



ผลของ เบซาโพเบรทต่อต้านที่ทางชีวพลังงานของโอมโคคอนเดรียที่แยก  
จากคัพหนูขาว

นางปริยารมย์ ศรีสุภกมล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-583-982-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF BEZAFIBRATE ON THE BIOENERGETIC  
FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

Mrs. Preeyarom Tresukosol

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

1994

ISBN 974-583-982-5

Thesis Title    EFFECTS OF BEZAFIBRATE ON THE BIOENERGETIC  
                      FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA  
By                  Mrs. Preeyarom Tresukosol  
Department       Pharmacology  
Thesis Advisor   Associate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Master's Degree/

*Thavorn Vajrabhaya*

.....Dean of Graduate School  
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....*Pornpen Pramyothin*.....Chairman

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

.....*Prakorn Chudapongse*.....Thesis Advisor

(Associate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.)

.....*Usana Hongvareewat*.....Member

(Associate Professor Usana Hongvareewat)

.....*Withaya Janthasoot*.....Member

(Assistant Professor Withaya Janthasoot)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

ปริยารมย์ ดรีสุโกศล : ผลของเบซาไฟเบรตต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (EFFECTS OF BEZAFIBRATE ON THE BIOENERGETIC FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกร จุฑะพงษ์, 124 หน้า. ISBN 974-583-982-5

การศึกษาผลของเบซาไฟเบรตต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานที่สำคัญของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่าเบซาไฟเบรตมีผลทำให้อัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u ของไมโทคอนเดรียลดลงเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท โดยเบซาไฟเบรตอาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่หายใจที่ complex I เป็นผลให้กระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชันและความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรียลดลง เบซาไฟเบรตออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชันได้มากขึ้นเมื่อ pH ของ incubation medium เป็นกรด ในขณะที่ bovine serum albumin สามารถทำให้ฤทธิ์ของเบซาไฟเบรตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ dithiothreitol และ  $Mg^{2+}$  ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยเบซาไฟเบรต เบซาไฟเบรตมีผลยับยั้ง ATPase activity ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร uncoupler เช่น 2,4-dinitrophenol ได้เล็กน้อย การศึกษาโดยใช้ calcium-selective electrode พบว่าเบซาไฟเบรตสามารถยับยั้งการสะสมแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรียได้เล็กน้อย แต่มีฤทธิ์เด่นชัดในการกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมที่ถูกสะสมไว้ในไมโทคอนเดรีย เบซาไฟเบรตไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ผลของเบซาไฟเบรตต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโทคอนเดรียดังกล่าวเกี่ยวข้องกับหรือไม่กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของยาตัวนี้ จะต้องทำการศึกษาต่อไป

ภาควิชา ..... เกษษวิทยา  
สาขาวิชา ..... เกษษวิทยา  
ปีการศึกษา ..... 2536

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C575488: MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: RAT LIVER MITOCHONDRIA/BEZAFIBRATE/MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS

PREEYAROM TRESUKOSOL : EFFECTS OF BEZAFIBRATE ON THE BIOENERGETIC  
FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR ;  
ASSO. PROF. PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D. 124 pp. ISBN 974-583-982-5

The present study investigates the effects of bezafibrate on the main bioenergetic functions of isolated rat liver mitochondria. Bezafibrate decreased rates of states 3 and 3u respiration with glutamate plus malate as substrates probably by inhibiting complex I of the respiratory chain leading to diminished oxidative phosphorylation and ATP synthesis. The inhibitory effect of bezafibrate increased when the incubation medium pH was acidic while bovine serum albumin attenuated the action of the drug. Dithiothreitol and  $Mg^{2+}$  did not significantly influence bezafibrate action. Bezafibrate slightly inhibited the uncoupler-induced ATPase activity. The investigation using calcium-selective electrode showed that bezafibrate had small inhibitory effect on mitochondrial calcium uptake but clearly exhibited the calcium-releasing effect. Mitochondrial monoamine oxidase activity was unaffected by bezafibrate. It remains to be determined whether these mitochondrial effects of bezafibrate contribute to the pharmacological and/or toxicological actions of this hypolipidemic drug.

ภาควิชา..... เกสัชวิทยา.....

สาขาวิชา..... เกสัชวิทยา.....

ปีการศึกษา..... 2536.....

ลายมือชื่อนิสิต..... ปรีชญ์ ทเรสุกอส.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... พร. ชูดปองเส.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

### Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to Asso.Prof.Prakorn Chudapongse, Ph.D., my thesis advisor, for guidance and encouragement throughout this study. Special thanks are expressed to Asso.Prof.Pornpen Pramyothin, Ph.D., Head of the Department of Pharmacology, Asso. Prof. Usana Hongvareewat, the former Head, and all instructors in the Department of Pharmacology for their valuable instruction, suggestion and guidance. I also thank Chulalongkorn University Graduate School for financial support to this study. Miss Ornanong Tungvichitrerk, Head of the Pharmacy Department, Veterans General Hospital, and all my colleagues are also appreciated.

Finally, I would like to thank my parents and my husband for their support, encouragement and understanding.

PREEYAROM TRESUKOSOL

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	
Pharmacological and Toxicological Actions of Bezafibrate.....	1
The Mitochondrial Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System.....	12
II. MATERIALS AND METHODS	
Animals.....	29
Preparation of Intact Rat Liver Mitochondria.	29
Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption Rates.....	32
The Study of Mitochondrial Monoamine Oxidase Activity.....	38
Measurement of Mitochondrial ATPase Activity.	39
The Study of Mitochondrial Calcium Transport.	41
Determination of Mitochondrial Protein.....	43
Reagents and Drugs.....	44
Statistics.....	46

## CONTENTS (CONTINUE)

	Page
CHAPTER	
III. RESULTS	
Effects of Bezafibrate on Oxidative Phosphorylation by Isolated Rat Liver Mitochondria.....	47
Factors Influencing The Effects of Bezafibrate on Oxidative Phosphorylation by Isolated Rat Liver Mitochondria.....	50
Effect of Bezafibrate on Calcium-Stimulated Respiration by Isolated Rat Liver Mitochondria.....	52
Effect of Bezafibrate on Calcium Transport by Isolated Rat Liver Mitochondria.....	53
Effect of Bezafibrate on ATPase Activity of Rat Liver Mitochondria.....	56
Effect of Bezafibrate on Mitochondrial Monoamine Oxidase (MAO) Activity.....	57
Comparison of the Effects of Bezafibrate and Clofibric Acid on Oxidative Phosphorylation and Calcium Transport by Isolated Rat Liver Mitochondria.....	58
IV. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	102
REFERENCES.....	114
VITAE.....	126



## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Classification of primary hyperlipidaemias.....	3
2. Effect of bezafibrate on respiratory control index (RCI) and P/O ratio of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	68
3. Effect of bezafibrate on respiratory control index (RCI) and P/O ratio of rat liver mitochondria with succinate as substrate.....	70
4. Effect of pH on the inhibition of state 3 and state 3u respiration by bezafibrate.....	72
5. Effect of dithiothreitol (DTT) on the inhibition of state 3 and state 3u respiration by bezafibrate.....	74
6. Effect of $Mg^{2+}$ on the inhibition of state 3 and state 3u respiration by bezafibrate.....	75
7. Attenuation of the bezafibrate-induced inhibitory effect on state 3 respiration by bovine serum albumin (BSA).....	77
8. Effect of bezafibrate on ATPase activity of rat liver mitochondria in the presence and absence of DNP.....	90

## LIST OF TABLES (CONTINUE)

Table	Page
9. Effects of bezafibrate compared with clofibrinic acid on state 4, state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria.....	96
10. Effect of bezafibrate compared with clofibrinic acid on respiratory control index (RCI) and P/O ratio of rat liver mitochondria.....	98

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Chemical structure of bezafibrate.....	2
2. Lipid metabolism.....	5
3. Correlation of fuel breakdown, Krebs cycle, electron transport chain and oxidative phosphorylation.....	13
4. Electron transport chain, coupling sites, and inhibitors.....	15
5. The measured redox potentials and their corresponding free-energy changes in each steps of electron transport from NADH to oxygen....	19
6. Schematic illustration of the coupled processes of electron transport and oxidative phosphorylation.....	21
7. Components of the $F_1-F_0$ ATPase complex.....	23
8. The mitochondrial $F_1-F_0$ ATPase may act reversibly as a synthetase or as a hydrolase.....	25
9. Utilization of mitochondrial protonmotive force in various processes.....	27
10. Gilson reaction chamber.....	32
11. An oxygraph tracing illustrating the measurement of RCI value.....	35
12. An oxygraph tracing illustrating the measurement of P/O ratio.....	35

## LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
13. An oxygraph tracing illustrating the measurement of oxygen consumption rates.....	35
14. Tracings illustrating the inhibitory effect of bezafibrate on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	62
15. The dose-response curves of bezafibrate effect on state 4 state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	64
16. The dose-response curves of bezafibrate effect on state 4, state 3, and state 3u respiration of rat liver mitochondria with succinate as substrate.....	66
17. Tracings demonstrating the inhibitory effect of bezafibrate on calcium-stimulated respiration of rat liver mitochondria.....	78
18. The dose-response curve of bezafibrate inhibition on calcium-stimulated respiration of rat liver mitochondria.....	80
19. Effect of bezafibrate on substrate-supported calcium transport by rat liver mitochondria..	82

## LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
20. Effect of bezafibrate on ATP-supported calcium transport by rat liver mitochondria.....	85
21. Effects of bezafibrate and ruthenium red on calcium transport by rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	87
22. Effect of bezafibrate on monoamine oxidase (MAO) activity of rat liver mitochondria.....	92
23. Tracings comparing the effects of bezafibrate with clofibric acid on state 4, state 3, and state 3u respiration of rat liver mitochondria.....	94
24. Comparison of the effects of bezafibrate and clofibric acid on calcium transport by rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	99
25. Chemical structure of three fibric acid derivatives.....	111

## LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
BSA	=	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	=	calcium ion
Co Q	=	coenzyme Q, ubiquinone
Cyt.	=	cytochrome
CaCl <sub>2</sub>	=	calcium chloride
CHD	=	coronary heart disease
°C	=	degree Celsius
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
DCCD	=	dicyclohexylcarbodiimide
DTNB	=	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate
DMSO	=	dimethylsulfoxide
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether)N,N,N',N'- tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH <sub>2</sub>	=	reduced flavin adenine dinucleotide
FMN	=	flavin mononucleotide
Fe-S	=	iron-sulfur center
g	=	centrifugal force unit (gravity)
gm	=	gram
H <sup>+</sup>	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid

## LIST OF ABBREVIATIONS (CONTINUE)

$H_2SO_4$	=	sulfuric acid
HDL	=	high density lipoprotein
KCl	=	potassium chloride
$KH_2PO_4$	=	potassium phosphate
L	=	litre
LDL	=	low density lipoprotein
M	=	molar
mM	=	millimolar
ml	=	millilitre
mg	=	milligram
mOsm	=	milliosmolar
min	=	minute
$Mg^{2+}$	=	magnesium
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
MAO	=	monoamine oxidase
$\mu g$	=	microgram
$\mu l$	=	microlitre
$\mu M$	=	micromolar
$NAD^+$	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
$Na_2CO_3$	=	sodium carbonate
$NaHCO_3$	=	sodium bicarbonate
NaOH	=	sodium hydroxide

## LIST OF ABBREVIATIONS (CONTINUE)

nmole	=	nanomole
ng	=	nanogram
O	=	oxygen
OSCP	=	oligomycin sensitivity conferring protein
Pi	=	inorganic phosphate
RLM	=	rat liver mitochondria
RPM	=	round per minute
RCI	=	respiratory control index
SEM	=	standard error of mean
state 3u	=	state 3 uncoupling
TMPD	=	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
VLDL	=	very low density lipoprotein
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent