

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงอยู่ในหน้า 46-115 โดยเรียงลำดับตามหัวข้อที่อยู่ในสารบัญ

ผลของสารสำคัญจากฝอยลมต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

1. ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 14 เป็น oxygraph tracing ซึ่งได้จากการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดย polarographic oxygen electrode technique ดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ตัวเลขที่กำกับอยู่ที่ระยะต่าง ๆ ของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะ (state) ต่าง ๆ โดยคำนวณออกมาเป็นจำนวนมคอ. ออกซิเจน/มล./นาที ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยา ในระยะแรกมีเพียงไมโตคอนเดรียที่ถูก incubate อยู่ใน incubation medium ที่มี glutamate+malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณที่มากเกินไป (excess) ที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยาระยะนี้ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียยังต่ำอยู่ (0.019) เรียกระยะที่ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาเพียงแค่นี้ (ไมโตคอนเดรีย, ออกซิเจน และ สับสเตรท) ว่า state 4 respiration ระยะต่อไปของ oxygraph tracing เรียกว่า state 3 respiration ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการเติม

(ต่อหน้า 102)

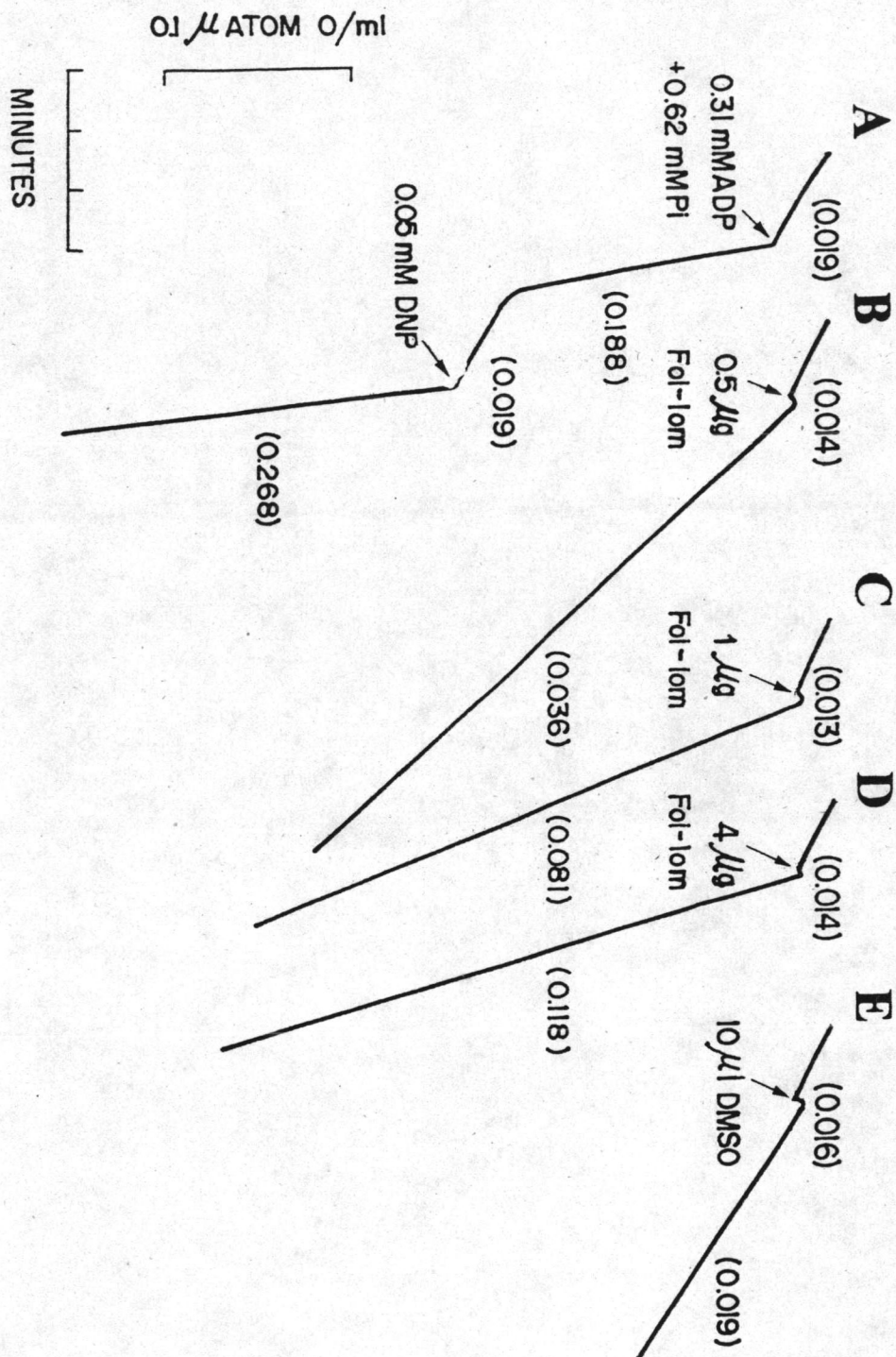
รูปที่ 14 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.5, 1 และ 4 มคก. ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.25 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 0.76, 1.5 และ 6.0  $\mu M$  และ DMSO ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที



5/17/64  
14

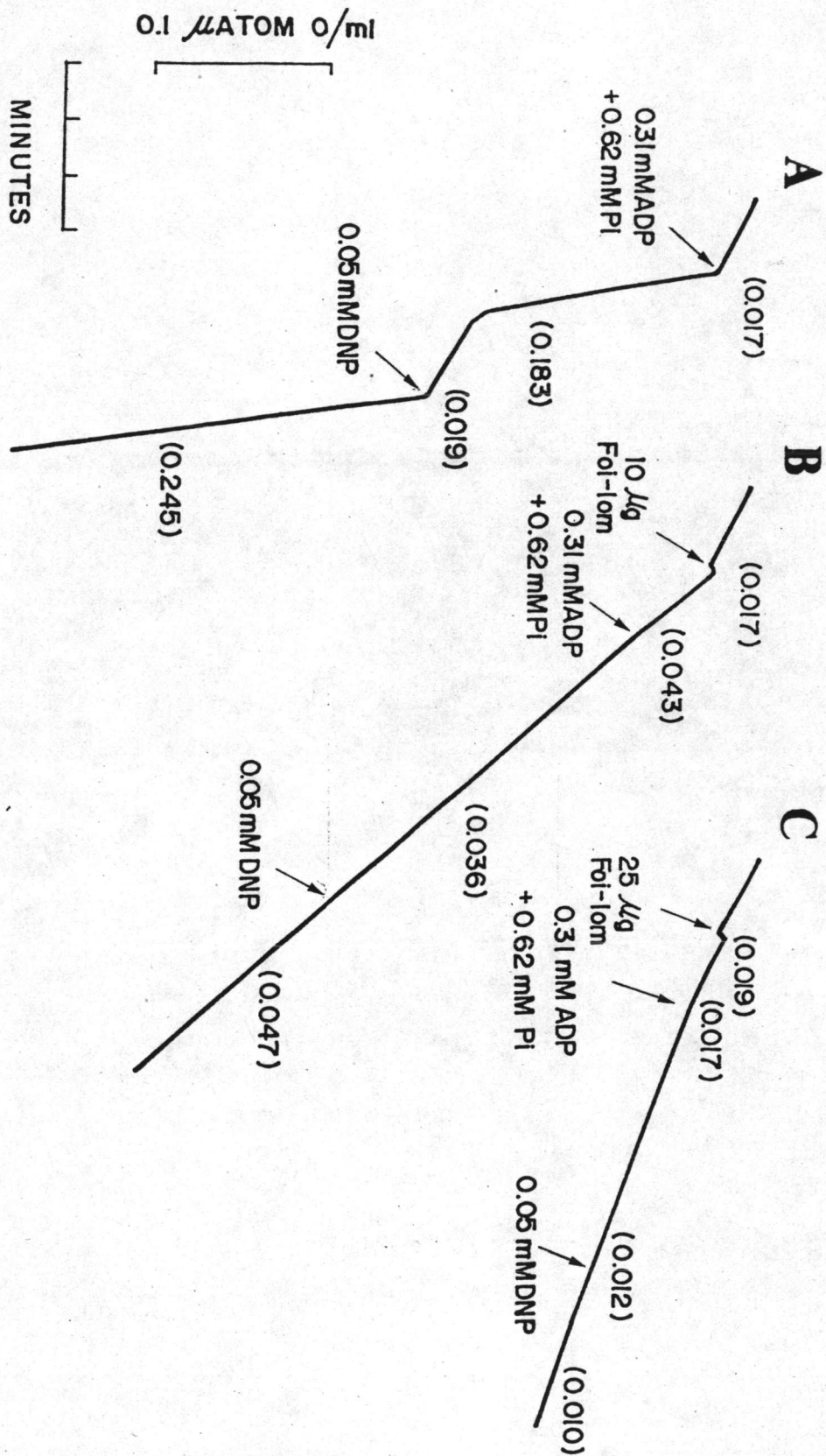


รูปที่ 15 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 10 และ 25 มคก. ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.56 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 15.0 และ 37.8  $\mu M$  และ DMSO ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที

July 15



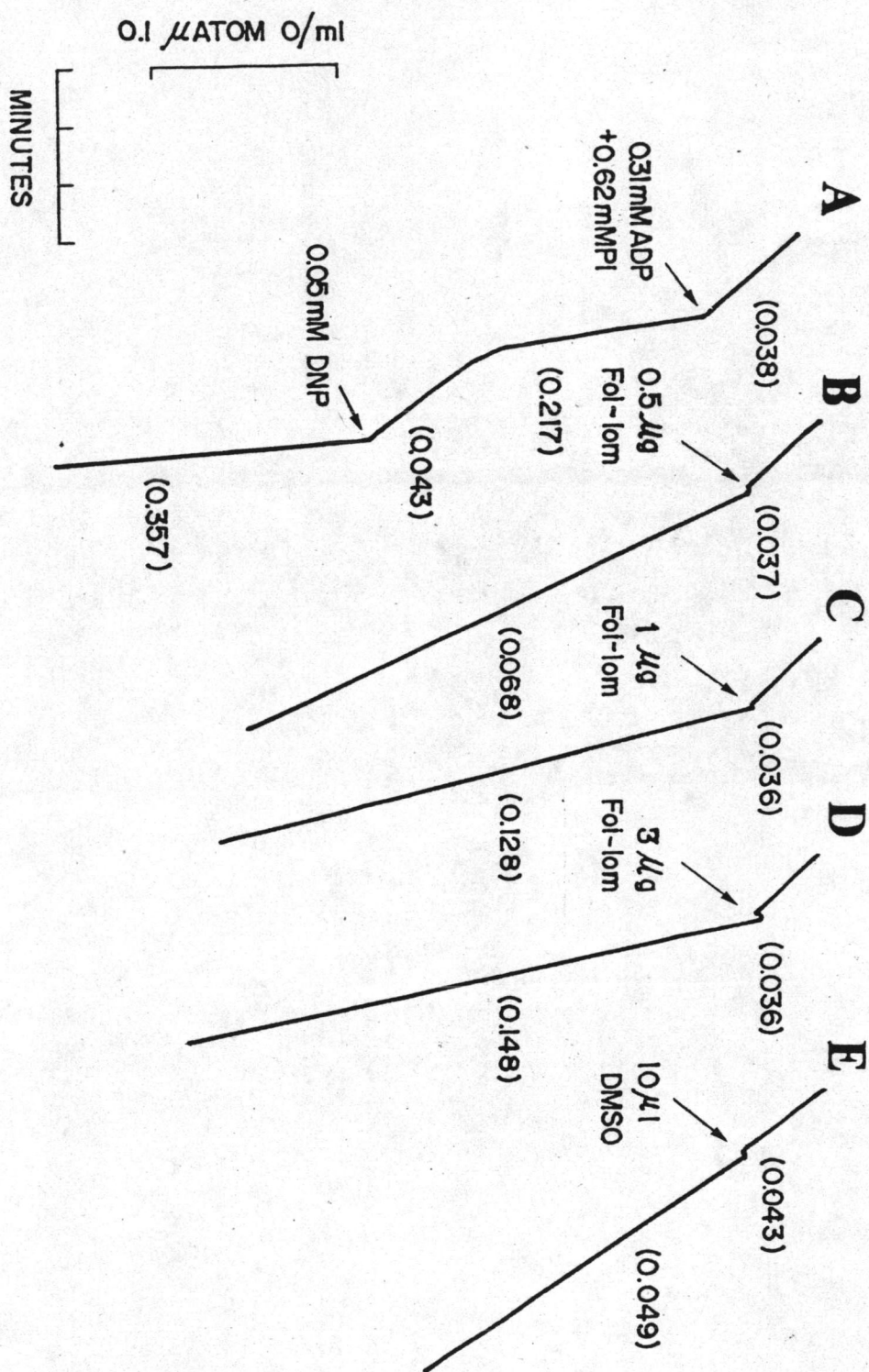


รูปที่ 16 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.5, 1 และ 3 มคก. ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.11 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, สารสำคัญจากฝอยลม ความเข้มข้น 0.76, 1.5 และ 4.5  $\mu M$  และ DMSO ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที

July 16



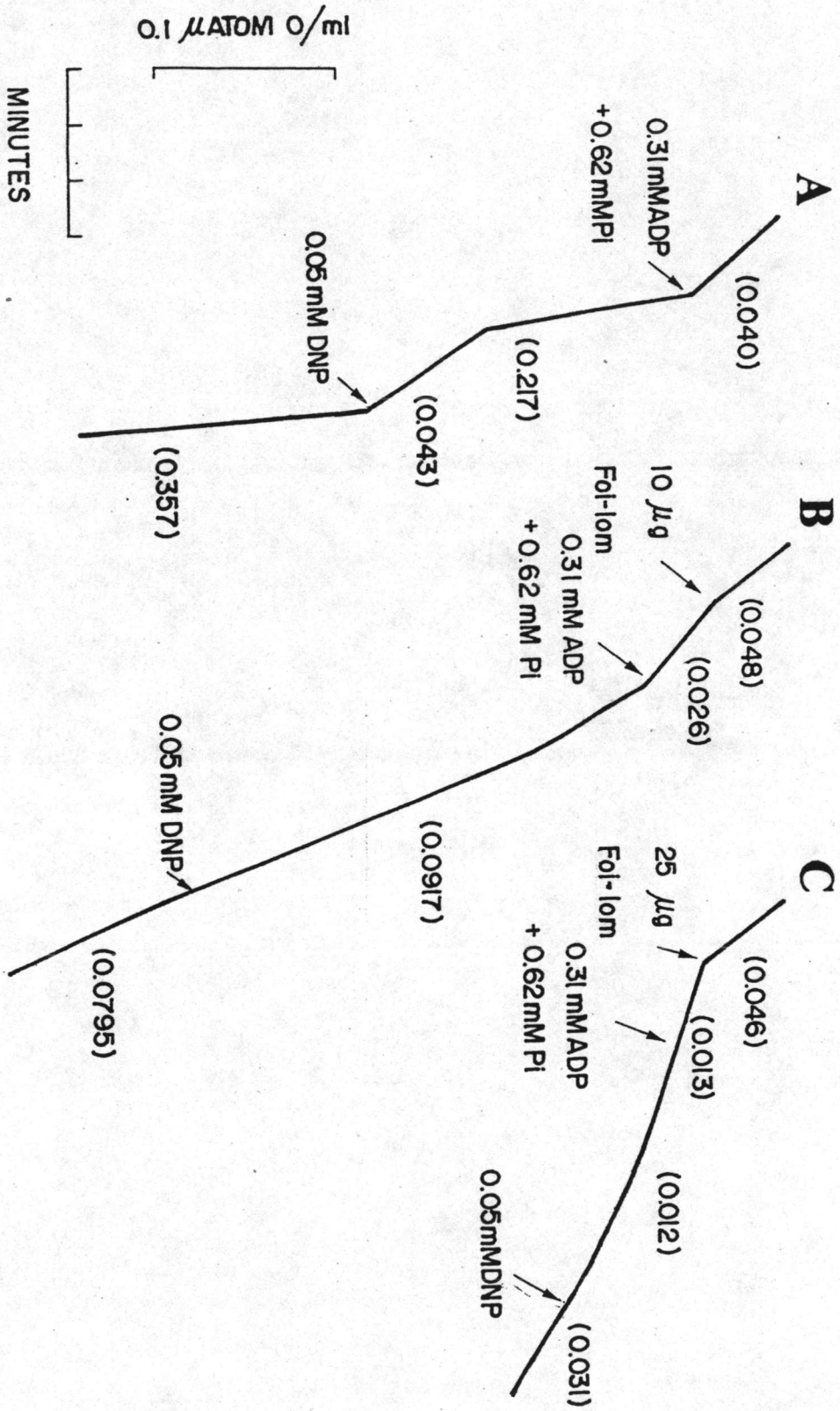
รูปที่ 17 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 10 และ 25 มคก. ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.69 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, สารสำคัญจากฝอยลม ความเข้มข้น 15.0 และ 37.8  $\mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที



Figure 17

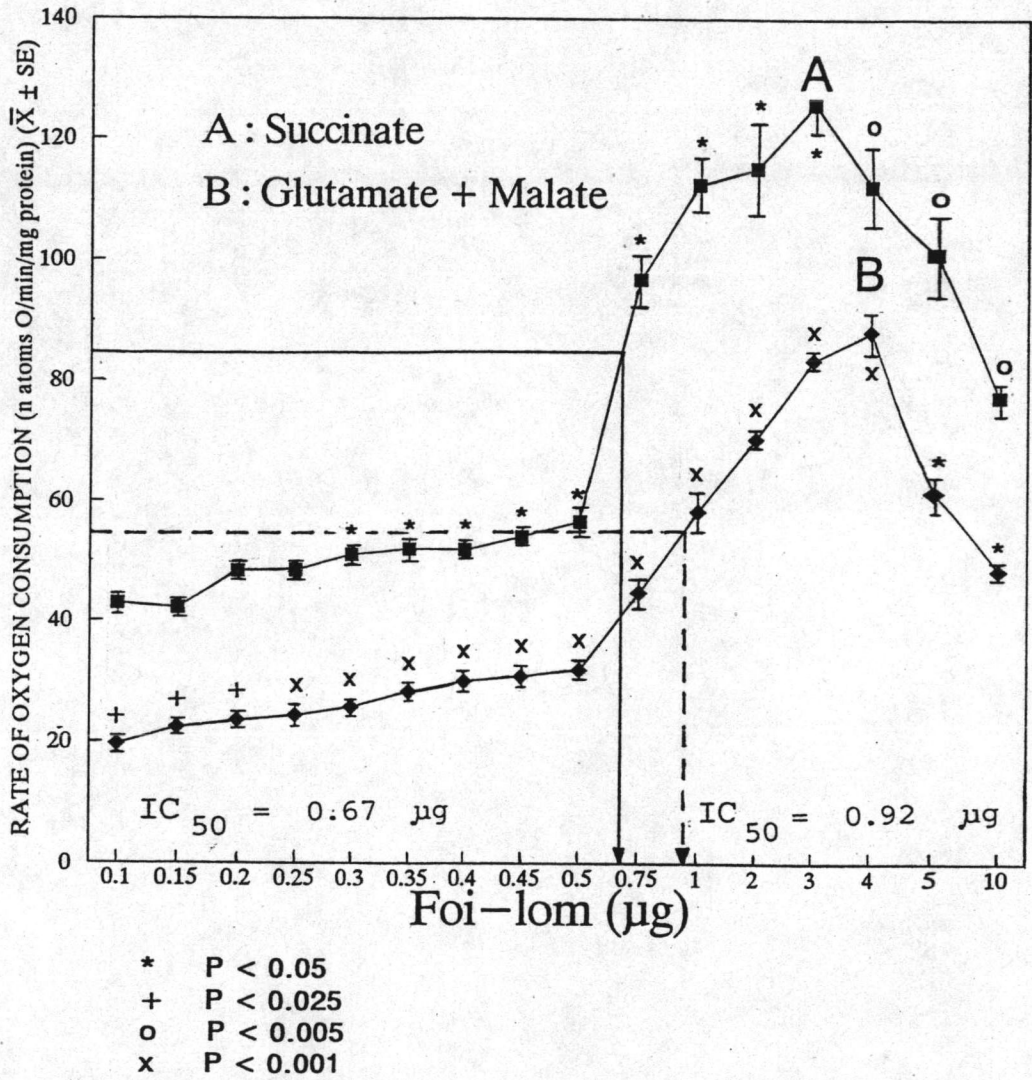


รูปที่ 18 Dose-response curve ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่างๆ ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate (curve A) และ glutamate+malate (curve B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate (กรณีของ curve A), 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate (กรณีของ curve B), 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.21 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณสารสำคัญจากฝอยลมขนาดต่างๆ ที่เติมตามลงไปอีกแสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 18





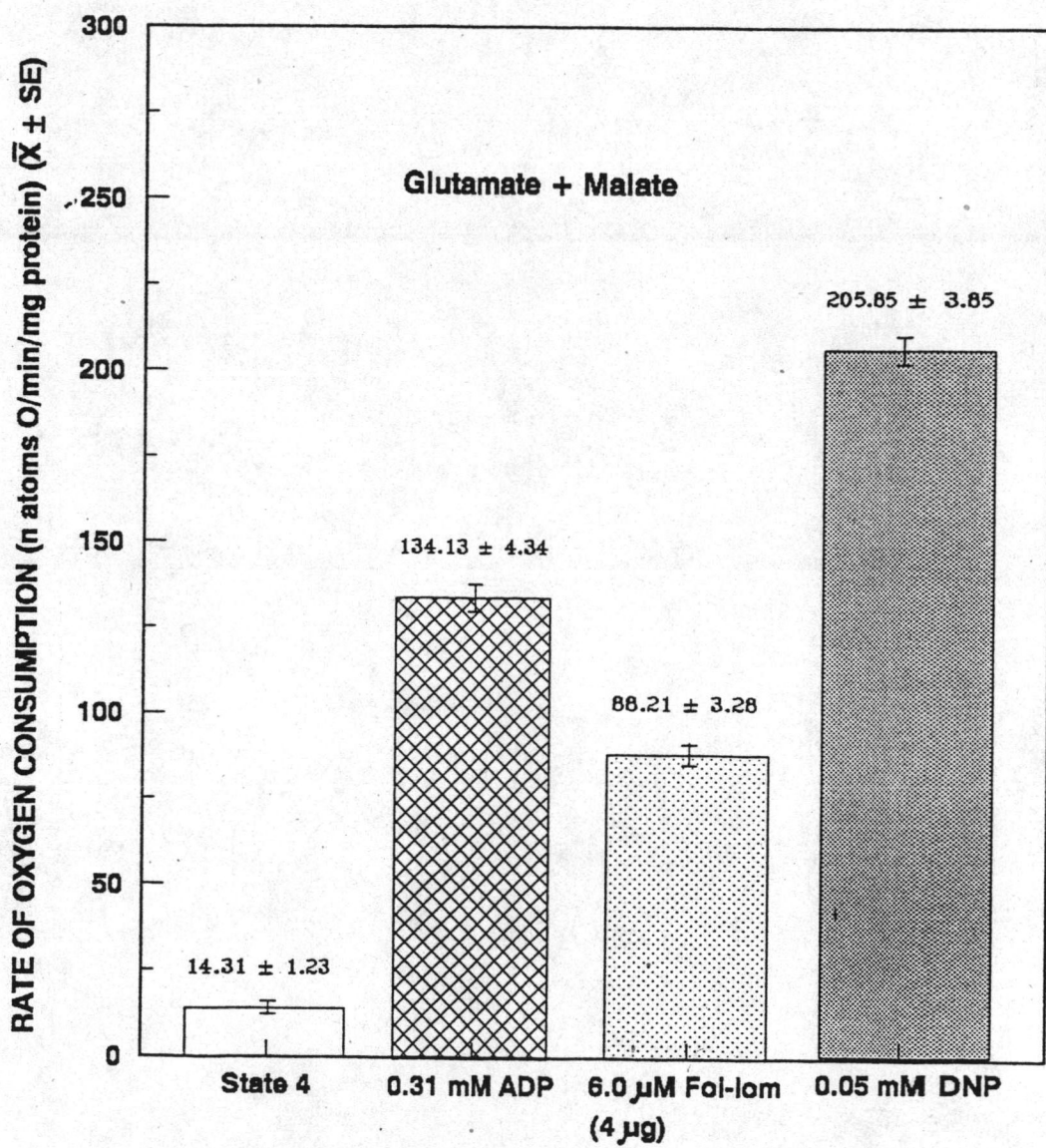
รูปที่ 19 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยสารสำคัญจากฝอยลม, ADP และ DNP เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย เฉลี่ย 1.24 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณสารสำคัญจากฝอยลมและความเข้มข้นของ DNP, ADP ที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจแสดงไว้ในรูปปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง



19



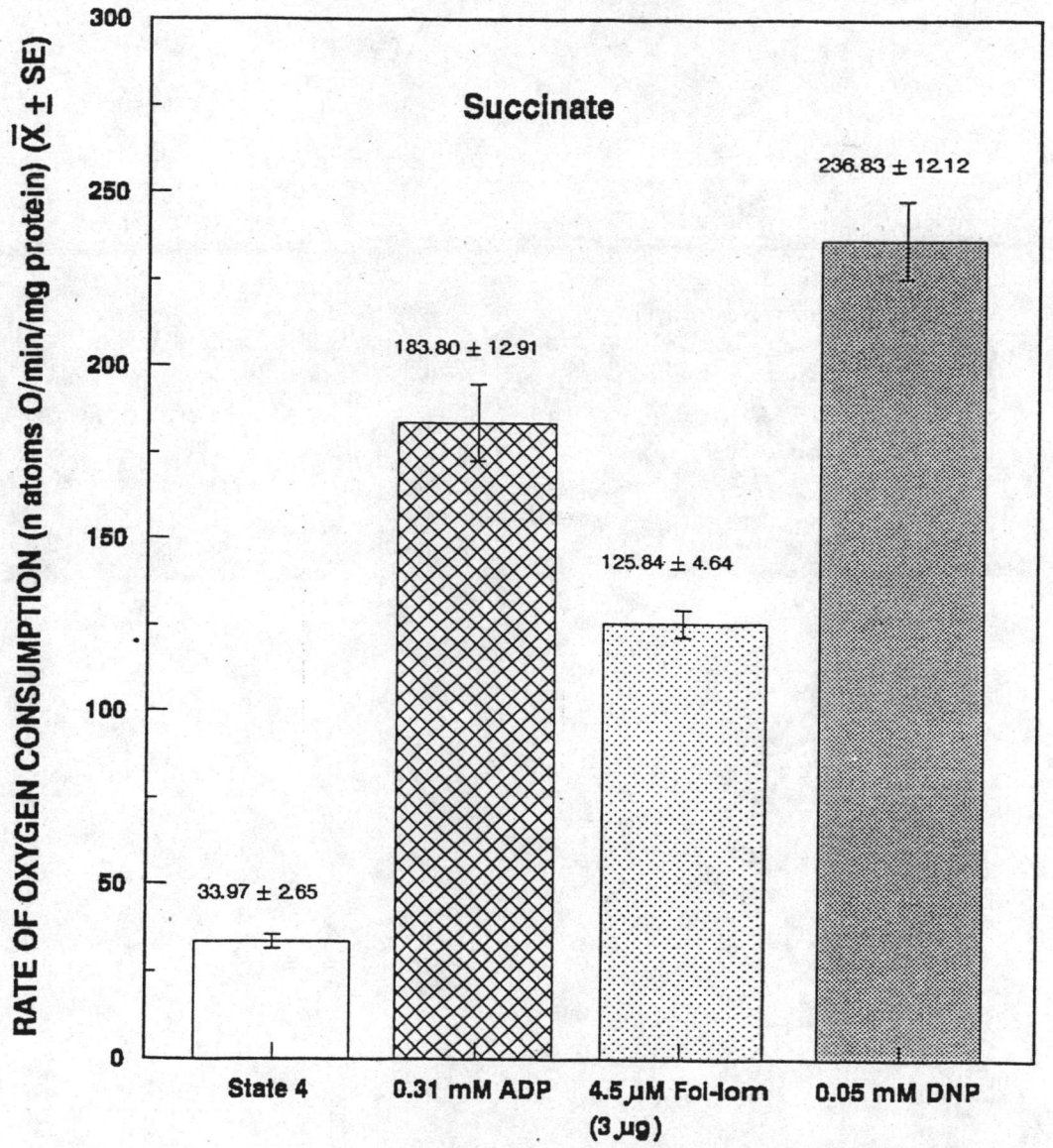
รูปที่ 20 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดย สารสำคัญจากฝอยลม, ADP และ DNP เมื่อใช้ succinate เป็น สับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.18 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณสารสำคัญ จากฝอยลมและความเข้มข้นของ DNP, ADP ที่เติมตามลงไปกระตุ้นการหายใจ แสดงไว้ในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย  
จาก 4 การทดลอง



Figure 20



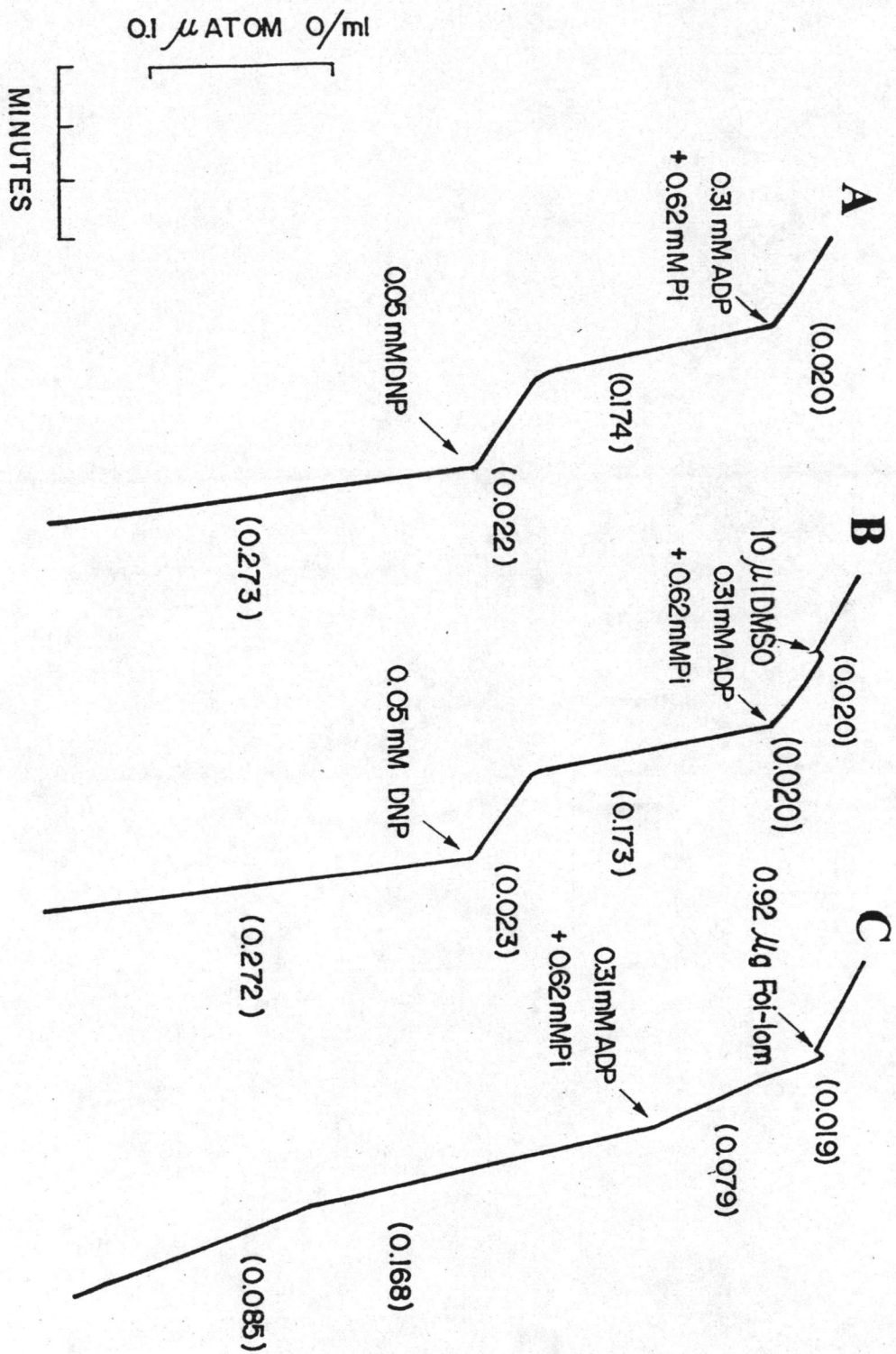
รูปที่ 21 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 1.64 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DMSO และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น  $1.39 \mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางดังนี้

	tracing		
	Control (A)	DMSO (B)	Foi-lom 0.92 $\mu g$ (C)
ดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI)	7.9	7.5	2
จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ. ออกซิเจน/นาที่/มก. โปรตีน)	106.10	105.49	102.44
อัตราส่วน ADP/O	2.7	2.68	2.09

July 21





ตารางที่ 3 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ที่มีต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้สารสำคัญจากฝอยลม (control) parameters ที่ใช้เปรียบเทียบ คือ ดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวน ออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O

Experiments	RCI	State 3 oxygen consumption (natoms O/min/ mg protein) (mean $\pm$ SE)	ADP/O
Control	7.330 $\pm$ 0.012	104.77 $\pm$ 3.91	2.660 $\pm$ 0.037
After 0.92 $\mu$ g Foi-lom	2.010 $\pm$ 0.037*	102.83 $\pm$ 8.04 NS	2.033 $\pm$ 0.063*
% Change	- 72.58	- 1.85	- 23.57

n = 4, \*P < 0.001

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.80 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi และ สารสำคัญจากฝอยลม ความเข้มข้น 1.39  $\mu$ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

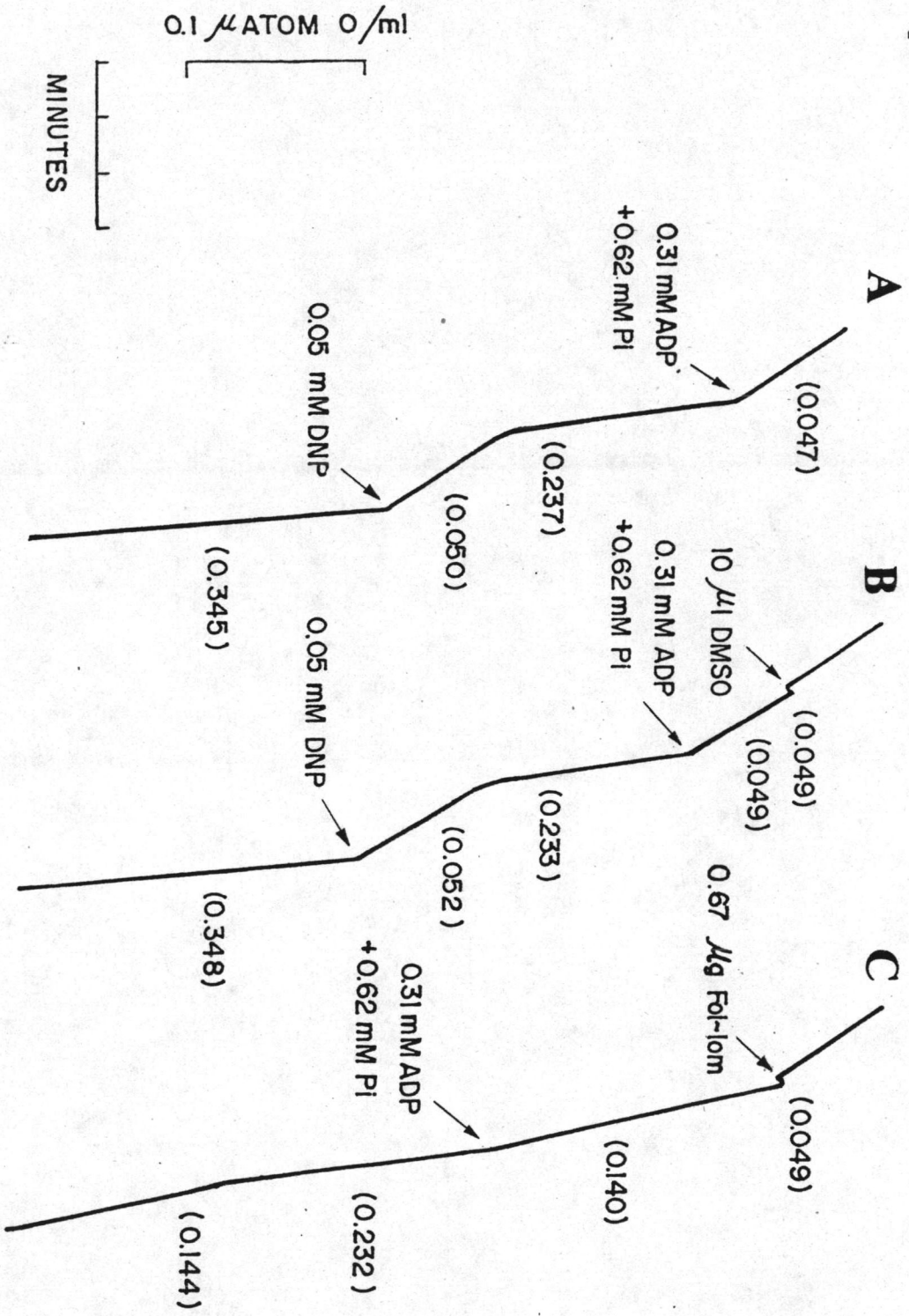
รูปที่ 22 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 1.65 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP, DNP, DMSO และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.01  $\mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ผลการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังกล่าวจาก tracing A, B และ C ดังแสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางดังนี้

	tracing		
	Control (A)	DMSO (B)	Foi-lom 0.67 $\mu g$ (C)
ดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI)	4.7	4.5	1.6
จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 (นนอ. ออกซิเจน/นาที่/มก. โปรตีน)	143.64	141.21	140.61
อัตราส่วน ADP/O	1.3	1.27	1.11

July 22





ตารางที่ 4 ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ที่มีต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท เทียบกับเมื่อไม่ใช้สารสำคัญจากฝอยลม (control) parameters ที่ใช้เปรียบเทียบคือดัชนีความคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3, และอัตราส่วน ADP/O

Experiments	RCI	State 3 oxygen consumption (natoms O/min/ mg protein) (mean $\pm$ SE)	ADP/O
Control	4.350 $\pm$ 0.153	130.21 $\pm$ 7.07	1.489 $\pm$ 0.072
After 0.67 $\mu$ g Foi-lom	1.450 $\pm$ 0.096*	129.34 $\pm$ 7.26 NS	1.044 $\pm$ 0.031 <sup>o</sup>
% Change	- 66.67	- 0.67	- 29.88

n = 4, <sup>o</sup>P < 0.025, \* P < 0.001

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.77 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.01  $\mu$ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

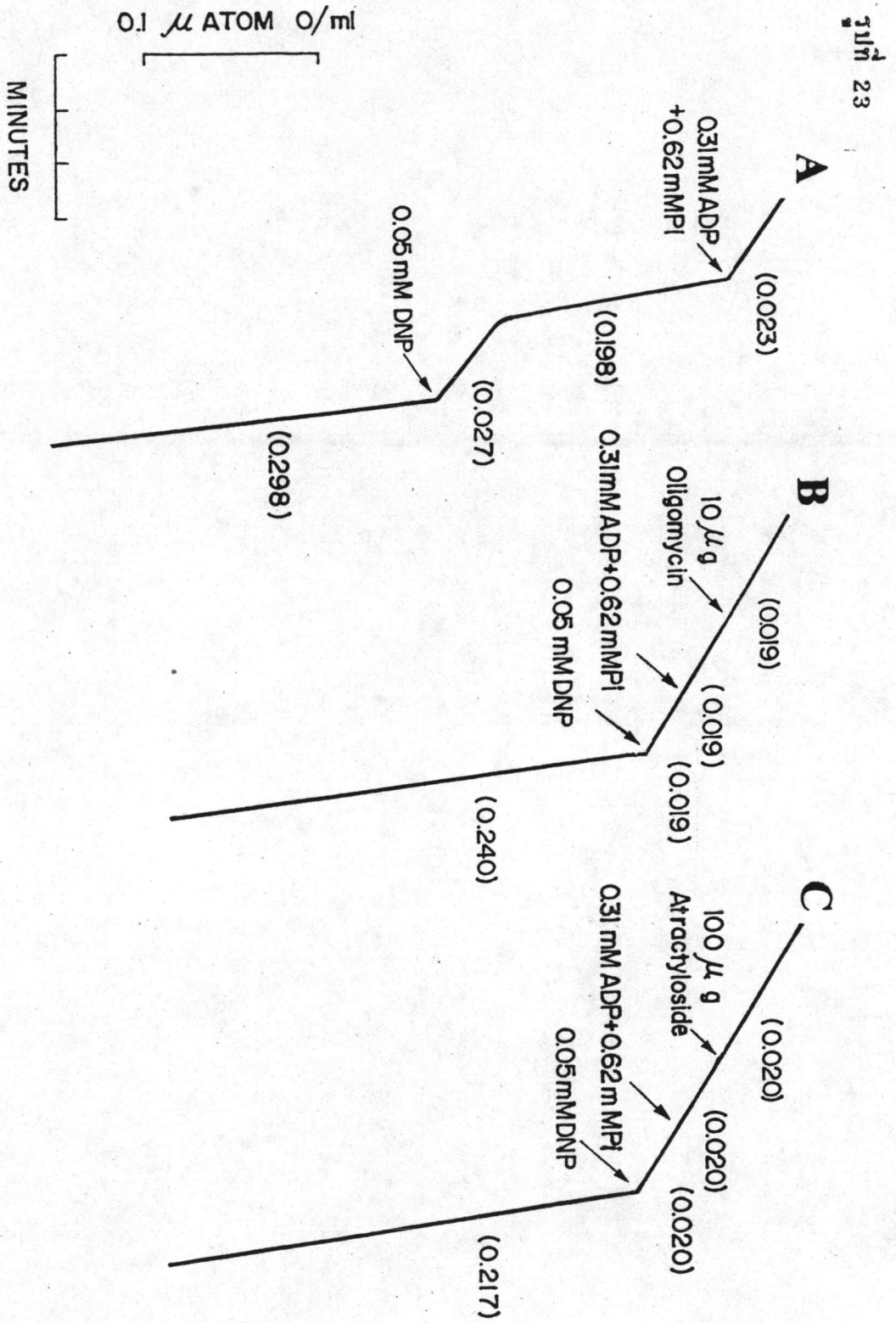
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 23 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 3.07 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP, oligomycin และ atractyloside ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที



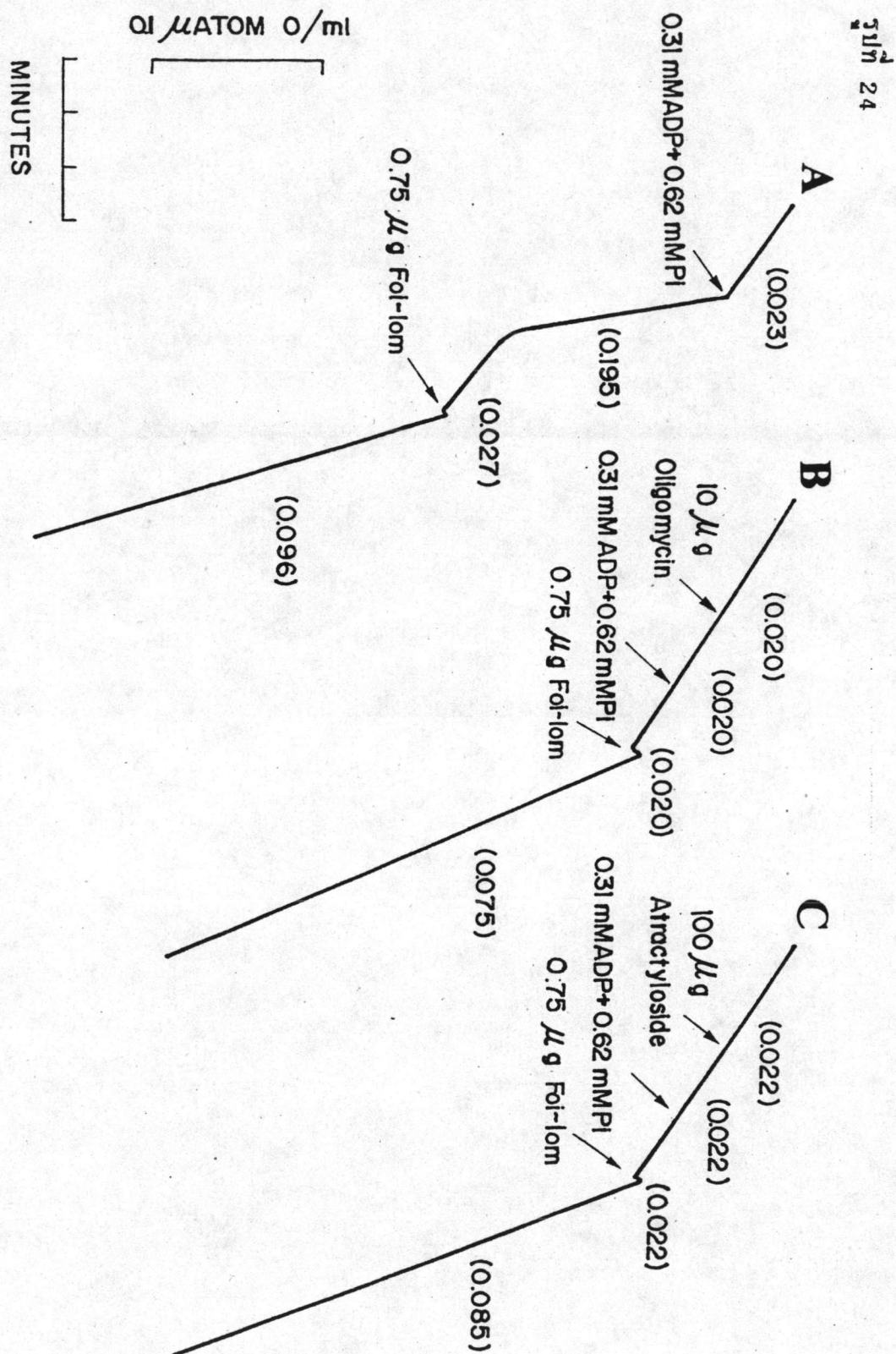




รูปที่ 24 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 3.07 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกตั้งแสดงในรูปคือ ADP, สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu M$ , oligomycin และ atractyloside ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที

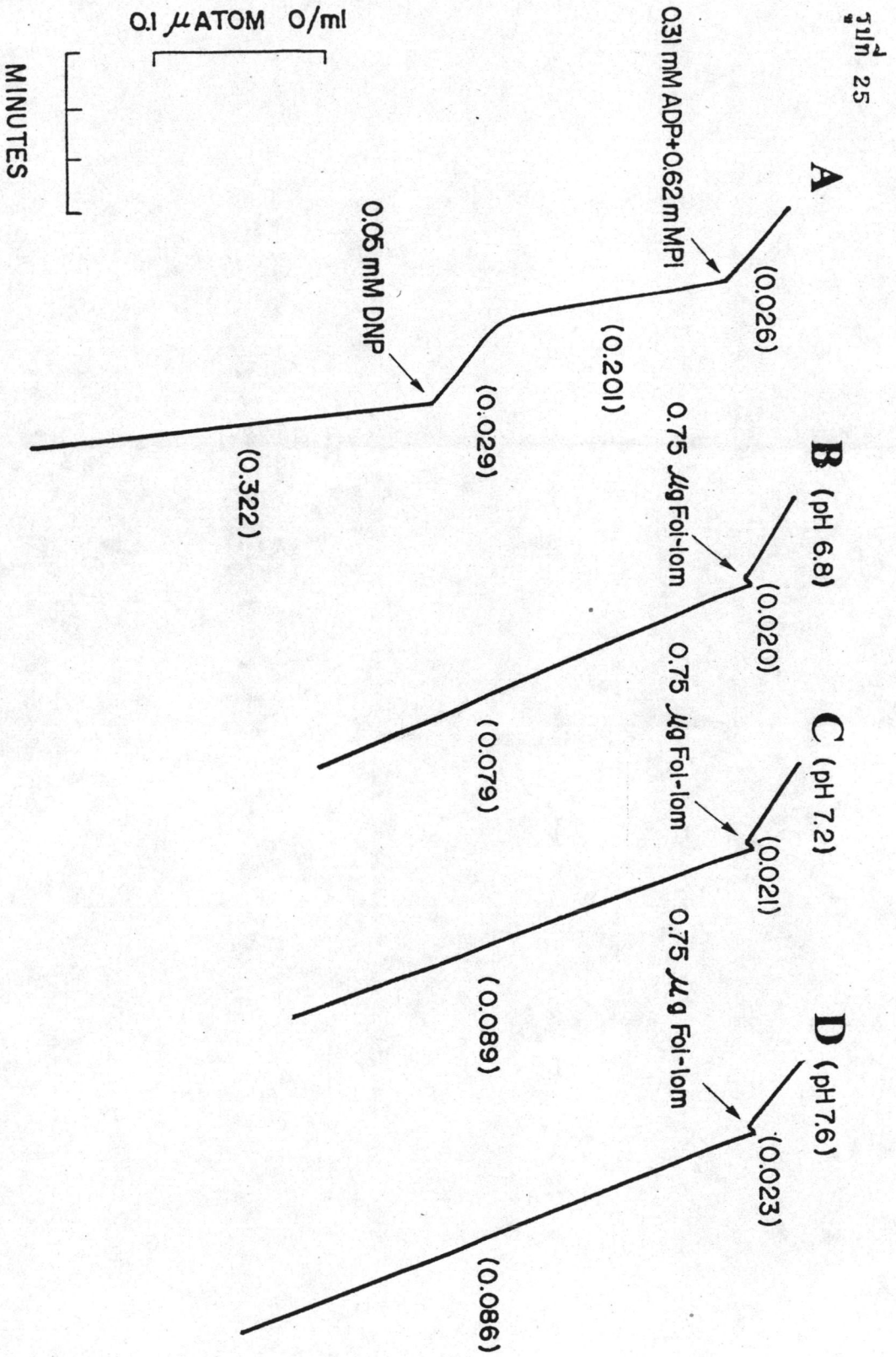


รูปที่ 25 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2,  
(tracing A และ C) pH 6.8 (tracing B) และ pH 7.6 (tracing  
D), 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate  
และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ  
ไมโทคอนเดรีย 2.08 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดง  
ในรูป คือ ADP, DNP และ สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu M$   
ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้  
ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที





ตารางที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.75 $\mu$ g Foi-lom (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
pH 6.8	23.83 $\pm$ 1.73                      P > 0.05
pH 7.2 (Control)	24.47 $\pm$ 3.07
pH 7.6	24.45 $\pm$ 2.10                      P > 0.05

n = 4

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, pH 6.8 และ pH 7.6, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.74 มก. โปรตีน/มล. สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu$ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

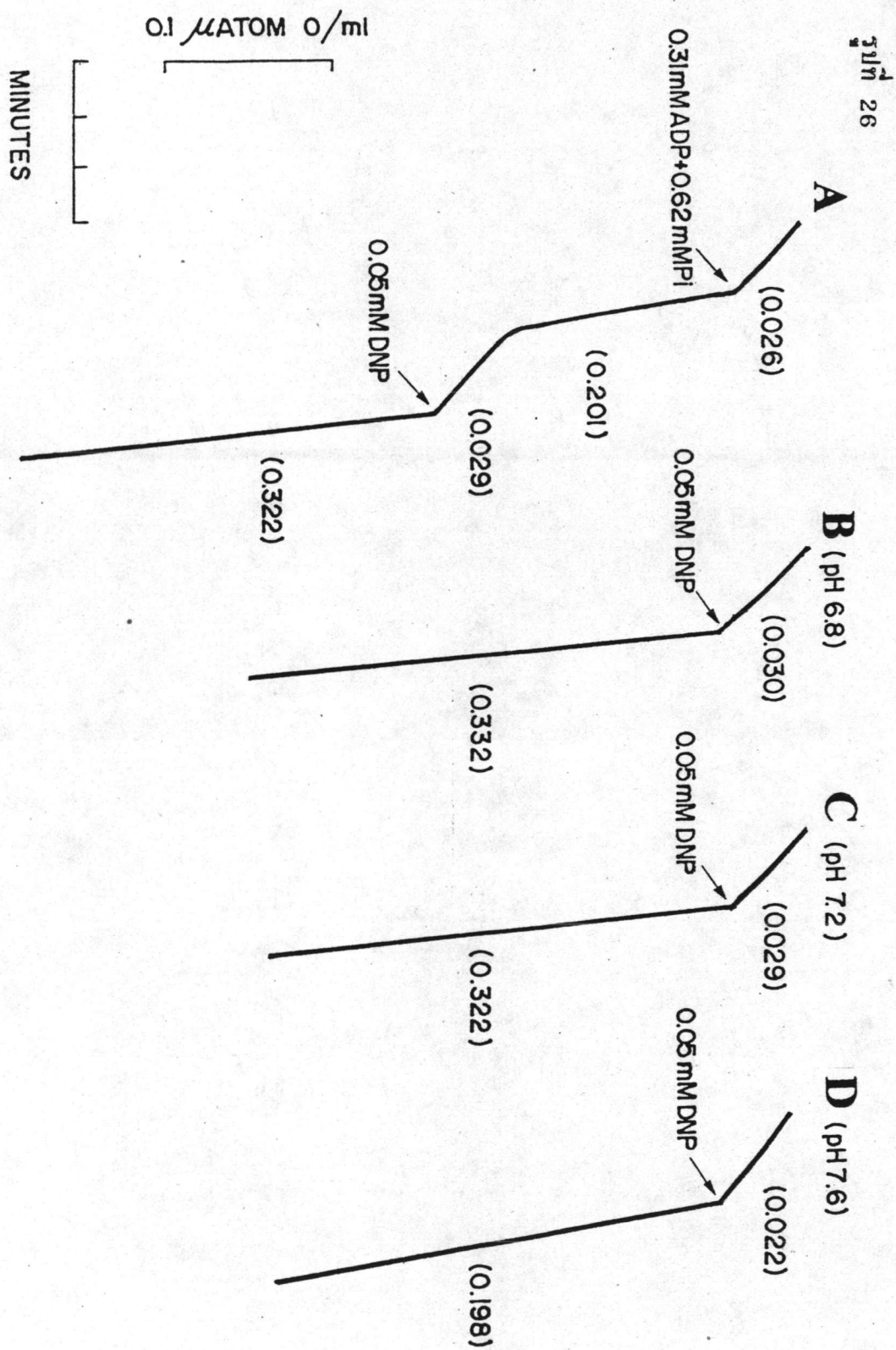
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 26 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2,  
(tracing A และ C) pH 6.8 (tracing B) และ pH 7.6 (tracing  
D), 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate  
และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ  
ไมโทคอนเดรีย 2.08 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดง  
ในรูปคือ ADP และ DNP ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้  
ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็น จำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที





ตารางที่ 6 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.05 mM DNP (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
pH 6.8	144.54 $\pm$ 5.31
pH 7.2 (Control)	139.50 $\pm$ 5.68
pH 7.6	90.96 $\pm$ 3.65*

n = 4

\* P < 0.001

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, pH 6.8 และ pH 7.6, 3.68 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.97 มก. โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ DNP ที่เติมตามลงไปดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 27 ผลของการไม่มี  $Mg^{2+}$  ใน incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมและ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรีย 2.08 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของ  $MgCl_2$  และ KCl ใน incubation medium คือ

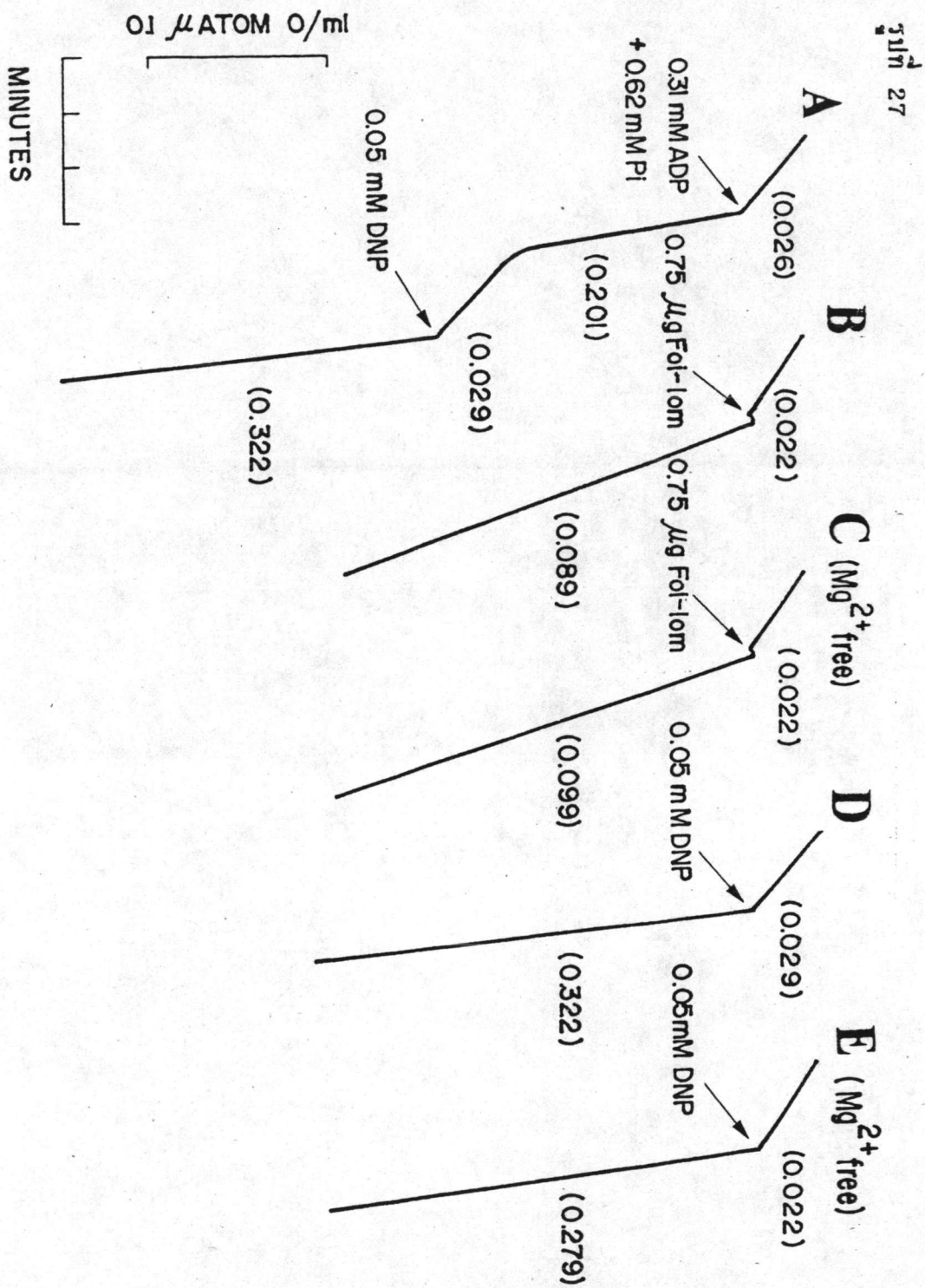
กรณีมี  $Mg^{2+}$  ใช้ 3.68 mM  $MgCl_2$  และ 86.25 mM KCl (tracing B และ D)

กรณี  $Mg^{2+}$  free medium ใช้ 0 mM  $MgCl_2$  และ 89.06 mM KCl (tracing C และ E)

ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที





ตารางที่ 7 ผลของการไม่มี  $Mg^{2+}$  ใน incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.75 $\mu$ g Foi-lom (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
Control	33.97 $\pm$ 2.46
$Mg^{2+}$ free	36.67 $\pm$ 2.96 P > 0.2

n = 4

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2,  
13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล.  
ปริมาณของ  $MgCl_2$  และ KCl ใน incubation medium คือ  
กรณีมี  $Mg^{2+}$  ใช้ 3.68 mM  $MgCl_2$  และ 86.25 mM KCl  
กรณี  $Mg^{2+}$  free medium ใช้ 0 mM  $MgCl_2$  และ 89.06 mM KCl  
สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu$ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย  
จาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 8 ผลของการไม่มี  $Mg^{2+}$  ใน incubation medium ที่มีต่อการ  
ออกฤทธิ์ของ DNP ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.05 mM DNP (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
Control	140.73 $\pm$ 6.03
$Mg^{2+}$ free	130.62 $\pm$ 7.93 P > 0.1

n = 4

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2,  
13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก.โปรตีน/มล.  
ปริมาณของ  $MgCl_2$  และ KCl ใน incubation medium คือ

กรณีมี  $Mg^{2+}$  ใช้ 3.68 mM  $MgCl_2$  และ 86.25 mM KCl

กรณี  $Mg^{2+}$  free medium ใช้ 0 mM  $MgCl_2$  และ 89.06 mM KCl

ความเข้มข้นของ DNP ที่เติมลงไปดังแสดงในตาราง ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

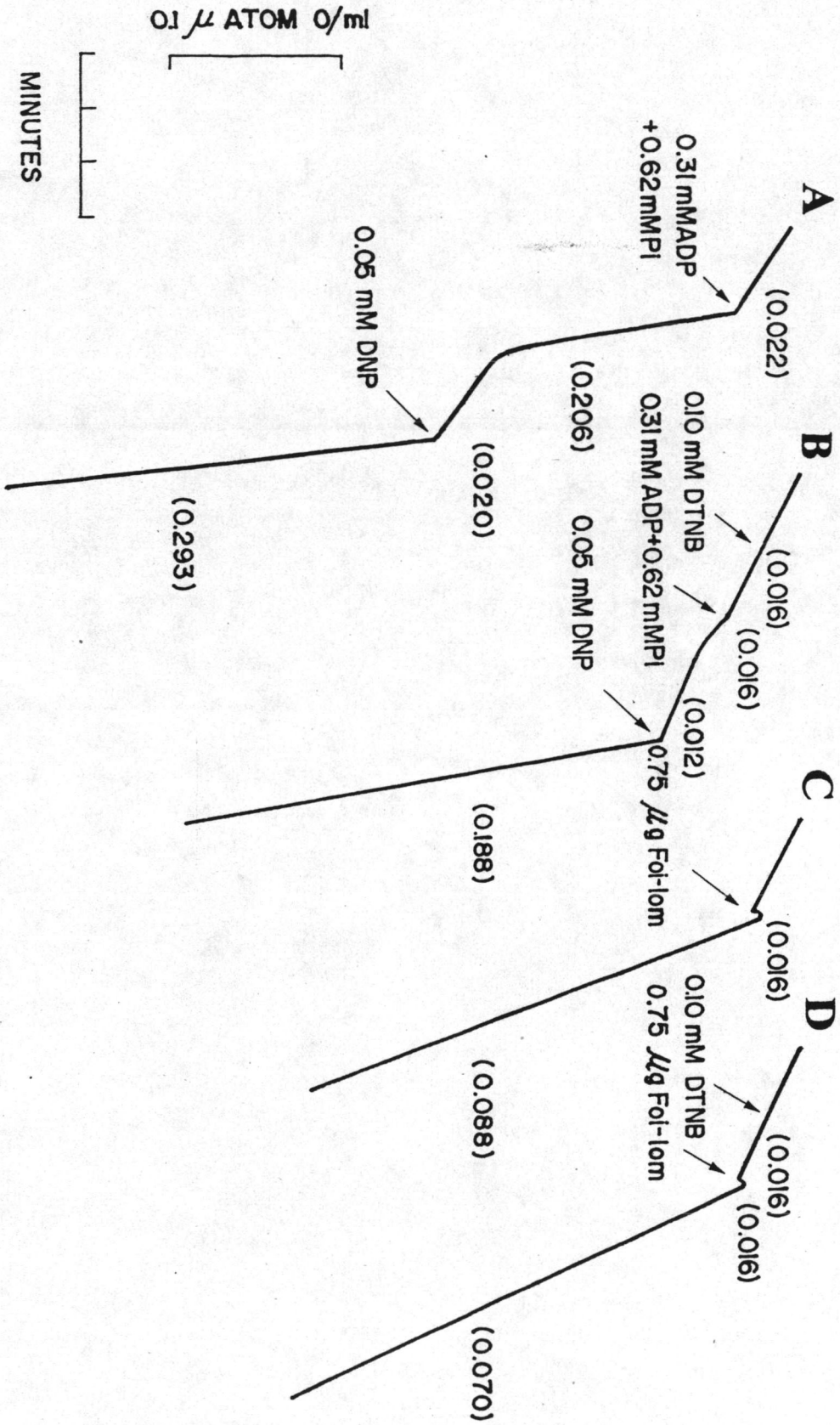
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย  
จาก 4 การทดลอง



รูปที่ 28 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อ การหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose . และ ไมโทคอนเดรีย 2.41 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกตั้งแสดง ในรูปคือ ADP, DNP, DTNB และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น  $1.13 \mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตร ทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที



ตารางที่ 9 ผลของ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อ การหายใจของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.75 $\mu$ g Foi-lom (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
0.75 $\mu$ g Foi-lom	35.08 $\pm$ 3.40
0.75 $\mu$ g Foi-lom after 0.10 mM DTNB	28.66 $\pm$ 3.02*

n = 4 \*p < 0.005

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM MgCl<sub>2</sub>, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีก คือ 0.10 mM DTNB และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu$ M ปริมาตร ทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

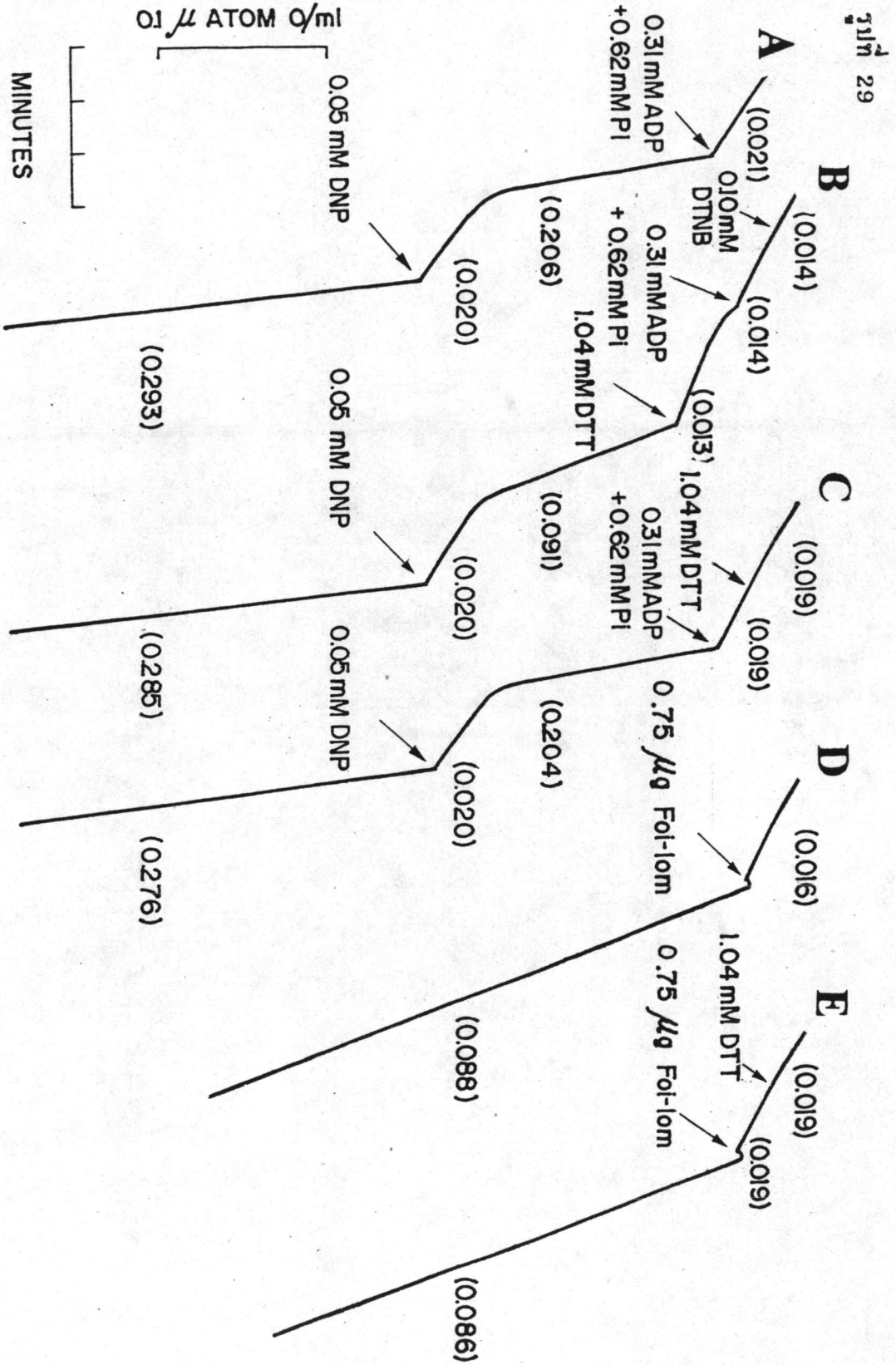


รูปที่ 29 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 2.41 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ ADP, DNP, DTNB, DTT และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น  $1.13 \mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที





ตารางที่ 10 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ต่อ  
การหายใจของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of extra oxygen consumption after 0.75 $\mu$ g Foi-lom (natoms O/min/mg protein) (mean $\pm$ SE)
0.75 $\mu$ g Foi-lom	3.08 $\pm$ 3.40
0.75 $\mu$ g Foi-lom after 1.04 mM DTT	2.94 $\pm$ 2.75 P > 0.1

n = 4

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.02 มก. โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีก คือ 1.04 mM DTT และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu$ M ปริมาตร ทั้งหมด 1.92 มล.

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย  
จาก 4 การทดลอง

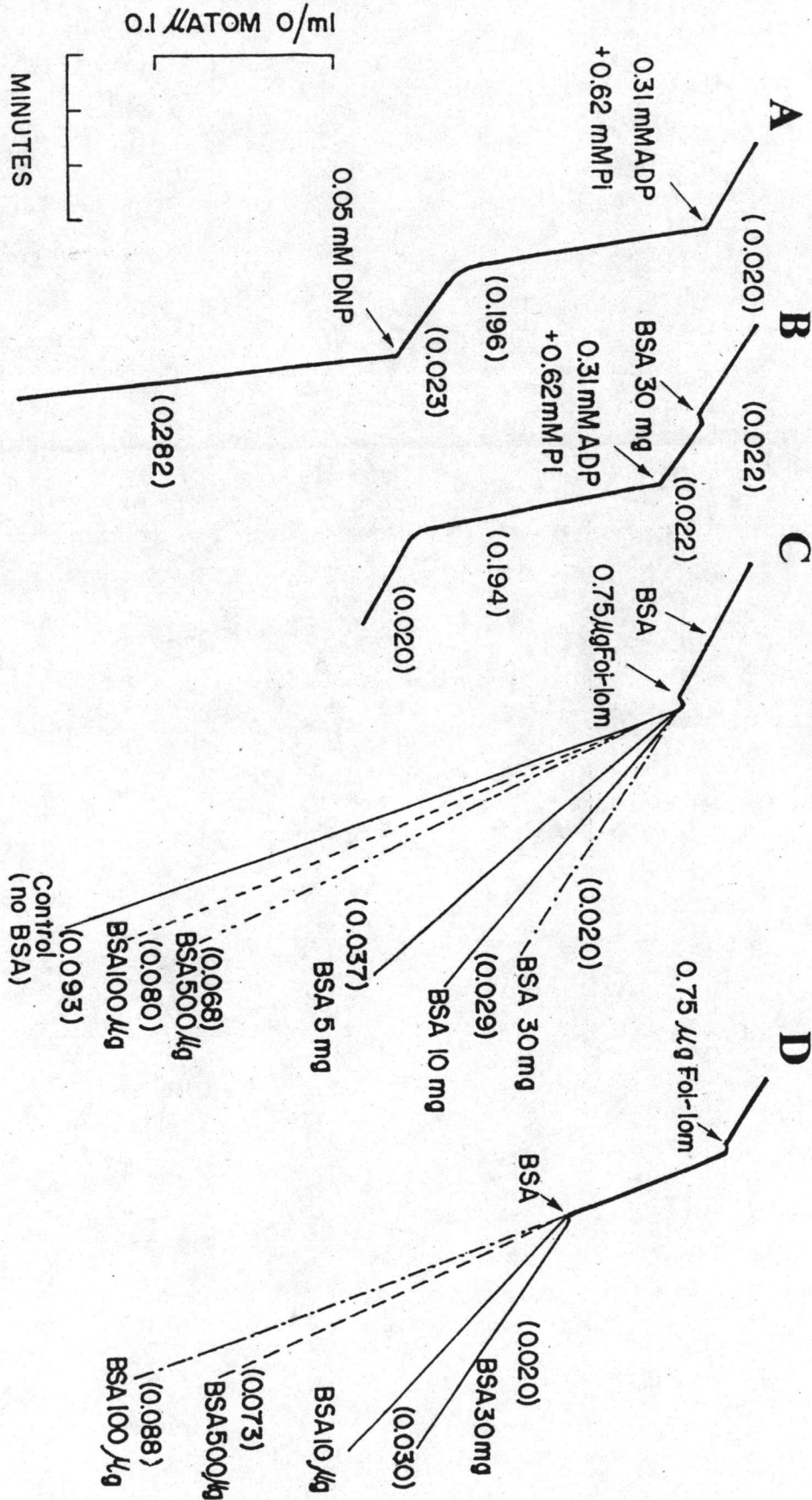


รูปที่ 30 ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ สารสำคัญจากฝอยลม ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.68 mM  $MgCl_2$ , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate และ 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose และ ไมโทคอนเดรีย 2.09 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดง ในรูปคือ ADP, DNP, BSA และสารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.13  $\mu M$  ทำให้แต่ละการทดลองมีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล.

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นจำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

July 30



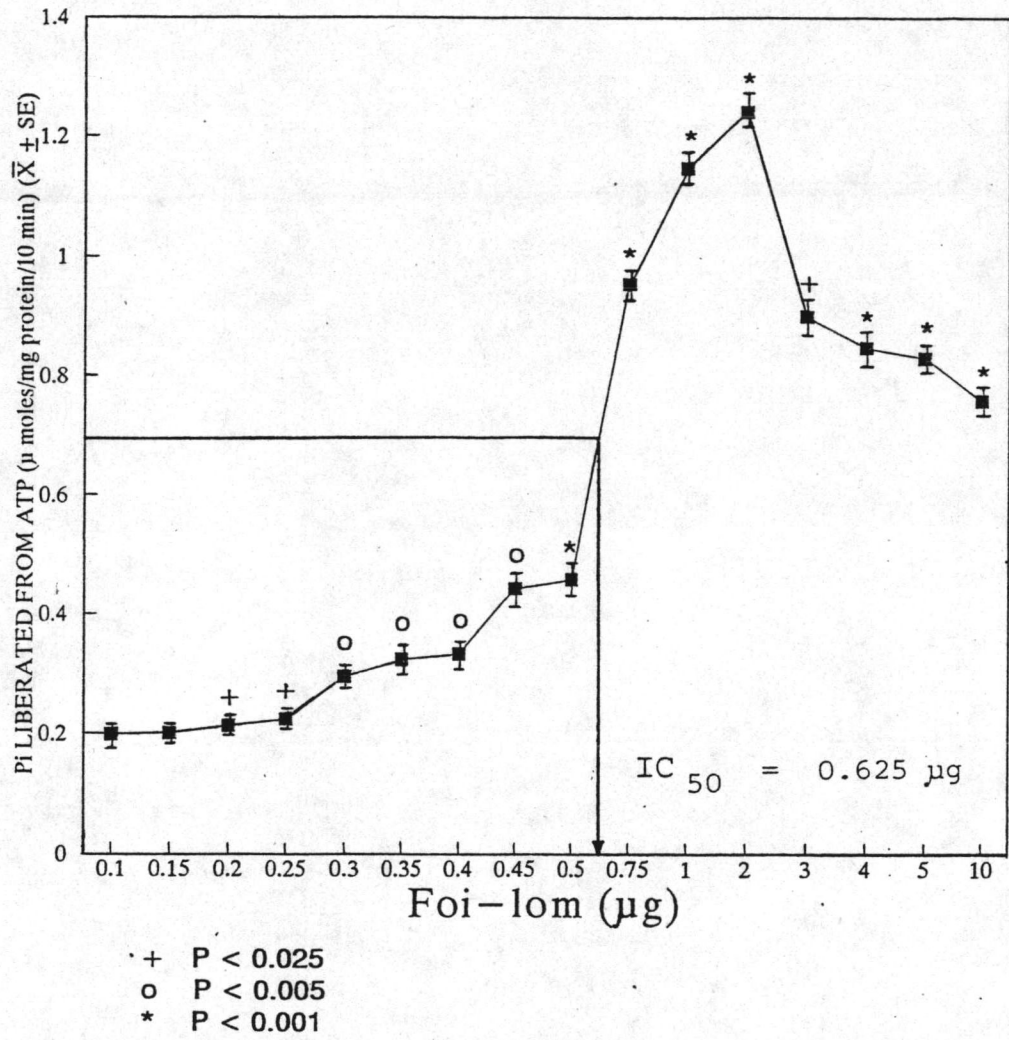
รูปที่ 31 Dose-response curve ของผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่างๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.51 mM  $MgCl_2$ , 82.58 mM KCl, 17.06 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.18 มก. โปรตีน/มล. ปริมาณของสารสำคัญจากฝอยลม ดังแสดงในรูป, 5.00 mM ATP เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วยสารสำคัญจากฝอยลมแล้ว 1 นาที ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล.

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



รูปที่ 31



ตารางที่ 11

Experiments	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min) (mean $\pm$ SE)
NONE	0.171 $\pm$ 0.005
DMSO 10 $\mu$ l	0.173 $\pm$ 0.008
Foi-lom 0.10 $\mu$ g	0.198 $\pm$ 0.009
Foi-lom 0.15 $\mu$ g	0.201 $\pm$ 0.009
Foi-lom 0.20 $\mu$ g	0.214 $\pm$ 0.010 <sup>†</sup>
Foi-lom 0.25 $\mu$ g	0.225 $\pm$ 0.014 <sup>†</sup>
Foi-lom 0.30 $\mu$ g	0.296 $\pm$ 0.017 <sup>°</sup>
Foi-lom 0.35 $\mu$ g	0.324 $\pm$ 0.020 <sup>°</sup>
Foi-lom 0.40 $\mu$ g	0.333 $\pm$ 0.021 <sup>°</sup>
Foi-lom 0.45 $\mu$ g	0.444 $\pm$ 0.028 <sup>°</sup>
Foi-lom 0.50 $\mu$ g	0.459 $\pm$ 0.026 <sup>*</sup>
Foi-lom 0.75 $\mu$ g	0.954 $\pm$ 0.031 <sup>*</sup>
Foi-lom 1 $\mu$ g	1.149 $\pm$ 0.023 <sup>*</sup>
Foi-lom 2 $\mu$ g	1.243 $\pm$ 0.025 <sup>*</sup>
Foi-lom 3 $\mu$ g	0.900 $\pm$ 0.026 <sup>†</sup>
Foi-lom 4 $\mu$ g	0.848 $\pm$ 0.026 <sup>*</sup>
Foi-lom 5 $\mu$ g	0.831 $\pm$ 0.022 <sup>*</sup>
Foi-lom 10 $\mu$ g	0.760 $\pm$ 0.022 <sup>*</sup>

n = 4

<sup>°</sup>P < 0.005<sup>†</sup>P < 0.025<sup>\*</sup>P < 0.001

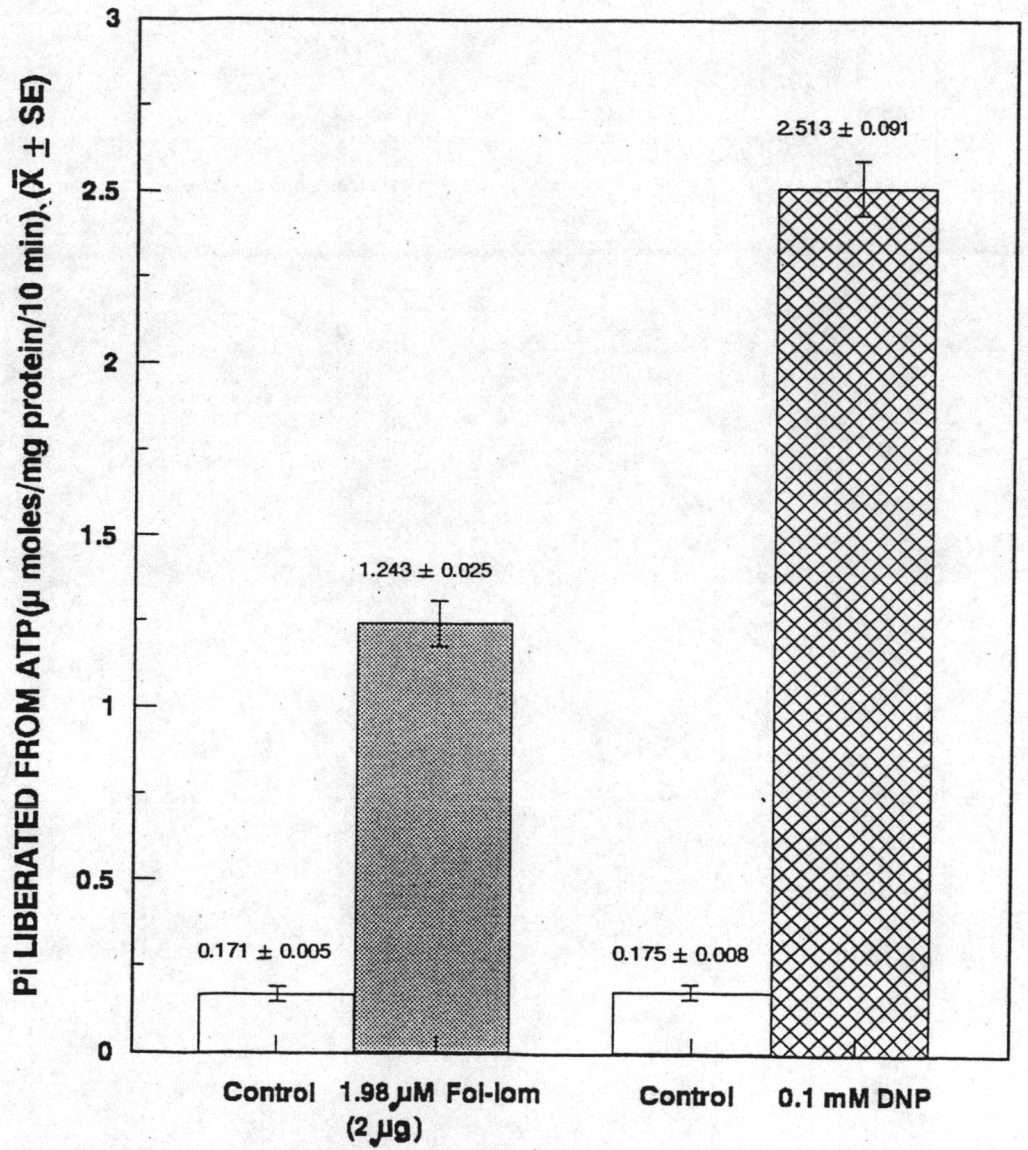
รูปที่ 32 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity ของ ไมโตคอนเดรียระหว่างสารสำคัญจากฝอยลม กับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.51 mM  $MgCl_2$ , 82.58 mM KCl, 17.06 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.18 มก. โปรตีน/มล. สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 1.98  $\mu$ M หรือ 0.1 mM DNP และ 5.00 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล. เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโตคอนเดรียด้วยสารสำคัญจากฝอยลม หรือ DNP แล้ว 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง



รูปที่ 32



ตารางที่ 12 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH 7.2, 3.51 mM  $MgCl_2$ , 82.58 mM KCl, 17.06 mM sucrose ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.19 มก. โปรตีน/มล. สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น  $0.74 \mu M$ , ปริมาตรของ DMSO, oligomycin, atractyloside และความเข้มข้นของ DNP ดังที่แสดงในตาราง, 5.00 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล. เติมด้วยยาต่าง ๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับดังแสดงในตาราง การเติมด้วยยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติม ATP หลังเติมด้วยยาอื่น ๆ ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 12

Experiments	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min) (mean $\pm$ SE)
NONE 10 $\mu$ l DMSO	0.175 $\pm$ 0.008 0.186 $\pm$ 0.012
0.75 $\mu$ g Foi-lom (control) 10 $\mu$ g Oligo+0.75 $\mu$ g Foi-lom 100 $\mu$ g Atrac+0.75 $\mu$ g Foi-lom	0.868 $\pm$ 0.025 0.502 $\pm$ 0.013 <sup>o</sup> 0.644 $\pm$ 0.013 <sup>o</sup>
0.1 mM DNP (control) 10 $\mu$ g Oligo + 0.1 mM DNP 100 $\mu$ g Atrac + 0.1 mM DNP	2.513 $\pm$ 0.019 0.488 $\pm$ 0.019 <sup>*</sup> 0.745 $\pm$ 0.015 <sup>*</sup>

n = 4

<sup>o</sup>P < 0.01<sup>\*</sup>P < 0.001



ตารางที่ 13 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH 7.2, pH 6.8 และ pH 7.6, 3.51 mM  $MgCl_2$ , 82.58 mM KCl, 17.06 mM sucrose, ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.31 มก. โปรตีน/มล. สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 0.74  $\mu M$ , ปริมาตรของ DMSO และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงในตาราง, 5.00 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล. เติม ATP หลัง preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย DMSO, สารสำคัญจากฝอยลม หรือ DNP เป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 13

Experiments	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min) (mean $\pm$ SE)
None (pH 6.8) None (pH 7.2) None (pH 7.6)	0.166 $\pm$ 0.017 0.187 $\pm$ 0.019 0.221 $\pm$ 0.030
10 $\mu$ l DMSO (pH 6.8) 10 $\mu$ l DMSO (pH 7.2) 10 $\mu$ l DMSO (pH 7.6)	0.166 $\pm$ 0.007 0.189 $\pm$ 0.004 0.210 $\pm$ 0.010
0.75 $\mu$ g Foi-lom (pH 6.8) 0.75 $\mu$ g Foi-lom (pH 7.2) (Control) 0.75 $\mu$ g Foi-lom (pH 7.6)	0.762 $\pm$ 0.047 NS 0.790 $\pm$ 0.051 0.851 $\pm$ 0.060 NS
0.1 mM DNP (pH 6.8) 0.1 mM DNP (pH 7.2) (Control) 0.1 mM DNP (pH 7.6)	2.041 $\pm$ 0.182 * 1.906 $\pm$ 0.121 1.793 $\pm$ 0.100 *

n = 4

\*P &lt; 0.025

ตารางที่ 14 ผลของการไม่มี  $Mg^{2+}$  ใน incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH 7.2, 17.06 mM sucrose, ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.17 มก./โปรตีน/มล. ปริมาณของ  $MgCl_2$  และ KCl ใน incubation medium คือ

กรณีมี  $Mg^{2+}$  ใช้ 3.51 mM  $MgCl_2$  และ 82.58 mM KCl

กรณี  $Mg^{2+}$  free medium ใช้ 0 mM  $MgCl_2$  และ 85.47 mM KCl

สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น 0.74  $\mu$ M, ปริมาตรของ DMSO และความเข้มข้นของ DNP ดังแสดงในตาราง, 5.00 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล. เติม ATP หลังจาก preincubate ไมโทคอนเดรียด้วย DMSO, สารสำคัญจากฝอยลม หรือ DNP เป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง



ตารางที่ 14

Experiments	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min) (mean $\pm$ SE)	
	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> free
None	0.173 $\pm$ 0.005	0.172 $\pm$ 0.007
10 $\mu$ l DMSO	0.174 $\pm$ 0.009	0.169 $\pm$ 0.003
0.75 $\mu$ g Foi-lom	0.896 $\pm$ 0.016	0.870 $\pm$ 0.024 P>0.5
0.1 mM DNP	2.193 $\pm$ 0.032	2.225 $\pm$ 0.050 P>0.5

n = 4

ตารางที่ 15 ผลของ DTNB และ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจาก  
ฝอยลม ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย  
เมื่อเทียบกับ DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.90 mM HEPES buffer pH  
7.2, 3.51 mM  $MgCl_2$ , 82.58 mM KCl, 17.06 mM sucrose,  
ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.69 มก.โปรตีน/มล. สารสำคัญจากฝอยลมความเข้มข้น  
0.74  $\mu M$ , ปริมาตรของ DMSO, ความเข้มข้นของ DTNB, DTT และ DNP  
ดังแสดงในตาราง, 5.00 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.93 มล. เติมด้วยยา  
ต่างๆ ลงไป preincubate ไมโทคอนเดรียตามลำดับดังแสดงในตาราง  
การเติมด้วยยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติม ATP หลังเติมด้วยยาอื่น ๆ  
ครบแล้วเป็นเวลา 1 นาที

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย  
จาก 4 การทดลอง



ตารางที่ 15

Experiments	Pi liberated from ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min) (mean $\pm$ SE)
None	0.175 $\pm$ 0.006
10 $\mu$ l DMSO	0.170 $\pm$ 0.005
0.10 mM DTNB	0.348 $\pm$ 0.010
1.04 mM DTT	0.219 $\pm$ 0.009
0.10 mM DTNB and 1.04 mM DTT	0.223 $\pm$ 0.010
0.75 $\mu$ g Foi-lom (Control)	0.882 $\pm$ 0.012
0.10 mM DTNB+0.75 $\mu$ g Foi-lom	0.626 $\pm$ 0.014 °
1.04 mM DTT +0.75 $\mu$ g Foi-lom	0.881 $\pm$ 0.016 NS
0.10 mM DTNB+1.04 mM DTT +0.75 $\mu$ g Foi-lom	0.796 $\pm$ 0.020 *
0.1 mM DNP (Control)	2.105 $\pm$ 0.040
0.10 mM DTNB + 0.1 mM DNP	1.410 $\pm$ 0.050 °
1.04 mM DTT + 0.1 mM DNP	2.101 $\pm$ 0.031 NS
0.10 mM DTNB + 1.04 mM DTT + 0.1 mM DNP	1.976 $\pm$ 0.027 *

n = 4

\*P &lt; 0.05

°P &lt; 0.001



ADP + Pi ลงไป ซึ่ง ADP + Pi ที่เติมลงไปจะไปทำให้เกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์ ATP ขึ้น ( $\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{ATP}$ ) จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นมาก (0.188) จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะช้าลง (0.019) กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่าไมโทคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโทคอนเดรีย และเรียกค่าที่แสดงถึงการควบคุมการหายใจนี้ว่า respiratory control index (RCI) และใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จากอัตราการหายใจใน state 3/อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้น RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ  $0.188 / 0.019 = 9.89$  และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไป โดยที่ DNP สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้ว่าจะไม่มี ADP อยู่ก็ตาม (ทำให้ไม่มีการสร้าง ATP) เรียกระยะนี้ว่า state 3u respiration ซึ่งมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จะเห็นได้จากอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะนี้สูงมาก (0.268) และการใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber จนในที่สุด ( $\text{O}_2 \sim 0$ )

tracing 14 B, C และ D แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากฝอยลมสามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ในลักษณะเดียวกับ DNP กล่าวคือในสภาวะที่ไม่มี ADP และสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้มากขึ้นตามขนาดที่ใช้ กล่าวคือสารสำคัญจากฝอยลมขนาด 0.5 มก. ( $0.76 \mu\text{M}$ ) สามารถกระตุ้น state 4 respiration ทำให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 0.036 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที และเพิ่มเป็น 0.081 และ 0.118 มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที เมื่อเพิ่มขนาดของสารสำคัญ

จากฝอยลมเป็น 1 มคก. ( $1.5 \mu\text{M}$ ) และ 4 มคก. ( $6.0 \mu\text{M}$ ) ตามลำดับ โดยที่สารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 4 มคก. จะกระตุ้นการหายใจได้สูงสุดเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

tracing 14 E แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของสารสำคัญจากฝอยลมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลกระตุ้น state 4 respiration ได้

รูปที่ 15 ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 14 โดย tracing 15 B และ C แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มขนาดของสารสำคัญจากฝอยลมเป็น 10 มคก. ( $15.0 \mu\text{M}$ ) และ 25 มคก. ( $37.8 \mu\text{M}$ ) พบว่ามีการยับยั้งการหายใจทั้งใน state 4 และที่เกิดจากการกระตุ้นการหายใจด้วย ADP และ DNP กล่าวคือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียลดลงจาก control ( $0.017$ ), ( $0.183$ ) และ ( $0.245$ ) เป็น ( $0.043$ ), ( $0.036$ ) และ ( $0.047$ ) เมื่อใช้สารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 10 มคก. ( $15 \mu\text{M}$ ) และในขนาด 25 มคก. ( $37.8 \mu\text{M}$ ) อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย จะลดลงเป็น ( $0.017$ ), ( $0.012$ ) และ ( $0.010$ ) มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับ ดังนั้นสารสำคัญจากฝอยลมจะมีผลสองอย่างต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย คือ ในขนาดต่ำ ๆ 0.1-4 มคก. ( $0.15-6.0 \mu\text{M}$ ) จะมีผลกระตุ้นการหายใจ แต่ในขนาดที่  $> 4$  มคก. ( $> 6 \mu\text{M}$ ) จะมีผลยับยั้งการหายใจ

รูปที่ 16 ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 14 และ 15 แต่เปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น succinate ซึ่งผลที่ได้ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือสารสำคัญจากฝอยลมขนาด 0.5 มคก. ( $0.76 \mu\text{M}$ ), 1 มคก. ( $1.5 \mu\text{M}$ ) และ 3 มคก. ( $4.5 \mu\text{M}$ ) จะกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้มากขึ้นตามขนาดที่ใช้ โดยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 จะเพิ่มขึ้นเป็น 0.068 (tracing B), 0.128 (tracing C) และ 0.148 (tracing D) มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ตามลำดับ และสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 3 มคก. จะกระตุ้นการหายใจได้



สูงสุดในการมีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท ส่วน tracing 16 E แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของสารสำคัญจากฝอยลมเพียงอย่างเดียว ไม่มีผลกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนใน state 4 ได้

รูปที่ 17 tracing 17 B และ C เมื่อเพิ่มขนาดของสารสำคัญจากฝอยลมเป็น 10 มคก. ( $15.0 \mu\text{M}$ ) และ 25 มคก. ( $37.8 \mu\text{M}$ ) ผลที่ได้ก็เป็นไปในทำนองเดียวกับที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือจะมีการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 4 และแม้ว่าเมื่อเติม ADP และ DNP ลงไปก็ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดฟอสฟอริลเลชัน หรือเกิดอันคัปปลิงจากการเติม DNP ได้

รูปที่ 18 แสดง Dose-response curve ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate (curve 18 B) หรือ succinate (curve 18 A) เป็นสับสเตรทจะเห็นได้ว่าทั้งสองกรณีได้ผลในลักษณะที่คล้ายกัน คือเมื่อใช้สารสำคัญจากฝอยลมตั้งแต่ขนาด 0.1-4 มคก. ( $0.15-6.0 \mu\text{M}$ ) อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามขนาดของสารที่ให้ จนกระทั่งสูงสุดที่ขนาดของสารที่ใช้ เท่ากับ 4 มคก. ( $6 \mu\text{M}$ ) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และ 3 มคก. ( $4.5 \mu\text{M}$ ) ในกรณีที่ succinate เป็นสับสเตรท และถ้าให้สารสำคัญจากฝอยลมในขนาดที่มากกว่านั้น จะเห็นว่าเริ่มมีการยับยั้งการหายใจ (อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ลดลง) ความเข้มข้นของสารสำคัญจากฝอยลมที่สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย ได้เป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด ( $\text{IC}_{50}$ ) ได้ประมาณ 0.92 มคก. ( $1.39 \mu\text{M}$ ) (glutamate + malate) และ 0.67 มคก. ( $1.01 \mu\text{M}$ ) (succinate)



2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจของ ไมโทคอนเดรียโดยสารสำคัญจากฝอยลม, ADP และ DNP

รูปที่ 19 (glutamate + malate เป็นสับสเตรท) และรูปที่ 20 (succinate เป็นสับสเตรท) จะเห็นว่าสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดที่สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด 4 มคก. ( $6.0 \mu\text{M}$ ) และ 3 มคก. ( $4.5 \mu\text{M}$ ) เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการหายใจที่ถูกกระตุ้นโดย  $0.31 \text{ mM ADP}$  และ  $0.05 \text{ mM DNP}$  แล้ว พบว่าสารสำคัญจากฝอยลมสามารถกระตุ้นการหายใจได้ในอัตราที่ต่ำกว่าทั้ง ADP และ DNP มาก กล่าวคือ มีค่าประมาณ 65.76% ของ ADP และ 42.85% ของ DNP ในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท และมีค่าประมาณ 68.47% ของ ADP และ 53.14% ของ DNP เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

3. ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $\text{IC}_{50}$  ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O

### 3.1 กรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 21 tracing 21 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง จะเห็นว่าไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองยังมีการควบคุมการหายใจได้อยู่ (RCI = 7.9, จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 = 106.10 นนอ./นาที/มก. โปรตีน และอัตราส่วน ADP/O = 2.7) tracing 21 B แสดงผลของ DMSO ในจำนวนที่ใช้เป็นตัวทำละลายของสารสำคัญจากฝอยลม ( $10 \mu\text{l}$ ) ซึ่งไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโทคอนเดรีย (RCI = 7.5, จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 = 105.49 นนอ./นาที/มก. โปรตีน และอัตราส่วน ADP/O = 2.68) กล่าวคือไม่สามารถทำให้ parameters ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปเมื่อ

เทียบกับ control tracing 21 C แสดงผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  ต่อค่า parameters ทั้งสาม พบว่าสารสำคัญจากฝอยลม ( $IC_{50}$ ) สามารถทำให้ค่า parameters ทั้งสามเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับ control กล่าวคือ ทำให้ค่า RCI ลดลงเป็น 2, จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และ อัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 102.44 นนอ.ออกซิเจน/นาท./มก.โปรตีน และ อัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 2.09 ตามลำดับ

### 3.2 กรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 22 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในรูปที่ 21 แต่เปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate ผลของสารสำคัญจากฝอยลม ( $IC_{50}$ ) ต่อค่า parameters ทั้งสาม จะมีลักษณะคล้ายกับในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท กล่าวคือทำให้ค่า RCI ลดลงเป็น 1.6, จำนวนออกซิเจนที่ถูกใช้ใน state 3 และอัตราส่วน ADP/O ลดลงเป็น 140.61 นนอ.ออกซิเจน/นาท./มก.โปรตีน และ 1.11 ตามลำดับ

จากทั้งสองกรณี แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากฝอยลมมีผลทำให้ค่า parameters ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ )

ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน incubation medium บางประการต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท เปรียบเทียบกับ DNP

#### 1. ผลของ oligomycin และ atractyloside

รูปที่ 23 tracing 23 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งยังมีการควบคุมการหายใจ

ยังได้อยู่ ในสภาวะเช่นนี้พบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันต้องเกิดควบคู่กับปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน ในระยะแรกของ tracing จะเห็นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียต่ำ (0.023) นั่นคือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดช้า เนื่องจากขาดปัจจัยในการทำให้เกิดฟอสฟอริลเลชัน (ADP) เมื่อเติม ADP ลงไป อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะเร็วขึ้นมาก (0.198) เนื่องจากมีปัจจัยในการเกิดฟอสฟอริลเลชันครบปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงเกิดเร็วเมื่อไมโทคอนเดรียใช้ ADP ในการสร้าง ATP หมด อัตราการใช้ออกซิเจนก็จะช้าลงและการเติม DNP ในช่วงสุดท้ายของ tracing จะเกิดการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้ ทั้งๆ ที่ไม่มี ADP กล่าวคือไมโทคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทโดยใช้ออกซิเจนร่วมด้วยอย่างรวดเร็วและเป็นอิสระ ไม่จำเป็นต้องเกิดควบคู่กับปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน ออกซิเจนใน reaction chamber จึงถูกใช้ไปในการออกซิไดซ์สับสเตรทจนหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีการสร้าง ATP นั่นคือ DNP มีฤทธิ์ทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปฏิกิริยาฟอสฟอริลเลชัน

ดังได้กล่าวไว้แล้วว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชันจะต้องเกิดควบคู่กัน ถ้ามีการยับยั้งปฏิกิริยาใด อีกปฏิกิริยาหนึ่งก็จะถูกยับยั้งไปด้วย (บทที่ 1) และจากการที่ oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งการเกิด state 3 ที่เกิดจากการเติม ADP (tracing 23 B และ C) เนื่องจากทั้ง oligomycin และ atractyloside มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันในไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการออกซิไดซ์สับสเตรทซึ่งต้องใช้ ออกซิเจนจึงถูกยับยั้งตามไปด้วย เมื่อเติม DNP ในระยะสุดท้ายของ tracing พบว่า DNP สามารถกระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์สับสเตรท โดยใช้ออกซิเจนร่วมด้วยอย่างรวดเร็วและเป็นอิสระ นั่นคือ oligomycin และ atractyloside ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจของ DNP ได้

รูปที่ 24 tracing 24 B และ C เป็นการศึกษาถึงผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มคก. (1.13  $\mu\text{M}$ ) พบว่าสารสำคัญจากฝอยลม



สามารถปลดปล่อย state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดย oligomycin และ atractyloside ได้

2. ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6

รูปที่ 25 tracing 25 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ส่วน tracing 25 B, C และ D แสดงผลเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มคก. (1.13  $\mu$ M) ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อถูก incubate อยู่ใน medium pH 6.8, 7.2 และ 7.6 ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย หลังจากได้รับสารสำคัญจากฝอยลมมีค่าเกือบจะไม่แตกต่างกันในทั้งสามกรณี คือมีค่า (0.079), (0.089) และ (0.086) ตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลองแล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 5 แสดงว่าในช่วง pH 6.8-7.6 นี้ สารสำคัญจากฝอยลมออกฤทธิ์กระตุ้น state 4 respiration ได้ใกล้เคียงกัน

รูปที่ 26 แสดงผลการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 25 แต่ใช้ DNP แทน จาก tracing 26 B, C และ D จะเห็นว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจาก 6.8-7.2-7.6 อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลงอย่างชัดเจน คือมีค่าเป็น (0.332), (0.322) และ (0.198) ตามลำดับเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าในกลุ่ม pH 7.2 และกลุ่ม pH 7.6 มีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 6 แสดงว่าในช่วง pH 6.8-7.6 นี้ DNP ออกฤทธิ์กระตุ้น state 4 respiration ได้ลดลงเมื่ออยู่ใน pH ที่สูงขึ้น ซึ่งกรณีนี้แตกต่างจากสารสำคัญจากฝอยลม

### 3. ผลของการไม่มี $Mg^{2+}$ ใน incubation medium

รูปที่ 27 tracing 27 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง tracing 27 B และ C แสดงผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อถูก incubate ใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  (tracing 27 B) และถูก incubate ใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  (tracing 27 C) ตามลำดับ จะเห็นว่า อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียหลังได้รับสารสำคัญจากฝอยลมใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  (0.099) สูงกว่าใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  (0.089) และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็พอจะเห็นแนวโน้มว่าสารสำคัญจากฝอยลมสามารถออกฤทธิ์กระตุ้น state 4 respiration ใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  ได้ดีกว่าใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  (7.95%) ดังรายละเอียดที่แสดงอยู่ในตารางที่ 7 tracing 27 D และ E ก็ทำการทดลองทำนองเดียวกับ tracing 27 B และ C เพียงแต่ใช้ DNP แทน จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียหลังได้รับ DNP ใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  (0.322) สูงกว่าใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  (0.279) และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แต่ก็พอจะเห็นแนวโน้มได้ว่า DNP สามารถกระตุ้น state 4 respiration ใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  ได้ดีกว่าใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  ซึ่งกรณีนี้ DNP ให้ผลตรงข้ามกับสารสำคัญจากฝอยลม (7.18%) (ตารางที่ 8)

### 4. ผลของ DTNB และ DTT

รูปที่ 28 tracing 28 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง tracing 28 B แสดงให้เห็นถึงผลของ DTNB ซึ่งเป็นสารประกอบพวก aromatic disulfide สามารถยับยั้งการเกิด state 3 respiration จากการเติม ADP ได้

(DTNB ยับยั้งการเกิด state 3 respiration โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย แล้วมีผลยับยั้งการส่งผ่าน Pi จากภายนอกเข้าไปในไมโทคอนเดรียทำให้ขาด Pi ในการทำปฏิกิริยา) แต่ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจจากการเติม DNP ได้ tracing 28 C แสดงถึงผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มคก. (1.13  $\mu\text{M}$ ) ในการกระตุ้น state 4 respiration ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งใช้เป็น control เปรียบเทียบกับ tracing 28 D ที่แสดงผลของ DTNB ต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม พบว่า DTNB มีผลทำให้สารสำคัญจากฝอยลมออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ลดลง (0.070) และเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า DTNB ทำให้ฤทธิ์ในการกระตุ้น state 4 respiration ของสารสำคัญจากฝอยลมลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.005$

สำหรับผลของ DTT ได้แสดงไว้ในผลการทดลองในรูปที่ 29 tracing 29 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง tracing 29 B แสดงให้เห็นว่า DTT ซึ่งเป็นสารที่ป้องกัน และแก้ไขการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (-SH groups) สามารถทำให้ state 3 respiration ที่เกิดจากการยับยั้งโดย DTNB กลับคืนมาได้ ในช่วงสุดท้ายของ tracing แสดงให้เห็นว่า การเติม DNP ทำให้ไมโทคอนเดรียเสียการควบคุมการหายใจไปได้ tracing 29 C แสดงผลของ DTT ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียพบว่า DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP และ DNP ที่เติมลงไป กล่าวคือแทบจะไม่มีผลต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเลย tracing 29 D แสดงผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มคก. (1.13  $\mu\text{M}$ ) ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย (0.088) และใช้เป็น control สำหรับเปรียบเทียบ tracing 29 E ที่แสดงผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ซึ่งพบว่า DTT มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียได้น้อยมาก และเมื่อทำ



การทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลอง แล้วหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

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

รูปที่ 30 tracing 30 A แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง tracing 30 B พบว่าการเติม BSA ก่อนที่จะใส่ ADP + Pi ไม่ทำให้มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP + Pi กล่าวคือ BSA ไม่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน tracing 30 C แสดงผลของ BSA ในขนาด 100, 500 มคก. และ 5, 10, 30 มก. เปรียบเทียบผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย พบว่าจะมีผลยับยั้งการกระตุ้นการหายใจที่เกิดจากสารสำคัญจากฝอยลมได้ กล่าวคือ BSA ในขนาด 500 มคก. จะทำให้ฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียลดลง และจะลดลงมากขึ้นในขนาด 5, 10 และ 30 มก. ตามลำดับ ส่วน BSA ในขนาด 100 มคก. จะมีผลต่อฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจของสารสำคัญจากฝอยลมน้อยมาก ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างจาก control (สภาวะที่ไม่มี BSA) และคุณสมบัติของ BSA นี้จะแสดงผลทั้งให้ก่อนและหลังสารสำคัญจากฝอยลม

#### ผลของสารสำคัญจากฝอยลมที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

1. ผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

รูปที่ 31 แสดงผลของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1 ถึง 10 มคก. (0.1-9.9  $\mu$ M) ต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียโดยวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP ตามวิธีการในบทที่ 2 แล้วนำมาแสดงเป็นกราฟโดยแสดงเป็น dose-response curve จากการทดลองนี้จะเห็นว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ จะมี

ATPase activity ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะปกติของไมโทคอนเดรีย เอ็นไซม์ ATPsynthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางกลับคืน ATP จาก ADP + Pi จึงทำให้มี ATPase activity ต่ำ (บทที่ 1) ส่วน DMSO ในขนาด 10  $\mu$ l ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสำคัญจากฝอยลมไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.1 - 2 มคก. (0.1 - 1.98  $\mu$ M) สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้มากขึ้นเรื่อย ๆ และจะสัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ กล่าวคือ เมื่อขนาดของสารสำคัญจากฝอยลมสูงขึ้น ก็จะกระตุ้น ATPase activity ได้มากขึ้น แต่เมื่อให้สารสำคัญจากฝอยลมมากกว่า 2 มคก. (1.98  $\mu$ M) เช่น 3 มคก. (2.97  $\mu$ M) จะเห็นว่าเริ่มมีฤทธิ์ยับยั้ง ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย และจากรูปที่ 31 นี้ ขนาดของสารสำคัญจากฝอยลมที่มีผลทำให้การกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้เป็นครึ่งหนึ่งของการกระตุ้นสูงสุด ( $IC_{50}$ ) มีค่าประมาณ 0.625 มคก. (0.62  $\mu$ M)

2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ได้สูงสุดระหว่างสารสำคัญจากฝอยลมกับ DNP

รูปที่ 32 เป็นการเปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity โดยสารสำคัญจากฝอยลม และ DNP จะเห็นว่าสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 2 มคก. (1.98  $\mu$ M) สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ต่ำกว่า 0.1 mM DNP กล่าวคือ สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้เพียง 49% ของ DNP เท่านั้น

ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน incubation medium บางประการต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย เปรียบเทียบกับ DNP

### 1. ผลของ oligomycin และ atractyloside

ตารางที่ 12 แสดงผลของสารสำคัญจากฝอยลมในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย กรณีที่ไม่ได้เติมสารใดเลย ซึ่งจะพบว่า ATPase activity ต่ำ และกรณีผลของ DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้โดยทำให้มีการสลายตัวของ ATP ไปเป็น ADP + Pi ได้อย่างมาก ซึ่งมีผลในทางตรงข้ามกับหน้าที่ปกติของไมโทคอนเดรีย (บทที่ 1) ส่วนสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มก. (0.74  $\mu$ M) ก็ให้ผลในการกระตุ้น ATPase activity เช่นเดียวกับ DNP เมื่อศึกษาถึงผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มก. (0.74  $\mu$ M) เปรียบเทียบกับ DNP พบว่า oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มก. (0.74  $\mu$ M) ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) และฤทธิ์ยับยั้งนี้เกิดได้เช่นเดียวกับกรณีของ 0.1 mM DNP ที่ใช้ทดลองเปรียบเทียบกันและมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 2. ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6

ตารางที่ 13 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6 ในกรณีที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ พบว่าให้ผลในการกระตุ้น ATPase activity ได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนในกรณีของ DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของสารสำคัญจากฝอยลม ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันและการ



เปลี่ยนแปลง pH ของ medium ในช่วง 6.8-7.2-7.6 นี้ ทำให้การออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลม ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียมีแนวโน้มว่าฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น แต่เมื่อทำการทดลองเพิ่มเป็น 4 การทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับ การออกฤทธิ์ของ 0.1 mM DNP พบว่าฤทธิ์ของ DNP มีแนวโน้มว่าฤทธิ์จะลดลงมากกว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าในกลุ่ม pH 6.8 และ 7.2 กับกลุ่ม pH 7.2 และ 7.6 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.025$ )

### 3. ผลของการไม่มี $Mg^{2+}$ ใน incubation medium

ตารางที่ 14 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเมื่ออยู่ใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  และ medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  ในกรณีของกลุ่มควบคุม พบว่าฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ไม่แตกต่างกัน และให้ผลทำนองเดียวกันกับในกรณีของ DMSO กรณีของสารสำคัญจากฝอยลม พบว่าฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ใน medium ที่ไม่มี  $Mg^{2+}$  มีแนวโน้มลดลงกว่าใน medium ที่มี  $Mg^{2+}$  แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติออกมาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับ DNP พบว่าฤทธิ์ของ DNP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อไม่มี  $Mg^{2+}$  ใน medium และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

### 4. ผลของ DTNB และ DTT

ตารางที่ 15 แสดงผลในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะมี ATPase activity ต่ำ และ DMSO ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน ในขณะที่ 0.10 mM DTNB มีฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ได้ ส่วน 1.04 mM DTT สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้เพียงเล็กน้อย

การเติม DTT ลงไปมีผลยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ที่เกิดจาก DTNB ได้ เมื่อพิจารณาถึงผลของ DTNB ต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในขนาด 0.75 มคก. (0.74  $\mu$ M) พบว่า มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากฝอยลมในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย (29%) และมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.001$  และฤทธิ์การยับยั้ง ATPase activity ของไมโทคอนเดรียเกิดขึ้นเช่นเดียวกับกรณีของ DNP (33.02%) และพบความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ส่วน DTT จะมีผลน้อยมากต่อการออกฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ของสารสำคัญจากฝอยลมและ DNP อย่างไรก็ตาม พบว่า DTT สามารถแก้ไขฤทธิ์ของ DTNB ได้ทั้งในสองกรณีได้อย่างสมบูรณ์

