

ผลของอนุพันธ์ของ เอ็น - เฮซิลอะมิโนไพรีดีน ต่อสมรรถนะของเอนไซม์  
โมโนเอมีนออกซิเดสและกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

นางสาว อัญชิษฐา ทิพวงศวิจิตร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-175-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF N - ACYLAMINOPYRIDINE DERIVATIVES ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY  
AND RESPIRATORY CHAIN OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA



MISS UNCHITTHA TIPAYAVONGVIJIT

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacology

Inter-Departmental Program in Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-175-2



อัญชิษฐา ทิพย์วงศ์จิตร : ผลของอนุพันธ์ของเอ็น-เอซิลอะมิโนไพริดีนต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (EFFECTS OF N-ACYLAMINOPYRIDINE DERIVATIVES ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND RESPIRATORY CHAIN OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA.) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.วิทยา จันทสูตร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช, 127 หน้า. ISBN 974-346-175-2

จากการศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ของสาร N-acylaminopyridine ได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส และกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่า CU 763-16-04 มีผลยับยั้งการใช้ ออกซิเจนและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ได้แรงกว่า CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ซึ่งทำให้อัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U ลดลง และยับยั้งการออกซิไดซ์ NADH ใน osmotic-shocked mitochondria แสดงให้เห็นว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I แต่สารทุกตัวกลับกระตุ้นการใช้ ออกซิเจนเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรทใน state 4 ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วย malonate นอกจากนี้ยังพบว่า สารทุกตัวไม่กระตุ้นการทำงานของ ATPase activity สาร dithiothreitol ไม่ยับยั้งขบวนการหายใจของ CU 763-16-04 แต่ยับยั้งขบวนการหายใจของ CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย แสดงว่าการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ไม่เกี่ยวข้องกับ sulfhydryl groups ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย bovine serum albumin สามารถลดฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-02 กลับเพิ่มการออกฤทธิ์ ใน CU 763-18-04 ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ iproniazid แต่ CU 763-16-04 สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วยแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย และสารทุกตัวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้ แต่ไม่ยับยั้ง lipid peroxidation ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ascorbate กับ ferrous sulfate

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาเภสัชวิทยา  
สาขาวิชา เภสัชวิทยา  
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิติ  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

# # 4175277130 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: N-Acylaminopyridine / Rat liver mitochondria / Mitochondria respiration / Monoamine oxidase /

UNCHITTHA TIPAYAVONGVIJIT : EFFECTS OF N-ACYLAMINOPYRIDINE DERIVATIVES  
ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND RESPIRATORY CHAIN OF ISOLATED RAT  
LIVER MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR : ASIST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT,  
THESIS COADVISOR : ASSO. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph. D., 127 pp.  
ISBN 974- 346-175-2X.

The effects of N-acylaminopyridine derivatives such as: CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 and CU 763-18-04 on monoamine oxidase activity and respiratory chain were studied on isolated rat liver mitochondria. The CU 763-16-04 decreased the rate of oxygen consumption in state 3 and state 3U respiration more than CU 763-18-01 and CU 763-18-04. The NADH oxidation was only inhibited by CU 763-16-04. All studied N-acylaminopyridine derivatives did not inhibit state 3 respiration but stimulated the state 4 of mitochondria with succinate as a substrate. These results suggested that CU 763-16-04 act as a inhibitor of site I of respiratory chain. These derivatives did not stimulate ATPase activity. Dithiotreitol did not alter the inhibitory effect on respiration of CU 763-16-04. The bovine serum albumin decreased the inhibitory effects of CU 763-16-04, CU 763-18-01 and CU 763-18-02 except CU 763-18-04 on oxygen consumption. Calcium stimulated respiration was inhibited by CU 763-16-04. All of these derivatives inhibited monoamine oxidase activity but did not inhibit on lipid peroxidation induced by ascorbate plus ferrous sulfate.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาเภสัชวิทยา  
สาขาวิชา เภสัชวิทยา  
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกด้านและคำปรึกษาที่ดีเยี่ยม ตลอดจนคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ศิริภรณ์ พึ่งวิทยา หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมจากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์บัณฑิตศึกษา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ตลอดการศึกษาระดับปริญญาโทบัณฑิต ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษา และให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผู้วิจัยที่ไม่ได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อัญชิษฐา ทิพยวงศ์จิตร

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่ 1	
1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
บทที่ 2	
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
การหายใจของไมโตคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน.....	7
ไมโนเอมีนออกซิเดส.....	33
บทที่ 3	
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	35
สัตว์ทดลอง.....	35
การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว.....	35
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	38
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	38

สารบัญ (ต่อ)

๗

หน้า

	การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase.....	41
	การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ(RCI) และอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	44
	การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	45
	การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย.....	48
	การวัดการเกิด lipid peroxidation.....	50
	การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี.....	51
	การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	52
บทที่ 4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
	เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	53
	เมื่อใช้ NAD <sup>+</sup> -linked substrate ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate+malate.....	57
	ผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะ osmotic-shocked mitochondria.....	59
	กรณีใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	60
	ผลของ malonate ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	61
	ผลของ dithiothreitol(DTT).....	61
	ผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	62
	ผลต่อ bovine serum albumin (BSA).....	63
	ผลต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย Ca <sup>2+</sup> (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	64
	การเกิด lipid peroxidation.....	65
	ต่อ MAO activity.....	65
	รูปและตารางประกอบผลการวิจัย.....	68
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	111
	ฤทธิ์ยับยั้งการใช้การหายใจ.....	111
	ฤทธิ์กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate.....	112



สารบัญ (ต่อ)

ณ

หน้า

ผลของ bovine serum albumin (BSA).....	114
ผลของ dithitritol (DTT).....	114
ผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย.....	115
ผลต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม.....	116
ผลต่อการเกิด lipid peroxidation.....	116
ผลต่อ monoamine oxidase activity.....	116
รายการอ้างอิง.....	120
ประวัติผู้เขียน.....	127



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย.....	15
2	แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่หายใจ 4 complex ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย.....	20
3	แสดงถึงส่วนต่างๆของ electron-transfer complex.....	21
4	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสับสเตรท.....	79
5	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท.....	80
6	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	91
7	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการเกิด lipid peroxidation.....	99
8A	ผลของ CU 763-16-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	102
8B	ผลของ CU 763-18-01 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	104
8C	ผลของ CU 763-18-02 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	106
8D	ผลของ CU 763-18-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	108
8E	ผลของ iproniazid ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	110
9	แสดงค่าสัดส่วนระหว่าง $IC_{50}$ ของ N-acylaminopyridine derivatives ต่อ respiration กับ $IC_{50}$ ของ N-acylaminopyridine derivatives ต่อ MAO.....	117

## สารบัญรูป

ฎ

รูปที่		หน้า
1	แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของสารในกลุ่ม N-acylaminopyridine CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04.....	8
2	แสดงสูตรโครงสร้างของ CU 763-15-13 และ CU 763-15-14.....	8
3	แสดง organelles ใน cytoplasm และ cell nucleus.....	9
4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle, respiratory chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation.....	10
5	ภาพแสดง biochemical anatomy of mitochondria.....	11
6	แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase ( $F_1-F_0$ ATPase)....	13
7	แสดง $F_1-F_0$ ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP.....	14
8	แสดงลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนใน respiratory chain.....	18
9	แสดงถึงค่าพลังงานอิสระขณะที่อิเล็กตรอนถูกส่งผ่านในช่วงต่างๆของลูกโซ่ การหายใจ.....	21
10	แสดงการสังเคราะห์ ATP จากการคำนวณได้จาก P/O ratio ในลูกโซ่.....	22
11	แผนภาพอธิบายทฤษฎีเคมีออสโมติก คัปปลิง เสนอโดย Peter Mitchell.....	24
12	แสดงถึงปฏิกิริยาต่างๆที่ใช้ electrochemical gradients ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่าน อิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ.....	26
13	แสดงการขนส่งแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) ในไมโทคอนเดรีย.....	27
14	แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนใน ลูกโซ่การหายใจ.....	31
15	แสดงกระบวนการเกิด Lipid peroxidation.....	32
16	แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge.....	37
17	แสดง reaction chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของ ไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus.....	40
18	แสดงลักษณะของ clark oxygen electrode ซึ่งเป็น Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้วcathode.....	41

## สารบัญรูป

ฎ

รูปที่		หน้า
19	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าRCI.....	47
20	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการคำนวณค่าอัตราส่วนP /O.....	47
21	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	47
22	กราฟแสดง oxygraph tracing ของไมโตคอนเดรีย.....	54
23A	แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	69
23B	แสดงเปอร์เซ็นต์ Respiration ของ CU 763-16-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	70
24A	แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-01 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	71
24B	แสดงเปอร์เซ็นต์ Respiration ของ CU 763-18-01 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	72
25A	แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-02 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	73
25B	แสดงเปอร์เซ็นต์ Respiration ของ CU 763-18-02 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	74
26A	แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	75
26B	แสดงเปอร์เซ็นต์ Respiration ของ CU 763-18-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	76
27A	แสดง Dose-response curve ของ iproniazid.....	77
27B	แสดงเปอร์เซ็นต์ Respiration ของ iproniazid.....	78
28	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 ,CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจในภาวะ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท.....	81

สารบัญรูป(ต่อ)

จ  
ม

รูปที่	หน้า
29	แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 ,CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....83
30	ผลของ malonate ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 ,CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....84
31A	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....86
31B	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-01 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....87
31C	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-02 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....88
31D	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....89
31E	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....90
32A	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....93
32B	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-01 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....94
32C	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-02 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....95
32D	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....96
32E	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....97

รูปที่		หน้า
33	ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 ,CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียมเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	98
34A	ผลของ CU 763-16-04 ต่อ monoamine oxidase activityของไมโตคอนเดรีย.....	101
34B	ผลของ CU 763-18-01 ต่อ monoamine oxidase activityของไมโตคอนเดรีย.....	103
34C	ผลของ CU 763-18-02 ต่อ monoamine oxidase activityของไมโตคอนเดรีย.....	105
34D	ผลของ CU 763-18-04 ต่อ monoamine oxidase activityของไมโตคอนเดรีย.....	107
34E	ผลของ iproniazid ต่อ monoamine oxidase activityของไมโตคอนเดรีย.....	109

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
Cyt.	=	cytochrome
°C	=	degree celsius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNP	=	2,4-dinitrophenol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-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)
H <sup>+</sup>	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxythylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
5-HT	=	5-hydroxytryptamine
K <sup>+</sup>	=	potassium ion
KCl	=	potassium chloride
Kg	=	kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	potassium phosphate
M	=	molar
MAO	=	monoamine oxidase
MAO-A	=	monoamine oxidase A
MAO-B	=	monoamine oxidase B

MAOIs	= monoamine oxidase inhibitors
MgCl <sub>2</sub>	= magnesium chloride
μ atoms	= microatoms
μg	= microgram
μl	= microlitre
μM	= micromolar
mg	= milligram
ml	= millilitre
mM	= millimolar
mOsm	= milliosmolar
NAD <sup>+</sup>	= nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	= sodium carbonate
NaOH	= sodium hydroxide
n atom	= nanoatom
ng	= nanogram
O <sub>2</sub>	= oxygen
OH <sup>-</sup>	= hydroxyl ion
OSCP	= oligomycin-sensitivity conferring protein
Pi	= inorganic phosphate
RCI	= respiratory control index
TBA	= triobarbituric acid
TCA	= trichloroacetic acid
TMPD	= N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
w/v	= weight by volume
/	= per
%	= percent

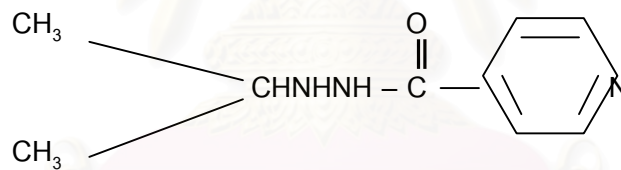


# บทที่ 1

## บทนำ

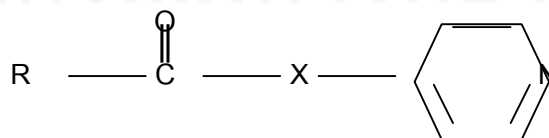
### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลายทศวรรษ 1950 ได้เริ่มมีการนำ monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์คือ iproniazid ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ isoniazid มาใช้เป็นยารักษาวัณโรค และพบว่าทำให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติทางอารมณ์ เนื่องจาก iproniazid ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และสามารถรักษาโรคซึมเศร้าได้ (Crane, 1957) แต่ความนิยมในการนำ iproniazid มาใช้ลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากยาเป็นพิษต่อตับ จึงได้มีการพัฒนาค้นคว้าสังเคราะห์สารจำนวนมากมายที่สามารถยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม N-acylaminopyridine เป็นสารที่ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยอาศัยข้อมูลที่ได้มีการศึกษาอนุพันธ์บางตัวของสารในกลุ่มนี้มาก่อนแล้ว ซึ่งพบว่า CU 763-15-13 นั้นออกฤทธิ์เป็น site I inhibitor ของกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย แต่ CU 763-15-14 กลับไม่มีฤทธิ์ (อุ้นเรือน, 2541) และ CU 763-15-13 ยังมีฤทธิ์ต่อต้านการหดตัวของลำไส้ของกระต่ายได้ (กุลยา, 2541)



สูตรโครงสร้างของ iproniazid

เมื่อได้มีการตัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มนี้ทำให้ได้สารใหม่ขึ้นมาอีก 4 ตัว โดยคาดหวังว่าน่าจะมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ จึงเห็นว่าควรทำการทดสอบกับไมโตคอนเดรีย เพื่อศึกษาผลที่เกิดขึ้น และเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารต่อไป



Acyl pyridine

## อนุพันธ์ในกลุ่ม Acyl pyridine

สาร	R	X	Position of N substitution
CU 763-16-04	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2-$	-NH-	Para
CU 763-18-01	$(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$	-NH-	Para
CU 763-18-02	$(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$	-NH-	Meta
CU 763-18-04	$(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$	-O-	Meta

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของ N- acylaminopyridine derivatives 4 ตัว ต่อกระบวนการหายใจ(ออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน) สมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และ lipid peroxidation

## ขอบเขตของการวิจัย

1. เพื่อศึกษา CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการหายใจของไมโตคอนเดรีย หรือไม่
2. เพื่อศึกษา CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ได้หรือไม่
3. เพื่อศึกษา CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation หรือไม่

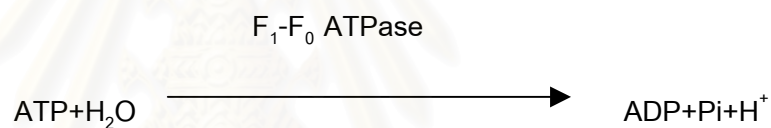
## ข้อตกลงเบื้องต้น

1. Differential centrifugation : การปั่นแยกสารที่มีอนุภาคแตกต่างกันด้วยเครื่องหมุนแรงเหวี่ยงสูงที่ใช้ค่าแรงหนีศูนย์กลางต่างๆกัน

2. RCI (Respiratory control index) : ค่าที่แสดงการควบคุม(coupling)ของปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชัน ค่า RCI นี้จะบอกถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดีหรือไม่ ในการทดลองนี้กำหนดค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นให้มีค่ามากกว่า 4 ขึ้นไป เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรทจึงยอมรับไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี ทำให้ผลการทดสอบให้การยอมรับได้

3. Uncoupled mitochondria : สภาวะที่ไมโทคอนเดรียออกซิไดซ์ สับสเตรทในกระบวนการหายใจได้อย่างอิสระ คือ มีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วโดยไม่มีการสร้าง ATP เหมือนในสภาวะปกติ เช่น ไมโทคอนเดรียที่เตรียมไว้มีคุณภาพไม่ดี หรือเก็บไว้นานเกินไป หรือสัมผัสสาร uncouple

4. ATPase activity (ATP hydrolysis activity) : ATPase เป็นเอนไซม์ที่เมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้มีการสลายตัวของ ATP ทำให้เกิด  $ADP+P_i+H^+$  มากขึ้นดังแสดงในปฏิกิริยาสามารถวัด ATPase activity ได้โดยการวัดปริมาณ  $P_i$  หรือ  $H^+$  ที่เกิดขึ้น



### ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ไม่ควรใช้หนูที่มีอายุมากเกินไป เนื่องจากจะได้ไมโทคอนเดรียที่มีคุณภาพไม่ดี ทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ ข้อจำกัดสามารถแก้ไขได้โดยสั่งหนูให้พ่อกับการใช้ คือ สปีดาร์ละ 3-4 ตัว
2. ในการเตรียมไมโทคอนเดรียต้องทำใน medium ที่บรรจุในภาชนะน้ำแข็ง โดยมีอุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  แม้กระทั่งขณะปั่นด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ต้องแช่ภาชนะในน้ำแข็งตลอดเวลา

## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) โดยแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว แล้วดูอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่อยู่ในสารละลายที่มี CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 เปรียบเทียบกับไมโตคอนเดรียในสารละลายที่ไม่มี CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และกับสารละลายที่มี iproniazid ในสภาวะต่างๆ ที่ต้องการศึกษา

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบผลอนุพันธ์ของ N- acylaminopyridine ได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย สมรรถนะของ เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส การสะสมแคลเซียม และ lipid peroxidation แล้วสามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวของสารสังเคราะห์กลุ่มนี้ได้
2. นำข้อมูลที่ได้จากการทำวิจัย เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขสารสังเคราะห์ให้มีฤทธิ์ที่เหมาะสมในการที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารเคมี CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ในการออกซิโดซ์สับสเตรท เพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ในการสร้าง ATP
2. ศึกษาผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อ respiratory chain โดยใช้ไมโตคอนเดรียในสภาวะ osmotic shock (NADH สามารถผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้)
3. ศึกษา dose-response curve ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

4. ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

4.1 ศึกษาผลของ DTT(dithiothreitol) เนื่องจาก DTT มีคุณสมบัติจับกับ -SH group ของไมโทคอนเดรีย

4.2 ศึกษาผลของ bovine serum albumin (BSA)

5. ศึกษาผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย รวมอยู่ด้วย เนื่องจากไมโทคอนเดรียใช้เอนไซม์ ATPase ในการสลาย ATP ได้เป็น ADP+Pi ซึ่งในที่นี้ทำการศึกษาโดยการวัดปริมาณของ phosphate ที่เกิดขึ้น ตามวิธีของ Weinbach (1956)

6. ศึกษาผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ต่อการเกิดกระบวนการ lipid peroxidationของไมโทคอนเดรีย

7. ศึกษา dose-response curve ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไมโทคอนเดรียออกซิเดส

### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ขั้น ตอน	เดือนที่ (เริ่มทำวิทยานิพนธ์เมื่อเดือน เมษายน2542)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล	←	→													
2.	ดำเนินการวิจัยและเก็บข้อมูล				←	→										
3.	วิเคราะห์ข้อมูลและทำการวิจัย เพิ่มเติมในส่วนที่จำเป็น									←	→					
4.	สรุปผล เขียนวิทยานิพนธ์ และ สอบวิทยานิพนธ์												←	→		

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม N-acylaminopyridine ที่นำมาศึกษาได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 (รูปที่ 1) เป็นสารที่ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยดัดแปลงสูตรโครงสร้างของ CU 763-15-13 และ CU 763-15-14 (รูปที่ 2) ซึ่งจากการศึกษาของอุ๋นเรื่อน แก้วพินิจ (2541) พบว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์เป็น site I inhibitor และกระตุ้น succinate oxidation ของกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย แต่ CU 763-15-14 กลับไม่มีฤทธิ์ และ CU 763-15-13 ยังสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อได้ กระทั่งแบบเกิดขึ้นเอง และจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine, barium chloride และ potassium chloride ลักษณะการออกฤทธิ์เป็นแบบไม่จำเพาะ (กุลยา, 2541) ซึ่งปกติสารที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบในทางการวิจัยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

- 1) สารกระตุ้นที่มีรีเซปเตอร์เฉพาะ (specific receptor) บนกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของกล้ามเนื้อ เช่น อะเซทิลโคลีน (acetylcholine), ฮิสตามีน (histamine), ซีโรโทนิน (serotonin), คาร์บาโคล (carbacol), ออกซีโตซิน (oxytocin), นอร์อะดรีนาลีน (noradrenaline), ฟีนิลเลปรีน (phenylephrine) เป็นต้น
- 2) สารกระตุ้นที่ไม่มีรีเซปเตอร์เฉพาะบนกล้ามเนื้อเรียบ เช่น แบเรียมคลอไรด์ ( $BaCl_2$ ), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ )

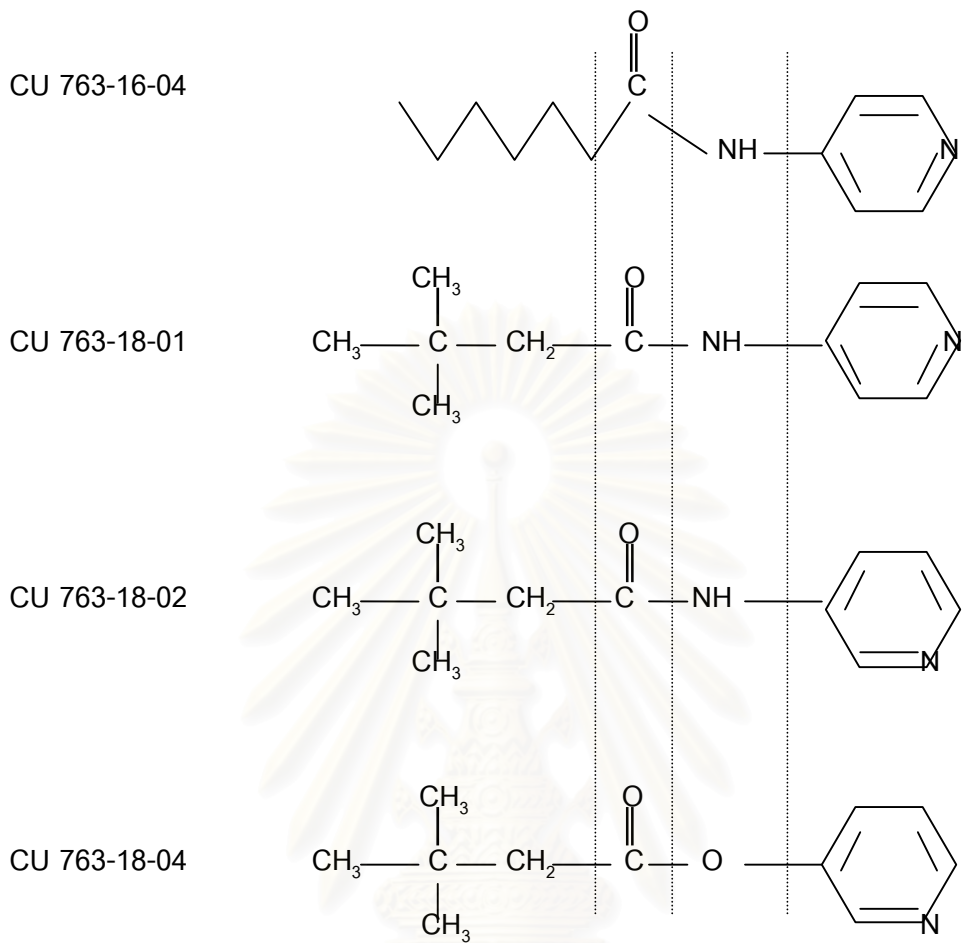
อย่างไรก็ดีสารกระตุ้นทั้งสองประเภทนี้ มีกระบวนการร่วมกันในการทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ คือทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระ (free calcium ion) ภายในเซลล์ ซึ่งแคลเซียมอิสระที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีบทบาทสำคัญในการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Bolton, 1979; Kenakin, 1984; Somlyo, 1985)

นอกจากแคลเซียมจำเป็นต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อแล้ว ยังต้องการสารพลังงานสูงในรูปของ ATP ด้วยเช่นกัน (Adelstein, R.S., and Eisenberg, E.,1980) และไมโทคอนเดรียก็เป็น organelle ที่สำคัญที่สุดของเซลล์ในการสร้าง ATP (Lehninger,1975) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีส่วนในการควบคุมปริมาณแคลเซียมอิสระภายใน cell ได้อีกด้วย (Lehninger,1970;Bolton,T.B.,1979) อีกประการหนึ่ง ก่อนที่จะนำเอาสารเคมีที่สังเคราะห์ใหม่ได้มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ จำเป็นต้องศึกษาการออกฤทธิ์ของสารเคมีนั้นๆ ต่อการทำงานในหลายๆ ระบบของร่างกาย ให้มีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเสียก่อน จึงได้นำเอาสาร CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 มาศึกษาฤทธิ์ต่อไมโทคอนเดรียโดยศึกษาถึงผลต่อขบวนการหายใจและ MAO activity ซึ่งเป็น marker enzyme ผนังชั้นนอกไมโทคอนเดรีย

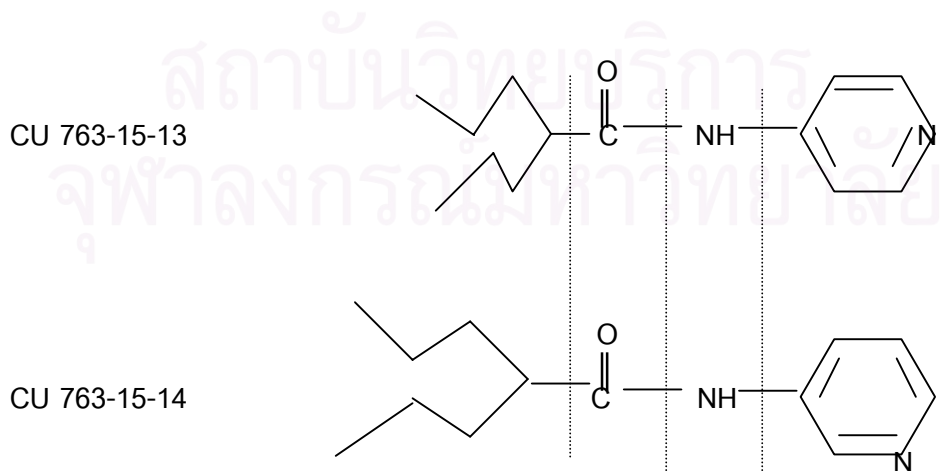
#### **การหายใจของไมโทคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน (Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)**

ไมโทคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญภายในเซลล์(รูปที่ 3) และเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (powerhouse of cell) เนื่องจากมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันกรดไขมัน(fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิเดชันกรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle or citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้ได้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิต (aerobic eukaryotic) (Avers,1986) (รูปที่ 4)

ไมโทคอนเดรียจะมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ เช่น ในเซลล์ตับมีลักษณะกลม (football-shaped) ในเซลล์ไตมีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) และใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างซับซ้อนและไม่แน่นอน (complex irregular structure) เช่นไมโทคอนเดรียในยีสต์ นอกจากนี้ขนาดและจำนวนที่พบจะแตกต่างกันไป มักพบ



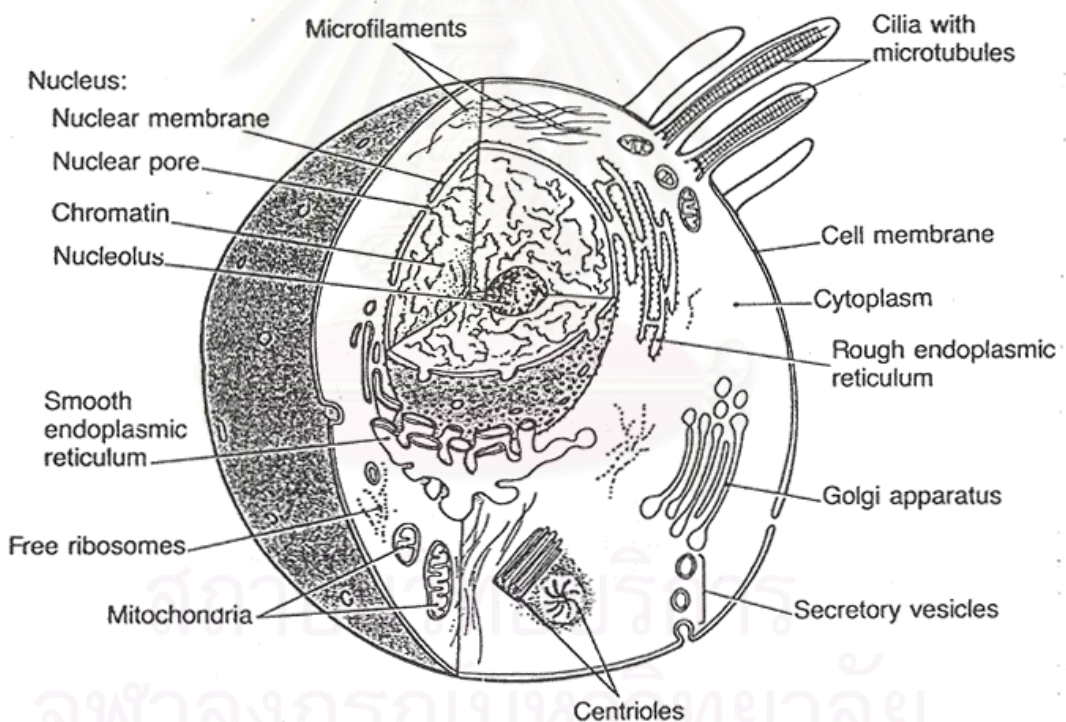
รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของสารในกลุ่ม N-Acylaminopyridine CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04



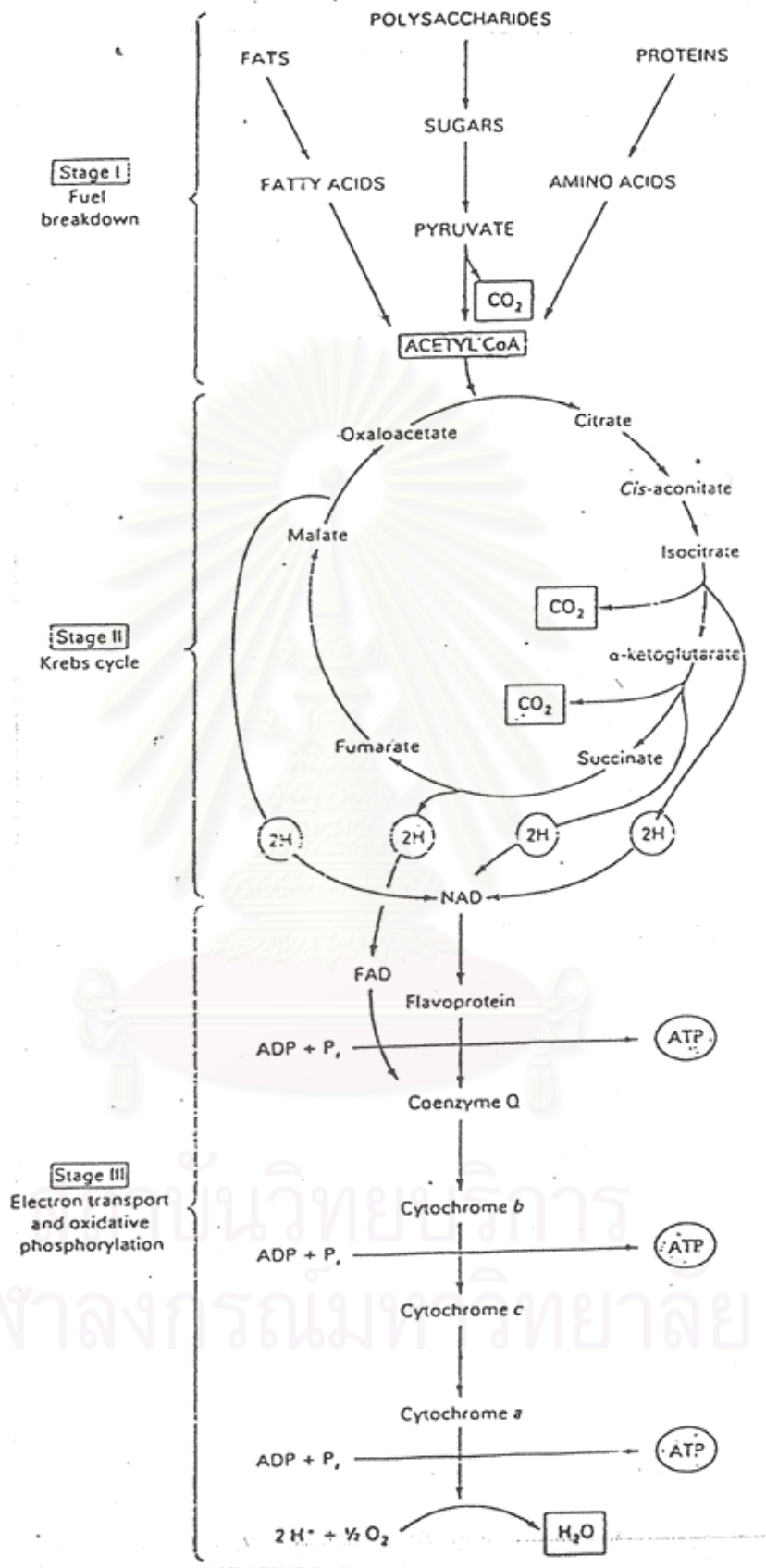
รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU 763-15-13 และ CU 763-15-14



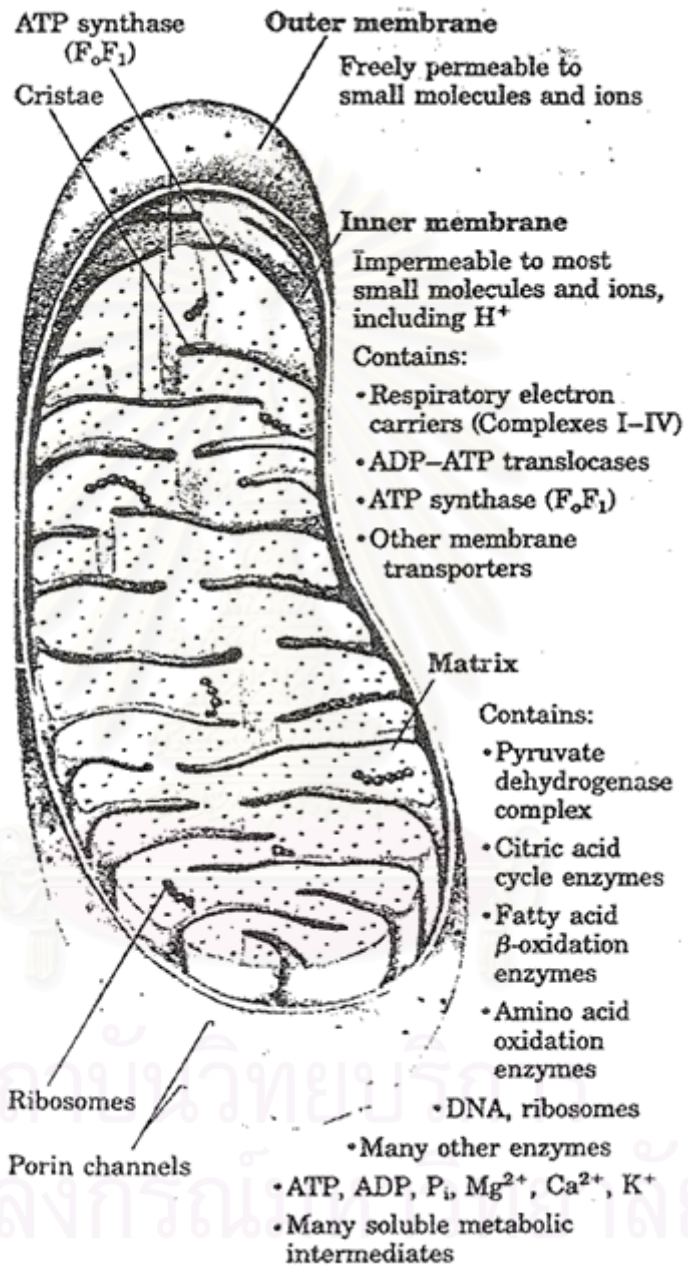
ไมโตคอนเดรียอยู่ใกล้กับโครงสร้างของเซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับสารก่อกำลังงาน(fuel)ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation) ต่างๆ (Lehninger,1993;Campbell,1995;Garrett and Grisham,1995) และแม้ขนาด จำนวน รูปร่างจะแตกต่างกัน แต่โดยลักษณะรวมๆ แล้วจะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น ได้แก่ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ ภายในผนังชั้นในจะห่อหุ้มของเหลวมีลักษณะคล้ายเจล (gel) เรียกว่า matrix (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 แสดง organelles ใน cytoplasm และ cell nucleus (Forhlich,1997)



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle, respiratory chain และ ปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (De Robertis,E.D.P. and De Robertis,E.M.F.,1987)

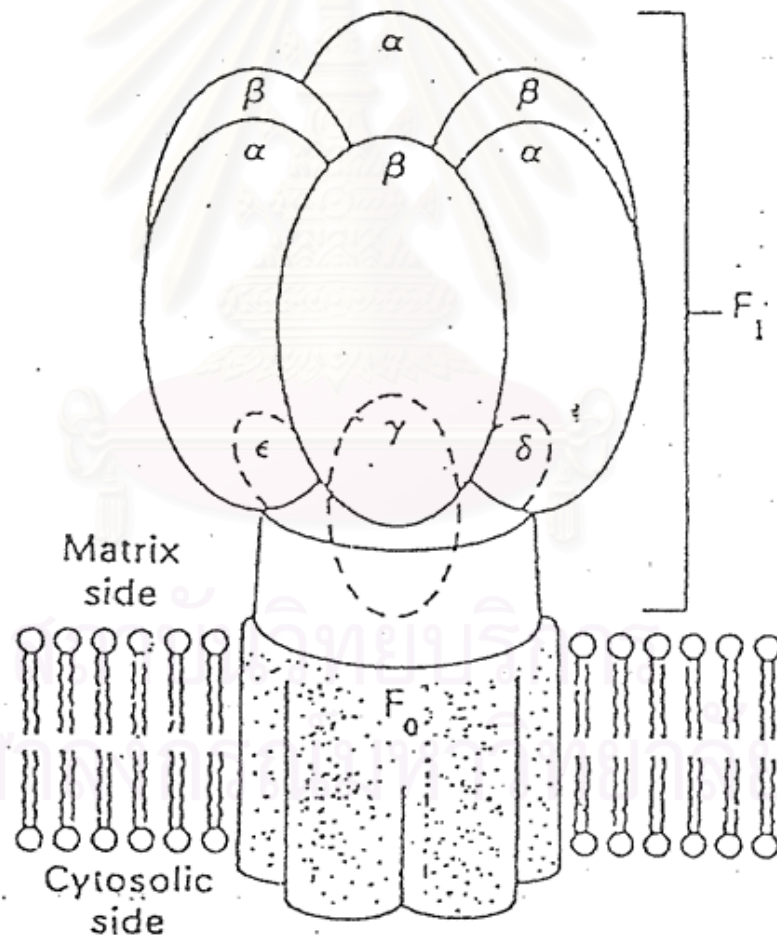


รูปที่ 5 ภาพแสดง biochemical anatomy of mitochondria

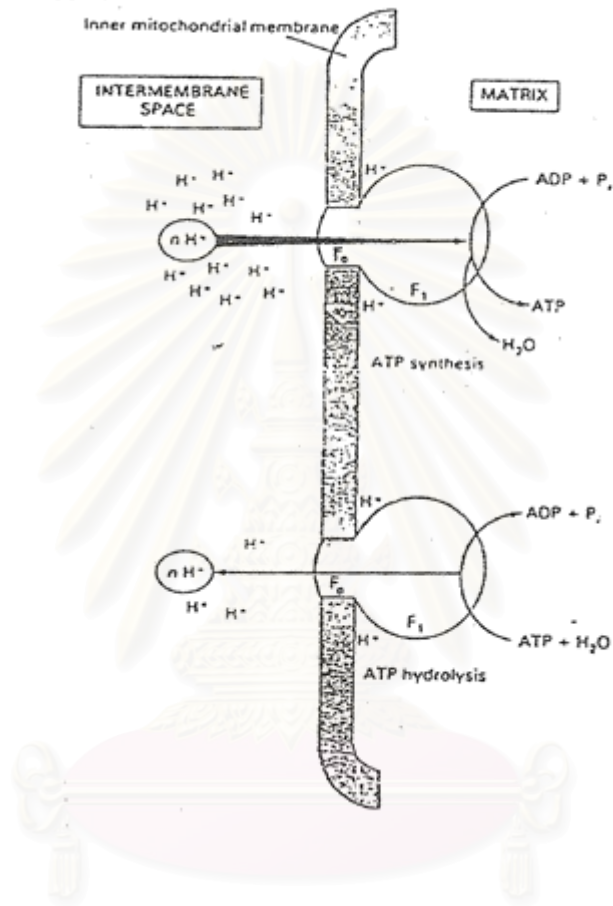
ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition), permeability และเอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะผิวเรียบ (smooth and unfold) และไม่มีรอยพับหุ้มล้อมรอบ ผนังชั้นในประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ ที่ผนังชั้นนอกมีเอนไซม์อยู่หลายชนิด เช่น monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ผนังชั้นในมีคุณสมบัติยืดหยุ่น (elastic) และมีพื้นที่ผิวมากกว่า เนื่องจากมีการพับ (fold) เข้าไปใน matrix ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากขึ้น ส่วนภายในผนังชั้นในประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และไขมันเป็นส่วนน้อย มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable) ดังนั้นการผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) (Sartorelli, Erecinska and Wilson, 1981; Voet, D. and Voet, J.G., 1990; Lehninger, 1993) ส่วนภายในผนังชั้นในจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme และ enzyme ATP synthase อยู่ด้วย ดังแสดงรายละเอียด(ตารางที่ 1) ส่วนใน matrix นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์แล้วยังประกอบด้วย DNA, ribosome และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน (Avers, 1986)

บริเวณ cristae เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะเห็นโครงสร้างทรงกลมที่เรียกว่า spherical knob หรือ headpieces ยื่นออกมาจากผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งพบว่าเป็นเอนไซม์ ATPase (ATP synthase and/or ATP hydrolase) (รูปที่ 6) ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า  $F_1$  (coupling factor one) มีน้ำหนักโมเลกุล 360,000 - 380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน (peripheral membrane protein) 5 subunits ได้แก่  $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta,$  และ  $\epsilon$  ในสภาวะปกติ เมื่อมี  $Mg^{2+}$  เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น ADP+Pi อย่างช้าๆ แต่จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP+Pi (รูปที่ 7) ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งคือ  $F_0$  (membrane sector) และ OSCP (oligomycin-sensitivity-conferring protein) กับ  $F_6$  (coupling factor 6) ซึ่งเป็น stalk sector ที่ทำให้  $F_1$  เชื่อมกับ  $F_0$  ได้  $F_0$  มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000 daltons เป็น

ส่วนที่ฝังอยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ประกอบด้วย 3 subunit คือ  $\alpha$ ,  $\beta$  และ  $c$  ทำหน้าที่เป็น  $H^+$  conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเป็นส่วนที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) โดย oligomycin จะไปจับกับส่วน subunit ของ  $F_0$  (แต่ไม่จับกับ OSCP) และยับยั้ง  $H^+$  transport ผ่านทาง  $F_0$  DCCD ก็ยับยั้ง  $H^+$  transport เช่นเดียวกันแต่จะทำปฏิกิริยากับ single Glu residue บน subunit อันหนึ่งของ  $F_0$  ใน mammalian (Avers,1986;Senior,1988;Stryer,1988;Futai,Noumi,and Maeda,1989;Voet,D.and Voet,J.G.,1990;Abeles, Frey and Jencks,1992;Devlin,1992)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase ( $F_1$ - $F_0$  ATP ase)



## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดง F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP ase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP

(De Robertis, E.D.P. and De Robertis, E.M.F., 1987)

ตารางที่ 1 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 1992)

Outer membrane	Intermembrane space	Inner membrane	Matrix
Monoamine oxidase	Adenylate kinase	F <sub>1</sub> -ATPase	Citrate synthase
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside diphosphate kinase	Succinate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase
Nucleoside diphosphate kinase		Cytocromes b,c <sub>1</sub> ,c,a,a <sub>3</sub>	Succinyl CoA synthetase
Phospholipase A		NADH dehydrogenase	Malate dehydrogenase
Fatty acyl CoA synthetases		Camitine : acyl CoA transferase	Isocitrate dehydrogenase
NADH : cytochrome c reductase (rotenone-insensitive)		β-Hydroxybutyrate dehydrogenase	Fatty acid β-oxidation system
Choline phosphotransferase		Adenine nucleotide translocase	α-Ketoglutarate dehydrogenase
		Mono-,di-,tricarboxylate translocase	Aconitase
		Glutamate-aspartate translocase	Fumarase
			Glutamate dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate transaminase
			Omithine transcarbamoylase

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรีย นั้น เริ่มจากสารอาหารต่างๆที่รับประทานเข้าไป ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ถูกย่อยสลายจนได้โมเลกุลเล็กๆ เช่น โปรตีนถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส และไขมันถูกย่อยจนได้กรดไขมัน (fatty acid) สารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อให้ได้ acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediates) ที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่างๆ ในวัฏจักรเครปส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ และมีโปรตอน( $H^+$ )ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) โปรตีน (reduce)  $NAD^+$  และ  $FAD$  ไปเป็น  $NADH+H^+$  และ  $FADH_2$  (Damell, Lodish and Baltimore, 1989; Devlin, 1992; Campbell, 1995; Garrett and Grisham, 1995) ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain or electron transport chain) ซึ่งอยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิด (Lehninger, 1993) คือ

1. Pyridine-linked dehydrogenase ได้แก่  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase , glutamate dehydrogenase , malate dehydrogenase เป็นต้น ซึ่งต้องการ  $NAD^+$  หรือ  $NADP^+$  ตัวใดตัวหนึ่ง เป็น coenzyme ยกเว้น glutamate dehydrogenase ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง  $NAD^+$  หรือ  $NADP^+$

2. Flavin-linked dehydrogenase หรือ flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเล็กตรอน ได้แก่  $NADH$  dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenase จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenase ตรงที่จะจับกับเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะจับกับ coenzyme

3. Iron-sulfur protein ประกอบไปด้วยเหล็ก (iron และ acid-labile sulfur) ได้แก่ ferredoxin



4. ระบบ cytochromes ประกอบด้วย iron-porphyrin เป็น prosthetic groups ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dehydrogenase systems ต่างๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b,c<sub>1</sub>,c,a,a<sub>3</sub>

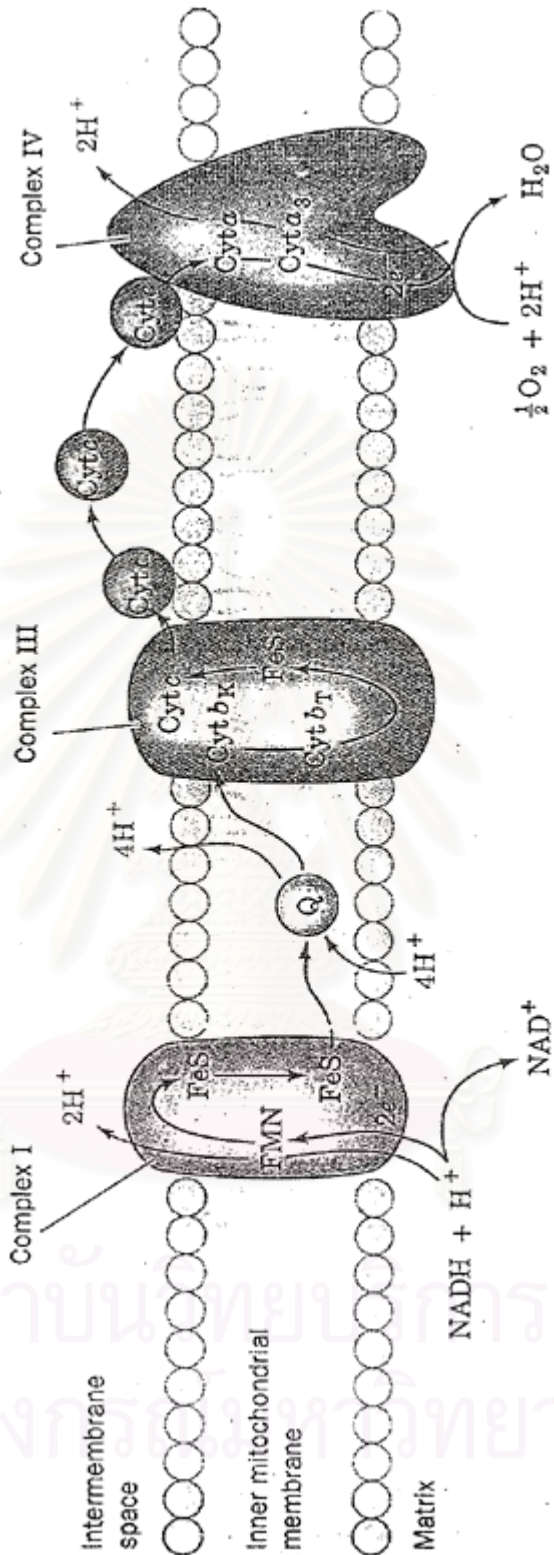
5. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone เป็นตำแหน่งที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH และ FADH<sub>2</sub> ไปยังระบบ Cytochromes

การส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับ ตามค่า E<sub>0</sub>' (พลังงานอิสระ) ของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนและมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H<sup>+</sup> กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 4)

สับสเตรทที่ไม่โตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆของลูกโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. NAD<sup>+</sup>-linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate, α-ketoglutarate เป็นสับสเตรทที่เมื่อเกิดปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรียโดย Krebs' cycle จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม(2H)ไปรีดิวซ์ NAD<sup>+</sup>ได้เป็นNADH+H<sup>+</sup> จะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I
2. FAD-linked substrate ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยจะไปรีดิวซ์ FAD เป็น FADH<sub>2</sub>ให้อิเล็กตรอนแล้วเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1993) ดังรายละเอียดในรูป 8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดงลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนใน respiratory chain (Voet,D. and Voet,J.G., 1990)

นอกจากนี้ลูกโซ่การหายใจแบ่งออกเป็น 4 complexes (ตารางที่ 2,3) (Hatefi, 1985) คือ

### 1. Complex I หรือ (NADH dehydrogenase complex)

ส่วนนี้จัดเป็น complex ที่ใหญ่ที่สุดโครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunits) 16 หน่วย ได้แก่ FMN และ Iron-sulfur center (Fe-S) substrate ที่ให้ reducing equivalent เข้าที่ complex นี้ได้คือ  $\text{NAD}^+$ -linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate โดยมี  $\text{NADH} + \text{H}^+$  เป็น reducing equivalent

### 2. Complex II (Succinate dehydrogenase complex)

Complex นี้ประกอบด้วย polypeptides 2 สาย มี FAD และ iron-sulfur centers เป็นหลัก มีข้อแตกต่างจาก complex I คือจะรับอิเล็กตรอนจาก succinate ได้โดยตรงผ่านทาง FAD เข้าที่ coenzyme Q (succinate จึงเป็น substrate ที่ไม่สามารถให้ reducing equivalent เข้าที่ complex I ได้)

### 3. Complex III (cytochrome b-c<sub>1</sub> complex)

Complex นี้ประกอบด้วย cytochrome b, c<sub>1</sub> และ iron sulfur protein ซึ่ง cytochrome C oxidoreductase จะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dihydroquinone ( $\text{QH}_2$ ) ไปยัง cytochrome C และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่กลไกของการส่งผ่านอิเล็กตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

### 4. Complex IV (Cytochrome oxidase complex)

Complex นี้ประกอบด้วย polypeptides 2-3 สาย cytochrome 2 หน่วย (a และ a<sub>3</sub>) และทองแดง (Cu) 2 อะตอม complex นี้สามารถรับอิเล็กตรอนจาก ascorbate (Vitamin C) และ  $\text{N,N',N'-tetramethylphenylenediamine}$  (TMPD) ได้โดยตรง

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก  $\text{NADH}$  หรือ  $\text{FADH}_2$  ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนต่างๆ ที่เรียงตัวอยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย จะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมามากพอในการสังเคราะห์ ATP โดยการเกิด phosphorylation ของ ADP เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่า กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) จะพบ 3 ตำแหน่งในลูกโซ่การหายใจที่ปลดปล่อยพลังงานอิสระที่มีมากเพียงพอในการนำไปใช้สังเคราะห์ ATP ตำแหน่งต่างๆ และพลังงานอิสระที่ปลดปล่อย ดังแสดงในรูปที่ 9 การคำนวณจาก P/O ratio (ADP/O) ทำให้รู้ว่าการสังเคราะห์ ATP นั้น ในแต่ละ

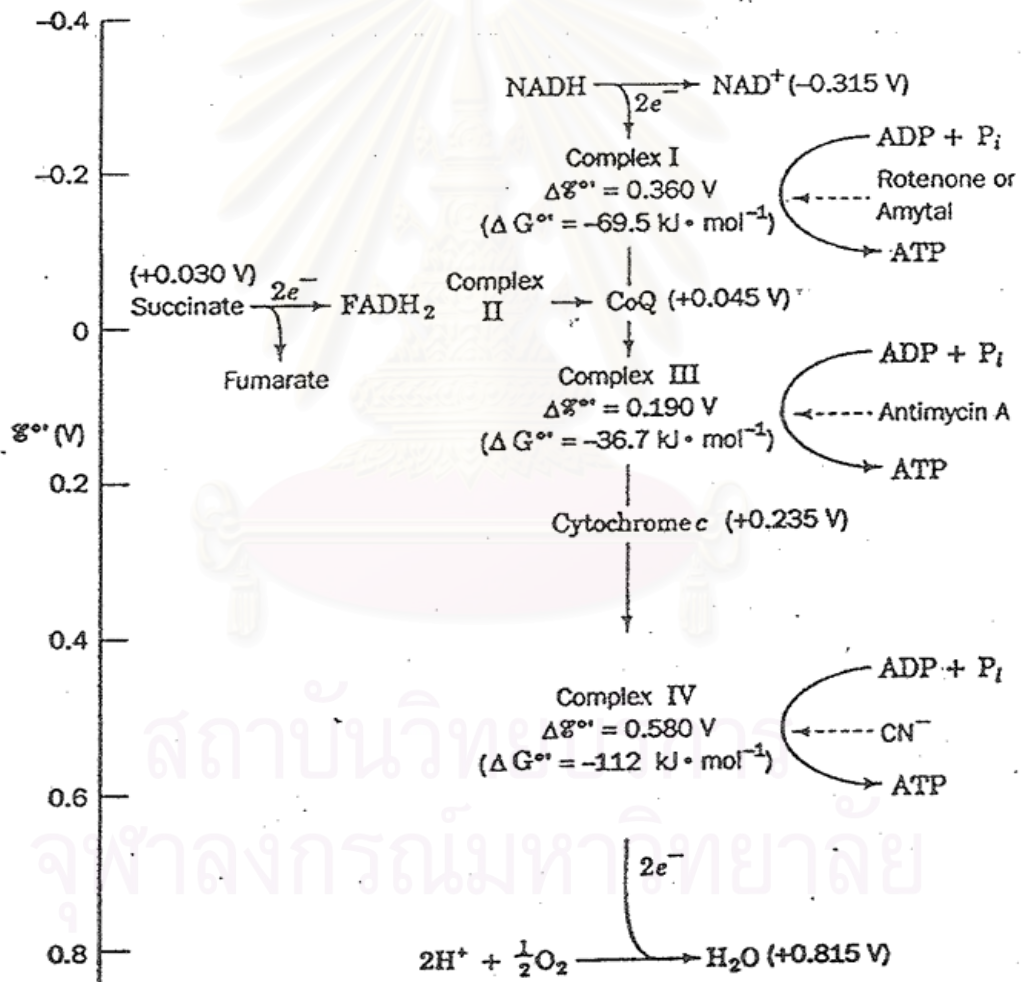
ช่วงของลูกโซ่การหายใจเท่ากับ 3,2 และ 1 โมเลกุลตามลำดับ (รูปที่ 10) ส่วนการคำนวณ ADP/O ratio จะกล่าวรายละเอียดในบทที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่หายใจ 4 complex ที่อยู่ภายในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Aver,1986)

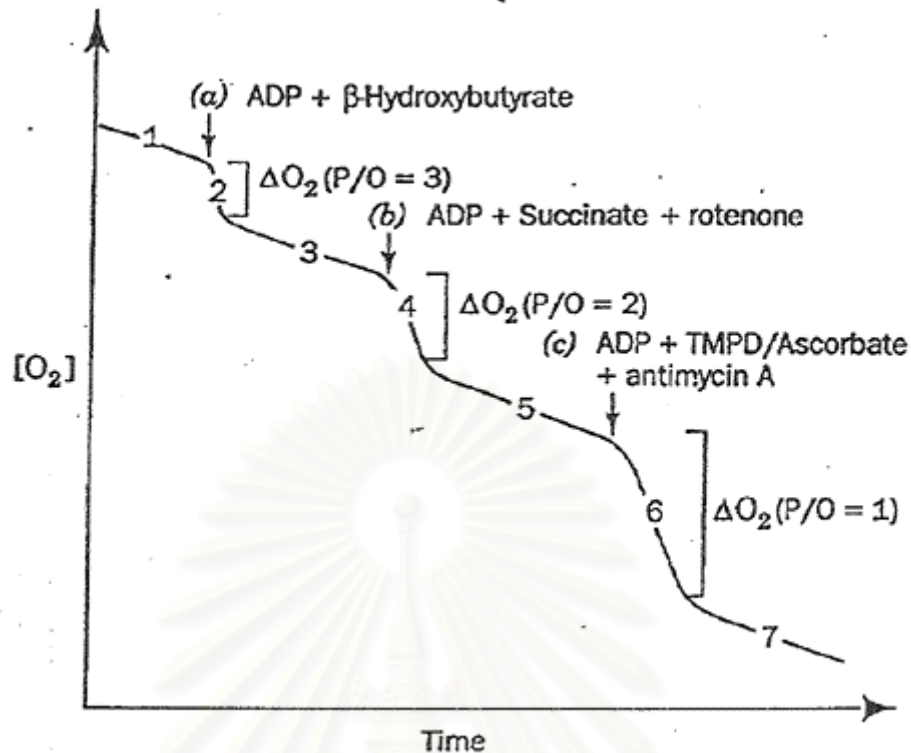
Complexes	Components
I,NADH dehydrogenase complex	NAD FMN Iron sulfur (FeS) centers Coenzyme Q <sub>10</sub> Phospholipids
II,Succinate dehydrogenase complex	FAD Iron sulfur (FeS) centers Cytochrome b <sub>558</sub>
III,Cytochrome b-c <sub>1</sub> complex	Cytochrome b Cytochrome c <sub>1</sub> Nonheme iron protein Coenzyme Q <sub>10</sub> Phospholipids
IV,Cytochrome oxidase complex	Cytochrome a Cytochrome a <sub>3</sub> Copper Phospholipids

ตารางที่ 3 แสดงถึงส่วนต่างๆ ของ electron-transfer complexes (Abeles, Frey and Jencks, 1992)

Proteins	Molecular weight	Cofactors	Number of proteins
Complex I	$1 \times 10^6$	$\text{Fe}_4\text{S}_4, \text{Fe}_2\text{S}_2, \text{FMN}$	26
Complex II	>100,000	$\text{Fe}_4\text{S}_4, \text{Fe}_2\text{S}_2, \text{FAD}$	4
Complex III	450,000	2Cyt b, Cyt $c_1$	> 6
Complex IV	200,000	Cyt a, Cyt $a_3, \text{Cu}$	> 7



รูปที่ 9 แสดงถึงค่าพลังงานอิสระขณะที่อิเล็กตรอนถูกส่งผ่านในช่วงต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจ (Voet, D. and Voet, J.G., 1990)



รูปที่ 10 แสดงการสังเคราะห์ ATP จากการคำนวณได้จาก P/O ratio ในลูกโซ่ (Voet,D. and Voet,J.G.,1990)

ในสภาวะปกติการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณีทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไม่โตคอนเดรียที่เตรียมได้คุณภาพที่ไม่ดี หรือเก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไม่โตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ได้แก่ DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นไม่โตคอนเดรียให้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็ว โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger,1993)

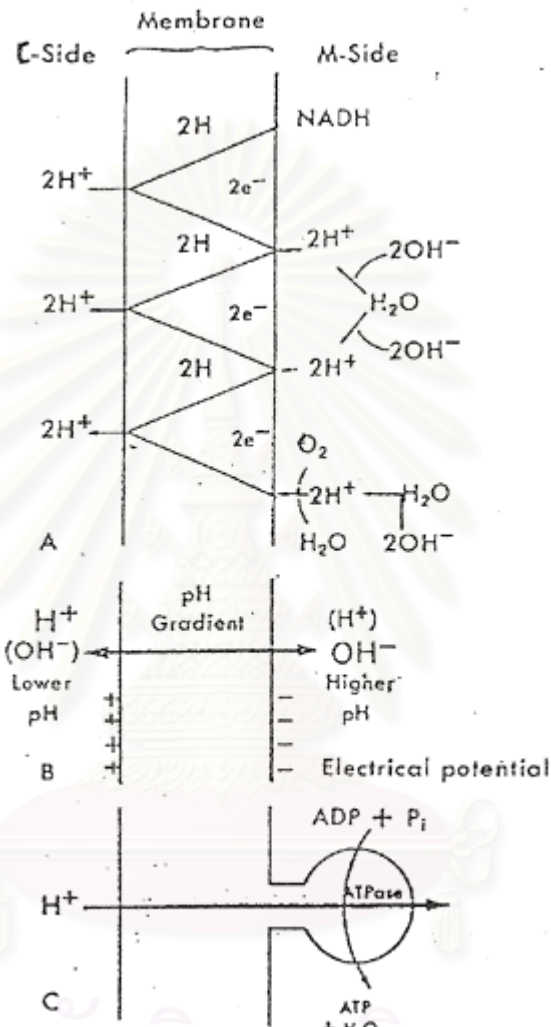
การสังเคราะห์ ATP ในไมโตคอนเดรีย นั้น เป็นการเปลี่ยนรูปของพลังงานที่เกิดจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามลูกโซ่การหายใจนั้นจะมีการสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดมากมาย เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ เช่น chemical

coupling, conformational coupling และ chemiosmotic coupling hypothesis แต่ในปัจจุบัน แนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับ คือ "chemiosmotic coupling hypothesis" ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี ค.ศ.1961 (Boyer et.al.,1977;Mitchell,1976;Avers,1986;Campbell,1995)

Peter Mitchell ได้เสนอหลักการสำคัญ 4 ข้อ ที่เกี่ยวข้องกับ chemiosmotic coupling hypothesis ไว้ดังนี้

1. ปกติผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียไม่ยอมให้โปรตอนและไฮดรอกซิลไอออน (OH) ผ่าน เช่นเดียวกับไอออนอื่น
2. ถ้าองค์ประกอบของระบบขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ยังคงฝังอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียตามปกติ เมื่อมีอิเล็กตรอนถูกส่งผ่านจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง โปรตอนก็จะเคลื่อนที่ตามโดยออกจาก matrix ผ่านผนังชั้นในเข้าสู่ช่องว่างระหว่างผนัง 2 ชั้นของไมโทคอนเดรีย (intermembrane space)
3. ATP synthase complex สามารถนำพลังงานที่อยู่ในรูป "electrochemical gradient" ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของโปรตอน ไปใช้ในการสร้าง ATP นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังสามารถใช้พลังงานจากการไฮโดรไลส์ ATP เพื่อผลักดันโปรตอนออกจาก matrix ได้
4. ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย มีระบบขนส่งโปรตอนและไฮดรอกซิลไอออน เพื่อช่วยส่งผ่านเมตาบอไลต์ (metabolites) ต่างๆ ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย หรือนำออกจาก matrix ได้

จากหลักการ 4 ข้อข้างต้น กล่าวได้ว่าผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่เป็นตัวแปรรูปพลังงาน (energy-transducing membrane) โดยขณะที่เกิดการขนส่งอิเล็กตรอนภายในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย โดยมีลักษณะเป็น redox loop (loop ละ 2 อิเล็กตรอน) ดังรูปที่ 11 อยู่นั้น โปรตอนจะถูกขับออกทาง matrix-side ( M-side ) ไปยัง cytosol (C-side) แต่ไฮดรอกซิลไอออนยังคงอยู่ที่ M-side ผลคือ ความเข้มข้นของโปรตอนที่ M-side ต่ำกว่า C-side เรียก pH ที่แตกต่างกันนี้ทำให้เกิด pH gradient ขึ้นและนอกจากนี้การเคลื่อนที่ของประจุบวก(โปรตอน) ดังกล่าวยังก่อให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า เรียก electrical gradient (หรือ electrical potential) ขึ้นด้วย

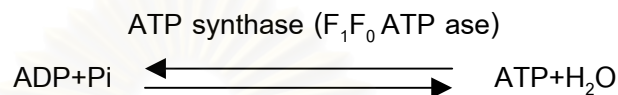


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 แผนภาพอธิบายทฤษฎีเคมีออสโมติก คัพปลิง (Mitchell, 1961)

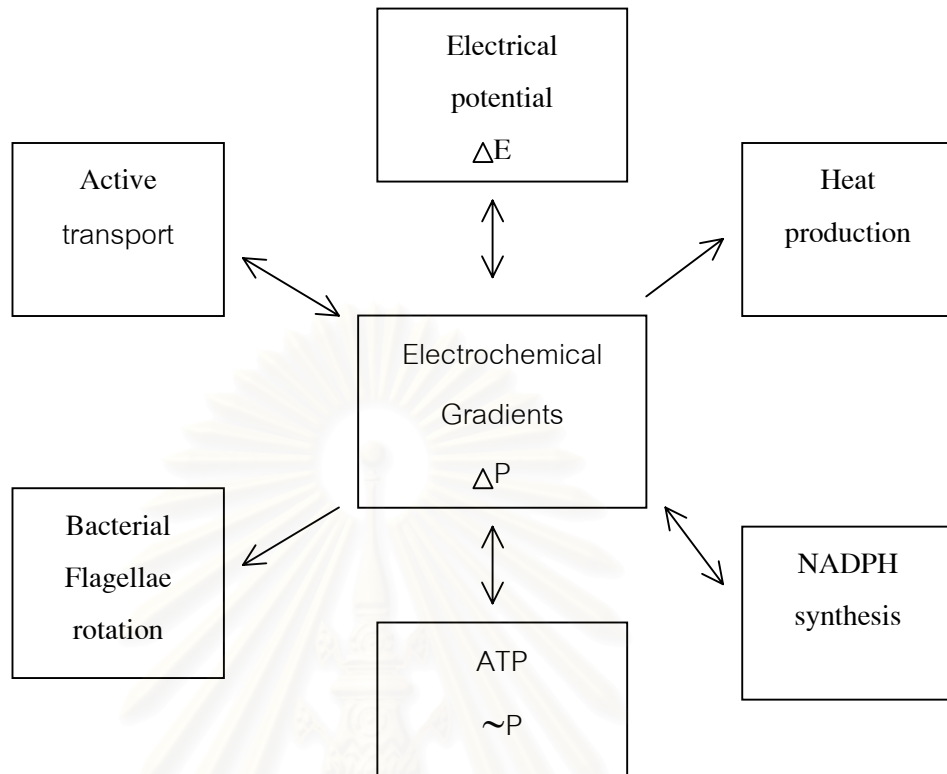


ผลรวมของ pH gradient (pH) และ electrical gradient เรียกว่า electrochemical gradient ของโปรตอน (หรืออาจเรียก proton motive force, P) ซึ่งเป็นพลังงานส่วนนี้จะผลักดันโปรตอนให้กลับเข้าสู่ matrix ทาง proton channel ของ  $F_0$  การเคลื่อนที่ดังกล่าวของโปรตอน จะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมา เพื่อนำไปใช้สร้าง ATP จาก ADP+Pi โดยเอนไซม์ ATP synthase ดังสมการต่อไปนี้



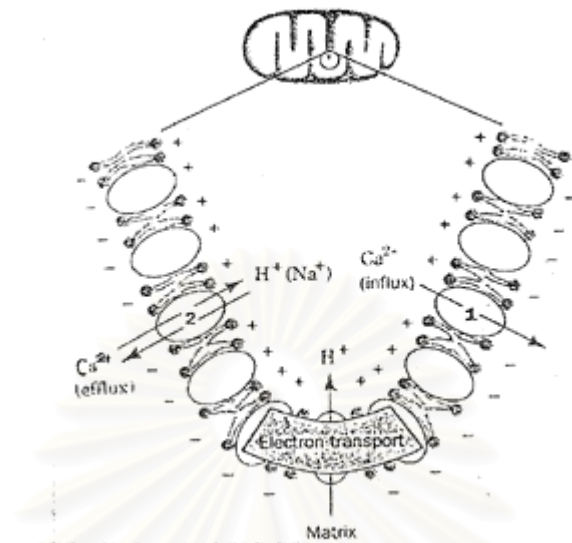
นอกจากไมโทคอนเดรียจะใช้ electrochemical gradient ในการสร้าง ATP แล้ว ไมโทคอนเดรียยังนำเอาพลังงานส่วนนี้ไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ ที่สำคัญอีก เช่น ใช้ในกระบวนการขนส่งเมตาบอไลต์และไอออนต่างๆ แบบ active transport ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ NADPH ใช้ในการเคลื่อนไหวของ flagella หรือสลายกลายเป็นพลังงานความร้อน (heat) เป็นต้น (ดังรูปที่ 12)

ส่วนการขนส่งแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) โดยไมโทคอนเดรีย นั้น พบว่าบทบาทของแคลเซียมคล้าย cAMP ทำหน้าที่เหมือน second messenger ไมโทคอนเดรีย endoplasmic reticulum (ER) และ extracellular space เป็นแหล่งเก็บสะสมแคลเซียม ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียแบ่งเป็น 2 ระบบแยกกันระหว่างการไหลเข้า (influx) และการไหลออก (efflux) ของแคลเซียม การไหลเข้าของแคลเซียมใช้แรงขับเคลื่อนจากความต่างศักย์ของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (ประจุลบข้างใน) ซึ่งจับกับประจุบวก อัตราการไหลเข้าแปรผันกับความเข้มข้นแคลเซียมภายนอก เพราะค่า  $K_m$  ของการขนส่งแคลเซียมโดยทางนี้มากกว่าความเข้มข้นแคลเซียมทางไซโตซอล ส่วนการไหลออกของแคลเซียมขับออกอย่างอิสระ โดยอาศัยการขนส่งอิเลคตรอนที่ทำให้เกิด  $\text{H}^+$  gradient ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย หรือถ้าในไมโทคอนเดรียของหัวใจใช้ความต่างศักย์ของ  $\text{Na}^+$  แทน แคลเซียมออกจาก matrix ทางเดียวโดยการแลกเปลี่ยนกับ  $\text{H}^+$  หรือ  $\text{Na}^+$



รูปที่12 แสดงถึงปฏิกิริยาต่างๆ ที่ใช้ electrochemical gradients ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ

โดยปกติขบวนการแลกเปลี่ยนนี้เกิดด้วยความเร็วสูงสุด ไมโตคอนเดรียจะทำหน้าที่เสมือนบัฟเฟอร์ (buffer) ต่อแคลเซียมในไซโตซอล คือถ้าความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลเพิ่ม อัตราการไหลเข้าของแคลเซียมในไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขณะที่การไหลออกของแคลเซียมจะคงที่ จนกระทั่งความเข้มข้นในไซโตซอลลดลงถึงระดับเริ่มต้น ในทางตรงกันข้าม ถ้าความเข้มข้นแคลเซียมในไซโตซอลลดลง อัตราการไหลเข้าเท่ากับอัตราการไหลออกของความเข้มข้นแคลเซียมรวมกับส่วนที่ทำให้ ความเข้มข้นแคลเซียมในไซโตซอลกลับเข้าสู่ระดับเริ่มต้น (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงการขนส่งแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ในไมโทคอนเดรีย (Voet,D. and Voet,J.G.,1990)

สารที่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันหรือสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย แบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Danishefsky,1980;Hatefi,1985;Voet,D. and Voet,J.G.,1990;Abeles,Frey and Jencks,1992) (รูปที่ 14) ได้แก่

1.1 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I คือจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone (เป็นสารพิษจากพืช ทำให้เกิดพิษในปลาและใช้เป็น insecticide), amytal, pipericin A , barbiturates, dimerol และ mercurials สารประเภทนี้ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกรณีที่ succinate เป็นตัวสเตรทเนื่องจาก succinate จะส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

1.2 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex II คือจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (site II) ได้แก่ antimycin A (antibiotic) แต่จะไม่สามารถยับยั้งสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น Ascorbate + TMPD ซึ่งสามารถส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง

1.3 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex IV คือจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide, azide และ carbon monoxide ซึ่งจะไปยับยั้งที่ cytochrome oxidase (cytochrome aa<sub>3</sub>) นั่นคือ ถ้ามีการยับยั้งที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทใดก็ตาม

2. สารจำพวก uncoupler สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H<sup>+</sup>-carrier หรือ proton-ionophores สามารถนำพา H<sup>+</sup> จากภายนอกผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้อย่างอิสระและทำลาย electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอน ทำให้ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ไม่เกิดขึ้นแต่ยังมีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ ดังนั้นจึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้นการสลาย ATP ด้วย (Heytler, 1981; Lehninger, 1993)

สาร uncouplers ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน เป็นกรดอ่อน และในสูตรโครงสร้างมักมี aromatic ring อยู่ด้วย สาร uncouplers แบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะทางเคมีและการออกฤทธิ์ (Heytler, 1981) ดังนี้

2.1 Classical uncouplers หรือเรียกว่า DNP-like, weak-acid, direct และ H<sup>+</sup>-ionophores uncoupler เช่น 2,4-dinitrophenol (DNP), carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weak acid) ที่มี pKa ระหว่าง 4.5-6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxy, heterocyclic -NH, amide, hydrazone -NH, carboxyl, sulfhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ทำลาย proton gradient โดยจะเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (unionize acid) ทำให้ proton (H<sup>+</sup>) สามารถผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H<sup>+</sup>-channel ของ F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> complex

2.2 The alkali - metal ionophores ได้แก่พวก antibiotics เช่น gramicidin, tyrothricin, tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ คือ นำเอา cation เช่น  $K^+$  เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ในกรณีของ valinomycin ซึ่งผ่านเข้าทางผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียทำให้เกิดการสลาย ของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิเดชันสแตนท์จะถูกนำไปใช้ในการ transport นำ cation เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย แทนที่จะใช้ในการสังเคราะห์ ATP

2.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้ด้วยกลไกต่างๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP ( $F_1$  factor) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งเป็นสารจากพืชที่มี phenolic groups อยู่ในโครงสร้าง สามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 nmole/mg protein ส่วน arsenic ทำให้เกิด uncoupling โดยจับกับ sulfhydryl groups อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่ม indirect uncouplers นี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

### 3. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

3.1 oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยไปยับยั้งที่  $F_0$  ของเอนไซม์ ATP synthase ทำให้ไม่สามารถส่งผ่านโปรตอนจาก  $F_0$  ไปยัง  $F_1$  ได้ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันรวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้เมื่อไมโทคอนเดรียอยู่ในภาวะ uncoupling (Senior, 1973; Voet and Voet, 1990)

3.2 atractyloside จะยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรียทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1993)

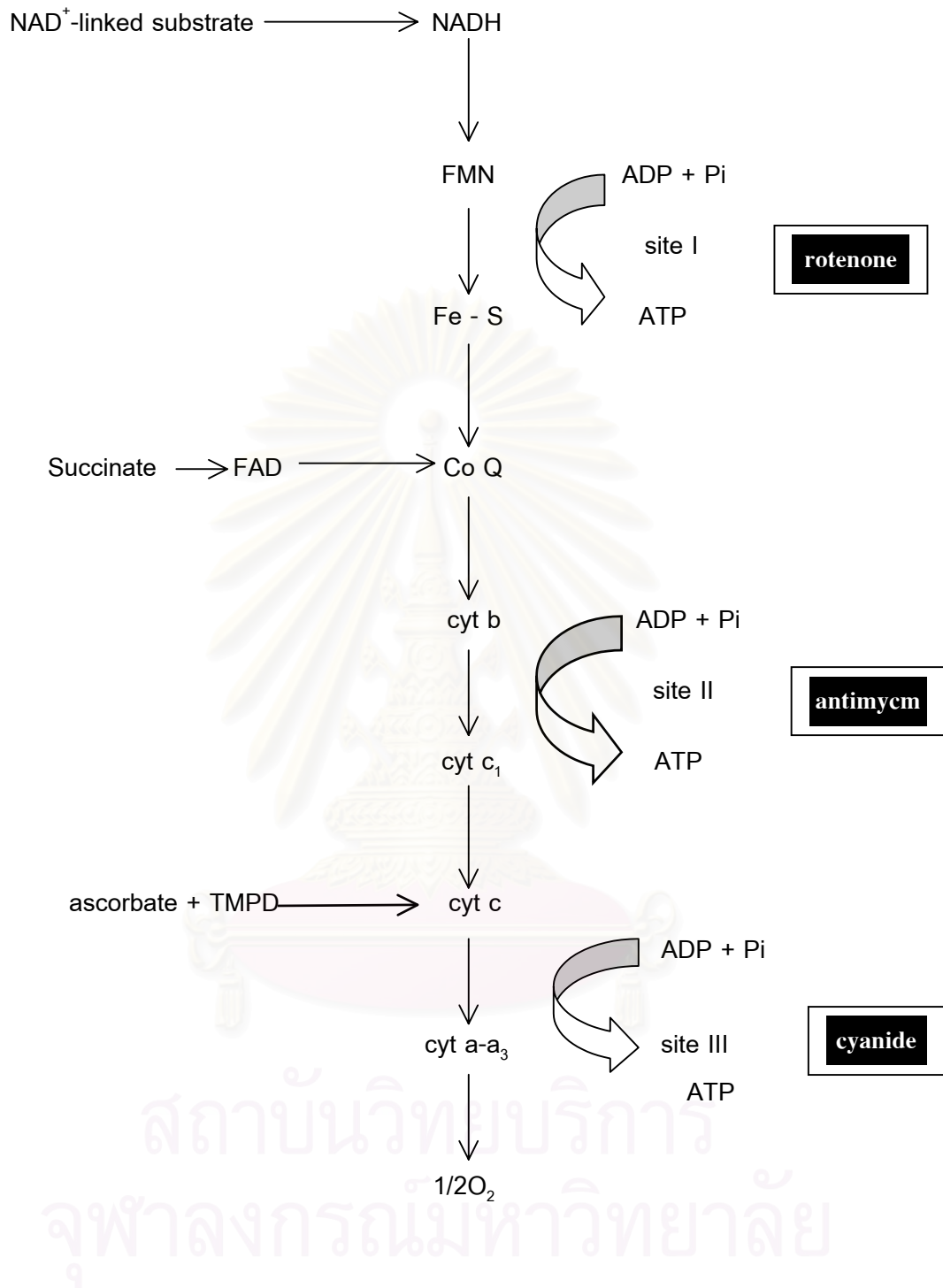
3.3 DTNB (5,5' - dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน  $P_i$  จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำให้ขาด  $P_i$  ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

3.4 N-ethylmaleimide (NEM) หรือ mersalyl จะมีผลยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งทำให้ไมโทคอนเดรียขาด Pi เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้ Pi ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Sartorelli, Erecinska and Wilson, 1981)

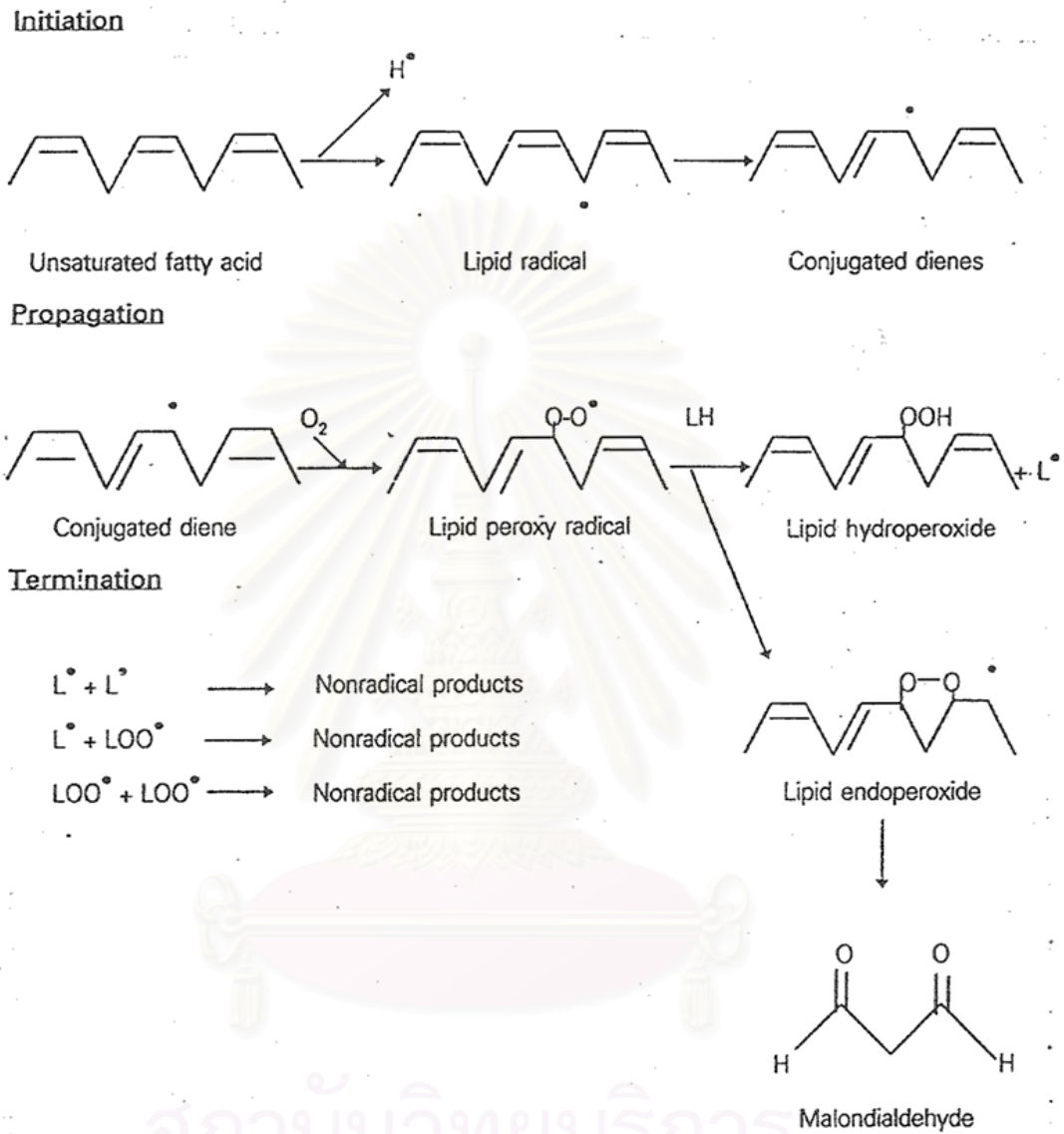
Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ lipid โดยการออกซิเดชันของ unsaturated fatty acids ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์สูญเสียหน้าที่ไป ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ (Haraguchi et al, 1995) เป็นการบาดเจ็บของเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะและสามารถทำให้เกิด liver necrosis, ischemia-reperfusion injury, coronary arteriosclerosis และ diabetes mellitus เป็นต้น ซึ่งการเกิดขึ้นนี้จะนำไปตามการสร้าง free radical ในเซลล์เนื้อเยื่อนั้นๆ และ lipid peroxidation นั้นมีกระบวนการที่ประกอบด้วยกันหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Buege and Aust, 1978) (รูปที่ 15)

1. **initiation** : เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเมตาบอลิซึมของสารพิษบางชนิดซึ่งจะไปแย่งที่ของ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid (ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของ lipid ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้ไม่คงตัวสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเคลื่อนที่ของพันธะคู่ภายในโมเลกุลจนทำให้เกิด lipid radical ที่เป็น conjugated diene

2. **propagation** : conjugated diene ที่เกิดขึ้นในช่วง initiation จะเกิดการรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิด lipid peroxy radicals ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้จะสามารถแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid ที่อยู่ใกล้เคียงได้ ทำให้เกิด lipid hydroperoxide และ lipid radicals ตัวใหม่ กระบวนการเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาได้ด้วยตัวเอง จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์เป็นวงกว้าง



รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกไซ้หายใจ (Hatefi, 1985)



หมายเหตุ: LH = unsaturated fatty acid

$L^\bullet$  = lipid radical

$LOO^\bullet$  = lipid peroxy radical



3. **termination** : เมื่อ lipid peroxidation ขยายวงกว้างไปเรื่อยๆจนกระทั่งไม่มีโมเลกุลของ unsaturated fatty acid เหลืออยู่ อนุมูลอิสระชนิดต่างๆก็จะทำปฏิกิริยากันเองจนกลายเป็น nonradical เป็นการหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดในกระบวนการ lipid peroxidation (Emest and Frank,1982; Emest and Patricia,1994) ผนังเซลล์ที่มีปริมาณ unsaturated fatty acid มาก มักเป็นเป้าหมายในการเกิด lipid peroxidation และการเกิด lipid peroxidation นี้มักทำให้ผนังเซลล์สูญเสียรูปร่างและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เกิดอันตรายต่อเซลล์นั้นๆโดยตรง นอกจากนั้นผลของ lipid peroxidation ยังสามารถลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน

### **โมโนเอมีนออกซิเดส(monoamine oxidases, MAO;monoamine:oxygen oxidoreductase (deaminating) EC 1.4.3.4)**

เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบได้ในหลายอวัยวะเช่น สมอง ตับ ลำไส้ และอวัยวะอื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เอนไซม์นี้จะฝังตัวแน่นในลักษณะของ integral protein อยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย(Schaitman,Erwin and Greenawalt,1967) มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารสื่อประสาทพวกเอมีนได้แก่ epinephrine, norepinephrine, dopamine, tyramine และ 5- hydroxytryptamine(5-HT) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณของสารพวกนี้ในระบบประสาท คือเป็นหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมสารกลุ่ม catecholamines ร่วมกับกระบวนการ methylation และ conjugation นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมปริมาณสารเอมีนอื่นๆไม่ว่าจะเป็นยาหรืออาหารที่รับจากภายนอกอีกด้วย

การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้เริ่มขึ้นเมื่อ Hare(1928) ค้นพบ tyramine oxidase ในตับกระต่าย ต่อมาผู้ค้นพบเอนไซม์อีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการออกซิเดชันของสารเอมีนได้แก่ adrenaline oxidase และ aliphatic amine oxidase (Blaschko,Richter and Schlossmann,1937,Pugh and Quastel,1937) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสามนี้มีคุณสมบัติที่เหมือนกันหลายประการ ภายหลัง Zeller(1951) จึงได้ตั้งชื่อขึ้นใหม่โดยรวมเรียกว่าโมโนเอมีนออกซิเดส

เนื่องจากสมมุติฐานเกี่ยวกับสาเหตุของการเกิดโรคซึมเศร้าเกี่ยวข้องกับระดับของสารสื่อประสาทเอมีนในสมองได้แก่ 5-HT และ norepinephrine ต่ำกว่าปกติ การที่เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสได้รับความสนใจเกี่ยวกับการบำบัดรักษาโรคซึมเศร้า เป็นเพราะว่าการยับยั้งเอนไซม์นี้ในร่างกาย มีผลทำให้ระดับของสารเอมีนในสมองสูงขึ้น และระดับของเอมีนเมตาบอลิท์ลดลง (Tipton,1977) นอกจากนี้จากการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออก

ซีเดสมีผลทำให้พฤติกรรมเปลี่ยนแปลงไป จึงได้นำมาใช้ทางการแพทย์ในการเป็นยารักษาโรคซึมเศร้า (antidepressants) เนื่องจากมีการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซีเดสโดยเฉพาะโมโนเอมีนออกซีเดสชนิดเอ (MAO-A) ในระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้เกิดการสะสมของระดับเอมีนในสมองเพิ่มขึ้น นอกจากนี้แล้วสารที่ยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซีเดสชนิดบี (MAO-B) ก็สามารถใช้เป็นยารักษาโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซึ่งมีอยู่เพียงตัวเดียวในปัจจุบันได้แก่ deprenyl หรือ selegiline จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซีเดสชนิดบีอย่างจำเพาะเจาะจงและยับยั้งแบบถาวร การรักษาผู้ป่วยโรคนี้จะให้ selegiline ร่วมกับ L-dopa เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดอาการข้างเคียงที่เกิดจาก L-dopa เนื่องจากยาไปรักษาระดับของ dopamine ในสมองไม่ให้เกิดการทำลายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เชื่อว่า selegiline ยังสามารถลดการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องมาจากกระบวนการออกซิเดชันของ dopamine และสารพิษอื่นๆ เช่น MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) โดยออกฤทธิ์เป็น antioxidant (Aminoff, 1995)

เนื่องจาก CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 เป็นสารสังเคราะห์ใหม่ โดยดัดแปลงสูตรโครงสร้างจาก CU 763-15-13 และ CU 763-15-14 ซึ่งคาดหวังว่าน่าจะมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ จึงเห็นว่าควรทำการทดสอบกับไมโตคอนเดรียเพื่อศึกษาผลที่เกิดขึ้นและเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

#### 2. การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย การเตรียมและปฏิบัติการนั้น ตับและไมโทคอนเดรียจะถูกเก็บโดยแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัดซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice-cold) การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจากตับหนูทำโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4°C ตลอดการเตรียม

#### ขั้นตอนการเตรียมแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักคือ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรีย

#### ขั้นตอนที่ 1 : การเตรียม liver homogenate

(1.) ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีที่หัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้องแล้วรีบตัดตับมาล้างด้วยสารละลาย isolated medium ที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัดหลายๆ ครั้งจนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลาย isolated medium ปริมาตรประมาณ 60-70 ml.

(2.) ตัดตับด้วยกรรไกรออกเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 0.3-0.5 ซม. ล้างเลือดอีกครั้งด้วยสารละลาย isolated medium จากนั้นนำไป homogenize ด้วย Heidolph tissue homogenizer type SO203 RZR2 ประมาณ 2-3 นาที (6-7 ครั้ง) จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-80 ml.

## ขั้นตอนที่ 2 : การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาปั่นแยก (centrifuge) ให้ได้ไมโทคอนเดรีย โดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model SCR 20B Rotor model RPR 18-3 โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภาพ(รูปที่ 16)

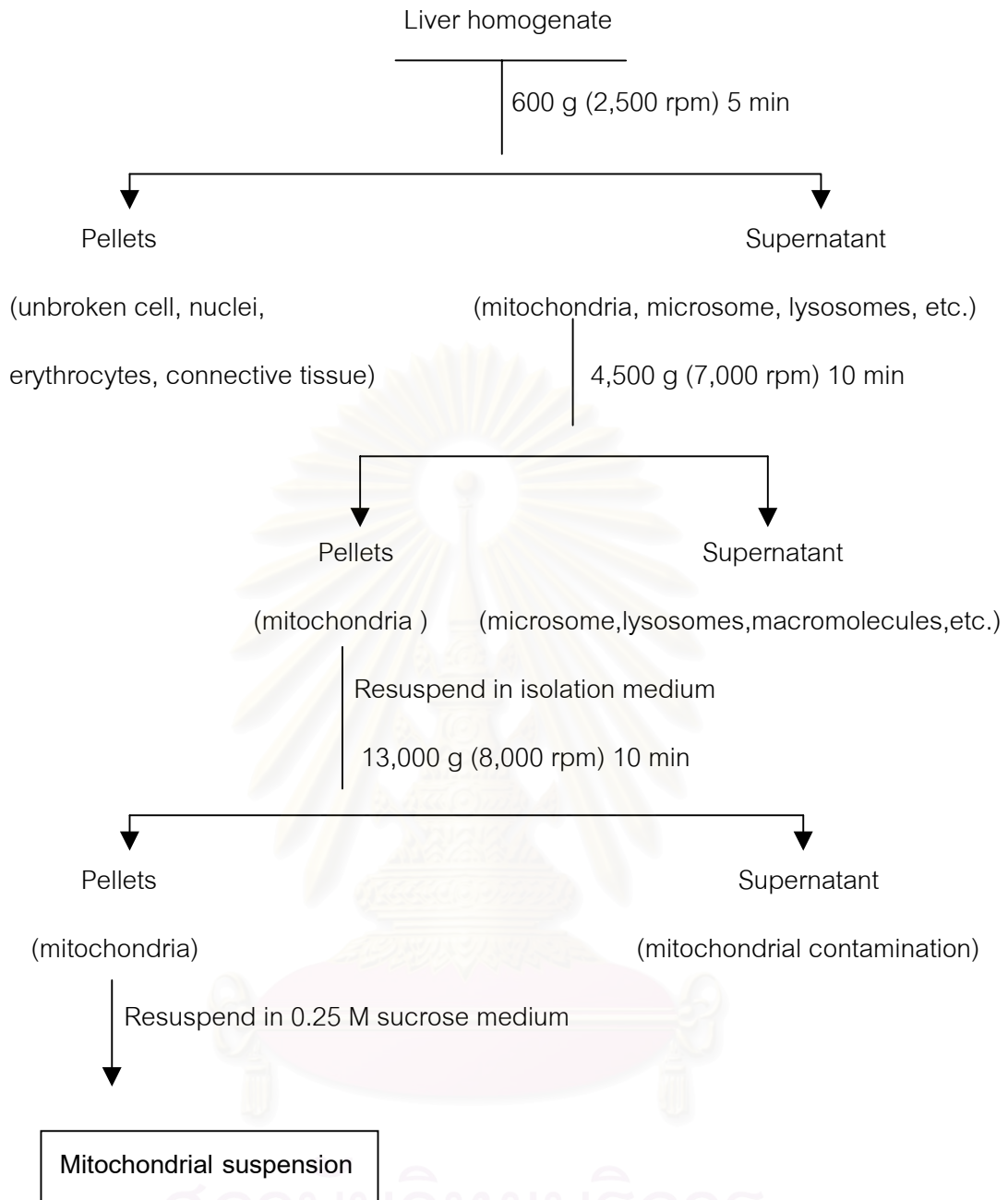
pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจนในหลอด centrifuge ชั้นบนจะเห็นเป็นสีชมพูและเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ คือ ชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างที่มีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่น คือ ชั้นของไมโทคอนเดรีย ส่วนของ supernatant fluid ที่ทิ้งและล้างส่วนที่เป็นไมโครโซมออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose เล็กน้อย จนเหลือเพียงส่วนของไมโทคอนเดรียที่มีสีน้ำตาล นำมา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml. Homogenize ด้วยมืออย่างเบาๆ จะได้ mitochondrial suspension สำหรับใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโทคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีน มีค่าประมาณ 30-60 mg/ml. และเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรทจะได้ค่า RCI >4 (ที่ 37°C)

### การเตรียม osmotic-shocked mitochondria

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้มาเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 2 เท่า จากที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หมุนกวนช้าๆ ด้วย magnetic stirrer ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลา จากนั้นให้นำ osmotic-shocked mitochondria เก็บในภาชนะแช่แข็ง (ice-bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### การเตรียม mitochondria เพื่อศึกษา lipid peroxidation

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้จากการปั่นครั้งที่ 3 ดังวิธีข้างต้นมาล้างด้วย 1.1% KCl 2 ครั้งและ resuspended ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 แล้วนำไปแช่แข็ง (ice-bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge (Hogeboom,1955;Myers and Slater,1957;Sordahl,1971)

### 3. การเตรียม Incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลองได้ดังนี้

#### 3.1 incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับศึกษาอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ประกอบด้วย : HEPES buffer	40	mM	(60 mOsm)
MgCl <sub>2</sub>	2	mM	(6 mOsm)
KCl	92	mM	(184 mOsm)

(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 milliosmolar) ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

#### 3.2 hypotonic incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria

ประกอบด้วย : HEPES buffer	40	mM	(60 mOsm)
MgCl <sub>2</sub>	2	mM	(6 mOsm)
KCl	29.5	mM	(59 mOsm)

#### 3.3 incubation medium สำหรับศึกษาการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) ประกอบด้วย 0.025 M inorganic phosphate (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>) buffer pH 7.2

#### 3.4 incubation medium สำหรับศึกษาการทดลอง lipid peroxidation ประกอบด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 7.4

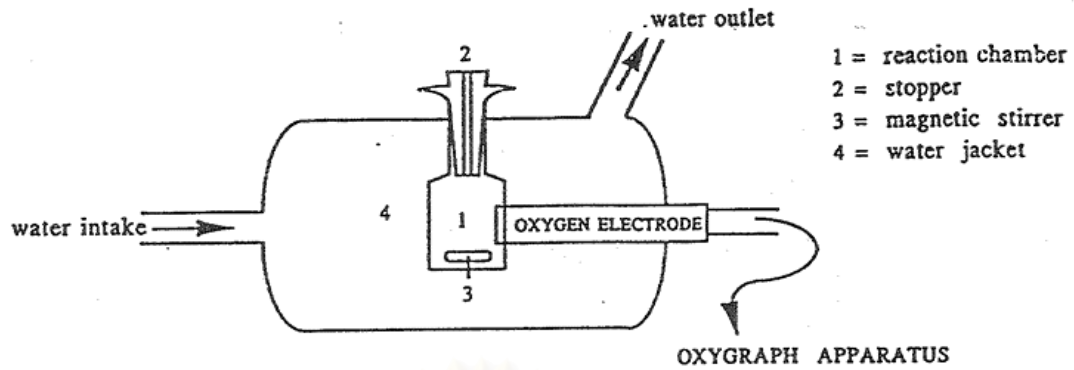
### 4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique (Sordahl et al., 1971) เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ Gilson reaction chamber ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 ml. ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้นและมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูเล็กๆ สำหรับเติมสารต่างๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโทคอนเดรียใน reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณ

ออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลอง เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามด้วยอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้ โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับของเหลวใน chamber และปริมาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนที่วัดได้โดย oxygen electrode นี้ จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีหน้าปัทม์บอกปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ ซึ่งสามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson recorder (model N2) บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่างๆ tracing ที่ปรากฏบนกระดาษบันทึกโดยวิธีนี้เรียกว่า oxygen-electrode tracing (polarographic tracing or oxygraph tracing)

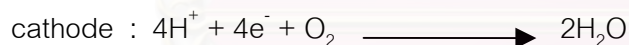
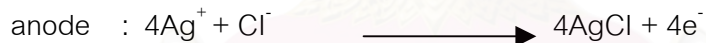
ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาใน reaction chamber เข้ากันดีตลอดเวลา ใช้น้ำที่ปรับอุณหภูมิจากอ่างควบคุมอุณหภูมิไหลผ่านเข้าและออกส่วนของ chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง น้ำที่มีอุณหภูมิตามที่ต้องการจะวนเวียนหล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก reaction chamber ทำให้อุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber คงที่ตามต้องการ ในที่นี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่  $37^{\circ}\text{C}$

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะมีค่าที่ระดับ 100% saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆลดลง วัดอัตราการลดลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode เมื่อต้องการใช้งานจะใช้ half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น



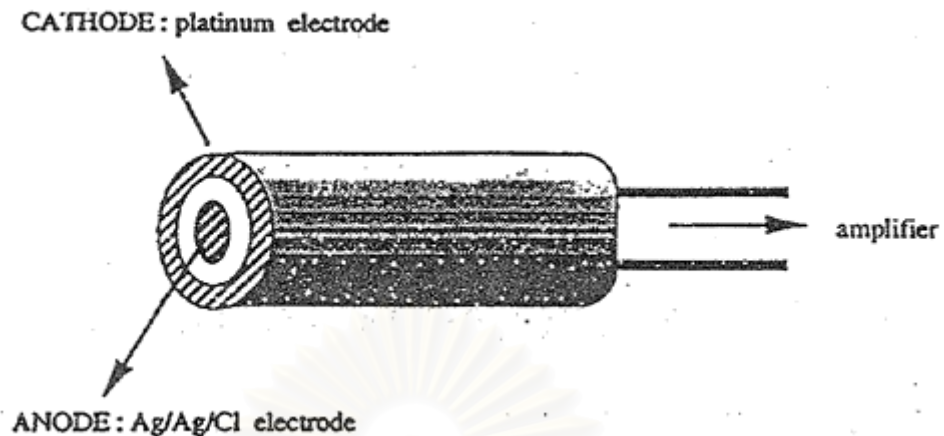
รูปที่ 17 แสดง Reaction chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor+recorder)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ



ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้นจะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้ว เกิดขึ้นและกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้

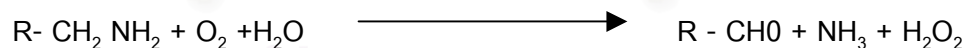




รูปที่ 18 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งเป็น Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

#### 5. การศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

อาศัยหลักการในการติดตามการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเช่นเดียวกัน monoamine oxidase เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของไมโตคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการออกซิไดส์สารพวก amine โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษา activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้สับสเตรทและ incubation medium ที่เหมาะสม และใช้ sodium phosphate buffer เป็น incubation medium นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดส์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบถึง monoamine oxidase activity ได้

## การแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโทคอนเดรีย มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจนอิสระ ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญ เป็นดังนี้

State	Condition
1	มีเพียง O <sub>2</sub>
2	มี O <sub>2</sub> และ ADP
3(active state)	มี O <sub>2</sub> ADP และ Substrate
3u	มี uncoupler
4(resting state)	มี O <sub>2</sub> และ Substrate
5	มีเพียง Substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca <sup>2+</sup>

6. การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

### 6.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโทคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริเลชันค่า RCI นี้แสดงถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้ว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ โดยปกติแล้วจะมีค่า RCI > 4 การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned}
 \text{RCI} &= \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4}} \\
 &= \frac{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 4}}
 \end{aligned}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 19 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน x ของทั้ง 2 states ยาวเท่ากันดังนั้น

$$\text{RCI} = \frac{Y_1/X}{Y_2/X} = \frac{Y_1}{Y_2}$$

## 6.2 การคำนวณค่า P/ O ratio

P/O ratio คือ อัตราส่วนของจำนวนโมเลกุลของ ATP ที่ถูกสร้างต่อออกซิเจน 1 อะตอม ( $1/2 \text{ O}_2$ ) ใน state 3 respiration ค่า P/O ratio สามารถคำนวณได้ตามวิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (1967) ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

$$\text{P/O} = \frac{\text{จำนวน nmoles ของ ATP ที่ถูกสร้างขึ้น}}{\text{จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$

จำนวน nmoles ของ ATP ที่สร้างขึ้นจะเท่ากับ nmoles ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา และสามารถคำนวณจากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไป

จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างที่ 20 ดังนี้

$$\text{จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างการเกิด state 3} = Q \times \frac{S}{p}$$

โดยที่ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และคุณสมบัติของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตรของ reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีอุณหภูมิสูง

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จาก ค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation mixture 1 ml.(A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation mixture 1 ml. หาได้จากสมการ

$$A = \frac{S \times P \times N \times 10^9 \text{ n atoms O/ml.}}{V \ 100}$$

เมื่อ A = จำนวน n atoms. ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml.

S = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 mm. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 mm.) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37°C

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรก๊าซที่ 0°C ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml.

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ 1 ml. (A) ที่อุณหภูมิ 37°C มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml.

### 6.3 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 21 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times S \text{ n atoms O/min}}{P}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน นนอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์อยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน n atoms O/ml./min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 21 เช่นกัน

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times A}{P} \text{ n atoms O/ml./min}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

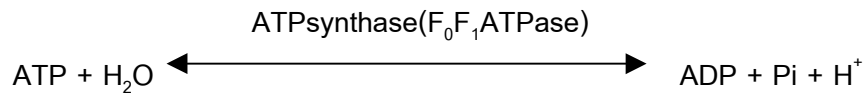
A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์ อยู่ในน้ำ 1 ml.

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 6.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37°C ซึ่งมีค่า A ในที่นี้ จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml.

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

## 7. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ATP จะเกิดผลผลิตคือ ADP, Pi และ H<sup>+</sup> ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



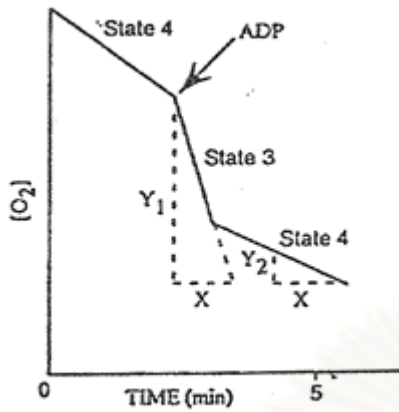
ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

- 7.1 โดยการวัดจำนวน  $\text{H}^+$  ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina and slater, 1975)
- 7.2 โดยการวัดปริมาณของ  $\text{P}_i$  ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

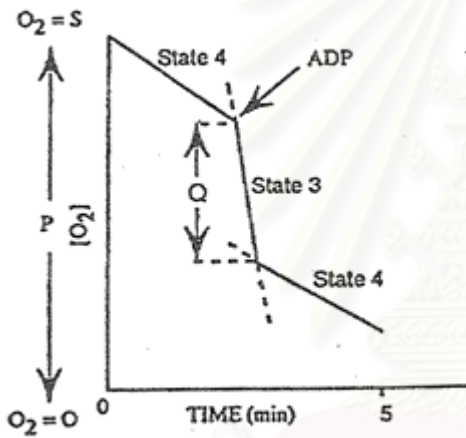
ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีวัดปริมาณ  $\text{P}_i$  ที่เกิดจากการสลายของ ATP ในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้คือ

**ขั้นตอนที่ 1** เป็นการ incubated ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml. อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

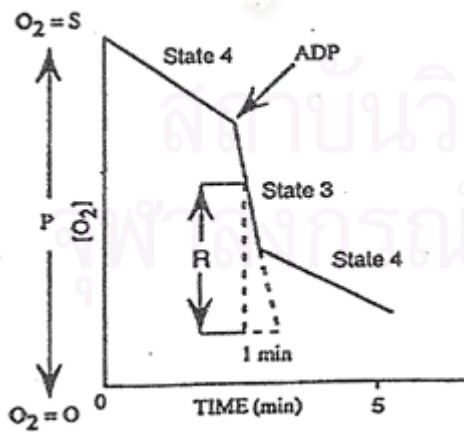
**ขั้นตอนที่ 2** เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ  $\text{P}_i$  ที่เกิดขึ้น จากที่ได้ในขั้นที่ 1 ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow(1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 ml. 20% sodium sulfite 2.5 ml. และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ  $\text{P}_i$  จากกราฟมาตรฐานของ  $\text{P}_i$  ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าของตัวอย่าง



รูปที่ 19 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 20 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการคำนวณค่าอัตราส่วน P/O



รูปที่ 21 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

## วิธีการวัดหา ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml. ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่  $37^{\circ}\text{C}$  ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา
2. เติม mitochondrial suspension 200  $\mu\text{l}$ .
3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบแล้วรอเวลา 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะมีเติม solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน)
4. เติม 0.1 M ATP 150  $\mu\text{l}$ . แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้วจึงดูด reaction mixture มาเป็น sample ปริมาณ 1 ml. แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ trichloroacetic acid 1 ml. อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm. นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant 1 ml. (ถ้าเป็น blank ใช้ น้ำกลั่น 1 ml. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml. ของ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 ml. อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม 2.5% นน./ปริมาตร ammonium molybdate 0.8 ml.
9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ  $3 \times 2 = 6$ ) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นตามต้องการ

(หมายเหตุ : ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน)



## 8. การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จาก ตับหนูขาว สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายต่างจะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

### วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10  $\mu$ l. ด้วยน้ำกลั่น 3 ml. (1:300) จะได้สารละลาย A
2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml. ใส่ในหลอดทดลองเติม alkaline copper reducing agent 1 ml. (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml. ส่วนในกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml. ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml. แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml. เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลานาน 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียหน่วยเป็น mg/ml.

### การเตรียมสารละลายที่ใช้

-Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5%  $\text{CuSO}_4$  ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ละลายอยู่ใน 0.5M NaOH

-Folin-Phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10(v/v) และเตรียมใช้ทันที

### 9. การวัดการเกิด lipid peroxidation (Thiete and Huff, 1959) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1. นำ rat liver mitochondrial pellets มา 100  $\mu\text{l}$ . incubate ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 3 ml.
2. ใส่สารทดสอบ incubate นาน 1 นาที
3. ใส่ 0.2 mg ascorbate และ 1 mM  $\text{FeSO}_4$  จากนั้นนำมา incubated ใน shaker bath (Hetofrig, Denmark), oscillating 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $38^\circ\text{C}$
4. นำมาเติม 20% trichloroacetic acid 2 ml. และนำมา centrifuged ที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูด supernatant มา 1 ml. แล้วเติม 0.5% Thiobarbituric acid 4 ml. แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ  $80^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
6. นำมาวัดหา absorbance ที่ความยาวคลื่น 535 nm. ในความกว้าง cuvette ที่แสงผ่าน 10 mm.

หมายเหตุ : 1 Unit คือ ค่า absorbance 0.100 ที่ 535 nm. ในความกว้าง cuvette ที่แสงผ่าน 10 mm.

### 10. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียมสารเคมีและตัวอย่างยาต่างๆ จะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ ultrapure water ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นหลัก

### 10.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น (ultrapure water) ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ขนาด 10  $\mu$ l., 1 M succinate (pH 7.2) ขนาด 10  $\mu$ l., 0.2 M NADH ใน 1% NaHCO<sub>3</sub> ขนาด 10  $\mu$ l., 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ขนาด 2  $\mu$ l., 2 mM ADP ขนาด 10  $\mu$ l., 0.05 M DNP ขนาด 2-6  $\mu$ l., 0.1 M ATP (pH 7.2) ขนาด 150  $\mu$ l., 1 M DTT ขนาด 2-3  $\mu$ l., atractyloside 10 mg./ml. ขนาด 10  $\mu$ l., bovine serum albumin 250 mg./ml. ขนาด 20-120  $\mu$ l., 0.25 M sucrose, 1 mM EGTA (pH 7.2), 1 M HEPES buffer, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 2.3 M KCl, 0.025 M และ 0.05 M potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ขนาด 5 ml., 0.4 M CaCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ l., 2.5  $\mu$ M malonate ขนาด 10  $\mu$ l., 1 mM FeSO<sub>4</sub> ใน 0.002 N HCl ขนาด 2  $\mu$ l., 0.2 mg/10  $\mu$ l. ascorbate, 1.1% KCl, 20% w/v trichoroacetic acid 0.5% thiobarbituric acid ใน 0.25 N HCl 0.1 M tyramine ขนาด 10  $\mu$ l., 0.1 M 5-HT ขนาด 10  $\mu$ l., 0.1 M benzylamine ขนาด 10  $\mu$ l.

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่

10  $\mu$ g. rotenone ขนาด 10  $\mu$ l., สาร CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04, iproniazid และ 0.1 M DTNB ขนาด 2  $\mu$ l.

### 10.2 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารสังเคราะห์ CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical คือ

ADP,ATP,ammonium molybdate, BSA,copper sulfate(CuSO<sub>4</sub>),DMSO,DNP,DTT,EGTA,Folin & Ciocalteu's phenol reagent, L-glutamic acid, atractyloside, malic acid, oligomycin,

potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, potassium tartrate, rotenone, sodium hydroxide, sodium sulfite, sodium bisulfite, succinic acid, sucrose, magnesium chloride, potassium chloride, HEPES buffer, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, 5- hydroxytryptamine creatinine sulphate complex, benzylamine hydrochloride, tyramine hydrochloride, DTNB

สารเคมีจากบริษัท E. Merck, Darmstadt คือ sodium carbonate, sulfuric acid, hydrochloric acid, potassium hydroxide, absolute ethanol

## 11. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

### 11.1 การแสดงผลการทดลอง แสดงเป็น 2 ลักษณะคือ

#### 11.1.1 Oxygraph tracing

เป็น oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลอง แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ ด้วยตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บซึ่งกำกับแต่ละระยะของ oxygraph tracing มีหน่วยเป็น n atoms O/ml/min

#### 11.1.2 ตารางและแผนภูมิแท่ง

### 11.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้สถิติชนิด two-tailed unpaired student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง

## บทที่ 4

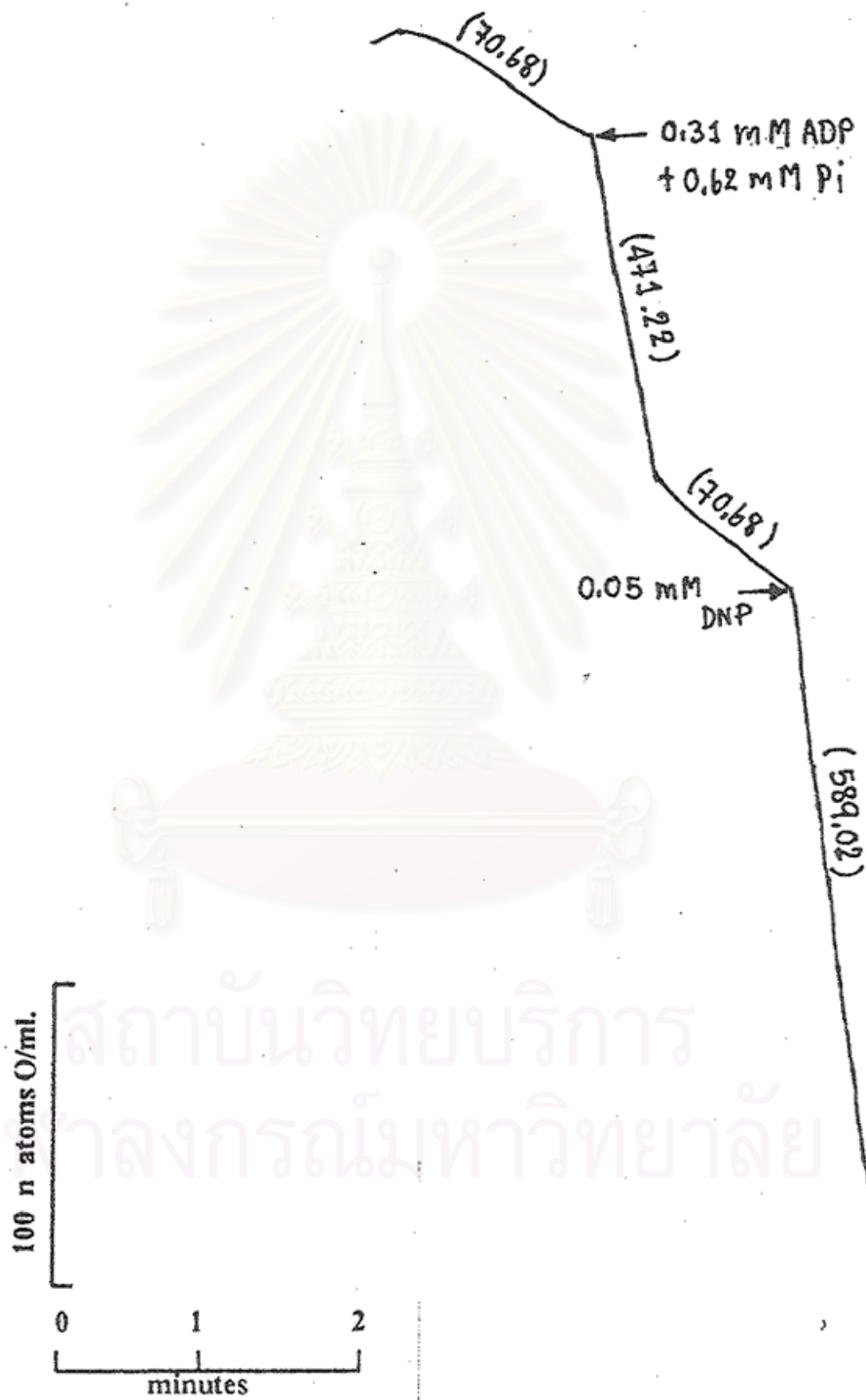
### ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ผลของอนุพันธ์ N-acylaminopyridine ได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

#### 1. เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 22 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกกระยะของทุก oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆโดยคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยามีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน medium มี glutamate+ malate เป็นสับสเตรท ปริมาณของสับสเตรทมีอยู่มากเกินพอที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรกนี้มีค่า 70.68 n atoms O/ml/min เรียกกระยะ (state) ที่มีไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย ไมโตคอนเดรีย+ ออกซิเจน+สับสเตรท ขาดแต่เพียง ADP ว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP ลงไป จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะนี้จะเป็น 471.22 n atoms O/ml/min เป็นการสร้าง ATP จากปฏิกิริยา  $ADP+P_i \rightarrow ATP$  แล้วอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจึงช้าลงเป็น 70.68 n atoms O/ml/min คืบสู่ state 4 ตามเดิม เรียกกระยะที่ไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วเนื่องจากการเติม ADP ลงไปนี้ว่า state 3 respiration หรือ active state และเรียกการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP ลงไปนี้ว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) และถือว่าเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโตคอนเดรีย คือถ้าไม่มี ADP (state 4) อัตราการหายใจจะช้า และถ้ามี ADP (state 3) อัตราการหายใจจะเร็วขึ้นและเรียกอัตราส่วนของอัตราการหายใจใน state 3/อัตราการหายใจใน state 4 ว่า respiratory control index (RCI) ดังนั้น RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ  $471.22/70.68 = 6.67$  สารเคมีบางอย่างเช่น DNP มีคุณสมบัติที่สามารถทำให้การควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรียนี้เสียไป โดย DNP สามารถกระตุ้น state 4 ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้  $ADP+P_i$  (ไม่มีการสร้าง ATP) และมีผลทำให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction medium เรียกว่า DNP ทำให้เกิดภาวะอันคับปลิงของกระบวนการ oxidative และ phosphorylation ให้แยกจากกัน ดังนั้นการเติม DNP ลงไปใน

ระยะสุดท้ายของรูปที่ 22 จึงทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะนี้เป็น 589.02 n atoms O/ml/min และมีการใช้ออกซิเจนติดต่อกันจนกระทั่งหมดไปในที่สุด ( $O_2=0$ )



รูปที่ 22 กราฟแสดง oxygraph tracing ของไมโตคอนเดรีย

จากรูปที่ 23 A แสดงถึงผลของ CU 763-16-04 ขนาดต่างๆที่มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนู เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อใส่สารขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.24  $\mu\text{M}$ ) , 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.73  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{g}$  (0.97  $\mu\text{M}$ ) และ 300  $\mu\text{g}$  (1.46  $\mu\text{M}$ ) เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi พบว่า CU 763-16-04 สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น  $19.21 \pm 1.82$ ,  $8.26 \pm 1.24$ ,  $8.15 \pm 0.71$ ,  $7.13 \pm 0.26$  และ  $6.28 \pm 0.74$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ และอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น  $28.41 \pm 1.31$ ,  $14.81 \pm 1.27$ ,  $10.66 \pm 0.49$ ,  $8.84 \pm 0.02$  และ  $6.60 \pm 0.67$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา จากรูปที่ 22 B ขนาดของสาร CU 763-16-04 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ใน state 3 ซึ่งเท่ากับ 65.97  $\mu\text{g}$  (0.32  $\mu\text{M}$ ) และค่า  $IC_{50}$  สำหรับยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย DNP มีค่าเท่ากับ 80.34  $\mu\text{g}$  (0.39  $\mu\text{M}$ )

รูปที่ 24 A แสดงให้เห็นว่า CU 763-18-01 มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือ เมื่อเติม CU 763-18-01 ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.78  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{g}$  (1.40  $\mu\text{M}$ ), 300  $\mu\text{g}$  (1.55  $\mu\text{M}$ ), 500  $\mu\text{g}$  (2.59  $\mu\text{M}$ ), 700  $\mu\text{g}$  (3.63  $\mu\text{M}$ ), 800  $\mu\text{g}$  (4.15  $\mu\text{M}$ ), 900  $\mu\text{g}$  (4.66  $\mu\text{M}$ ) และ 1,000  $\mu\text{g}$  (5.18  $\mu\text{M}$ ) เป็นเวลา 1 นาที เติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า CU 763-18-01 ลดลงเป็น  $45.61 \pm 1.49$ ,  $36.47 \pm 2.25$ ,  $27.39 \pm 1.8$ ,  $21.64 \pm 1.12$ ,  $18.68 \pm 0.92$ ,  $13.75 \pm 1.06$ ,  $10.75 \pm 1.42$ ,  $10.07 \pm 1.30$ ,  $8.34 \pm 0.93$ , และ  $4.91 \pm 0.75$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U respiration ลดลงเป็น  $56.55 \pm 1.02$ ,  $51.45 \pm 1.78$ ,  $37.35 \pm 1.04$ ,  $33.05 \pm 1.13$ ,  $32.27 \pm 0.85$ ,  $20.68 \pm 1.32$ ,  $15.95 \pm 1.97$ ,  $15.68 \pm 1.11$ ,  $8.75 \pm 1.17$  และ  $4.02 \pm 1.41$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา จากรูปที่ 24 B ขนาดของสาร CU 763-18-01 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ใน state 3 ซึ่งเท่ากับ 406.52  $\mu\text{g}$  (2.11  $\mu\text{M}$ ) และค่า  $IC_{50}$  สำหรับยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย DNP มีค่าเท่ากับ 504.35  $\mu\text{g}$  (2.61  $\mu\text{M}$ )

รูปที่ 25 A แสดงให้เห็นว่า CU 763-18-02 มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติม CU 763-18-01 ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.78  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{g}$  (1.40  $\mu\text{M}$ ), 300  $\mu\text{g}$  (1.55  $\mu\text{M}$ ), 500  $\mu\text{g}$  (2.59  $\mu\text{M}$ ) และ 1,000  $\mu\text{g}$  (5.18  $\mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า

CU 763-18-02 สามารถกระตุ้นให้อัตราการใช้ออกซิเจน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)  $32.12 \pm 1.52$  และ ค่อยๆลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เป็น  $48.2 \pm 2.08, 45.82 \pm 2.15, 45.55 \pm 1.68, 41.88 \pm 1.37, 35.84 \pm 1.29, 34.12 \pm 1.03$  และ  $29.51 \pm 1.52$  n atoms O/min/mg proteinตามลำดับ และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เป็นในกรณีเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม(DMSO)  $41.12 \pm 0.64$  ลดอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น  $72.81 \pm 1.15, 63.23 \pm 1.52, 50.49 \pm 1.84, 49.00 \pm 1.37, 47.73 \pm 1.58, 39.95 \pm 1.94$  และ  $27.38 \pm 2.19$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา จากรูปที่ 25 B ขนาดของสาร CU 763-18-02 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ใน state 3 และ state 3U มีค่ามากกว่า  $1,000 \mu\text{g}$  ( $5.18 \mu\text{M}$ )

รูปที่ 26 A แสดงให้เห็นว่า CU 763-18-04 มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติม CU 763-18-04 ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ),  $100 \mu\text{g}$  ( $0.51 \mu\text{M}$ ),  $150 \mu\text{g}$  ( $0.77 \mu\text{M}$ ),  $200 \mu\text{g}$  ( $1.03 \mu\text{M}$ ),  $300 \mu\text{g}$  ( $1.54 \mu\text{M}$ ),  $500 \mu\text{g}$  ( $2.56 \mu\text{M}$ ),  $700 \mu\text{g}$  ( $3.59 \mu\text{M}$ ),  $800 \mu\text{g}$  ( $4.10 \mu\text{M}$ ),  $900 \mu\text{g}$  ( $4.61 \mu\text{M}$ ) และ  $1,000 \mu\text{g}$  ( $5.13 \mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม  $0.31 \text{ mM ADP} + 0.62 \text{ mM Pi}$  พบว่า CU 763-18-04 สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น  $44.91 \pm 1.12, 31.08 \pm 0.86, 27.38 \pm 1.88, 26.65 \pm 0.99, 21.30 \pm 0.91, 19.15 \pm 2.86, 13.21 \pm 1.02, 12.32 \pm 1.02, 11.15 \pm 0.68$  และ  $11.04 \pm 0.67$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น  $48.82 \pm 1.73, 43.91 \pm 1.29, 34.41 \pm 1.21, 32.32 \pm 1.23, 25.26 \pm 1.32, 18.93 \pm 1.11, 10.57 \pm 0.38, 9.68 \pm 1.02, 8.71 \pm 1.44$  และ  $8.60 \pm 0.24$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับเมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา จากรูปที่ 26 B ขนาดของสาร CU 763-18-04 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ใน state 3 ซึ่งเท่ากับ  $605.56 \mu\text{g}$  ( $3.10 \mu\text{M}$ ) และค่า  $IC_{50}$  สำหรับยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย DNP มีค่าเท่ากับ  $450 \mu\text{g}$  ( $2.31 \mu\text{M}$ )

รูปที่ 27 A แสดงให้เห็นว่า iproniazid มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติม iproniazid ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.18 \mu\text{M}$ ),  $100 \mu\text{g}$  ( $0.36 \mu\text{M}$ ),  $150 \mu\text{g}$  ( $0.54 \mu\text{M}$ ),  $200 \mu\text{g}$  ( $0.72 \mu\text{M}$ ),  $300 \mu\text{g}$  ( $1.08 \mu\text{M}$ ),  $500 \mu\text{g}$  ( $1.81 \mu\text{M}$ ) และ  $1,000 \mu\text{g}$  ( $5.13 \mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม  $0.31 \text{ mM ADP} + 0.62 \text{ mM Pi}$  พบว่า iproniazid สามารถกระตุ้นทำให้อัตราการใช้ออกซิเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)  $32.12 \pm 1.52$  และค่อยๆลดอัตราการใช้ออกซิเจนลงใน state 3 respiration เป็น  $69.57 \pm 1.03,$



67.97±2.01, 62.62±2.14, 49.92±1.29, 47.80±1.33, 43.87±2.00 และ 37.14±2.15 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เป็นในกรณีเดียวกันคือ 88.58±2.09, 86.23±1.72, 79.69±1.16, 78.54±1.0, 60.14±1.83, 55.78±1.38, 51.42±1.68 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) ใน state 3 และ state 3U มีแนวโน้มต้องใช้ขนาดมากกว่า 1,000 µg (3.16 µM)

## 2. เมื่อใช้ NAD<sup>+</sup>- linked substrate ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate+malate

### 2.1. เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็นสับสเตรท

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า CU 763-16-04 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด 50 µg (0.24 µM) และ 100 µg (0.49 µM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นเติม 0.31 mM ADP +0.62 mM Pi พบว่า CU 763-16-04 สามารถ ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 14.65±12.09 และ 12.01±0.21 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม(DMSO) คือ 17.70±1.30 n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม 0.06 mM DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น 17.36±1.85 และ 14.65±0.42 n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ(p<0.05) ตามลำดับเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO) เป็น 22.28±1.02 n atoms O/min/mg protein ส่วน CU 763-18-01 ทำให้อัตราการหายใจใน state 3 ขนาด 50µg (0.26 µM) ได้เป็น 20.96±0.96 n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ(p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO) และเมื่อเพิ่มขนาดเป็น 100 µg (0.52 µM) ทำให้เกิดการลดอัตราการหายใจลงเป็น 15.89±0.89 n atoms O/min/mg protein (p<0.05) ใน state 3U respiration พบว่าขนาด 50µg (0.26 µM) กระตุ้นอัตราการหายใจเล็กน้อยคือ 23.02±1.33 n atoms O/min/mg protein ไม่มีนัยสำคัญ แต่เพิ่มขนาดเป็น 100 µg (0.52µM) ทำให้อัตราการหายใจลดลง 17.62±0.97 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ (p<0.05) ส่วน CU 763-18-02 มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration คือเมื่อเติมสารในขนาด 50 µg (0.24 µM) และ 100 µg (0.52 µM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า CU 763-18-02 ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เป็น 22.00±0.82 และ 22.79±2.02 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ (p<0.05) และเมื่อเติม 0.06 mM DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เป็น 24.07±1.27 และ 25.28±1.23 n atoms O/min/mg protein ส่วน CU 763-

18-04 มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 3 ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) ได้  $20.19 \pm 1.48$  n atoms O/min/mg protein ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเพิ่มขนาดเป็น 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ ออกซิเจนลดลงเป็น  $16.91 \pm 0.85$  n atoms O/min/mg protein ไม่มีนัยสำคัญใน state 3U respiration พบว่า 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการหายใจเป็น  $22.93 \pm 1.36$  และ  $20.46 \pm 1.71$  n atoms O/min/mg protein iproniazid มีผลต่ออัตราการหายใจ state 3 และ state 3U respiration คือ เมื่อเติมสารในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.18  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.36  $\mu\text{M}$ ) พบว่า iproniazid ทำให้อัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 3 respiration เป็น  $22.28 \pm 1.06$  และ  $21.72 \pm 1.07$  n atoms O/min/mg protin ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO) และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $26.40 \pm 1.39$  และ  $25.31 \pm 1.83$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ

## 2.2 เมื่อใช้ $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับ  $\alpha$ -ketoglutarate โดยเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น  $\beta$ -hydroxybutyrate ได้ผลดังนี้คือ

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า CU 763-16-04 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.024  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi พบว่า CU 763-16-04 ทำให้อัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น  $11.90 \pm 1.61$  และ  $8.21 \pm 2.43$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเติม 0.06 mM DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น  $13.90 \pm 1.60$  และ  $10.93 \pm 0.74$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) CU 763-18-01 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.026  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) พบว่า CU 763-18-01 ทำให้อัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น  $16.74 \pm 1.08$  และ  $14.54 \pm 1.18$  n atoms O/min/mg protein และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น  $18.88 \pm 0.63$  และ  $16.63 \pm 1.49$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) CU 763-18-02 สามารถกระตุ้นอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration คือ เมื่อเติมสารในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.026  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) พบว่า CU 763-18-02 ทำให้อัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 3 respiration เพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัย

สำคัญคือ  $18.23 \pm 0.87$  และ  $18.51 \pm 1.18$  n atoms O/min/mg protein และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญเป็น  $20.83 \pm 2.18$  และ  $23.40 \pm 0.88$  n atoms O/min/mg protein CU 763-18-04 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.51 \mu\text{M}$ ) พบว่า CU 763-18-04 ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น  $17.00 \pm 1.15$  และ  $15.74 \pm 0.82$  n atoms O/min/mg protein และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ลดลงเป็น  $20.50 \pm 0.02$  และ  $17.35 \pm 1.34$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และ iproniazid สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration คือ เมื่อเติมสารในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.28 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.56 \mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม  $0.31 \text{ mM ADP} + 0.62 \text{ mM Pi}$  พบว่า iproniazid ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือ  $19.39 \pm 0.69$  และ  $19.34 \pm 0.77$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม  $0.06 \text{ mM DNP}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $25.53 \pm 1.43$  และ  $26.69 \pm 1.97$  n atoms O/min/mg protein

### 3. ผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะ osmotic-shocked mitochondria

จากรูปที่ 28 เมื่อ preincubate osmotic-shocked mitochondria ด้วย DMSO นาน 1 นาที หลังจากเติม DMSO มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $3.94 \pm 0.70$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งไม่แตกต่างจาก ไมโตคอนเดรียที่ไม่เติมสารใดๆคือ  $4.23 \pm 0.87$  และเมื่อเติม  $1.04 \text{ mM NADH}$  อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น  $42.06 \pm 2.38$  n atoms O/min/mg protein เมื่อ preincubate osmotic-shocked mitochondria ด้วยสาร CU 763-16-04 ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.24 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.49 \mu\text{M}$ ) นาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงเติม  $1.04 \text{ mM NADH}$  ซึ่งเป็นสับสเตรทเพื่อให้เกิด state 3U respiration พบว่าการใช้ออกซิเจนมีค่าเป็น  $14.0 \pm 0.91$  และ  $8.45 \pm 0.02$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งเป็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนสาร CU 763-18-01 ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.52 \mu\text{M}$ ) นาน 1 นาที พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนมีค่าเป็น  $41.27 \pm 3.88$  และ  $40.21 \pm 1.22$  n atoms O/min/mg protein ใน state 3U respiration CU 763-18-02 ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.52 \mu\text{M}$ ) พบว่า state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นมีค่าเท่ากับ  $45.43 \pm 3.66$  และ  $43.21 \pm 1.22$  n atoms O/min/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO) CU 763-18-04 ในขนาด  $50 \mu\text{g}$  ( $0.26 \mu\text{M}$ ) และ  $100 \mu\text{g}$  ( $0.51 \mu\text{M}$ ) พบว่า state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนมีค่าเท่ากับ  $41.21 \pm 1.22$  และ  $40.15 \pm 1.44$  n atoms O/min/mg protein iproniazid ในขนาด  $50 \mu\text{g}$

(0.28  $\mu\text{M}$ ) และ 100 $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) อัตราการใช้ ออกซิเจนมีค่าเท่ากับ  $44.38 \pm 1.44$  และ  $47.55 \pm 1.22$  n atoms O/min/mg protein

#### 4. กรณีใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 29 เป็นการศึกษาค่าผลของ N-acylaminopyridine derivatives ต่อการทำงานของ isolated rat liver mitochondria เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท CU 763-16-04 ขนาด 50 $\mu\text{g}$  (0.24  $\mu\text{M}$ ) , 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.73  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (0.97  $\mu\text{M}$ ) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราหายใจ state 4 respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $39.37 \pm 0.62$ ,  $42.80 \pm 0.95$ ,  $48.85 \pm 0.68$  และ  $60.48 \pm 1.13$  n atoms O/min/mg protein ส่วน CU 763-18-01 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) , 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.78  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (1.04  $\mu\text{M}$ ) พบว่าอัตราหายใจ state 4 respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $24.84 \pm 0.65$ ,  $29.98 \pm 1.02$ ,  $35.54 \pm 0.53$  และ  $43.19 \pm 0.61$  n atoms O/min/mg protein ส่วน CU 763-18-02 อัตราการใช้ ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของสารที่เติมมากขึ้นคือเติม 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.78  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (1.04  $\mu\text{M}$ ) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราหายใจ state 4 respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $20.39 \pm 0.73$ ,  $24.91 \pm 0.54$ ,  $31.99 \pm 0.89$  และ  $35.05 \pm 0.04$  n atoms O/min/mg protein ส่วน CU 763-18-04 อัตราการใช้ ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของสารที่เติมมากขึ้นคือเติม 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) , 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.77  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (1.03  $\mu\text{M}$ ) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราหายใจ state 4 respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $18.52 \pm 0.84$ ,  $23.34 \pm 0.94$ ,  $36.65 \pm 1.60$  และ  $40.97 \pm 0.82$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเป็น iproniazid อัตราการใช้ ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของสารที่เติมมากขึ้นคือเติม 50  $\mu\text{g}$  (0.18  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{g}$  (0.36  $\mu\text{M}$ ), 150  $\mu\text{g}$  (0.54  $\mu\text{M}$ ) และ 200  $\mu\text{g}$  (0.72  $\mu\text{M}$ ) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราหายใจ state 4 respiration เพิ่มขึ้นเป็น  $15.98 \pm 0.53$ ,  $18.28 \pm 0.56$ ,  $30.33 \pm 0.84$  และ  $35.31 \pm 0.75$  n atoms O/min/mg protein โดยสรุปฤทธิ์ในการกระตุ้น succinate oxidation ของ N-acylaminopyridines ที่ศึกษาอาจเรียงได้ดังนี้ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-04, CU 763-18-02 และ iproniazid

5. ผลของ malonate (succinate dehydrogenase inhibitor) ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

จากรูปที่ 30 อัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 4 respiration ก่อนเติม 2.5  $\mu\text{M}$  malonate มีค่าเท่ากับ  $17.14 \pm 2.54$  n atoms O/min/mg protein และหลังเติม 2.5  $\mu\text{M}$  malonate มีค่า  $12.57 \pm 2.32$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติมสาร DMSO, CU 763-16-04 ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-01 ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-02 ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-04 ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) และ iproniazid ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.36  $\mu\text{M}$ ) พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่มี 2.5  $\mu\text{M}$  malonate คือ  $12.57 \pm 1.05$ ,  $11.27 \pm 1.25$ ,  $12.00 \pm 1.56$ ,  $11.07 \pm 2.35$ ,  $11.10 \pm 1.19$  และ  $12.25 \pm 0.67$  n atoms O/min/mg protein ตามลำดับดังรูปที่ 30 นั่นคือ malonate ยับยั้งผลการกระตุ้น succinate oxidation ต่ออนุพันธ์ N- acylaminopyridine ได้

## 6. ผลของ dithiothreitol(DTT)

ทำการศึกษาโดยเติม 1.04 mM DTT preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเติม 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration และเมื่ออัตราการใช้ออกซิเจนลดลงกลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิมจึงเติม 0.06 mM DNP เพื่อให้เกิด 3U respiration

จากรูปที่ 31 เมื่อเติมสาร CU 763-16-04 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ) โดยไม่เติม DTT พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น  $8.26 \pm 1.24$  n atoms O/min/mg protein ใน state 3 respiration และ state 3U respiration เป็น  $14.82 \pm 1.28$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม DTT ก่อนเติมสาร CU 763-16-04 พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 เป็น  $8.98 \pm 1.57$  n atoms O/min/mg protein และ state 3U คือ  $15.28 \pm 0.14$  n atoms O/min/mg protein พบว่า DTT สามารถเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนมากขึ้นทั้ง state 3 และ state 3U respiration เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไม่เติม DTT ไม่มีนัยสำคัญ ในรูปที่ 31 B ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับสาร CU 763-16-04 พบว่า เมื่อเติมสาร CU 763-18-01 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) อย่างเดียว พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 respiration เป็น  $36.47 \pm 2.25$  n atoms O/min/mg protein ใน state 3U respiration เป็น  $51.44 \pm 1.78$  n atoms O/min/mg protein เมื่อเติม 1.04 mM DTT กับสาร CU 763-18-01 ใน state 3 respiration เป็น  $24.02 \pm 2.21$  n atoms O/min/mg protein คือ  $36.24 \pm 2.05$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งแตกต่างจากไม่ได้เติม DTT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในรูปที่ 31C แสดงให้เห็นว่า เมื่อเติมสาร CU 763-18-02 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) อย่างเดียว พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 respiration เป็น  $45.82 \pm 2.16$  n atoms

O/min/mg protein ใน state 3U respiration เป็น  $63.23 \pm 1.52$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม 1.04 mM DTT ร่วมกับสาร CU 763-18-02 ใน state 3 และ state 3U respiration เป็น  $42.10 \pm 0.32$  และ  $48.50 \pm 1.66$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลง ในรูปที่ 31 D แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสาร CU 763-18-04 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) ร่วมกับ 1.04 mM DTT การใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U respiration เท่ากับ  $27.61 \pm 1.23$  และ  $35.89 \pm 1.68$  n atoms O/min/mg protein อัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อให้ CU 763-18-04 ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) อย่างเดียวใน state 3 และ state 3U respiration เป็น  $31.08 \pm 0.86$  และ  $43.91 \pm 1.29$  n atoms O/min/mg protein ดังนั้น DTT สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนทั้ง state 3 และ state 3U respiration ของ CU 763-18-04 ได้ และจากรูปที่ 31 E แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสาร iproniazid ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) อย่างเดียว พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 และ state 3U respiration เป็น  $67.99 \pm 2.01$  และ  $86.23 \pm 1.72$  n atoms O/min/mg protein เมื่อให้ร่วมกับ 1.04 mM DTT state 3 และ state 3U respiration เป็น  $41.41 \pm 1.47$  และ  $49.18 \pm 0.72$  n atoms O/min/mg protein พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจากการให้ iproniazid อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้น DTT สามารถลดฤทธิ์อัตราการใช้ออกซิเจนทั้ง state 3 และ state 3U respiration ของ iproniazid ได้

## 7. ผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

จากตารางที่ 6 แสดงผลของ CU 763-16-04 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.24  $\mu\text{M}$ ) กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-01 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-02 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-04 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ), กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) และขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.28  $\mu\text{M}$ ) กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย โดยวัดปริมาณ Pi liberate ได้ดังนี้  $0.18 \pm 0.09$  กับ  $0.22 \pm 0.02$ ,  $0.22 \pm 0.09$  กับ  $0.22 \pm 0$ ,  $0.22 \pm 0.07$  กับ  $0.21 \pm 0.09$ ,  $0.29 \pm 0.06$  กับ  $0.27 \pm 0.05$  และ  $0.22 \pm 0.05$  กับ  $0.25 \pm 0.06$   $\mu\text{mol/mg protein/10 min}$  ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ใส่ DMSO ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมมีค่า Pi liberate  $0.22 \pm 0.09$  ส่วน DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity มีค่า Pi liberate เท่ากับ  $1.10 \pm 0.083$   $\mu\text{mol/mg protein/10 min}$  พบว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ไม่มีคุณสมบัติกระตุ้น ATPase activity ส่วน Oligomycin เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเกิด ATPase

activity(รายละเอียด บทที่ 2) ซึ่งเมื่อให้ร่วมกับ DNP สามารถยับยั้ง ATPase ได้  $0.14 \pm 0.04 \mu \text{ mol/mg protein/10 min}$

## 8. ผลต่อ bovine serum albumin(BSA)

รูปที่ 32 A จากการศึกษาถึงผลของการเติม BSA ในขนาดต่างๆกัน 5,10 และ 20 mg ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย ใน state 3 respiration จากกราฟจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ) เท่ากับ  $8.26 \pm 1.24 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเท่ากับ  $5.78 \pm 0.71$ ,  $6.48 \pm 1.30$  และ  $11.35 \pm 1.45 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อเพิ่มขนาด BSA มากกว่า 20 mg อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ในกรณีของ CU 763-18-01 (รูปที่ 32 B) BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-01 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration จากกราฟจะเห็นได้ว่า อัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) โดยไม่มีการเติม BSA เท่ากับ  $36.47 \pm 2.25 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเท่ากับ  $10.47 \pm 0.85$ ,  $13.42 \pm 1.88$  และ  $14.01 \pm 1.16 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  ตามลำดับ เมื่อเพิ่มขนาด BSA สามารถเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนขึ้นได้ ส่วนรูปที่ 32 C แสดงการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-02 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) เมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration จากกราฟจะเห็นได้ว่า อัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ) โดยไม่มีการเติม BSA เท่ากับ  $45.82 \pm 2.16 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  เมื่อเพิ่มขนาด BSA สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนลงได้ ส่วนการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-04 ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) (รูปที่ 32 D) เมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration จากกราฟจะเห็นได้ว่า อัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) โดยไม่มีการเติม BSA เท่ากับ  $31.08 \pm 0.86 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเท่ากับ  $14.52 \pm 1.15$ ,  $12.85 \pm 1.25$  และ  $10.93 \pm 0.76 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  เมื่อเพิ่มขนาด BSA สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนลงได้ และผลการเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20 mg ต่อการออกฤทธิ์ของ iproniazid ในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย ใน state 3 respiration จากกราฟรูปที่ 32 E จะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) โดยไม่มีการเติม BSA ในขนาด 5, 10

และ 20 mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเท่ากับ  $67.96 \pm 2.01$  n atoms O/min/mg protein และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5, 10 และ 20mg พบว่าอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเท่ากับ  $14.54 \pm 1.46$ ,  $14.27 \pm 1.19$  และ  $14.27 \pm 1.19$  เมื่อเพิ่มขนาดของ BSA เท่าใดก็ตาม ทำให้ฤทธิ์การกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเกือบคงที่ตลอด

### 9. ผลต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย $Ca^{2+}$ (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตามปกติพลังงานส่วนหนึ่งที่ได้จากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย หรือ proton gradient มาใช้ในการขนส่ง  $Ca^{2+}$  มาสะสมภายในไมโตคอนเดรีย ดังนั้นเมื่อเติม 0.42 mM  $CaCl_2$  ลงไปในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากเพียงพอ และมี Pi อยู่ อัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะเพิ่มสูงขึ้น และอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเมื่อ  $Ca^{2+}$  ถูกสะสมเข้าไปในไมโตคอนเดรียแล้ว จากรูปที่ 33 กลุ่มควบคุม(DMSO) เมื่อไมโตคอนเดรียได้รับ  $Ca^{2+}$  อัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $39.76 \pm 1.25$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งพอกๆกับอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่ไม่ได้เติม DMSO คือ  $39.55 \pm 1.36$  n atoms O/min/ mg protein ผลของ CU 763-16-04 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.24  $\mu$ M) กับ 100  $\mu$ g (0.49  $\mu$ M) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $Ca^{2+}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO) คือ  $26.53 \pm 0.66$  กับ  $22.85 \pm 2.34$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่า CU 763-16-04 ไม่มีผลกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย ผลของ CU 763-18-01 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.26  $\mu$ M) และ 100  $\mu$ g (0.52  $\mu$ M) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $Ca^{2+}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนพอกๆกับกลุ่มควบคุมคือ  $42.96 \pm 2.02$  และ  $39.54 \pm 1.77$  n atoms O/min/mg protein ซึ่งแสดงว่ามีการกระตุ้นการหายใจด้วย  $Ca^{2+}$  ในขนาดสารนี้ กรณีของ CU 763-18-02 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.26  $\mu$ M) และ 100  $\mu$ g (0.52  $\mu$ M) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $Ca^{2+}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ  $49.55 \pm 1.77$  และ  $52.29 \pm 2.42$  n atoms O/min/mg protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่า CU 763-18-02 มีการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $Ca^{2+}$  ส่วนผลของ CU 763-18-04 ในขนาด 50  $\mu$ g (0.26  $\mu$ M) และ 100  $\mu$ g (0.51  $\mu$ M) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $Ca^{2+}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนคือ  $41.54 \pm 2.28$  และ  $31.69 \pm 1.84$  n atoms O/min/mg protein แสดงให้เห็นว่า CU 763-18-04 ขนาด 100  $\mu$ g (0.51  $\mu$ M) สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



(DMSO) ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และกรณีของ iproniazid ในขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.28  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (0.56  $\mu\text{M}$ ) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $\text{Ca}^{2+}$  พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น  $50.54 \pm 2.09$  และ  $47.67 \pm 1.91$  n atoms O/min/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม(DMSO) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย  $\text{Ca}^{2+}$

## 10. การเกิด lipid peroxidation

จากตารางที่ 7 พบว่าสาร CU 763-16-04 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.24  $\mu\text{M}$ ) กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.49  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-01 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) กับขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.52  $\mu\text{M}$ ), CU 763-18-04 ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) กับขนาด 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) และ iproniazid ขนาด 50  $\mu\text{g}$  (0.26  $\mu\text{M}$ ) กับ 100  $\mu\text{g}$  (0.51  $\mu\text{M}$ ) ให้ค่าการดูดกลืนแสงหลังการทำปฏิกิริยา ให้สีชมพูขึ้นตามวิธีการบทที่ 3 ได้  $0.156 \pm 6.886 \times 10^{-3}$  กับ  $0.138 \pm 1.102 \times 10^{-2}$ ,  $0.139 \pm 2.326 \times 10^{-2}$  กับ  $0.158 \pm 1.295 \times 10^{-2}$ ,  $0.161 \pm 1.368 \times 10^{-2}$  กับ  $0.156 + 1.345 \times 10^{-2}$ ,  $0.157 \pm 1.046 \times 10^{-2}$  กับ  $0.157 \pm 2.264 \times 10^{-2}$  และ  $0.144 \pm 1.074 \times 10^{-2}$  กับ  $0.151 \pm 1.004 \times 10^{-2}$  units ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) คือ  $0.164 \pm 9.097 \times 10^{-3}$  units ส่วน EDTA คือสารที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คือ  $0.016 \pm 1.07 \times 10^{-2}$  units

## 11. ต่อก MAO activity

การศึกษาผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อก activity ของเอนไซม์ MAO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ชั้นนอกของไมโตคอนเดรียในการศึกษานี้ใช้ tyramine, benzylamine และ 5-HT เป็น monoamine substrate และมี rotenone ทำหน้าที่เป็น respiratory chain inhibitor

รูปที่ 34 A แสดงเปอร์เซ็นต์การหายใจโดยไมโตคอนเดรียพบว่า เมื่อเติม DMSO (กลุ่มควบคุม) 10  $\mu\text{l}$  ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 2 นาที ก่อนเติม tyramine หรือ benzylamine และ 5-HT พบว่าไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนเท่ากับ  $40.67 \pm 1.20$ ,  $56.4 \pm 2.10$  และ  $52.27 \pm 0.50$  n atoms O/min/mg protein เมื่อเปรียบเทียบกับไมโตคอนเดรีย โดยไม่ได้เติมสารใด ๆ มีค่าเท่ากับ  $39.4 \pm 1.20$ ,  $53.39 \pm 1.20$  และ  $48.02 \pm 0.67$  ซึ่งแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และตารางที่ 8 A แสดงอัตราการหายใจโดยใช้ออกซิเจนของสาร CU 763-16-04 ในการ

ออกซีไดร์ 0.1 M tyramine ขนาดต่างๆกัน พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein จากกลุ่มควบคุม(DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขนาดสารที่ใช้คือ 400  $\mu\text{g}$  (1.94  $\mu\text{M}$ ) และจากรูป 34 A แสดงให้เห็นว่าขนาดสารมีค่าประมาณ 41.67 $\mu\text{g}$  (0.20 $\mu\text{M}$ ) จึงจะสามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $\text{IC}_{50}$ ) เมื่อเปลี่ยนจาก 0.1M tyramine เป็น 0.1 M benzylamine พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein แตกต่างจากกลุ่มควบคุม(DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้สารขนาด 300  $\mu\text{g}$  (1.46  $\mu\text{M}$ ) และจากรูป 34 A พบว่าขนาด 52.08  $\mu\text{g}$  (0.25  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการหายใจได้ถึง 50 % แต่เมื่อเปลี่ยนเป็น 0.1 mM 5-HT พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขนาดสารที่ใช้คือ 300  $\mu\text{g}$  (1.4  $\mu\text{M}$ ) จากรูป 34 A พบว่าขนาดประมาณ 33.33  $\mu\text{g}$  (0.16  $\mu\text{M}$ ) จึงจะยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $\text{IC}_{50}$ ) ดังนั้นแสดงว่า CU 763-16-04 สามารถยับยั้ง MAO เมื่อใช้ 5-HT ได้ดีกว่าสาร CU หรือ substrate อื่น

ในตารางที่ 8 B แสดงอัตราการหายใจโดยใช้ออกซีเจนของสาร CU 763-18-01 ในการออกซีไดร์ 0.1M tyramine เมื่อเติมสารขนาดต่างๆกัน พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้คือ 600  $\mu\text{g}$  (3.11  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม(DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูป 34 B ขนาดสารประมาณ 84.37  $\mu\text{g}$  (0.44  $\mu\text{M}$ ) จึงจะสามารถยับยั้งการหายใจได้ 50 % เมื่อเปลี่ยนจาก 0.1 M tyramine เป็น 0.1 M benzylamine พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้สารขนาด 300  $\mu\text{g}$  (1.55  $\mu\text{M}$ ) และจากรูป 34 B พบว่าขนาดประมาณ 68.75  $\mu\text{g}$  (0.36  $\mu\text{M}$ ) มากจึงจะยับยั้งการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ 0.1 M 5-HT พบว่าอัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้คือ 400  $\mu\text{g}$  (2.07  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม(DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูป 34 B แสดงว่าขนาดประมาณ 75  $\mu\text{g}$  (0.39 $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จากกราฟรูป 34 B พบว่า CU 763-18-01 สามารถยับยั้ง MAO เมื่อใช้ benzylamine ได้ดีกว่า

ตารางที่ 8C แสดงอัตราการหายใจโดยใช้ออกซีเจนของสาร CU 763-18-02 ในการออกซีไดร์ 0.1M tyramine และ 0.1 M 5-HT เมื่อเติมสารขนาดเพิ่มขึ้น อัตราการใช้ออกซีเจนลดลงแต่ต้องขนาดมากกว่า 1,000  $\mu\text{g}$  (5.18  $\mu\text{M}$ ) มากๆจึงอาจจะพบว่า อัตราการใช้ออกซีเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein จากรูป 34 C พบว่าขนาด 121.59  $\mu\text{g}$  (0.63  $\mu\text{M}$ ) เมื่อใช้ 0.1M tyramine สามารถยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ขนาด 104.22 $\mu\text{g}$  (0.54  $\mu\text{M}$ ) เมื่อใช้ 0.1 M benzylamine ยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และขนาด 121.59  $\mu\text{g}$  (0.63  $\mu\text{M}$ ) ของ 0.1 M 5-HT

สามารถยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแสดงว่าสาร CU 763-18-02 สามารถยับยั้ง MAO เมื่อใช้ benzylamine ได้ดีกว่า

ตารางที่ 8 D แสดงอัตราการหายใจโดยใช้ออกซิเจนของสาร CU 763-18-04 ในการออกซิไดซ์ 0.1 M tyramine เมื่อเติมสารขนาดต่างๆกัน พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้คือ 400  $\mu\text{g}$  (2.05  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูป 34 D ขนาดสารประมาณ 88.33  $\mu\text{g}$  (0.45  $\mu\text{M}$ ) ยับยั้งอัตราการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปลี่ยนจาก 0.1 M tyramine เป็น 0.1 M benzylamine เป็น 0.1 M benzylamine พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้คือ 1,000  $\mu\text{g}$  (5.13  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูป 34 D ขนาดสารประมาณ 97.62  $\mu\text{g}$  (0.50  $\mu\text{M}$ ) ยับยั้งอัตราการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ 0.1 M 5-HT พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้ 700  $\mu\text{g}$  (3.08  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากรูป 34 D ขนาดสารประมาณ 73.81  $\mu\text{g}$  (0.38  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า CU 763-18-04 ยับยั้ง MAO โดยใช้ 5-HT ได้ดีกว่าตัวอื่น

ตารางที่ 8 E แสดงอัตราการหายใจโดยใช้ออกซิเจนของสาร iproniazid ในการออกซิไดซ์ 0.1 M tyramine เมื่อเติมสารขนาดต่างๆกัน พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 0 n atoms O/min/mg protein ขนาดสารที่ใช้คือ 600  $\mu\text{g}$  (2.17  $\mu\text{M}$ ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรูป 34 E ขนาดสาร 160.53  $\mu\text{g}$  (0.58  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการหายใจได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปลี่ยน 0.1 M tyramine เป็น 0.1 M benzylamine พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเมื่อเพิ่มขนาดมากขึ้น จากรูป 34 E ขนาด 97.5  $\mu\text{g}$  (0.54  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ 0.1 M 5-HT พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเมื่อขนาดของสารเพิ่มขึ้น จากรูป 34 E พบว่าขนาดสาร 90  $\mu\text{g}$  (0.50  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้ง MAO ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า iproniazid ยับยั้ง MAO โดยใช้ 5-HT ได้ดีกว่าตัวอื่น

รูปที่ 23 A,B-27A,B แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl., 5.21 mM potassium glutamate+ 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.33 mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวแทนทำละลาย สาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

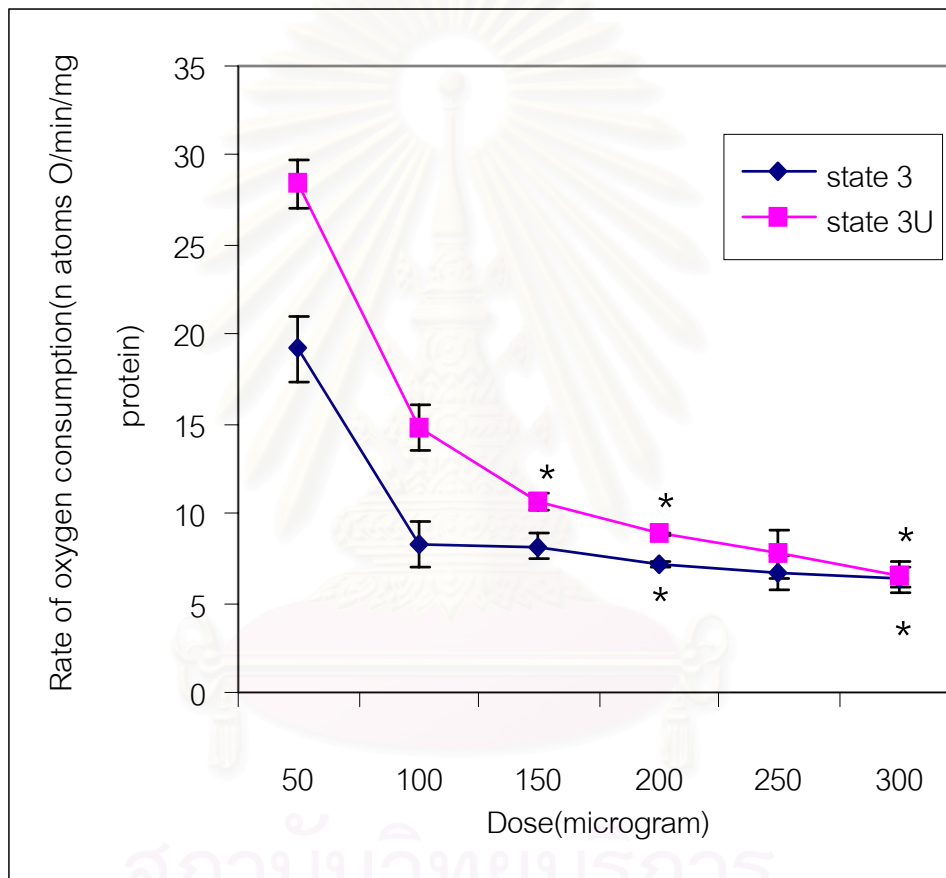


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23A แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

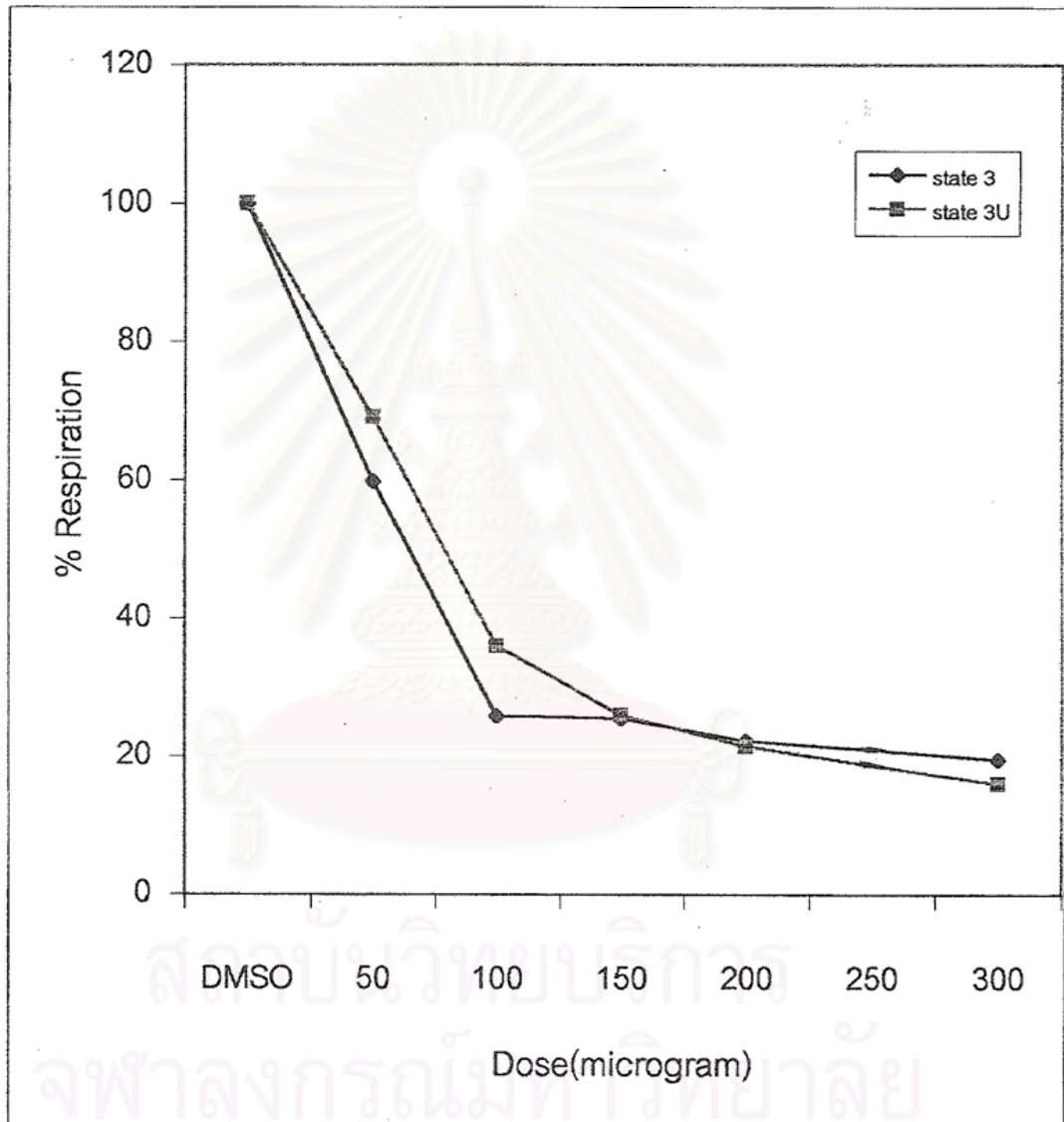
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

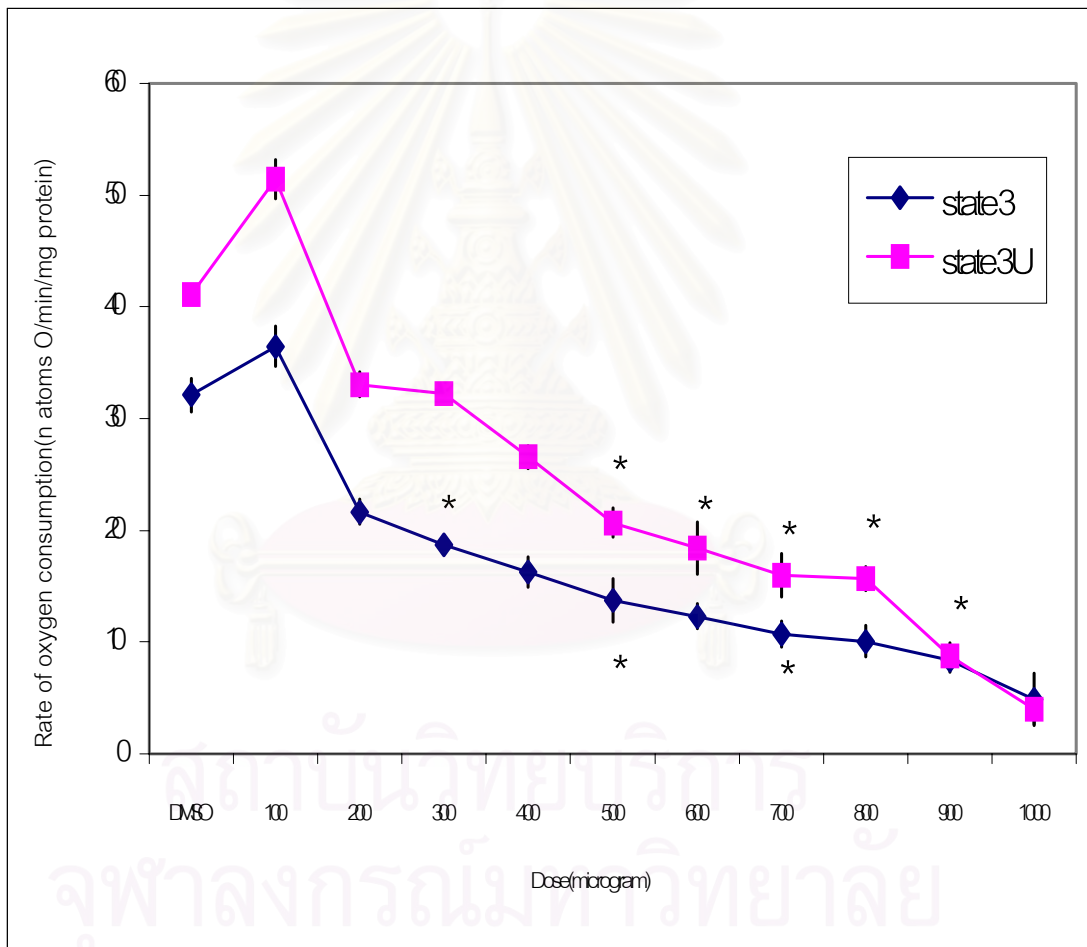
รูปที่ 23 B แสดง % Respiration ของ CU 763-16-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



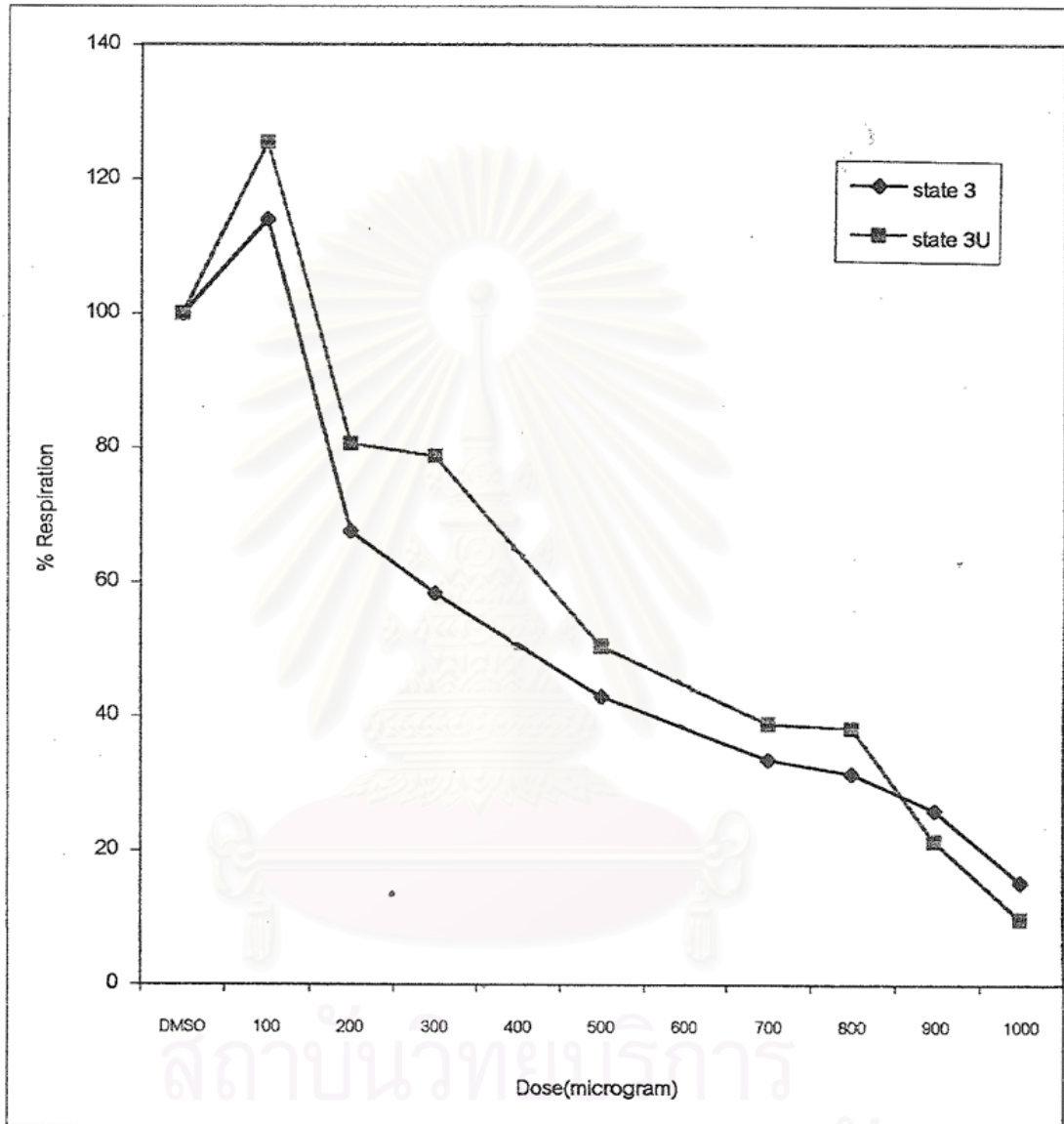
รูปที่ 24 A แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-01 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับDMSO



รูปที่ 24 B แสดง % Respiration ของ CU 763-18-01 ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



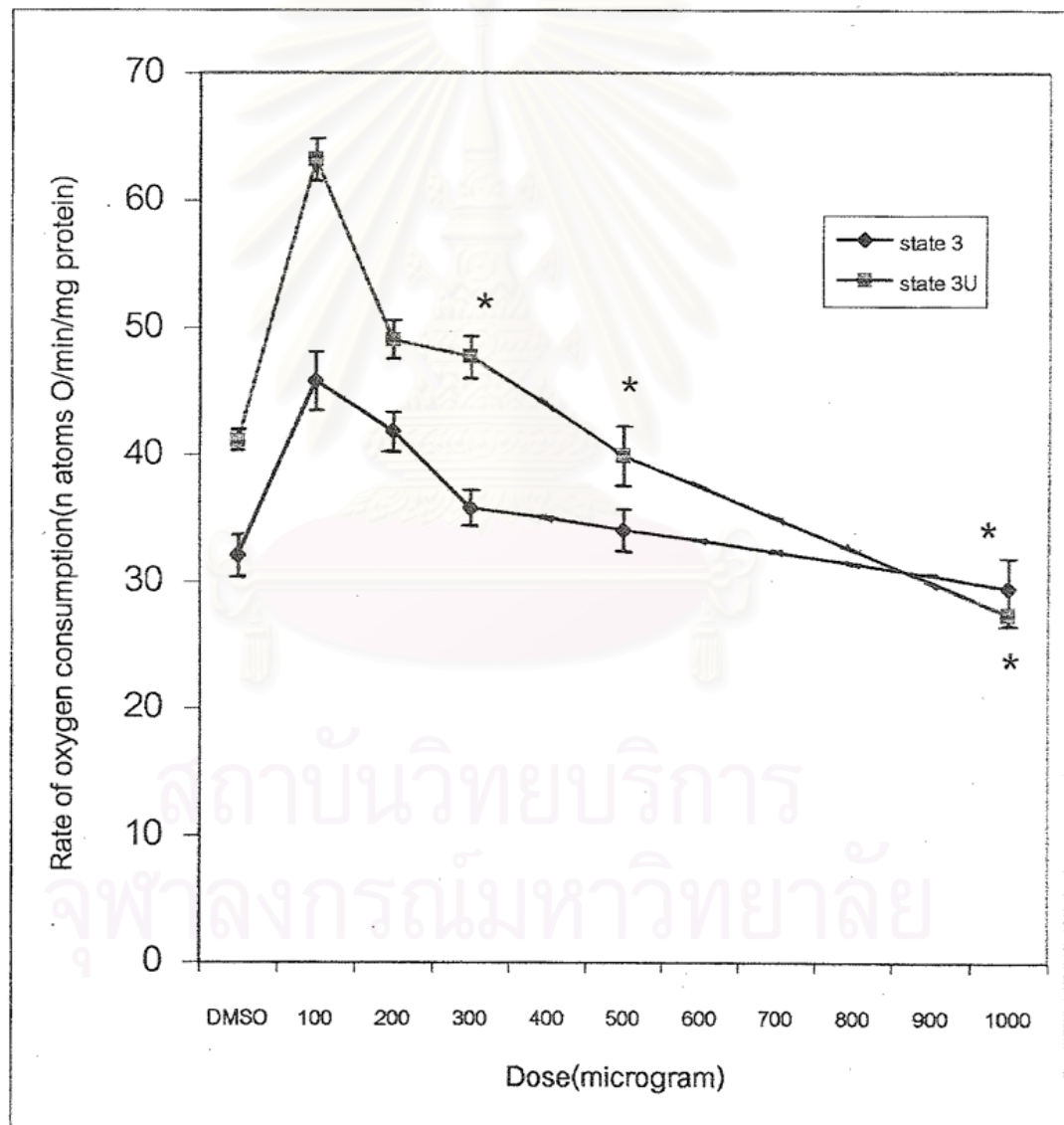
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



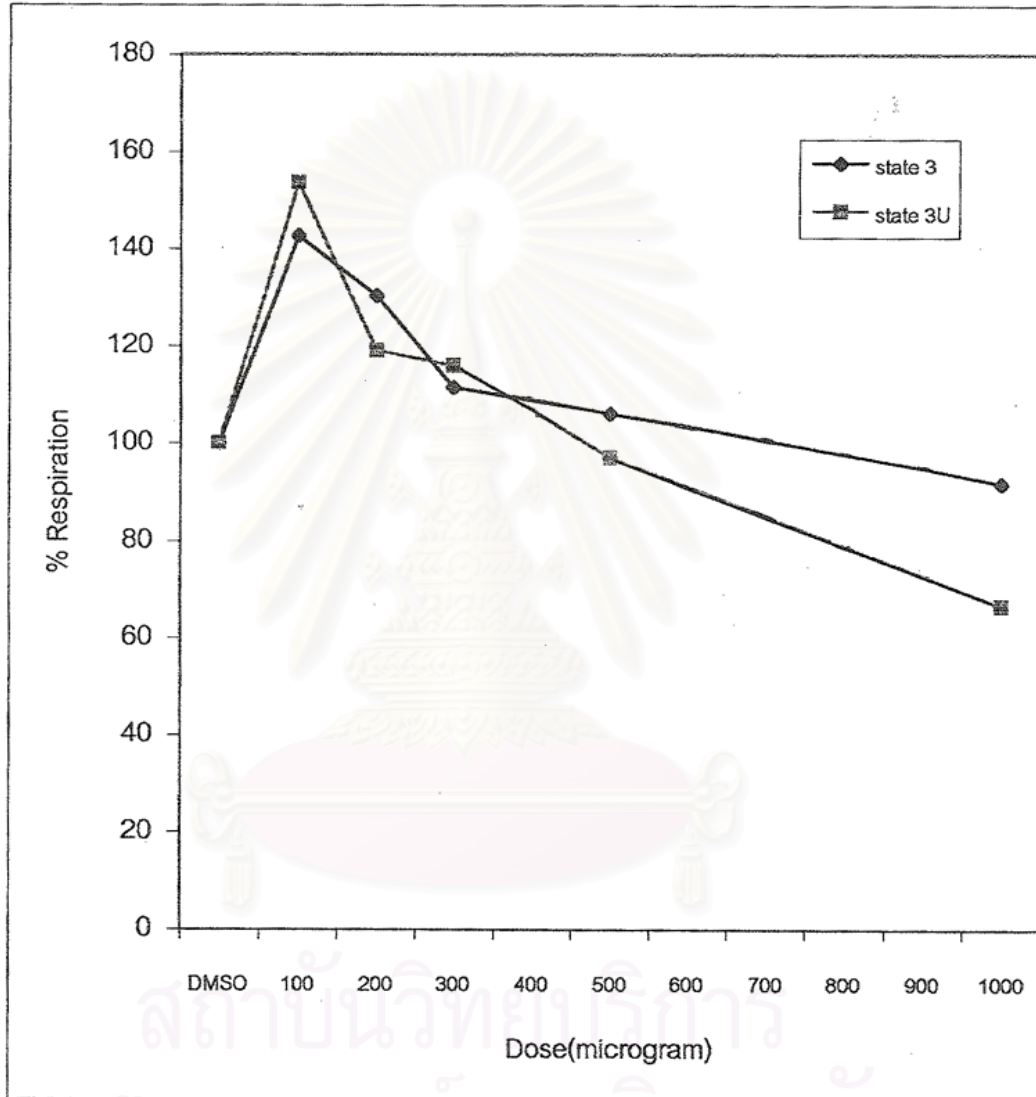
รูปที่ 25 A แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-02 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



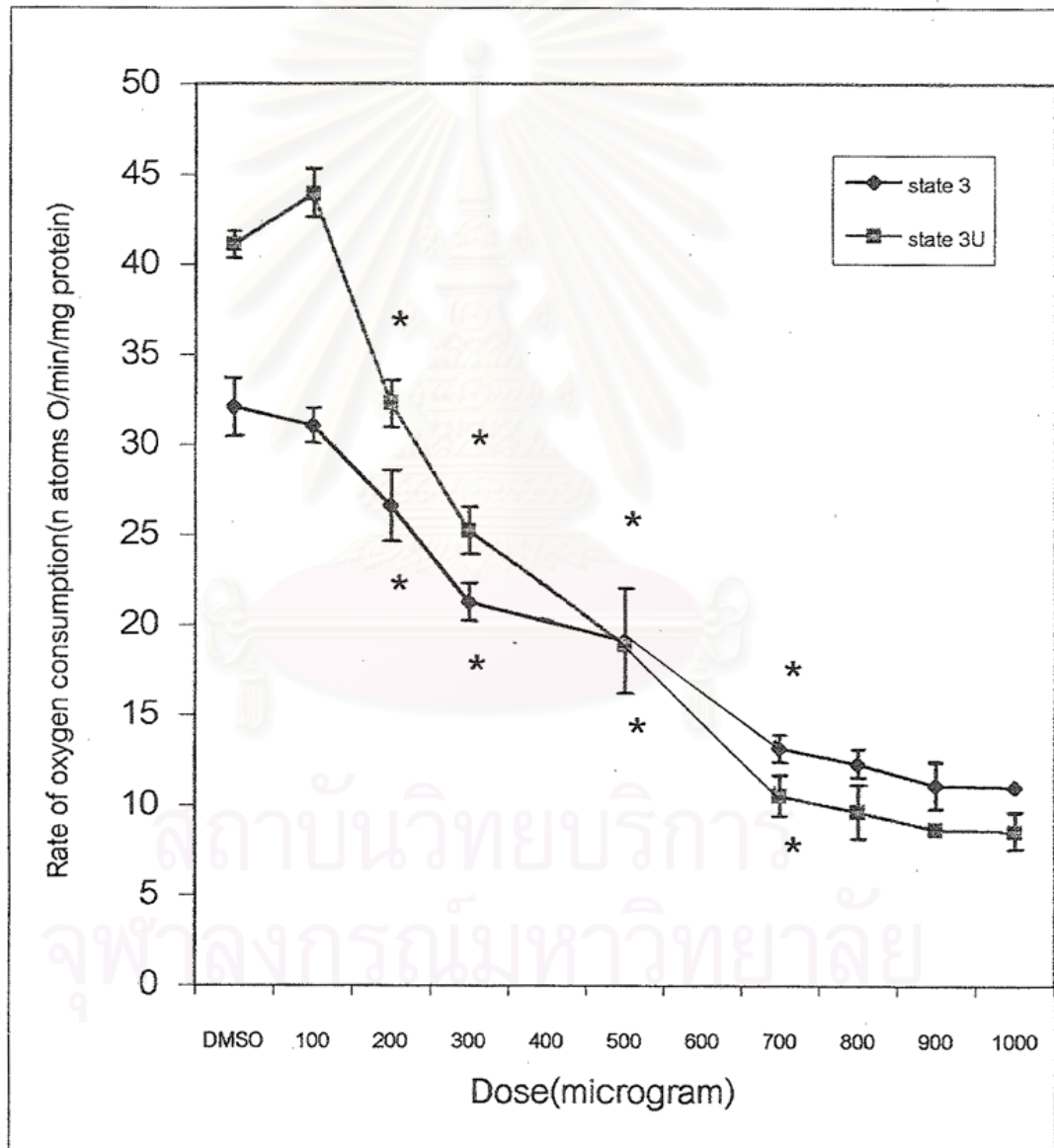
รูปที่ 25 B แสดง % Respiration ของ CU 763-18-02 ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



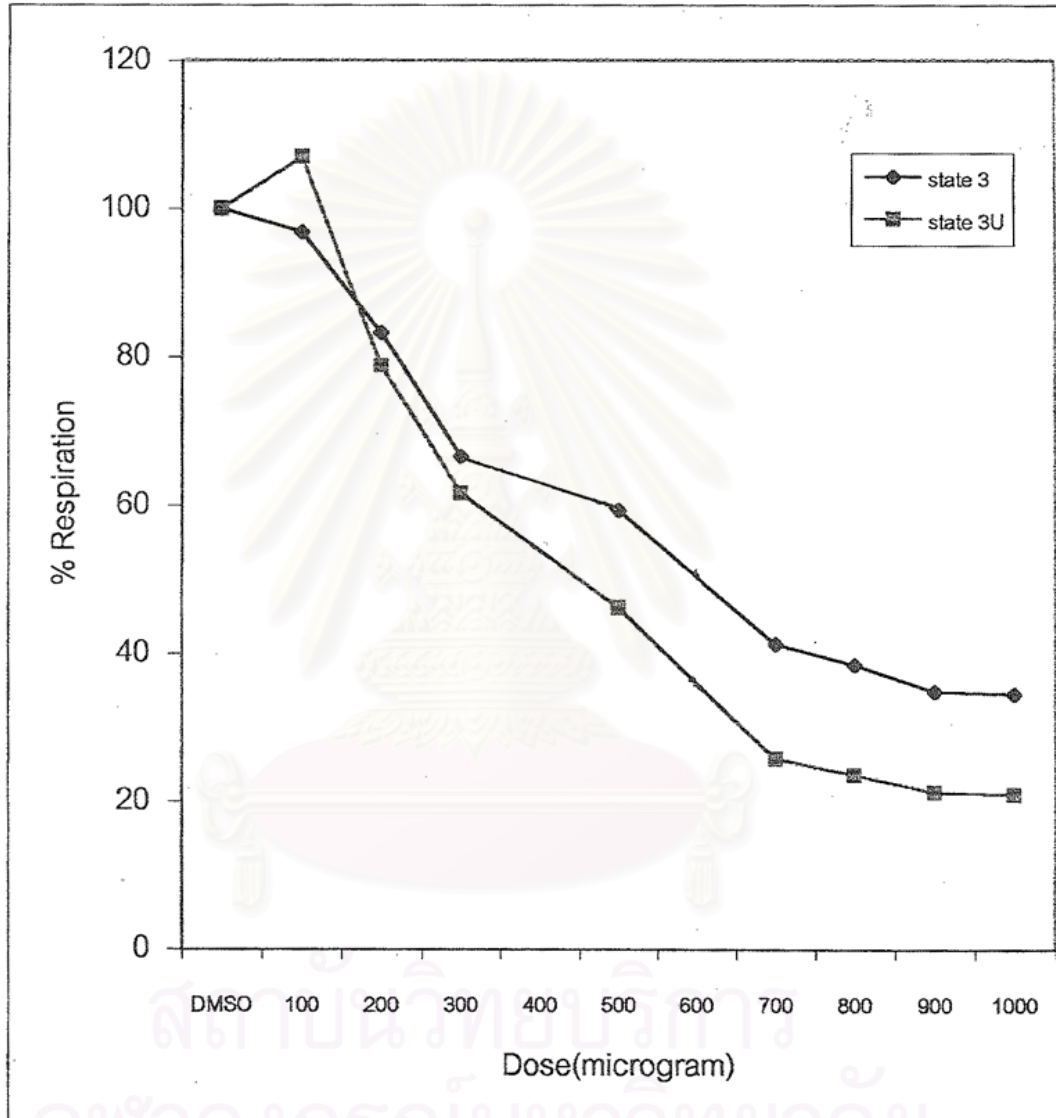
รูปที่ 26 A แสดง Dose-response curve ของ CU 763-18-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



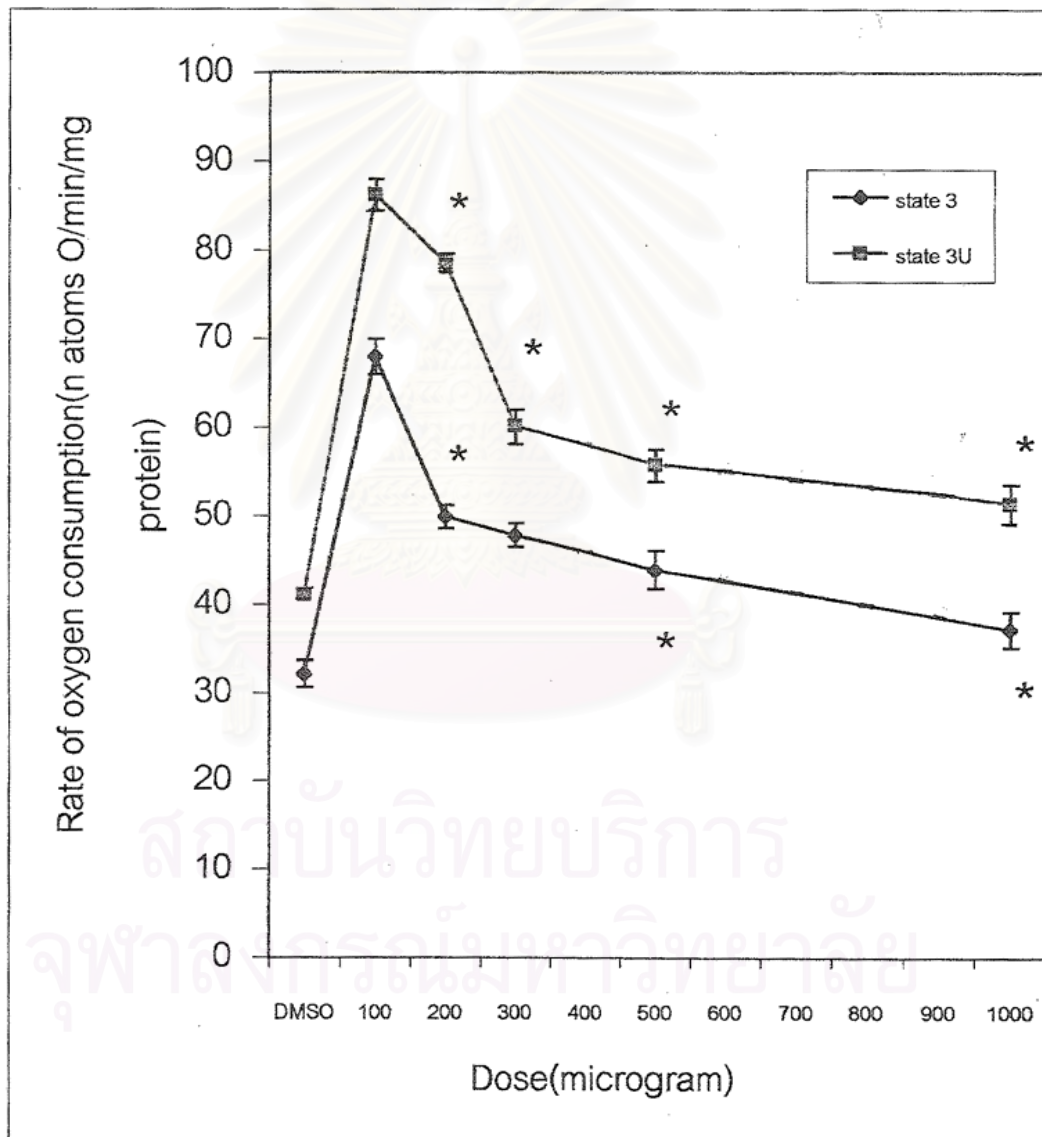
รูปที่ 26 B แสดง % Respiration ของ CU 763-18-04 ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



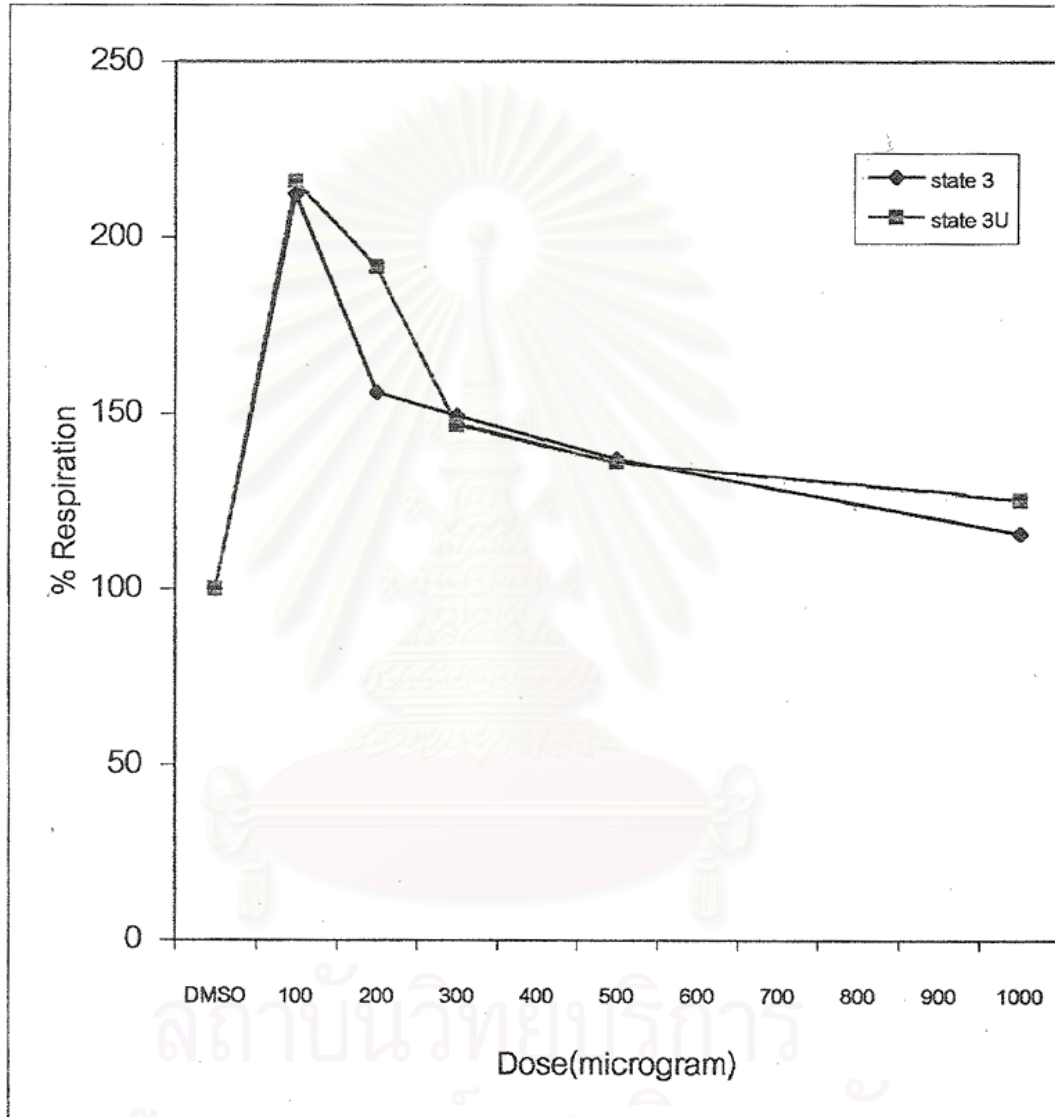
รูปที่ 27 A แสดง Dose-response curve ของ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



รูปที่ 27B แสดง % Respiration ของ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย  
เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



ตารางที่ 4 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อ อัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl., 5.21 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.25 mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37<sup>0</sup>C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Experiment ( $\mu$ M)	Rate of respiration (n atoms O/min./mg. protein)	
	State 3	State 3U
Non DMSO	20.27 $\pm$ 1.56	24.43 $\pm$ 1.25
DMSO	17.70 $\pm$ 1.30	22.28 $\pm$ 1.02
CU 763-16-04(0.24)	14.65 $\pm$ 2.09 <sup>*b</sup>	17.36 $\pm$ 1.85 <sup>*b</sup>
CU 763-16-04(0.49)	12.01 $\pm$ 0.21 <sup>*b</sup>	14.65 $\pm$ 0.42 <sup>*b</sup>
CU 763-18-01(0.26)	20.96 $\pm$ 0.96 <sup>*a</sup>	23.02 $\pm$ 1.33
CU 763-18-01(0.52)	15.89 $\pm$ 0.89 <sup>*b</sup>	17.62 $\pm$ 0.97 <sup>*b</sup>
CU 763-18-02(0.26)	22.00 $\pm$ 0.82 <sup>*a</sup>	24.07 $\pm$ 1.27 <sup>*a</sup>
CU 763-18-02(0.52)	22.79 $\pm$ 2.02 <sup>*a</sup>	25.28 $\pm$ 1.23 <sup>*a</sup>
CU 763-18-04(0.26)	20.19 $\pm$ 1.48 <sup>*a</sup>	22.93 $\pm$ 1.36
CU 763-18-04(0.51)	16.91 $\pm$ 0.85	20.46 $\pm$ 1.71
Iproniazid (0.28)	22.28 $\pm$ 1.06 <sup>*a</sup>	26.40 $\pm$ 1.39 <sup>*a</sup>
Iproniazid (0.56)	21.72 $\pm$ 1.07 <sup>*a</sup>	25.31 $\pm$ 1.83 <sup>*a</sup>

\*p <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับDMSO

\*a increase rate of oxygen consumption

\*b decrease rate of oxygen consumption

ตารางที่ 5 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อ อัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้  $\beta$ -hydroxybutyrate เป็น สับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl., 5.21 mM  $\beta$ -hydroxybutyrate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.56 mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Experiment ( $\mu$ M)	Rate of respiration (n atoms O/min./mg. protein)	
	State 3	State 3U
Non DMSO	20.27 $\pm$ 1.56	24.43 $\pm$ 1.25
DMSO	17.49 $\pm$ 1.51	22.99 $\pm$ 1.27
CU 763-16-04(0.24)	11.90 $\pm$ 1.61 <sup>*b</sup>	13.90 $\pm$ 1.60 <sup>*b</sup>
CU 763-16-04(0.49)	8.21 $\pm$ 2.43 <sup>*b</sup>	10.92 $\pm$ 0.74 <sup>*b</sup>
CU 763-18-01(0.26)	16.74 $\pm$ 1.08	18.88 $\pm$ 0.63 <sup>*b</sup>
CU 763-18-01(0.52)	14.54 $\pm$ 1.18 <sup>*b</sup>	16.63 $\pm$ 1.49 <sup>*b</sup>
CU 763-18-02(0.26)	18.23 $\pm$ 0.87	20.83 $\pm$ 2.18
CU 763-18-02(0.52)	18.51 $\pm$ 1.18	23.40 $\pm$ 0.88
CU 763-18-04(0.26)	17.00 $\pm$ 1.15	20.50 $\pm$ 0.02 <sup>*b</sup>
CU 763-18-04(0.51)	15.74 $\pm$ 0.82 <sup>*b</sup>	17.35 $\pm$ 1.34 <sup>*b</sup>
Iproniazid (0.28)	19.39 $\pm$ 0.69 <sup>*a</sup>	25.53 $\pm$ 1.43 <sup>*a</sup>
Iproniazid (0.56)	19.34 $\pm$ 0.77 <sup>*a</sup>	26.69 $\pm$ 1.97 <sup>*a</sup>

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

\*a increase rate of oxygen consumption

\*b decrease rate of oxygen consumption

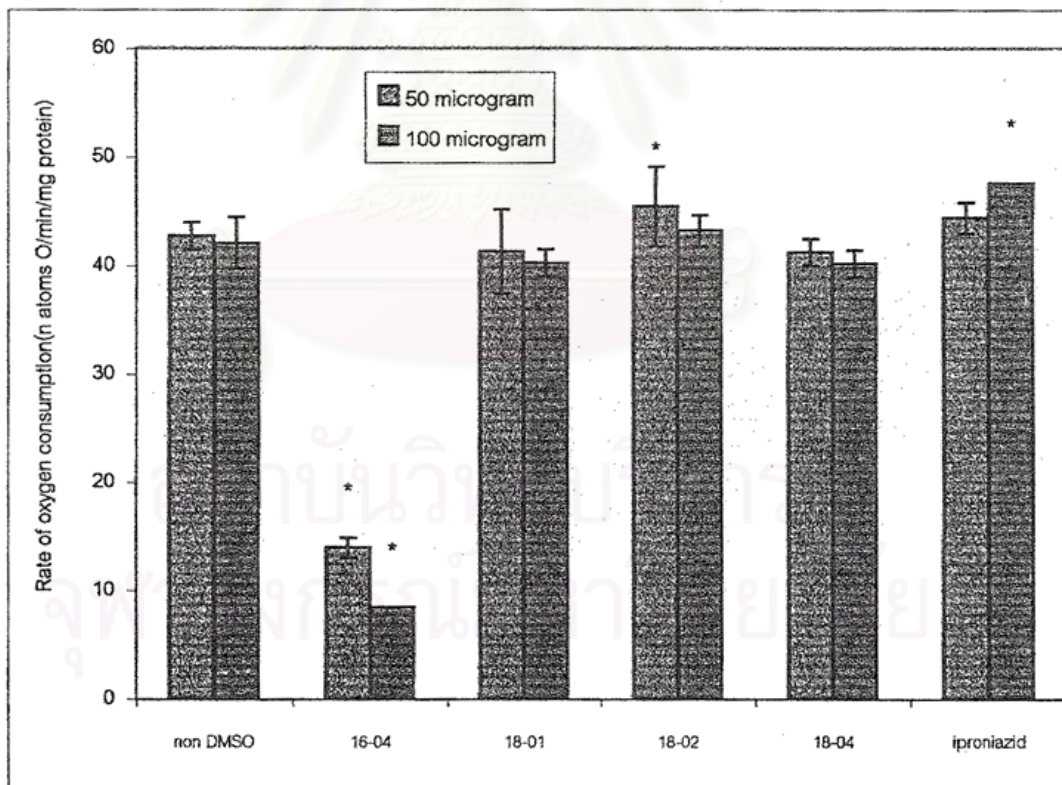


รูปที่ 28 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจในภาวะ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 82.25 mM KCl., 1.04 mM NADH, 0.521 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.52 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



รูปที่ 29 แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

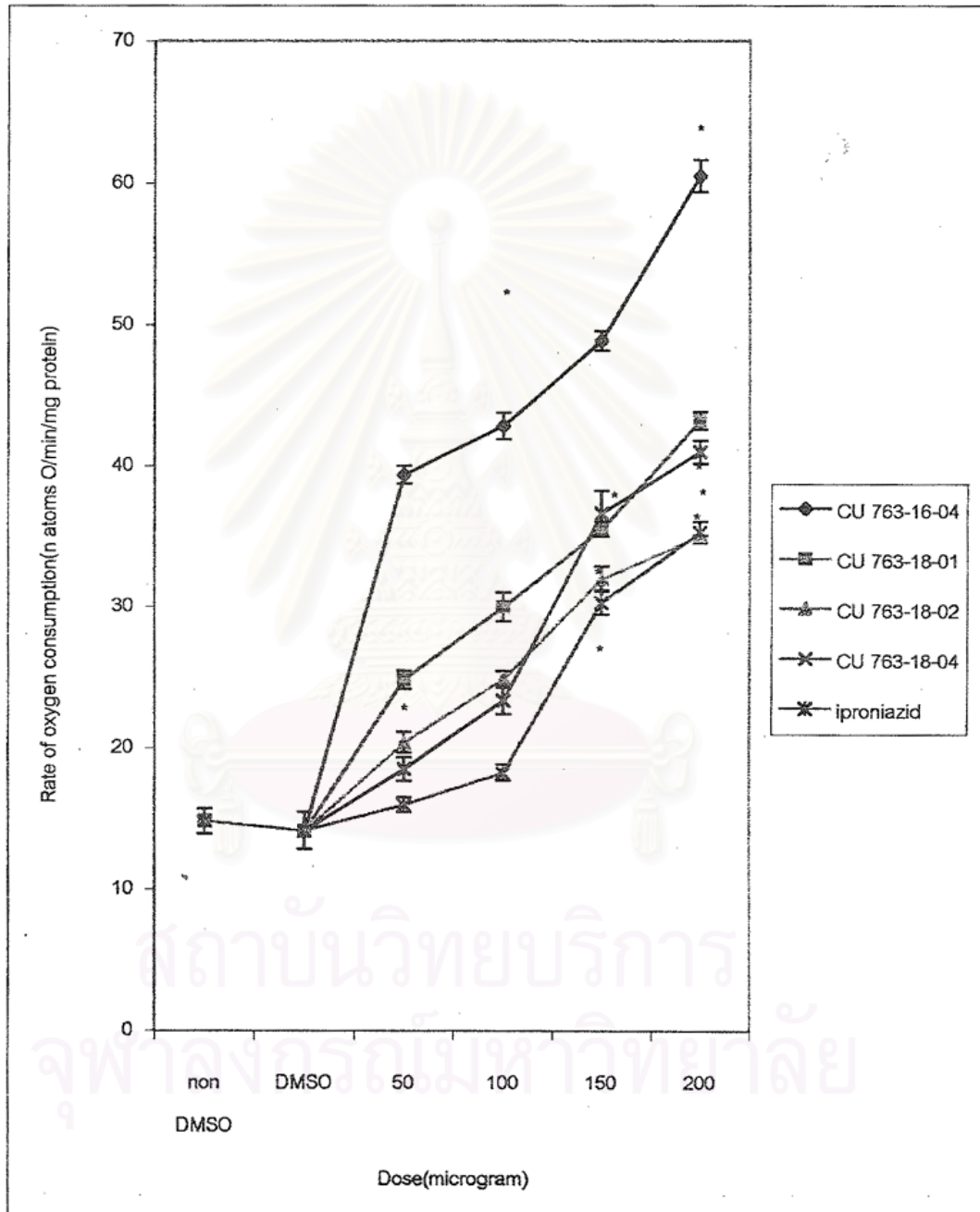
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl., 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.33 mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง  
\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 29 แสดง Dose-response curve ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

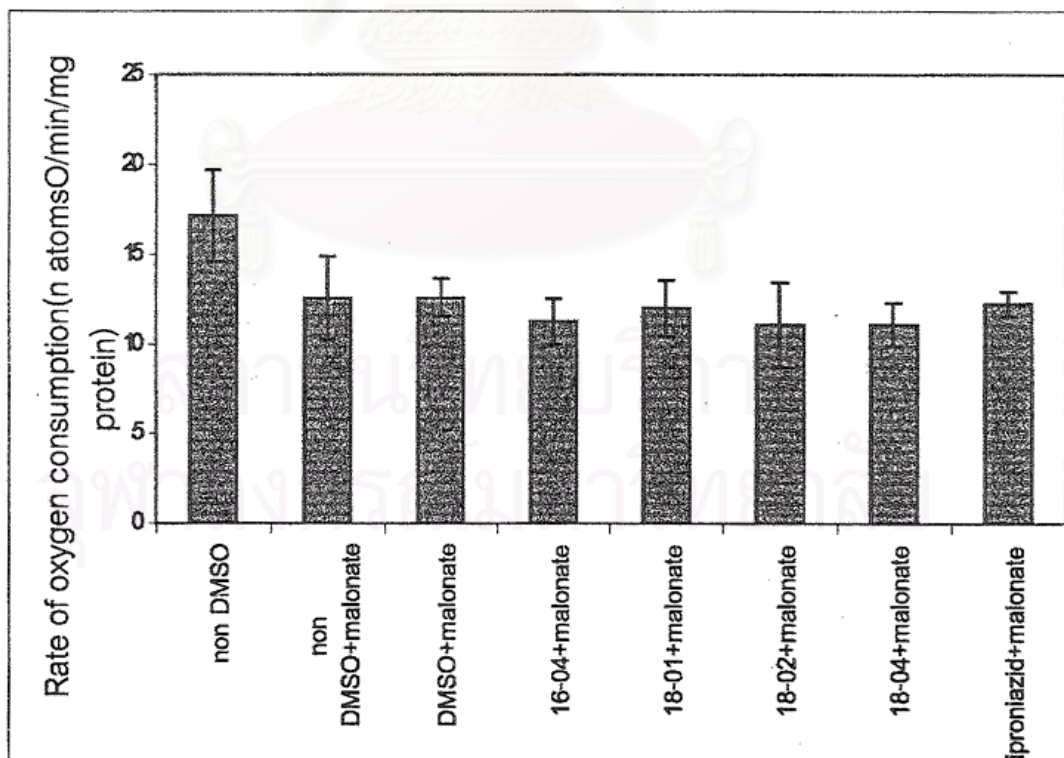


รูปที่ 30 ผลของ malonate ต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl., 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.25mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid และ 0.10 mM malonate ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

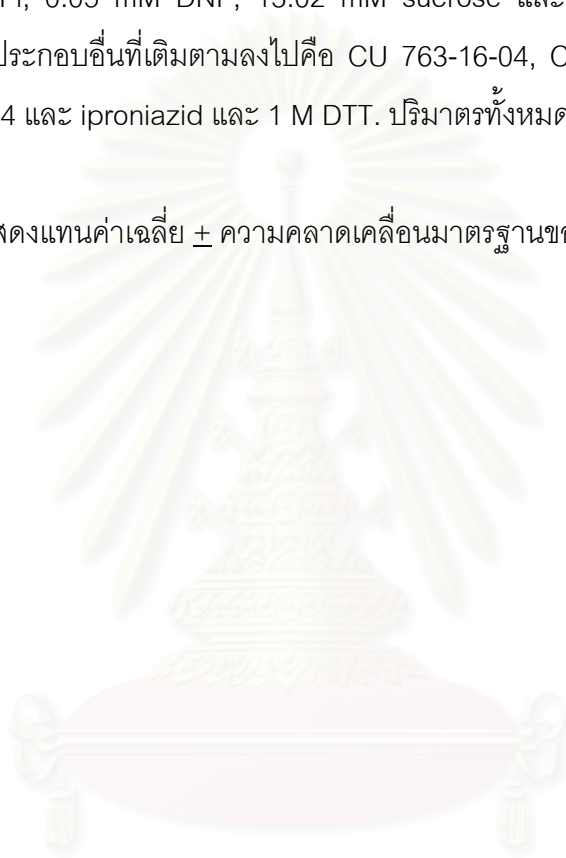
\*p <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับDMSO



รูปที่ 31 A-E ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

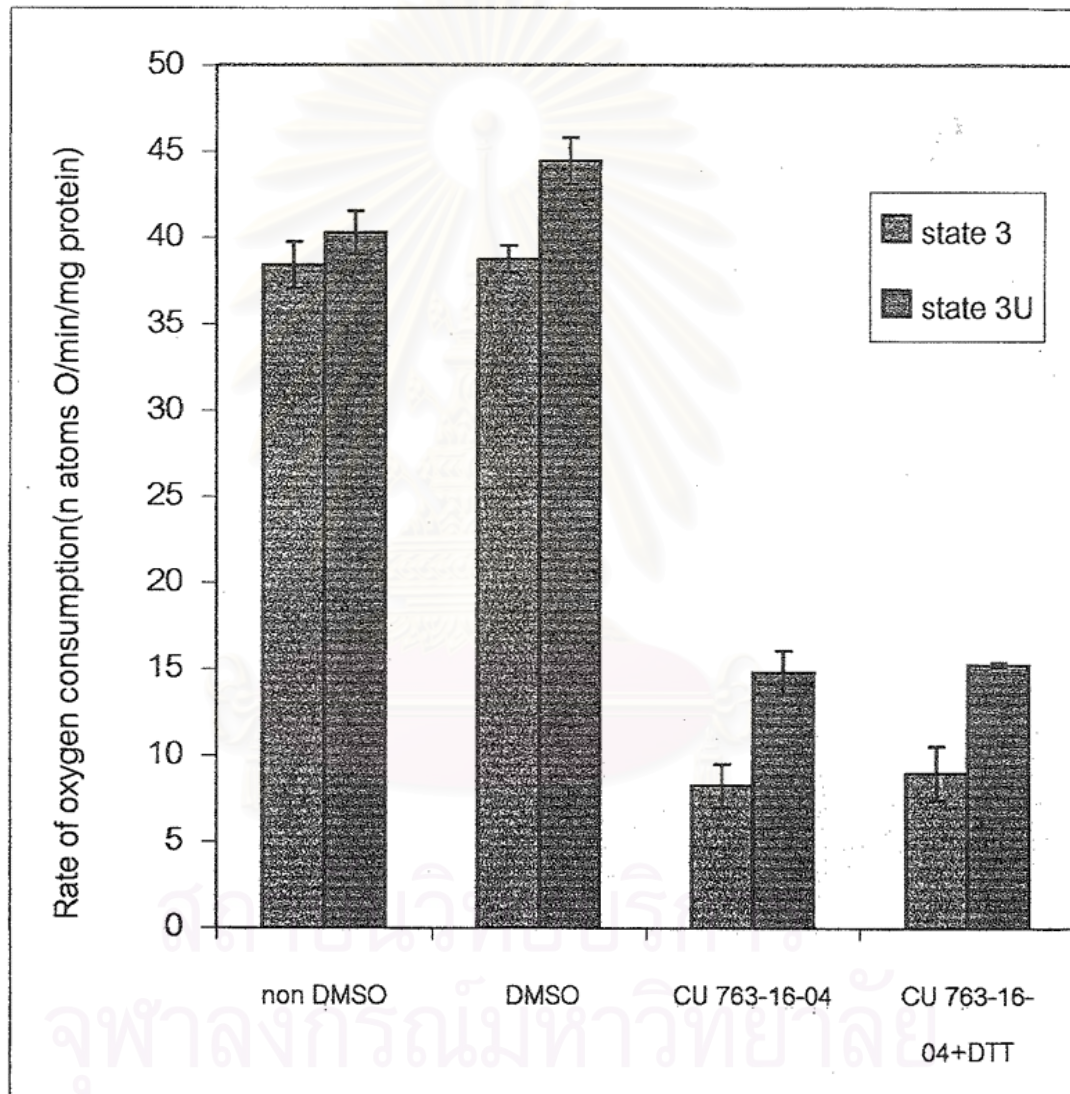
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate+ 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.43mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid และ 1 M DTT. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

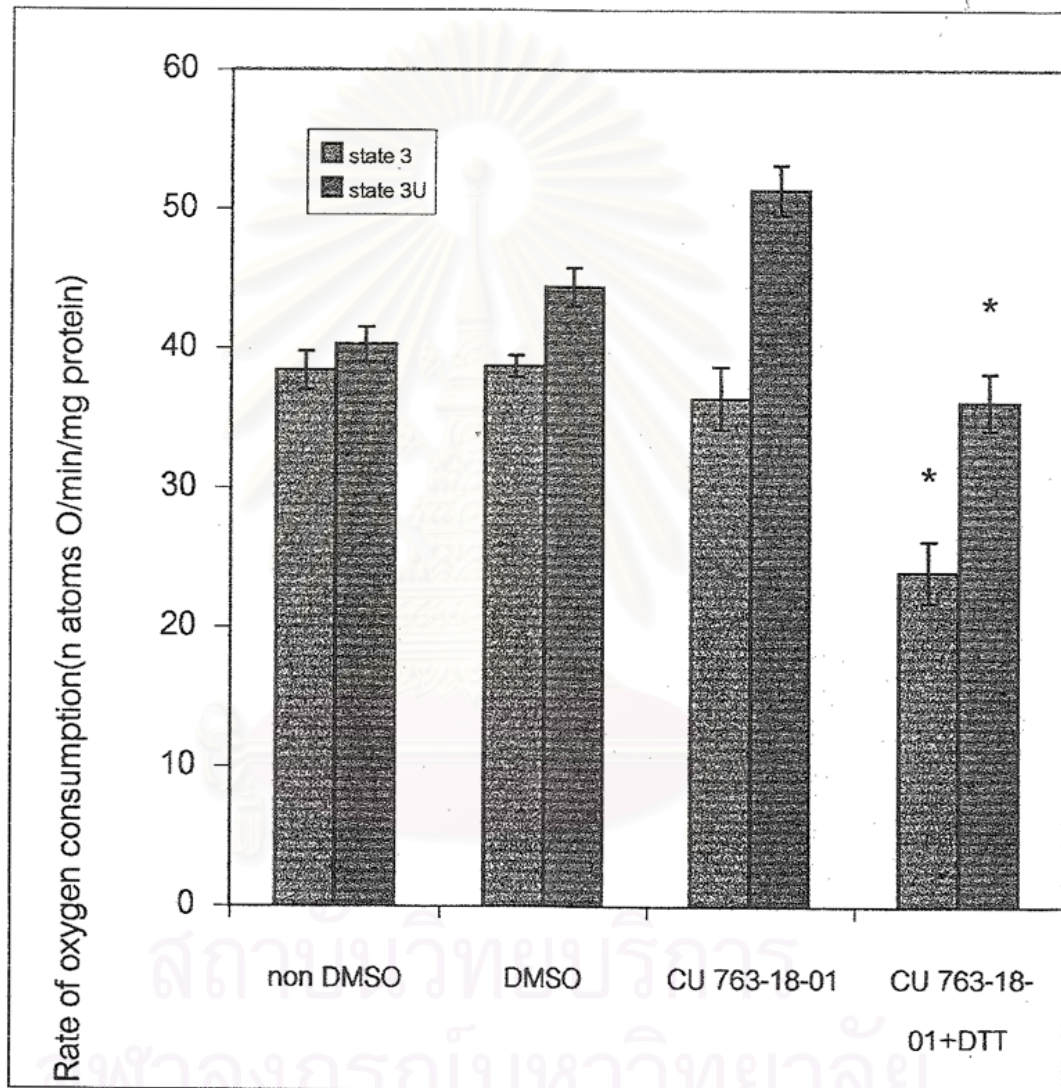


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 A ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

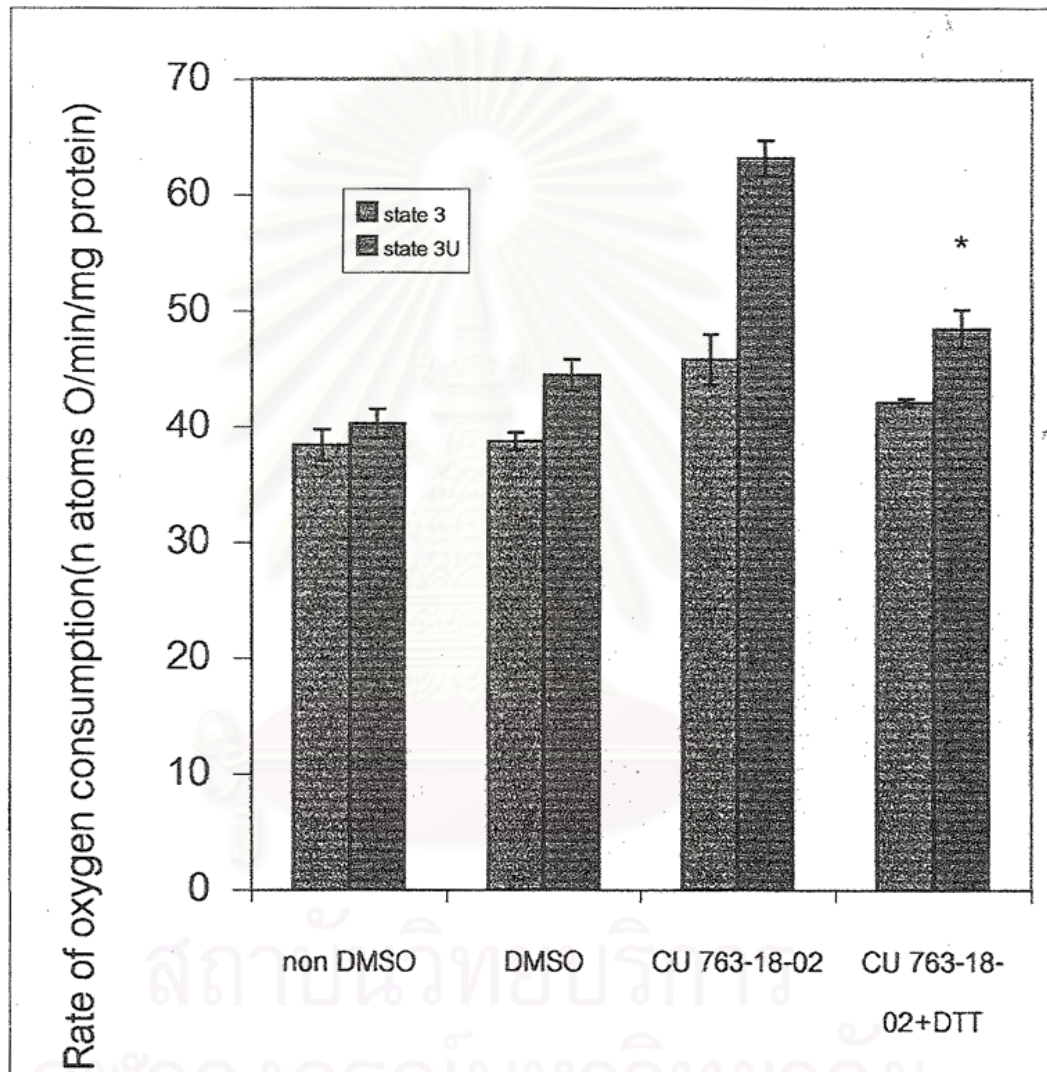


รูปที่ 31 B ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-01 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ CU 763-18-01

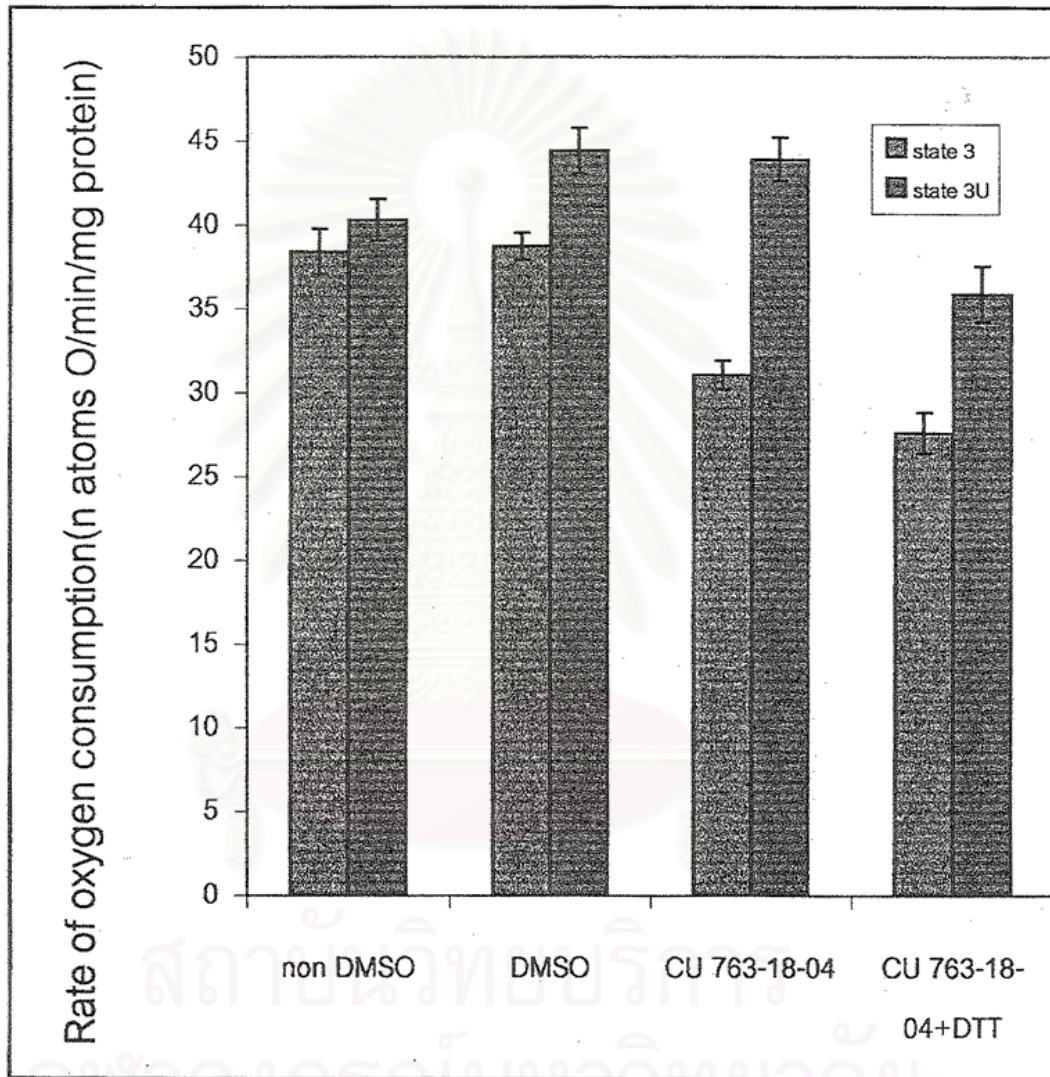
รูปที่ 31 C ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-02 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ CU 763-18-02



รูปที่ 31 D ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-04ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



ตารางที่ 6 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

Experiments ( $\mu\text{M}$ )	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg. protein/10 min.)
Non DMSO	$0.20 \pm 0.020$
DMSO	$0.22 \pm 0.09$
CU 763-16-04 (0.24)	$0.18 \pm 0.09$
CU 763-16-04 (0.49)	$0.22 \pm 0.02$
CU 763-18-01 (0.26)	$0.22 \pm 0.09$
CU 763-18-01 (0.52)	$0.22 \pm 0.00$
CU 763-18-02 (0.26)	$0.22 \pm 0.07$
CU 763-18-02 (0.52)	$0.21 \pm 0.09$
CU 763-18-04 (0.26)	$0.29 \pm 0.06$
CU 763-18-04 (0.51)	$0.27 \pm 0.05$
Iproniazid (0.28)	$0.22 \pm 0.05$
Iproniazid (0.56)	$0.25 \pm 0.06$
0.1 mM DNP	$1.10 + 0.083^*$
10 $\mu\text{g}$ oligomycin + 0.1 mM DNP	$0.14 \pm 0.04^*$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.77 mM  $\text{MgCl}_2$ , 16.78 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.26 mg protein/ml., 0.1 mM DNP, CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{M}$  ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร และ 5.03 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 32 A-E ผลของ bovine serum albumin(BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

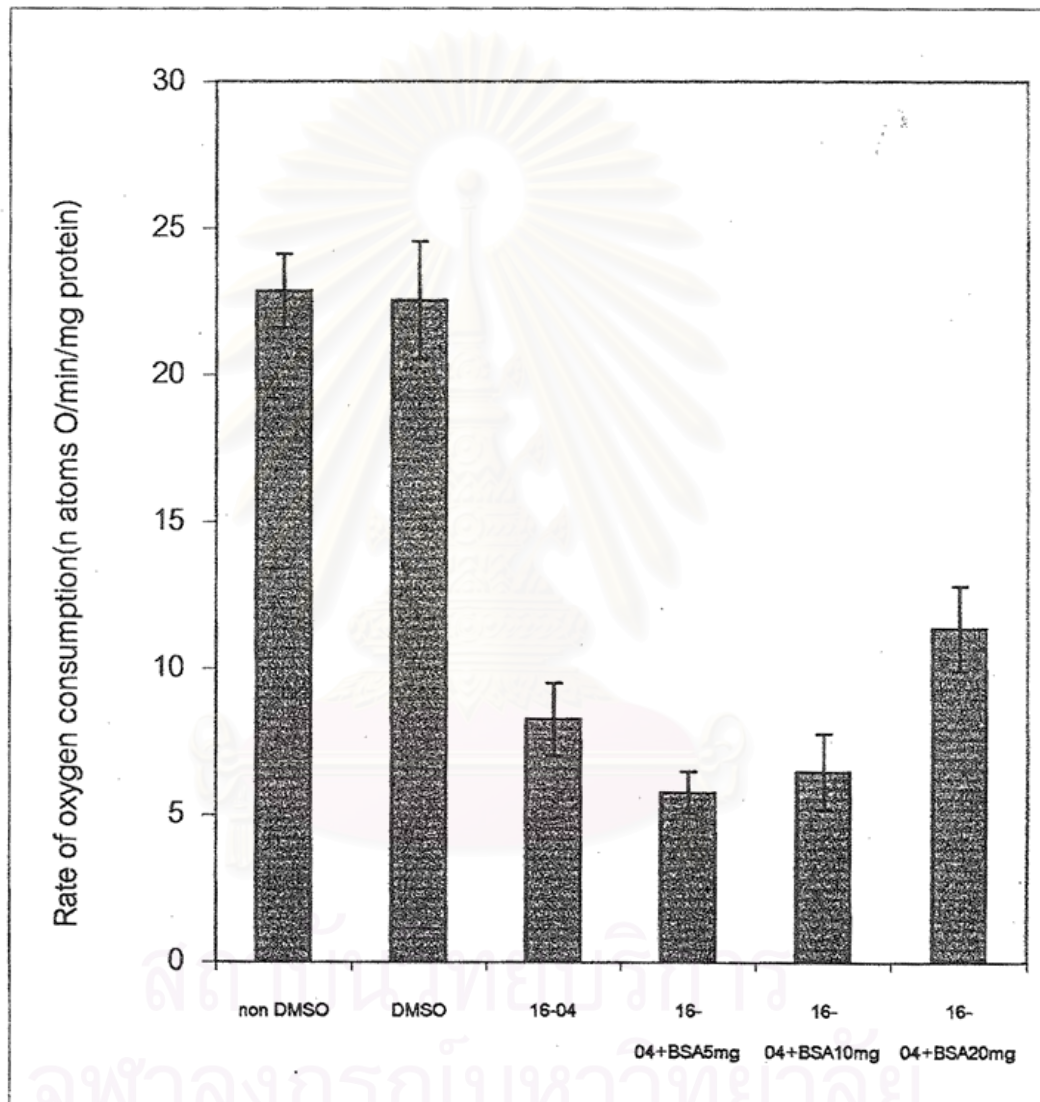
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl., 5.21 mM potassium glutamate+ 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP+0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.32mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04, iproniazid, BSA 5,10 และ 20 mg และ DMSO 10  $\mu$ l. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

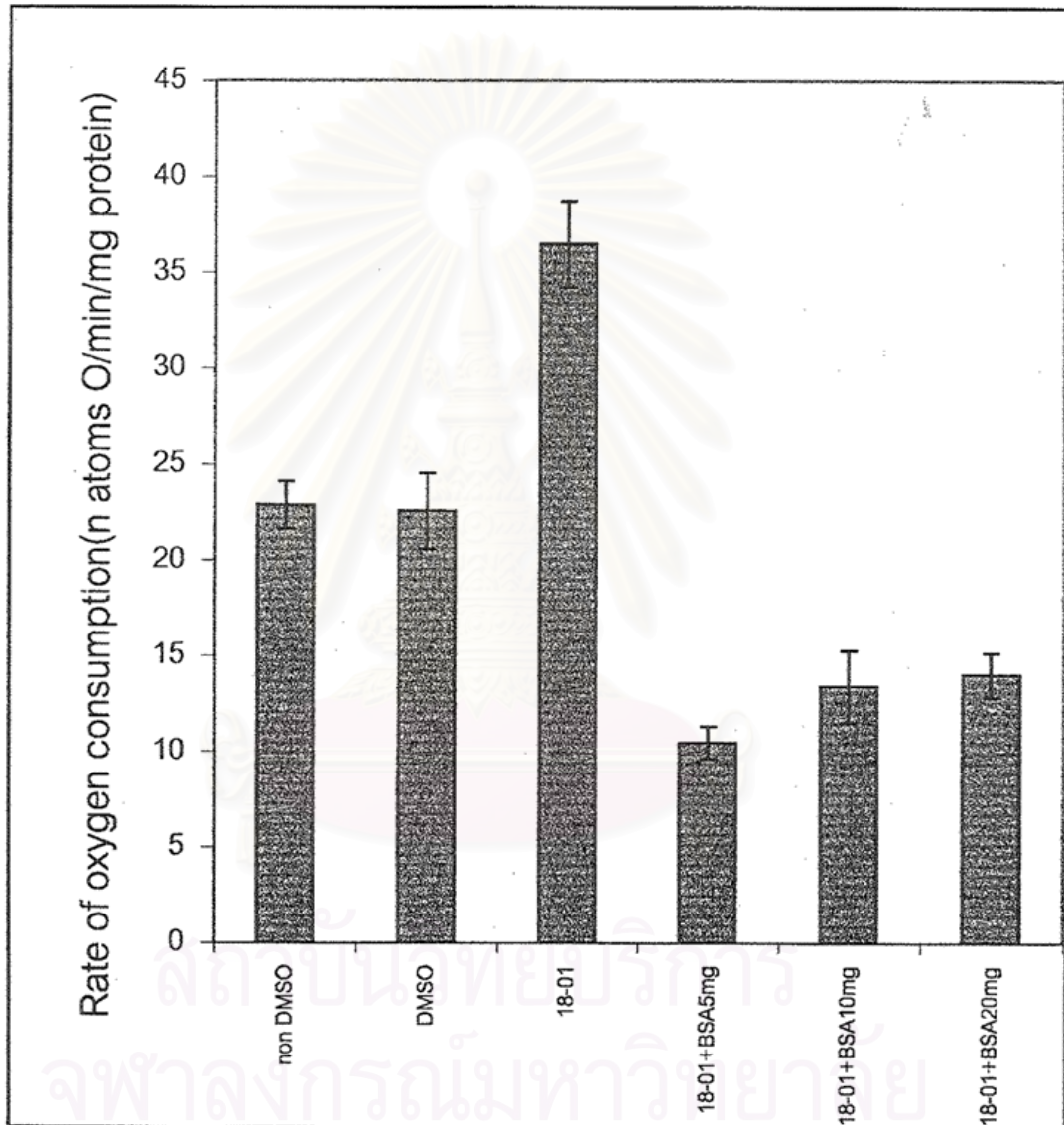


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

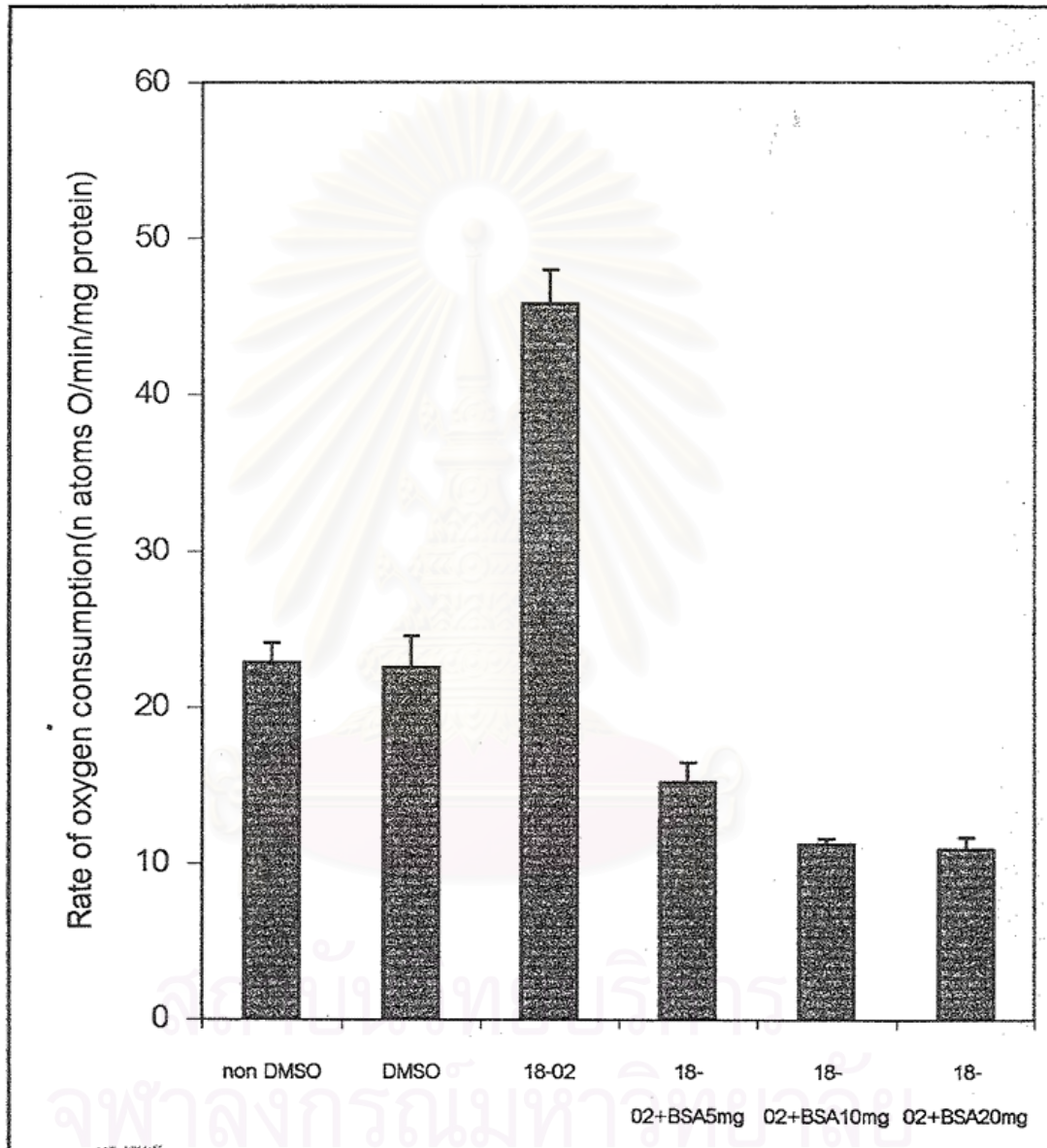
รูปที่ 32 A ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



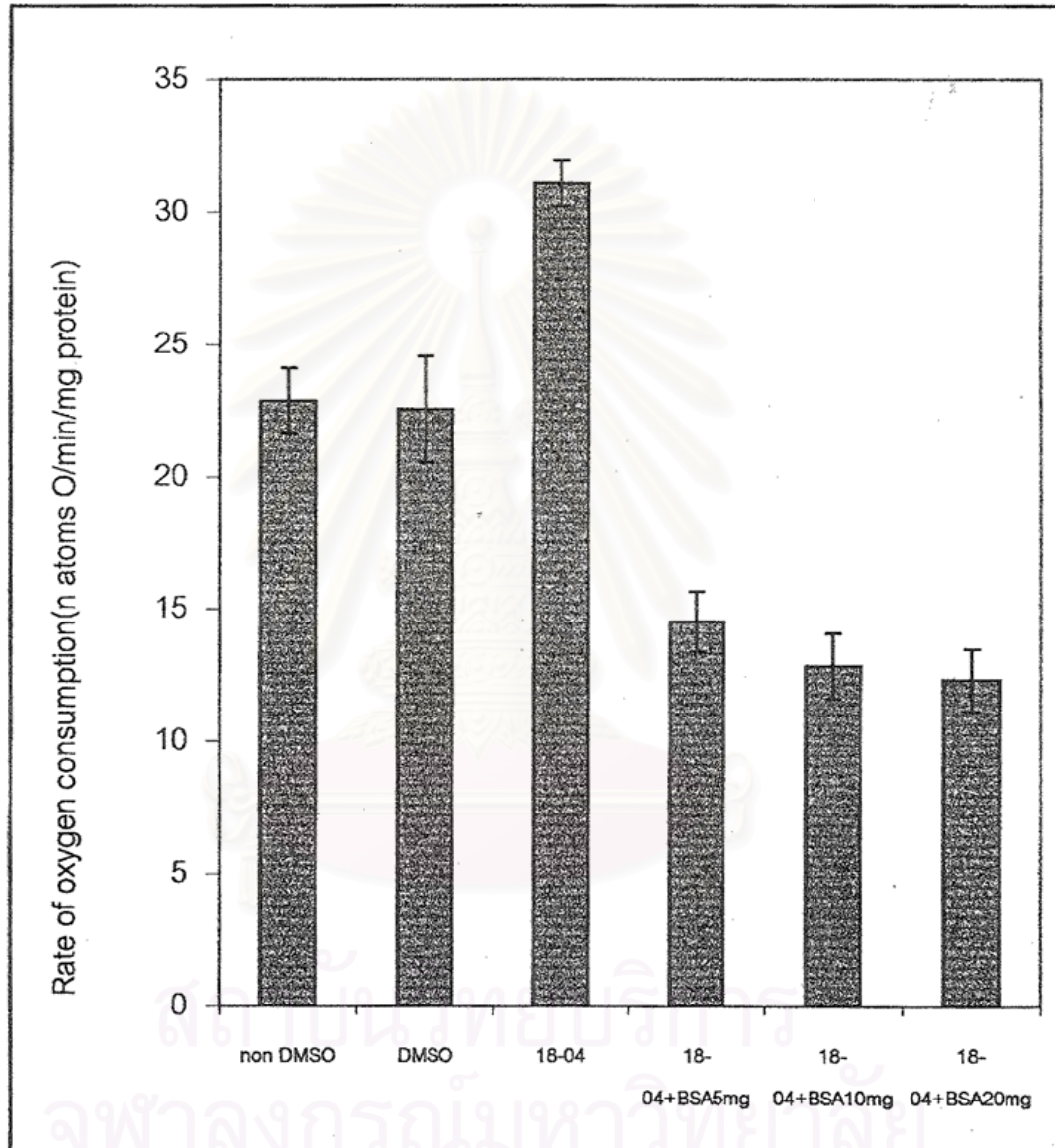
รูปที่ 32 B ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-01 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



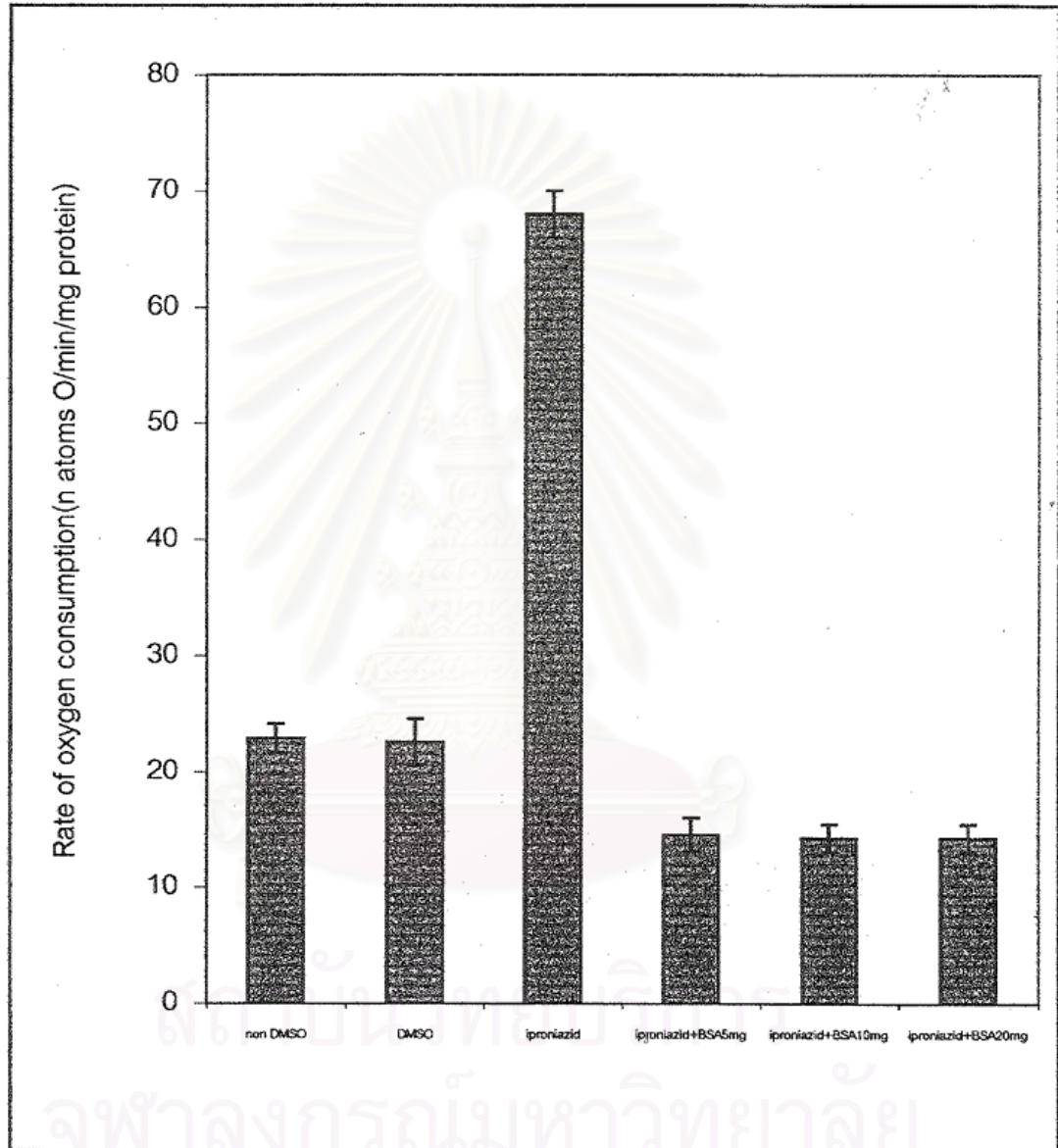
รูปที่ 32 C ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-02 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



รูปที่ 32 D ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-18-04 ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท



รูปที่ 32 E ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ iproniazid ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

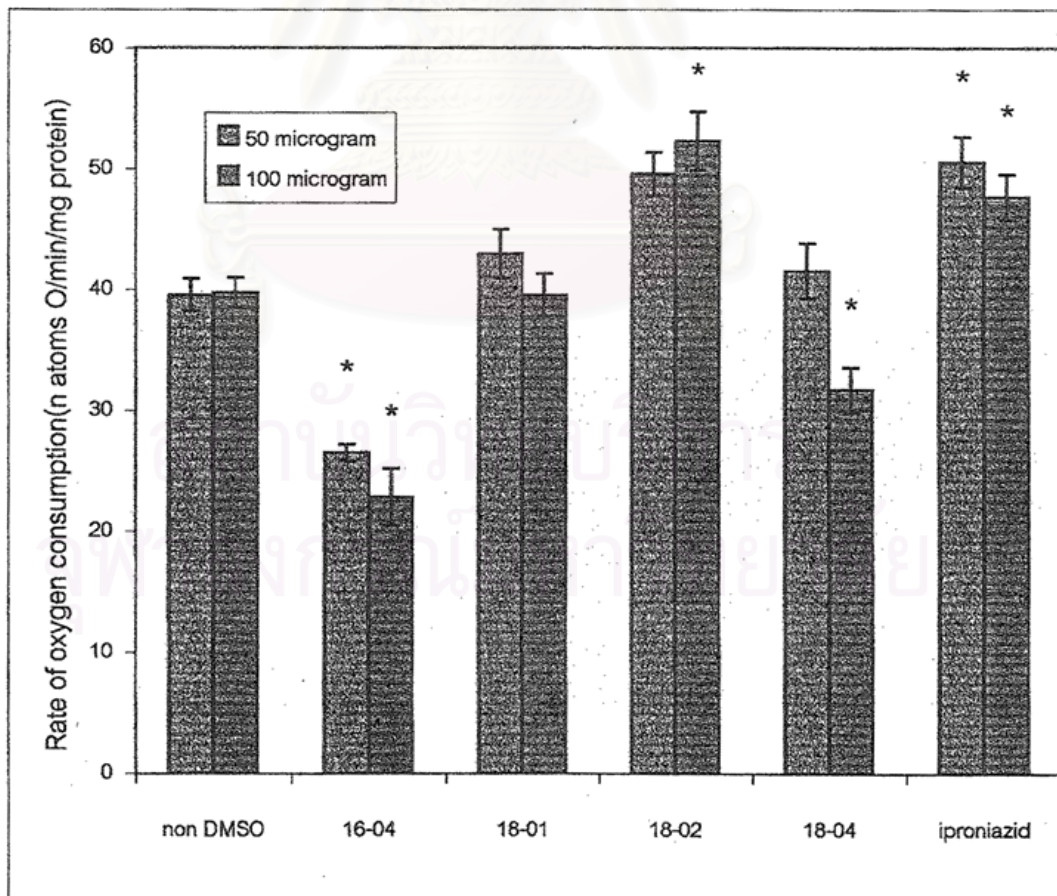




รูปที่ 33 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 188. MM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl., 5.21 mM potassium glutamate+ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.94 mM potassium phosphate และไมโทคอนเดรีย 2.05 mg protein/ml. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.42 mM CaCl<sub>2</sub> และ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 µl. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารปริมาณทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง  
\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



ตารางที่ 7 ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อการเกิด Lipid peroxidation

Experiments ( $\mu\text{M}$ )	ค่าการดูดกลืนแสง (Unit)
Non DMSO	$0.032 + 1.315 \times 10^{-3}$
<u>+ Ascorbate+FeSO<sub>4</sub></u>	
DMSO	$0.164 + 9.097 \times 10^{-3}$
CU 763-16-04 (0.243)	$0.156 \pm 6.886 \times 10^{-3}$
CU 763-16-04 (0.485)	$0.138 \pm 1.102 \times 10^{-2}$
Iproniazid (0.278)	$0.144 \pm 1.074 \times 10^{-2}$
Iproniazid (0.556)	$0.151 \pm 1.004 \times 10^{-2}$
CU 763-18-01 (0.259)	$0.139 \pm 2.326 \times 10^{-2}$
CU 763-18-01 (0.518)	$0.158 \pm 1.295 \times 10^{-2}$
CU 763-18-02 (0.259)	$0.161 \pm 1.368 \times 10^{-2}$
CU 763-18-02 (0.518)	$0.156 \pm 1.345 \times 10^{-2}$
CU 763-18-04 (0.256)	$0.157 \pm 1.046 \times 10^{-2}$
CU 763-18-04 (0.513)	$0.157 \pm 2.264 \times 10^{-2}$
EDTA (1.2 mM)	$0.016 \pm 1.070 \times 10^{-2}$ *

1 Unit : ค่าการดูดกลืนแสง 0.100 ที่ 535 นาโนเมตร แสงผ่านความกว้าง cuvette 10 มิลลิเมตร

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.4, 0.2 mg. ascorbate, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>, 20% TCA และ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสาร นำมาทำปฏิกิริยากับ 0.5% TBA

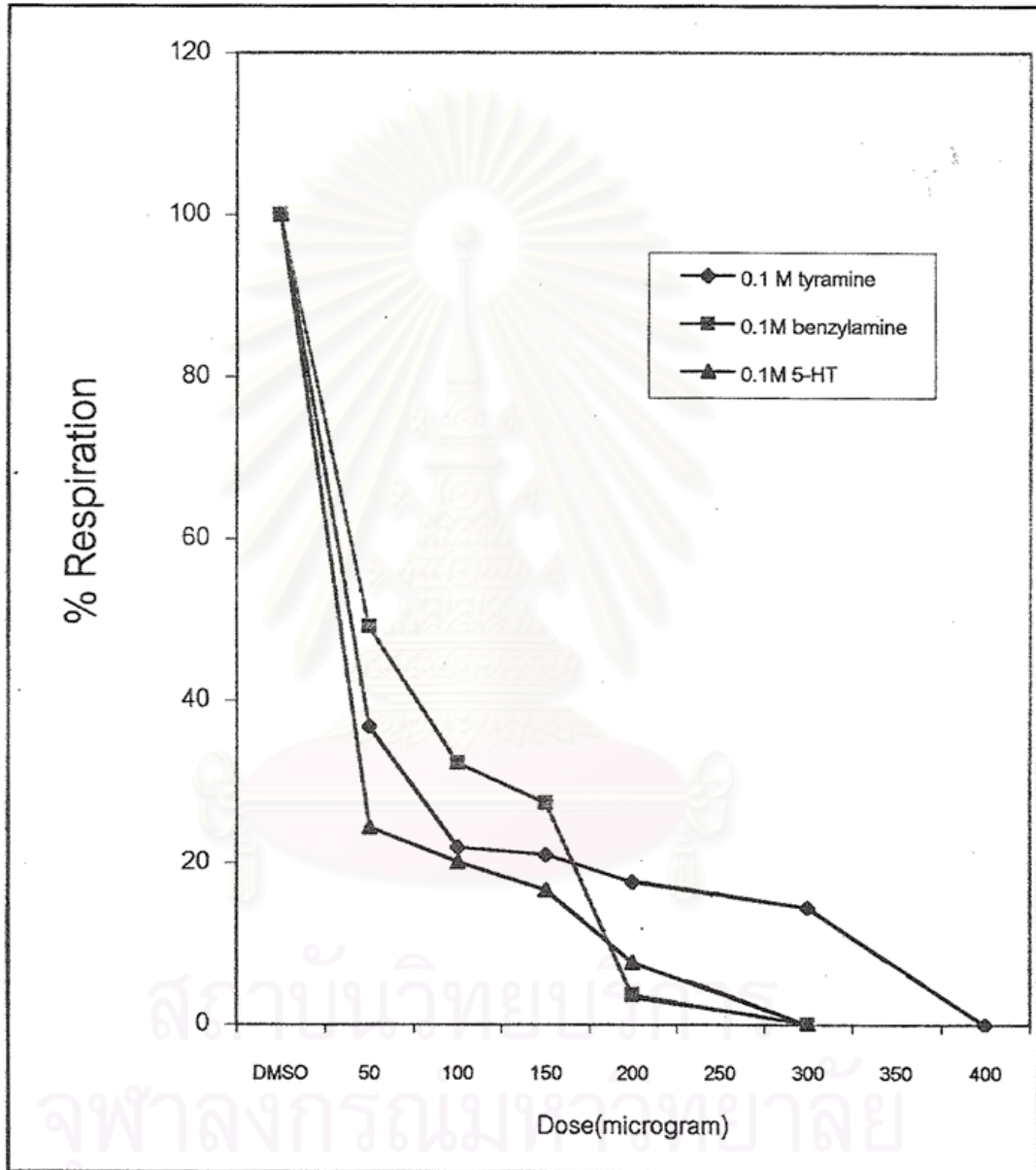
ตารางที่ 8 A-E ผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.23 M.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2, 13.02 mM sucrose, 10  $\mu\text{g}$ . rotenone และไมโตคอนเดรีย 2.08 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid, tyramine or benzylamine or 5-HT และกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10  $\mu\text{l}$ . ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 A ผลของ CU 763-16-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย



ตารางที่ 8A ผลของ CU 763-16-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

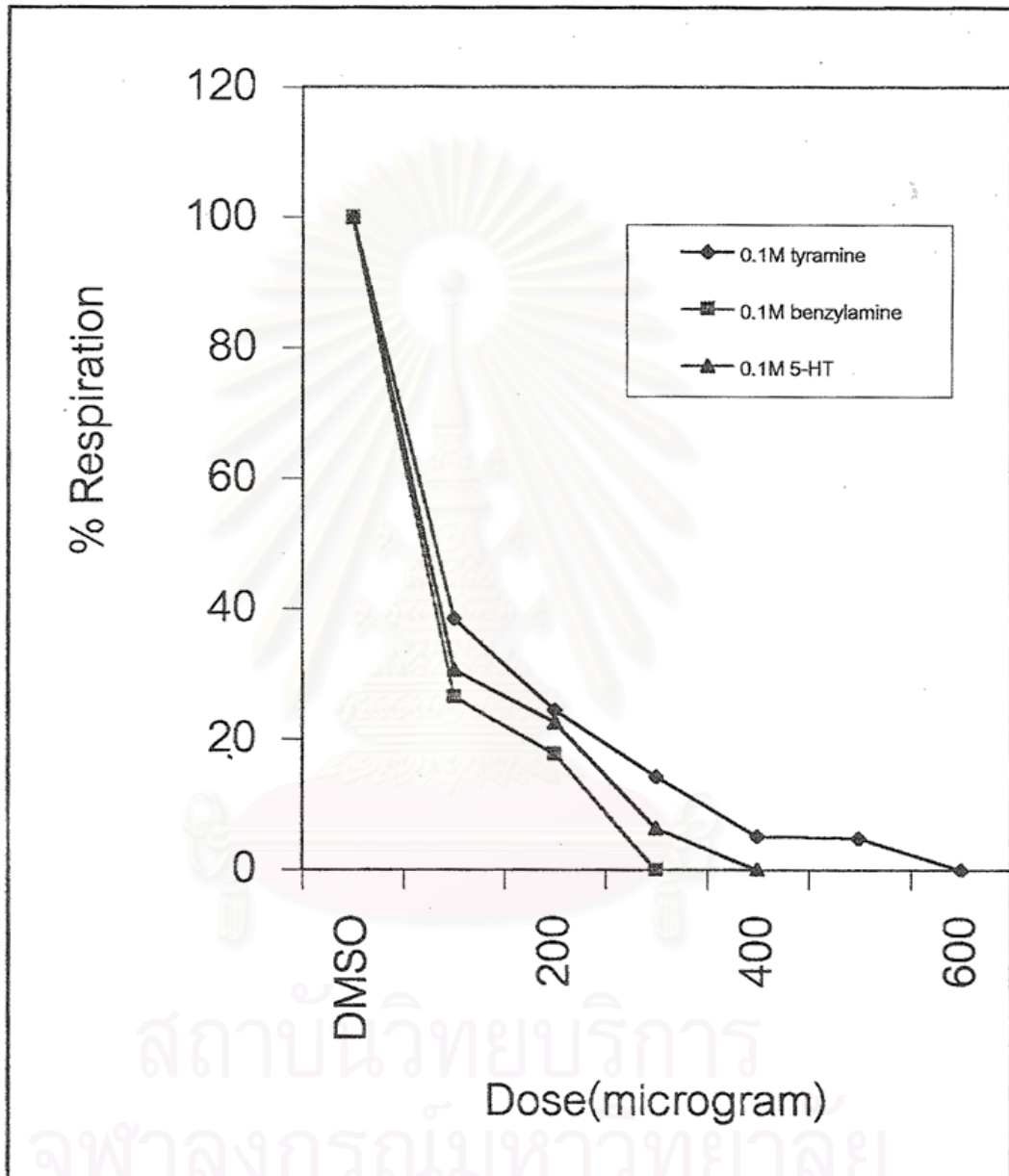
Does ( $\mu\text{M}$ )	Rate of oxygen consumption (n atom O/min./mg. protein)		
	after 0.10 M tyramine (MAO A+B)	after 0.10 M benzylamine (MAO B)	after 0.10 M 5-HT (MAO A)
DMSO	40.67 $\pm$ 1.2	56.4 $\pm$ 2.1	52.27 $\pm$ 0.50
0.24	14.97 $\pm$ 1.25*	27.69 $\pm$ 0.58*	12.73 $\pm$ 0.35*
0.49	8.92 $\pm$ 0.85*	18.22 $\pm$ 2.62*	10.49 $\pm$ 0.16*
0.73	8.54 $\pm$ 0.42*	15.44 $\pm$ 0.97*	8.68 $\pm$ 0.72*
0.97	7.14 $\pm$ 2.22*	2.07 $\pm$ 1.31*	4.02 $\pm$ 0.28*
1.46	5.88 $\pm$ 2.39*	0.00 $\pm$ 0.00*	0.00 $\pm$ 0.00*
1.94	0.00 $\pm$ 0.00*	-	-

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย + ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 B ผลของ CU 763-18-01 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย



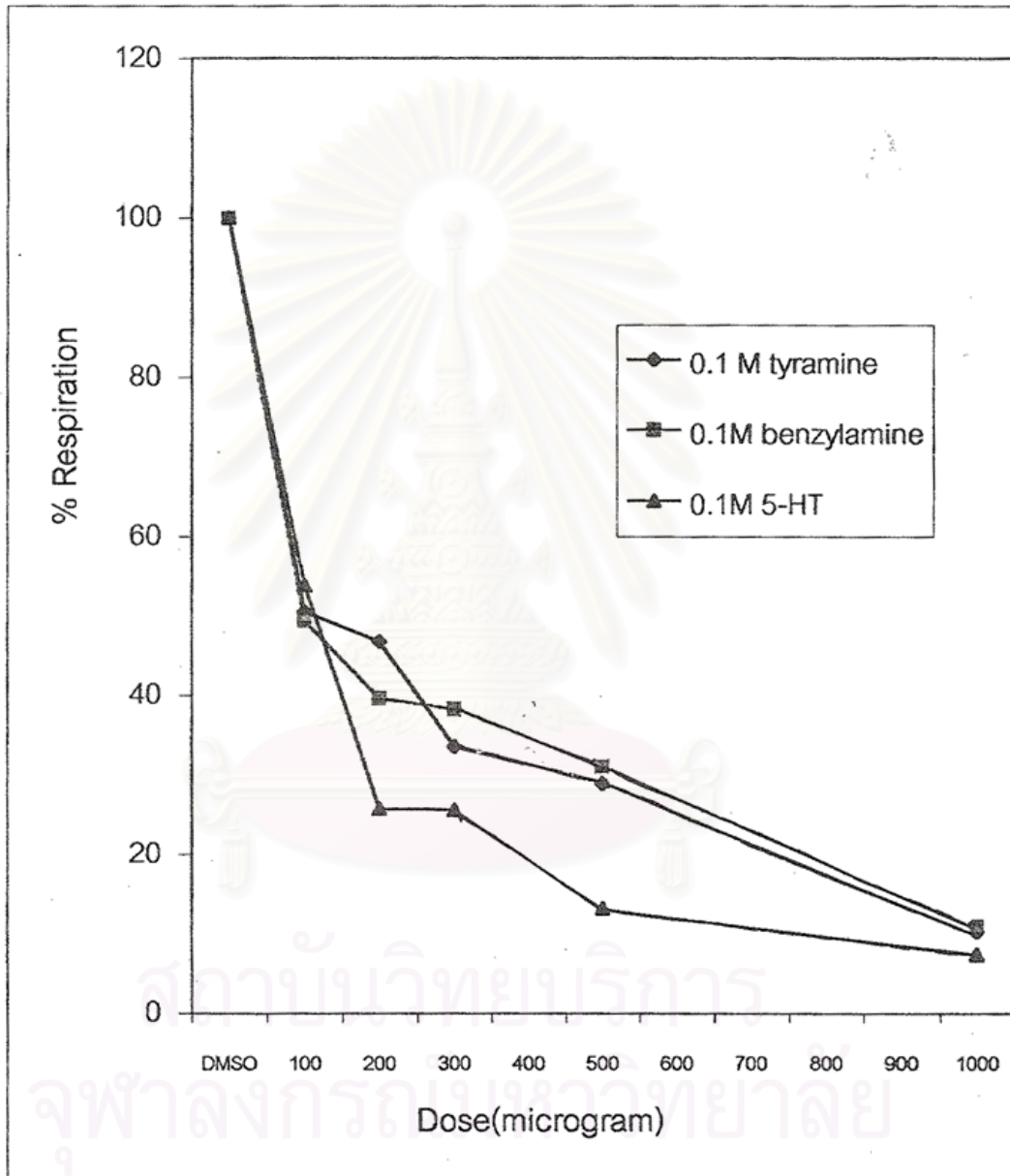
ตารางที่ 8 B ผลของ CU 763-18-01 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

Does ( $\mu\text{M}$ )	Rate of oxygen consumption (n atom O/min./mg. protein)		
	after 0.10 M tyramine (MAO A+B)	after 0.10 M benzylamine (MAO B)	after 0.10 M 5-HT (MAO A)
DMSO	40.67 $\pm$ 1.2	56.4 $\pm$ 2.1	52.27 $\pm$ 0.50
0.26	20.28 $\pm$ 1.22*	16.78 $\pm$ 1.73*	24.02 $\pm$ 1.17*
0.52	15.66 $\pm$ 1.08*	14.91 $\pm$ 0.90*	15.99 $\pm$ 1.54*
0.78	11.91 $\pm$ 2.09*	10.11 $\pm$ 1.87*	13.35 $\pm$ 2.85*
1.04	9.94 $\pm$ 2.35*	10.00 $\pm$ 1.27*	11.79 $\pm$ 1.09*
1.55	5.81 $\pm$ 1.26*	0.00 $\pm$ 0.00*	3.34 $\pm$ 1.93*
2.07	2.12 $\pm$ 0.29*	-	0.00 $\pm$ 0.00*
2.59	2.00 $\pm$ 0.68*	-	-
3.11	0.00 $\pm$ 0.00*	-	-

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับDMSO

รูปที่ 34 C ผลของ CU 763-18-02 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย





ตารางที่ 8 C ผลของ CU 763-18-02 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

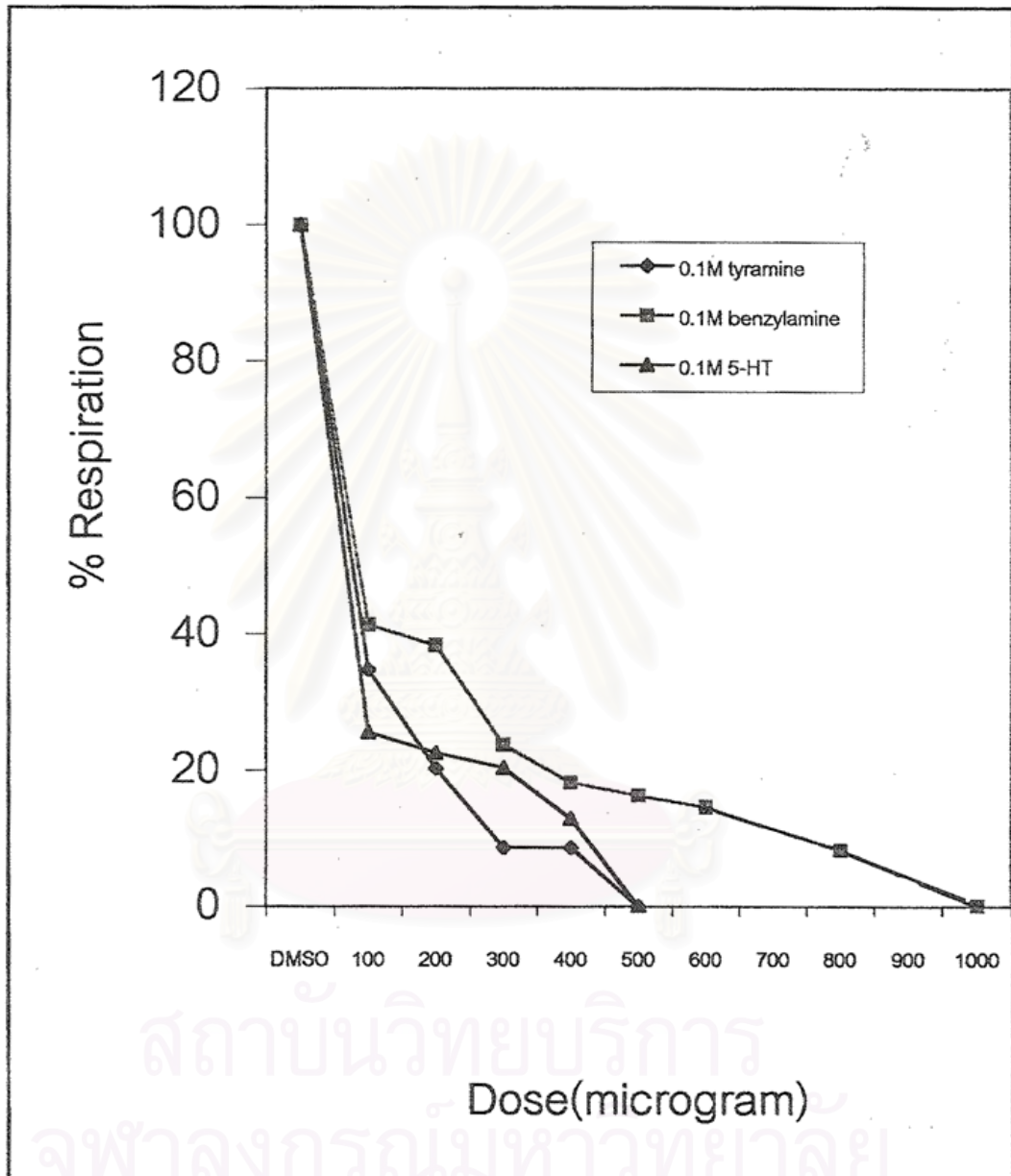
Does ( $\mu\text{M}$ )	Rate of oxygen consumption (n atom O/min./mg. protein)		
	after 0.10 M tyramine (MAO A+ B)	after 0.10 M benzylamine (MAO B)	after 0.10 M 5-HT (MAO A)
DMSO	40.67 $\pm$ 1.2	56.4 $\pm$ 2.1	52.27 $\pm$ 0.50
0.26	26.11 $\pm$ 1.21*	34.92 $\pm$ 1.08*	35.21 $\pm$ 1.70*
0.52	20.55 $\pm$ 1.69*	27.84 $\pm$ 2.19*	28.18 $\pm$ 1.07*
0.78	19.94 $\pm$ 1.81*	25.69 $\pm$ 0.58*	23.36 $\pm$ 1.92*
1.04	19.04 $\pm$ 0.78*	22.36 $\pm$ 1.07*	13.49 $\pm$ 0.08*
1.55	13.66 $\pm$ 1.92*	21.59 $\pm$ 0.96*	13.42 $\pm$ 0.04*
2.07	13.25 $\pm$ 0.26*	21.59 $\pm$ 0.95*	7.16 $\pm$ 1.74*
3.11	10.29 $\pm$ 0.66*	13.39 $\pm$ 1.78*	6.67 $\pm$ 3.85*
5.18	9.72 $\pm$ 0.33*	6.17 $\pm$ 8.31*	3.89 $\pm$ 2.24*

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 D ผลของ CU 763-18-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย



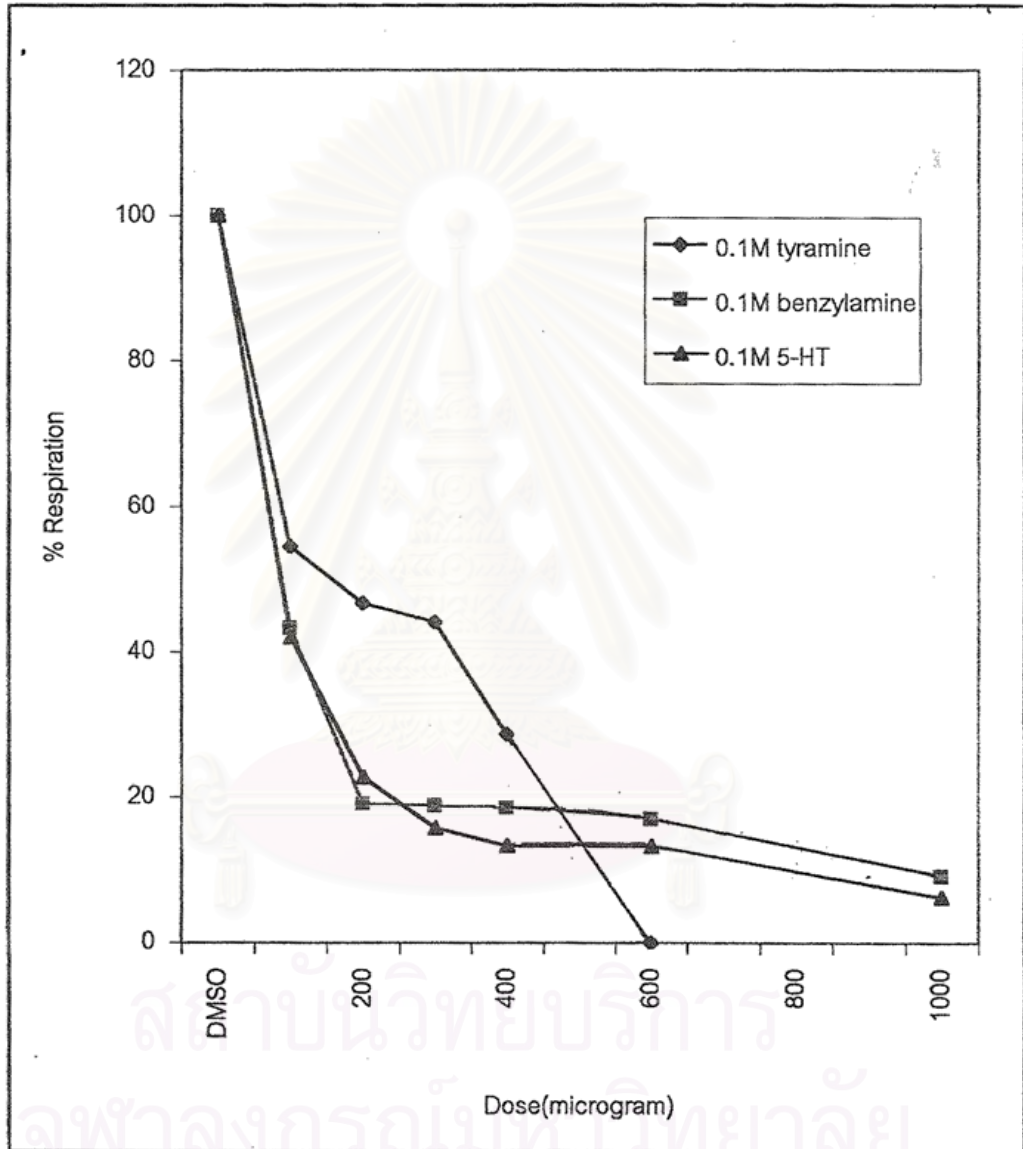
ตารางที่ 8 D ผลของ CU 763-18-04 ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

Does ( $\mu\text{M}$ )	Rate of oxygen consumption (n atom O/min./mg. protein)		
	after 0.10 M tyramine (MAO A+B)	after 0.10 M benzylamine (MAO B)	after 0.10 M 5-HT (MAO A)
DMSO	40.67 $\pm$ 1.2	56.4 $\pm$ 2.1	52.27 $\pm$ 0.50
0.26	21.12 $\pm$ 1.34*	31.56 $\pm$ 2.95*	14.62 $\pm$ 1.05*
0.51	14.12 $\pm$ 0.43*	23.30 $\pm$ 0.24*	13.35 $\pm$ 0.00*
0.77	13.78 $\pm$ 1.27*	21.66 $\pm$ 2.83*	12.57 $\pm$ 0.66*
1.03	8.27 $\pm$ 1.71*	21.58 $\pm$ 2.05*	11.79 $\pm$ 0.39*
1.54	3.51 $\pm$ 0.20*	13.35 $\pm$ 2.00*	10.66 $\pm$ 1.55*
2.05	0.00 $\pm$ 0.00*	10.29 $\pm$ 2.02*	6.77 $\pm$ 2.37*
3.08	-	8.23 $\pm$ 2.75*	0.00 $\pm$ 0.00*
4.10	-	4.65 $\pm$ 0.65*	-
5.13	-	0.00 $\pm$ 0.00*	-

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 34 E ผลของ iproniazid ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย



ตารางที่ 8 E ผลของ iproniazid ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

Does ( $\mu\text{M}$ )	Rate of oxygen consumption (n atom O/min./mg. protein)		
	after 0.10 M tyramine (MAO A+B)	after 0.10 M benzylamine (MAO B)	after 0.10 M 5-HT (MAO A)
DMSO	40.67 $\pm$ 1.2	56.4 $\pm$ 2.1	52.27 $\pm$ 0.50
0.28	31.86 $\pm$ 1.42*	30.76 $\pm$ 0.54*	35.49 $\pm$ 0.17*
0.56	22.19 $\pm$ 2.32*	24.41 $\pm$ 0.77*	21.93 $\pm$ 2.54*
0.83	20.40 $\pm$ 2.28*	23.45 $\pm$ 0.08*	16.69 $\pm$ 1.93*
1.11	19.0 $\pm$ 1.19*	10.77 $\pm$ 0.76*	11.86 $\pm$ 1.19*
1.67	17.95 $\pm$ 1.55*	10.63 $\pm$ 0.72*	8.23 $\pm$ 0.89*
2.22	11.66 $\pm$ 1.18*	10.47 $\pm$ 0.72*	6.95 $\pm$ 0.98*
3.33	0.00 $\pm$ 0.00*	9.61 $\pm$ 0.97*	6.90 $\pm$ 0.53*
5.55	-	5.14 $\pm$ 1.49*	3.48 $\pm$ 0.75*

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

\*p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับDMSO

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองในบทที่ 4 แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของสารสังเคราะห์กลุ่ม N-acylaminopyridine ได้แก่ CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU763-18-04 มีฤทธิ์ต่อไมโตคอนเดรียที่แยกมาจากตับหนูขาว โดยมีฤทธิ์ต่อกระบวนการหายใจ 2 ประการ คือ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3U respiration เมื่อใช้  $\text{NAD}^+$ -linked substrates ได้แก่ glutamate+malate,  $\alpha$ -ketoglutarate และ  $\beta$ -hydroxybutyrate (รูปที่ 23 A,B- 27 A,B , ตารางที่ 4-5, รูปที่ 28) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า N-acylaminopyridine เป็นสารในกลุ่ม respiratory chain inhibitor ซึ่งผลที่ศึกษานี้ก็สอดคล้องกับ CU 763-15-13 ซึ่งเป็นสาร N-acylaminopyridine ที่ได้มีการศึกษามาก่อน พบว่าออกฤทธิ์เป็น site I inhibitor (อุ้นเว็อน, 2541) และเมื่อเปลี่ยนชนิดของ substrate เป็น succinate พบว่าสารทุกตัวของ N-acylaminopyridine derivatives มีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจใน state 4 และไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเลย สารทุกตัวไม่พบว่าจะกระตุ้นการทำงานของ ATPase และไม่ยับยั้ง lipid peroxidation ของไมโตคอนเดรียที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ascorbate กับ ferrous และยังพบว่า สารทุกตัวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO โดยมีความแรงต่างกัน ซึ่งรายละเอียดของผลการทดลองจะใช้นำมาอภิปรายฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หรือพิษวิทยาได้ดังที่จะกล่าวต่อไป

#### 1. ฤทธิ์ยับยั้งการใช้การหายใจ

จากผลการศึกษาเมื่อใช้ glutamate+malate รวมทั้ง  $\text{NAD}^+$ -linked substrate ตัวอื่นๆ เช่น  $\alpha$ -ketoglutarate และ  $\beta$ -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท พบว่า CU 763-16-04 มีฤทธิ์ยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U respiration ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว และฤทธิ์ของสารจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 0.32  $\mu\text{M}$  และ 0.39  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 23 A,B) ส่วนอนุพันธ์อื่นๆ ก็มีฤทธิ์เช่นเดียวกัน แต่มีความแรงในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียแตกต่างกัน โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ดังต่อไปนี้ CU 763-18-01 มีค่า 2.11  $\mu\text{M}$  และ 2.61  $\mu\text{M}$ , CU763-18-02 มีค่ามากกว่า 5.18  $\mu\text{M}$  ทั้ง 2 state และ CU 763-18-04 เป็น 3.10  $\mu\text{M}$  และ 2.31  $\mu\text{M}$  ใน state 3 และ state 3U ส่วน iproniazid ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติยับยั้ง MAO ได้ และมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียง ได้ถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบ ซึ่งมีผลน้อยมากต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเมื่อเปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate จะพบว่า

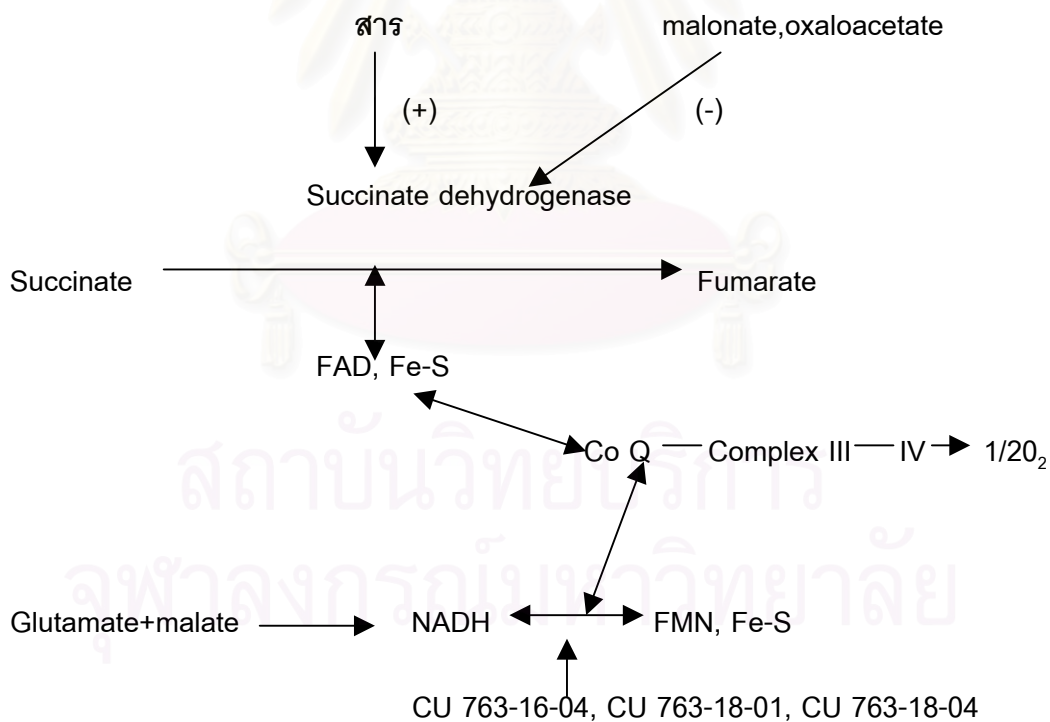
N-acylaminopyridine derivatives ที่นำมาศึกษามีฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนใน state 4 แต่ไม่ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน เมื่อเติม ADP+Pi ลงในปฏิกิริยาผลก็จะเป็นการแสดงว่า N-acylaminopyridine น่าจะออกฤทธิ์เป็น site I inhibitor เช่นเดียวกับ rotenone (Teeter, Baginsky and Hatefi, 1969) ซึ่งอาจจะอธิบายได้ดังนี้ เมื่อสับสเตรท ( $\text{NAD}^+$ -linked substrate) ผ่าน Krebs' cycle จะมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม(2H) จากสารตัวกลางไปรีดิวซ์  $\text{NAD}^+$  ไปเป็น  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ถ้าใช้ succinate เป็นสับสเตรทไฮโดรเจนอะตอม(2H) จะรีดิวซ์ FAD ไปเป็น  $\text{FADH}_2$  (Darnell, Lodish and Baltimore, 1986) ซึ่งเป็น reducing equivalent ที่สำคัญจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ ในกรณีที่ได้  $\text{NADH}+\text{H}^+$  จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I ส่วน  $\text{FADH}_2$  จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II และเพื่อแสดงให้เห็นชัดเจนว่า N-acylaminopyridine เป็น site I inhibitor ก็โดยทำการศึกษากับ NADH oxidation โดย osmotic-shocked mitochondria ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่โตคอนเดรียอยู่ในสภาวะ uncoupling อยู่แล้ว โดยไม่ต้องเติม DNP แต่สามารถกระตุ้นให้เกิด state 3U respiration ได้ โดยใช้ NADH เป็นสับสเตรท ในสภาวะนี้ไมโตคอนเดรียจะสามารถออกซิไดซ์ NADH ที่เติมลงไปได้ (exogenous NADH ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่) ซึ่งตามปกติแล้ว intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ NADH ที่เติมลงไปได้ นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย (Lehninger, 1993) การเตรียมไมโตคอนเดรียใน hypotonic solution ทำให้ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียบวม (swelling) (De Robertis, E.D.P. and Robertis, E.M.F., 1987) จึงยอมให้ NADH ผ่านเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรียได้โดยตรง (Lehninger, 1962, Lehninger, 1993) และ NADH จะส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรงในลูกโซ่การหายใจ จากผลการศึกษา CU 763-16-04 มีผลยับยั้งการออกซิไดซ์ของ NADH แรงกว่า CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการยับยั้ง  $\text{NAD}^+$ -linked substrate ว่า CU 763-16-04 มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนบนลูกโซ่การหายใจโดยตรงที่ complex I แรงที่สุด และจากการศึกษาในขั้นตอนนี้แสดงว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 มีคุณสมบัติเป็น mitochondrial effect จัดอยู่ในกลุ่ม site I inhibitors ซึ่งได้แก่ rhein, amytal, rotenone, piericidin, steroids เป็นต้น (ตามรูปที่ 14, ในบทที่ 2)

## 2. ฤทธิ์กระตุ้นการออกซิเดชันของ succinate

จากการศึกษาทดลองผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 ในบทที่ 4 พบว่าเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท มีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 29) ส่วน iproniazid มีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อขนาดตั้งแต่ 150  $\mu\text{g}$  (0.54

$\mu\text{M}$ ) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าใน Krebs' cycle นั้น succinate จะถูกออกซิไดซ์โดย succinate dehydrogenase เพื่อให้ได้ fumarate นอกจากนี้ succinate dehydrogenase จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นด้วย succinate, ATP, Pi และสามารถถูกยับยั้งการออกซิไดซ์ succinate ได้ด้วย malonate และ oxaloacetate (Devlin, 1992) จากผลการทดลองพบว่า malonate ออกฤทธิ์ยับยั้งการออกซิไดซ์ของ succinate ที่ถูกกระตุ้นด้วย CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid (รูปที่ 30) ได้

ดังนั้นผลของ CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวนั้น แสดงฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งในลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่ง complex I และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ succinate ไปเป็น fumarate ดังนั้น CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ออกฤทธิ์เป็น inhibitor หรือ stimulator ต่อกระบวนการหายใจขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรทที่มีอยู่ในขณะนั้น ส่วน CU 763-18-02 และ iproniazid ไม่มีผลยับยั้งในลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่ง complex I แต่มีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ succinate ไปเป็น fumarate ได้ ดังรูปข้างล่างนี้



เครื่องหมายแสดง (-) = inhibition effect, (+) = stimulation effect

จากการศึกษาของ Jockel, et al., (1998) พบว่า สารที่ยับยั้ง succinate oxidation มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ dihydroorotate dehydrogenase ซึ่งมีข้อบ่งชี้ว่าอาจจะมีฤทธิ์เป็น



antiproliferation antiparasitic และ anticancer ดังนั้นสารในกลุ่ม N-acylaminopyridine derivatives ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้น succinate oxidation ควรจะมีการศึกษาเกี่ยวกับผลต่อ dihydroorotate dehydrogenase

### 3. ผลของ bovine serum albumin (BSA)

Bovine serum albumin เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ plasma albumin เนื่องจากยาส่วนใหญ่เมื่อเข้าสู่กระแสโลหิตจะจับกับ plasma proteins ซึ่งประกอบด้วย albumin และ globulin โดยในกระแสโลหิต plasma protein ส่วนใหญ่จะเป็น albumin และยาส่วนใหญ่จะมี affinity ต่อ albumin มากกว่า globulin (Gilman, Goodman, Rall and Murad, 1985) จากผลการทดลองในบทที่ 4 พบว่า BSA มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ N-acylaminopyridine derivatives คือ การยับยั้ง state 3 และ 3U respiration แบบขึ้นกับปริมาณของ BSA กล่าวคือ BSA จำนวนน้อย (5 mg) จะมีปฏิสัมพันธ์กับ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ทำให้มีการยับยั้ง state 3 มาก และเมื่อเพิ่ม BSA มากขึ้นเป็น 10 mg และ 20 mg จะพบว่าผลการยับยั้ง state 3 จะน้อยลง ซึ่งผลอันนี้อาจเป็นไปได้ว่า BSA อาจมีผลบางประการ ทำให้ CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ออกฤทธิ์ได้มากขึ้น ซึ่งควรมีการศึกษาต่อถึงปฏิสัมพันธ์ว่ามีกลไกอย่างไร

### 4. ผลของ dithiothreitol (DTT)

บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียจะมี sulfhydryl groups อยู่ ซึ่งมีหน้าที่ควบคุม permeability ของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ควบคุมความสมบูรณ์ของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (membrane integrity) การขนส่งอิเล็กตรอนต่างๆ การทำงานของเอนไซม์ ATP synthase และการควบคุมกันของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (Le-quoc, K. and Le-quoc, D., 1982) ซึ่ง DTT เป็นสารป้องกันการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (Cleland, 1964) จากผลการทดลองในบทที่ 4 (รูปที่ 31 A-E) CU 763-16-04 ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยจับกับ sulfhydryl groups (-SH) ของไมโทคอนเดรีย ส่วน CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ออกฤทธิ์โดยการจับกับ sulfhydryl groups (-SH) ของไมโทคอนเดรีย เมื่อให้ DTT จึงทำให้การออกฤทธิ์ลดลงได้

## 5. ผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

จากผลการทดลองในบทที่ 4 (ตารางที่ 6) พบว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ไม่มีฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO DNP เป็นสารสามารถกระตุ้น ATPase ทำให้เกิดเป็น uncoupler เกิดการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ทำให้มีปริมาณ Pi เพิ่มขึ้นด้วย (Danishefky, 1980; Campbell, 1995; Garrett and Grisham, 1995) Oligomycin เป็นสารที่ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย โดยมีผลยับยั้งที่  $F_0$  ของเอนไซม์ ATP synthase (Chappell and Croft, 1965; Senior, 1973) และสามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของ DNP ได้ดังตารางที่ 6

## 6. ผลต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม

การทำงานของไมโทคอนเดรีย นอกจากการสร้าง ATP โดยกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันแล้ว ยังมีความสามารถในการสะสมแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) จาก medium เข้าไปเก็บสะสมไว้ในตัวเองได้เป็นจำนวนมาก และยังพบว่าไมโทคอนเดรียจะใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปในการสะสม  $Ca^{2+}$  ก่อน จนกระทั่ง  $Ca^{2+}$  เกือบทั้งหมดถูกสะสม ไมโทคอนเดรียจึงจะเริ่มใช้พลังงานในการสร้าง ATP จึงแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียมี affinity ต่อ  $Ca^{2+}$  มากกว่า ADP และแสดงให้เห็นว่าการสะสม  $Ca^{2+}$  โดยไมโทคอนเดรียเป็นขบวนการที่สำคัญมากต่อการทำงานของเซลล์ ข้อมูลเหล่านี้จึงกล่าวได้ว่า การขนส่ง  $Ca^{2+}$  และการสร้าง ATP เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของไมโทคอนเดรียทั่วไป

ในการขนส่ง  $Ca^{2+}$  โดยไมโทคอนเดรีย นั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ  $Ca^{2+}$  ในไซโตซอล (cytosol) เป็นตัวที่ถูกควบคุม ซึ่งภายในเซลล์จะมีการสะสม  $Ca^{2+}$  บริเวณ endoplasmic reticulum (ER), extracellular space และไมโทคอนเดรีย การไหลเข้าของแคลเซียมใช้แรงขับเคลื่อนจากความต่างศักย์ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นประจุลบ (negative inside) ทำให้จับกับประจุบวก อัตราการไหลเข้าจะแปรผันตามความเข้มข้นของ  $Ca^{2+}$  ที่ภายนอก ส่วนการไหลออก  $Ca^{2+}$  จะมีแรงขับเคลื่อนโดยอาศัยการขนส่งอิเล็กตรอนหรือเกิด proton gradient ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ขบวนการแลกเปลี่ยนนี้เกิดขึ้นด้วยความเร็วสูงสุด จากผลการทดลอง รูปที่ 33 สารในกลุ่ม N-acylaminopyridine มีผลต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นโดย  $Ca^{2+}$  ไม่เท่ากัน บางตัวยับยั้ง เช่น CU 763-16-04 บางตัวไม่มีผล เช่น CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 บางตัวมีแนวโน้มที่เสริมฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจ คือ CU 763-18-02 และ iproniazid

## 7. ผลต่อการเกิด lipid peroxidation

การเกิด lipid peroxidation จะทำให้ผนังเซลล์สูญเสียความทรงตัวและไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เกิดอันตรายต่อเซลล์นั้นๆโดยตรง จากการศึกษาพบว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01, CU 763-18-02, CU 763-18-04 และ iproniazid ไม่มีฤทธิ์ต่อต้านการกระตุ้นการเกิด lipid peroxidation โดย ascorbate กับ ferrous sulfate (ตารางที่ 7) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาออกมาเป็นหน่วย unit ส่วน EDTA สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ (Theite and Huff, 1960)

## 8. ผลต่อ monoamine oxidase activity

Monoamine oxidase เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Avers, 1986) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์สาร monoamine ในการทดลองนี้ใช้ tyramine เป็นสับสเตรทของ MAO แบบไม่จำเพาะเจาะจง benzylamine เป็นสับสเตรทของ MAO-B และ 5-HT เป็นสับสเตรทของ MAO-A เติม rotenone เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrate จากการศึกษาทดลองในบทที่ 4 (ตารางที่ 8 A-E, รูปที่ 34 A-E) พบว่า CU 763-16-04 สามารถยับยั้ง MAO-A เมื่อใช้ 5-HT เป็นสับสเตรทได้ดีกว่าด้วย  $IC_{50}$  ที่ขนาดประมาณ  $33.33\mu g(0.16\mu M)$  มากๆ CU 763-18-01 สามารถยับยั้ง MAO-B เมื่อใช้ benzylamine ได้ดีกว่า MAO-A ด้วยขนาด  $IC_{50}$  ประมาณ  $68.75\mu g(0.36\mu M)$  CU 763-18-02 สามารถยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ด้วยขนาด  $IC_{50}$   $104.22\mu g(0.54\mu M)$  ส่วน CU 763-18-04 สามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดีกว่า MAO-B ด้วยขนาด  $IC_{50}$  ประมาณ  $73.81\mu g(0.38\mu M)$  และ ipmiazid สามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดีกว่า MAO-B ด้วยขนาด  $IC_{50}$  ประมาณ  $90\mu g(0.50\mu M)$

จากผลการศึกษาในบทที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบถึงพิษต่อเซลล์กับประโยชน์ที่ต้องการ ดังตารางที่ 9 ตารางที่ 9 แสดงค่าสัดส่วนระหว่าง  $IC_{50}$  ของ N-acylaminopyridine derivatives ต่อ respiration กับ  $IC_{50}$  ของ N-acylaminopyridine derivatives ต่อ MAO

Substrate	$IC_{50}$ ( $\mu$ M) MAO			$IC_{50}$ ( $\mu$ M) Respiration (state 3)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M) Ratio = $IC_{50}$ ( $\mu$ M) respiration / $IC_{50}$ ( $\mu$ M) MAO		
	MAO A+B	MAO- A	MAO B		A+B	A	B
CU 763-16-04	0.20	0.16	0.25	0.32	1.6	2	1.28
CU 763-18-01	0.44	0.39	0.36	2.11	4.79	5.41	5.86
CU 763-18-02	0.63	0.63	0.54	>5.18	>8.22	>8.22	>9.59
CU 763-18-04	0.45	0.38	0.50	3.10	6.89	8.16	6.2

การคำนวณค่า ratio ที่ได้ระหว่างค่าที่  $IC_{50}$  ของการยับยั้ง state 3 กับค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้ง MAO ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9 ซึ่งพบว่า CU 763-18-02 ให้ค่า ratio สูงกว่า CU 763-16-04, CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าควรพิจารณา CU 763-18-02 เพื่อดัดแปลงสูตรโครงสร้างหรือทิศทางต่อไป เนื่องจาก  $IC_{50}$  สำหรับ MAO มีค่า  $0.63 \mu$ M ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่ต่ำมาก

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า

1. สารอนุพันธ์ของ N-acylaminopyridine derivatives 4 ตัว มีผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3 respiration เมื่อใช้  $NAD^+$ -linked substrates ตำแหน่งที่ถูกยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจคือ complex I
2. สารอนุพันธ์ของ N-acylaminopyridine derivatives 4 ตัว มีผลกระตุ้น succinate

oxidation ซึ่งถูกยับยั้งด้วย malonate

3. การออกฤทธิ์ของสาร N- acylaminopyridine derivatives 4 ตัวต่อ state 3 respiration ในไมโตคอนเดรียจะยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนมากขึ้น เมื่อมี BSA ปริมาณน้อย แต่เมื่อ BSA ปริมาณมากการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลง
4. DTT ไม่มีผลยับยั้งต่อการออกฤทธิ์ของ CU 763-16-04 ส่วน CU 763-18-01, CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 เมื่อให้ร่วมกับ DTT ทำให้การออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3 ลดลง
5. สารอนุพันธ์ของ N- acylaminopyridine derivatives 4 ตัว ไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity ของ mitochondria
6. CU 763-16-04 สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ mitochondria ด้วยแคลเซียมได้ ส่วน CU 763-18-01 และ CU 763-18-04 ไม่มีผลดังกล่าว และ CU 763-18-02 มีแนวโน้มที่เสริมฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจ
7. สารอนุพันธ์ของ N- acylaminopyridine derivatives 4 ตัว ไม่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ascorbate และ  $\text{FeSO}_4$  ได้
8. สารอนุพันธ์ของ N- acylaminopyridine derivatives 4 ตัว สามารถยับยั้งเอนไซม์ โมโนเอมีนออกซิเดสได้ ด้วยขนาดความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน

สารประกอบ N-acylaminopyridine derivatives ที่นำมาศึกษา พบว่าสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้ง MAO นั้น สามารถยับยั้ง MAO ได้โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ต่ำมาก ( $<1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) เมื่อสังเกตจากโครงสร้างของสารทั้ง 4 พบว่า nitrogen atom ที่อยู่บน aromatic ring ตำแหน่ง meta มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียต่ำกว่า nitrogen atom ที่ตำแหน่ง para และจากการเปรียบเทียบระหว่าง CU 763-16-04 กับ CU 763-18-02 และ CU 763-18-04 และ CU 763-18-02 พบว่า side chain ถ้าอยู่เป็นกลุ่มก้อนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียต่ำกว่า side chain ที่เป็นเส้นตรง ซึ่งจากผลการศึกษาทั้งหมดมีข้อบ่งชี้ว่าสาร CU 763-18-02 เป็น

สารที่ควรได้รับการศึกษาและปรับปรุงต่อไป เพื่อให้ได้สารที่พิษต่อเซลล์น้อย แต่มีผลต่อ MAO มากขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กุลยา สายชุ่มอินทร์. ผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่ายและหลอดเลือดแดงใหญ่ และทำนายอสุจิที่แยกจากหนูขาว.  
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.
- นุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ. ผลต่อของ(+)กรดอัลลีนจากฝอยลมและการเหนี่ยวนำเฮพาทิคไฮโดโครม พี 450 ในหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.
- นุตติยา วีระวัชรชัย. ฤทธิ์อันค้ำพลัง 22-ไฮดรอกซีทีนจันที่สกัดจากแสนคอกำใหญ่ต่อกระบวนการหายใจและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
- นภาพรณ วงศ์สมนึก. ผลของอนุพันธ์ไซคลิอะซีทาลของไพริดอกซีน.CU 763-14-10 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.
- อุ้นเรื่อน แก้วพินิจ. ผลของCU 763-15-13 ต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.
- อมรทัศน์ สดใส. ผลของซิลิโมารินต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

### ภาษาอังกฤษ

Abeles, R.H., Frey, P.A., and Jencks, W.P. The electron-transport pathway and phosphorylation. Biochemistry. Boston: Jones and Barretlett Publishers. 1992: 603-631.

Adelstein, R.S. and Eisenberg, E. Regulation and kinetics of the Actin-Myosin-ATP

- Interaction. Ann Rev. Biochem. 49(1980):921-956.
- Alan, R.B., Duncan, J.F., and Donald, S.D., Mechanisms of cell death. TIPS. 10(1989):275-284.
- Aminoff, M.J. Pharmacologic management of parkinsonism & other movement disorder: In Katzung, B.G. (ed.). Basic & clinical pharmacology. 6<sup>th</sup> ed. USA: Appleton & Lange. 1995:419-431.
- Avers, C.J. et al. Molecular cell biology. California : The Benjamin/cummings publish company, 1986.
- Bach, A.J.W., et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzyme properties. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 85(1988):4934-4938.
- Berson, A. et al. Inhibition by nilutamide of the mitochondrial respiratory chain and ATP formation. Possible to the adverse effects of this antiandrogen. JPET 270 (1994):167-176.
- Bertina, R.M., and Slater, E.C. The effect of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone-induced ATPase of rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 376(1975):492-504.
- Blaschko, H., Richter, D., and Schlossmann, H. The oxidation of adrenaline and other amines. Biochem. J. 31(1937):2187-2196.
- Bolton, T.B. Mechanisms of Action of Transmitters and other substances on smooth Muscle. Physiol. Rev. 59(1979):607-718.
- Boyer, P.D., et al. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 46(1977):968-1000.
- Buege, J.A., and Aust, S.D. In: Method in Enzymology. 52 part C. New York: Academic Press, 1978.
- Campbell, M.K. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1995:391-417.
- Chance, E., and Williams, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17(1956): 65-134.
- Chappell, J.B., and Crofts, A.R. The effect of atractyloside and oligomycin on the behavior of mitochondria towards adenine nucleotides. Biochem J. 95(1965):707-715.



- Cleland, W.W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group. Biochemistry. 3(1964):480-482.
- Crane, G.E. Iproniazid (Marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating disease. Psychiatry Research Reports. 8 (1957): 142-152.
- Danishefsky, I. Biochemistry for medical sciences. 1<sup>st</sup> ed. Boston: Little Brown and Company, 1980.
- Darley, V.M., Rickwood, D., and Wilson, M.T. Mitochondria a practical approach. England: IRL Press, 1987.
- Darnell J, Lodish H, and Baltimore D. Molecular cell biology. New York: Scientific American Books, 1989.
- De Robertis, E.D.P., and De Robertis, E.M.F. Cell and molecular biology. 18<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.
- Devlin, T.M. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. New York : Wiley-Liss, 1995:417.
- Devlin, T.M. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- Ernest, H., and Frank, E.G. Introduction to biochemical toxicology. (n.p.):1982:341-356.
- Ernest, H., and Patricia, E.L. Introduction to biochemical toxicology. 2<sup>nd</sup> ed.(n.p.):1994: 459-489.
- Estabrook, R.W. Method in Enzymology. Vol.X. New York: Academic Press, 1967.
- Fiske, O.H., and Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66 (1925):375-400.
- Forhlich, E.D. Rytins' basic science review. 17<sup>th</sup> ed. New York: Lippincott, 1997:197.
- Fortney, S.R., and Lynn, W.S., Role of ascorbate and Cysteine on swelling and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 104(1964): 241-247.
- Fromenty, B. et al. Dual effect of aminodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255 (1990a):1377-1384.
- Fromenty, B. et al. Tianeptine, a new tricyclic antidepressant metabolized by  $\beta$ -oxidation of its heptanoic side chain, inhibits the mitochondrial oxidation of

- medium and short chain fatty acid in mice. Biochem. Pharmacol. 38(1989): 3743-3751.
- Futai, M. Noumi, T., and Maeda, M. ATP synthase (Ht-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. Ann. Rev. Biochem. 58(1989):111-136.
- Garrett, R.H.,and Grisham, C.M. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. 1995:627-659.
- Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., and Murad, F. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 7<sup>th</sup> ed. New York:Macmillian,1985.
- Green, D.E. and Zande H.V. Mechanism of uncoupling by uncouplers of oxidative phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100(1981):1017-1024.
- Haraguchi, H., Saito,T.O., Kamura, N.,and Yagi, A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by Diterpenoids from Rosmarinus officinalis. Planta Med. 61(1995): 333-336.
- Hare,M.L.C. Tyramine oxidase:A new enzyme system in liver. Biochem. J. 22(1928): 968-979.
- Hatefi, Y. Preparation and properties of the enzymes and enzyme complexes of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. Methods Enzymol. 53 (1978):3-54.
- Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann. Rev. Biochem. 54(1985): 1015-1069.
- Haugaard, N., Lee, N.H., Kostrzewa, R., Horm, R.S., and Haugard, E.S. The role of sulphhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria.Biochem Biophy. Acta. 172(1969): 198-204.
- Heytler, P.G. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitor of mitochondrial functions. Oxford: Pergamon Press,1981:199-208.
- Hogeboom, G.H., Fractionation of cell components of animal tissues: In Colowick,S.P.,and Kaplan,N.O.(eds.). Methods in enzymology. New York:Academic Press,1(1955):16-19.
- Hunter, F.E. etal. Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. J. Biol. Chem. 238(1963):828-835.

- Jockel, J., Wendt, B., and Löffler, M. Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 56(1998):1053-1060.
- Katre, N.V., and Wilson, D.F. Interaction of uncouplers with the mitochondrial membrane: identification of the high affinity binding site. Arch. Biochem. Biophys. 191(1978):647-656.
- Kenakin, T.P. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. Phar.Rev. 36(1984):165-222.
- Lardy, H.A., Connelly, J.L., and Johnson, D. Antibiotics as tools for metabolic studies II inhibition of phosphoryl transfer in mitochondria by oligomycin and aurovertin. Inh. Phos. Trans. 3(1964):1961-1968.
- Lehninger, A.L. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Worth, 1993: 542-571.
- Lehninger, A.L. Mitochondria and Calcium Ion Transport. Biochem.J. 119(1970):129-138.
- Lehninger, A.L. Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. Physiol. Rev. 42(1962):467-517.
- Le-quoc, K., and Le-quoc, D. Control of the mitochondrial inner membrane permeability by sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 216(1982):639-651.
- Löffler, M. On the role of dihydroorotate dehydrogenase in growth cessation of Ehrlich ascites tumor cells cultured under oxygen deficiency. Eur.J.Biochem. 107 (1980):207-215.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randell, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193(1951): 265-275.
- Miller, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem. 31 (1959):964-965.
- Mitchell, P. On the chemiosmotic theory of coupling. Nature. 144(1961):191-195.
- Mitchell, P. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: Power transmission by proticity. Biochem. Soc. Trans. 4(1976):399-430.
- Myers, D.K., and Slater, E.C. The enzymic hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria I. Activities at different pH values. Biochem. J. 67(1957): 558-572.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95(1979):351-358.

- Ottolenghi, A., Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides. Arch. Biochem. Biophys. 79(1959):355-363.
- Plummer, D.T. An introduction to practical biochemistry. England: Mc Graw-Hill Book company, 1971.
- Pugh, C.E.M.,and Quastel,J.M. Oxidation of aliphatic amines by brain and other tissues. Biochem. J. 31(1937):286-291.
- Sartorelli AC, Erecinska M, Wilson DF. International encyclopedia of pharmacology and therapeutics: inhibitors of mitochondrial functions. Oxford: Pergamon Press,1981.
- Schnaitman,C.,Erwin,V.G.,and Greenawalt,J.W. Submitochondrial localization of monoamine oxidase. J. Cell. Biol. 32(1969):719-739.
- Senior, A.E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Physiol. Rev. 68(1988): 177-231.
- Senior, A.E. The structure of mitochondrial ATPase. Biochem Biophys. Acta. 301 (1973):249-277.
- Smith, G.J., and Dunkley, W.L., Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal ion.Arch. Biochem. Biophys. 98(1962):46-48.
- Snell, K., and Mullock, B. Biochemical toxicology a practical approach. England: IRL Press,1987.
- Somlyo, A.P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. Cir.Res. 57(1985):497-507.
- Sordahl, L.A., Johnson, C., Blailock, Z.R., Schwartz, A. The mitochondrion. Methods in pharmacology. New York: Meredith Cooperation,1971:247-250.
- Stryer, L. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed USA.: W.H. Freeman and company,1988.
- Teeter, M.E., Baginsky, M.L., and Hatefi, Y. Ectopic inhibition of the complexes of electron transport system by rotenone, piericidin A, demerol, and antimycin A. Biochim.Biophys. Acta. 172(1969):331-333.
- Thiele, E.H., and Huff, J.W., Quantitative measurements of lipide peroxide formation by Normal liver mitochondria under Various conditions. Arch. Biochem. Biophys. 88(1960):203-207.
- Tipton, K.F.,and Mantle, T.J. Dynamic properties of monoamin oxidase: In

Usdin,E.,Weiner,N.,and Youdim,M.B.H. (eds.). Structure and function of monoamine enzymes. New York:Mercel Dekker,1977:559-585.

Voet, D.,and Voet, J.G. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. New York: Jonh Wiley & Sons, 1990: 528-560.

Weinbach, E.C. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosine triphosphatase.J.Biol. Chem. 221(1956):609-618.

Zeller,E.A.,and Sarkar,S. Amine oxidases: Inhibition of monoamine oxidase by phenylcyclopropylamines and iproniazid. J. Biol. Chem. 237(1962):2332-2336.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัญชิษฐา ทิพย์วงศ์จิตร เกิดเมื่อวันที่ 18 เมษายน 2511 กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีพยาบาลศาสตรบัณฑิต จากวิทยาลัยพยาบาลสภากาชาดไทย เมื่อปีการศึกษา 2533 และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสหสาขาเภสัชวิทยาบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541 ปัจจุบันปฏิบัติงานในตำแหน่งพยาบาลประจำการ ที่แผนก ไอ ซี ยู ศัลยกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย