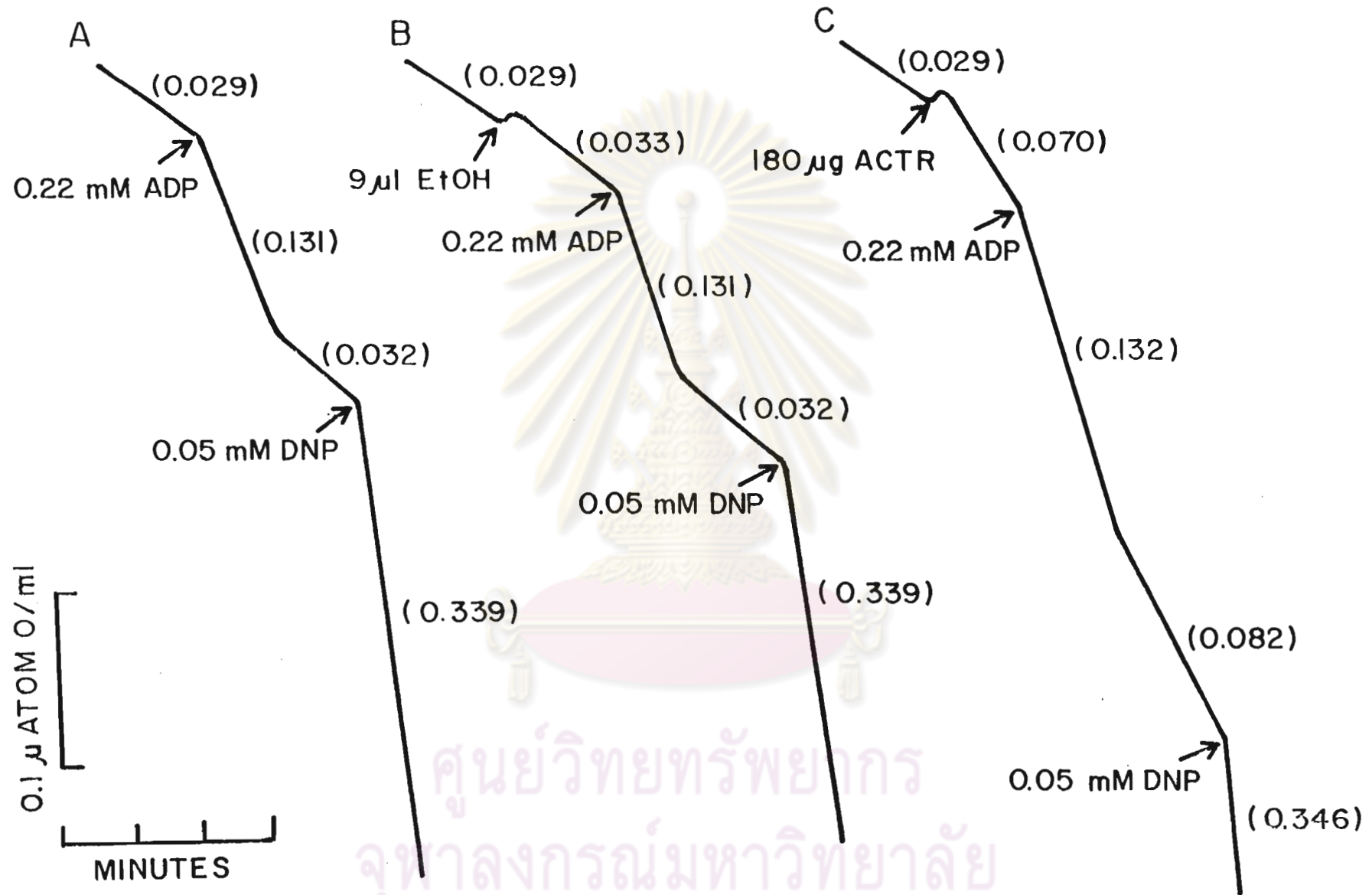
รูปที่ 17 ผลของแอนติสไตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium succinate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM, และไมโตคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP, เอทานอลและแอนติสไตรเทคโตรินทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางดังนี้

| | A | B | C |
|--|-------|-------|-------|
| ดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI) | 4.09 | 4.09 | 1.61 |
| จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ.ออกซิเจน/มก.โปรตีน) | 51.80 | 51.93 | 80.70 |
| อัตราส่วน ADP/O | 1.94 | 1.93 | 1.24 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2 ผลของแอนติสไตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้แอนติสไตรเทคโตริน (control) parameters ที่ใช้เปรียบเทียบ คือดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O

| Experiments | RCI | State 3 oxygen consumption (atoms O/mg protein) | ADP/O |
|-------------------|------------|---|------------|
| Control | 4.04±0.06 | 68.69±8.03 | 1.98±0.05 |
| After 180 µg ACTR | 1.75±0.05* | 109.46±13.67** | 1.25±0.02* |
| % Change | -56.70 | +59.35 | -37.06 |

*P < 0.001; ** P < 0.02

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4 MgCl₂ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium succinate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM, และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.86 มก. โปรตีน/มล.

ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ ADP 0.22 mM, และปริมาณของแอนติสไตรเทคโตรินดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

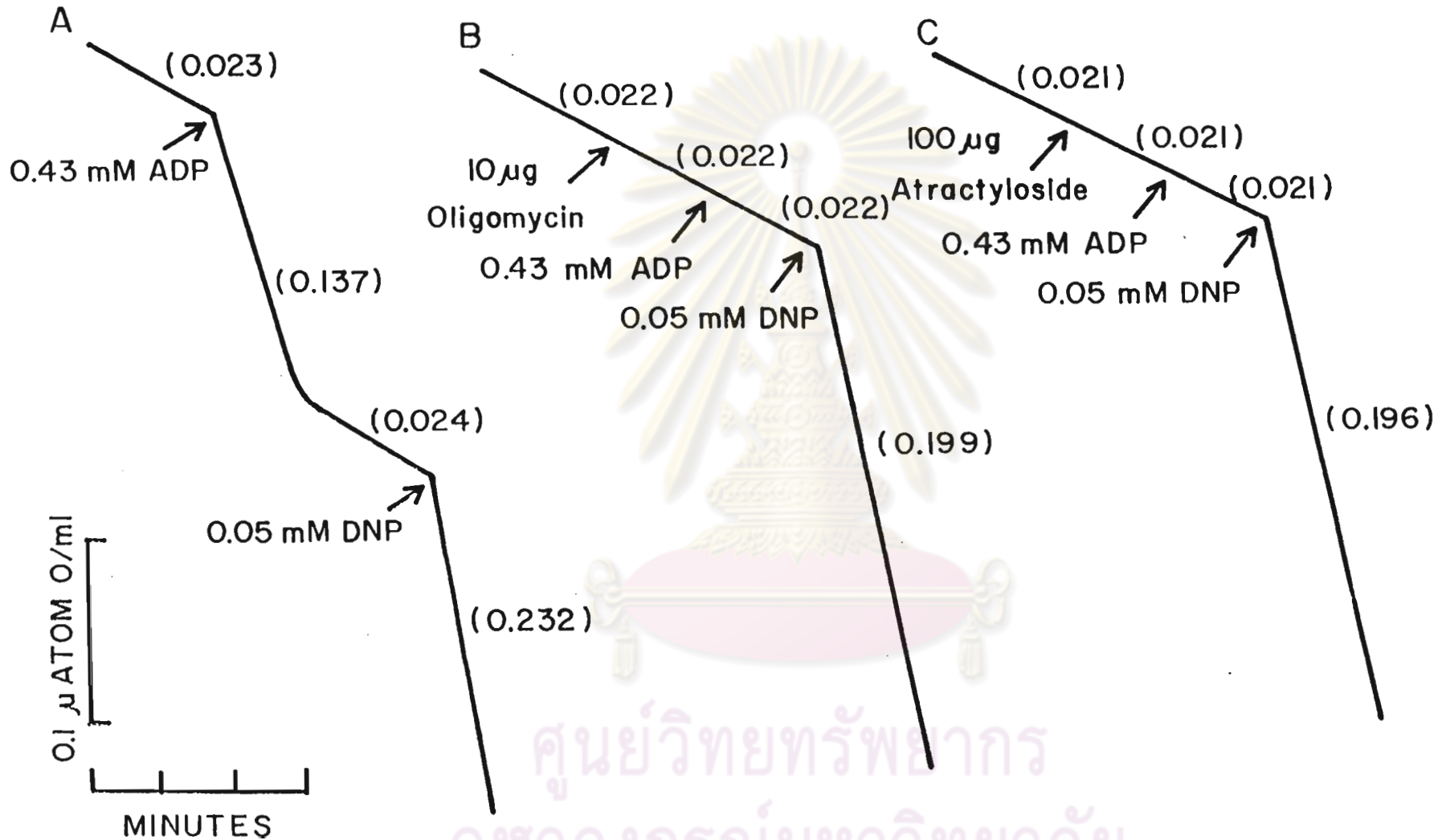
10 การทดลอง

รูปที่ 18 ผลของ oligomycin และผลของ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์
ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$
7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium
glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และ
ไมโทคอนเดรีย 1.56 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ
ADP, DNP, oligomycin และ atractyloside ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด
1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



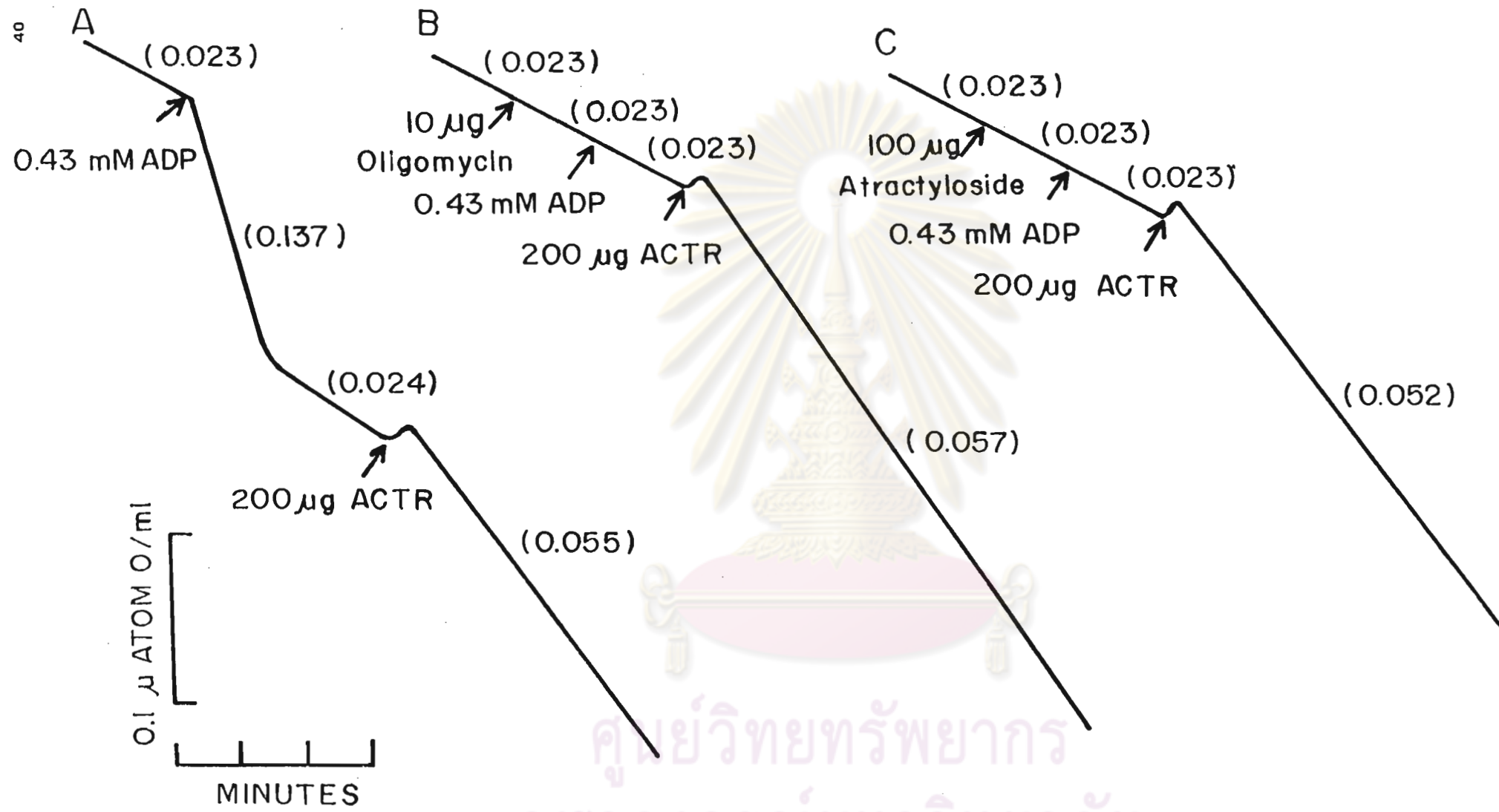
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 ผลของ oligomycin และผลของ atractyloside ที่มีต่อการออก
ฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$
7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium
glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM
และ ไมโทคอนเดรีย 1.56 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดง
ในรูปคือ ADP, แอนติสไตรเทคโตริน, oligomycin และ atractyloside ทำให้
แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



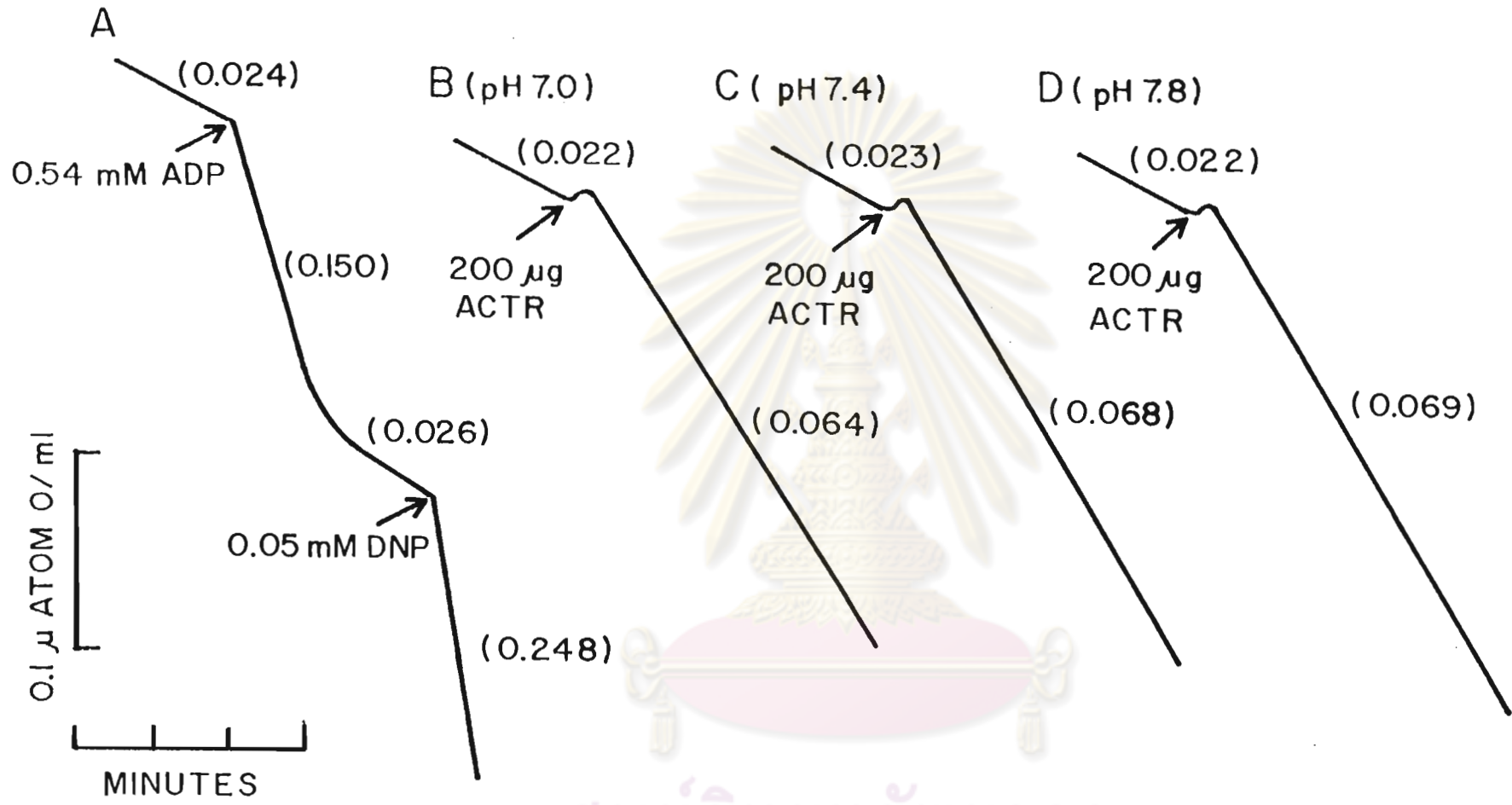
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทค ไตรีน ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 pH 7.4 (tracing A และ C) pH 7.0 (tracing B) และ pH 7.8 (tracing D) $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP และแอนติสไตรเทค ไตรีน ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนติไซโตเรค
ไตรีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption after 200 µg ACTR (natoms O/min/mg protein) |
|-------------|--|
| pH 7.0 | 18.76 \pm 1.97 |
| pH 7.4 | 19.34 \pm 2.00 |
| pH 7.8 | 19.79 \pm 2.01 |

P > 0.05

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH (7.0, 7.4 หรือ 7.8 แล้วแต่กรณี) MgCl₂ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของแอนติไซโตเรคไตรีนที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 5 การทดลอง

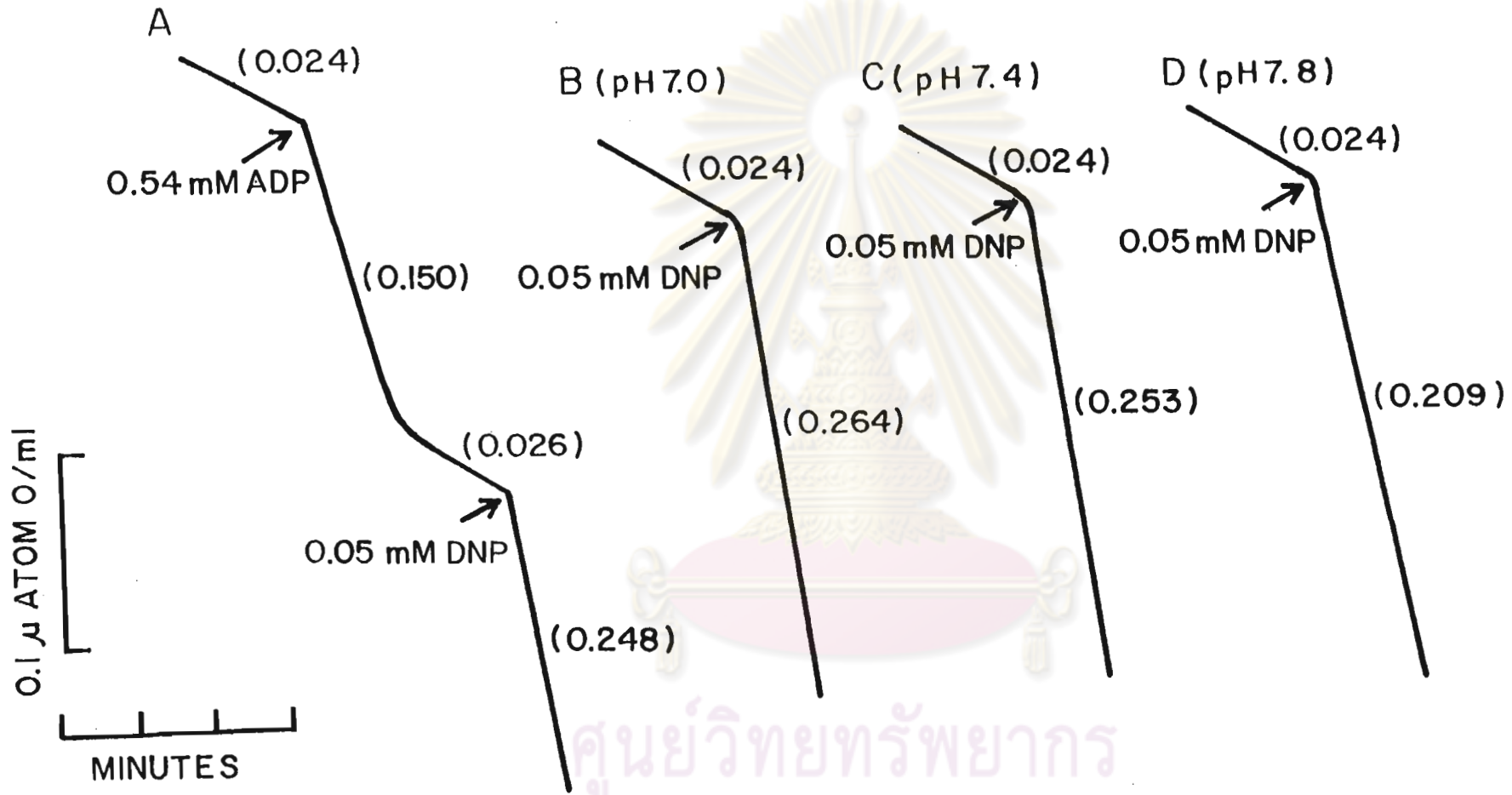
Rate of extra oxygen consumption คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่เพิ่มมากขึ้นจากปกติ หาได้โดยนำเอาอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ไปหักออกจากอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะที่ถูกกระตุ้นด้วย uncouplers

รูปที่ 21 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4 (tracing A และ C) pH 7.0 (tracing B) และ pH 7.8 (tracing D), $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP และ DNP ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption after 0.05 mM DNP (natoms O/min/mg protein) |
|------------------|--|
| pH 7.0 (Control) | 117.39±2.32 |
| pH 7.4 | 111.10±4.31 |
| pH 7.8 | 98.49±4.44 * P < 0.01 |

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH (7.0, 7.4 หรือ 7.8 แล้วแต่กรณี), $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.29 มก. โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ DNP ที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 5 การทดลอง

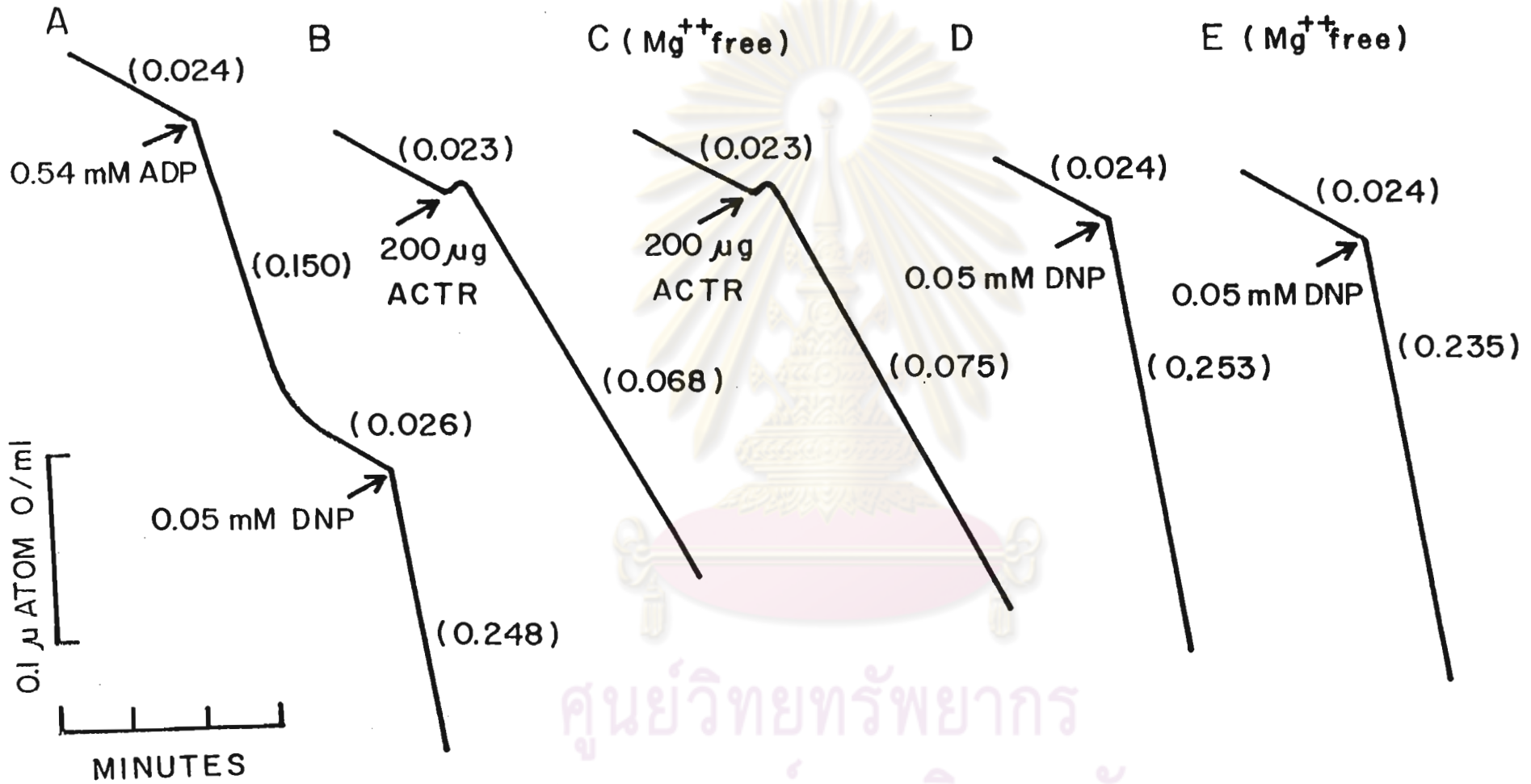
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตรินและ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM (กรณีของ tracing C และ E ไม่ใช้ $MgCl_2$ เลย), KCl 78.09 mM (กรณีของ tracing C และ E ใช้ KCl 89.38 mM), potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล., ส่วนประกอบที่เดิมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP และแอนติสไตรเทคโตริน ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทค
ไตรีน ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption after 200 μ g ACTR (natoms O/min/mg protein) |
|----------------|---|
| Control | 19.34 \pm 2.00 |
| Mg^{2+} free | 24.69 \pm 2.34 |

P > 0.05

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM (ไม่ใช่ $MgCl_2$ เลยในกรณี Mg^{2+} free medium), KCl 78.09 mM (89.38 mM ในกรณี Mg^{2+} free medium), potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของแอนซิสโตรเทคไตรีนที่เติมลงไปกระตุ้นการหายใจดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด
5 การทดลอง

ตารางที่ 6 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption after 0.05 mM DNP (natoms O/min/mg protein) |
|----------------|--|
| Control | 111.10±4.31 |
| Mg^{2+} free | 105.08±3.64 |

P > 0.05

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM (ไม่ใช่ $MgCl_2$ เลยในกรณี Mg^{2+} free medium), KCl 78.09 mM (89.38 mM ในกรณี Mg^{2+} free medium), potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.29 มก. โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ DNP ที่เติมลงไปกระตุ้นการหายใจดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

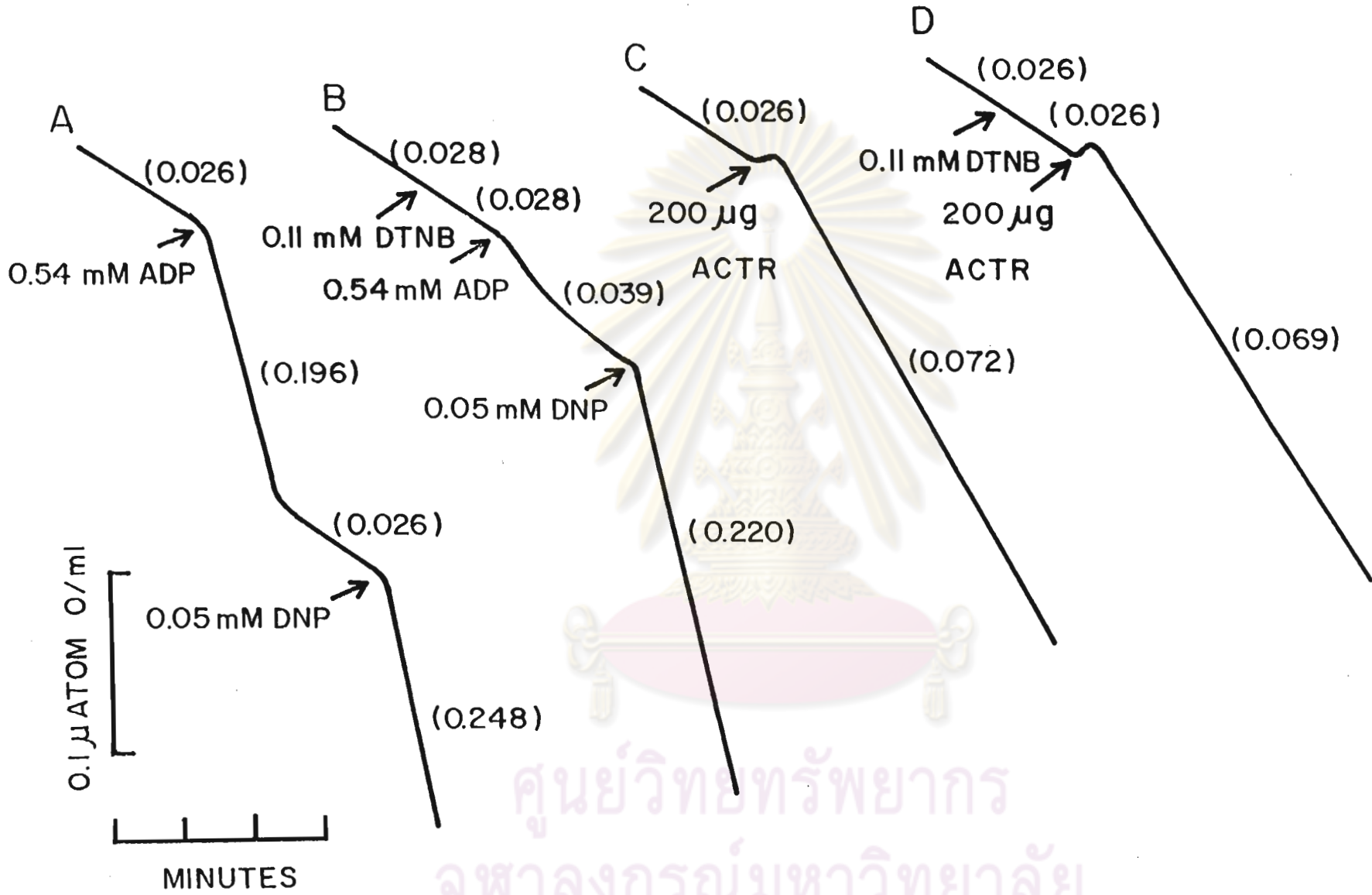
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 5 การทดลอง

รูปที่ 23 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสไตรเทคโครีน ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และไมโทคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP, DTNB และแอนซิสไตรเทคโครีน ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ต่อการหายใจ
ของไมโตคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption (natoms O/min/mg protein) |
|--|---|
| 200 μ g ACTR | 19.31 \pm 2.10 |
| 200 μ g ACTR after 0.11 mM DTNB | 17.87 \pm 1.71 |

P > 0.05

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, MgCl₂ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.26 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีก คือ DTNB 0.11 mM และปริมาณของแอนซิสโตรเทคโตรินดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

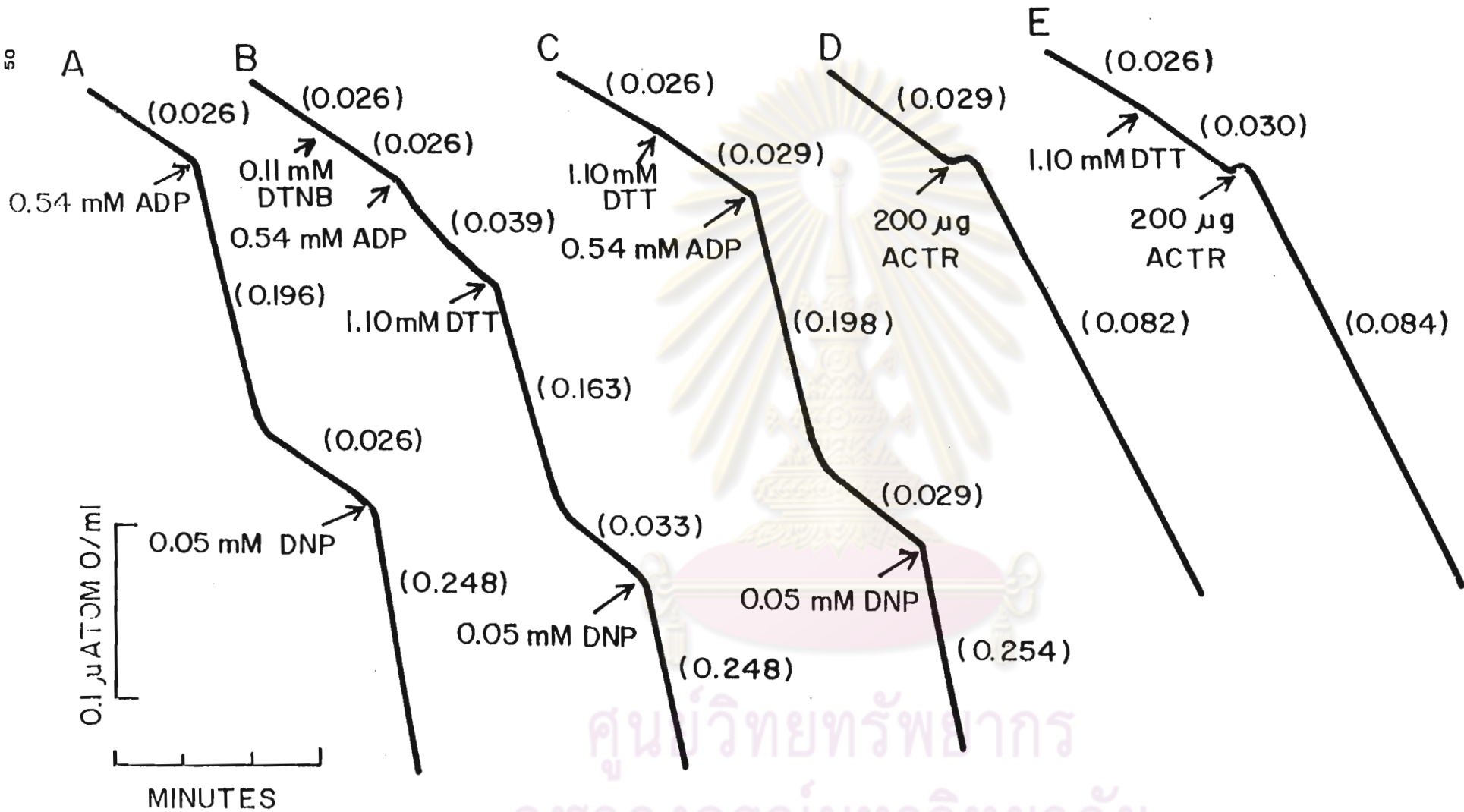
5 การทดลอง

รูปที่ 24 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนฮิสโดรเทคโดริน ต่อการหายใจของ
ไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, $MgCl_2$
7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM,
potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose
13.44 mM และไมโตคอนเดรีย 2.15 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตาม
ลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DTNB, DTT และแอนฮิสโดรเทคโดริน ทำให้
แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ต่อการหายใจของ
ไมโทคอนเดรีย

| Experiments | Rate of extra oxygen consumption (natoms O/min/mg protein) |
|---------------------------------------|---|
| 200 μ g ACTR | 19.31 \pm 2.10 |
| 200 μ g ACTR after 1.10 mM DTT | 20.70 \pm 2.30 |

P > 0.05

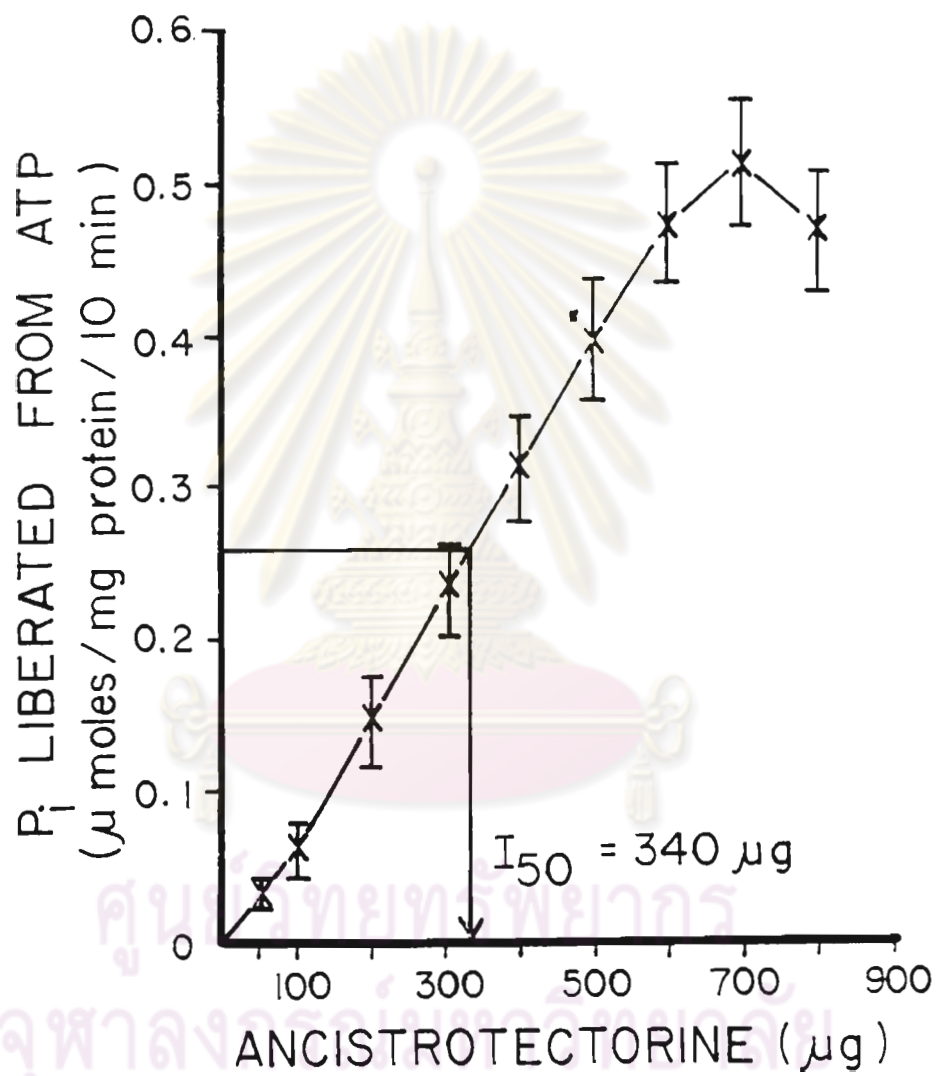
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.63 mM pH 7.4, MgCl₂ 7.53 mM, KCl 78.09 mM, potassium phosphate (Pi) 1.88 mM, potassium glutamate 5.38 mM, potassium malate 5.38 mM, sucrose 13.44 mM และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.26 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก คือ DTT 1.10 mM และปริมาณของแอนซิสโตรเทคโตรินดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด
5 การทดลอง

รูปที่ 25 dose-response curve ของผลของแอนฮิสโดรเทคโดรีนในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 6.96 mM, KCl 72.21 mM, sucrose 16.67 mM, ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.18 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของแอนฮิสโดรเทคโดรีนดังที่แสดงในรูป และ ATP 5.00 mM เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วยแอนฮิสโดรเทคโดรีนแล้ว 1 นาที แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากทั้งหมด 5 การทดลอง ปริมาณของแอนฮิสโดรเทคโดรีนที่สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้เร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุดคือ 340 มก. ผลการทดลองก่อนนำไป plot dose-response curve แสดงอยู่ในตารางที่ 9 ดังนี้

| Additions | | Piliberated from ATP (umoles/mg protein/10 min) |
|-----------|-------------|--|
| None | | 0.197 \pm 0.006 |
| EtOH | 20 μ l | 0.199 \pm 0.006 |
| EtOH | 40 μ l | 0.200 \pm 0.006 |
| ACTR | 50 μ g | 0.231 \pm 0.017 |
| ACTR | 100 μ g | 0.261 \pm 0.023 |
| ACTR | 200 μ g | 0.345 \pm 0.030 |
| ACTR | 300 μ g | 0.430 \pm 0.035 |
| ACTR | 400 μ g | 0.510 \pm 0.037 |
| ACTR | 500 μ g | 0.586 \pm 0.039 |
| ACTR | 600 μ g | 0.665 \pm 0.039 |
| ACTR | 700 μ g | 0.715 \pm 0.039 |
| ACTR | 800 μ g | 0.665 \pm 0.036 |



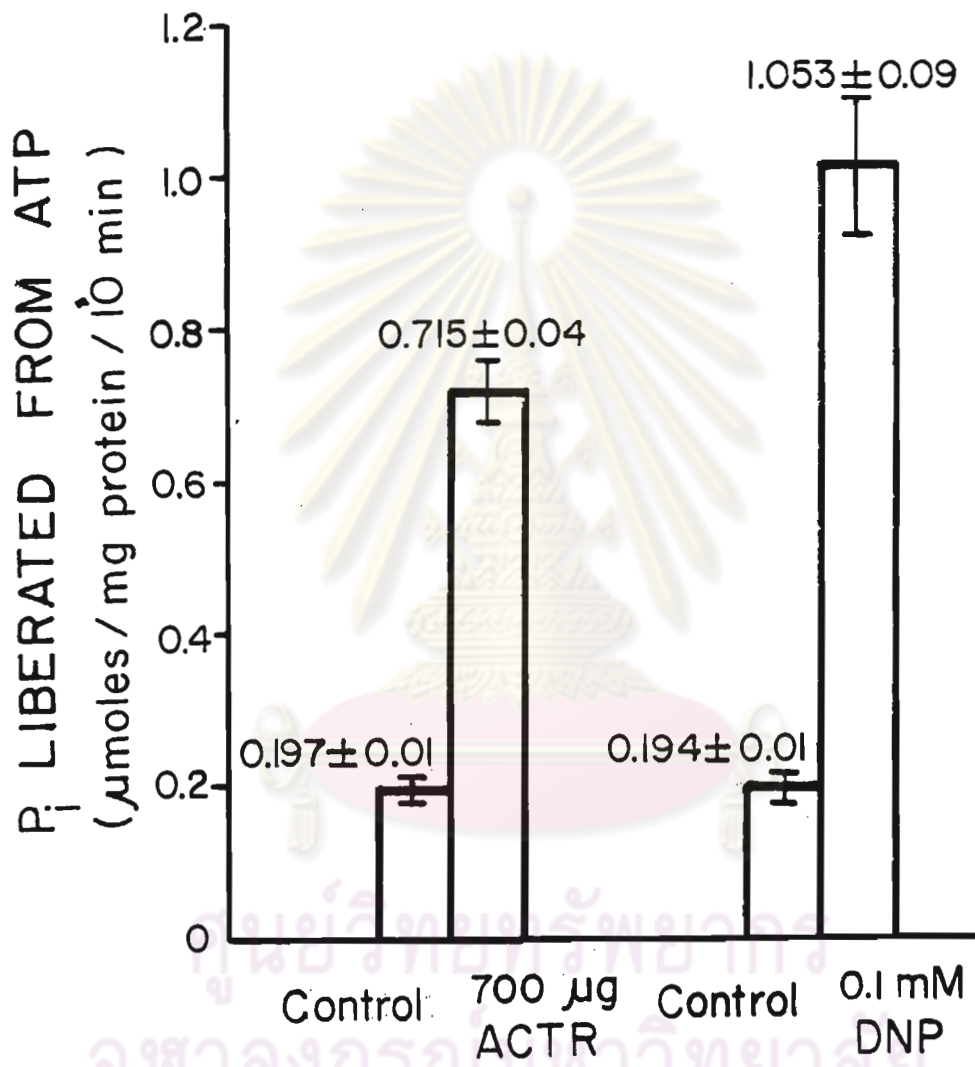
รูปที่ 26 ผลการเปรียบเทียบ maximum response ระหว่างแอนติสไตรเทคโตรินกับ DNP ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 6.96 mM, KCl 72.21 mM, sucrose 16.67 mM, ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.33 มก. โปรตีน/มล. แอนติสไตรเทคโตริน 700 มคก. หรือ DNP 0.1 mM และ ATP 5.00 mM ปริมาตรทั้งหมด 3.00 มล. เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วยแอนติสไตรเทคโตริน หรือ DNP แล้ว 1 นาที

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 5 การทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 10 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ แอนซิสไตรเทคโคโรน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

| Additions | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) |
|---|---|
| None | 0.187 \pm 0.016 |
| 20 μ l EtOH | 0.195 \pm 0.017 |
| 400 μ g ACTR(control) | 0.515 \pm 0.015 |
| 400 μ g ACTR after 10 μ g Oligo | 0.306 \pm 0.006 * P < 0.001 |
| 400 μ g ACTR after 100 μ g Atract | 0.314 \pm 0.006 * P < 0.001 |
| 0.1 mM DNP (Control) | 1.063 \pm 0.061 |
| 0.1 mM DNP after 10 μ g Oligo | 0.318 \pm 0.009 * P < 0.001 |
| 0.1 mM DNP after 100 μ g Atract | 0.330 \pm 0.012 * P < 0.001 |

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH 7.4, MgCl₂ 6.96 mM, KCl 72.21 mM, sucrose 16.67 mM, ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.33 มก. โปรตีน/มล., ปริมาตรของเอทานอล, ปริมาตรของแอนซิสไตรเทคโคโรน, oligomycin, atractyloside และความเข้มข้นของ DNP ดังที่แสดงในตาราง, ATP 5.00 mM ปริมาตรทั้งหมด 3 มล. เติมหด้วยยาต่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมหด้วยยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติมห ATP หลังเติมหด้วยยาอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาทีเช่นกัน

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

5 การทดลอง

ตารางที่ 11 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ที่มีต่อฤทธิ์ของแอนฮิส ไตรเทคโตริน ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH (7.0, 7.4 หรือ 7.8 แล้วแต่กรณี) $MgCl_2$ 6.96 mM, KCl 72.21 mM, sucrose 16.67 mM ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.34 มก. โปรตีน/มล. ปริมาตรของเอทานอล, ปริมาตรของแอนฮิส ไตรเทคโตริน และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงในตาราง ATP 5.00 mM ปริมาตร ทั้งหมด 3 มล. เติม ATP หลัง preincubate ไมโทคอนเดรียด้วยเอทานอล, แอนฮิส ไตรเทคโตริน หรือ DNP แล้วเป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

5 การทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11

| Additions | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) |
|-------------------------------------|---|
| None (pH 7.0) | 0.184 \pm 0.022 |
| None (pH 7.4) | 0.191 \pm 0.016 |
| None (pH 7.8) | 0.198 \pm 0.015 |
| 20 μ l EtOH (pH 7.0) | 0.189 \pm 0.030 |
| 20 μ l EtOH (pH 7.4) | 0.201 \pm 0.012 |
| 20 μ l EtOH (pH 7.8) | 0.201 \pm 0.020 |
| 400 μ g ACTR (pH 7.0) (Control) | 0.506 \pm 0.018 |
| 400 μ g ACTR (pH 7.4) | 0.517 \pm 0.010 |
| 400 μ g ACTR (pH 7.8) | 0.504 \pm 0.013 |
| 0.1 mM DNP (pH 7.0) (Control) | 1.140 \pm 0.063 |
| 0.1 mM DNP (pH 7.4) | 1.077 \pm 0.065 |
| 0.1 mM DNP (pH 7.8) | 1.018 \pm 0.046 |

P > 0.05

ตารางที่ 12 ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ที่มีต่อฤทธิ์ของแอนฮิสไตรเทคโคโรนในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

| Additions | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) |
|------------------------------------|---|
| None | 0.209 \pm 0.027 |
| None (Mg^{2+} free) | 0.186 \pm 0.019 |
| 20 μ l EtOH | 0.207 \pm 0.028 |
| 20 μ l EtOH (Mg^{2+} free) | 0.189 \pm 0.021 |
| 400 μ g ACTR (Control) | 0.514 \pm 0.015 |
| 400 μ g ACTR (Mg^{2+} free) | 0.508 \pm 0.030 |
| 0.1 mM DNP (Control) | 1.077 \pm 0.065 |
| 0.1 mM DNP (Mg^{2+} free) | 1.362 \pm 0.061 * P < 0.02 |

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 6.96 mM (กรณี Mg^{2+} free ไม่ใช่ $MgCl_2$ เลย), KCl 72.21 mM (82.68 mM ในกรณีของ Mg^{2+} free), sucrose 16.67 mM ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.40 มก.โปรตีน/มล. ปริมาณของเอทานอล ปริมาณของแอนฮิสไตรเทคโคโรน และความเข้มข้นของ DNP ดังที่แสดงในตาราง, ATP 5.00 mM, ปริมาตรทั้งหมด 3 มล. เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วยเอทานอล แอนฮิสไตรเทคโคโรน หรือ DNP แล้วเป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

5 การทดลอง

ตารางที่ 13 ผลของ DTNB และ DTT ที่มีต่อฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 34.80 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 6.96 mM, KCl 72.21 mM, sucrose 16.67 mM, ไมโทคอนเดรีย เจลลี่ 2.33 มก. โปรตีน/มล., ปริมาตรของเอทานอล. ความเข้มข้นของ DTNB, DTT, DNP และปริมาณของแอนซิสโตรเทคโตริน ดังแสดงในตาราง ATP 5.00 mM, ปริมาตรทั้งหมด 3 มล. เติมหด้วยยาต่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับดังแสดงในตาราง การเติมหด้วยยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติมห ATP หลังเติมหด้วยยาอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาทีเช่นกัน

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด

5 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13

| Additions | Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min) |
|--|---|
| None | 0.184 \pm 0.012 |
| 20 μ l EtOH | 0.190 \pm 0.011 |
| 0.1 mM DTNB | 0.345 \pm 0.014 |
| 1 mM DTT | 0.205 \pm 0.011 |
| 0.1 mM DTNB and 1 mM DTT | 0.196 \pm 0.012 |
| 400 μ g ACTR (Control) | 0.505 \pm 0.019 |
| 400 μ g ACTR after 0.1 mM DTNB | 0.742 \pm 0.026 * P < 0.001 |
| 400 μ g ACTR after 1 mM DTT | 0.502 \pm 0.029 |
| 400 μ g ACTR after 0.1 mM DTNB and 1 mM DTT | 0.496 \pm 0.027 |
| 0.1 mM DNP (Control) | 1.053 \pm 0.089 |
| 0.1 mM DNP after 0.1 mM DTNB | 0.653 \pm 0.066 * P < 0.01 |
| 0.1 mM DNP after 1 mM DTT | 1.071 \pm 0.095 |
| 0.1 mM DNP after 0.1 mM DTNB and 1 mM DTT | 1.121 \pm 0.098 |

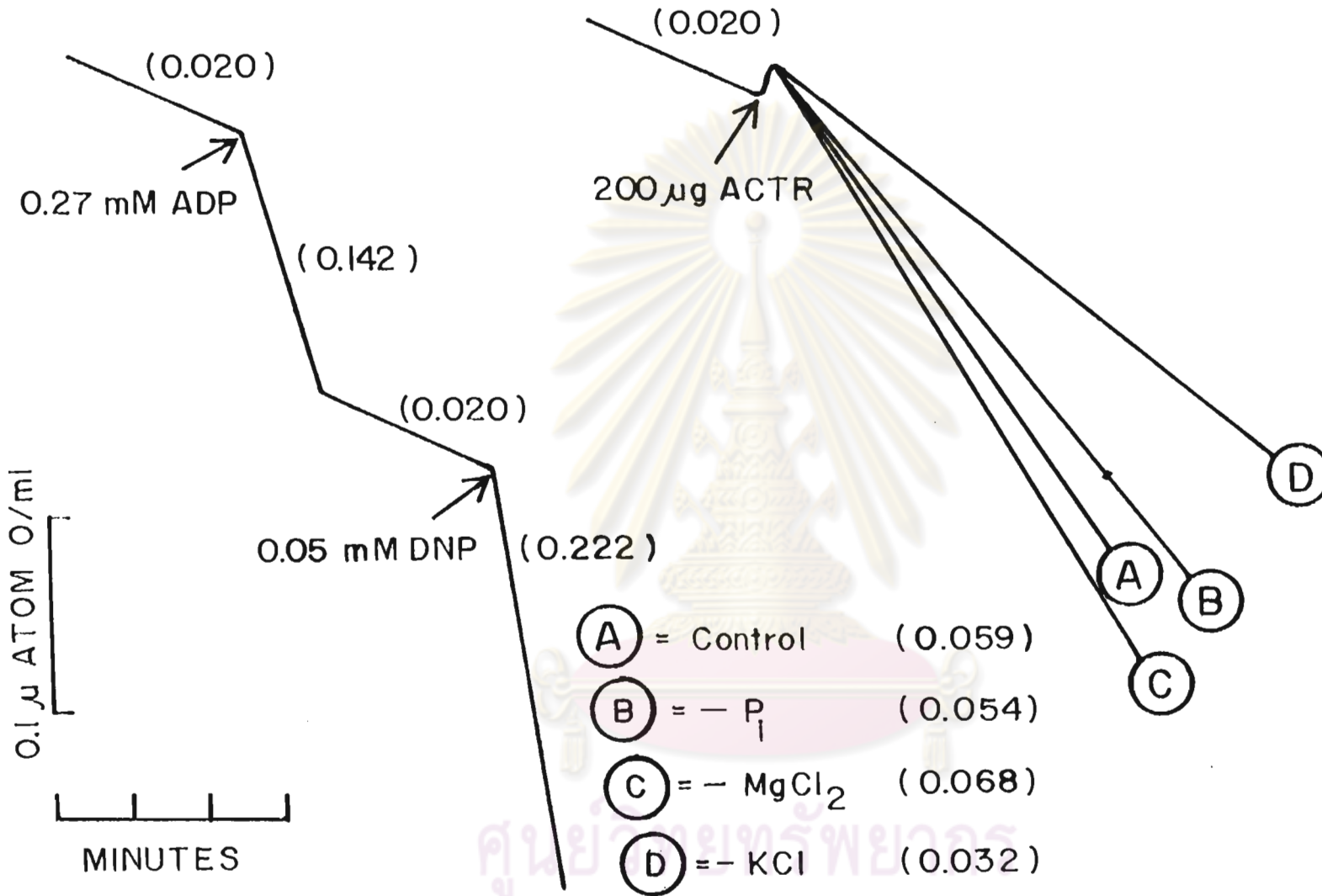
รูปที่ 27 ผลของแอนฮิสโดรเทคโตรินที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่ออยู่ใน medium ที่มีส่วนประกอบต่างกันหลายกรณี

ในที่นี้ให้ (A) อยู่ใน medium มาตรฐานของการวิจัยนี้ (มี HEPES buffer, $MgCl_2$, KCl และ Pi, final concentration = 250 mOsm) (B) อยู่ใน medium ที่เหมือนกับ medium มาตรฐาน เพียงแต่ไม่มีการเติม Pi ลงไปด้วยเท่านั้น (C) อยู่ใน medium ที่เหมือนกับ medium มาตรฐาน เพียงแต่ไม่เติม $MgCl_2$ ลงไป แล้วเพิ่ม KCl ขึ้นเพื่อชดเชยให้ final concentration = 250 mOsm เท่าเดิม และ (D) อยู่ใน medium ที่เหมือนกับ medium มาตรฐาน เพียงแต่ไม่เติม KCl ลงไป แล้วเพิ่ม $MgCl_2$ ขึ้นชดเชยให้ final concentration = 250 mOsm เท่าเดิม

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 40 mM pH 7.4, $MgCl_2$ (A และ B = 8 mM, C = 0 mM, D = 64 mM) KCl (A และ B = 83 mM, C = 95 mM, D = 0 mM), potassium phosphate (A, C และ D = 2 mM, เฉพาะ B = 0 mM), potassium glutamate 5 mM, potassium malate 5 mM, sucrose 14 mM และ ไมโตคอนเดรีย 1.90 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP และแอนฮิสโดรเทคโตริน ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.86 มล.

อัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณ ออกมาเป็นจำนวน มคอ. ของออกซิเจน/มล./นาที

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

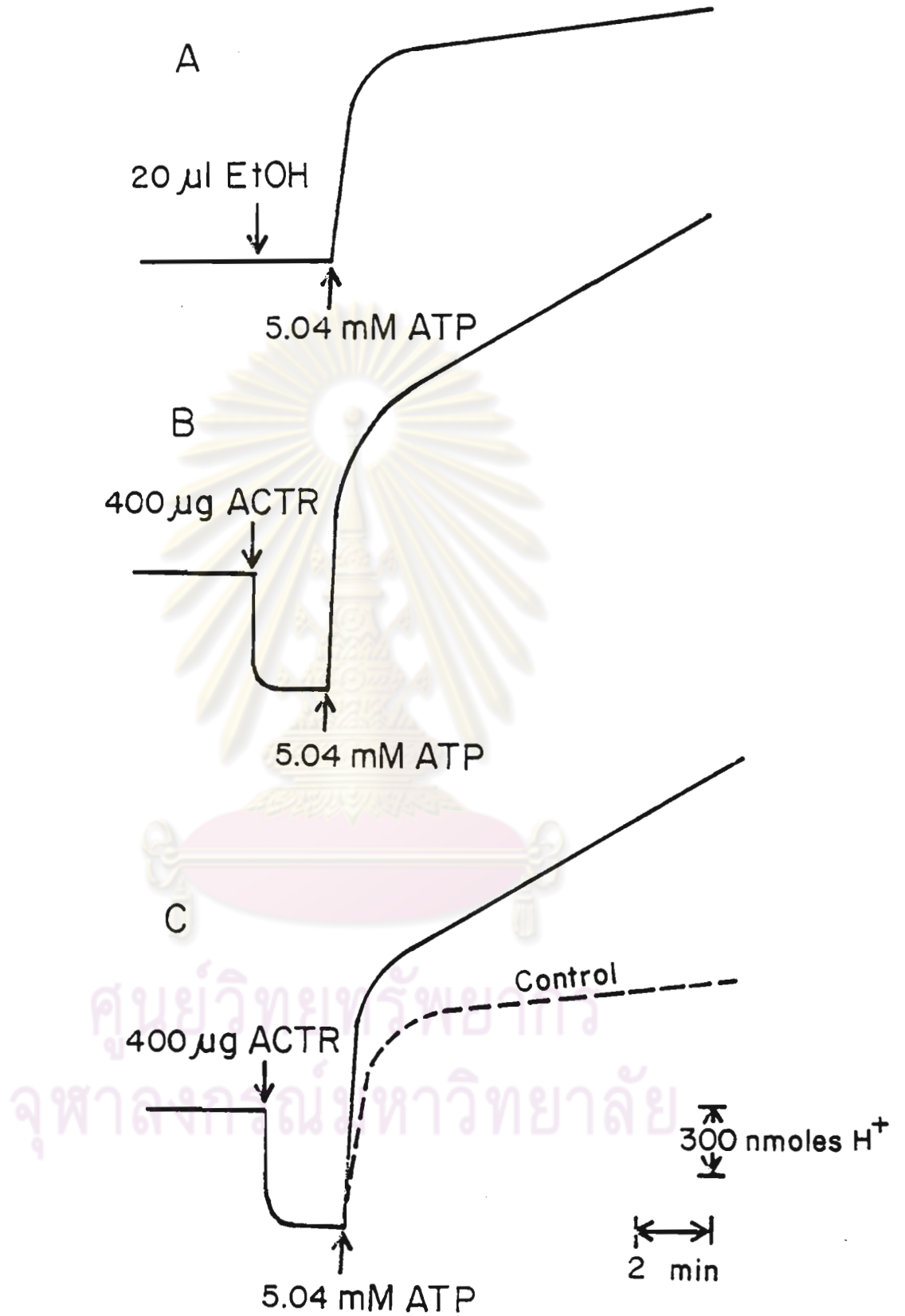
รูปที่ 28 ผลการใช้แอนซิสไตรเทคโตรินกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย
แล้ววัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มมากขึ้นใน medium

วัดโดยใช้ pH electrode ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502)
เพื่อติดตามอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวน H^+ ใน medium และบันทึกผลการทดลองลงใน
Gilson recorder (model N 2) ทั้งนี้โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Bertina and
Slater (38)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 8.82 mM pH 7.4, $MgCl_2$
7.05 mM, KCl 93.45 mM, sucrose 15.74 mM, ไมโทคอนเดรีย 1.74 มก.
โปรตีน/มล. ปริมาตรของเอทานอล ปริมาณของแอนซิสไตรเทคโตรินและความเข้มข้น
ของ ATP (pH 6.8) ดังแสดงในภาพ ปริมาตรทั้งหมด 3.97 มล. เทียบมาตรฐาน
จำนวน H^+ จากการใช้ 0.01154 N HCl



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



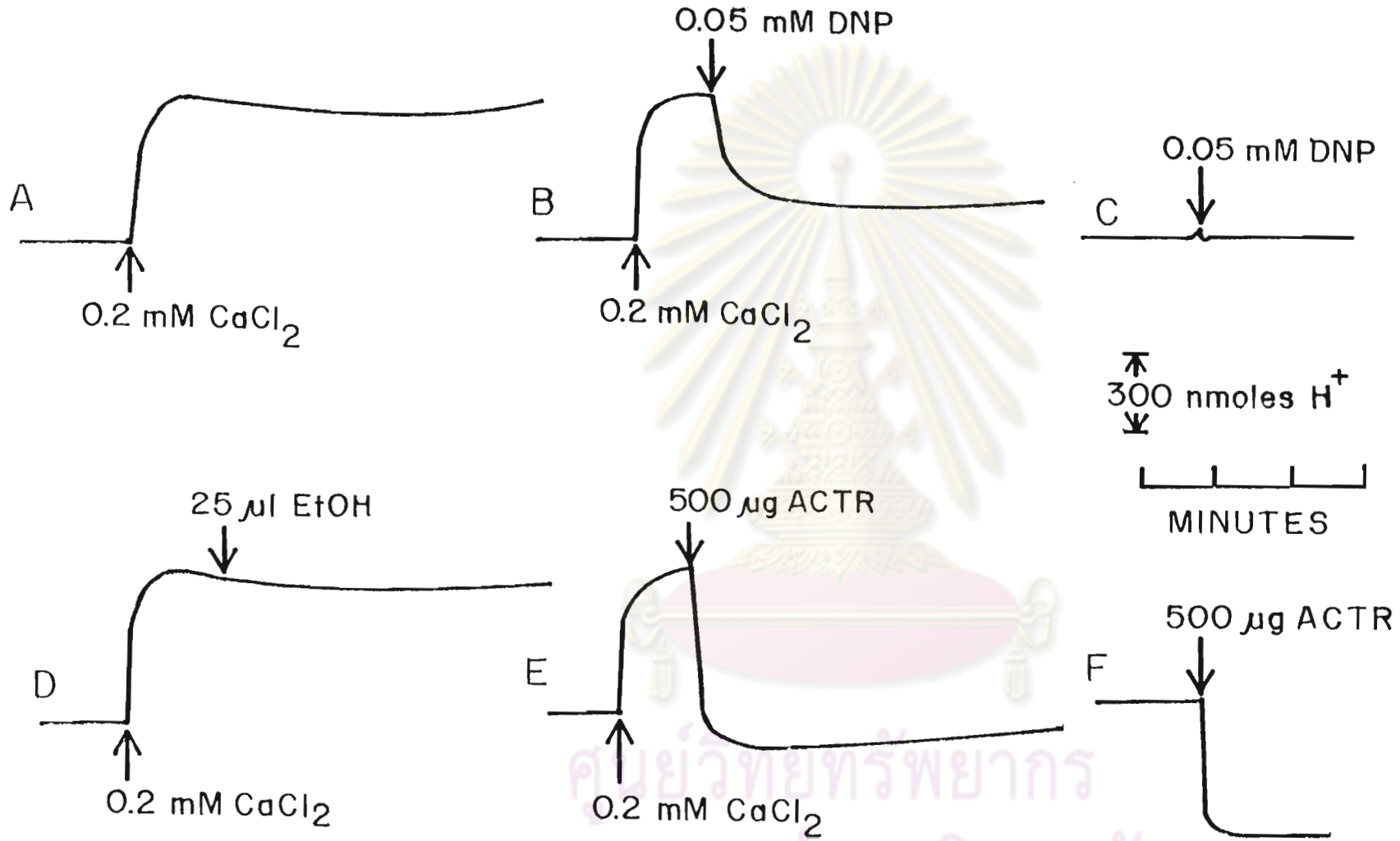
รูปที่ 29 ผลของแอนนิสไตรเทคโตรินที่มีต่อ H^+ uptake โดยไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

วัดโดยใช้ pH electrode ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) เพื่อติดตามอัตราการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวน H^+ ใน medium และบันทึกผลการทดลองลงใน Gilson recorder (model N 2) ทั้งนี้ โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Weinbach et al., (43) และ Toninello and Siliprandi (44)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 2.74 mM pH 7.4, KCl 45.63 mM, sucrose 151.06 mM, potassium glutamate 5 mM, potassium malate 5 mM และไมโตคอนเดรีย 1.80 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในภาพ คือ $CaCl_2$, DNP, เอทานอล และแอนนิสไตรเทคโตริน ปริมาตรทั้งหมด 4.00 มล. เทียบตามมาตรฐานจำนวน H^+ จากการใช้ 0.01154 N HCl



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



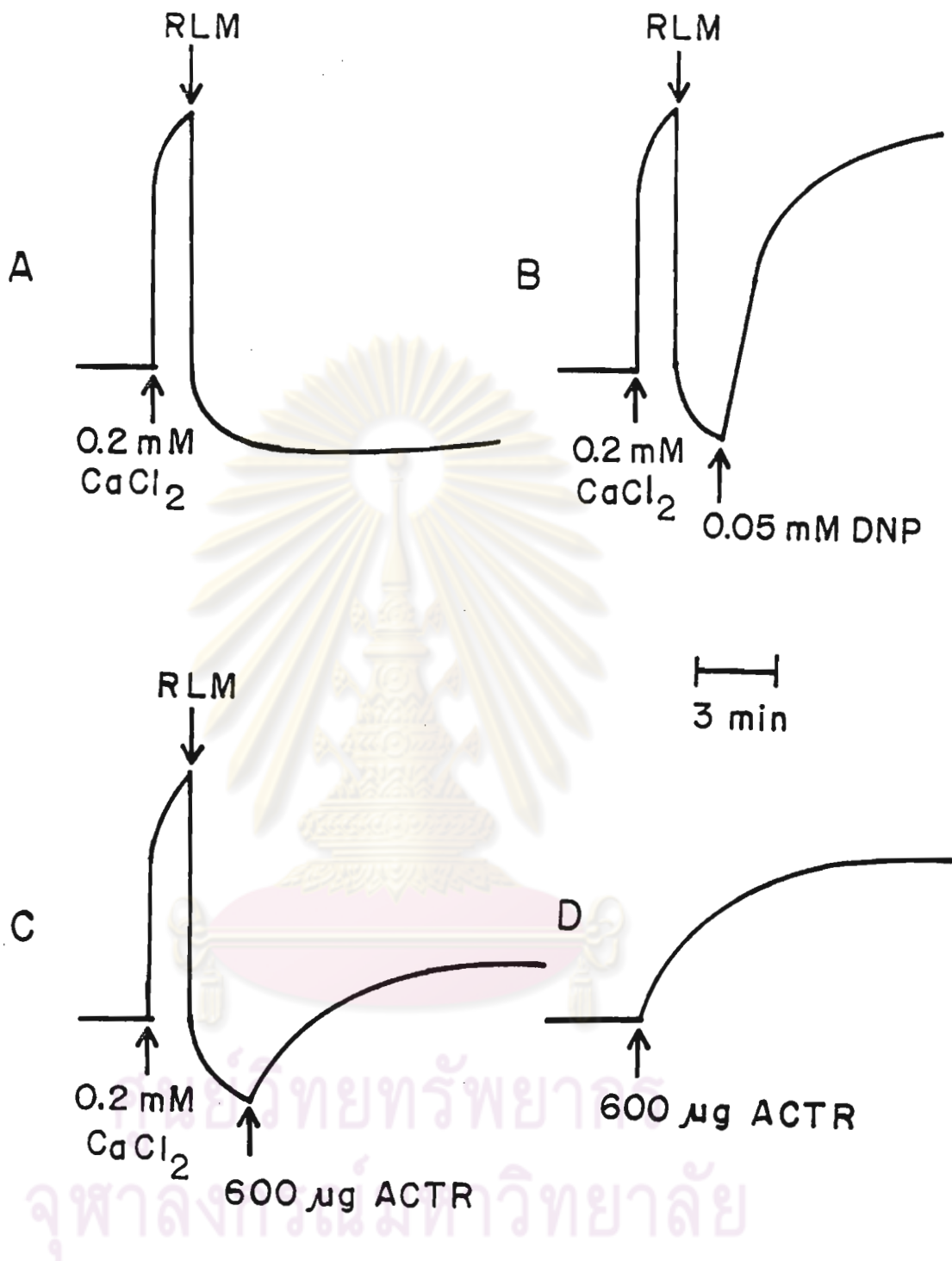
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

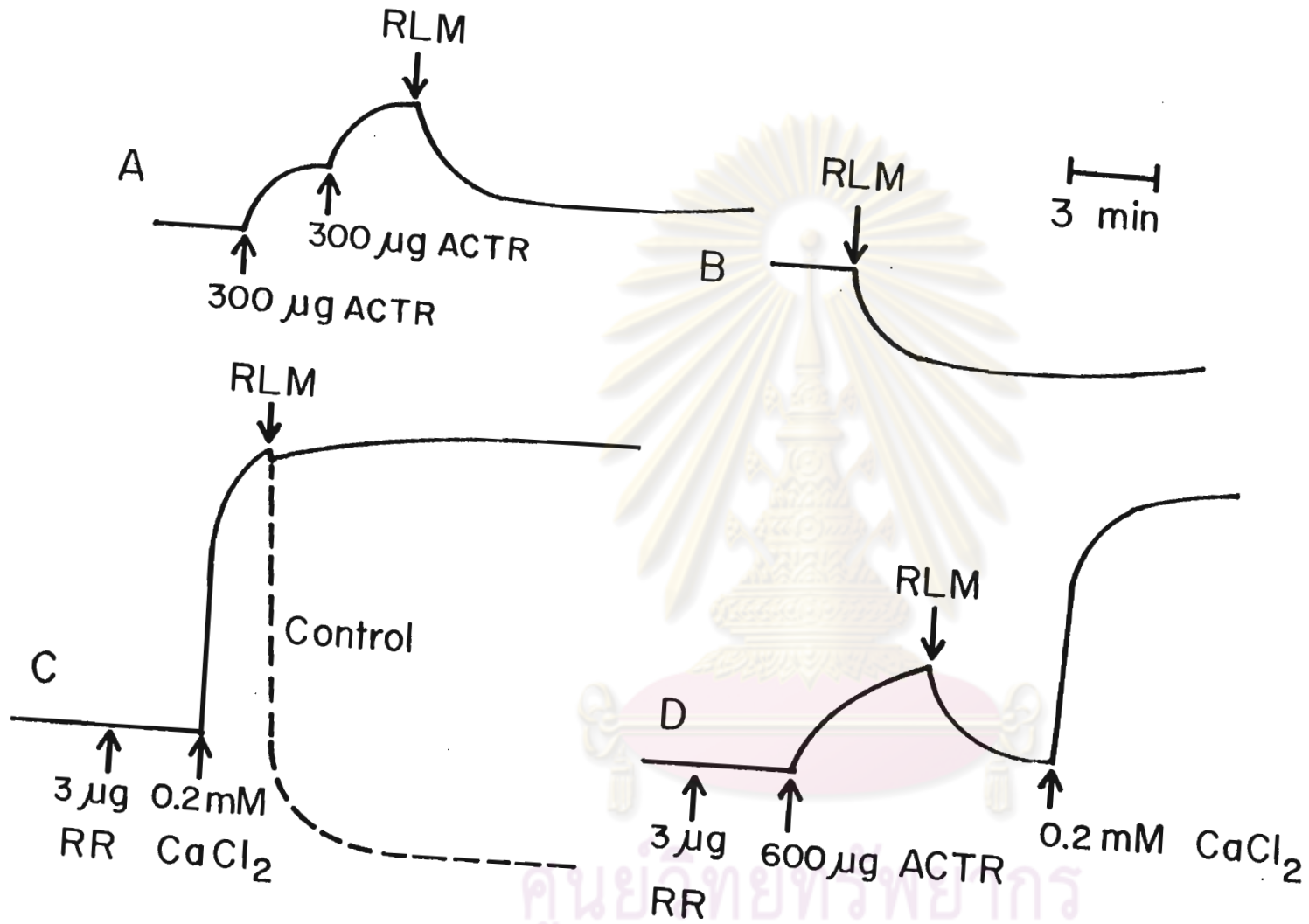
รูปที่ 30/1-3 ผลของแอนฮิสไตรเทคโตรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมโดยไม
โตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

วัดโดยใช้ calcium-selective electrode (orion model 93-20) ร่วม
กับ reference electrode (orion model 90-02) นำ electrodes ทั้งสองนี้ต่อ
เข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) เพื่อติดตามการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ
ปริมาณแคลเซียมใน medium และบันทึกผลการทดลองลงใน Gilson recorder (model
N 2)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.45 mM pH 7.4, $MgCl_2$
1.87 mM, KCl 86.15 mM, potassium phosphate 0.47 mM, potassium
glutamate 5 mM, potassium malate 5 mM และ sucrose 16.39 mM
ส่วนประกอบอื่น ๆ ที่เติมตามลงไปดังแสดงในภาพ คือ $CaCl_2$ ไมโตคอนเดรีย (RLM)
1.91 มก. โปรตีน/มล., DNP, แอนฮิสไตรเทคโตริน และ ruthenium red (RR)
ปริมาตรทั้งหมด 5.34 มล.

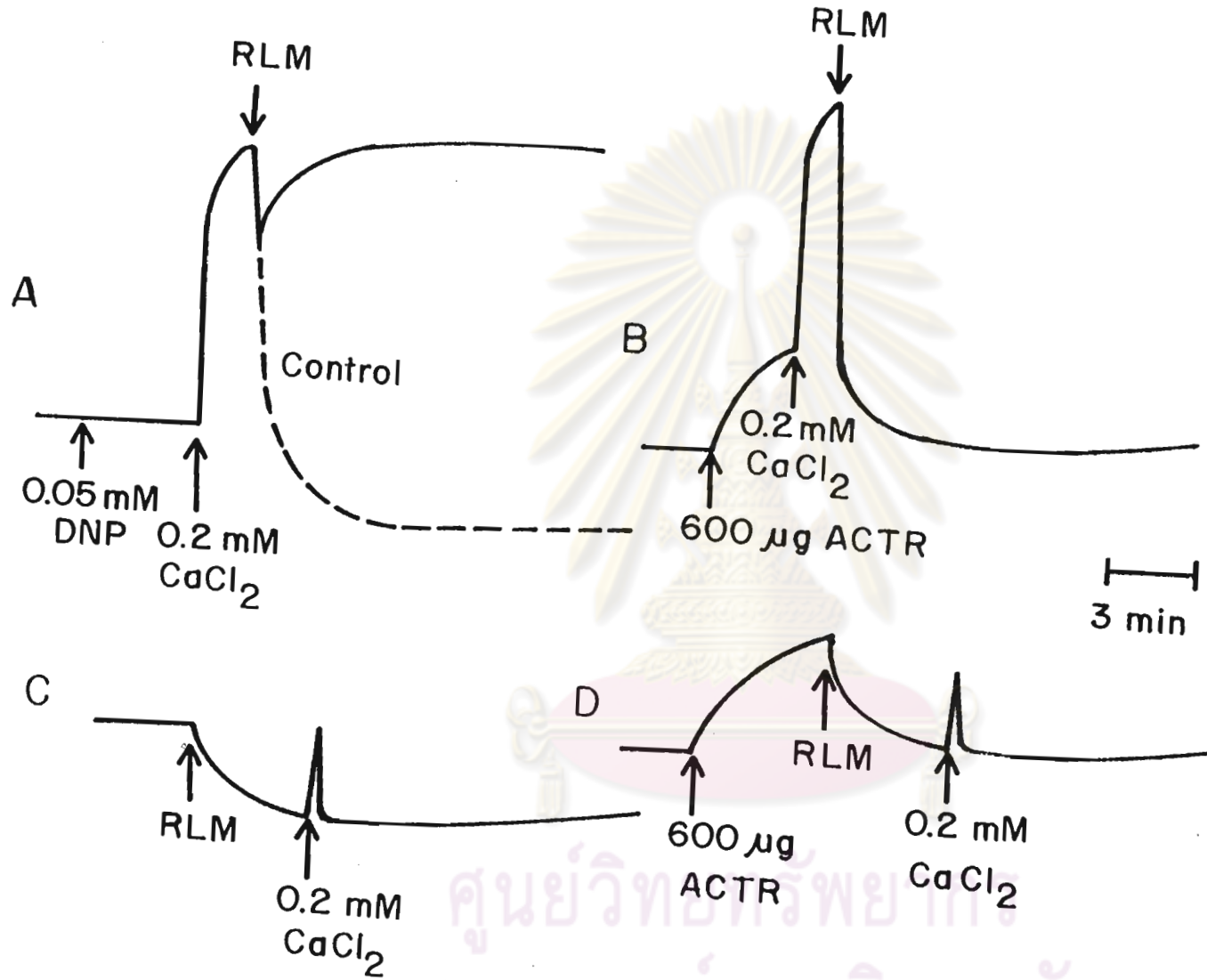
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 30/2

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30/3

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

state และเรียกการใช้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP ลงไปนี้ว่าไมโทคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) และถือว่าเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโทคอนเดรีย คือถ้าไม่มี ADP (state 4) อัตราการหายใจจะช้า และถ้ามี ADP (state 3) อัตราการหายใจจึงจะเร็ว และเรียกอัตราส่วนของอัตราการหายใจใน state 3/อัตราการหายใจใน state 4 ว่า respiratory control index (RCI) ดังนั้น RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ $0.248/0.033=7.52$ แต่ก็มีสารเคมีบางอย่างเช่น DNP มีคุณสมบัติที่สามารถทำให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไป โดยตัว DNP เองสามารถกระตุ้น state 4 ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ ADP เลย (ไม่มีการสร้าง ATP) และมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber เราเรียกว่า DNP ทำให้เกิดอันดับปลง (บทที่ 1) ดังนั้น การเติม DNP ลงไปในระยะสุดท้ายของ tracing 11A จึงทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะนี้ (0.333) สูงมาก และมีการใช้ออกซิเจนติดต่อกันไปจนกระทั่งหมดไปในที่สุด ($O_2 = 0$)

tracing 11B, C และ D แสดงให้เห็นว่า แอนซิสโตรเทคโตรินก็สามารถกระตุ้น state 4 ได้รุนแรงขึ้นตามขนาดของสารที่ใช้ ส่วน tracing 11E แสดงให้เห็นว่า เอทธานอลเท่าที่ใช้เป็นตัวทำละลายของแอนซิสโตรเทคโตรินเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้น state 4 ได้

ในรูปที่ 12 ทำการทดลองทำนองเดียวกันกับรูปที่ 11 ต่างกันเพียงใช้ succinate เป็นสับสเตรท ผลที่ได้จากการทดลองจะเห็นว่าเป็นไปทำนองเดียวกันกับการใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรทในรูปที่ 11

ในรูปที่ 13 แสดง dose-response curve ของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate (curve 13A) และเมื่อใช้ glutamate+malate (curve 13B) เป็นสับสเตรท จะเห็นได้ว่าทั้งสองกรณีได้ผลที่คล้ายกัน คือ เมื่อใช้แอนซิสโตรเทคโตรินตั้งแต่ขนาด 50-400 มก. อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดของสารที่ให้ จนกระทั่งสูงสุดที่ขนาดของสารที่ใช้เท่ากับ 400 มก. และถ้าให้แอนซิสโตรเทคโตรินมากกว่า 400 มก. เช่น 500 มก. จะเห็นว่าเริ่มมีการยับยั้งการหายใจ ในที่นี้ เรายังสามารถหาความเข้มข้นของแอนซิสโตรเทคโตริน

ที่สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้เป็นครั้งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (I_{50}) ได้ออกมาประมาณ 180 มก. (0.23 mM) เท่า ๆ กันทั้งสองกรณี

1.2 ผลการเปรียบเทียบ maximum response เมื่อใช้แอนซิสโตรเทคโตริน DNP และ ADP กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย

จากรูปที่ 14 (glutamate+malate เป็นสับสเตรท) และรูปที่ 15 (succinate เป็นสับสเตรท) จะเห็นว่า แอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดที่สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด (400 มก.) สามารถกระตุ้นการหายใจได้ในอัตราที่ต่ำกว่าทั้ง DNP และ ADP

1.3 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ที่มีต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state3 และอัตราส่วนของ ADP/O

รูปที่ 16 (glutamate+malate เป็นสับสเตรท) tracing 16A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง จะเห็นว่า ไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองยังคงมีการควบคุมการหายใจคืออยู่ ผลการคำนวณเพื่อหาค่า parameters ทั้งสาม แสดงไว้ในตารางส่วนล่างของคำอธิบายรูปที่ 16 tracing 16B แสดงผลของเอทานอลจำนวนเท่าที่ใช้เป็นตัวทำลายของแอนซิสโตรเทคโตริน (I_{50}) ต่อค่า parameters ทั้งสาม แล้วแสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางส่วนล่างของคำอธิบายรูปที่ 16 จะเห็นว่า เอทานอลเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้ parameters ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับ control (tracing 16A) tracing 16C แสดงผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่ความเข้มข้น I_{50} ต่อค่า parameters ต่าง ๆ เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบผลการคำนวณในตารางส่วนล่างของคำอธิบายรูปที่ 16 จะเห็นว่า แอนซิสโตรเทคโตริน (I_{50}) สามารถทำให้ค่า parameters ทั้งสามเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับ control (tracing 16A และ B) คือ ทำให้ค่า RCI น้อยลง จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3 มากขึ้น และอัตราส่วน ADP/O ลดลง

รูปที่ 17 ทำการทดลองทำนองเดียวกันกับในรูปที่ 16 เพียงแต่เปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate ผลของแอนซิสโตรเทคโตริน (I_{50}) ต่อค่า parameters ทั้งสามคือ ทำให้ค่า RCI น้อยลง จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state3 มากขึ้น และอัตราส่วน ADP/O ลดลง เช่นเดียวกันกับในรูปที่ 16

นอกจากนี้ โดยวิธีเดียวกันกับวิธีการที่ใช้ในรูปที่ 16 และ 17 ได้คำนวณค่า parameters ทั้งสามจากทั้งหมด 10 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ย (\bar{X}) พร้อมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 1 (glutamate+malate เป็นสับสเตรท) และ ตารางที่ 2 (succinate เป็นสับสเตรท) จากทั้งสองกรณีจะพบว่า แอนซิสโคเรเทคโครีน ที่ความเข้มข้น I_{50} มีผลทำให้ parameters ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรีย เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุก parameters ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

2. ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน medium บางประการต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโคเรเทคโครีน ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

2.1 ผลของ oligomycin และ atractyloside

ปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิด state3 (ไมโทคอนเดรีย+ออกซิเจน+สับสเตรท+Pi+ADP) คือ ไมโทคอนเดรียจะออกซิไดซ์สับสเตรทโดยต้องใช้ออกซิเจนร่วมด้วย แล้วทำให้เกิดพลังงานขึ้น ไมโทคอนเดรียจะนำเอาพลังงานที่สงวนไว้ได้จากการออกซิไดซ์สับสเตรทนี้ไปใช้ผลักดันให้มีการสร้าง ATP จากปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน ($ADP+Pi \rightleftharpoons ATP$) ในไมโทคอนเดรียที่การควบคุมการหายใจยังคงอยู่ จะพบว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันนี้จะต้องเกิดควบคู่กัน โดยเป็นปัจจัยซึ่งกันและกัน ดังตัวอย่างการทดลองใน tracing 18A จะเห็นว่า ถ้าขาดปัจจัยในการเกิดฟอสฟอริลเลชัน เช่นขาด ADP (state4) อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะช้า (ออกซิเดชันเกิดช้า) และเมื่อเติม ADP ตามลงไป (state3) ทำให้มีปัจจัยในการเกิดฟอสฟอริลเลชันครบ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียก็จะเร็วขึ้นอย่างทันทีทันใด (ออกซิเดชันเกิดเร็ว) และเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปในการสร้าง ATP อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียก็จะกลับช้าเข้าสู่ state4 ตามเดิมอย่างทันทีทันใดเช่นกัน (tracing cut off) และเพื่อให้แตกต่างจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันในอื่น ๆ จึงเรียกกระบวนการเกิดออกซิเดชันที่ ต้องเกิดควบคู่กันกับฟอสฟอริลเลชันในไมโทคอนเดรียนี้ว่าออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ในช่วงสุดท้ายของ tracing 18A จะเห็นว่า DNP ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดกระบวนการ

ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (คือมีฤทธิ์ทำให้เกิดการไม่ควบคุมกันของปฏิกิริยาออกซิเดชันและ ฟอสฟอริลเลชัน) สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียขึ้นได้ทั้ง ๆ ที่ไม่มี ADP กรณีเช่นนี้ไมโทคอนเดรียจะออกซิโคซ์สเตรทโดยใช้ออกซิเจนร่วมด้วยอย่างรวดเร็วและเป็นอิสระ คือไม่จำเป็นต้องเกิดควบคุมกับฟอสฟอริลเลชันเหมือนก่อนที่จะได้รับ DNP ออกซิเจน ใน reaction chamber จึงถูกใช้ไปในการออกซิโคซ์สเตรทจนหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีการสร้าง ATP

tracing 18B และ C ในระยะแรกแสดงให้เห็นว่าทั้ง oligomycin และ atractyloside ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันในไมโทคอนเดรีย (บทที่ 1) สามารถป้องกันการเกิด state 3 จากการเติม ADP ได้ เนื่องจากระยะแรกนี้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียยังคงขึ้นอยู่กับการเกิดฟอสฟอริลเลชัน เมื่อ oligomycin และ atractyloside ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชัน การออกซิโคซ์สเตรทซึ่งต้องใช้ออกซิเจนร่วมด้วยจึงถูกยับยั้งตามไปด้วย ในระยะสุดท้ายของ tracing จะเห็นว่า oligomycin และ atractyloside ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เกิดเนื่องจากการเติม DNP ได้ เนื่องจาก DNP สามารถกระตุ้นให้ไมโทคอนเดรียออกซิโคซ์สเตรทโดยใช้ออกซิเจนร่วมด้วยอย่างรวดเร็วและเป็นอิสระ คือไม่ต้องขึ้นอยู่กับการเกิดฟอสฟอริลเลชันเหมือนในระยะแรก (ก่อนเติม DNP)

tracing 19A,B และ C แสดงให้เห็นว่า แอนติสไตรเทคโตรินก็สามารถปลดปล่อยฤทธิ์ยับยั้งการเกิด state3 ทั้งที่เกิดจาก oligomycin และ atractyloside ได้เช่นเดียวกันกับ DNP

2.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium

ผลการทดลองในรูปที่ 20 คือ tracing 20A แสดง control

respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง; tracing 20B,C และ D แสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตรินขนาด 200 มก. ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อถูก incubate อยู่ใน medium ที่มี pH 7.0, 7.4 และ 7.8 ตามลำดับ จะเห็นว่าในทั้งสามกรณีนี้ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียหลังจากได้รับแอนติสไตรเทคโตรินมีค่าเกือบไม่ต่างกัน และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง

แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันของกลุ่มข้อมูลทั้งสามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 3 แสดงว่าในช่วง pH 7.0-7.8 นี้ แอนซิสโตรเทคโครีนสามารถออกฤทธิ์ในการกระตุ้น state4 ได้ใกล้เคียงกัน

ผลการทดลองในรูปที่ 21 ก็ได้จากการทดลองทำนองเดียวกับการทดลองในรูปที่ 20 เพียงแต่ใช้ DNP แทนแอนซิสโตรเทคโครีน จาก tracing 21B,C และ D จะเห็นว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจาก 7.0-7.4-7.8 อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดลงอย่างเห็นแนวโน้มได้ชัดเจน (0.264-0.253-0.209) และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา พบว่ามีกลุ่มตัวอย่างอยู่คู่หนึ่งคือกลุ่ม pH 7.0 และกลุ่ม pH 7.8 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียของสองกลุ่มการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 4 แสดงว่าในช่วง pH 7.0-7.8 นี้ DNP สามารถออกฤทธิ์ในการกระตุ้น state4 ได้ลดลงเมื่ออยู่ใน pH ที่สูงขึ้น ซึ่งแตกต่างจากกรณีของแอนซิสโตรเทคโครีน

2.3 ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium

ผลของการทดลองในรูปที่ 22 คือ tracing 22A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง; tracing 22B และ C แสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโครีนที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อถูก incubate ใน medium ที่มี Mg^{2+} (tracing 22B) และเมื่อถูก incubate ใน medium ที่ไม่มี Mg^{2+} (tracing 22C) จะเห็นได้ว่า อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียหลังจากได้รับแอนซิสโตรเทคโครีนใน tracing 22C (0.075) มีค่าสูงกว่าใน tracing 22B (0.068) อยู่เล็กน้อย และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็พอเห็นแนวโน้มได้ค่อนข้างชัดเจนว่า ใน medium ที่ไม่มี Mg^{2+} แอนซิสโตรเทคโครีนสามารถออกฤทธิ์ในการกระตุ้น state4 ได้ดีกว่าใน medium ที่มี Mg^{2+} (27.66 %) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 5

ส่วน tracing 22D และ E ก็เป็นการทดลองทำนองเดียวกับ tracing 22B และ C เพียงแต่ใช้ DNP แทนแอนซิสโตรเทคโคโรน จะเห็นว่า อัตราการใช้ออกซิเจนใน tracing 22D (0.253) สูงกว่าใน tracing 22E (0.235) อยู่บ้าง และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา ก็พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แต่ก็พอจะเห็นแนวโน้มได้ว่า DNP สามารถกระตุ้น state4 ใน medium ที่มี Mg^{2+} ได้ดีกว่าใน medium ที่ไม่มี Mg^{2+} (5.73 %) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 6 ดังนั้น กรณีนี้แอนซิสโตรเทคโคโรน ให้ผลตรงกันข้ามกับ DNP

2.4 ผลของ DTNB และ DTT

ผลการทดลองในรูปแบบที่ 23 คือ tracing 23A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง; tracing 23B ในช่วงแรกจะเห็นว่า DTNB (0.11 mM) สามารถยับยั้งการเกิด state3 จากการเติม ADP ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นด้วย DNP ในระยะสุดท้ายของ tracing ได้ tracing 23 C เป็น control สำหรับเปรียบเทียบกับ tracing 23D ผลการทดลองจาก tracing 23D พบว่า DTNB มีผลต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโคโรนในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียน้อยมาก และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็พอจะมองเห็นแนวโน้มได้บ้างว่า DTNB ทำให้แอนซิสโตรเทคโคโรนออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ลดลงเล็กน้อย (7.46%) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 7

ผลการทดลองในรูปแบบที่ 24 คือ tracing 24A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง; tracing 24B ในช่วงแรกแสดงให้เห็นว่า DTNB (0.11 mM) สามารถป้องกันการเกิด state3 จากการเติม ADP ได้ แต่ก็สามารถแก้ไขให้เกิด state3 กลับคืนมาได้ด้วย DTT (1.10 mM) ในช่วงสุดท้ายของ tracing ไมโตคอนเดรียก็ยังคงเสียการควบคุมการหายใจเมื่อได้รับ DNP; tracing 24C เป็น control ที่แสดงให้เห็นว่า DTT (1.10 mM) มีผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียน้อยมาก

และไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของทั้ง ADP และ DNP ที่เดิมตามลงไป; tracing 24D เป็น control สำหรับเปรียบเทียบกับ tracing 24E ผลการทดลองจาก tracing 24E พบว่า DTT (1.10mM) มีผลต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียน้อยมาก และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 5 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็พอจะมองเห็นแนวโน้มได้บ้างว่า DTT ทำให้แอนซิสโตรเทคโตรินออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (7.20%) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 8

3. ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

3.1 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดต่าง ๆ

ผลการทดลองในรูปที่ 25 แสดงผลของแอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP ตามวิธีการในบทที่ 2 แล้วนำมา plot เป็น dose-response curve; จาก dose-response curve นี้ จะเห็นว่า ในช่วงที่ใช้แอนซิสโตรเทคโตรินระหว่าง 50-700 มกก. แอนซิสโตรเทคโตรินสามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้รุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดของสารที่ใช้ แต่เมื่อให้แอนซิสโตรเทคโตรินเกิน 700 มกก. เช่น 800 มกก. สารนี้จึงจะเริ่มมีฤทธิ์ยับยั้ง ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ในที่นี้ ยังสามารถหาความเข้มข้นของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีผลทำให้เกิดการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้เป็นครึ่งหนึ่งของความแรงสูงสุด (I_{50}) ได้ออกมาประมาณ 340 มกก. (0.27 mM)

3.2 ผลเปรียบเทียบ maximum response ระหว่างแอนซิสโตรเทคโตรินกับ DNP ที่มีต่อ ATPase activity

ผลการทดลองในรูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่า แอนซิสโตรเทคโตรินในขนาดที่ให้ผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้สูงสุด (700 มกก. หรือ 0.55 mM) สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้ต่ำกว่า DNP (0.1 mM) คือสามารถกระตุ้นได้สูงสุดไม่เกิน 70 % ของ DNP และยังคงใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า DNP ประมาณ 5 เท่า

4. ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน medium บางประการต่อการออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่อเทียบกับ DNP

4.1 ผลของ oligomycin และ atractyloside

ผลการทดลองในตารางที่ 10 พบว่า oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน (400 มก.) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ฤทธิ์ยับยั้งนี้เกิดได้เช่นเดียวกับกับกรณีของ DNP (0.1 mM) ที่ใช้ทดลองเปรียบเทียบกัน

4.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium

ผลการทดลองในตารางที่ 11 พบว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium ในช่วง 7.0-7.4-7.8 ฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน (400 มก.) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับ DNP (0.1 mM) จะเห็นว่า ฤทธิ์ของ DNP เปลี่ยนแปลงไปมากกว่า และมีแนวโน้มว่าฤทธิ์จะลดลงเมื่อ pH ในช่วงดังกล่าวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วก็พบว่า ไม่มีกลุ่มข้อมูลคู่ไหนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งกรณีของแอนติสไตรเทคโตรินและ DNP

4.3 ผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium

ผลการทดลองในตารางที่ 12 พบว่า เมื่อไม่มี Mg^{2+} ใน medium ฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน (400 มก.) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก และไม่พบความแตกต่างจาก control (มี Mg^{2+} ใน medium) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กรณีของ DNP (0.1 mM) กลับพบว่า ฤทธิ์ของ DNP เพิ่มขึ้นเมื่อไม่มี Mg^{2+} ใน medium โดยเพิ่มขึ้นถึง 26.46% และมีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.02$ ด้วย

4.4 ผลของ DTNB และ DTT

ผลการทดลองในตารางที่ 13 พบว่า DTT มีผลน้อยมากต่อการออกฤทธิ์ของทั้งแอนติสไตรเทคโตริน (400 มก.) และ DNP (0.1 mM) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย และไม่พบความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ส่วน DTNB นั้น พบว่า มีผลเพิ่มการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน (400 มก.) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียอย่างเห็นได้ชัด (39.41%) และพบความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) แต่ DTNB กลับมีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ DNP (0.1 mM) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียอย่างมาก (37.99 %) และพบความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) อย่างไรก็ดี พบว่า DIT สามารถแก้ไขฤทธิ์ของ DTNB ได้ทั้งสองกรณีอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ ผลการทดลองในตารางที่ 13 ยังมีข้อมูลที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือค่าทั้ง DTNB (0.1 mM) เอง ก็มีผลในการกระตุ้น ATPase activity อยู่บ้างเช่นกัน

5. ผลที่น่าสนใจอื่น ๆ ของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย

5.1 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่ออยู่ใน medium ที่มีส่วนประกอบต่างกัน หลายกรณี

oxygraph tracings ในรูปที่ 27 สามารถอธิบายได้คือ tracing แรกเป็น control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ส่วน tracing หลังแสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตรินเมื่ออยู่ใน medium ต่างชนิดกัน จากการเปรียบเทียบ (A) และ (B) จะพบว่า แอนซิสโตรเทคโตรินสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ทั้งในสภาวะที่มี P_i (A) และไม่มี P_i (B) ใน medium โดยที่อัตราการหายใจในสภาวะไม่มี P_i ต่ำกว่าสภาวะที่มี P_i เล็กน้อย (8.48%) เมื่อเปรียบเทียบ (A) กับ (C) จะพบว่า แอนซิสโตรเทคโตรินสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ทั้งในสภาวะที่มี Mg^{2+} (A) และไม่มี Mg^{2+} (C) ใน medium โดยที่อัตราการหายใจในสภาวะไม่มี Mg^{2+} สูงกว่าสภาวะที่มี Mg^{2+} เล็กน้อย (15.25 %) เมื่อเปรียบเทียบ (A) กับ (D) จะพบว่าแอนซิสโตรเทคโตรินออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียลดลงอย่างมากเมื่อไม่มี K^+ (D) อยู่ใน medium (45.76 %)

สรุปได้ว่า ส่วนประกอบของ medium ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็ค่าจะมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน

5.2 ผลการใช้แอนซิสโทรเทคโตรินกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย แล้ววัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH electrode

tracings ในรูปที่ 28 สามารถอธิบายได้คือ tracing 28 A เป็น control response เพื่อดูผลของเอทานอลเท่าที่ใช้เป็นตัวทำละลายของแอนซิสโทรเทคโตรินต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย จะเห็นว่าหลังจาก start reaction ด้วย ATP ในช่วงแรกจะมี H^+ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนช่วงหลังจำนวน H^+ เพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่ช้ามาก H^+ ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกอาจเนื่องจาก ATP ที่ใช้มีสภาพเป็นกรด ส่วน tracing 28B เป็นผลของแอนซิสโทรเทคโตรินต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย จะเห็นได้ว่าหลังจากเติมแอนซิสโทรเทคโตรินลงไป จะพบว่า แอนซิสโทรเทคโตรินซึ่งละลายอยู่ในเอทานอลแสดงคุณสมบัติเป็นด่าง และมีผลรบกวนต่อการวัดปริมาณ H^+ ด้วยวิธีนี้ อย่างไรก็ตาม หลังจากเติม ATP เพื่อ start reaction จะเห็นว่า ในช่วงแรกมีการเพิ่ม H^+ อย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับ control และเมื่อนำ tracing 28A และ B มาซ้อนกันเป็น tracing 28C จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของ H^+ ในช่วงหลังต่างกันมาก โดยที่แอนซิสโทรเทคโตรินมีผลทำให้มีจำนวน H^+ เพิ่มมากขึ้นใน medium ดังนั้น แอนซิสโทรเทคโตรินจึงมีผลกระตุ้น ATPase activity ที่วัดโดยวิธีนี้เช่นกัน

5.3 ผลของแอนซิสโทรเทคโตรินที่มีต่อ H^+ uptake โดยไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

tracing ในรูปที่ 29 สามารถอธิบายได้คือ tracing 29A เป็น control response เมื่อเติม $CaCl_2$ ลงไปจะพบว่ามีการ eject H^+ ออกมาจาก ไมโตคอนเดรีย (43) หรืออีกนัยหนึ่ง $CaCl_2$ ที่เติมลงไปจะเป็นตัวก่อให้เกิด membrane potential (44)

tracing 29B คล้ายกับ 29A เพียงแต่มีการเติม DNP ตามลงไปด้วย จะเห็นว่า DNP มีผลทำให้ไมโตคอนเดรีย uptake H^+ กลับเข้าไปอย่างรวดเร็ว (สลาย membrane potential)

tracing 29C เป็น control เพื่อดูผลของ DNP เท่าที่ใช้ใน tracing 29B จะเห็นว่าถ้าไม่มีไมโตคอนเดรียและ $CaCl_2$ อยู่ด้วยแล้ว DNP จะไม่มีผลต่อการ

เปลี่ยนแปลงปริมาณ H^+ ทั้ง ๆ ที่มีฤทธิ์เป็นกรด

tracing 29D คล้ายกับ 29A เพียงแต่มีการเติมเอทานอลเท่าที่ใช้ เป็นตัวทำลายของแอนซิสโตรเทคโตรินลงไปด้วย เพื่อใช้เป็น control กับการทดลองใน tracing 29E

tracing 29E คล้ายกับ 29 D เพียงแต่เปลี่ยนจากเอทานอลเป็นแอนซิสโตรเทคโตริน ทำให้ดูเหมือนว่าแอนซิสโตรเทคโตรินก็มีผลในการทำให้ไมโทคอนเดรีย uptake H^+ กลับเข้าไปอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับ DNP ใน tracing 29 B

tracing 29F เป็น control เพื่อดูผลของแอนซิสโตรเทคโตรินเท่าที่ใช้ ใน tracing 29E จะเห็นว่าแม้ไม่มีไมโทคอนเดรีย และ $CaCl_2$ อยู่ด้วยแอนซิสโตรเทคโตรินก็มีผลได้เช่นเดียวกับใน tracing 29E ผลรบกวนการวัดปริมาณ H^+ นี้ คาดว่าเนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นด่างของแอนซิสโตรเทคโตริน จึงทำให้ผลเกี่ยวกับ H^+ uptake ใน tracing 29E ยังไม่สามารถสรุปผลได้แน่ชัด ต่างจากกรณีของ DNP ใน tracing 29B ซึ่งน่าจะสรุปได้แน่นอนว่าเกิดจากฤทธิ์ของ DNP

5.4 ผลของแอนซิสโตรเทคโตรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

tracing ในรูปที่ 30/1, 30/2 และ 30/3 เป็น tracings ที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมอิสระใน medium ในสภาวะต่าง ๆ

tracing 30/1A เป็น control response จะเห็นว่าระดับแคลเซียมใน medium จะสูงขึ้นหลังจากเติม $CaCl_2$ ลงไป แต่เมื่อเติมไมโทคอนเดรีย (RLM) ตามลงไป แคลเซียมจะถูกสะสมเข้าไปไว้ในไมโทคอนเดรียจนหมดอย่างรวดเร็ว

tracing 30/1B คล้ายกับ 30/1A เพียงแต่มีการเติม DNP ตามลงไป ด้วย จะเห็นว่า DNP มีผลทำให้ไมโทคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซียม ที่สะสมไว้ออกมาอย่างรวดเร็วเช่นกัน

tracing 30/1C คล้ายกับ 30/1B เพียงแต่เปลี่ยนจาก DNP เป็นแอนซิสโตรเทคโตริน ผลที่ได้คล้ายกับว่าแอนซิสโตรเทคโตรินก็สามารถทำให้มีการปลดปล่อย

แคลเซียมที่ไมโตคอนเดรียสะสมไว้ออกมาเช่นเดียวกัน

tracing 30/1D แอนติสไตรเทคโคโรนอย่างเดียวก้สามารถทำให้มีผลคล้ายกับมีแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นใน medium ผลของแอนติสไตรเทคโคโรนใน tracing 30/1C จึงยังสรุปผลแน่นอนไม่ได้ ส่วนผลของ DNP อย่างเดียว พบว่า DNP ไม่มีผลรบกวนการทำงานของ calcium-selective electrode (tracing 30/3A) ผลของ DNP ใน tracing 30/1B จึงน่าจะสรุปได้ว่าเป็นเพราะฤทธิ์ของ DNP แต่เพียงอย่างเดียว

tracing 30/2A แอนติสไตรเทคโคโรนมีผลรบกวนการทำงานของ calcium-selective electrode โดยทำให้มีผลเหมือนการเติมแคลเซียมลงไป ใน medium เมื่อเติมไมโตคอนเดรีย (RIM) ตามลงไปก็ทำให้ดูเหมือนว่ามีการสะสมแคลเซียมเข้าไปในไมโตคอนเดรียด้วย

tracing 30/2B ไมโตคอนเดรียอย่างเดียวก้ทำให้มีผลเหมือนมีการสะสมแคลเซียมที่มีอยู่เดิมใน medium เข้าไปในไมโตคอนเดรียด้วย ผลการสะสมแคลเซียมใน tracing 30/2A จึงอาจเป็นสภาวะปกติของการทดลองเท่านั้น

tracing 30/2C ตามรอยเส้นประ คือผลที่ได้ถ้าไม่มี ruthenium red (RR) อยู่ด้วย ซึ่งก็คือ control (tracing 30/1A) จะเห็นได้ว่า ruthenium red มีผลยับยั้งการสะสมแคลเซียมเข้าไปไว้ในไมโตคอนเดรียได้เนื่องจากเป็น calcium transport inhibitor (45)

tracing 30/2D จะเห็นว่า ruthenium red ไม่สามารถยับยั้งสภาวะที่เหมือนกับว่ามีการสะสมแคลเซียมใน tracing 30/2A และ B ได้ CaCl_2 ที่เติมตามลงไปลำดับสุดท้าย แสดงให้เห็นว่า ruthenium red ในขนาดที่ใช้นี้สามารถยับยั้งการสะสมแคลเซียมเข้าไปในไมโตคอนเดรียได้

สรุปได้ว่า ผลที่ได้ใน tracing 30/2A และ B นั้น แท้ที่จริงแล้วอาจเป็น normal response ของ system ที่ไม่เกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณแคลเซียมจริง ๆ

tracing 30/3A จะเห็นว่า DNP ในขนาดที่ทำให้เกิดอันคัปปลิงสามารถมีผลยับยั้งการสะสมแคลเซียมเข้าไปไว้ในไมโตคอนเดรีย

tracing 30/3B ทำนองเดียวกับ tracing 30/3A เพียงแต่เปลี่ยน DNP เป็นแอนซิสไตรเทคโครีน จะเห็นว่าแอนซิสไตรเทคโครีนไม่มีผลยับยั้งการสะสมแคลเซียม โดยไมโตคอนเดรีย

tracing 30/3C ไมโตคอนเดรียสามารถสะสมแคลเซียมที่เดิมตามลงไปไว้ได้ ทั้งหมดอย่างรวดเร็ว

tracing 30/3D คล้ายกับ tracing 30/3C เพียงแต่เติมแอนซิสไตรเทคโครีน ลงไปก่อน จะเห็นว่าแอนซิสไตรเทคโครีนไม่มีผลต่อการสะสมแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย อีกเช่นกัน

สรุปได้ว่า ฤทธิ์อันค้ำปลิงของแอนซิสไตรเทคโครีนอาจต่างกับของ DNP อีกประการ หนึ่งคือ แอนซิสไตรเทคโครีนมีผลน้อยมากหรือไม่มีผลต่อทั้งการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียม โดยไมโตคอนเดรีย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลจากการทดลองในบทที่ 3 พบว่า แอนซิสโครเทคโคโรนสามารถทำให้เกิดการไม่ควบคู่กัน (uncouple) ของการออกซิโคซีสับสเตรทกับปฏิกิริยาการสร้าง ATP (รูปที่ 11-12, 19) และกระตุ้น ATPase activity (รูปที่ 25) ของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นแอนซิสโครเทคโคโรนจึงมีฤทธิ์เป็น uncoupler ของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (46-49) สิ่งที่จะอภิปรายต่อไปในที่นี้ ก็คือ กลไกการเกิดอันคัปปลิงของแอนซิสโครเทคโคโรนควรเป็นอย่างไร และฤทธิ์อันคัปปลิงนี้จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาของแอนซิสโครเทคโคโรนเท่าที่มีการศึกษากันในปัจจุบันหรือไม่ อย่างไร ตลอดจนโอกาสที่จะนำเอาฤทธิ์อันคัปปลิงของแอนซิสโครเทคโคโรนไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

ก. กลไกการเกิดอันคัปปลิงในกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ที่เกิดเนื่องจากฤทธิ์ของแอนซิสโครเทคโคโรน

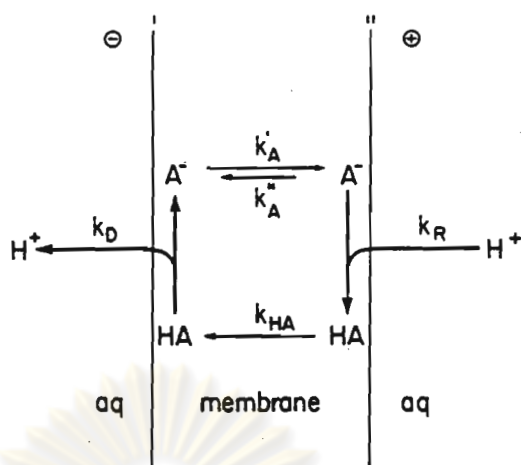
แม้ว่าเราจะรู้จักฤทธิ์อันคัปปลิงกันมานานกว่า 40 ปี และพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดอันคัปปลิงกับการสลาย H^+ gradient ก็ตามที ในส่วนรายละเอียดที่เกี่ยวกับกลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับโมเลกุลก็ยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัด (46-49)

DNP (2,4-dinitrophenol) และ CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) ซึ่งเป็น uncouplers ที่เป็นกรดอ่อนที่มีการศึกษากันมาก และรู้จักกันมานาน มักจะถูกจัดอยู่ในพวก classical หรือ true uncouplers (46-49) โดยทั่วไปแล้ว uncouplers ที่รู้จักกันในปัจจุบันเกือบทั้งหมด โดยเฉพาะพวกที่มีฤทธิ์แรง ๆ ทั้งหมด จะมีคุณสมบัติคล้ายกันกับ DNP และ CCCP คือเป็นกรดอ่อน โดยมีค่า pKa อยู่ระหว่าง 5-7 และเนื่องจาก classical uncouplers สามารถส่งเสริมให้มีการส่ง H^+ (proton) ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียและ model membrane systems ได้เพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันจึงมักถูกเรียกเป็น protonophoric uncouplers ด้วยเช่นกัน

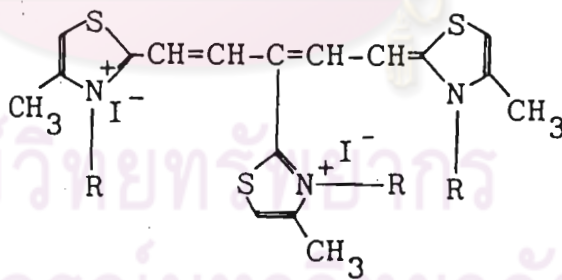
คุณสมบัติ protonophoric นี้ สนับสนุนกลไกการเกิดอันคัปปลิงตาม chemiosmotic theory ที่เน้นเกิดการสลาย H^+ gradient ระหว่างเกิดอันคัปปลิง ปัจจุบันเราจึงมักเรียกกลไกการเกิดอันคัปปลิงตามแนวความคิดนี้ว่า protonophoric mechanism (49) การศึกษาทาง biophysics เร็ว ๆ นี้ (50-53) ก็พบด้วยว่า กลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไมโทคอนเดรียของการส่ง H^+ ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียโดย uncouplers ที่เป็นกรดอ่อน อาจเป็นดังที่แสดงอยู่ในรูปที่ 31

นอกจาก classical uncouplers แล้ว ยังมีสารอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่สามารถเลียนแบบฤทธิ์ของ classical uncouplers ได้ เช่น valinomycin สามารถแสดงฤทธิ์อันคัปปลิงได้เมื่อมี K^+ และ Pi อยู่ใน incubation medium (54) oligomycin แสดงฤทธิ์อันคัปปลิงได้เมื่อมี Cl^- อยู่ใน medium (55) เมื่อความเข้มข้นสูง ๆ antimycin ก็สามารถแสดงฤทธิ์อันคัปปลิงได้ด้วยเช่นกัน (56) กรดไขมัน เช่น oleic acid ก็สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจได้ แต่ไม่พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ATPase activity (49) สารที่ทำให้เกิดอันคัปปลิงที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากกรณีของ classical uncouplers เช่นนี้ เรามักจะจัดไว้ในพวก nonclassical หรือ pseudo-uncouplers (46-49)

จากการวิจัยต่าง ๆ ยังพบด้วยว่า กลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไมโทคอนเดรียที่เกิดเนื่องจาก nonclassical uncouplers อาจแตกต่างไปจากกรณีของ classical uncouplers นอกจากนี้ nonclassical uncouplers ต่างชนิดกันก็มีแนวโน้มว่าจะมีกลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไมโทคอนเดรียต่างกัน ทั้งนี้ คาดว่าขึ้นอยู่กับสูตรโครงสร้างทางเคมีของ uncouplers แต่ละชนิดเป็นสำคัญ (49, 53) เช่น 1) กรณีของ cyanide dye ซึ่งเป็น hydrophobic cations ทำให้เกิดแนวความคิดเกี่ยวกับ membrane potential dissipation mechanism (57, 58) คือคิดว่า สารพวกนี้ทำให้เกิดอันคัปปลิงได้โดยไปทำให้เกิดการสลาย membrane potential ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการควบคู่กันของปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันในไมโทคอนเดรีย 2) กรณีของ hydrophobic amines เช่น butacaine ทำให้เกิดแนวความคิดเกี่ยวกับ lipophilic ion pairs mechanism (59) คือคิดว่า สารพวกนี้จะไปรวมตัวกับ lipophilic anions



รูปที่ 31 แสดงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ของการส่ง H^+ ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรียโดย uncouplers ที่เป็นการค่อน เครื่องหมาย \oplus และ \ominus แสดงความต่างศักย์ระหว่างสองด้านของเยื่อหุ้มชั้นใน; HA และ A^- แทน uncouplers ที่เป็นการค่อนที่อยู่ในรูป unionised และ ionised ตามลำดับ ; k แทน rate constants ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ในรูป (50-53)



Chemical structure of the carbocyanine dyes: triS-C₄(S), R = -CH₂(CH₂)₂CH₃; and triS-C₇(S), R = -CH₂(CH₂)₅CH₃.

รูปที่ 32 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ carbocyanide dyes ซึ่งเป็นตัวอย่างของ cationic uncouplers (57)

ที่เหมาะสมแล้วทำให้มีการส่ง H^+ ผ่านเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้อย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้จะต่างจากกรณีของ uncouplers ที่เป็นการต่อต้านตรงที่กรณีนี้ต้องการ groups ที่สำคัญ คือ tertiary amine และ lipophilic anion 3) กรณีของ reactive electrophilic compounds และ SH reagents บางตัว ทำให้เกิดแนวความคิดเกี่ยวกับ membrane protein modification mechanism (60-65) คือคิดว่า สารพวกนี้จะไปจับกับ membrane proteins ที่มีหน้าที่โดยตรงกับการเกิดการควบคุมของปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันในไมโทคอนเดรีย 4) กรณีของ ionophore antibiotics เช่น valinomycin และ nigericin ทำให้เกิดแนวความคิดเกี่ยวกับ cyclical cation transport mechanism (66-68) คือคิดว่า สารพวกนี้จะทำให้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้ได้จากการออกซิเดชันสับสเตรทนั้น แทนที่จะถูกนำไปใช้ในการสร้าง ATP กลับต้องนำมาใช้ในการนำ cations เข้า และออกผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียวนเวียนกันไปอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา และ 5) กรณีของ general anesthetics เช่น chloroform และ halothane ทำให้เกิดแนวความคิดเกี่ยวกับ membrane fluidity และ intermembrane processes mechanism (69) คือคิดว่านี่สารพวกนี้จะไปรบกวนโดยตรงต่อกระบวนการสำคัญต่อการเกิดการควบคุมของปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันซึ่งอยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย

อย่างไรก็ดี ในปัจจุบันเรายอมรับกันโดยทั่วไปว่า uncouplers มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ทำหน้าที่เป็น protonophoric agents ช่วยส่งเสริมการส่ง H^+ ผ่านผนังชั้นในเข้าไปในไมโทคอนเดรีย แล้วทำให้เกิดการสลายตัวของ H^+ gradient ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับผลักดันให้มีการสร้าง ATP จาก ADP และ P_i แม้ว่าในบางกรณีเช่น กรณีของ cyanide dye (58) พบว่า มีจำนวน H^+ เพิ่มขึ้นใน medium ระหว่างที่ทำให้เกิดอันคัปปลิง หรือกรณีของ general anesthetics (69) พบว่าสารพวกนี้ทำให้เกิดอันคัปปลิงได้โดยไม่มี การสลาย proton electrochemical potential และจากการวิจัยของ Terada (49) ก็พบด้วยว่า การสลายตัวของ H^+ gradient ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียไม่ใช่ สิ่งสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดอันคัปปลิง

กรณีกลไกการเกิดฤทธิ์อันคัปปลิงของแอนนิส ไตร เทค ไตรีน ในไมโทคอนเดรีย นั้นจากการวิจัยนี้ได้ข้อมูลต่าง ๆ ที่น่าสนใจคือ

1. แอนซิสไตร เทคโตรินออกฤทธิ์ได้เหมือนกับ classical uncouplers ได้หลายประการ เช่น

1.1 ผลต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย พบว่า แอนซิสไตร เทคโตรินสามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจ คือสามารถกระตุ้น state 4 respiration (รูปที่ 11, 12) และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมาก ๆ จึงจะมีผลทำให้มีการยับยั้งการหายใจ (รูปที่ 13), ทำให้มีการใช้ออกซิเจนใน state 3 เพิ่มขึ้นเกินกว่าปกติ (รูปที่ 16, 17 ตารางที่ 1, 2), ทำให้อัตราส่วน ADP/O ลดลง (รูปที่ 16, 17 ตารางที่ 1, 2), สามารถแก้ไขผลยับยั้งการเกิด state 3 เนื่องจากฤทธิ์ของ oligomycin และ atractyloside ได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 19), และฤทธิ์กระตุ้น state 4 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจาก control ทั้งเมื่อใช้ DTNB (SH reagent) DTT (sulfhydryl compound) ก่อนการกระตุ้นการหายใจ (รูปที่ 23, 24 ตารางที่ 7, 8)

1.2 ผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย พบว่า แอนซิสไตร เทคโตรินสามารถกระตุ้น ATPase activity และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมาก ๆ จึงจะมีผลทำให้มีการยับยั้งการกระตุ้น ATPase activity (รูปที่ 25) ฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย oligomycin และ atractyloside (ตารางที่ 10), และฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจาก control ทั้งเมื่อใช้ DTT และ DTNB ตามด้วย DTT ก่อนการกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 13)

2. แอนซิสไตร เทคโตรินกระตุ้นการออกซิโคซิสสเตรทได้ทั้งเมื่อใช้สับสเตรทชนิด NAD⁺-linked (รูปที่ 11) และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (รูปที่ 12) ฤทธิ์นี้ก็เหมือนกับ classical uncouplers โดยทั่วไป แต่จะต่างจาก nonclassical uncouplers อีกหลายชนิด เช่น ketamine (70), dipyridamole (71) และ disulfiram (72) ซึ่งพบว่า uncouplers ตัวอย่างเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการออกซิโคซิสสเตรทชนิด NAD⁺-linked แต่จะมีฤทธิ์อันค้ำปลิงเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

3. แอนซิสไตร เทคโตรินสามารถกระตุ้นการออกซิโคซิสสเตรทได้ทั้งกรณีที่มีและไม่มี Pi อยู่ใน incubation medium (รูปที่ 27) รวมทั้งกรณีที่ใช้ DTNB ยับยั้งการส่ง Pi ผ่านเข้าไปในไมโทคอนเดรียก่อนการกระตุ้นด้วยแอนซิสไตร เทคโตรินก็ไม่มีผลต่อการ

ออกฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตรินด้วยเช่นกัน (รูปที่ 23 ตารางที่ 7) กรณีนี้ก็เหมือนกับ classical uncouplers โดยทั่วไป แต่จะต่างจาก nonclassical uncouplers อีกหลายชนิด เช่น valinomycin (54), amine local anesthetics (59), cationic uncouplers (57,58), tetracycline antibiotics และ thyroxin (73) ซึ่งพบว่า uncouplers ตัวอย่างเหล่านี้ มีฤทธิ์อันคัปปลิงได้เฉพาะเมื่อมี P_i หรือ anions อื่นที่เหมาะสมอยู่ใน incubation medium ด้วยเท่านั้น

4. ฤทธิ์กระตุ้นการออกซิโคซิสเตรทของแอนติสไตรเทคโตรินไม่มีการเปลี่ยนแปลงจาก control ทั้งเมื่อใช้ DTNB และ DTT ก่อนการกระตุ้นการหายใจ แสดงว่า SH groups ในไมโตคอนเดรียไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน ในการกระตุ้นการออกซิโคซิสเตรท กรณีนี้ก็เหมือน DNP ที่ใช้ทดลองเป็นตัวเปรียบเทียบ (รูปที่ 23, 24 ตารางที่ 7, 8) แต่จะต่างจาก uncouplers บางชนิด เช่น sequiterpine juvenile hormones (74) ซึ่งพบว่าอาจจะทำให้เกิดอันคัปปลิงได้โดยไม่จับโดยตรงกับ SH groups ของโปรตีนที่ฝังขึ้นในของไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ยังพบว่า DTT และ DTNB ตามด้วย DTT ก็ไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อการออกฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ของแอนติสไตรเทคโตรินเช่นเดียวกัน กรณีนี้ก็ให้ผลทำนองเดียวกับฤทธิ์ของ DNP ที่ใช้ทดลองเป็นตัวเปรียบเทียบ (ตารางที่ 13)

ส่วนกรณีที่ใช้ DTNB ก่อนการกระตุ้น ATPase activity ด้วยแอนติสไตรเทคโตริน และ DNP ตามตารางที่ 13 นั้น ผลปรากฏว่า ได้ผลออกมาตรงกันข้ามคือ DTNB มีผลเพิ่มฤทธิ์ของแอนติสไตรเทคโตริน แต่มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ DNP กรณีที่แตกต่างกันเช่นนี้อาจเนื่องจากว่า โดยตัว DTNB เองแล้ว ก็มีฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity อยู่บ้างเช่นกัน (ตารางที่ 13) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของแอนติสไตรเทคโตรินและ DNP ที่ใช้ในการทดลองก็อยู่ในระดับที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของแอนติสไตรเทคโตรินอยู่ในระดับ I_{50} แต่ของ DNP อยู่ในระดับที่สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้สูงสุด (ไม่ใช่แอนติสไตรเทคโตรินมากกว่านี้เพื่อหลีกเลี่ยงการมีเอทานอลในการทดลองมากเกินไป) ดังนั้น ผลของ DTT และ DTNB ต่อฤทธิ์การกระตุ้น ATPase activity ของทั้งแอนติสไตรเทคโตรินและ DNP นี้ จึงยังไม่สามารถสรุปถึงบทบาทและความสำคัญของ SH groups ในการเกิดอันคัปปลิงได้อย่าง

แน่ชัด แต่ก็อาจเป็นเครื่องชี้แนะได้อย่างหนึ่งว่า กลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไม เลกุลของแอนซิสโตรินอาจมีข้อแตกต่างไปจากกรณีของ DNP

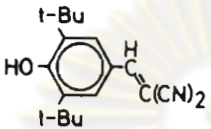
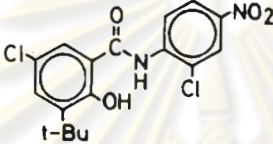
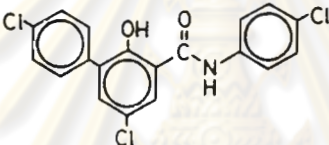
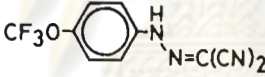
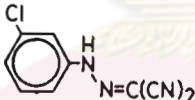
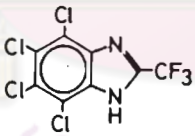
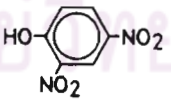
5. แอนซิสโตรินออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ final concentration อยู่ในระดับประมาณ 0.1-0.5 mM (รูปที่ 13) ซึ่งมีฤทธิ์ต่ำกว่าพวก classical uncouplers โดยทั่วไปค่อนข้างมาก โดยปกติแล้ว uncouplers ที่เป็นกรดอ่อนจะสามารถออกฤทธิ์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า $1 \mu\text{M}$ (46-49) ในกรณีเช่นนี้ แอนซิสโตรินออกฤทธิ์คล้ายกับพวก hydrophobic cations (57,58) ซึ่งพบว่าสามารถออกฤทธิ์อันคัปปลิงได้ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 0.1-1 mM

6. แอนซิสโตรินไม่สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 14,15) กรณีนี้จะต่างจาก classical uncouplers โดยทั่วไป ซึ่งปกติแล้วสามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจได้อย่างสมบูรณ์ (46-49) (รูปที่ 14,15) กรณีเช่นนี้ แอนซิสโตรินออกฤทธิ์คล้ายกับพวก terpinoid natural product ตัวหนึ่ง คือ sesquiterpene (74) และแม้จะไม่ได้กล่าวไว้ในรายงาน แต่ก็เชื่อว่า nonclassical uncouplers อีกหลายตัว รวมทั้งที่อยู่ในกลุ่ม hydrophobic amines (59) และ hydrophobic cations (57,58) ก็น่าจะมีคุณสมบัติที่คล้ายกันนี้

7. Terada (49) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมี และฤทธิ์อันคัปปลิงของ uncouplers ที่มีฤทธิ์แรง ๆ เท่าที่พบในปัจจุบัน พบว่า groups ที่มีความจำเป็นและมีส่วนทำให้ uncouplers มีฤทธิ์แรงได้แก่ 1) acid-dissociable groups เช่น phenolic-OH, anilino-NH และในบางกรณี -SH groups โดยที่ groups ต่าง ๆ เหล่านี้จะทำหน้าที่ release electrons มากกว่าที่จะทำหน้าที่เป็น H^+ donor 2) strong electron-withdrawing moiety เช่น $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CF}_3$ และ $-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$ และ 3) bulky hydrophobic groups เช่น tert-butyl-, $-\text{Cl}$, และ $-\text{CF}_3$ ตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์อันคัปปลิง ดังแสดงในตารางที่ 14

กรณีของแอนซิสโตรินที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงอยู่ในรูปที่ 1 นั้น จะเห็นได้ว่า groups ที่พอจะมีโอกาสเป็น acid-dissociable groups คือ phenolic-OH

ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งของตัวอย่าง uncouplers ที่มีฤทธิ์แรง ๆ เท่าที่พบในยี่จจุบัน (49)

| Uncoupler (mol. wt.) | Structure | Uncoupling activity | |
|-------------------------------|---|---------------------|--------|
| | | Respiration | ATPase |
| SF 6847 (282.39) |  | 10 nM | 3 nM |
| S-13 (383.23) |  | 20 nM | 7 nM |
| S-6 (392.67) |  | 150 nM | 100 nM |
| FCCP (254.17) |  | 70 nM | 15 nM |
| CCCP (204.62) |  | 110 nM | 35 nM |
| TTFB (323.92) |  | 30 nM | |
| 2,4-Dinitrophenol (184.11) |  | 24 μM | 8 μM |

ศูนย์เภสัชวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ naphthalene unit และอะตอมของไนโตรเจนใน isoquinoline unit แต่แอนซิสโตรเทคโตรินไม่มี strong electron-withdrawing moiety และ bulky hydrophobic groups ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้างทางเคมีของแอนซิสโตรเทคโตรินแล้ว จะพบว่าจะมีความสอดคล้องกันกับผลการวิจัยนี้ ที่พบว่า แอนซิสโตรเทคโตรินเป็น uncouplers ที่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อน และไม่สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจได้อย่างสมบูรณ์

8. จากการวิจัยนี้ พบว่าการเปลี่ยนแปลง pH (7.0-7.8) ใน incubation medium ไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโตริน ทั้งในการกระตุ้นการหายใจ (รูปที่ 20 ตารางที่ 3) และในการกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 11) ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งต่างจากกรณีของ DNP ที่ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบกัน โดยพบว่าฤทธิ์ของ DNP มีแนวโน้มลดน้อยลงเมื่อ pH สูงขึ้น ทั้งในการกระตุ้นการหายใจ (รูปที่ 20 ตารางที่ 3) และในการกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 11) ของไมโทคอนเดรีย ผลของ pH ต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ในการกระตุ้น ATPase activity ทำนองเดียวกับที่ได้จากการวิจัยนี้ก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (35,75)

ความแตกต่างระหว่างแอนซิสโตรเทคโตรินกับ DNP ในกรณีเช่นนี้ คาดว่าเกิดเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละตัวเป็นสำคัญ โดยที่อาจเป็นไปได้ว่า 1) เนื่องจากแอนซิสโตรเทคโตรินมี groups ที่มีโอกาสเป็น acid-dissociable group ตามความหมายของ Terada (49) ถึงสองแห่งคือ ที่ phenolic-OH และที่อะตอมของไนโตรเจนดังกล่าวแล้ว และเนื่องจาก phenolic-OH มีคุณสมบัติเป็นกรดในขณะที่อะตอมของไนโตรเจนมีคุณสมบัติเป็นด่าง ดังนั้น เมื่อ pH ของ incubation medium เปลี่ยนไปก็อาจมีการชดเชยหน้าที่กันในการเป็น acid-dissociable group จึงทำให้ผลการวิจัยออกมาเป็นไปทำนองที่ว่าฤทธิ์อันคับปลิงของแอนซิสโตรเทคโตรินเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อ pH ของ medium เปลี่ยนแปลง ต่างจากกรณีของ DNP ซึ่งมี phenolic-OH อย่างเดียวในการทำหน้าที่เป็น acid-dissociable group ดังนั้น เมื่อ pH ของ medium เปลี่ยนแปลง จึงทำให้ฤทธิ์อันคับปลิงเปลี่ยนแปลงไปมากกว่ากรณีของแอนซิสโตรเทคโตริน หรือ 2) เนื่องจากขาด strong electron withdrawing moiety และ bulky hydrophobic groups

จึงทำให้ phenolic-OH ของแอนซิสไตรเทคโตรินเป็น static group มากกว่าที่จะเป็น dynamic group ทำให้ขาดคุณสมบัติในการที่จะทำหน้าที่เป็น acid-dissociable group กรณีนี้ดูเหมือนจะสอดคล้องกับรายงานของ รศ.นิจศิริ เรื่องรังสีและคณะ (1) ที่รายงานว่า ไม่เกิด proton shift ที่ phenolic-OH ของแอนซิสไตรเทคโตรินเมื่อทำการ induce ด้วยค่าง ดังนั้น อะตอมของไนโตรเจนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นค่าง จึงอาจเป็น group ที่มีความสำคัญที่สุดต่อฤทธิ์อันค้ำปลิงของแอนซิสไตรเทคโตริน ต่างจาก acid-dissociable group ของ DNP คือ phenolic-OH ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด จึงทำให้ผลในการวิจัยนี้ออกมาในทำนองที่ว่า เมื่อ pH เปลี่ยนแปลงไป ฤทธิ์อันค้ำปลิงของแอนซิสไตรเทคโตรินกับ DNP มีแนวโน้มที่เป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม (รูปที่ 20,21 ตารางที่ 3,4,11)

9. จากรายงานของ รศ.นิจศิริ เรื่องรังสีและคณะ (1) พบว่า isoquinoline unit ของแอนซิสไตรเทคโตรินสามารถ derived ไปเป็นดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1 ดังนั้น ถ้าเป็นไปตามนี้จะทำให้คุณสมบัติทางเคมี โดยเฉพาะสูตรโครงสร้างทางเคมีของแอนซิสไตรเทคโตรินไปคล้ายกันกับ cationic uncouplers เช่น carbocyanide dyes (รูปที่ 32) (57) ในแง่ที่ว่า มีประจุบวกบนอะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ใน nucleus เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ฤทธิ์ในการกระตุ้นการออกซิโคซัลบสเตรทก็อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน ดังได้กล่าวมาแล้ว

10. จากการวิจัยนี้พบว่า 20% นน./ปริมาตร ของแอนซิสไตรเทคโตรินในเอทธานอลมีคุณสมบัติเป็นค่าง (รูปที่ 28,29) และมีผลรบกวนต่อการวัดปริมาณ H^+ โดยการใช้ pH electrode ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ protonophoric activity (รูปที่ 29) และการวัด ATPase activity ที่เกิดจากฤทธิ์ของแอนซิสไตรเทคโตรินโดย pH meter (รูปที่ 28) สรุปผลได้ไม่แน่นอน ผลรบกวนต่อการวัดปริมาณ cations โดยใช้ K^+ และ H^+ electrode ที่เกิดจาก uncouplers ในกลุ่ม organic cations ที่มีคุณสมบัติเป็นค่างอ่อนก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (76) กรณีนี้ต่างกับ DNP กล่าวคือ DNP เป็นกรดอ่อนและไม่มีการรบกวนการวัดปริมาณ H^+ ด้วย pH electrode (รูปที่ 28,29)

11. จากการวิจัยนี้ พบว่า Mg^{2+} อาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ของแอนซิสไตรเทคโตรินในการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย เพราะถ้าไม่เติม Mg^{2+} ลงไปใน medium (ขณะเดียวกันก็เพิ่ม K^+ ขึ้นชดเชย เพื่อให้ final concentration ของ medium เป็น

250 mOsm เท่าเดิม) ทำให้มีแนวโน้มว่าแอนซิสโทรเทคโตรินจะกระตุ้นการหายใจได้เร็วขึ้น (รูปที่ 22, 27 ตารางที่ 5, 6) และถ้าเติม Mg^{2+} ลงใน medium มากขึ้น (ไม่เติม K^+ เลย final concentration 250 mOsm เท่าเดิม) ปรากฏว่า แอนซิสโทรเทคโตรินกระตุ้นการหายใจได้ลดลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 27) ผลของ Mg^{2+} ในการลดฤทธิ์อันคัปปลิงทำนองเดียวกันนี้ก็เคยมีรายงานมาก่อน เช่นกรณีของ tetracycline antibiotics และ thyroxin (73) นอกจากนี้ ความสำคัญของความจำเป็นต่อมี Mg^{2+} ใน medium เนื่องจากมีผลต่อการควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (77)

อย่างไรก็ดี อัตราการหายใจที่เปลี่ยนแปลงไปดังกล่าวอาจไม่ใช่ผลของ Mg^{2+} เพียงอย่างเดียว แต่อาจเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณ K^+ ใน incubation medium ด้วยก็อาจเป็นได้ เพราะผลของ K^+ ต่อการเพิ่มหรือลดฤทธิ์อันคัปปลิงของทั้ง classical และ nonclassical uncouplers ก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (46-49, 66-68) และถ้าเปรียบเทียบผลของ Mg^{2+} หรือ K^+ ที่มีต่อฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจของ DNP จะพบว่า ในกรณีที่ไม่มี Mg^{2+} ลงไปใน medium (K^+ มากกว่าปกติ) ฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของ DNP มีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 22 ตารางที่ 6) ซึ่งเป็นแนวโน้มที่สวนทางกับกรณีของแอนซิสโทรเทคโตริน (รูปที่ 22 ตารางที่ 5) ความแตกต่างของแนวโน้มนี้อาจเป็นเครื่องชี้แนะอย่างหนึ่งว่า กลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไมโทคอนเดรียทั้งสองอาจแตกต่างกัน

นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ที่เกิดจากแอนซิสโทรเทคโตรินเปรียบเทียบกับ DNP ในสภาวะที่ไม่มี Mg^{2+} ใน medium ก็พบความแตกต่างจากสารทั้งสองเช่นกัน (ตารางที่ 12) คือในสภาวะที่ไม่มี Mg^{2+} ใน medium แอนซิสโทรเทคโตรินสามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ใกล้เคียงกับ control (มี Mg^{2+} ใน medium) ส่วน DNP จะกระตุ้น ATPase activity ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control ผลของการไม่มี Mg^{2+} ใน medium ต่อฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ของ DNP ทำนองเดียวกันกับการวิจัยนี้ก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (35, 75) ความแตกต่างของผลการทดลองในกรณีนี้ ก็อาจเป็นเครื่องชี้แนะอีกอย่างหนึ่งว่า แอนซิสโทรเทคโตรินอาจมีกลไกการเกิดอันคัปปลิงในระดับไมโทคอนเดรียที่แตกต่างไปจากกรณีของ DNP

12. จากการวิจัยนี้ พบว่า 20 % นน./ปริมาตรของแอนซิสไตรเทคโคโรนินในเอทธานอล มีผลรบกวนต่อการวัดปริมาณแคลเซียมโดยการใช้ calcium-selective electrode ด้วยเช่นกัน (รูปที่ 30/1-3) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาจะสรุปได้ว่าแอนซิสไตรเทคโคโรนินในขนาดที่สามารถทำให้เกิดฤทธิ์อันคัปปลิงจะไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียม โดยไมโคคอนเดรีย (รูปที่ 30/1-3) ผลทำนองเดียวกับการวิจัยนี้ของ nonclassical uncouplers (เช่น 100 μ M picrate) ก็เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน (66) กรณีนี้ แอนซิสไตรเทคโคโรนินต่างจาก DNP คือ DNP มีผลทำให้ไมโคคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซียมที่ไมโคคอนเดรียสะสมไว้ออกมาอย่างรวดเร็ว (รูป 30/1-3) ฤทธิ์ปลดปล่อยแคลเซียมจากไมโคคอนเดรียที่เกิดจาก classical uncouplers นี้เป็นที่ยอมรับและรู้จักกันดีมานาน (66) ผลแตกต่างในกรณีนี้ก็เช่นกัน อาจเป็นเครื่องชี้แนะอีกอย่างหนึ่งว่า กลไกการเกิดอันคัปปลิงของแอนซิสไตรเทคโคโรนินอาจมีข้อแตกต่างจากกรณีของ classical uncouplers

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า แอนซิสไตรเทคโคโรนินมีคุณสมบัติทั้งที่เหมือนกับ classical uncouplers และ nonclassical uncouplers คุณสมบัติทางเคมีและผลการทดลองหลายประการของแอนซิสไตรเทคโคโรนินมีแนวโน้มหลายประการที่คล้ายกันกับ uncouplers ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic organic cations เช่น มีอะตอมของไนโตรเจนที่มีประจุบวกอยู่ใน nucleus ของสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกันและละลายในน้ำได้ยากเหมือนกัน ความเข้มข้นในช่วงที่ทำให้เกิดฤทธิ์อันคัปปลิงใกล้เคียงกัน และเป็น uncouplers ที่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อนเหมือนกัน นอกจากนี้ การที่มีผลรบกวนการทำงานของ cation electrode ชนิดต่าง ๆ ของแอนซิสไตรเทคโคโรนิน อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรบกวน membrane potential ของไมโคคอนเดรีย ซึ่งเป็นสาเหตุหรือกลไกการเกิดอันคัปปลิงตามแนวความคิดเกี่ยวกับ membrane potential dissipation mechanism ซึ่งถูกเสนอขึ้นเพื่ออธิบายกลไกการเกิดอันคัปปลิงของ hydrophobic cation uncouplers (57-58) อย่างไรก็ตาม แนวความคิดเกี่ยวกับ lipophilic ion pairs mechanism ที่ถูกเสนอขึ้นเพื่อใช้อธิบายกลไกการเกิดอันคัปปลิงของ amine local anesthetics (59) ก็ไม่สามารถมองข้ามไปได้เช่นกัน แนวความคิดในการพยายามเปรียบเทียบเพื่อหากลไกการเกิดอันคัปปลิงของแอนซิสไตรเทคโคโรนินเท่าที่กล่าวมา เป็นการคาดหมาย

ไปตามข้อมูลที่มีอยู่อย่างจำกัด ฉะนั้น จึงยังไม่สามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของแอนซิสโตรเทคโครีนอย่างแน่ชัดได้ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษากันต่อไป ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษากลไกการเกิดอันคัปปลิงของ uncouplers ชนิดต่าง ๆ นั้น นอกจากจะทำให้เราได้ทราบกลไกการเกิดอันคัปปลิงเองแล้ว ยังช่วยทำให้เราได้เข้าใจถึงกลไกการเกิดการควบคู่ (coupling) ในกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันได้แน่ชัดขึ้นด้วย (57-69)

ข. ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์อันคัปปลิงกับผลการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของแอนซิสโตรเทคโครีน เท่าที่มีการศึกษากันในปัจจุบัน

ผลการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของแอนซิสโตรเทคโครีน ในปัจจุบันนี้ สามารถลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั้งที่อยู่ในสัตว์ทดลอง (in vivo) และที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง (isolated organ) ได้หลายชนิด การลดการหดเกร็งนี้ เป็นแบบ non-competitive และไม่เกี่ยวข้องกับ receptors ของยาหลายชนิด (บทที่ 1) ดังนั้น สิ่งที่จะอภิปรายต่อไป คือฤทธิ์อันคัปปลิงของแอนซิสโตรเทคโครีนมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบหรือไม่ อย่างไร

เนื่องจากแคลเซียมและ ATP เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับใช้ในกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อทุกชนิด และไมโทคอนเดรียก็เป็นส่วนหนึ่งของแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ นอกเหนือจาก sarcoplasmic reticulum และ sarcolemma นอกจากนี้ ไมโทคอนเดรียยังมีหน้าที่โดยตรงในการสร้าง ATP เพื่อใช้เป็นพลังงานสำหรับการหดตัวของกล้ามเนื้ออีกด้วย (บทที่ 1) ดังนั้น ปัญหาที่ต้องการคำตอบต่อไปคือ ฤทธิ์อันคัปปลิงของแอนซิสโตรเทคโครีน มีผลต่อการสะสมและการปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรียอย่างไร และมีผลต่อการสร้าง ATP ในไมโทคอนเดรียอย่างไร

ผลจากการวิจัยโดยทั่วไปจะพบว่า ฤทธิ์อันคัปปลิงของ uncouplers จะทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมที่ไมโทคอนเดรียสะสมไว้ออกมา (66) จึงมีผลทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งอาจจะมีผลต่อการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ (78) ส่วนกรณีของแอนซิสโตรเทคโครีน เราพบว่าในขนาดที่ทำให้เกิดฤทธิ์อันคัปปลิงได้จะมีผลน้อยมากต่อการปลดปล่อยแคลเซียมที่ไมโทคอนเดรียสะสมไว้ออกมา (รูปที่ 30/1-3) ดังนั้น โดยสรุปแล้ว จะเห็นว่าฤทธิ์อันคัปปลิงของ uncouplers รวมทั้งของแอนซิสโตรเทคโครีน คงจะมีผลต่อ

ไมโคคอนเดรียในการควบคุมปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ในกรณีนี้น้อยมาก ซึ่งหมายถึงว่าฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของแอนคิซินโดรเทคโคโรนมีความสัมพันธ์ทางด้านนี้น้อยมากต่อการออกฤทธิ์ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

และการทดลองในบทที่ 3 พบว่า แอนคิซินโดรเทคโคโรนจะทำให้มีการเพิ่มอัตราการออกซิโคซิสสเตรท แต่การสร้าง ATP จะลดลง (กระตุ้น state 4, ADP/O ลดลง) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้อัตราการสลายตัวของ ATP มากขึ้นด้วย (กระตุ้น ATPase activity) ทั้งหมดนี้น่าจะมีผลทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง activity ต่าง ๆ ของเซลล์ รวมทั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อก็ควรลดลงตามไปด้วย ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของแอนคิซินโดรเทคโคโรนจึงสอดคล้องกับฤทธิ์ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่เกิดจากแอนคิซินโดรเทคโคโรน โดยเฉพาะกรณีที่ไม่สามารถใช้แคลเซียมแก้ไขฤทธิ์ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนนำเชื้อสุจิหลังจากใช้แอนคิซินโดรเทคโคโรนในขนาดสูง ๆ (บทที่ 1) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า เป็นเพราะขาด ATP สำหรับใช้เป็นพลังงานในการหดตัวและการทำงานอื่น ๆ ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ อย่างไรก็ตาม การที่จะพิสูจน์อย่างแน่ชัดว่า ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของแอนคิซินโดรเทคโคโรนมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ลดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบของสารนี้ จำเป็นจะต้องทำการวิจัยต่อไปอีกมาก

ค. โอกาสที่จะนำเอาฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของแอนคิซินโดรเทคโคโรนไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

ในปัจจุบันจะพบว่า มีรายงานเกี่ยวกับยาต่าง ๆ ที่เราใช้รักษาโรคกันอยู่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันอยู่ด้วย เป็นจำนวนมาก ทำให้มีแนวความคิดว่าฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยานี้อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยากี่เป็นได้ (43,73) แต่จากการวิจัยต่าง ๆ เพื่อที่จะหาข้อมูลสำหรับอธิบายข้อเท็จจริงนี้ มักจะสรุปผลถึงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาและผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาได้ไม่แน่ชัด ในปัจจุบันจึงยังไม่พบว่า มียาที่เราใช้รักษาโรคกันอยู่ตัวใดที่มีผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาอย่างแน่ชัด อย่างไรก็ตาม ก็มีกรณีที่ได้รับการสนใจกันมากเป็นพิเศษ คือประเด็นเกี่ยวกับการเกิดพิษของยาเนื่องจากฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา (25,43,73) ดังนั้น ปัญหาที่น่าสนใจในที่นี้ ก็คือ ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของแอนคิซินโดรเทคโคโรน อาจจะก่อให้เกิดพิษขึ้นได้หรือไม่ ถ้าพิจารณาจากผลการวิจัยนี้ ซึ่งเป็นผลการทดลองแบบ

in vitro จะพบว่า แอนซิสไตรเทคโตรินอาจจะก่อให้เกิดพิษหรือฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ขึ้นได้ไม่มากนักน้อย เพราะมีผลรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็น organelle ที่มีหน้าที่สำคัญหลายประการภายในเซลล์ แต่ทั้งนี้มิได้หมายความว่าผลใน in vivo จะต้องเป็นไปตามนี้

กรณีอื่น ๆ ที่น่าสนใจเกี่ยวกับฤทธิ์อันค้ำปดของแอนซิสไตรเทคโตริน คือมีการวิจัยเร็ว ๆ นี้พบว่า ฤทธิ์อันค้ำปดของ uncouplers อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง prostaglandin ของยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่ steroid เช่น indomethacin และ phenylbutazone (79) จึงอาจเป็นไปได้เช่นกันว่า ฤทธิ์อันค้ำปดของแอนซิสไตรเทคโตรินก็อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ที่แพทย์แผนโบราณของไทยทางภาคตะวันออกเฉียงและปราจีนบุรีใช้ประโยชน์จากน้ำที่ได้จากการต้ม Ancistrocladus tectorius มาอาบรักษาอาการบวมตามตัว และเป็น เม็ดฝนคันตามผิวหนัง (2,3)

นอกจากนี้ ในปัจจุบันยังมีการพยายามวิจัยเพื่อที่จะนำเอาฤทธิ์อันค้ำปดของ DNP ไปใช้ประโยชน์ เป็นยาสำหรับเพิ่มความอบอุ่นให้กับร่างกาย (thermogenic drug) ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากในกรณีที่จะต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เย็นจัด (80) แต่ก็เป็นที่ทราบกันดีว่า DNP ซึ่งเคยถูกใช้เป็นยาลดความอ้วนมากระยะหนึ่งนั้น มีฤทธิ์ข้างเคียงค่อนข้างมากจนต้องเลิกใช้เป็นยามาแล้ว (48) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ถ้าใช้ฤทธิ์อันค้ำปดของแอนซิสไตรเทคโตรินในกรณีเช่นว่านี้ อาจทำให้ได้ผลในการรักษาคล้าย DNP แต่ฤทธิ์ข้างเคียงต่าง ๆ น้อยกว่า DNP เพราะตามรายงาน (2,3) พบว่า ในประเทศเรามีผู้ที่นำเอาใบอ่อนของ Ancistrocladus tectorius นี้มารับประทานเป็นผักได้

กล่าวโดยสรุปแล้ว จากการวิจัยนี้พบว่า แอนซิสไตรเทคโตรินมีฤทธิ์เป็น uncouplers ของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันที่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อน และมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียเหมือนกันกับ classical uncouplers เป็นส่วนใหญ่ แต่ขณะเดียวกันก็มีคุณสมบัติและผลของปฏิกิริยาหลายประการที่คล้ายกับ nonclassical uncouplers โดยเฉพาะในกลุ่ม cationic uncouplers และ hydrophobic amines กลไกการเกิดอันค้ำปดจึงยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด ฤทธิ์อันค้ำปดของแอนซิสไตรเทคโตรินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับผลที่ได้จากการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเท่าที่มีการศึกษากัน ในปัจจุบันบางประการ และ

ยังอาจมีส่วนทำให้เกิดพิษขึ้นได้เช่นกัน นอกจากนี้ เนื่องจาก uncouplers เป็น typical compounds ที่ออกฤทธิ์อยู่บน biological membranes (24, 49) จึงเป็นไปได้ว่า แอนติสไตรเทคโครีนอาจมีตำแหน่งที่จะไปออกฤทธิ์อยู่ที่บน biological membranes ต่าง ๆ นอกเหนือจาก mitochondrial membranes เช่นอาจจะออกฤทธิ์อยู่ที่ plasma membranes หรือ sarcoplasmic reticulum membranes ได้อีกด้วย เป็นต้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Ruangrungsi, N., V. Wongpanich, P. Tantivatana, H.J. Cowe, P.J. Cox, S. Funayama, and G.A. Cordell. "Traditional Medicinal Plants of Thailand, V. Ancistrocladus tectorius, A New Naphthalene-Isoquinoline Alkaloid From Ancistrocladus tectorius," J. Nat. Prod., 48(4), 529-535, 1985.
2. บุษบรรณ ๗ สงขลา. สมุนไพรไทย ตอนที่ 1, หน้า 74-75, ท่างหุ้นส่วนจำกัดพันนิพัมบิษซึ่ง, กรุงเทพมหานคร, 1976.
3. เต็ม สมิตินันท์. พรรณไม้ของวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่, หน้า 55, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 2526.
4. Willis, J.C. A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns, 8th ed., pp. 59, Cambridge University Press, Cambridge, 1966.
5. Burkill., I.H. A Dictionary of the Economic Product's of the Malay Peninsula, vol. I., pp. 155, University Press, Oxford, 1935.
6. The Wealth of India. A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products, Vol I, pp. 77, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1948.
7. สุวรรณ ภาสภัทร. "ฤทธิ์ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบของสารแอนนิสโตรเทคโคโรน," วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526.
8. Ketkosol, C. "Effect of Ancistrocladus tectorius on the isolated Rat Vas Deferens." Master's thesis, Department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, 1986.

9. ขวัญตา ไสสถานกุล. "ฤทธิ์ของแอนติฮิสตามีนและทรานส์มิเตอร์ในระบบหัวใจและหลอดเลือดในหนูขาวและกระต่าย," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหศาสวีรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2529.
10. Bolton, T.B. "Mechanisms of Action of Transmitters and other Substances on Smooth Muscle," Physiol. Rev., 59, 607-718, 1979.
11. Kenakin, T.P. "The Classification of Drugs and Drug Receptors in Isolated Tissues," Phar. Rev., 36(3), 165-222, 1984.
12. Somlyo, A.P. "Excitation-Contraction Coupling and the Ultrastructure of Smooth Muscle," Cir. Res., 57(4), 497-507, 1985
13. Simonis, A.M. E.J. Arien and J.J.W. Van Den Broeke, "Non-competitive spasmolytics as antagonists of Ca^{2+} -induced smooth muscle contraction," J. Pharm. Pharmac., 23, 107-110, 1971.
14. Malagodi, M.H. and C.Y. Chiou. "Pharmacological evaluation of A new Calcium Antagonist 8-(N, N-diethylamino) -octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8): Studies in smooth muscle; Eur.J.Pharm., 24, 25-33, 1974.
15. Adelstein, R.S. and E.Eisenberg, "Regulation and Kinetics of the Actin-Myosin-ATP Interaction," Ann.Rev. Biochem., 49, 921-56, 1980.
16. Lehninger, A.L. Biochemistry, pp. 509-542, Worth Publishers, New York, 2nd ed., 1975.
17. Strand, F.L. Physiology, A Regulatory System Approach, pp. 62-73, Macmillan Publishing Co., New York, 1978.
18. Flickinger, C.J., J.C. Brown, H.C.Kutchai, J.W. Ogilvie, and M.J.Peach. Medical Cell Biology, pp. 286-322, W.B. Saundery Company, Philadelphia, 1979.

19. Danishefsky, I. Biochemistry for Medical Sciences, pp. 111-161, Little Brown and Company, Boston, 1st ed., 1980.
20. Montgomery, R., R.L.Dryer, T.W. Conway, and A.A. Spector, Biochemistry, A Case-Oriented Approach, pp. 188-231, The C.V.Mosby Company, ST.Louis, 3rd ed., 1980.
21. Orten, J.M., and O.W. Neuhaus. Human Biochemistry, pp. 126-146, The C.V. Mosby Company, ST.Louis, 10th ed., 1982.
22. Lehninger, A.L. "Mitochondria and Calcium Ion Transport," Biochem. J., 119, 129-138, 1970.
23. Borle, A.B. "Calcium metabolism at the cellular level," Fed. Proc., 32(9), 1944-1950, 1973.
24. Sordahl, L.A. C. Johnson, Z.R.Blailock, and A. Schwartz, Methods in Pharmacology (Schwartz, A. ed.), pp. 247-286, Meredith Corporation, New York, 1971.
25. Fowler, B.A. G.W.Lucier, and A. Wallace Hayes. Principles and Methods of Toxicology (Wallace Hays, A. ed.), pp. 635-658, Raven Press, New York, 1982.
26. Boyer, P.D. B.Chance, L.Ernster, P. Mitchell, E. Racker, and E.C.Slater. "Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation," Ann. Rev. Biochem., 46, 955-1026, 1977.
27. Mitchell, P. "Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by Proticity," Biochem. Soc. Trans., 4, 399-430, 1976.
28. Erecińska, M., and D.F. Wilson. Inhibitors of Mitochondrial Functions, pp. 1-334, Pergamon Press, Oxford, 1st ed., 1981.
29. Senior, A.E. "The Structure of Mitochondrial ATPase," Biochim. Biophys. Acta, 301, 249-277, 1973.

30. Chappell, J.B., and A.R. Crofts. "The Effect of Atractylate and Oligomycin on the Behaviour of Mitochondria towards Adenine Nucleotides," Biochem.J., 95, 707-716, 1965,
31. Haugaard, N., N.H. Lee, R. Kostrzewa, R.S. Horn, and E.S. Haugaard. "The Role of Sulfhydryl groups in Oxidative Phosphorylation and Ion Transport by Rat Liver Mitochondria," Biochim. Biophys. Acta, 172, 198-204, 1969.
32. Cleland, W.W. "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups," Biochemistry, 3(4), 480-482, 1964.
33. Haugaard, N. N.H.Lee, R. Kostrzewa and E.S. Haugaard, "Effects of a Disulfide (Ellman's Reagent) and Thiols on oxidative phosphorylation and Ion Transport by Rat Liver Mitochondria," Biochem. Pharmacol., 18, 2385-2391, 1969.
34. Hogeboom, E.H. Methods in Enzymology, Vol. I, pp. 16-19, Academic Press, New York, 1955.
35. Myer, D.K. and Slater, E.C. "The Enzymes hydrolysis of Adenine Triphosphate by Liver Mitochondria. I. Activities at different pH Value," Biochem.J., 67, 558-572, 1957.
36. Chance, B., and G.R. Williams. "The Respiratory chain and Oxidative phosphorylation" Advances Enzym., 17, 65-134, 1956.
37. Estabrook, R.W. Method in Enzymology, Vol. X, pp. 41, Academic Press, New York, 1967.
38. Bertina, R.M., and E.C. Slater. "The Effects of Phosphate and Electron Transport on the Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazide-Induced ATPase of Rat Liver Mitochondria," Biochim. Biophys. Acta, 376, 492-504, 1975.

39. Weinbach, E.C. "Pentachlorophenol and Mitochondrial Adenosinetriphosphatase," J.Biol.Chem., 221, 609, 1956.
40. Fiske, O.H. and Subbarow, Y. "The Colorimetric Determination of Phosphorus," J.Biol. Chem., 66, 375-400, 1925.
41. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein Measurement with Folin Phenol Reagent," J.Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
42. Miller, G.L. "Protein Determination for Large Numbers of Samples," Anal. Chem., 31, 964, 1959
43. Weinbach, E.C. J.L. Costa, B.D.Nelson, C.E. Claggett, T.Hundal, D.Bradley, and S.J. Morris. "Effects of Tricyclic Antidepressant Drugs on Energy-Linked Reactions in Mitochondria," Biochem.Pharmacol., 35(9), 1445-1451, 1986.
44. Toninello, A., and N.Siliprandi. "Restoration of Membrane Potential in Mitochondria Deenergized with Carbonyl Cyanide p-Trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP)," Biochim. Biophys.Acta, 682, 289-292, 1982.
45. Caroni, P., K.Schwerzmann and E. Carafoli. "Separate Pathways, for Ca^{2+} Uptake and Release in Liver Mitochondria," FEBS Lett., 96, 339-342, 1978.
46. Hanstein, W.G. "Uncoupling of Oxidative Phosphorylation," Biochim. Biophys. Acta, 456, 129-148, 1976.

47. Heytler, P.G. Methods in Enzymology (Fleischer, S., and L.Parker, eds.), Vol. LV, pp. 463-472, Academic Press, New York, 1979.
48. Heytler, P.G. Inhibitors of Mitochondrial Functions (Erecinska, M. and D.F. Wilson, eds.), pp. 199-210, Pergaman Press, Oxford, 1st ed., 1981.
49. Terada, H. "The Interaction of Highly Active Uncouplers with Mitochondria," Biochim. Biophys. Acta, 639, 225-242, 1981.
50. Terada, H., K. Shirakawa, F.Kametani and K. Yoshikawa. "Acceleration of Proton Exchange Between Octanol and Water by 2,4-Dinitrophenol Determined by H-NMR Spectrometry," Biochim. Biophys. Acta, 725, 254-260, 1983.
51. O'shaughnessy, K., and S.B. Hladky. "Transient Currents Carried by The Uncouplers, Carbonyl Cyanide m-chlorophenylhydrazone," Biochim.Biophys.Acta, 724, 381-387, 1983.
52. Benz, R., and S. McLaughlin. "The Molecular Mechanism of Action of The Proton Ionophore FCCP (Carbonyl Cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)," Biophys.J., 41, 381-398, 1983.
53. Balaz, S., E. Sturdik, E.Durcova, M.Antalik and P. Sulo. "Quantitative Structure-Activity Relationship of Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones as Uncouplers of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation," Biochim.Biophys.Acta, 851, 93-98, 1986.
54. Moore, C., and B.C. Pressman. "Mechanism of Action of Valinomycin on Mitochondria," Biochim.Biophys.Res.Commun., 15(6), 562-567, 1964.

55. Ariel, N., and Y. Avi-dor. "Chloride-Dependent Uncoupling Mediated by Oligomycin in Rat Liver Mitochondria," Biochem.J., 136, 911-917, 1973.
56. Hass, D.W. "Phosphorylation Coupled to The Oxidation of NADH by Fumarate in Digitonin Fragments of Beef-Heart Mitochondria," Biochim. Biophys. Acta, 92, 433-439, 1964.
57. Terada, H., H.Nagamune, Y.Osaki and K. Yoshikawa. "Specific Requirement for Inorganic Phosphate for Induction of Bilayer Membrane Conductance by The Cationic Uncoupler carbocyanide Dye," Biochim.Biophys. Acta, 646, 488-490, 1981.
58. Terada, H., and H. Nakamune. "A Cyanide Dye Tri-S-C₇(5) Phosphate Dependent Cationic Uncoupler of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria," Biochim.Biophys. Acta, 17, 7-15, 1983.
59. Garlid, K.D. and R.A. Nakashima. "Studies on the Mechanism of Uncoupling by Amine Local Anesthetics," J.Biol. Chem. 258(13), 7974-7980, 1983.
60. Weinbach, E.C. and J. Garbus. "Mechanism of Action of Reagents that uncouple Oxidative Phosphorylation," Nature, 221, 1016-1018, 1969.
61. Katre, N.V. and D.F. Wilson. "Interaction of Uncouplers with the Mitochondrial Membrane: Identification of the High Affinity Binding Site," Arch. Biochem. Biophys., 191(2), 647-656, 1978.
62. Katre, N.V., and D.F. Wilson. "A Specific Uncoupler-Binding Protein in Tetrahymena pyriformis and Paracoccus denitrificans," Biochim.Biophysic. Acta, 593, 224-229, 1980.

63. Moroney, J.V., C.S. Andreo, R.H. Vallejos, and R.E. McCarty.
"Uncoupling and Energy Transfer Inhibition of Photophosphorylation by Sulfhydryl Reagents," J.Biol.Chem., 255(14), 6670-6674, 1980.
64. Drobnica, L and E. Sturdik. "The Reaction of Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones with Thiols," Biochim.Biophys. Acta, 585, 462-476, 1979.
65. Yagi, T., and Y. Hatefi. "Thiols in Oxidative Phosphorylation: Inhibition and Energy-Potentiated Uncoupling by Monothiol and Dithiol Modifiers," Biochemistry, 23, 2449-2455, 1984.
66. Kessler, R.J., C.A. Tyson, and D.E. Green. "Mechanism of Uncoupling in Mitochondria: Uncouplers as Ionophores for Cycling Cations and Protons," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73(9), 3141-3145, 1976.
67. Kessler, R.J., H.V. Zande, C.A. Tyson, G.A. Blondin, J.Fairfield, P. Glasser and D.E. Green. "Uncouplers and the Molecular Mechanism of Uncoupling in Mitochondria," Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 74(6), 2241-2245, 1977.
68. Green, D.E. and H.V. Zande. "Mechanism of Uncoupling by Uncouplers of Oxidative Phosphorylation," Biochem. Biophys. Res.Commun., 100(3), 1017-1024, 1981.
69. Rottenberg, H. "Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria by General Anesthetics," Proc.Natl.Acad. USA, 80, 3313-3317, 1983.
70. Markham, A., I. Cameron and S.J.White. "The Effect of Ketamine Hydrochloride, A Non-Barbiturate Parenteral Anesthetic on Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria," Biochem. Pharmacol., 30(15), 2165-2168, 1981.

71. Sordahl, L.A., and A. Schwartz. "Effects of Dipyrindamole on Heart Muscle Mitochondria," Molec.Pharmacol., 3, 509-515, 1967.
72. Hassinen, I., and M.Hallman. "Comparison of The Effects of Disulfiram and Dimercaptopropanol Arsenite on Mitochondrial Structure and Function," Biochem.Pharmacol., 16, 2155-2161, 1967.
73. Brody, M.T. "The Uncoupling of Oxidative Phosphorylation as A Mechanism of Drug Action," Pharmac. Rev., 7, 335-363, 1955.
74. Chefurka, W. "Sesquiterpene Juvenile Hormones: Novel Uncouplers of Oxidative Phosphorylation," Biochem.Biophys.Res.Comm., 83(2), 571-578, 1978.
75. Pullman, M.E., H.S. Penefsky, A.Datla, and E.Racker. "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation I. Purification and Properties of Soluble, Dinitrophenol-Stimulated Adenosine Triphosphatase," J.Biol.Chem., 235(11), 3322-3329, 1960.
76. Massari, S. and T. Pozzan. "The Interaction of Organic Cations with the Mitochondrial Membrane," Experimentia, 32(7), 868-869, 1976.
77. Baltscheffsky, H. "Mitochondrial Respiratory Control and Phosphorylative Activities in A Magnesium-Free Medium," Biochim. Biophys.Acta, 25, 382-388, 1957.
78. Haugaard, N., E.S. Haugaard, N.H.Lee and R.S. Horn. "Possible Role of Mitochondria in Regulation of Cardiac Contractility," Federation Proceedings, 28(5), 1657-1662, 1969.

79. Inagi, T., and H. Terada. "Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs on The Proton Exchange Reaction Between Octanol and Water: Its Correlation with their Inhibitions of Inflammation and Prostaglandin Synthesis," Biochem. Biophys. Res. Commun., 113(3), 745-750, 1983.
80. Bachynsky, N. "A Testing Program Using the Thermogenic Drug 2,4-Dinitrophenol to Save Lives in Freezing Environments," The Journal of Environmental Sciences, May/June, 50-56, 1987.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายวิบูลย์ วัฒนาริ เกิดเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2497 ที่ ต.โพนางคำ อ.สรรพยา จ.ชัยนาท สำเร็จการศึกษาปริญญา เกษตรศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2520 เข้ารับราชการในตำแหน่งเภสัชกร ระดับ 3 โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชหล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ ขณะที่ได้รับอนุมัติให้ลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2528 กำลังรับราชการในตำแหน่งเภสัชกร ระดับ 5 โรงพยาบาลธัญญารักษ์ รังสิต จ.ปทุมธานี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย