

ผลของอนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ต่อกฤทธิ์อันคับปลิง
ของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการการหายใจของไมโตคอนเดรีย



นางสาวราณี กาญจนวิชกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5023-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF N-HEPTANOYL, NITRO-m-METHOXY ANILIDE DERIVATIVES ON
UNCOUPLING MITOCHONDRIAL RESPIRATION INDUCED BY NSAIDs

Miss Waranee Kanchanawanichkul



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5023-4

วราณี กาญจนวิฑกุล : ผลของอนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ต่อฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย. (EFFECTS OF N-HEPTANOYL, NITRO-*m*-METHOXY ANILIDE DERIVATIVES ON UNCOUPLING MITOCHONDRIAL RESPIRATION INDUCED BY NSAIDs) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.วิทยา จันทสูตร, 106 หน้า. ISBN 974-17-5023-4.

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ต่อฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ทำการศึกษาฤทธิ์อันคัปปลิงของ NSAIDs 3 ชนิดได้แก่ indomethacin, piroxicam และ nimesulide ซึ่ง NSAIDs ทั้ง 3 ชนิดในช่วงความเข้มข้น 0.05-2 mM แสดงฤทธิ์อันคัปปลิงต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีฤทธิ์กระตุ้นอัตราการหายใจ state 4 ความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียสูงสุดของ NSAIDs แต่ละชนิดเท่ากับ 0.2, 0.5 และ 0.1 mM ตามลำดับ และ NSAIDs ทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลต่อ ATPase activity ผลการศึกษาพบว่า เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย indomethacin พบว่า CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-09<CU-18-15<CU-18-10<CU-18-13<CU-18-14) และ CU-18-09, CU-18-10, CU-18-14, CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-15<CU-18-10<CU-18-09<CU-18-14) เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย piroxicam พบว่า CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-15<CU-18-09<CU-18-10<CU-18-14<CU-18-13<CU-18-07) และ succinate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-10<CU-18-09<CU-18-15<CU-18-14<CU-18-07<CU-18-13) เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย nimesulide พบว่าสารทุกตัวมีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-09<CU-18-10=CU-18-15<CU-18-14<CU-18-13<CU-18-07) และ CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (ค่า IC_{50} จากน้อยไปมากดังนี้ CU-18-13<CU-18-09<CU-18-10<CU-18-15<CU-18-14)

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546

4576597533 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD : N-HEPTANOYL NITRO META METHOXY ANILIDE / UNCOUPLING /
MITOCHONDRIAL RESPIRATION / NSAIDs

WARANEE KANCHANAWANICHKUL : EFFECTS OF N-HEPTANOYL, NITRO-*m*-
METHOXY ANILIDE DERIVATIVES ON UNCOUPLING MITOCHONDRIAL
RESPIRATION INDUCED BY NSAIDs. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.
WITHAYA JANTHASOOT, 106 PP. ISBN 974-17-5023-4.

The purpose of this study was to investigate the effects of N-heptanoyl, nitro-*m*-methoxy anilide derivatives on uncoupling mitochondrial respiration induced by NSAIDs. We investigated uncoupling effect of indomethacin, piroxicam and nimesulide on mitochondrial respiration over a drug concentration range of 0.05-2 mM and showed that all NSAIDs stimulated respiration (uncoupled oxidative phosphorylation) in coupled isolated rat liver mitochondria. The concentrations at which indomethacin, piroxicam and nimesulide caused maximal uncoupling were 0.2, 0.5 and 0.1 mM, respectively. These NSAIDs did not show stimulatory effect on ATPase activity. CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 and CU-18-15 showed inhibition effects on uncoupling mitochondrial respiration caused by indomethacin using glutamate+malate as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-09<CU-18-15<CU-18-10<CU-18-13<CU-18-14) and CU-18-09, CU-18-10, CU-18-14 and CU-18-15 showed inhibition effects when succinate was used as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-15<CU-18-10<CU-18-09<CU-18-14). All of N-heptanoyl anilide derivatives showed inhibition effects on uncoupling mitochondrial respiration caused by piroxicam when glutamate+malate was used as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-15<CU-18-09<CU-18-10<CU-18-14<CU-18-13<CU-18-07) and when succinate was use as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-10<CU-18-09<CU-18-15<CU-18-14<CU-18-07<CU-18-13). All of N-heptanoyl anilide derivatives showed inhibition effects on uncoupling mitochondrial respiration caused by nimesulide when glutamate+malate was used as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-09<CU-18-10=CU-18-15<CU-18-14<CU-18-13<CU-18-07). CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 and CU-18-15 showed inhibition effects when succinate was used as substrate (the order of IC_{50} was CU-18-13<CU-18-09<CU-18-10<CU-18-15<CU-18-14).

DepartmentPHARMACOLOGY..... Student' s signature.....

Field of study.....PHARMACOLOGY..... Advisor' s signature.....

Academic year.....2003.....

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกด้าน ให้คำปรึกษาตลอดคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆอย่างดียิ่งตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันตีสิริระ หัวหน้าภาคเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆของภาควิชา ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชานาญ ภัทรพานิช ที่กรุณาให้สารทดสอบ รวมทั้งคำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำปรึกษาตลอดการศึกษาระดับปริญญาโทมาหาบัณฑิต ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้าน การศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่ 1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ปัจจัยที่ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหาร.....	6
ยาที่ใช้ในการรักษาแผลทางเดินอาหาร.....	7
การแบ่งกลุ่มยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์.....	10
กลไกการออกฤทธิ์ลดการอักเสบของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์.....	11
ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์และการทำให้เกิดรอยแผลทางเดินอาหาร..	14
ไมโตคอนเดรียและสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย.....	19
ผลของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ต่อไมโตคอนเดรีย.....	26
บทที่ 3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	31
สัตว์ทดลอง.....	31
การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี....	32
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา.....	32
การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว.....	33
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	34
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	36

สารบัญ (ต่อ)

๗

หน้า

การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ.....	38
การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย.....	42
การหาความเข้มข้นโปรตีนของไมโทคอนเดรีย.....	44
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	45
บทที่ 4. ผลการวิจัย.....	46
1.ฤทธิ์อันค้ำปลิงของยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท.	46
2. ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์.....	47
2.1 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยindomethacin.....	47
2.2 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam.....	49
2.3 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ที่มีต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide.....	51
3. ผลของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์.....	53
4. ผลของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์.....	54
5. ผลของยาด้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย.....	55
บทที่ 5. สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	87
รายการอ้างอิง.....	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงลักษณะทั่วไปของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	4
2	แสดงยารักษาแผลในทางเดินอาหาร.....	9
3	แสดงการแบ่งกลุ่ม NSAIDs ตามสูตรโครงสร้าง.....	12
4	แสดงอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโตคอนเดรีย โดย indomethacin, piroxicam และ nimesulide ความเข้มข้นต่างๆ.....	57
5	แสดงความสามารถในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀) ของ CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15...	84
6	แสดงผลของ indomethacin, piroxicam, nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.1 mM ตามลำดับ และ 0.12 mM DNP ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์.....	3
2 กลไกในการออกฤทธิ์ของยาลดการสร้างกรดในกระเพาะอาหาร.....	8
3 แสดงถึงการสังเคราะห์ prostaglandins ชนิดต่างๆและตำแหน่งที่ ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ออกฤทธิ์.....	13
4 แสดงกลไกที่ NSAIDs เหนี่ยวทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหาร.....	18
5 ภาพแสดงโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย.....	24
6 แสดงโครงสร้างของไมโตคอนเดรียโดยรวม (A)และแสดง respiratory chain (B).....	25
7 แสดงตำแหน่งสารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน..	28
8 แสดงกลไกการเกิดอันคัปปลิงของ diclofenac ที่มีต่อกระบวนการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย.....	29
9 แสดงตำแหน่งที่ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์มีผลต่อไมโตคอนเดรีย.....	30
10 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homognate โดยใช้ differential centrifuge.....	35
11 แสดง Gilson's Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลอง.....	37
12 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหา RCI.....	41
13 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	41
14 กราฟแสดง oxygraph tracing การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	56
15 อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโตคอนเดรียโดย indomethacin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	58
16 อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโตคอนเดรียโดย piroxicam ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ฎ

หน้า

17	อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโตคอนเดรียโดย nimesulide ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	60
18	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	61
19	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็น สับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	62
20	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	63
21	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	64
22	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	65
23	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	66
24	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ฎ
หน้า

25	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam(0.5 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	68
26	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	69
27	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	70
28	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malateเป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	71
29	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	72
30	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	73
31	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) gluatamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ฐ

หน้า

32	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	75
33	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	76
34	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	77
35	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	78
36	อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	79
37	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	80
38	อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	81

39	อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	82
40	อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท.....	83
41	แสดงผลของ indomethacin, piroxicam, nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.1 mM ตามลำดับ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย.....	86

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5' -diphosphate
ATP	=	adenosine 5' -triphosphate
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
Ca ²⁺	=	calcium ion
CaCl ₂	=	calcium chloride
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
COX	=	cyclooxygenase
CuSO ₄	=	copper sulfate
Cyt.	=	cytochrome
°C	=	degree Celsius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
DU	=	duodenal ulcer
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	=	reduced flavin adenine dinucleotide
<i>g</i>	=	centrifugal force unit (gravity)
GU	=	gastric ulcer
H ⁺	=	proton
HCl	=	hydrochloric acid
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
H ₂ RA	=	H ₂ -receptor antagonist
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid
IC ₅₀	=	median inhibition concentration
K ⁺	=	potassium ion

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

KCl	=	potassium chloride
K ₂ HPO ₄	=	potassium phosphate
M	=	molar
MgCl ₂	=	magnesium chloride
μ atoms	=	microatoms
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mOsm	=	milliosmolar
NAD ⁺	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
Na ₂ CO ₃	=	sodium carbonate
NaOH	=	sodium hydroxide
n atoms	=	nanoatoms
ng	=	nanogram
NSAIDs	=	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
O ₂	=	oxygen
OH ⁻	=	hydroxyl ion
Pi	=	inorganic phosphate
PGE ₂	=	prostaglandin E ₂
PGI ₂	=	prostaglandin I ₂
PGs	=	prostaglandins
PPIs	=	proton pump inhibitors
PU	=	peptic ulcer
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

SE	=	standard error of mean
TCA	=	trichloroacetic acid
TXA ₂	=	thromboxane A ₂
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

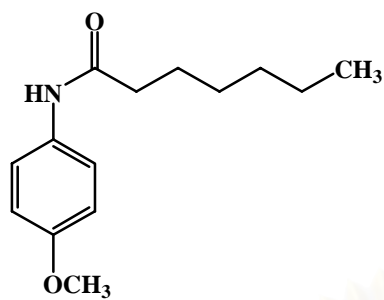
ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) เป็นกลุ่มยาที่มีการใช้อย่างมากในหลายประเทศทั่วโลก (Jones, 2001) มีการนำ NSAIDs มาใช้ในทางเวชปฏิบัติอย่างมากมาโดยหลักๆคือ ใช้สำหรับลดการอักเสบ ใช้สำหรับลดอาการปวด และใช้สำหรับลดไข้ กลไกการออกฤทธิ์ของ NSAIDs ในการยับยั้งการอักเสบคือ ยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandins (PGs) ในเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งมี 2 รูปแบบคือ COX-1 หรือ constitutive COX และ COX-2 หรือ inducible COX (Laurence et al., 1997)

อาการข้างเคียงที่สำคัญของ NSAIDs คือ ผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีระดับความรุนแรงน้อยๆ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ไปถึงขั้นรุนแรงเป็นแผลที่ผนังกระเพาะอาหารหรือลำไส้และอาจจะเป็นแผลจนเกิดเลือดออกอย่างรุนแรงจนทำให้เสียชีวิตได้ กระบวนการเกิดโรคที่ NSAIDs เหนียวนำไปให้เกิดแผลในทางเดินอาหารมีความยุ่งยากซับซ้อนและยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด ซึ่งส่วนใหญ่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ที่ยับยั้ง COX-1 ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้เกิดการขาดแคลน PGs ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทเกี่ยวกับการปกป้องเนื้อเยื่อ (cytoprotection) ต่อมา Somasundaram และคณะ (1995) ทำการศึกษาและอธิบายว่า กลไกที่ NSAIDs เหนียวนำไปให้เกิดแผลในทางเดินอาหารอาจเกิดได้จาก nonprostaglandin effect ร่วมด้วย ซึ่ง NSAIDs จะแสดงฤทธิ์อันคับปลิง (uncoupling effect) ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย

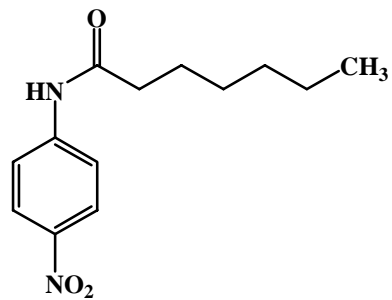
จากการศึกษาหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า NSAIDs มีฤทธิ์อันคับปลิงต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย อาทิ NSAIDs (aspirin, flurbiprofen, diclofenac, indomethacin, naproxen, ibuprofen, piroxicam และ ketoprofen) non-aspirin salicylate, azapropazone, phenylbutazone และ acidic pro- NSAIDs (etodolac, fenbufen และ sulindac) ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ (0.02-2.7 μM) มีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (Mahmud et al., 1996) ต่อมาเมื่อผู้ทำการศึกษาและแสดงให้เห็นว่า indomethacin และ nimesulide มีฤทธิ์อันคับปลิงต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยพบว่า indomethacin แสดงฤทธิ์อันคับปลิงที่ความเข้มข้นต่ำกว่า nimesulide (Sigthorsson et al, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับผลการ

ศึกษาของ Moreno-Sanchez และคณะ (1999) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า nimesulide, meloxicam, piroxicam และ indomethacin มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย ผลการศึกษาของ Jacob และคณะ (2001) ซึ่งศึกษาจากไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว หนูถีบจักร และมนุษย์ พบว่า indomethacin แสดงฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 และ 0.2 mM) และแสดงฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ความเข้มข้นสูง (0.5 และ 2.5 mM) การศึกษาของ Krause และคณะ (2003) พบว่า NSAIDs ได้แก่ diclofenac และ indomethacin และ SC-236 ซึ่งเป็น selective COX-2 inhibitor แสดงฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย และจากการศึกษาของ Leite และคณะ (2001) ซึ่งทำการทดลอง *in vivo* พบว่า metronidazole สามารถลดการเกิดแผลในลำไส้ที่เกิดจาก indomethacin ได้ และทำการทดลองโดยแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวที่ได้รับ metronidazole พบว่า หนูขาวที่ได้รับ metronidazole ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของไมโตคอนเดรียที่เกิดจาก indomethacin ลดลง จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาหาสารที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของไมโตคอนเดรียที่เกิดจาก NSAIDs เพื่อเป็นประโยชน์ในการใช้ร่วมกับ NSAIDs เพื่อลดอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร

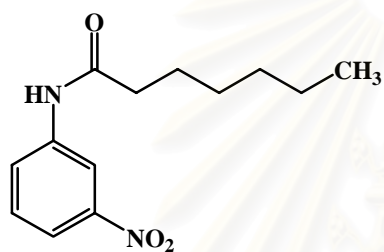
สารสังเคราะห์อนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ได้แก่ CU-18-14 และ CU-18-15 ซึ่งพัฒนาสูตรโครงสร้างโดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช และคณะ ซึ่งหัตถ์รัตน์ เชื้อนแสน (2545) ได้ทำการศึกษาผลของสาร CU-18-07, CU-18-08, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-11, CU-18-12 และ CU-18-13 ต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวพบว่าสารทั้งหมดแสดงฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ site I ของลูกโซ่การหายใจ และพบว่า CU-18-09 และ CU-18-10 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมและ 2,4-dinitrophenol (DNP) ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ทำการศึกษาถึงผลของสารดังกล่าว ถึงผลในการยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของ NSAIDs ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารอนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ในการยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของ NSAIDs ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย ซึ่งคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสารเพื่อใช้ร่วมกับ NSAIDs เพื่อลดอาการข้างเคียงของระบบทางเดินอาหาร



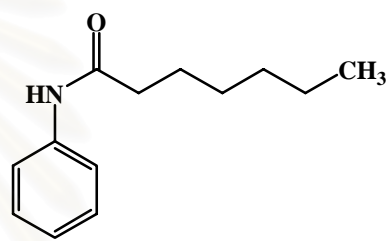
CU-18-07



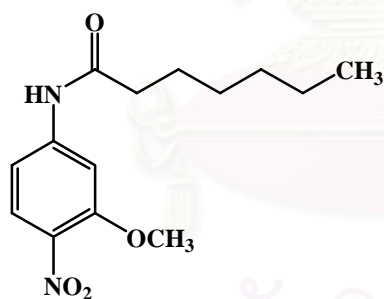
CU-18-09



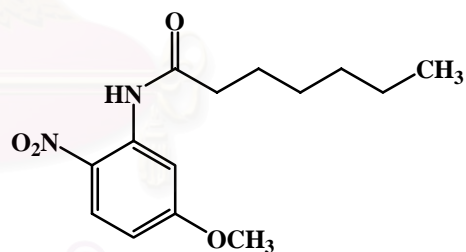
CU-18-10



CU-18-13



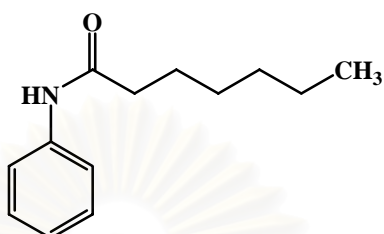
CU-18-14



CU-18-15

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิด อะนิไลด์

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย



สารตัวอย่าง	น้ำหนักโมเลกุล	ตำแหน่งที่มีการแทนที่ -OCH ₃	ตำแหน่งที่มีการแทนที่ -NO ₂
CU-18-07	235.32	4	-
CU-18-09	250.29	-	4
CU-18-10	250.29	-	3
CU-18-13	205.30	-	-
CU-18-14	280.32	3	4
CU-18-15	280.32	5	2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ต่อฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

สมมุติฐาน

อนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นถึงผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียหรือไม่ สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยมาเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาสารเพื่อเป็นประโยชน์ในการใช้ร่วมกับยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ เพื่อลดอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แผลในทางเดินอาหาร (PEPTIC ULCER, PU)

PU หมายถึง แผลที่เกิดขึ้นที่บริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น พยาธิกำเนิดของแผลในทางเดินอาหารเชื่อว่าเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างปัจจัยซึ่งมีผลในการทำลายและปัจจัยที่ช่วยป้องกันและเพิ่มความต้านทานของเยื่อบุทางเดินอาหาร หากปัจจัยซึ่งมีผลในการทำลายเยื่อบุเพิ่มขึ้นความต้านทานของเยื่อบุที่มีอยู่ จะทำให้เกิดแผลทางเดินอาหาร ขึ้นได้ (Andrew, 1996; Tygat, 1998)

ปัจจัยที่ทำให้เกิด peptic ulcer

ปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิด PU มีหลายประการ (Hui, 1991; McGuigan, 1991; Richardson, 1992) พอสรุปได้ดังนี้

1. ความผิดปกติในการหลั่งกรดและเปปซิน กรดในกระเพาะอาหารสร้างที่ parietal cell สารเคมีภายในร่างกายที่มีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งกรดได้แก่ acetylcholine, gastrin และ histamine ส่วน pepsin สร้างที่ chief cell ในรูป pepsinogen เมื่อสัมผัสกับกรดในกระเพาะอาหารจึงเปลี่ยนเป็น pepsin สภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดในการสร้าง pepsin คือ pH 1.8-3.5 pepsin จะหมดฤทธิ์ที่ pH เกินกว่า 4

2. การไหลย้อนขึ้น (reflux) ของน้ำดีและน้ำย่อยจากตับอ่อนเข้าสู่กระเพาะอาหาร ทำให้กระเพาะอาหารอักเสบและเป็นแผล

3. ความทนทานของชั้นเยื่อเมือกลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก ลดการหลั่งเมือกและไบคาร์บอเนต prostaglandins (PGs) เป็นต้น นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของ growth factors ที่มีบทบาทในการปกป้องชั้นเยื่อเมือกและช่วยรักษา peptic ulcer growth factor เหล่านี้ได้แก่ epidermal growth factor (EGF) และ fibroblast growth factor (FGF) โดย EGF มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของ epithelial cell มีผลน้อยต่อเซลล์อื่น มีบทบาทเกี่ยวกับ "gastroprotection" FGF มีบทบาทเกี่ยวกับ "gastroprotection" ต่ำ แต่มีฤทธิ์แรงในการช่วยให้แผลหาย เนื่องจากมีฤทธิ์ทำให้เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ต่างๆ เช่น endothelial cell, fibroblast, เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และยังเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ด้วย

4. Gastric emptying ช้า อาหารถูกกักเก็บอยู่ในกระเพาะนานอาจไปกระตุ้นการหลั่งกรด และ pepsin

5. ความเครียด อาจกระตุ้นการหลั่งกรด ลดการสร้างสารที่ปกป้องเยื่อเมือก

6. พันธุกรรม อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับเกิด peptic ulcer ในผู้ป่วยบางราย

7. เชื้อโรค เช่น *Candida albicans*, *Helicobacter pylori* สำหรับ *H. pylori* มีผู้ทำการศึกษามาก พบเชื้อที่ชั้นเยื่อบุกระเพาะอาหาร ในผู้ป่วย duodenal ulcer ตรวจพบเชื้อนี้ 80-90% (Ateshkadi et al., 1993)

8. การสูบบุหรี่ ค่อนข้างจะสัมพันธ์กับการเกิด PU และการเสียชีวิตเนื่องจากโรคนี้ นอกจากนี้การรักษา duodenal ulcer ในผู้ที่สูบบุหรี่จะหายยากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ และอัตราการกลับมาเป็นใหม่ในผู้ที่สูบบุหรี่ก็สูงกว่าด้วย

9. ยาบางชนิด เช่น NSAIDs, glucocorticoid เป็นต้น มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง PGs และอาจมีผลอื่นที่ไปลดความต้านทานของชั้นเยื่อเมือก ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหารได้ง่าย

10. อื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์และเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีน อาจไปกระตุ้นการหลั่งกรดหรือลดความต้านทานของชั้นเยื่อเมือก

ยาที่ใช้ในการรักษา PU (Altman, 1992; Hoogerwerf and Pasricha, 2001; Bennett and Brown, 2003; Rang et al., 2003)

ยาที่ใช้กันทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ (ตารางที่ 2)

1. ยามีฤทธิ์ต้านหรือลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ได้แก่

ก. ยาต้านกรดหรือยาลดกรด (antacids) ส่วนมากเป็นส่วนผสมของ Aluminium และ Magnesium hydroxide

ข. ยาลดการหลั่งของกรด (anti-secretory drugs) ได้แก่ ยาที่มีฤทธิ์ที่ receptor ต่างๆซึ่งมีส่วนในการผลิตกรด เช่น ที่ H_2 receptor (ได้แก่ cimetidine, ranitidine, famotidine), cholinergic receptor (ได้แก่ pirenzepine), และที่ proton pump (ได้แก่ omeprazole) ดังแสดงในรูปที่ 2

2. ยามีฤทธิ์ป้องกันเยื่อบุกระเพาะอาหาร ได้แก่

ก. Cytoprotective agents

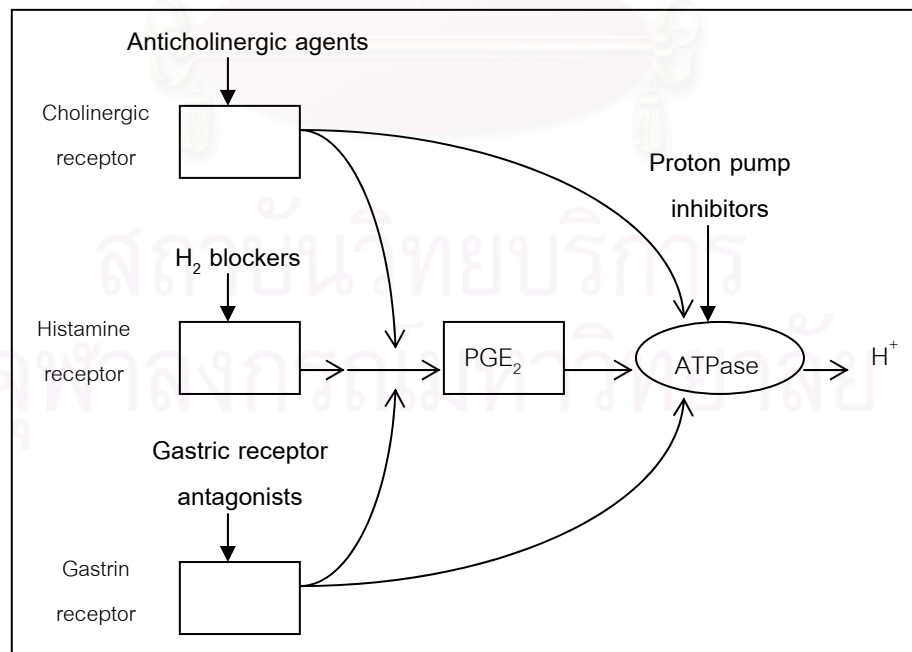
ได้แก่ยาในกลุ่ม prostaglandins เช่น misoprostol ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเยื่อเมือก (mucus) และไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้น รวมทั้งเพิ่มเลือดที่ไปยังเยื่อผิวกระเพาะอาหาร ยาในกลุ่มนี้ยังมีฤทธิ์ลดกรดในกระเพาะอาหารด้วย

ข. Site-protective agents

ได้แก่ sucralfate และ bismuth chelate (colloidal bismuth subcitrate, tripotassium dicitratobismuthate) ทำหน้าที่เสมือนเป็นฉนวน (insulator) กั้นแผลจากการทำลายของกรดและ pepsin นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดเซลล์ใหม่ รวมทั้งให้มีการสร้างเยื่อเมือกและ PGs ด้วย

Sonnenberg (1985) ได้นำเสนอวิธีการรักษาซึ่งอาจแบ่งออกเป็น

1. การรักษาในระยะสั้น (acute therapy) ใช้เวลา 4 ถึง 8 สัปดาห์ เพื่อให้อาการหายและแผลหาย
2. การรักษาในระยะยาว (long-term therapy) เป็นการให้ยาขนาดน้อยติดต่อกันในระยะยาว ตั้งแต่ 6 เดือนถึงหลายปี เพื่อป้องกันการเกิดใหม่ของแผล
3. การรักษาเป็นครั้งคราวเมื่อแผลกลับเป็นอีก (intermittent relapse therapy) ครั้งละ 4-8 สัปดาห์
4. การรักษาเฉพาะขณะที่มีอาการ โดยไม่ต้องให้จนครบกำหนดหรือจนแผลหาย (symptomatic หรือ on demand therapy) เช่น รักษาเพียงครั้งละ 2 สัปดาห์



รูปที่ 2 กลไกในการออกฤทธิ์ของยาลดการสร้างกรดในกระเพาะอาหาร (Altman, 1992)

Current Recommendations for Treatment of Gastroduodenal Ulcers

Active ulcer

H₂-receptor antagonists

Cimetidine 800 mg

Ranitidine or nizatidine 300 mg

Famotidine 40 mg

All administered between evening meal and bedtime

Proton-Pump Inhibitors

Omeprazole 20 mg

Lansoprazole 30 mg

Rabeprazole 20 mg

All administered daily before breakfast

Maintenance therapy

H₂-receptor antagonists

Cimetidine 400 mg

Ranitidine or nizatidine 150 mg

Famotidine 20 mg

All administered between the evening meal and bedtime

Proton-Pump Inhibitors

Omeprazole 20 mg

Lansoprazole 30 mg

Rabeprazole 20 mg

All administered daily before breakfast

Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced ulcers

Misoprostol

At least 200 μ g 3 times/day

Proton-Pump Inhibitors

Omeprazole 20 mg

Lansoprazole 30 mg

Rabeprazole 20 mg

All administered daily before breakfast

ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ (NSAIDs)

เนื่องจากยาในกลุ่ม NSAIDs มีมากมายหลายชนิด และโครงสร้างทางเคมีก็ต่างกันไป อย่างไรก็ตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของยาในกลุ่ม NSAIDs จะเหมือนกัน คือ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ฤทธิ์แก้ปวด (analgesic action) และฤทธิ์ลดไข้ (antipyretic) แต่แตกต่างกันในด้านของความแรงของยา (potency)

การแบ่งกลุ่ม NSAIDs

1. แบ่งตามสูตรโครงสร้าง

การแบ่งกลุ่มแบบนี้นำมาใช้กับ NSAIDs กลุ่มดั้งเดิมที่ใช้กันทั่วไปในการบรรเทาอาการอักเสบและรวมทั้งยาใหม่บางชนิด ซึ่ง NSAIDs เหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน แบ่งตามสูตรโครงสร้างได้ดังตารางที่ 3 (Brody et al., 1998)

2. แบ่งตามความเลือกเฉพาะในการยับยั้งเอนไซม์ COX

การแบ่งกลุ่มแบบนี้เกิดขึ้นเมื่อพบว่าเอนไซม์ COX มี 2 isoforms ที่สำคัญคือ COX-1 และ COX-2 และ NSAIDs ยับยั้ง isoforms ทั้งสองนี้ได้ต่างกัน COX-1 เป็น constitutive enzyme หรือ housekeeping enzyme ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อใช้สร้าง PGs เช่น PGI_2 ขยายหลอดเลือดและยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด PGE_2 ยับยั้งการหลั่งกรดและกระตุ้นการหลั่งไปคาร์บอนเนต TXA_2 ช่วยในการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด เป็นต้น ส่วน COX-2 เป็น inducible enzyme ถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมากได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย pro-inflammatory cytokines และ growth factors เพื่อสร้าง PGs ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอาการบวม ปวด การเกิดไข้ และควบคุมการเจริญของเซลล์ (Richardson and Emery, 1996; Jouzeau et al., 1997; Heller et al., 1998; Lipsky et al., 1998; Vane et al., 1998)

NSAIDs แบ่งตามความเลือกเฉพาะในการยับยั้ง COX ออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ (Richardson and Emery, 1996; Frolich, 1997; Jouzeau et al., 1997; Heller et al., 1998; Lipsky et al., 1998; Vane et al., 1998)

1. specific COX-1 inhibitors ออกฤทธิ์เจาะจงในการยับยั้ง COX-1 โดยไม่มีฤทธิ์ต่อ COX-2 ได้แก่ แอสไพรินขนาดต่ำๆ

2. nonspecific COX inhibitors ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง COX-1 และ COX-2 ในความเข้มข้นของยาที่ไม่ต่างกันมากนัก ได้แก่ แอสไพรินขนาดสูง, indomethacin, piroxicam, diclofenac และ ibuprofen เป็นต้น

3. preferential (selective) COX-2 inhibitors ในขนาดที่นำมาใช้ลดการอักเสบและบรรเทาปวดนั้น จะมีฤทธิ์เลือกเฉพาะในการยับยั้ง COX-2 โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง COX-1 ไม่ถึงระดับที่มีนัยสำคัญ แต่ถ้าเพิ่มขนาดให้สูงขึ้น จะเห็นผลในการยับยั้ง COX-1 ได้ ความเข้มข้นในการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสอง isoforms ในหลอดทดลองต่างกัน 2-100 เท่า อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากหลอดทดลองกับผลที่ได้ในคนนั้นแตกต่างกันได้ เนื่องจากปัจจัยทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ ด้วยเหตุนี้อาจมีการจัดยาไว้ในกลุ่ม COX nonspecific inhibitors ก่อน จนกว่าจะได้ข้อมูลทางคลินิกแน่ชัดว่าเป็น COX-2 preferential inhibitors ตัวอย่างยาที่มีฤทธิ์เลือกเฉพาะในการยับยั้ง COX-2 ได้แก่ meloxicam, nimesulide, nabumethone และ etodolac เป็นต้น

4. specific COX-2 inhibitors มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ COX-2 แม้จะเพิ่มขนาดยาที่ใช้รักษาให้สูงขึ้นก็ไม่มีนัยสำคัญทางคลินิกที่จะยับยั้ง COX-1 ค่าความเข้มข้นของยาในการยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดในหลอดทดลองมีค่าต่างกันเกินกว่า 100 เท่า ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, parecoxib และ valdecoxib เป็นต้น

กลไกการออกฤทธิ์ลดการอักเสบของ NSAIDs

NSAIDs ออกฤทธิ์ลดการอักเสบโดย ยับยั้งการสร้าง PGs ซึ่งเป็นสารสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดการอักเสบ ทฤษฎีนี้มีผู้เชื่อถือกันมากเพราะพบว่าความสามารถในการสร้าง PGs จะเป็นสัดส่วนกับความแรงของยาที่จะลดการอักเสบ จากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พบว่า NSAIDs ส่วนใหญ่จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น PGG₂ และ PGH₂ ซึ่งจะถูกลดเปลี่ยนเป็น thromboxane A₂, prostacyclin (PGI₂) และ PGE₂, PGD₂ และ PGF_{2α} (รูปที่ 3) (Laurence et al., 1997; Rang et al., 2003)

CARBOXYLIC ACIDS

Aspirin
Diflunisal
Salsalate
Choline magnesium trisalicylate
Sodium salicylate

ACETIC ACIDS

Indomethacin
Sulindac
Tolmetin
Diclofenac
Etodolac
Ketorolac

ALKANONES

Nabumetone

PROPIONIC ACIDS

Ibuprofen
Naproxen
Fenoprofen
Ketoprofen
Flurbiprofen
Oxaprozin

FENAMATES

Mefenamic acid

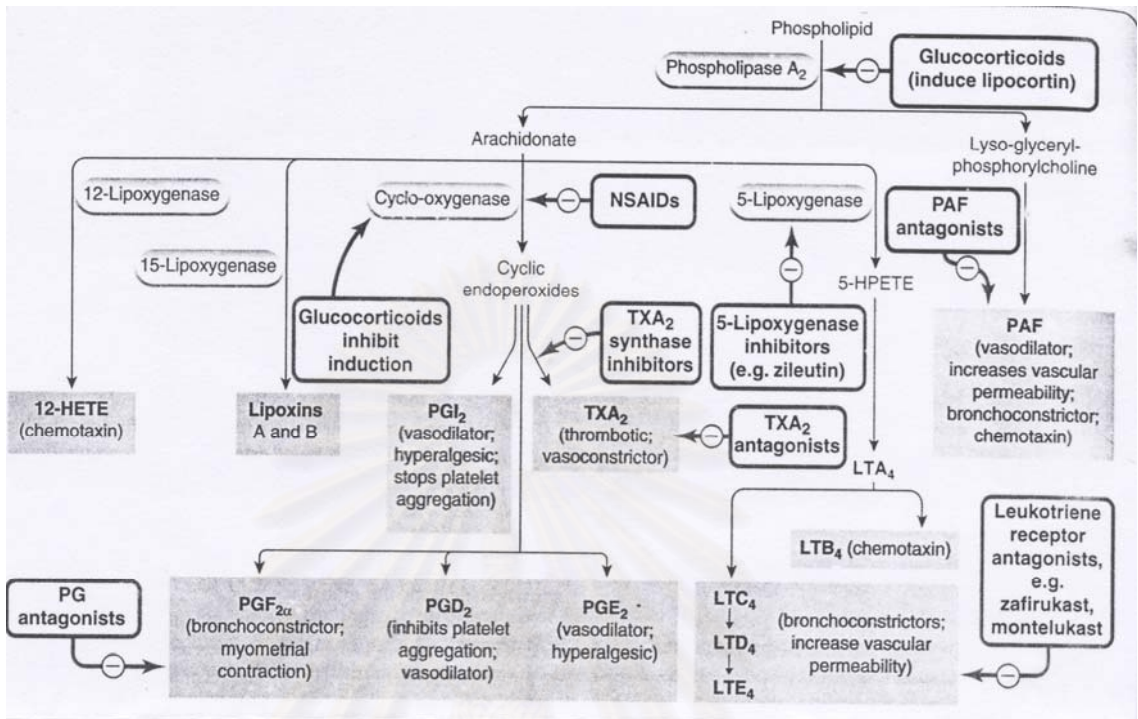
PYRAZOLONES

Phenylbutazone
Oxyphenbutazone

OXICAMS

Piroxicam

ตารางที่ 3 แสดงการแบ่งกลุ่ม NSAIDs ตามสูตรโครงสร้าง (Brody et al., 1998)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงถึงการสังเคราะห์ prostaglandins ชนิดต่างๆและตำแหน่งที่ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ออกฤทธิ์ (Rang et al., 2003)

NSAIDs และการทำให้เกิดรอยแผลในทางเดินอาหาร (NSAIDs – Induced gastroduodenal lesions)

เป็นที่ทราบกันดีว่ายาในกลุ่ม NSAIDs เป็นสาเหตุสำคัญของ PU และภาวะแทรกซ้อนของ PU โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ (Marie, 1988; John, 1990; Norman, 1990) ผู้ป่วยที่ได้รับ NSAIDs จะมีอาการและภาวะแทรกซ้อนของทางเดินอาหารส่วนบนดังนี้

-อาการปวดท้อง ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่มีอาการปวดท้อง แน่นท้อง dyspepsia คล้าย PU หลังจากได้รับ NSAIDs จะตรวจไม่พบพยาธิสภาพในทางเดินอาหาร (Edwin, 1987; Michael, 1988)

-แผลในทางเดินอาหาร เช่น

Acute mucosal injury มีลักษณะเป็นรอยแผล (erosion), submucosal petichiae ส่วนใหญ่พบบริเวณ antrum และ body ของกระเพาะอาหาร erosion เหล่านี้อาจหายไปเอง หรือเป็นสาเหตุของเลือดออกจาก lesion หรือกลายเป็น GU (Bardhan, 1993)

PU ในผู้ที่ได้รับ NSAIDs โอกาสที่จะเกิด GU และ DU มากกว่าผู้ที่ไม่ได้รับ NSAIDs ประมาณ 4-5 เท่า และ 1.2 เท่า ตามลำดับ โดยพบ GU ประมาณร้อยละ 12-30 DU ประมาณร้อยละ 2-19 (Fenn, 1994; Hollander, 1994)

Ulcer complication ภาวะซีด เลือดออกในทางเดินอาหารส่วนบน รอยแผลทะลุ (peptic perforation) มีอัตราเสี่ยงสูงขึ้น 2.7-8 เท่า (Sherine, 1991; Alberto, 1994)

กลไกที่ NSAIDs ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหาร

NSAIDs ขนาดที่ใช้กันทั่วไปในการลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase มีผลทำให้ลดการสร้าง systemic prostaglandins (PGs) จาก arachidonic acid PGs ทำหน้าที่เป็น cytoprotection สำหรับกระเพาะและลำไส้เล็กส่วนต้น ดังนั้นเมื่อขาด PGs ทำให้ mucosa เกิดอันตรายโดยกรด และ pepsin ได้ง่ายขึ้น

กลไกที่ NSAIDs ทำให้เกิดแผลนั้นมีทั้งเกี่ยวข้องกับ PGs (Prostaglandin dependent) และไม่เกี่ยวข้องกับ PGs (Prostaglandin independent) มีผลทำให้เกิดการทำลาย mucosa และยับยั้งกลไกการหายของแผล โดยแนวความคิดส่วนใหญ่ยังเชื่อว่าการเกิดแผลในทางเดินอาหาร

จากการใช้ NSAIDs นั้น เกิดจากการยับยั้งการสร้าง PGs เป็นกลไกที่สำคัญ ส่วนกลไกอื่นจะเป็นกลไกเสริม (Somasundaram et al., 1995) การเกิดแผลในทางเดินอาหารจะแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การทำอันตรายต่อเยื่อบุ (mucosal damage)

ผลจากการที่ NSAIDs ไปออกฤทธิ์ยับยั้ง COX ทำให้ PGs ถูกสร้างได้น้อยลงโดยเฉพาะที่เยื่อบุทางเดินอาหารจนไม่เพียงพอที่จะทำหน้าที่ cytoprotection ได้ ซึ่งเป็นกลไกทางด้าน Prostaglandin dependent เป็นผลให้ ลดการหลั่งเมือกและไปคาร์บอนเนต ลด mucosal blood flow และทำให้เกิด ischemia และนอกจากนี้ NSAIDs ยังแสดงฤทธิ์ในด้านที่ไม่เกี่ยวข้องกับ PGs (Prostaglandin independent) ซึ่งได้แก่

(1) การลดลงของ cyclooxygenase ทำให้ arachidonic acid เปลี่ยนเป็น leukotrienes ทาง lipooxygenase pathway leukotriene B₄ ที่เพิ่มขึ้นมีผลกระตุ้นให้ neutrophil เคลื่อนที่เข้ามาบริเวณ mucosa มากขึ้น และมีการทำลาย mucosa โดย oxygen free radical และ protease enzyme

(2) NSAIDs แสดงฤทธิ์เป็น ion trapping ออกฤทธิ์ทำลาย gastric epithelium โดยตรง โดย NSAIDs ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน ซึ่งในสภาวะแตกตัว (ionized state) จะสามารถทำลาย epithelium ได้โดยตรง (Brune et al., 1977; Fromm, 1987; Schoen and Vender; 1989; Mahmud et al., 1996; Sigthorsson et al., 2000)

(3) Uncoupling oxidative phosphorylation เป็นผลจาก NSAIDs ออกฤทธิ์ที่ mitochondrial membrane โดยตรง ซึ่ง Somasundaram และคณะ (1995) ได้อธิบายถึงผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยแสดงได้ 3 ระยะดังนี้ (รูปที่ 4) ได้แก่ Stage 1, Transitional stage และ Stage 2 โดย Stage 1 คือ มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายใน enterocyte (biochemical) โดย NSAIDs ทำให้เกิด uncoupling ของกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียและ/หรือมีผลยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ส่งผลให้ ปริมาณ adenosine triphosphate (ATP) ลดลง มีการเคลื่อนที่ของ Ca²⁺ ออกนอกไมโทคอนเดรีย ผลที่ตามมาคือ ปริมาณ Ca²⁺ ใน cytosol เพิ่มขึ้น มีการทำลายไมโทคอนเดรียและมีการเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen species มีการรบกวนระบบ Na⁺/K⁺ ratio และ cellular osmotic balance มีการสูญเสียการควบคุมของ tight junction (intracellular junctions) ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ intestinal permeability การที่ NSAIDs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง biochemical ต่อ enterocyte ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ intestinal permeability เรียกขั้นตอนนี้ว่า Transitional stage Stage 2 คือ Non-specific tissue reaction

เกิดการทำลายเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร เนื่องจาก mucosal สามารถสัมผัสกับ luminal aggressive factors เช่น กรด pepsin น้ำดี H.pyroli เป็นต้น

2. ยับยั้งการหายของแผล และ adaptation

NSAIDs ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณขอบของแผล นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า mucosa เกิดการปรับตัวให้ต้านทานต่อ luminal aggressive factors ต่างๆได้มากขึ้น ปรากฏการณ์นี้จะถูกยับยั้งเมื่อขนาดของ NSAIDs เพิ่มมากขึ้น

มีสารหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล และป้องกันการทำลายของชั้น mucosa เช่น EGF, TGF- α , bFGF ซึ่ง NSAIDs มีผลยับยั้ง bFGF ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผลโดยตรง

การรักษาและป้องกัน

การรักษาการเกิดแผลในทางเดินอาหารจากการใช้ NSAIDs ขึ้นตอนหลักในการรักษาควรหยุดการใช้ยา NSAIDs หรือควรลดขนาดการใช้ยา NSAIDs แล้วทำการตรวจหาว่าพบเชื้อ H.pyroli หรือไม่ ถ้าพบเชื้อดังกล่าวก็ทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Andrew, 1996) แต่หากจำเป็นต้องใช้ NSAIDs ต่อ ต้องทำการรักษาโดยให้ยารักษาโรคแผลทางเดินอาหาร ซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน แต่ยาดังกล่าวก็ไม่สามารถรักษาแผลในทางเดินอาหารที่เกิดจาก NSAIDs ได้ทุกชนิด (Andrew, 1996)

การใช้ยาป้องกัน NSAIDs induced gastrointestinal ulcer ไม่เป็นข้อบ่งชี้ในผู้ป่วยที่ใช้ NSAIDs ทุกคน แต่จะเหมาะสมในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงสูง (Graham, 1989) จึงได้มีการศึกษามากมาย เพื่อทำการยืนยันว่ายาชนิดใดที่สามารถรักษาและป้องกันพยาธิสภาพดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ยาต้านฤทธิ์ฮิสตามีนที่ตัวรับฮิสตามีน 2 (H₂-receptor antagonists, H₂RA)

ยาในกลุ่มนี้สามารถใช้ป้องกัน NSAIDs-induced duodenal ulcer และบรรเทาอาการ dyspepsia, heartburn ที่เกิดจากการใช้ NSAIDs แต่ไม่สามารถป้องกัน NSAIDs-induced gastric ulcer ได้ (Chan and Leung, 2002; Bennett and Brown, 2003)

2. ยายับยั้งการทำงานของ proton pump (Proton pump inhibitors, PPIs)

ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ omeprazole, lansoprazole, rabeprazole ซึ่งการใช้ยาในกลุ่มนี้ในขนาด 2 เท่าสามารถที่จะป้องกันและรักษาการเกิดแผลในกระเพาะและลำไส้เล็กส่วนต้น จากการ ใช้ NSAIDs ได้ (Chan and Leung, 2002)

3. Cytoprotective drug

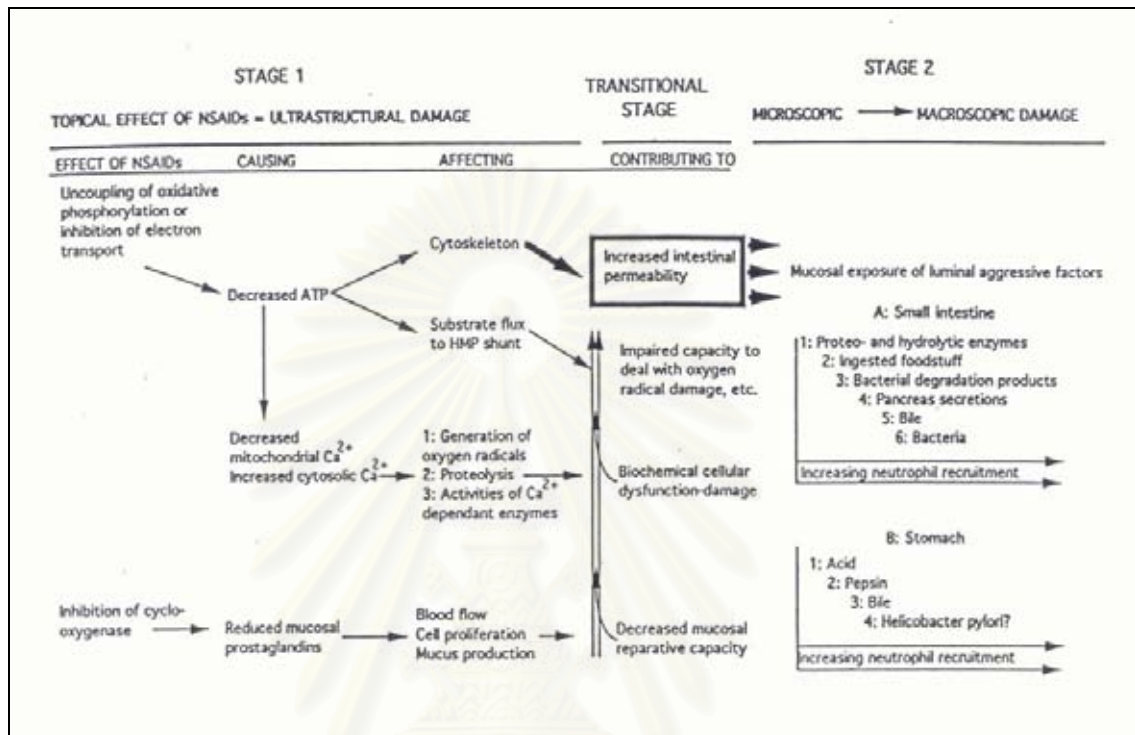
Sucralfate

ในผู้ป่วยที่มีการใช้ยา aspirin ในขนาด 3.6 g ต่อวัน การให้ sucralfate 1 g ก่อนอาหารวันละ 4 ครั้ง พบว่าสามารถป้องกัน aspirin induced mucosal injury ได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งยืนยันได้จาก การส่องกล้อง(endoscopy) (McEvoy, 2000)

4. Prostaglandin analog

Misoprostol

มีรายงานมากมายที่สนับสนุนว่า misoprostol สามารถรักษา NSAIDs-induced gastrointestinal ulcer ในผู้ป่วย rheumatoid arthritis ที่ยังได้รับยา NSAIDs ต่อเนื่องได้ (Chey and Scheiman, 2003; Rang et al., 2003) โดยขนาดการใช้จะให้ขนาด 800 μg โดยแบ่งให้วันละ 2-4 ครั้ง (Chan and Leung, 2002; Bennett and Brown, 2003) ปัญหาที่พบสำหรับการใช้ยานี้คือ ท้องเสีย และมีอาการปวดท้องเกร็ง



รูปที่ 4 แสดงกลไกที่ NSAIDs เหนี่ยวนำไปให้เกิดแผลในทางเดินอาหาร

(Somasundaram et al., 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็น organelle ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในการสร้าง ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็น high energy compound มีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆหลายอย่างที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle หรือ citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Avers, 1986; Voet et al., 1999; Hodgson and Smart, 2001; Garrett and Grisham, 2002)

ไมโทคอนเดรียมีโครงสร้างประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ช่องว่างระหว่างผนังชั้นนอกและผนังชั้นในเรียกว่า intermembrane space ผนังของไมโทคอนเดรียชั้นในจะหุ้มห่อส่วนของของเหลวมีลักษณะคล้ายเจล หรือ semi-fluid เรียกว่า matrix (รูปที่ 5) ซึ่งจะมีระบบเอนไซม์ต่างๆที่สำคัญ คือ citric acid cycle ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียจะมีระบบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ ATP คือ respiratory chain enzyme หรือ electron transport chain ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 complex ดังนี้ (Hatefi, 1985; Lehninger et al., 2000; Wallace and Starkov, 2000)

Complex I หรือ NADH dehydrogenase complex : ubiquinone oxidoreductase ซึ่งจะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH ไปยัง ubiquinone, ferricyanide และ NAD^+

Complex II หรือ Succinate dehydrogenase complex : ubiquinone oxidoreductase ซึ่งจะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก succinate ไปยัง ubiquinone

Complex III หรือ Cytochrome bc_1 complex : cytochrome c oxidoreductase ซึ่งจะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง cytochrome c

Complex IV หรือ Cytochrome Oxidase complex หรือ Ferrocycytochrome c : oxygen oxidoreductase จะ catalyze การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลออกซิเจน

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนใน electron transport chain จาก NADH หรือ FADH_2 ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylate ของ ADP กระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นเรียกว่า กระบวนการออกซิเดทีฟ

พอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ใน respiratory chain จะมีอยู่ 3 ตำแหน่งที่การปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP คือ complex I, III และ IV ซึ่งตรงกับ site I, site II และ site III ตามลำดับ (รูปที่ 6)

จากความสำคัญของไมโทคอนเดรียซึ่งทำหน้าที่สร้างพลังงานให้กับเซลล์นั้น สารใดก็ตามที่รบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ก็จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ได้

จากคุณสมบัติของผนังด้านในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารที่ผ่านเข้าออก โดยจะไม่ปล่อยให้ H^+ หรืออิออนรวมทั้งสารเมตาโบไลต์ต่างๆผ่านได้อย่างอิสระ แต่จะต้องอาศัยตัวพาเฉพาะ (specific membrane protein carrier) ดังนั้นจากคุณสมบัติของตัวพาเฉพาะและการมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังด้านใน จึงมีความสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นผนังเมมเบรนด้านในจึงเป็นเป้าหมายของการเกิดพิษต่อไมโทคอนเดรียซึ่งสารเคมีหรือสารพิษสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรีย อาจโดยการเพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออก (permeability) ของผนังเมมเบรนด้านใน หรือโดยการยับยั้งการขนส่งของตัวพาเฉพาะก็ได้ อย่างไรก็ตามการเกิดพิษส่วนใหญ่จะเกิดโดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของการเป็นเยื่อเลือกผ่านของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะมีผลทำให้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้ในรูปของ electrochemical proton gradient ($\Delta\mu_{H^+}$) ถูกนำมาใช้ในการสร้างและปล่อยออกมาในรูปพลังงานความร้อน ดังนั้นไมโทคอนเดรียจึงสูญเสียพลังงานที่ได้จากการเมตาโบไลต์สาร (Wallace and Starkov, 2000)

นอกจากสารพิษต่างๆจะก่อให้เกิดพิษในลักษณะที่กล่าวมาแล้ว ยังมีสารอีกหลายประเภทที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียเช่นกัน (รูปที่ 7) ซึ่งสามารถแบ่งสารที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ได้เป็น 3 ประเภทใหญ่คือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Electron transport chain inhibitors) (Wallace and Starkov, 2000; Hodgson and Smart, 2001)

1.1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q complex I (site I) จัดเป็นส่วนแรกของ mitochondrial respiratory chain เป็นเอนไซม์ที่อ่อนแอที่สุดของ respiratory chain complex ที่จะถูกทำให้เสียหายที่โดยสารเคมี มีสารเคมีมากกว่า 60 ชนิด ซึ่งเป็นทั้งสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ยับยั้งการทำงานของ complex I ตัวอย่างของสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I เช่น rotenone, rhein แม้ว่า complex I

จะมีอยู่ในไมโทคอนเดรียและ eukaryotic organisms ต่างๆก็ตาม แต่โครงสร้างของเอนไซม์และความไวต่อสารที่ยับยั้ง (inhibitor) ก็ไม่เหมือนกันในแต่ละ species โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียจากแมลงและปลาจะไวต่อการยับยั้งที่ complex I มากที่สุด ในขณะที่ไมโทคอนเดรียจากพืชและรามักจะไม่ค่อยไว ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่าไมโทคอนเดรียจากเซลล์ประสาทไวต่อสารที่ยับยั้งมากที่สุด

- 1.2 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex III (site II) คือสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c ความไวของ complex III ของสิ่งมีชีวิต species ต่างๆต่อสารเคมีจะต่างกัน ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ myxothiazol (จากเชื้อ myxobacterium *Myxococcus fulvus*), antibiotic antimycin A, funiculosin, zinc ion เป็นต้น
- 1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex IV (site III) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยัง ออกซิเจน ถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนได้แล้ว ยังไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ด้วย ไม่ว่าจะใช้ substrate ใดก็ตาม ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ cyanide, azide, sulfide

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP ซึ่งได้แก่

- 2.1 oligomycin และ dicyclohexycarbodiimide (DCCD) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยไปยับยั้งที่ F_0 ของเอนไซม์ ATPsynthase ทำให้ไม่สามารถส่งผ่าน H^+ จาก F_0 ไปยัง F_1 ได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation รวมทั้งการใช้ ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ เมื่อไมโทคอนเดรียอยู่ในสภาวะ uncoupling (Senior, 1973; Voet, 1999)
- 2.2 atractyloside จะยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพา ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรียผ่านทางผนังชั้นใน ทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger et al., 2000)
- 2.3 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)

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

3. สารจำพวก uncouplers

สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+ carrier หรือ proton-ionophores คือ สามารถพา H^+ ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้อย่างอิสระ จึงทำลาย electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการไหลของอิเล็กตรอนไปตาม respiratory chain ดังนั้นจึงมีผลทำให้พลังงานไม่เปลี่ยนรูปเป็น ATP โดยไม่มีผลต่อการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีการสร้าง ATP (Erecinska and Wilson, 1981; Wallace and Starkov, 2000)

Uncouplers สามารถแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆตามกลไกการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

3.1 Classical uncouplers สารในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid กล่าวคือ เป็นสารที่สามารถละลายได้ในไขมัน สามารถแตกตัวให้ประจุได้ และสามารถที่จะจับและปล่อย H^+ ได้ แบ่งออกได้เป็น

3.1.1 สารที่มีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid (HA) สามารถผ่านเข้าไปยังชั้นไขมันของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียแล้วแตกตัวให้ H^+ และ A^- ตัวอย่างสารที่มีกลไกแบบนี้ เช่น FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) และ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)

3.1.2 สารที่สามารถผ่านผนังของไมโทคอนเดรียในรูปของ HA_2 dimer ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถแตกตัวให้ H^+ (HA) และ anionic (A^-) ได้แก่ 2,4-dinitrophenol (DNP) และสารที่มีหมู่ phenol, สารในกลุ่ม benzimidazoles

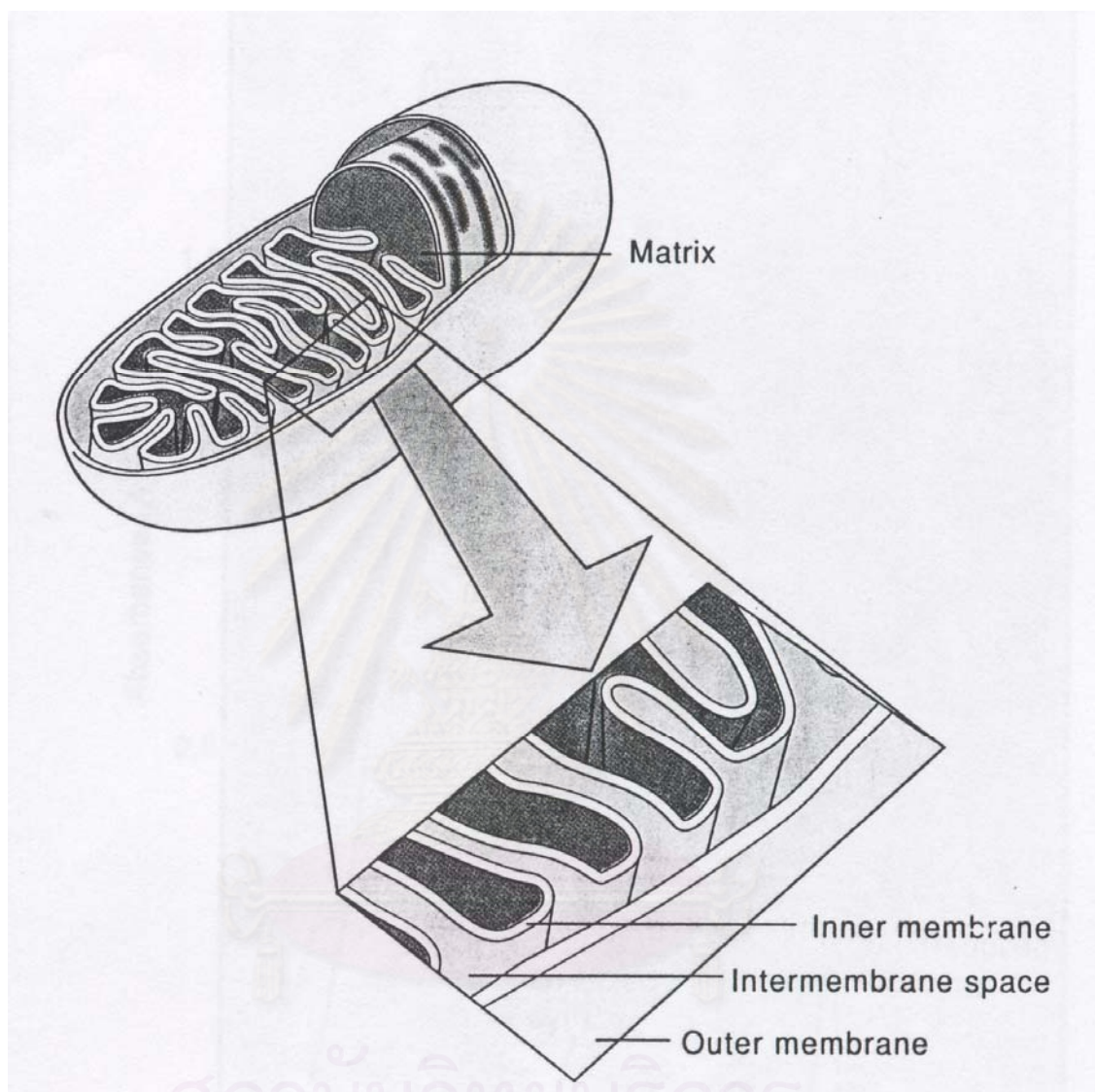
3.2 Ionophores คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ คือ เพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออกของ H^+ และ cation เช่น K^+ ดังนั้นพลังงานที่ได้จาก $\Delta\mu_{H^+}$ จึงถูกนำมาใช้ในการผลักดัน cation เข้าสู่เมตริกซ์แทน แบ่งออกได้เป็น

3.2.1 Channel type : โดยการเกิดช่อง (channel) ที่บริเวณชั้นไขมันของผนังไมโทคอนเดรีย ทำให้ ions เช่น H^+ และ K^+ สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้ เช่น gramicidins

- 3.2.2 Carrier type : โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายในไขมันกับ ion (lipid-soluble complex) เคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย เช่น valinomycin, nigericin, calcimycin
- 3.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้กลไกต่างๆกัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 ATPase)แล้วทำให้เกิด uncoupling, Arsenic กับ cadmium จะจับกับ sulhydryl groups เป็นต้น

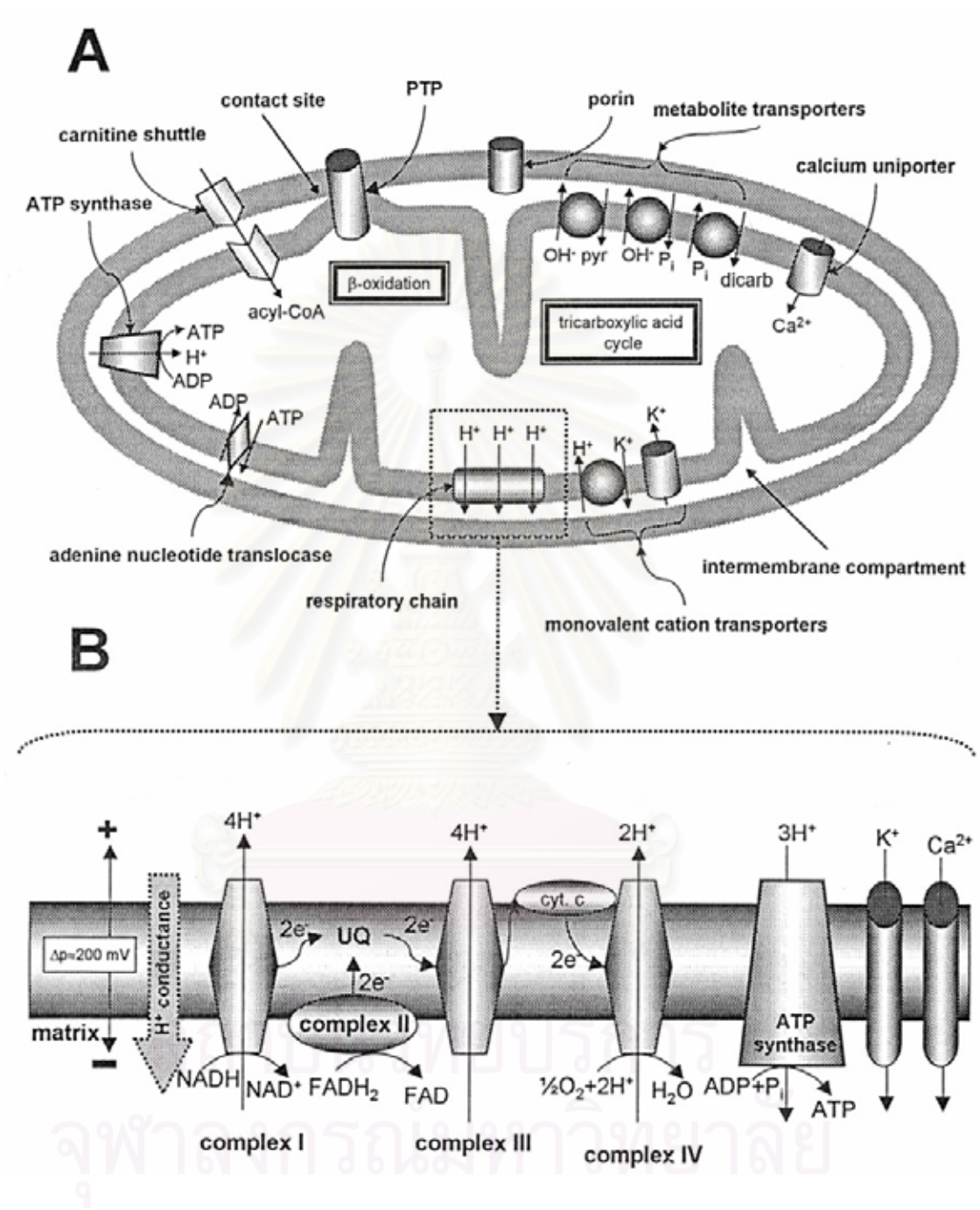


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ภาพแสดงโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Zubay, 1993)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของไมโทคอนเดรียโดยรวม (A) และแสดง respiratory chain (B)

(Szewczyk and wojtczak, 2002)

ผลของ NSAIDs ต่อไมโทคอนเดรีย

NSAIDs เช่น aspirin, ibuprofen เป็นกลุ่มยาที่มีการสั่งใช้อย่างมากมาย โดยเฉพาะการใช้ NSAIDs ในการลดการอักเสบในผู้ป่วยโรค arthritis (Steinmeyer, 2000) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของ NSAIDs คือ ยับยั้ง COX ส่งผลให้การสังเคราะห์ PGs ลดลง (Kam and See, 2000) อาการแทรกซ้อนที่เกิดจากการใช้ NSAIDs ที่สำคัญคือ แผลในทางเดินอาหาร ซึ่งกลไกที่ NSAIDs ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหารนั้น ประกอบด้วยหลายขั้นตอน (multistage process) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายไมโทคอนเดรียและการยับยั้ง COX และส่งผลให้เกิดแผลอักเสบ (inflammatory tissue reaction) (Somasundaram et al., 1997, 2000; Davies et al., 2000)

จากการศึกษาผลของ NSAIDs ต่อไมโทคอนเดรีย พบว่า NSAIDs ทำให้เกิด uncoupling oxidative phosphorylation เพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียในสถานะพัก (resting state) ลดการสร้าง ATP ยับยั้ง adenine nucleotide translocase (ANT) และสลาย mitochondrial transmembrane potential (Mahmud et al., 1996; Mingatto et al., 1996; Petrescu and Tarba, 1997; Tomada et al., 1998; Masubuchi et al., 1999; Moreno-Sanchez et al., 1999; Mingatto et al., 2000)

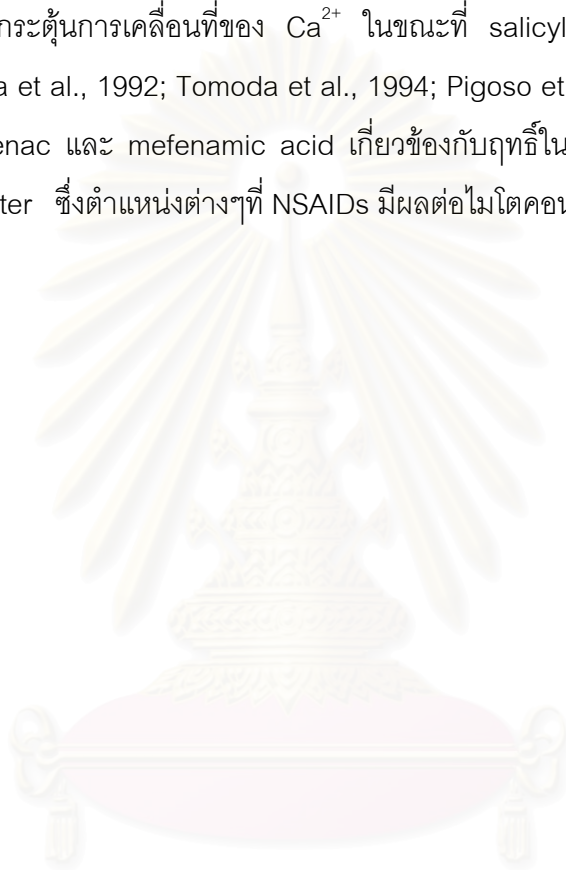
ซึ่ง Boelsterli (2003) ได้อธิบายกลไกการเกิด uncoupling ของ diclofenac ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย สรุปได้ดังนี้ คือ diclofenac มีผลทำให้เกิด uncoupling ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย ได้อย่างน้อย 3 กลไกได้แก่ (รูปที่ 8)

1. มีผลโดยตรงต่อผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย diclofenac มีคุณสมบัติเป็น lipophilic ซึ่งมีความเข้มข้นสูง จะเคลื่อนที่แทรกเข้าไปยังชั้นไขมันของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย เป็นสาเหตุให้โปรตอนไหลกลับเข้าไปใน matrix

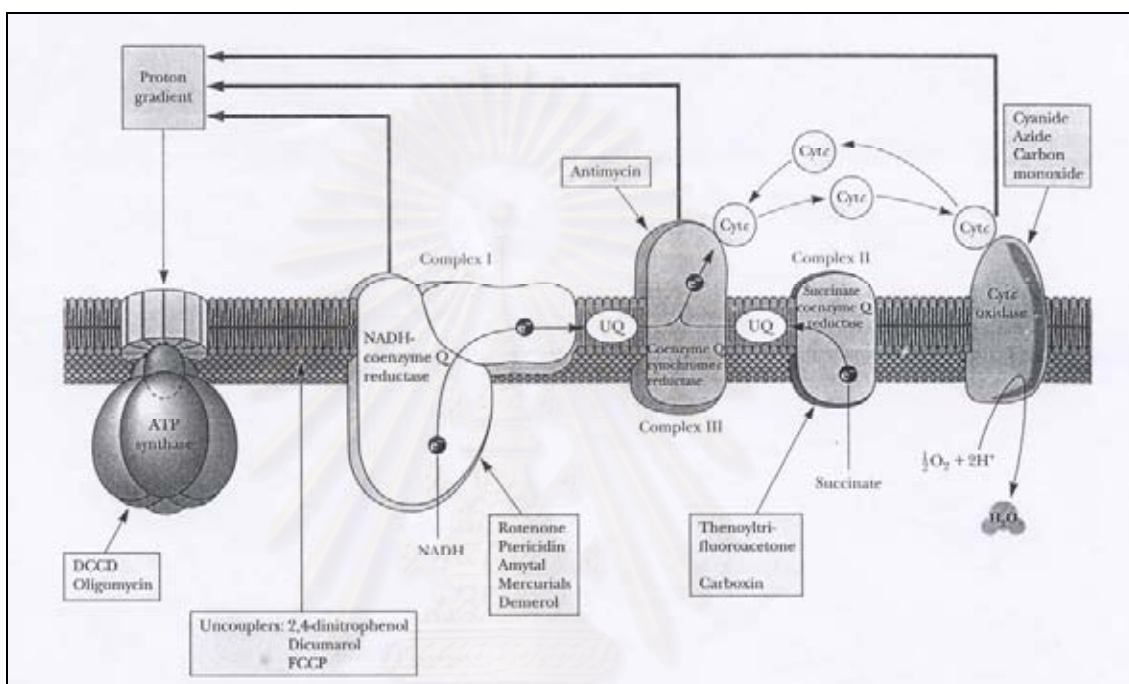
2. เกิด uncoupling ของกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยเกิด proton shuttling diclofenac มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน สามารถแสดงคุณสมบัติเป็น protonophoretic คือสามารถจับกับโปรตอน แล้วพาผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียเข้าสู่ matrix ได้

3. เปิด mitochondrial membrane permeability transition (MPT) pore ทำให้โปรตอนเคลื่อนที่กลับเข้ามาใน matrix และเกิดการสลายตัวของ mitochondrial inner transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) และส่งผลให้เกิด oxidative stress ในเซลล์ และมีการเคลื่อนที่ออกของ cytochrome c (cyt c) จาก inter-membrane space ไปยัง cytosol

กลไกการเกิดฤทธิ์ uncoupling ของ NSAIDs เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของ mitochondrial permeability transition pore (PTP) (Szewczyk and Wojtczak, 2002) โดย Al-Nasser (1999) ทำการศึกษาฤทธิ์ ibuprofen ต่อไมโทคอนเดรีย พบว่า ibuprofen มีฤทธิ์กระตุ้น PTP และผลการศึกษาฤทธิ์ uncoupling ของ NSAIDs ชนิดอื่นๆ เช่น nimesulide มีฤทธิ์กระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่เข้าของ Ca^{2+} และกระตุ้น PTP (Mingatto et al., 2000) ibuprofen มีผลเล็กน้อยต่อ PTP และไม่มีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} ในขณะที่ salicylic acid แสดงฤทธิ์เป็น poor inducer (Yoshida et al., 1992; Tomoda et al., 1994; Pigoso et al., 1998) Pigoso (1998) ได้อธิบายว่า diclofenac และ mefenamic acid เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการกระตุ้น PTP ร่วมกับฤทธิ์ที่ Ca^{2+}/nH^+ antiporter ซึ่งตำแหน่งต่างๆที่ NSAIDs มีผลต่อไมโทคอนเดรียแสดงในรูปที่ 9



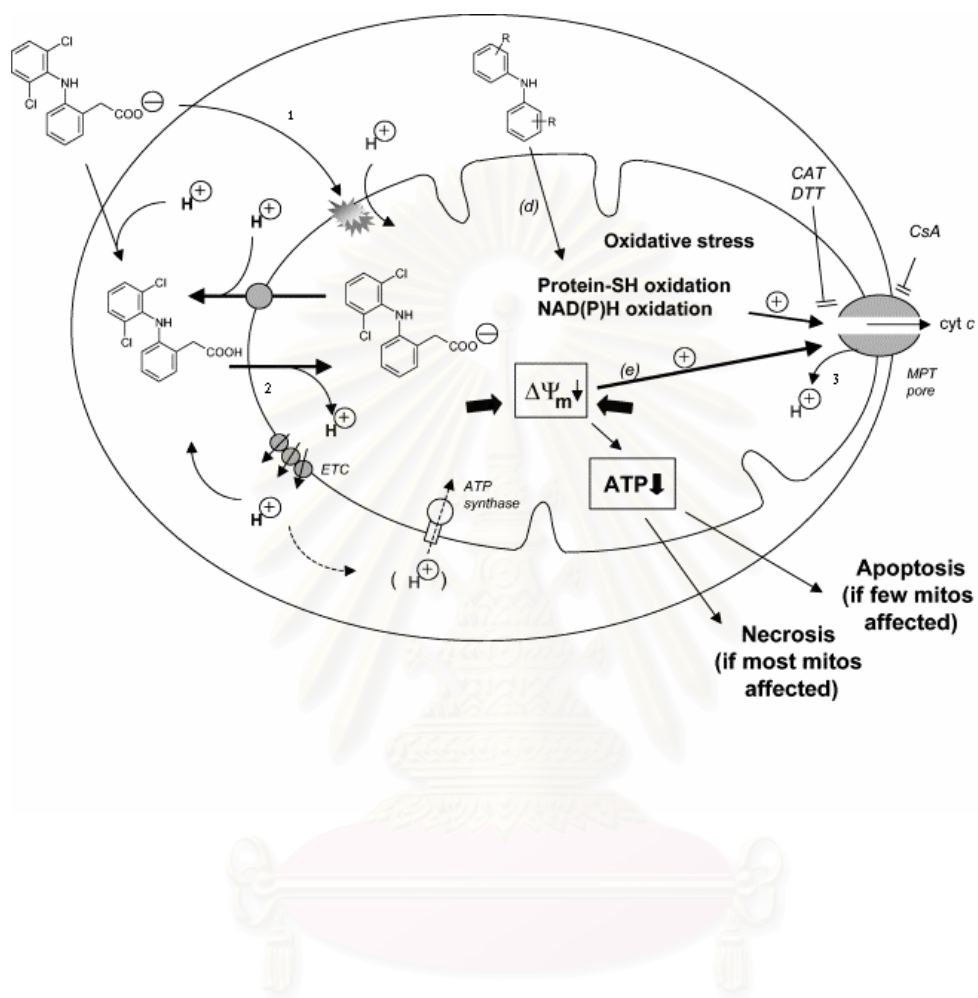
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งสารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

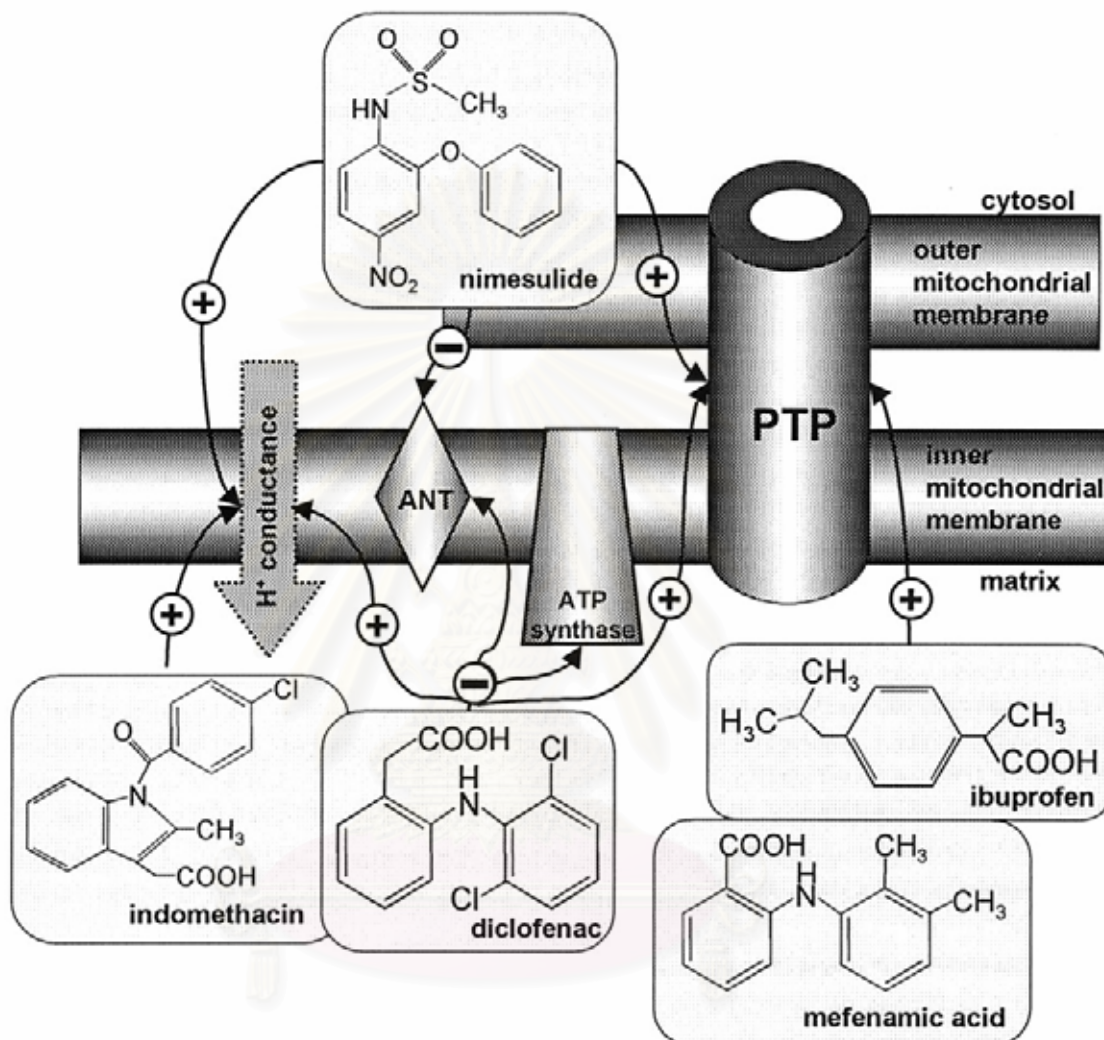
(Garret and Grisham, 2002)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แสดงกลไกการเกิดอันคัปปลิงของ diclofenac ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย

(Boelsterli, 2003)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งที่ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์มีผลต่อไมโทคอนเดรีย

(Szewczyk and Wojtczak, 2002)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

2. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียมสารเคมีที่จะใช้ตัวทำละลายเป็น ultrapure water ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย อนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ที่ใช้ในการวิจัยละลายใน DMSO ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.1 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

สารสังเคราะห์อนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์

สารสังเคราะห์ CU18-07, CU18-09, CU18-10, CU18-13, CU18-14, CU18-15 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ได้แก่ indomethacin และ piroxicam จากบริษัท T.O.chemical, nimesulide จากบริษัท Sigma chemical

Proton pump inhibitor ได้แก่ omeprazole จากบริษัท Sigma chemical

Antimicrobial drug ได้แก่ metronidazole ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทสยามเภสัช จำกัด

สารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical

ADP, ATP, ammonium molybdate, copper sulfate (CuSO_4), DMSO, EGTA, Folin&Ciocalteu's phenol reagent, L-glutamic acid, malic acid, HEPES, dipotassium

hydrogen phosphate, magnesium chloride, potassium chloride, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, sodium sulfite, sodium bisulfite, succinic acid, sucrose, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, trichloroacetic acid

สารเคมีจากบริษัท E. Merck, Darmstadt

Sodium carbonate, sulfuric acid, hydrochloric acid, potassium hydroxide, absolute ethanol

2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ปริมาตร 10 μ l, 1 M succinate (Ph 7.2) ปริมาตร 10 μ l, 0.31 M ADP + 0.62 M Pi ปริมาตร 2 μ l, 0.05 M DNP ปริมาตร 2 μ l, 0.1 M ATP (pH 7.2) ปริมาตร 150 μ l, bovine serum albumin (BSA) 250 mg/ml, 0.25 M sucrose, 1 M HEPES buffer, 1 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl, 0.025 M และ 0.05 M potassium phosphate (KH_2PO_4), 0.2 M H_2SO_4 ปริมาตร 10 μ l, 15%w/v trichloroacetic acid

ความเข้มข้นที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่

- CU18-07, CU18-09, CU18-10, CU18-13, CU18-14, CU18-15

ความเข้มข้น 0.5 , 5, 50, 100, 200, 500 μ g/10 μ l

- indomethacin, piroxicam, nimesulide ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM
- omeprazole, metronidazole ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200, 400 μ g/10 μ l

3.เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. Heidolph Motor Drive Homogenizer type 50203 RZR2
2. pH-meter
3. Hitachi Refrigerated High Speed Centrifuge Model CR20B3
4. Oxygraph

Gilson's Recorder

YSI Model 53 Oxygen Monitor

Gilson's Oxygen chamber

Clark's Oxygen Electrode

5. UV / Visible spectrophotometer 4050 (LKB Ultrospec II)
6. Temperature Controlled Circulator Water bath
7. Thomas Glass homogenizer with Teflon pestle
8. Autometric pipette
9. Hamilton microsyringe 5 μ l, 25 μ l

4. การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธี Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย การเตรียมและปฏิบัติการนั้นตับและไมโทคอนเดรียควรจะแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice cold) ทำการปั่นแยกไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาวโดย refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมได้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียมไมโทคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรีย จาก liver homogenate

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ทำหนูให้ตายทันที โดยวิธี decapitation ทำการผ่าตัดหน้าท้อง ตัดตับออกมาอย่างรวดเร็ว แล้วล้างทันทีด้วยสารละลาย homogenizing medium ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose (pH 7.2) ที่เย็นจัด นำมาล้างหลายๆครั้ง แช่ตับใน homogenizing medium ปริมาตรประมาณ 60-70 ml ใช้กรรไกรตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างเลือดอีกครั้งโดยใช้สารละลายเดิม เทใส่หลอด homogenize ที่เย็นจัด โดยหลอดที่บรรจุตับจะต้องอยู่ในภาชนะแช่ในน้ำแข็ง นำไป homogenize ด้วย Heidolph Motor Drive Homogenizer จนกระทั่งได้ liver homogenate โดยมีปริมาตร 60-80 ml นำมาเทใส่หลอด centrifuge

ขั้นตอน 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้นำมาปั่นแยก (centrifuge) เพื่อให้ได้ไมโทคอนเดรียโดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge ใช้ rotor model RPR 18-3 โดยทำการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ (รูปที่ 10)

ครั้งที่ 1 นำ liver homogenate มาปั่นแยกที่ $600 \times g$ (2500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifuge สำหรับส่วนที่เป็น pellets ให้ทิ้งไป

หมายเหตุ : ส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้คือ mitochondria, microsome

ส่วนที่เป็น pellets จะประกอบด้วย nuclei, red blood cells, cell wall, unruptured cells

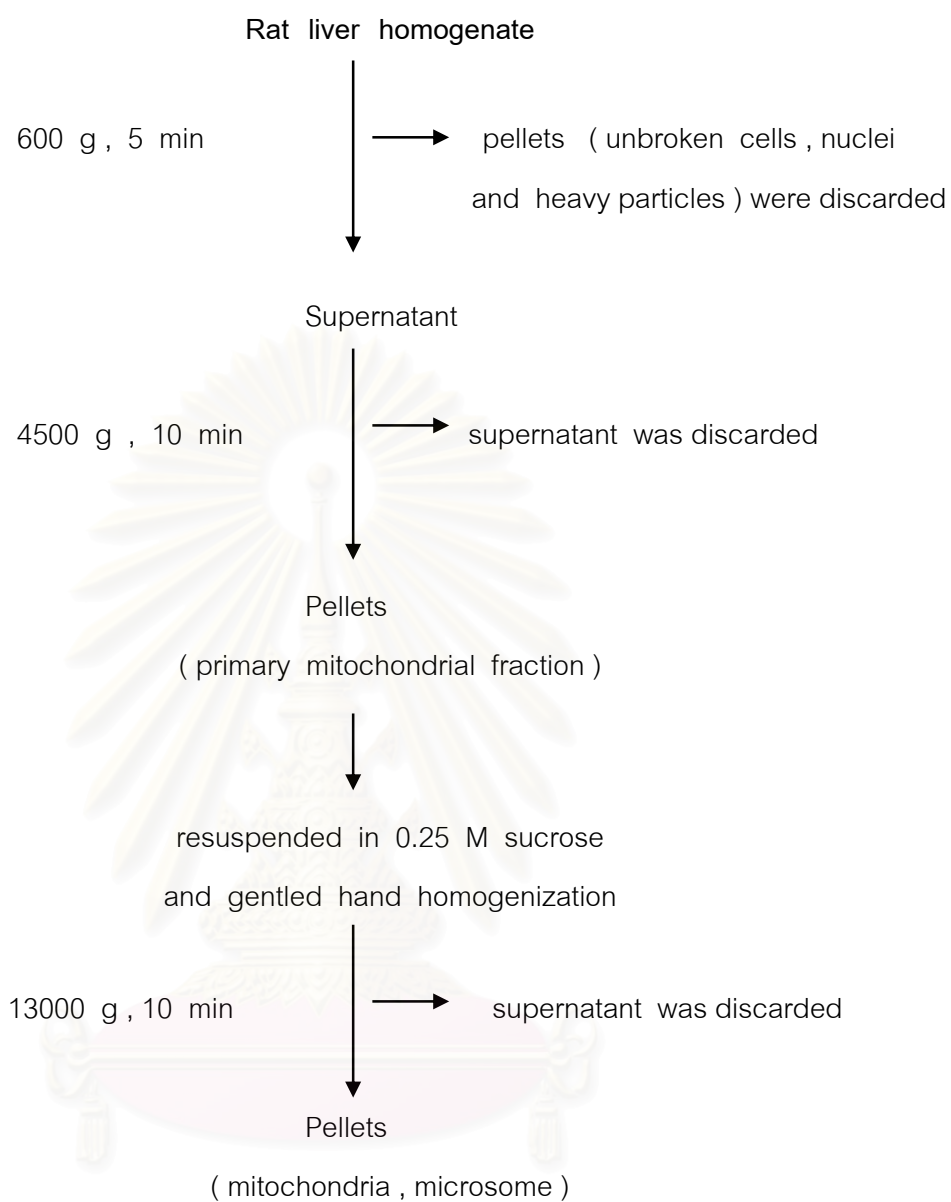
ครั้งที่ 2 นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นแยกต่อที่ $4500 \times g$ (7000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้แยก supernatant ทิ้งไป เอาเฉพาะส่วน pellets มา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำการ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้ตะกอนกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่ 3 นำมาปั่นแยกต่อที่ $13000 \times g$ (8000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินส่วน supernatant ทิ้งไป ส่วนของ pellets นั้นจะมีลักษณะเป็นชั้นของไมโครโซมสีชมพูอยู่ชั้นบน ให้กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ที่แช่เย็นใส่ลงไปเล็กน้อย แล้วค่อยๆ เทออกด้วยความระมัดระวัง ทำซ้ำจนกระทั่งชั้นของไมโครโซมเหลือน้อยที่สุด จากนั้นทำการ resuspend ตะกอนไมโทคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose แช่เย็นในภาคน้ำแข็งเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

5.การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

Incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับศึกษาอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียและการศึกษา ATPase activity ประกอบด้วย

HEPES buffer, pH 7.2	40 mM (60 mOsm)
MgCl ₂	2 mM (6 mOsm)
KCl	92 mM (184 mOsm)

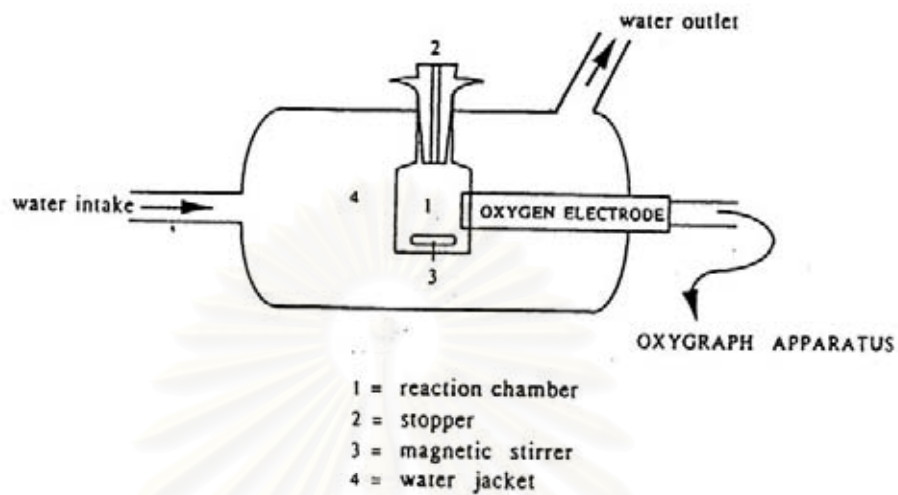


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifuge (Hogeboom, 1955 ; Myers and Slater, 1957 ; Sordahl et al., 1971)

6. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson's reaction chamber (รูปที่ 11) ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูสำหรับเติมสารต่างๆลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนได้ โดยใช้ Clark's oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดได้โดย oxygen electrode นี้ จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งจะมีหน้าปัทม์บอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ สามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson's recorder บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจน (polarographic tracing หรือ oxygraph tracing) นอกจากนี้ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่างๆใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิใน reaction chamber ให้คงที่ที่ 37 °C



รูปที่ 11 แสดง Gilson's Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของ
 ไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน
 reaction chamber แล้วอ่านบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

การแบ่งสภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria respiratory state)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของ mitochondria มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน, สับสเตรท, ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่มี เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งสภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย ตามองค์ประกอบสำคัญ ดังนี้

State	condition
1	มีเพียง O ₂
2	มี O ₂ และ ADP
3 (active state)	มี O ₂ , ADP และ substrate
3u	มี uncoupler
4 (resting state)	มี O ₂ และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca ²⁺

7.การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ(Respiratory Control Index, RCI) และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียระยะต่าง ๆ

7.1การคำนวณดัชนีควบคุมหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งภาวะ (state) การหายใจของไมโทคอนเดรียเป็นภาวะต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phosphorylation ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned}
 \text{RCI} &= \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state4}} \\
 &= \frac{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state3}}{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state4}}
 \end{aligned}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 12 การหาความชันของ tracing ใน state3 และ state4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้งสอง state ยาวเท่ากันดังนี้

$$RCI = \frac{Y1/X}{Y2/X} = \frac{Y1}{Y2}$$

7.2 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 13 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state3} = \frac{R \times S}{P} \quad \text{n atoms O/ml}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และคุณสมบัติของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตรของ reaction mixture มาก ออกซิเจนก็ละลายอิมตัวอยู่ได้มาก และถ้าคุณสมบัติต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีคุณสมบัติสูง

การคำนวณค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation mixture 1 ml (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture ทั้งหมด สามารถหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation medium 1 ml

หาได้จากสมการ

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

เมื่อ $A =$ จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml
 $S =$ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 nm แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 nm) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37°C
 $P =$ สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศเท่ากับ 21%
 $N =$ จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจนเท่ากับ 2
 $V =$ ปริมาตรก๊าซที่ 0°C ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมลมีค่าเท่ากับ 22,400 ml
 เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ 37°C มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามสมการข้างต้น จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms/min/mg protein

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน n atoms O/ml/min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 13 เช่นกัน

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

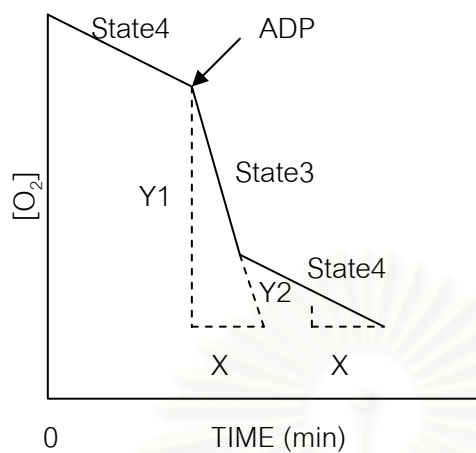
โดยที่ $R =$ ความสูงของเส้น R ในรูป

$P =$ ความสูงของเส้น P ในรูป

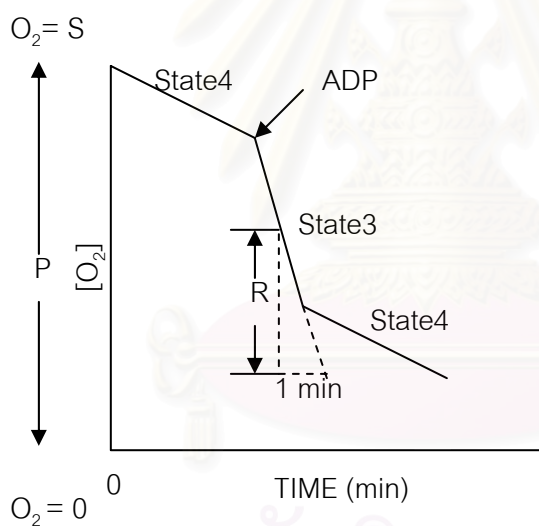
$A =$ จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัว อยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆของ oxygraph tracing ก็สามารรถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน



รูปที่ 12 ตัวอย่าง oxygraph tracing
เพื่อแสดงวิธีการหา RCI

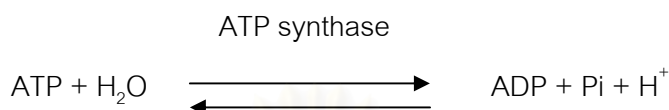


รูปที่ 13 ตัวอย่าง oxygraph tracing
เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจน
ของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

การศึกษา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียในการวิจัยครั้งนี้จะทำโดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ดังสมการ



ดังนั้นการศึกษา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

วิธีที่ 1 โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina and Slater, 1975)

วิธีที่ 2 โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลาย ATP โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆที่ต้องการศึกษา ใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ทำการหยุดปฏิกิริยาทันที โดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่น้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆครอบคลุมค่าของตัวอย่าง

วิธีการวัดเพื่อหา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml. ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ ที่ 37°C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยหมุนวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันตลอดเวลา

2. เติม mitochondria suspension 200 μ l
3. เติมสารละลายของสารที่ต้องการศึกษาแล้วปล่อยให้ทิ้งไว้ 1 นาที (control เติม solvent ที่ใช้ละลายสารที่ต้องการศึกษาในปริมาตรที่เท่ากัน)
4. เติม 0.1 M ATP ปริมาตร 150 μ l แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาที ทำการดูด reaction mixture ปริมาตร 1 ml. แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20%w/v ของ trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant 1 ml. (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml. ของ K_2HPO_4 ที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม 2.5%w/v ammonium molybdate 0.8 ml.
9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างจะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ :

- 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 g

- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ที่ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน

9. การหาความเข้มข้นโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ปริมาณของไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondria suspension ที่เตรียมจากตับหนูขาวใช้วิธีการวัดเป็นความเข้มข้นโปรตีนใช้วิธีของ Lowry (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาความเข้มข้นโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ CuSO_4 ในสารละลายต่าง ๆ จะเกิดเป็น co-ordinate complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของตัวอย่าง เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondria suspension 10 μl ด้วยน้ำกลั่น 3 ml. (1:300) จะได้สารละลาย A
2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml. ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reducing agent 1 ml. (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml. ส่วนกรณีที่ทำกราฟมาตรฐานจะใช้ 1 ml. ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1: 10) ปริมาตร 3 ml. เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน จะได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโทคอนเดรียมีหน่วยเป็น mg/ml

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- Alkaline copper reducing agent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5% CuSO_4 ที่ละลายอยู่ใน 1%w/v ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10% Na_2CO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH
- Folin-Phenol reagent (1: 10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 10 (v/v) และเตรียมใช้ทันที

10. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

10.1 การแสดงผลการทดลอง แสดงออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

10.1.1 oxygraph tracing

เป็น oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลองซึ่งแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ มีหน่วยเป็น n atoms O/ml/min

10.1.2 ตารางและกราฟ

10.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนระยะต่างๆแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E)

การเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มทดลองใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1.ฤทธิ์อันค้ำปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 14 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆมีหน่วยเป็น จำนวน n atoms O/ml/min ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยามีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน medium ที่มี glutamate+malate เป็นสับสเตรท ปริมาณมากเกินพอ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะแรกมีค่า 22.25 n atoms O/ml/min ระยะนี้เรียกว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP+Pi ลงไปในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 129.02 n atoms O/ml/min เรียกระยะการหายใจของไมโตคอนเดรียที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเติม ADP+Pi นี้ว่า state 3 respiration ซึ่งเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดลงเป็น 24.47 n atoms O/ml/min ซึ่งจะกลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม ค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 14 มีค่าเท่ากับ 5.8 เมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป DNP สามารถกระตุ้นการหายใจทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction medium ($O_2=0$) เรียกระยะนี้ว่า state 3u respiration ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น 193.53 n atoms O/ml/min

จากรูปที่ 15A แสดงถึงผลของ indomethacin ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท โดยเติม indomethacin ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า indomethacin สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 43.54 ± 2.39 , 58.24 ± 1.10 , 103.71 ± 2.14 , 33.66 ± 8.22 , -4.11 ± 4.35 , -26.45 ± 2.42 , -59.34 ± 1.27 ตามลำดับ

จากรูปที่ 15B แสดงถึงผลของ indomethacin ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท โดยเติม indomethacin ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า indomethacin สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 41.95 ± 9.13 , 53.34 ± 4.51 , 120.99 ± 9.96 , 19.41 ± 5.48 , 14.70 ± 10.23 , 6.23 ± 9.39 , -58.76 ± 0.73 ตามลำดับ

จากรูปที่ 16A แสดงถึงผลของ piroxicam ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท โดยเติม piroxicam ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า piroxicam สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 95.65 ± 6.79 , 150.47 ± 22.06 , 214.03 ± 4.09 , 304.87 ± 14.71 , 251.75 ± 26.96 , 175.63 ± 14.07 , 68.92 ± 5.55 ตามลำดับ

จากรูปที่ 16B แสดงถึงผลของ piroxicam ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท โดยเติม piroxicam ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า piroxicam สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 81.88 ± 6.41 , 113.41 ± 4.70 , 215.35 ± 16.80 , 365.80 ± 23.54 , 399.78 ± 30.67 , 63.06 ± 18.88 , 80.98 ± 13.70 ตามลำดับ

จากรูปที่ 17A แสดงถึงผลของ nimesulide ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท โดยเติม nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า nimesulide สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 481.43 ± 30.53 , 575.16 ± 49.54 , 287.59 ± 24.36 , 102.68 ± 12.64 , 56.88 ± 12.11 , 82.15 ± 14.73 , 94.79 ± 13.04 ตามลำดับ

จากรูปที่ 17B แสดงถึงผลของ nimesulide ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท โดยเติม nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 mM พบว่า nimesulide สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 61.06 ± 13.50 , 110.24 ± 14.13 , 185.49 ± 12.59 , 119.96 ± 33.33 , 111.10 ± 39.48 , 114.78 ± 35.00 , 96.94 ± 30.52 ตามลำดับ

2. ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ (CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15) ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์

2.1 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ (CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15) ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin

จากรูปที่ 18 แสดงให้เห็นผลของ CU-18-07 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.13×10^{-3} , 1.13×10^{-2} , 1.13×10^{-1} , 0.226, 0.45, 1.13 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 สามารถลด

การใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 3.96 ± 2.29 , 2.34 ± 1.36 , 2.85 ± 2.15 , 3.41 ± 3.41 , 6.02 ± 3.68 , 6.14 ± 3.64 ตามลำดับ เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนใน state 3u

จากรูปที่ 19A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-09 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.06×10^{-3} , 1.63×10^{-2} , 1.06×10^{-1} , 0.213, 0.43, 1.06 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 41.14 ± 1.47 , 72.38 ± 2.16 , 79.10 ± 1.09 , 80.13 ± 1.38 ตามลำดับ และจากรูปที่ 19B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 0, 55.13 ± 7.84 , 69.42 ± 4.96 , 71.95 ± 5.36 ตามลำดับ

จากรูปที่ 20A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-10 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.06×10^{-3} , 1.63×10^{-2} , 1.06×10^{-1} , 0.213, 0.43, 1.06 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 36.64 ± 2.38 , 50.19 ± 1.29 , 68.63 ± 0.45 , 64.86 ± 0.79 ตามลำดับ และจากรูปที่ 20B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 0, 87.40 ± 0.50 , 92.97 ± 0.70 , 92.57 ± 1.38 ตามลำดับ

จากรูปที่ 21 แสดงให้เห็นผลของ CU-18-13 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.295×10^{-3} , 1.295×10^{-2} , 1.295×10^{-1} , 0.259, 0.518, 1.295 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 0, 4.84 ± 4.84 , 47.56 ± 1.49 , 53.35 ± 5.12 ตามลำดับ เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนใน state 3u

จากรูปที่ 22A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-14 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 9.49×10^{-4} , 9.49×10^{-3} , 9.49×10^{-2} , 1.898×10^{-1} , 0.380, 0.949 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14

สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 3.63 ± 1.42 , 0.81 ± 0.81 , 16.81 ± 0.64 , 33.77 ± 3.28 , 49.01 ± 1.13 , 50.53 ± 2.39 ตามลำดับ และจากรูปที่ 22B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ -3.41 ± 3.41 , -5.26 ± 2.01 , 15.78 ± 2.27 , 57.64 ± 2.16 , 62.47 ± 1.48 , 67.17 ± 2.49 ตามลำดับ

จากรูปที่ 23A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-15 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 9.49×10^{-4} , 9.49×10^{-3} , 9.49×10^{-2} , 1.898×10^{-1} , 0.380 , 0.949 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0.83 ± 0.83 , -1.04 ± 1.04 , 38.81 ± 8.50 , 65.00 ± 1.29 , 72.75 ± 1.70 , 78.81 ± 2.72 ตามลำดับ และจากรูปที่ 23B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0 , 9.78 ± 9.78 , 63.60 ± 2.27 , 69.45 ± 5.06 , 79.60 ± 3.27 , 86.55 ± 3.37 ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียของสารทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 5

2.2 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ (CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15) ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam

จากรูปที่ 24A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-07 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.13×10^{-3} , 1.13×10^{-2} , 1.13×10^{-1} , 0.226 , 0.45 , 1.13 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0 , 0 , 0 , 20.32 ± 4.10 , 39.46 ± 3.05 ตามลำดับ และจากรูปที่ 24B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0 , 0 , 56.44 ± 4.79 , 42.99 ± 2.08 , 56.32 ± 2.00 , 30.40 ± 7.39 ตามลำดับ

จากรูปที่ 25A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-09 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.06×10^{-3} , 1.63×10^{-2} , 1.06×10^{-1} , 0.213 , 0.43 , 1.06 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลด

การใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $0, 18.56 \pm 2.55, 66.73 \pm 0.79, 84.23 \pm 1.16, 90.01 \pm 0.89, 89.90 \pm 1.37$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 25B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $41.95 \pm 4.45, 40.48 \pm 0.57, 50.30 \pm 3.82, 54.58 \pm 3.14, 70.75 \pm 6.39, 74.35 \pm 3.52$ ตามลำดับ

จากรูปที่ 26A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-10 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $1.06 \times 10^{-3}, 1.63 \times 10^{-2}, 1.06 \times 10^{-1}, 0.213, 0.43, 1.06$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $0, 1.70 \pm 1.70, 65.24 \pm 0.97, 74.62 \pm 1.03, 84.42 \pm 0.82, 83.62 \pm 0.52$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 26B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $42.25 \pm 5.43, 52.27 \pm 2.36, 59.83 \pm 2.01, 75.14 \pm 4.36, 92.79 \pm 1.53, 93.07 \pm 1.03$ ตามลำดับ

จากรูปที่ 27A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-13 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $1.295 \times 10^{-3}, 1.295 \times 10^{-2}, 1.295 \times 10^{-1}, 0.259, 0.518, 1.295$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $0, 0, 43.35 \pm 2.14, 65.57 \pm 1.14, 63.72 \pm 3.00$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 27B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $75.53 \pm 0.79, 75.98 \pm 0.71, 24.20 \pm 1.44, 54.46 \pm 1.81, 55.86 \pm 2.44, 64.36 \pm 0.91$ ตามลำดับ

จากรูปที่ 28A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-14 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $9.49 \times 10^{-4}, 9.49 \times 10^{-3}, 9.49 \times 10^{-2}, 1.898 \times 10^{-1}, 0.380, 0.949$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $4.16 \pm 1.64, 4.62 \pm 1.60, 24.01 \pm 3.08, 63.81 \pm 1.55, 76.01 \pm 5.44, 75.37 \pm 4.26$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 28B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $41.95 \pm 4.45, 40.48 \pm 0.57, 50.30 \pm 3.82, 54.58 \pm 3.14, 70.75 \pm 6.39, 74.35 \pm 3.52$ ตามลำดับ

ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 33.77 ± 7.98, 60.86 ± 2.08, 70.78 ± 1.19, 69.17 ± 2.48 ตามลำดับ

จากรูปที่ 29A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-15 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 9.49×10^{-4} , 9.49×10^{-3} , 9.49×10^{-2} , 1.898×10^{-1} , 0.380, 0.949 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 7.89 ± 1.01, 83.43 ± 0.87, 84.25 ± 0.57, 86.76 ± 1.11, 86.57 ± 0.71 ตามลำดับ และจากรูปที่ 29B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 0, 0, 78.06 ± 2.26, 87.23 ± 2.01, 92.17 ± 1.16, 94.84 ± 0.55 ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียของสารทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 5

2.3 ผลของอนุพันธ์เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ (CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15) ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide

จากรูปที่ 30A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-07 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.13×10^{-3} , 1.13×10^{-2} , 1.13×10^{-1} , 0.226, 0.45, 1.13 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 24.54 ± 2.49, 17.58 ± 1.95, 36.86 ± 1.43, 59.80 ± 2.00, 65.08 ± 2.72, 65.67 ± 1.97 ตามลำดับ และจากรูปที่ 30B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-07 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 63.05 ± 2.93, 64.94 ± 2.34, 61.86 ± 2.43, 57.21 ± 2.62, 59.46 ± 1.00, 58.91 ± 2.62 ตามลำดับ

จากรูปที่ 31A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-09 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.06×10^{-3} , 1.63×10^{-2} , 1.06×10^{-1} , 0.213, 0.43, 1.06 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 34.64 ± 5.15, 61.42 ± 3.81, 77.19 ± 3.63, 90.06 ± 3.62, 93.05 ± 2.71, 91.83 ± 4.34 ตามลำดับ และจากรูปที่ 31B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 63.05 ± 2.93, 64.94 ± 2.34, 61.86 ± 2.43, 57.21 ± 2.62, 59.46 ± 1.00, 58.91 ± 2.62 ตามลำดับ

ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 61.25 ± 2.62 , 55.50 ± 4.25 , 69.02 ± 0.87 , 73.91 ± 1.90 , 78.62 ± 2.02 , 78.78 ± 1.81 ตามลำดับ

จากรูปที่ 32A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-10 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.06×10^{-3} , 1.63×10^{-2} , 1.06×10^{-1} , 0.213, 0.43, 1.06 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 28.81 ± 6.01 , 46.46 ± 4.13 , 73.87 ± 2.89 , 80.52 ± 2.94 , 88.85 ± 3.52 , 87.72 ± 3.68 ตามลำดับ และจากรูปที่ 32B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-10 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 56.85 ± 4.39 , 54.95 ± 3.02 , 66.62 ± 2.25 , 73.78 ± 1.45 , 84.17 ± 2.63 , 83.49 ± 2.19 ตามลำดับ

จากรูปที่ 33A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-13 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1.295×10^{-3} , 1.295×10^{-2} , 1.295×10^{-1} , 0.259, 0.518, 1.295 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 21.86 ± 1.55 , 29.21 ± 4.99 , 53.03 ± 3.26 , 69.87 ± 2.63 , 81.69 ± 1.94 , 81.68 ± 2.73 ตามลำดับ และจากรูปที่ 33B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-13 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 63.33 ± 2.24 , 60.20 ± 3.26 , 49.01 ± 3.09 , 60.76 ± 0.89 , 70.09 ± 1.05 , 71.55 ± 2.37 ตามลำดับ

จากรูปที่ 34A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-14 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 9.49×10^{-4} , 9.49×10^{-3} , 9.49×10^{-2} , 1.898×10^{-1} , 0.380, 0.949 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 22.15 ± 1.41 , 16.01 ± 0.73 , 55.31 ± 0.78 , 81.79 ± 2.63 , 85.53 ± 3.55 , 81.62 ± 5.84 ตามลำดับ และจากรูปที่ 34B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-14 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 2.52 ± 2.48 , 3.33 ± 3.23 , -7.63 ± 3.58 , 25.46 ± 4.65 , 49.37 ± 5.29 , 43.97 ± 6.52 ตามลำดับ

จากรูปที่ 35A แสดงให้เห็นผลของ CU-18-15 ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 9.49×10^{-4} , 9.49×10^{-3} , 9.49×10^{-2} , 1.898×10^{-1} , 0.380, 0.949 mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้น

ด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 29.90 ± 4.32 , 22.24 ± 0.99 , 88.14 ± 1.21 , 89.48 ± 1.07 , 91.46 ± 0.87 , 91.90 ± 0.68 ตามลำดับ และจากรูปที่ 35B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-15 สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 5.29 ± 1.98 , 6.05 ± 3.26 , 64.04 ± 4.73 , 78.14 ± 3.53 , 85.66 ± 2.33 , 90.84 ± 1.37 ตามลำดับ

ค่า IC_{50} ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียของสารทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 5

3. ผลของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์

จากรูปที่ 36A แสดงให้เห็นผลของ omeprazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 7.997×10^{-3} , 7.997×10^{-2} , 1.599×10^{-1} , 0.32, 0.64 mM ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethcin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 5.28 ± 1.82 , 9.04 ± 0.78 , 11.18 ± 4.52 , 21.82 ± 2.58 , 34.48 ± 3.79 ตามลำดับ และจากรูปที่ 36B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole มีผลเพิ่มการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 16.89 ± 5.77 , 22.42 ± 1.89 , 33.56 ± 4.10 , 49.08 ± 6.17 , 74.63 ± 2.14 ตามลำดับ

จากรูปที่ 37 แสดงให้เห็นผลของ omeprazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 7.997×10^{-3} , 7.997×10^{-2} , 1.599×10^{-1} , 0.32, 0.64 mM ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 3.48 ± 2.31 , 8.84 ± 0.62 , 16.44 ± 1.72 , 26.07 ± 2.56 , 37.05 ± 3.21 ตามลำดับ เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนใน state 3u

จากรูปที่ 38A แสดงให้เห็นผลของ omeprazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ 7.997×10^{-3} , 7.997×10^{-2} , 1.599×10^{-1} , 0.32, 0.64 mM ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ได้ดังนี้ $0, 21.32 \pm 0.72, 27.70 \pm 1.50, 38.49 \pm 3.22, 49.95 \pm 4.09$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 38B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า omeprazole ที่ความเข้มข้น 7.997×10^{-3} และ 7.997×10^{-2} mM สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 1.60 ± 1.60 และ 3.32 ± 1.94 ตามลำดับ และ omeprazole ที่ความเข้มข้น $1.599 \times 10^{-1}, 0.32, 0.64$ mM มีผลเพิ่มการใช้ออกซิเจนใน State 3u ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $2.27 \pm 2.27, 9.90 \pm 1.36, 19.69 \pm 0.68$ ตามลำดับ

4. ผลของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์

จากรูปที่ 39A แสดงให้เห็นผลของ metronidazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $1.61 \times 10^{-2}, 1.61 \times 10^{-1}, 0.32, 0.65, 1.29$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย indomethcin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $4.01 \pm 1.38, 0.63 \pm 0.63, 2.32 \pm 1.49, 2.78 \pm 2.78, 6.22 \pm 2.13$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 39B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole มีผลเพิ่มการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $26.70 \pm 5.68, 24.89 \pm 1.95, 13.13 \pm 4.00, 23.87 \pm 1.64, 29.96 \pm 5.45$ ตามลำดับ

ผลของ metronidazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $1.61 \times 10^{-2}, 1.61 \times 10^{-1}, 0.32, 0.65, 1.29$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนใน state 3u และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole ไม่มีผลต่อการใช้ออกซิเจนใน state 3u

จากรูปที่ 40A แสดงให้เห็นผลของ metronidazole ในความเข้มข้นต่างๆกันคือ $1.61 \times 10^{-2}, 1.61 \times 10^{-1}, 0.32, 0.65, 1.29$ mM ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่งความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ $5.15 \pm 2.97, 5.35 \pm 3.10, 4.57 \pm 2.71, 3.57 \pm 2.06, 3.54 \pm 2.09$ ตามลำดับ และจากรูปที่ 40B เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า metronidazole สามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3u ซึ่ง

ความแรงในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ 3.09 ± 1.79 , 4.21 ± 2.44 , 3.65 ± 2.15 , 3.54 ± 2.33 , 6.17 ± 2.06 ตามลำดับ

5. ผลของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

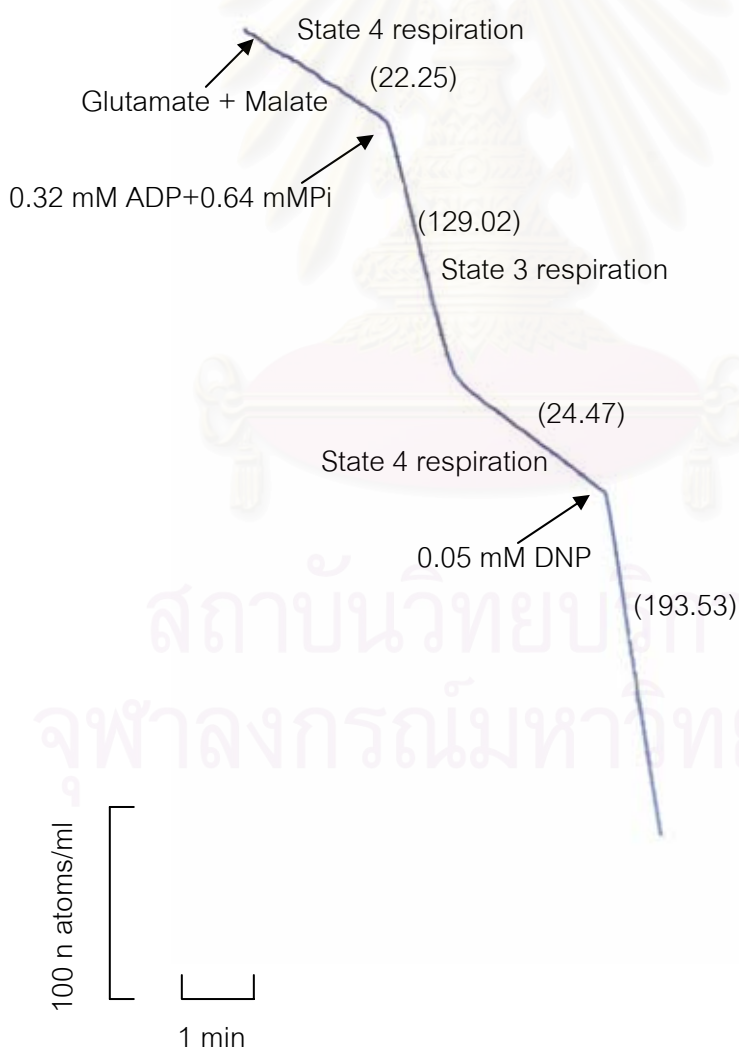
จากรูปที่ 41 แสดงผลของสารทดสอบที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย โดยทำการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายตัวของ ATP เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารทดสอบ พบว่า Pi liberate มีค่าเท่ากับ 21.31 ± 0.30 และ 21.47 ± 0.29 $\mu\text{moles/mg protein/10 min}$ ซึ่งแสดงว่า DMSO ไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ผลของ indomethacin, piroxicam, nimesulide ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.1 mM ตามลำดับ และ DNP ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรียได้สรุปได้ดังตารางที่ 6 ซึ่งพบว่า indomethacin, piroxicam, nimesulide ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

รูปที่ 14 กราฟแสดง oxygraph tracing การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.63 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.93 mM $MgCl_2$, 88.84 mM KCl, 5.36 mM potassium glutamate+ 5.36 mM potassium malate, 0.32 mM ADP + 0.64 mM Pi, 0.05 mM DNP, 6.7 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 38.48 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.864 ml. อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/ml/min



ตารางที่ 4 แสดงอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโตคอนเดรียโดย indomethacin, piroxicam และ nimesulide ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท(n=4) และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

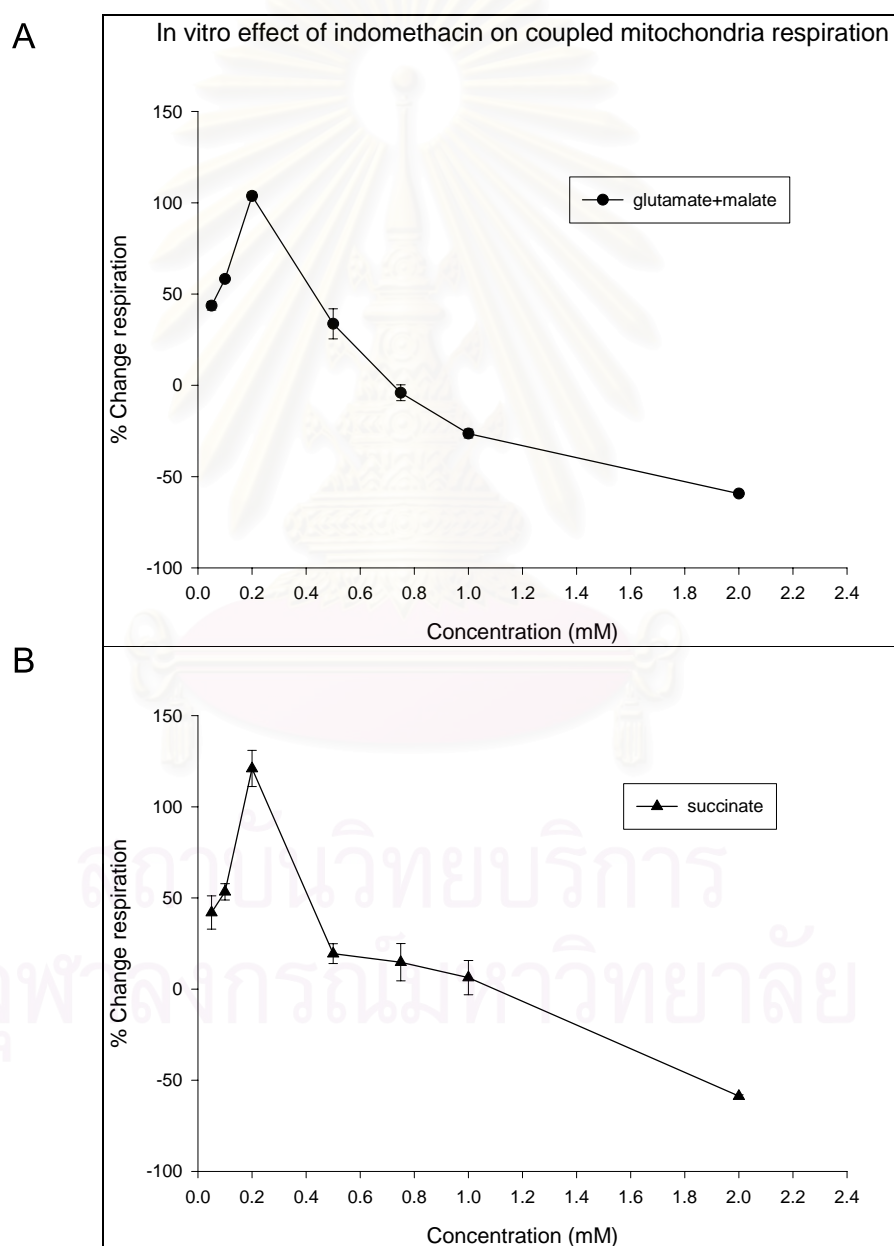
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.92 mM $MgCl_2$, 88.56 mM KCl, 5.34 mM potassium glutamate+ 5.34 mM potassium malate, 6.68 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.87 ml. อุณหภูมิ 37°C

ความเข้มข้น (mM)	% Change respiration					
	Glutamate+Malate as substrate			Succinate as substrate		
	indomethacin	piroxicam	nimesulide	indomethacin	piroxicam	nimesulide
0.05	43.54 ± 2.39	95.65±6.79	481.43±30.53	41.95±9.13	81.88±6.41	61.06±13.50
0.1	58.24 ± 1.10	150.47±22.06	575.16±49.54	53.34±4.51	113.41±4.70	110.24±14.13
0.2	103.71 ± 2.14	214.03±4.09	287.59±24.36	120.99±9.96	215.35±16.80	185.49±12.59
0.5	33.66 ± 8.22	304.87±14.71	102.68±12.64	19.41±5.48	365.80±23.54	119.96±33.33
0.75	-4.11 ± 4.35	251.75±26.96	56.88±12.11	14.70±10.23	399.78±30.67	111.10±39.48
1	-26.45 ± 2.42	175.63±14.07	82.15±14.73	6.23±9.39	63.06±18.88	114.78±35.00
2	-59.34 ± 1.27	68.92±5.55	94.79±13.04	-58.76±0.73	80.98±13.70	96.94±30.52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

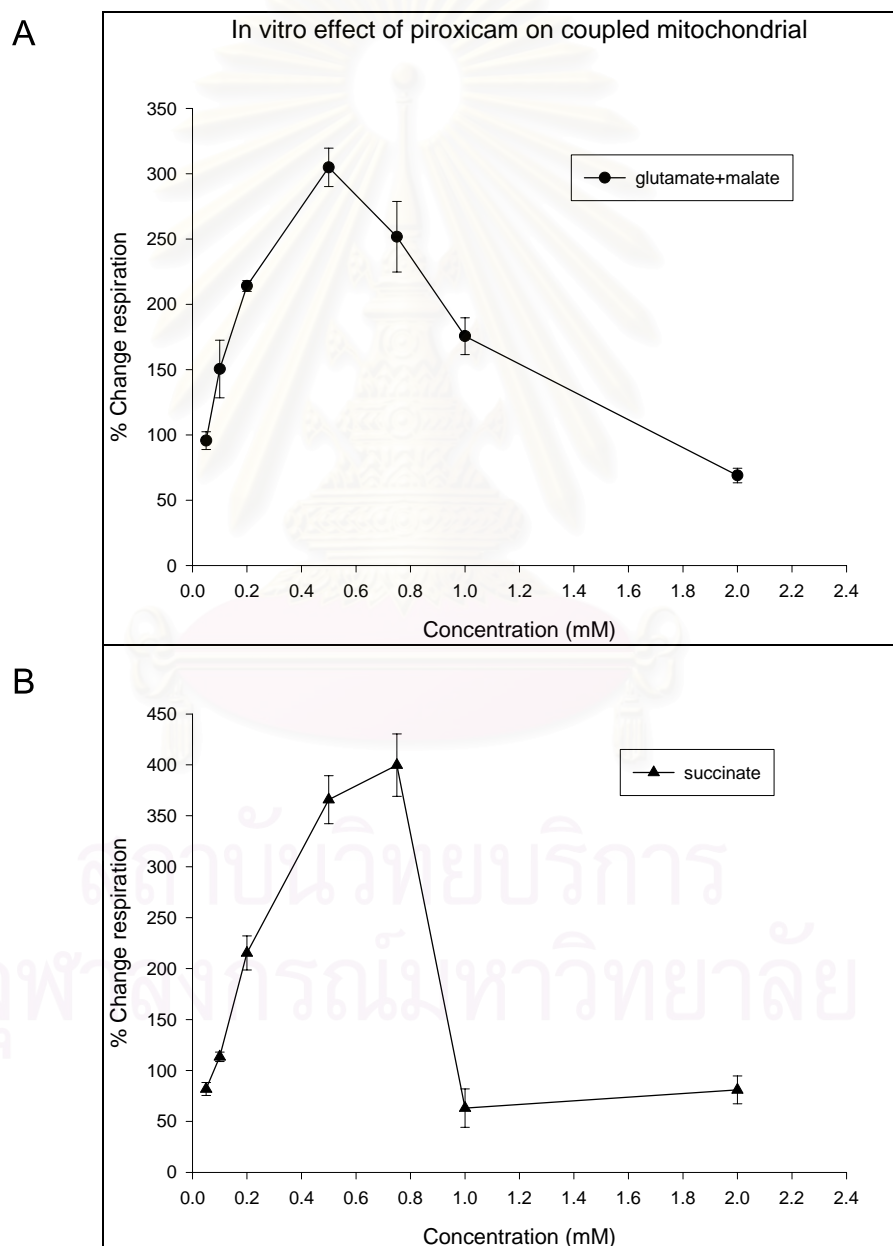
รูปที่ 15 อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโทคอนเดรียโดย indomethacin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.92 mM $MgCl_2$, 88.56 mM KCl, 5.34 mM potassium glutamate+ 5.34 mM potassium malate, 6.68 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.87 ml. อุณหภูมิ 37°C



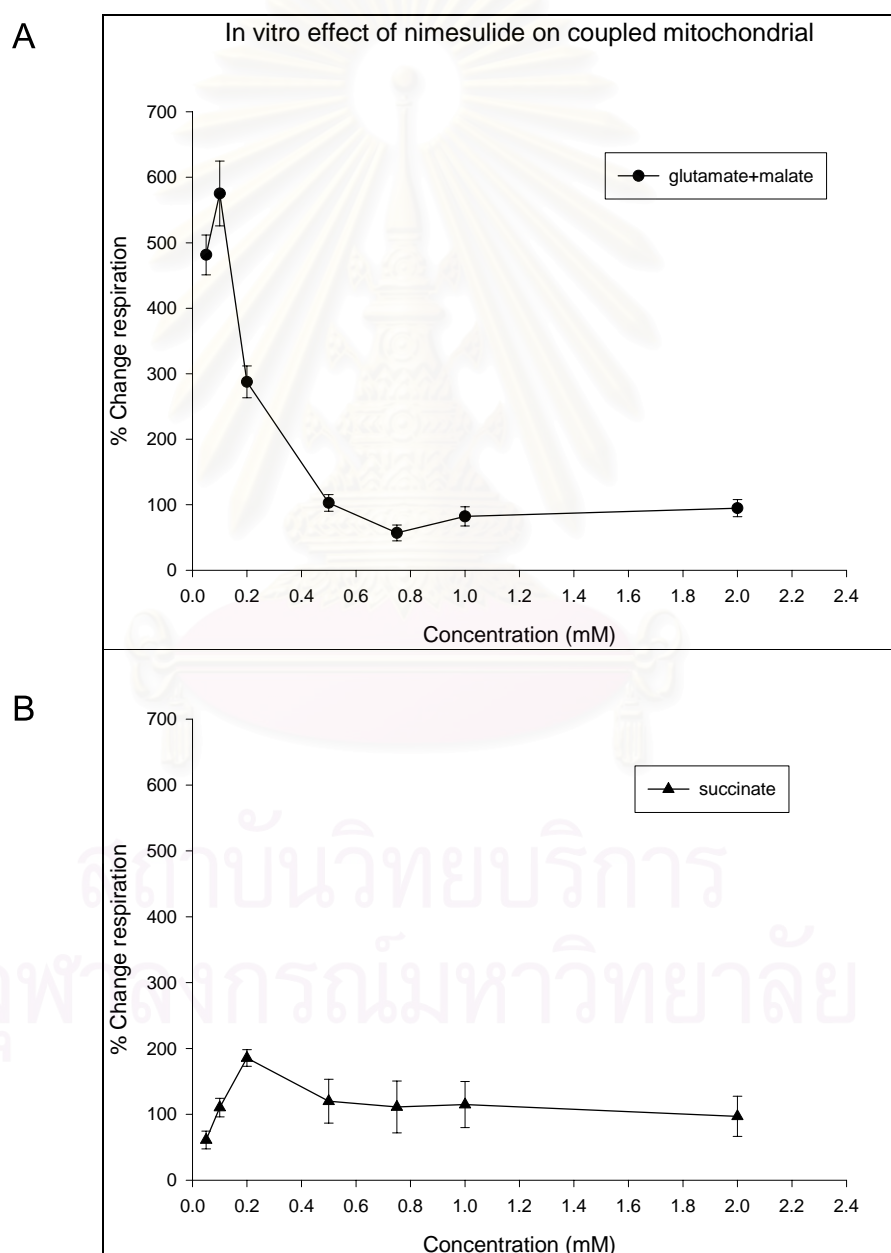
รูปที่ 16 อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโทคอนเดรียโดย piroxicam ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.92 mM $MgCl_2$, 88.56 mM KCl, 5.34 mM potassium glutamate+ 5.34 mM potassium malate, 6.68 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.87 ml. อุณหภูมิ 37°C



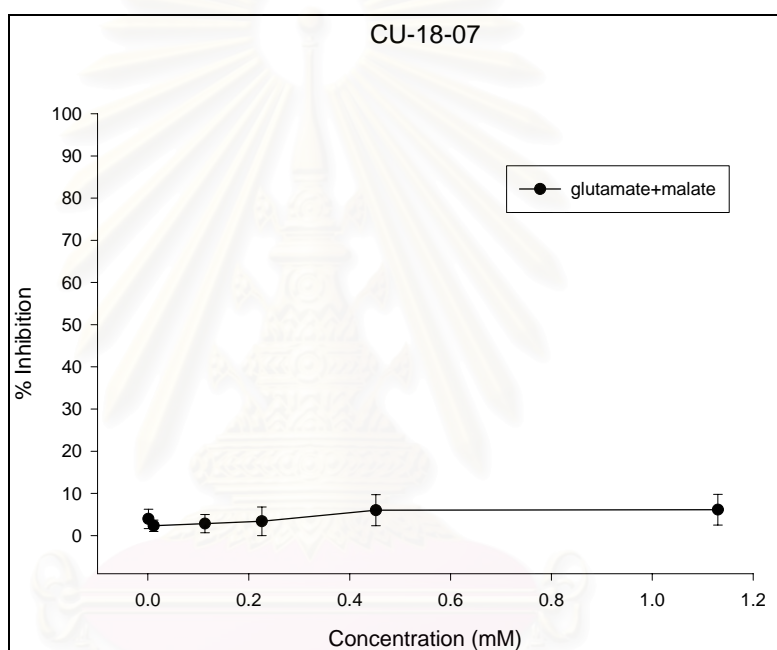
รูปที่ 17 อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของไมโทคอนเดรียโดย nimesulide ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.50 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.92 mM $MgCl_2$, 88.56 mM KCl, 5.34 mM potassium glutamate+ 5.34 mM potassium malate, 6.68 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.87 ml. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 18 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4)

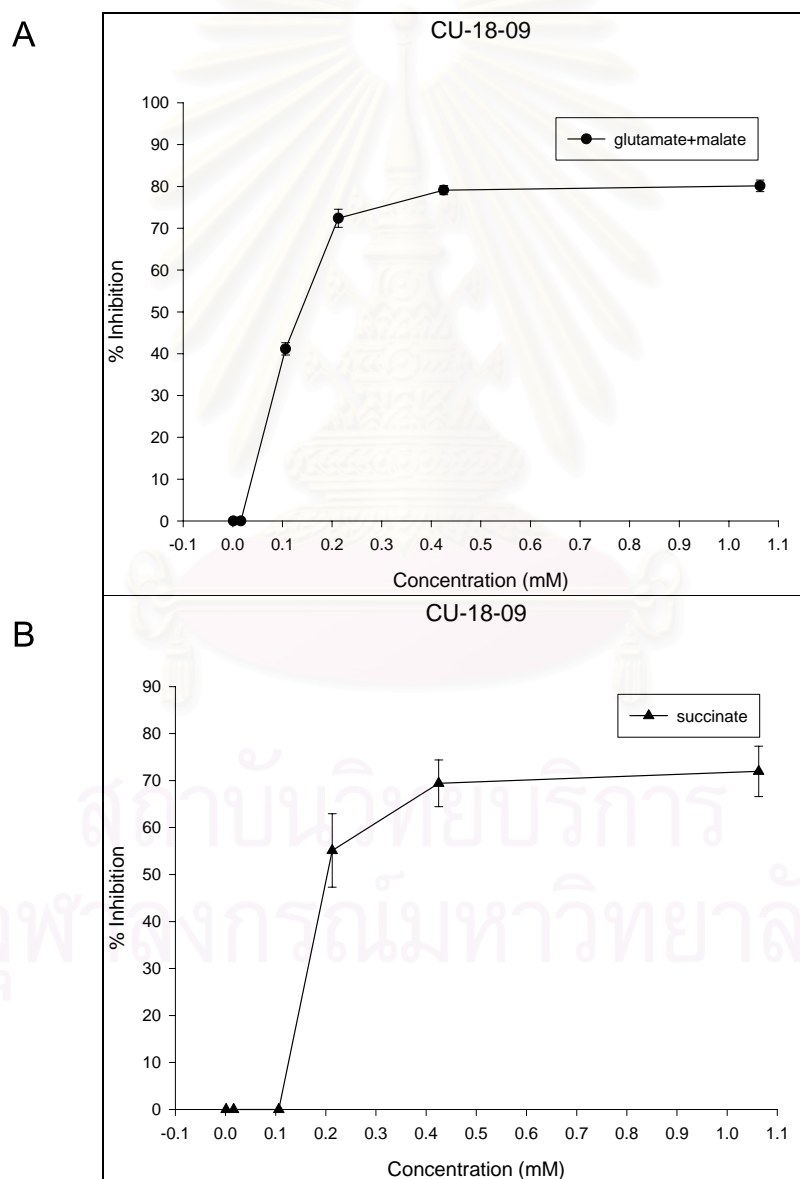
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

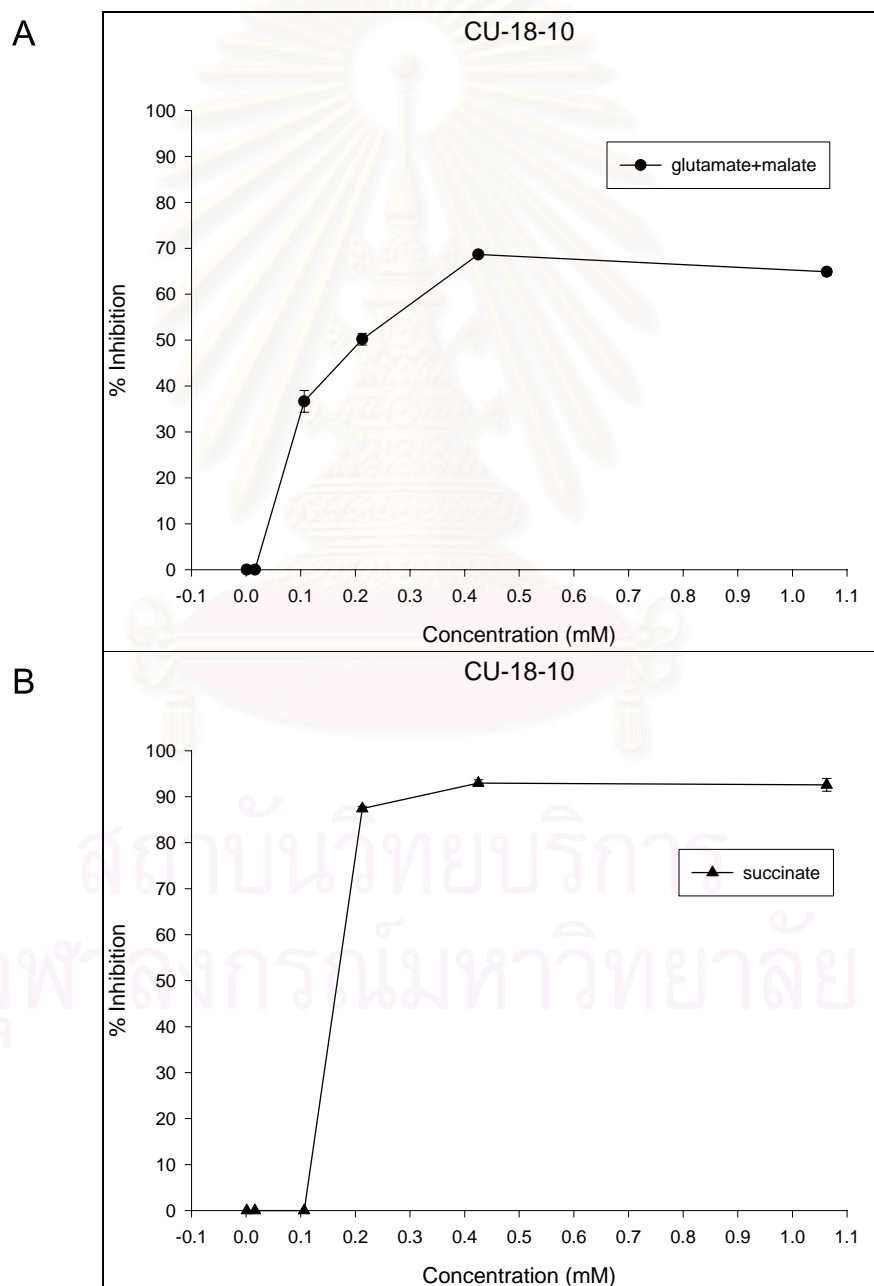
รูปที่ 19 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



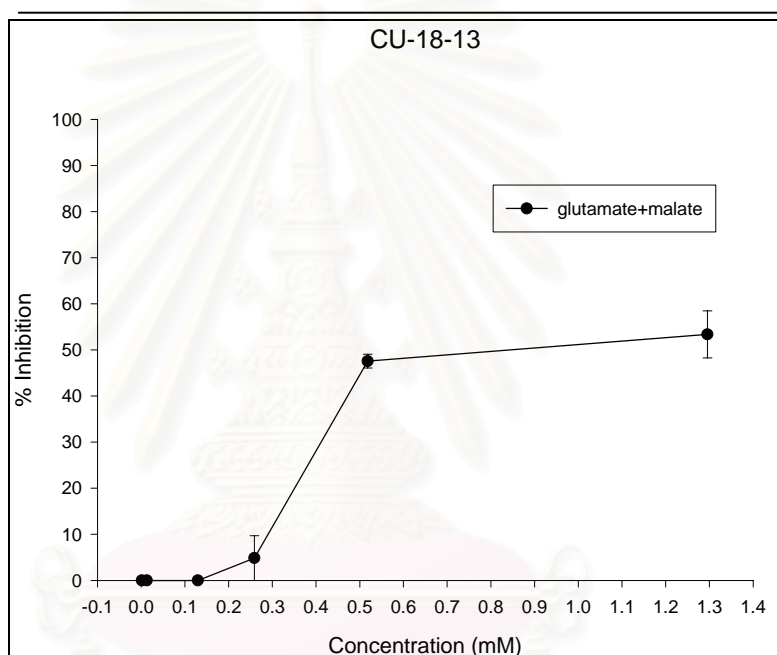
รูปที่ 20 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 21 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4)

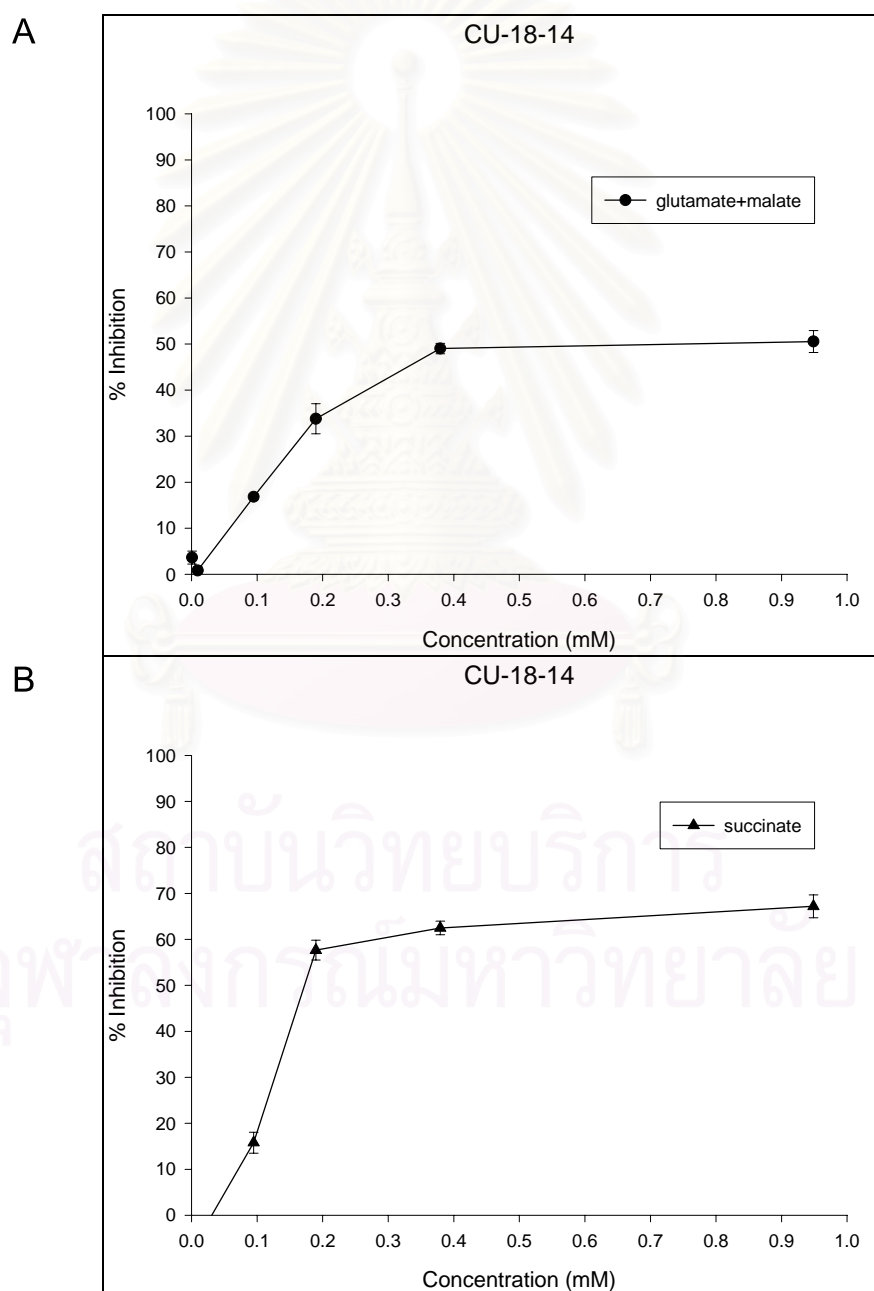
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

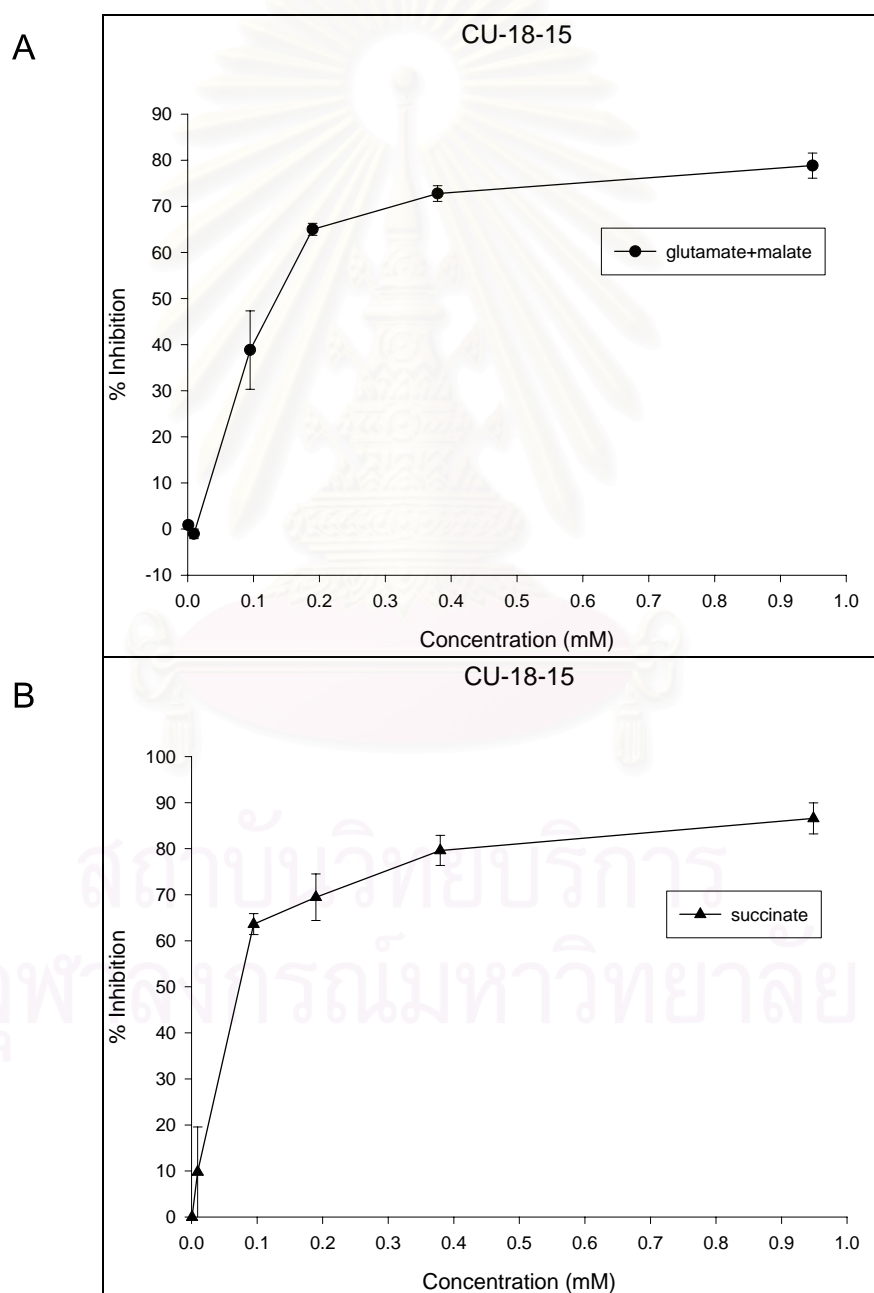
รูปที่ 22 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



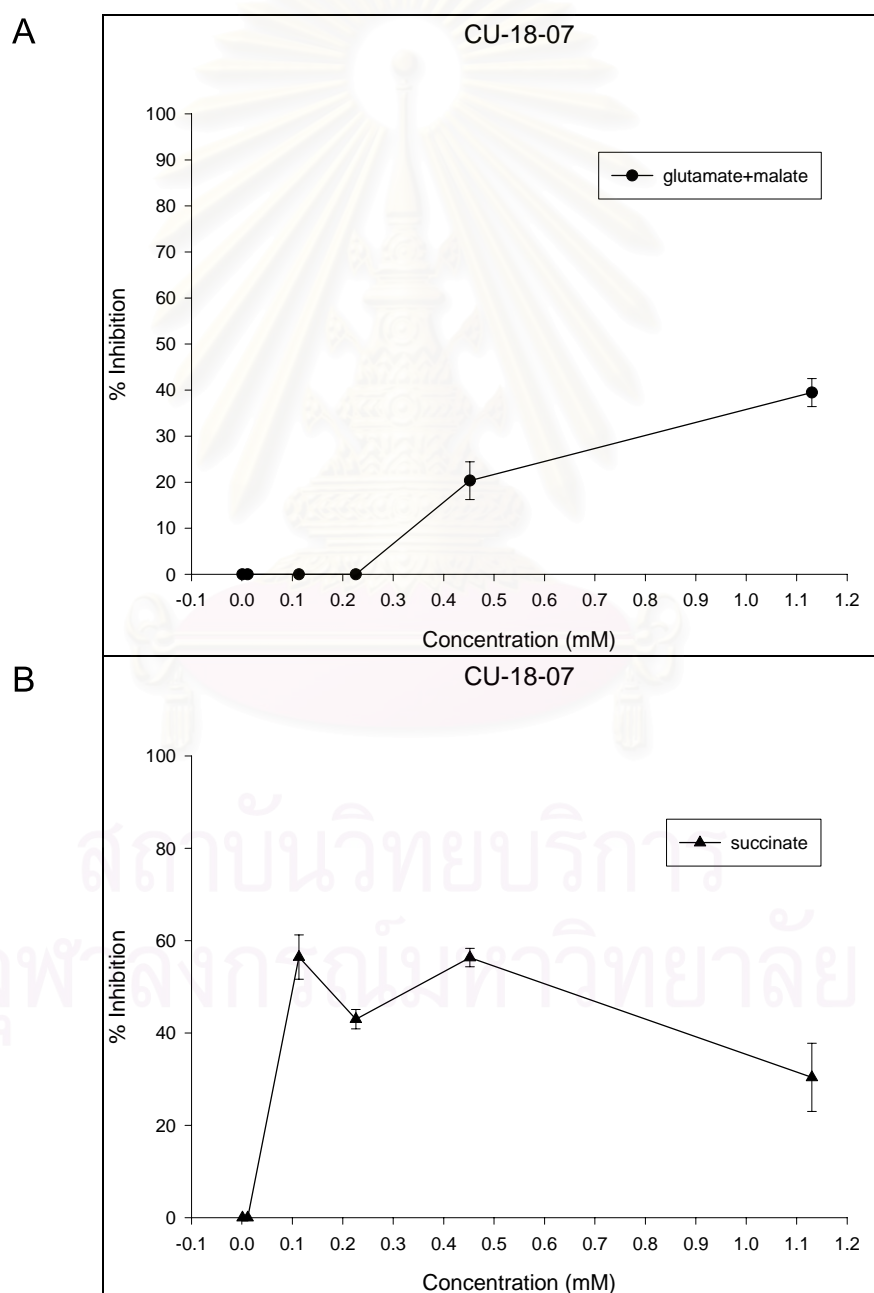
รูปที่ 23 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



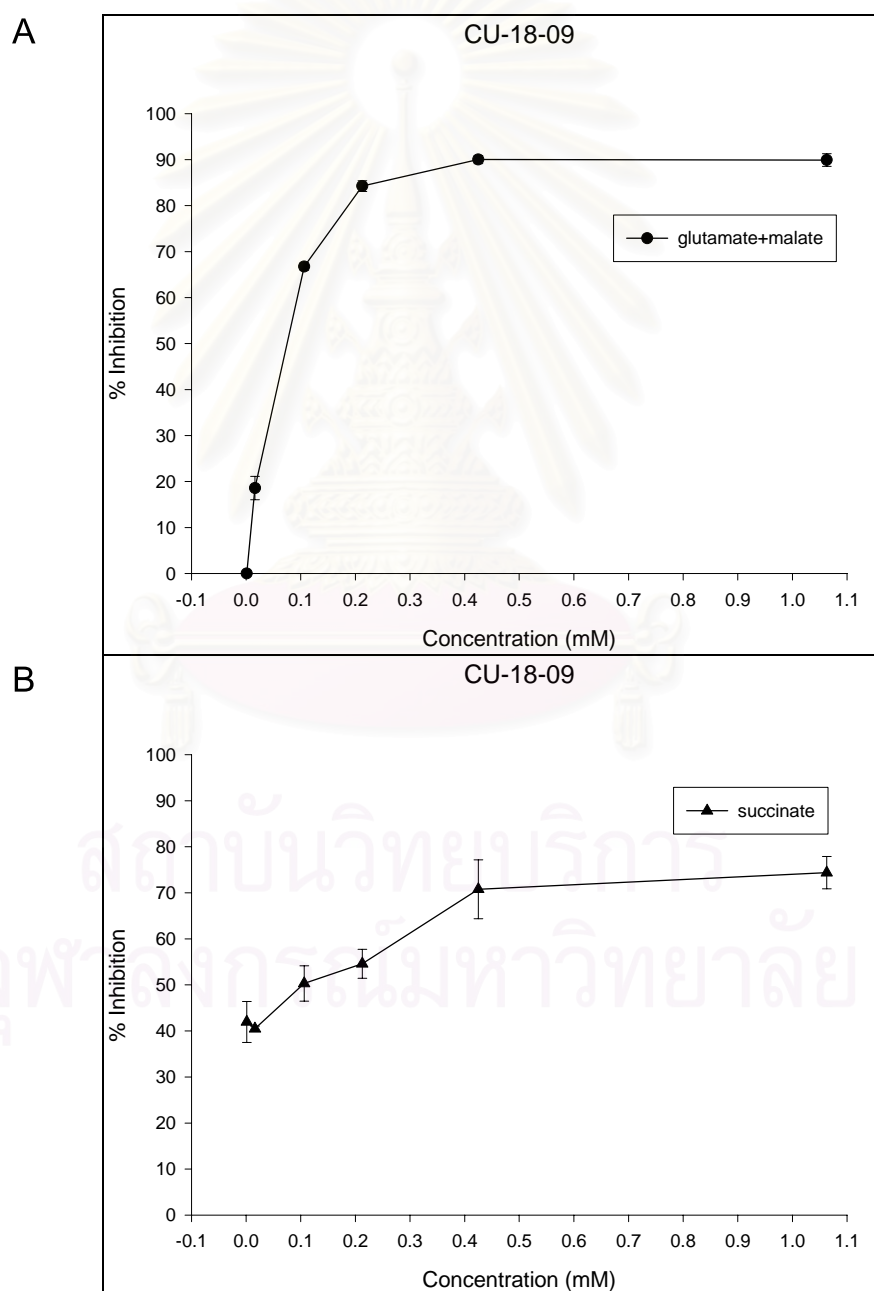
รูปที่ 24 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



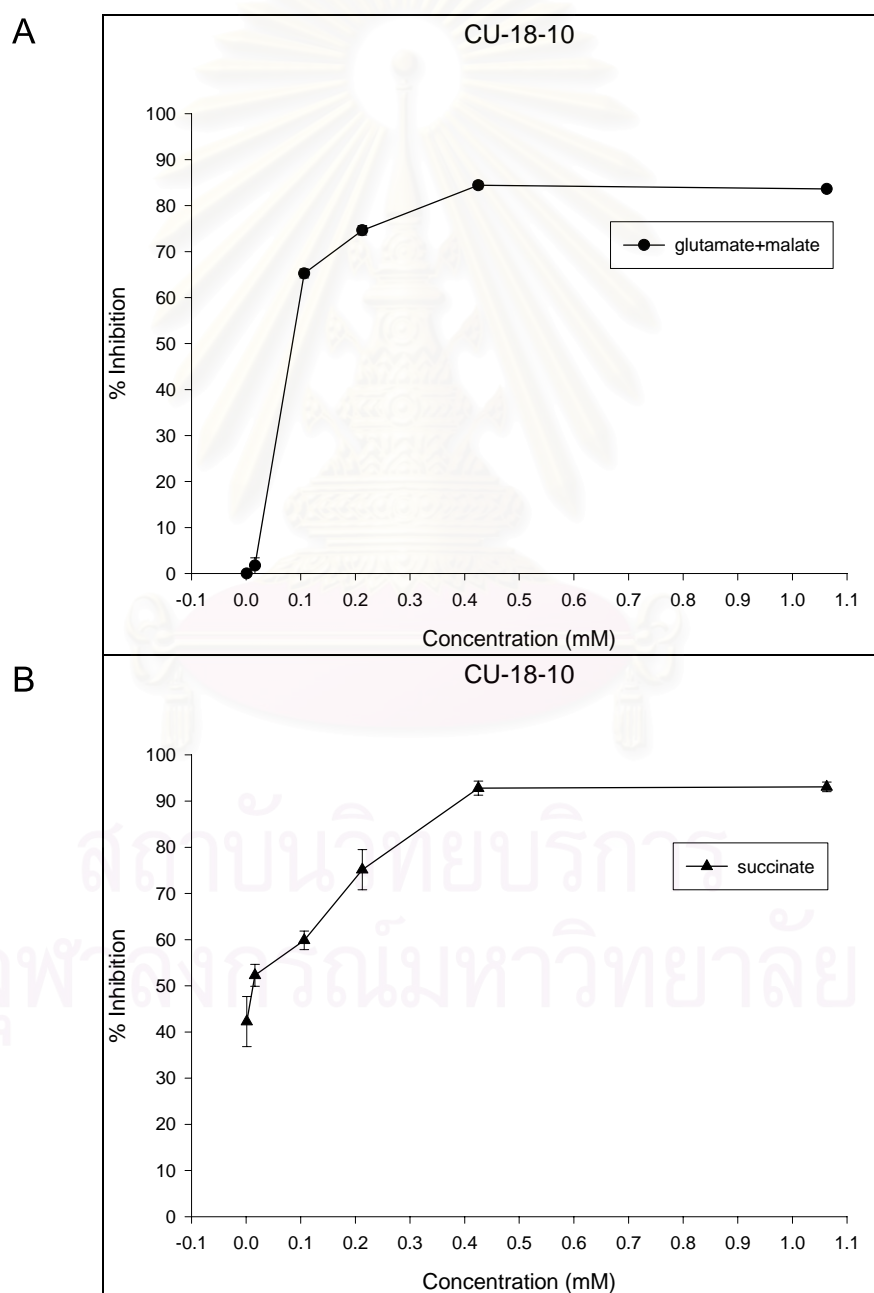
รูปที่ 25 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



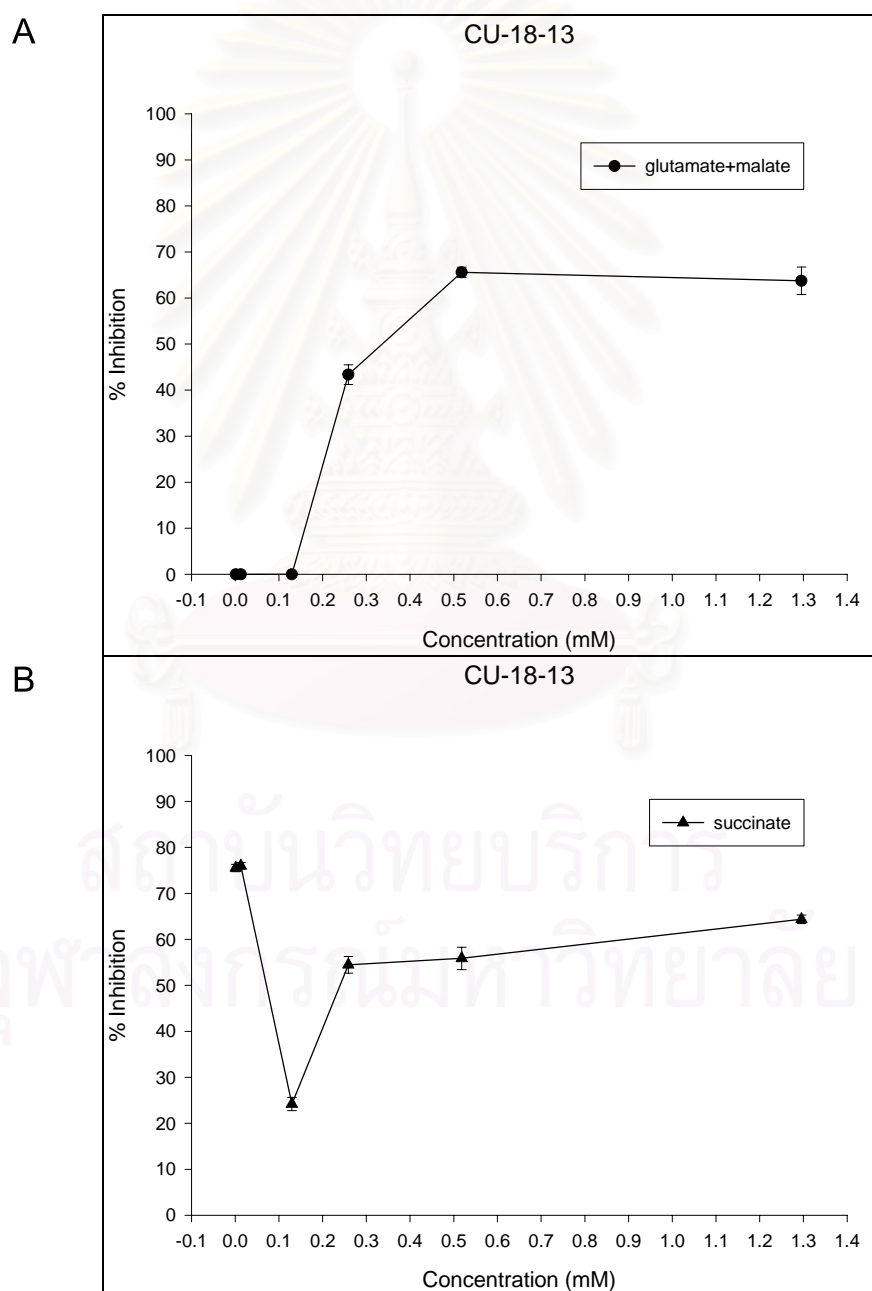
รูปที่ 26 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



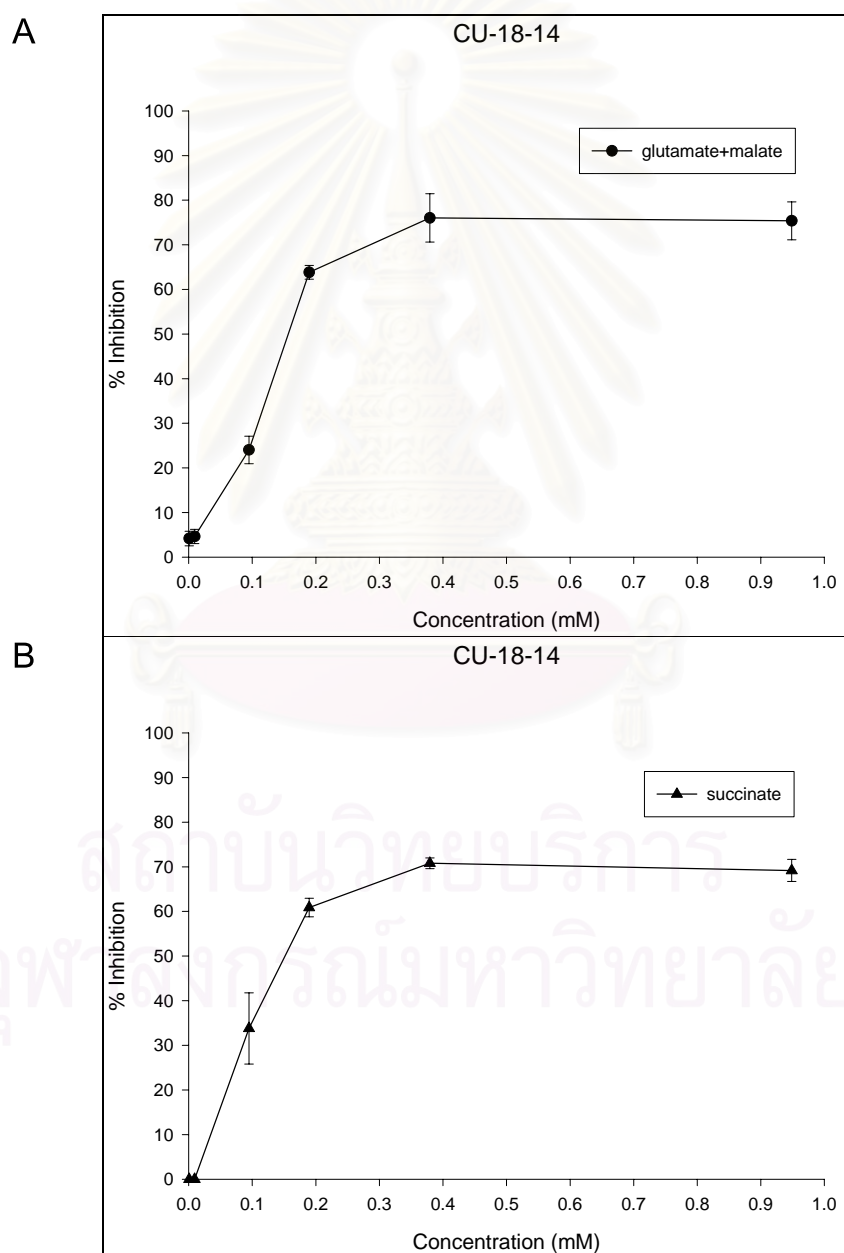
รูปที่ 27 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



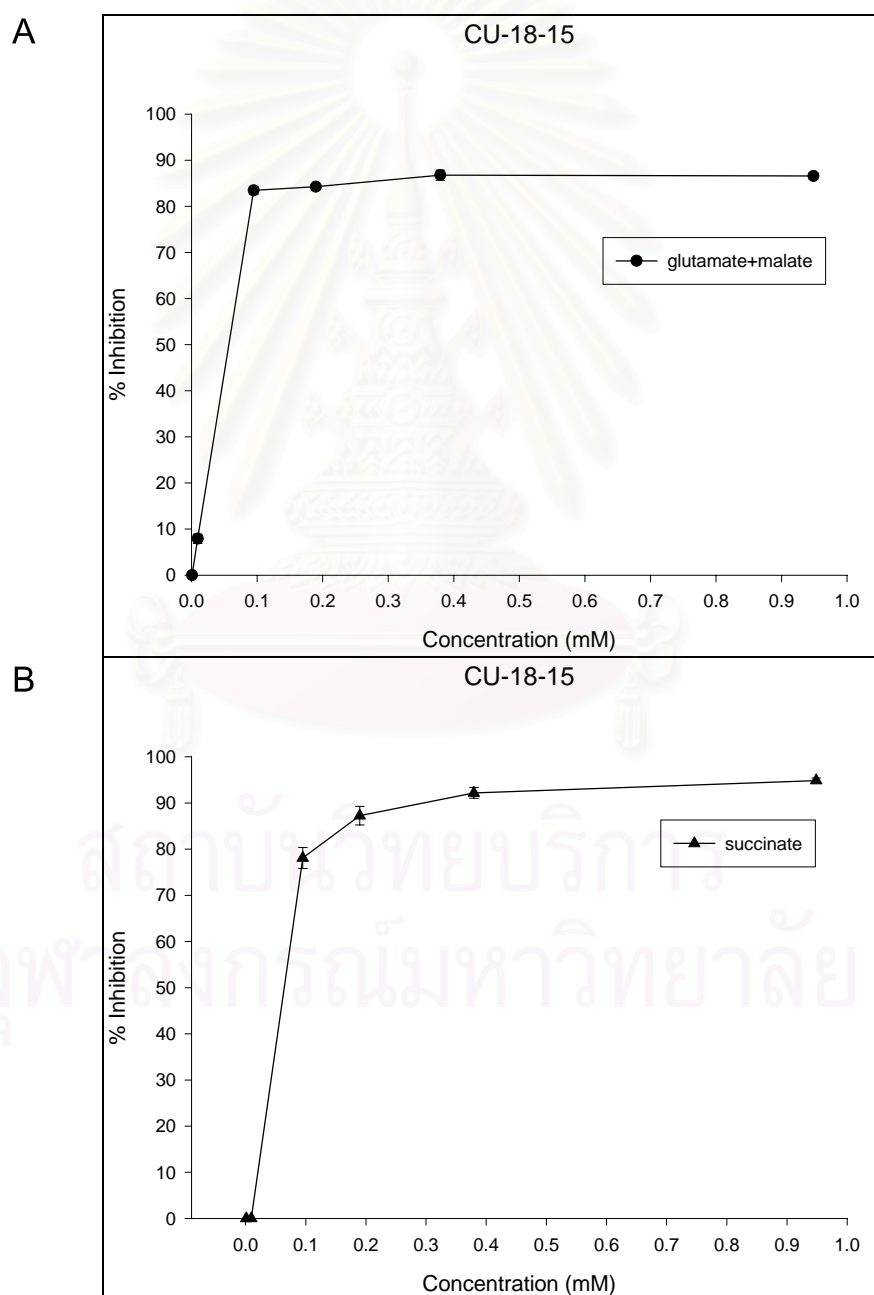
รูปที่ 28 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



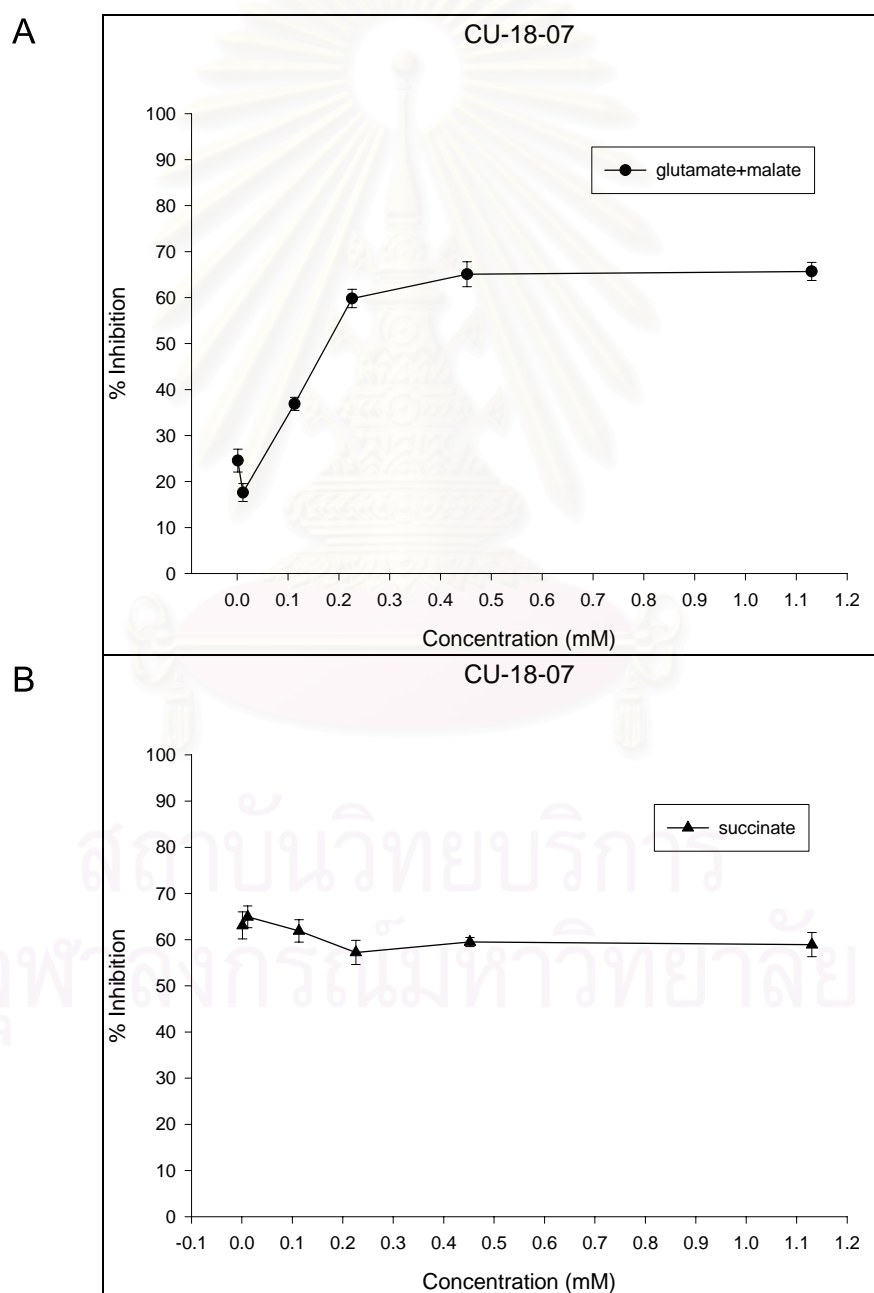
รูปที่ 29 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



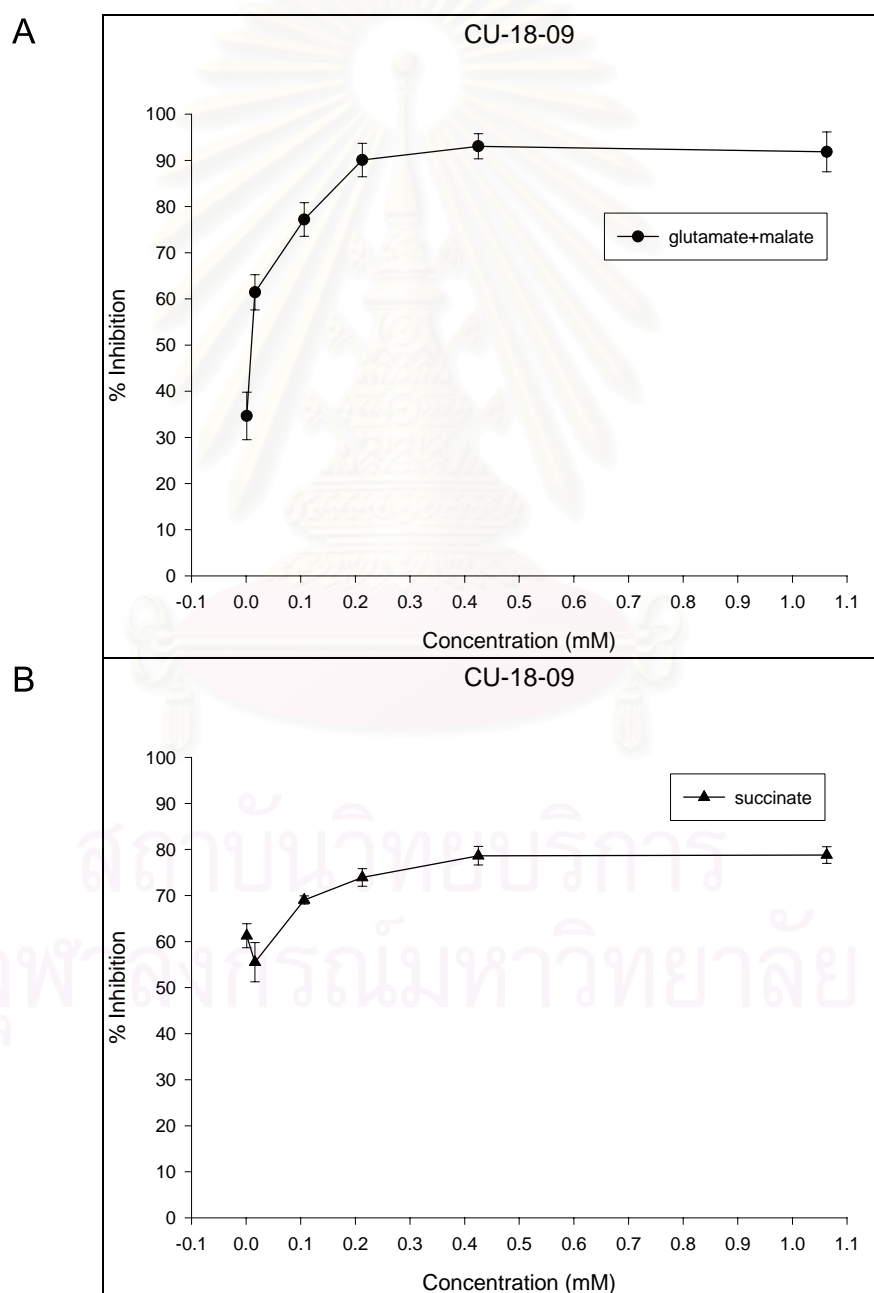
รูปที่ 30 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-07 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



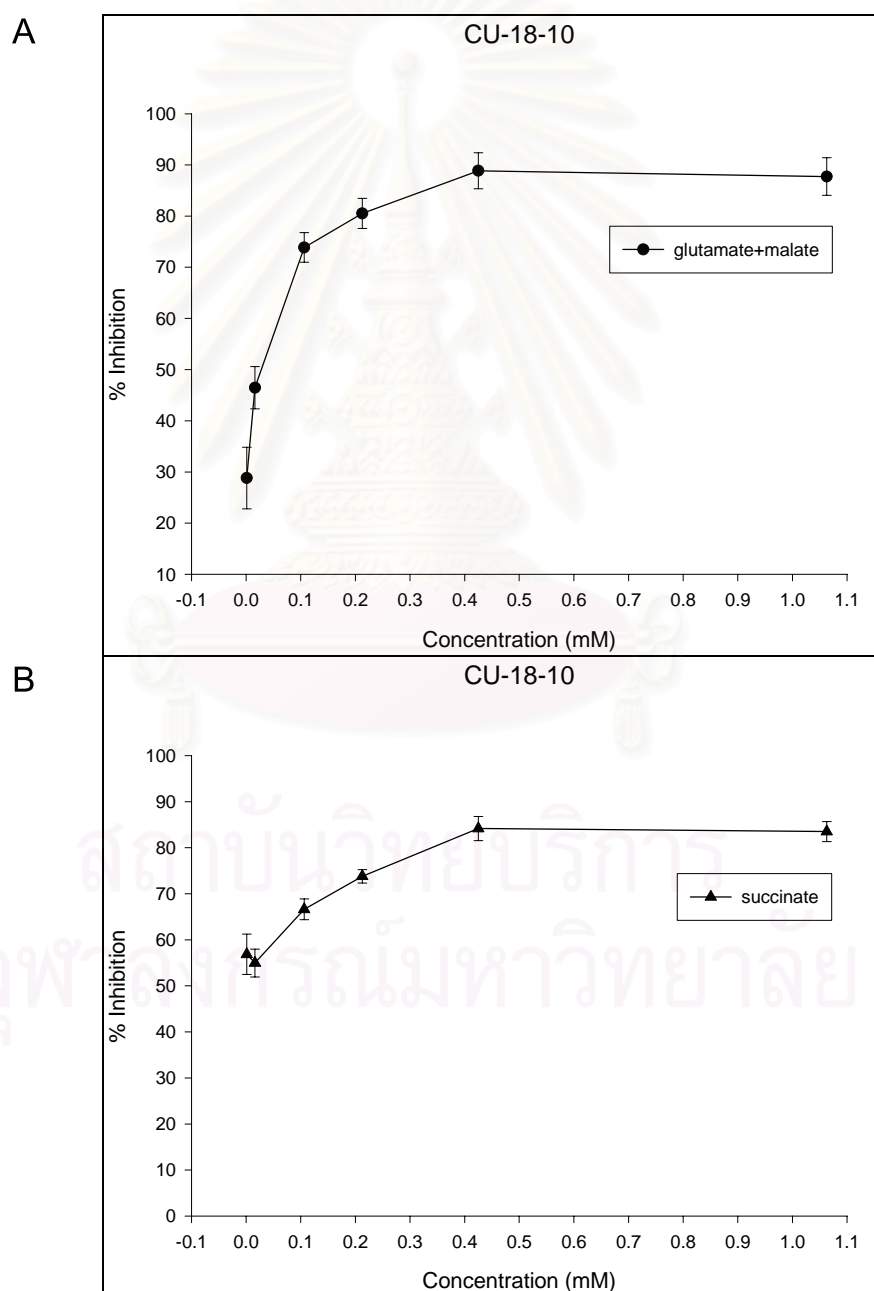
รูปที่ 31 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-09 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



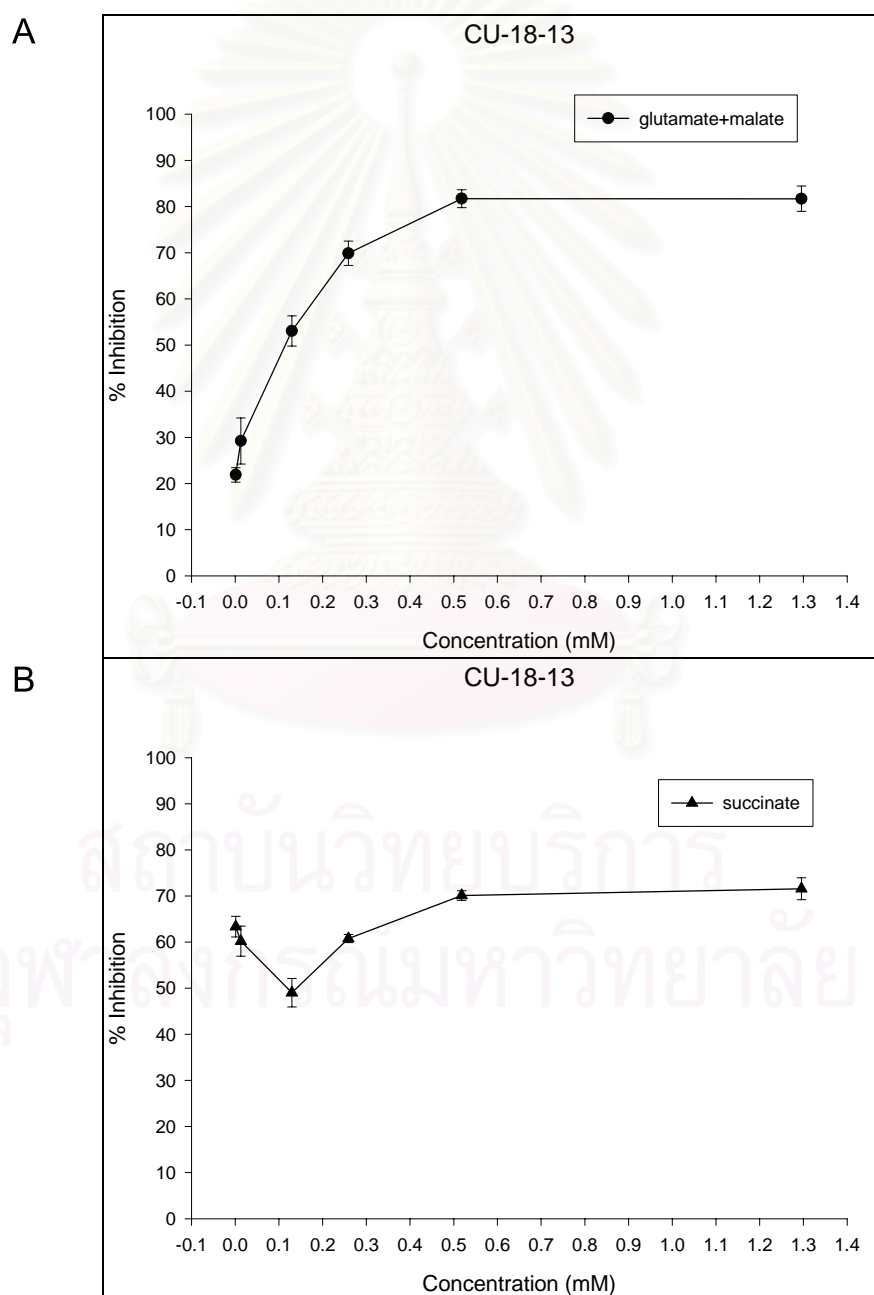
รูปที่ 32 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง(% Inhibition) ของ CU-18-10 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



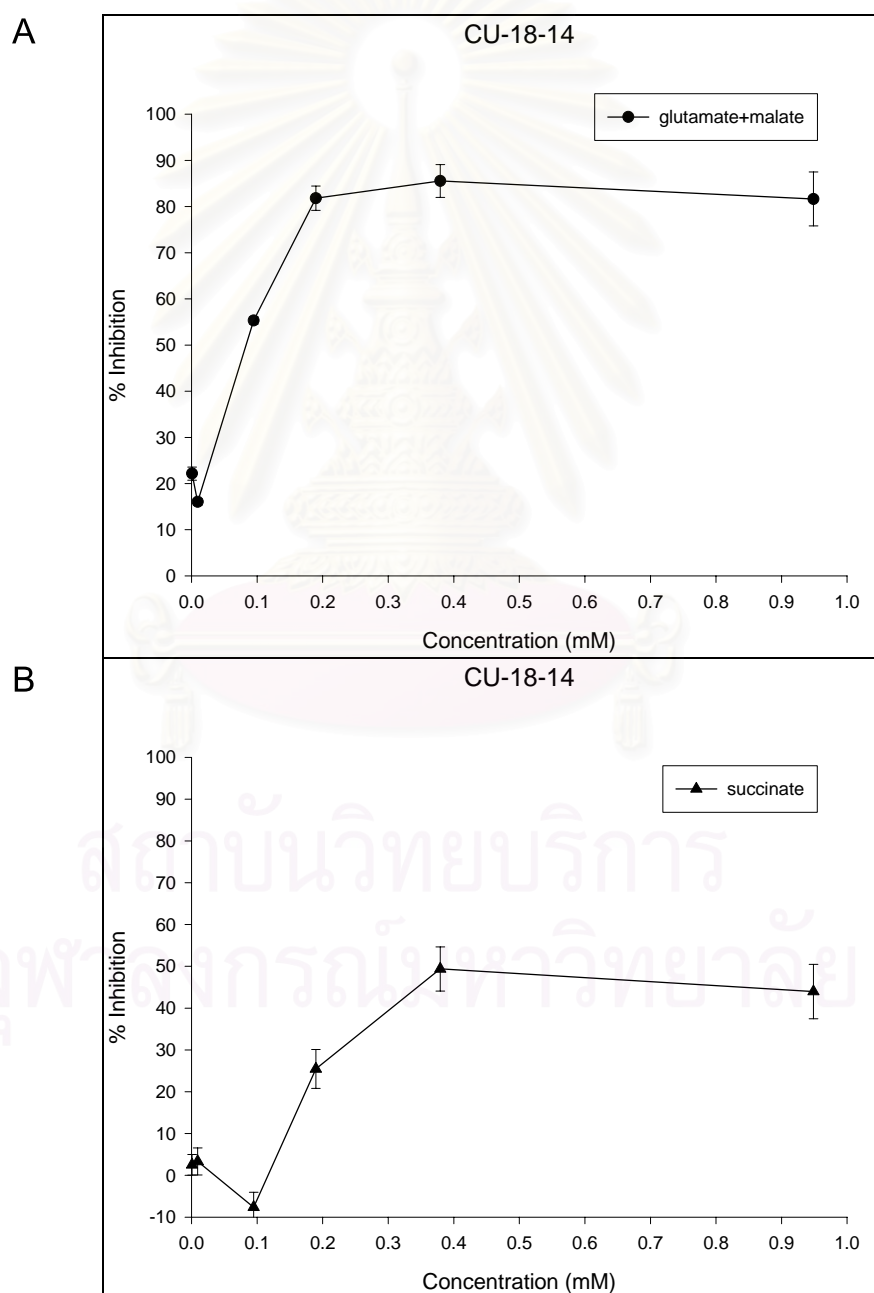
รูปที่ 33 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-13 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



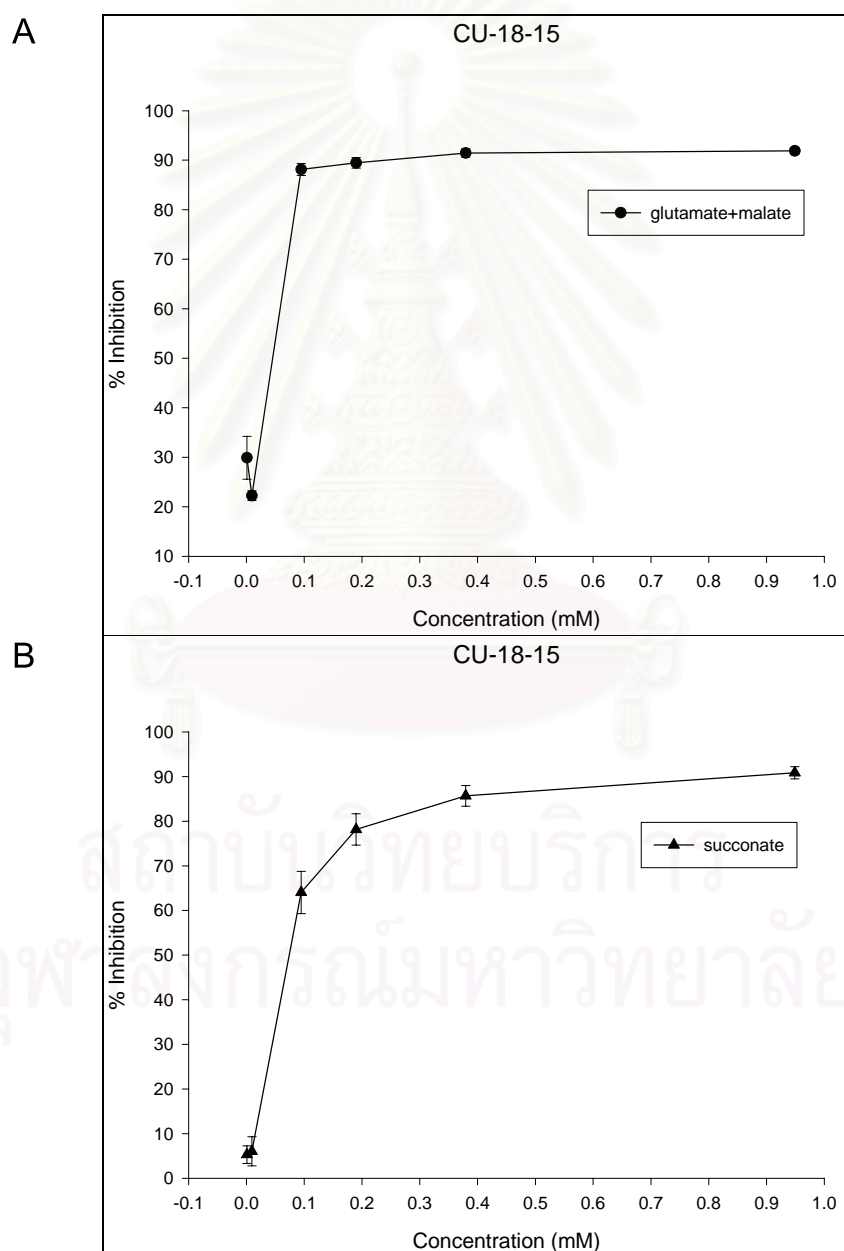
รูปที่ 34 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-14 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



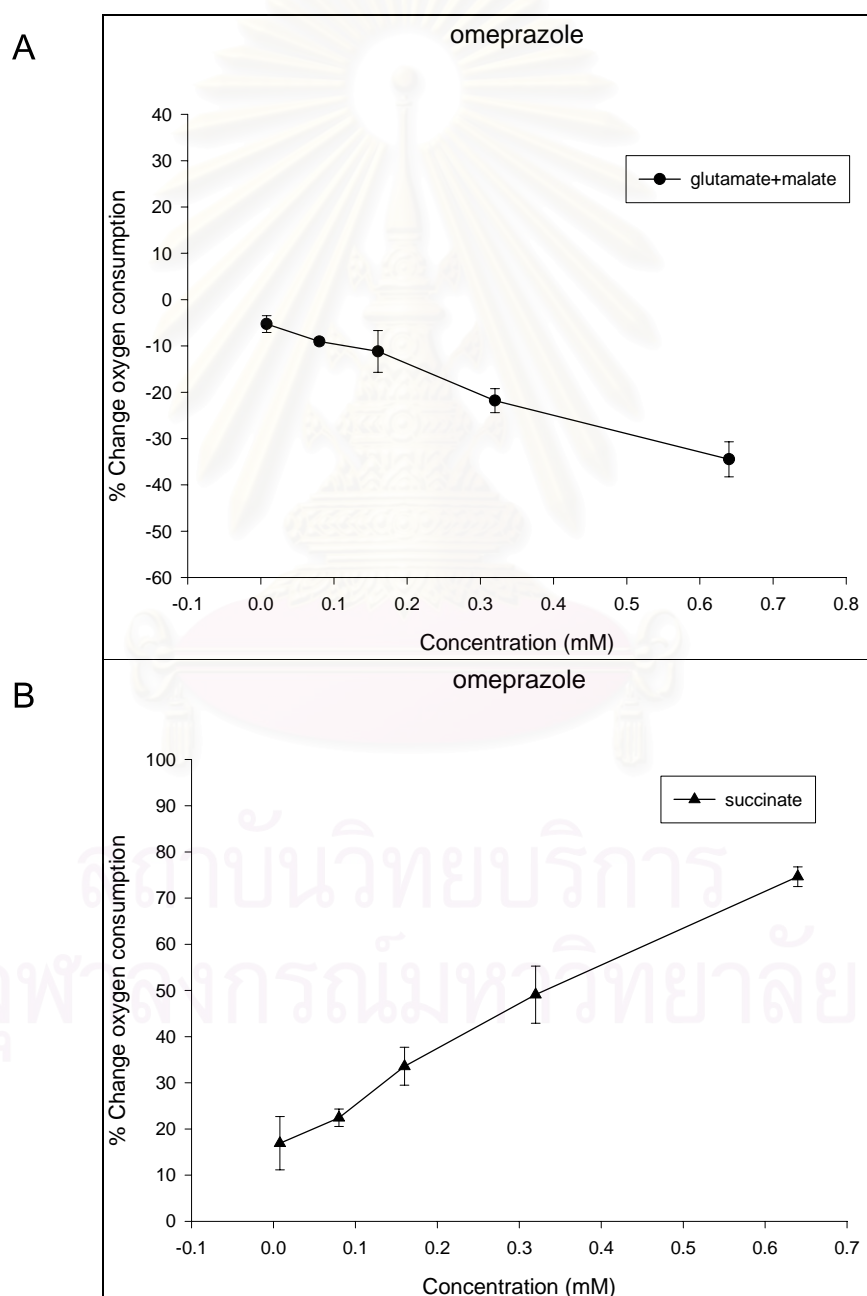
รูปที่ 35 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ CU-18-15 ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



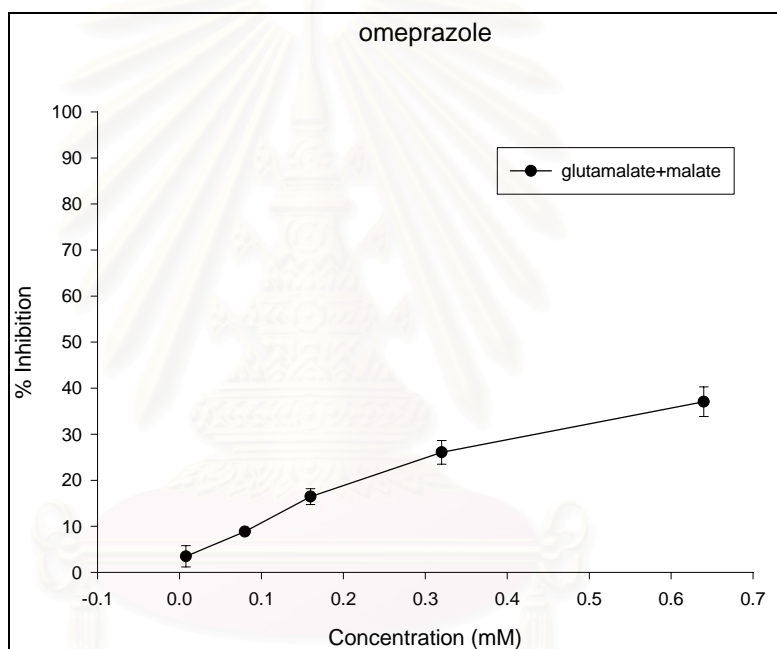
รูปที่ 36 อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 37 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย piroxicam (0.5 mM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4)

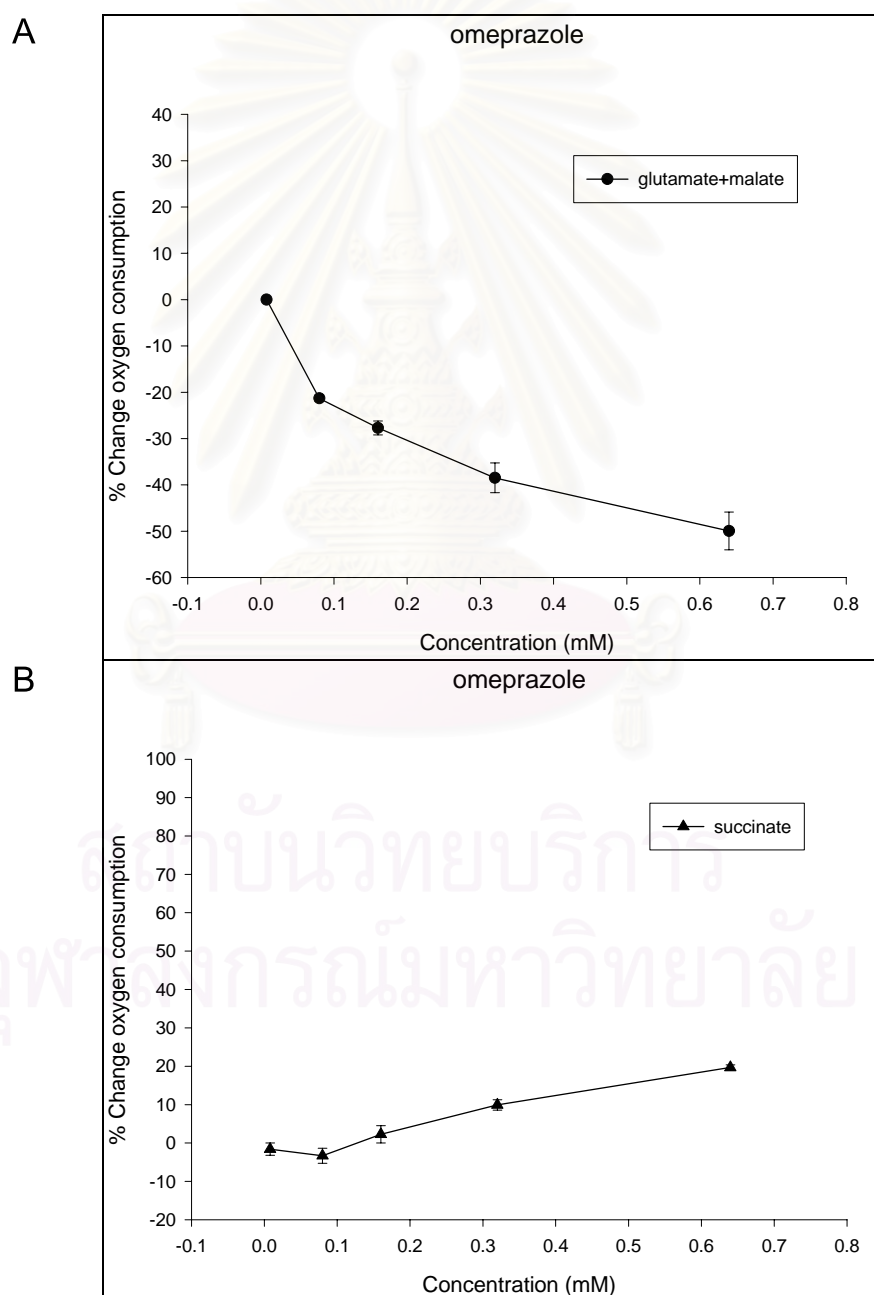
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

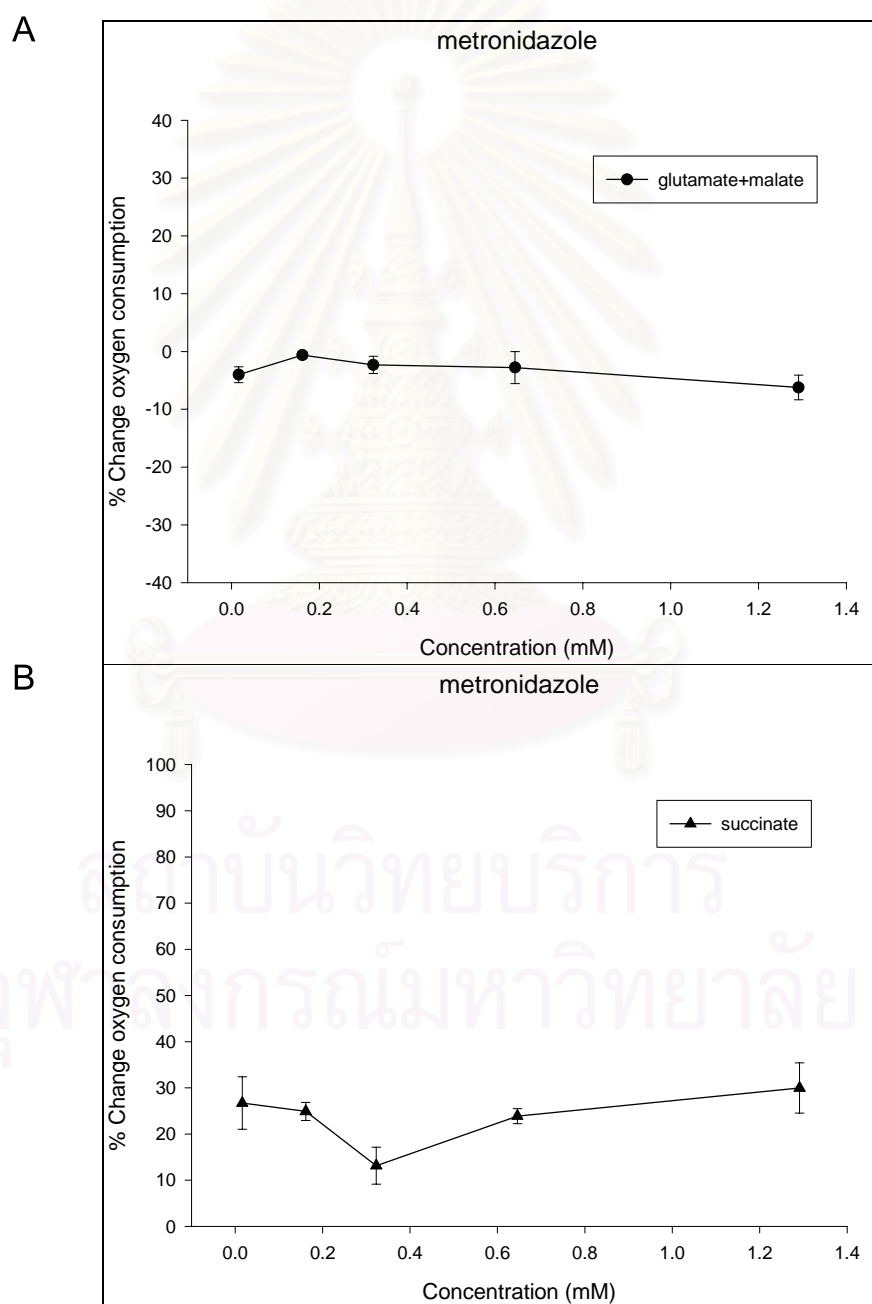
รูปที่ 38 อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ omeprazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



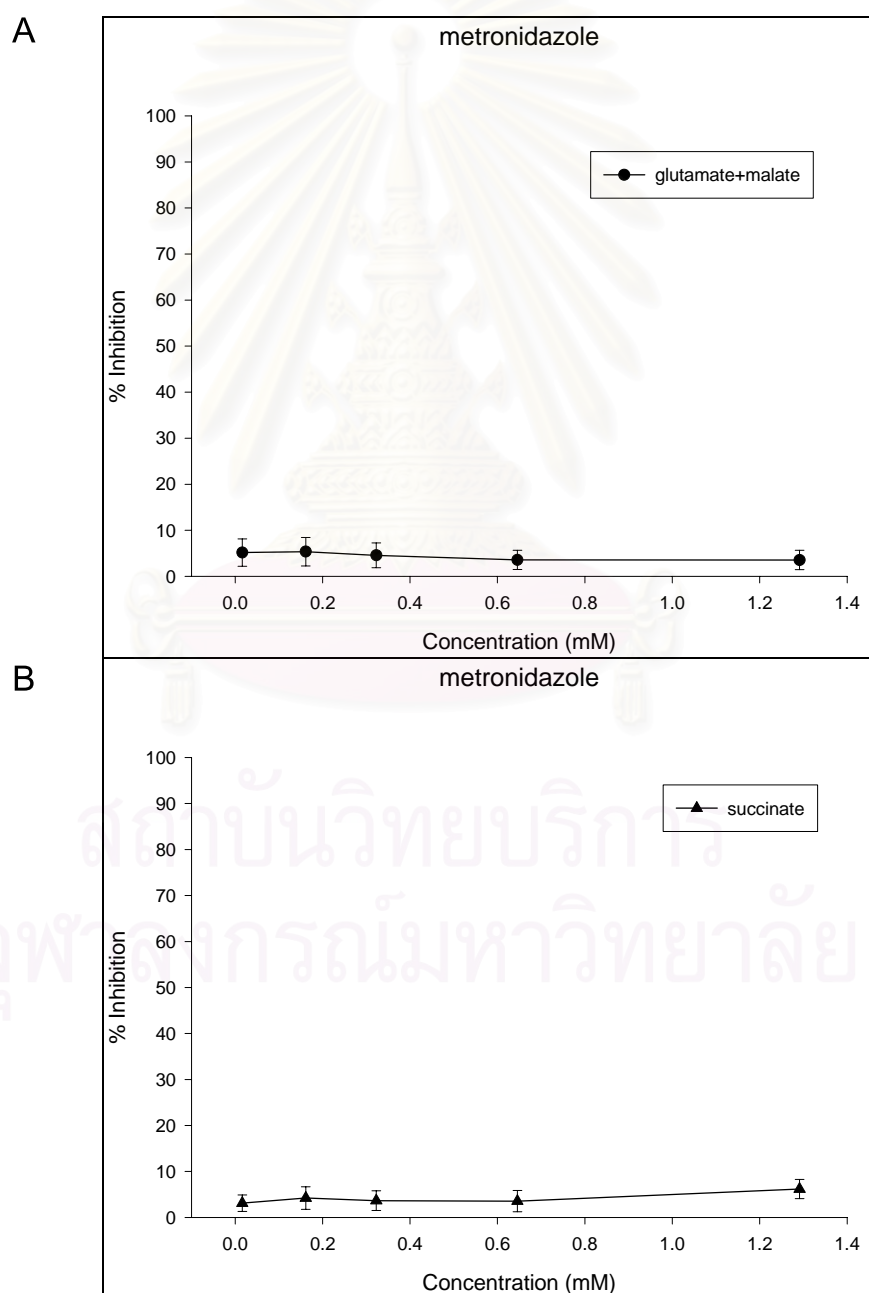
รูปที่ 39 อัตราการใช้ออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลง (% Change oxygen consumption) ของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (0.2 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 40 อัตราการหายใจที่ถูกยับยั้ง (% Inhibition) ของ metronidazole ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย nimesulide (0.1 mM) เมื่อใช้ (A) glutamate+malate เป็นสับสเตรท (n=4) และเมื่อใช้ (B) succinate เป็นสับสเตรท (n=4)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.20 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.91 mM $MgCl_2$, 88.09 mM KCl, 5.32 mM potassium glutamate+ 5.32 mM potassium malate, 6.65 mM sucrose ปริมาตรทั้งหมด 1.88 ml. อุณหภูมิ 37°C



ตารางที่ 5 แสดงความสามารถในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})
ของ CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14, CU-18-15

สาร ทดสอบ	IC_{50} (M)					
	Glutamate + Malate as substrate			Succinate as substrate		
	indomethacin	piroxicam	nimesulide	indomethacin	piroxicam	nimesulide
CU-18-07	$> 1.13 \times 10^{-3}$	1.27×10^{-3}	4.52×10^{-4}	-	5.26×10^{-4}	$< 1.13 \times 10^{-6}$
CU-18-09	3.67×10^{-4}	2.88×10^{-4}	9.67×10^{-5}	3.71×10^{-4}	1.97×10^{-4}	2.71×10^{-5}
CU-18-10	5.12×10^{-4}	4.23×10^{-4}	1.4×10^{-4}	2.45×10^{-5}	1.11×10^{-4}	5.28×10^{-5}
CU-18-13	9.76×10^{-4}	5.87×10^{-4}	2.57×10^{-4}	-	9.48×10^{-4}	1.76×10^{-6}
CU-18-14	9.97×10^{-4}	4.55×10^{-4}	2.26×10^{-4}	5.84×10^{-4}	4.47×10^{-4}	1.07×10^{-3}
CU-18-15	4.14×10^{-4}	2.81×10^{-4}	1.35×10^{-4}	3.37×10^{-4}	1.35×10^{-4}	2.84×10^{-4}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - แสดงว่าไม่มีผลในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงผลของ indomethacin, piroxicam, nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.1 mM ตามลำดับ และ 0.12mM DNP ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM MgCl₂, 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

สารทดสอบ	Pi liberate (μ moles/mg protein/10 min)
NON DMSO	21.47 \pm 0.29
DMSO	21.31 \pm 0.30
Indomethcin	23.29 \pm 0.35
Piroxicam	23.71 \pm 0.18
Nimesulide	25.38 \pm 0.31
DNP	41.31 \pm 7.53 *

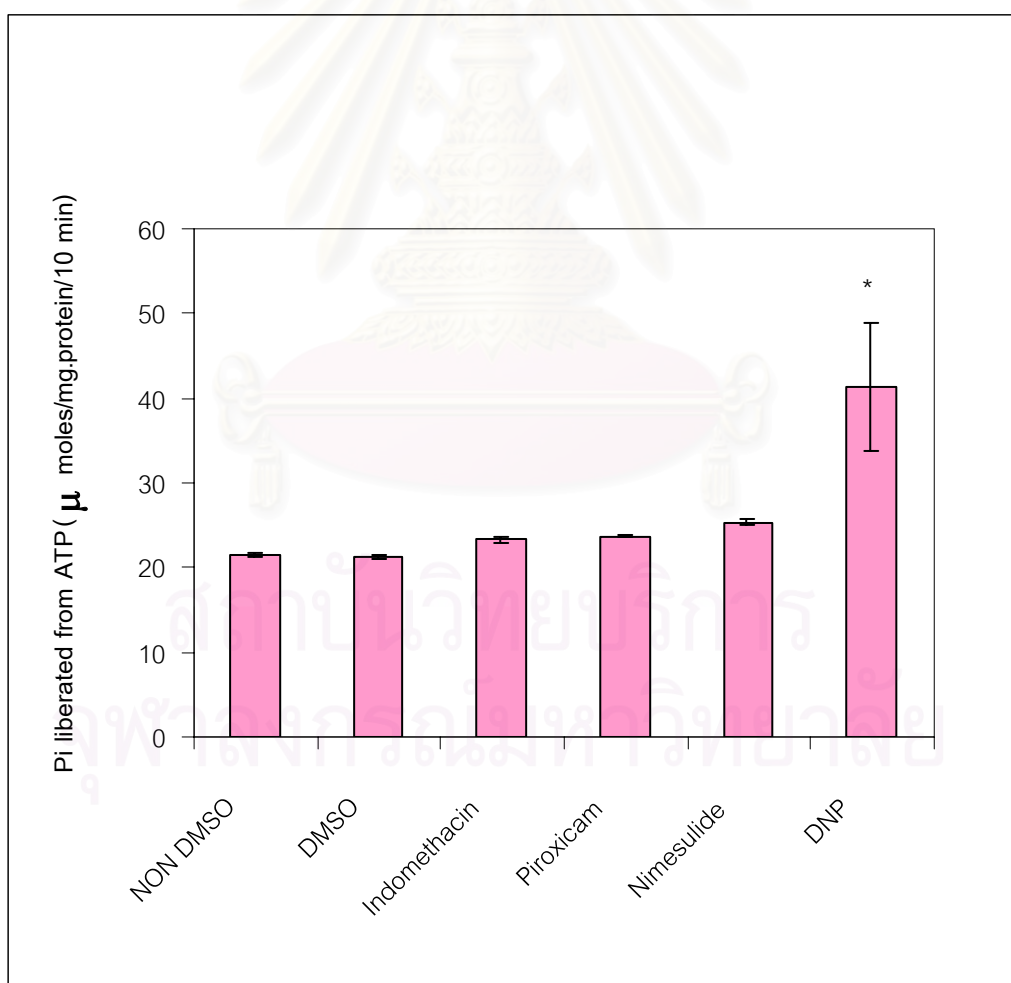
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 41 แสดงผลของ indomethacin, piroxicam, nimesulide ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 0.1 mM ตามลำดับ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM $MgCl_2$, 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ ศึกษาผลของอนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล ไนโตร เมตา เมทอกซี อะนิไลด์ ต่อฤทธิ์อันคัปปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ ที่มีต่อกระบวนการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย วิธีการศึกษาในครั้งนี้ใช้ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเป็นแม่แบบ (model) ใน การศึกษา ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่อยู่ในเซลล์มีหน้าที่สำคัญในการเป็นแหล่งเปลี่ยน พลังงานจากสารอาหารให้อยู่ในรูปของพลังงานเคมี คือ ATP โดยกระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดขึ้นที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ไมโตคอนเดรียได้ถูกนำมาใช้เป็น model ในการศึกษาทั้งในด้าน biochemical toxicology (Fowler et al., 1994) และ pharmacology (Szewczyk and Wojtczak, 2002) เช่น การศึกษาผลของสารพิษ (toxicant) เพื่อความเข้าใจถึง ความสัมพันธ์ระหว่าง particular metabolic functions และ physical integrity ของไมโตคอนเดรีย ได้แก่ โครงสร้าง ยกตัวอย่างเช่น การประเมินผลของ arsenate, methyl mercury ต่อไมโตคอนเดรีย *in vivo* (Fowler and Woods, 1977; Fowler and Woods, 1979; Fowler et al., 1979) และเป็นที่ ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่า การใช้ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวสามารถเป็นตัวแทนใน การศึกษาทางด้าน chemiosmotic coupling mechanism คือ กระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนใน electron transport chain และกระบวนการ oxidative phosphorylation ได้ (McLaughlin and Dilger, 1980) และไม่มี ความแตกต่างระหว่างความสามารถในการตอบสนองต่อ uncoupling agent หรือสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง respiratory chain ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากอวัยวะต่างๆ (Tyler, 1991)

มีการศึกษามากมายได้แสดงให้เห็นว่า NSAIDs แสดงฤทธิ์อันคัปปลิงต่อกระบวนการ หายใจของไมโตคอนเดรีย เช่น Insel (1996) ทำการศึกษาพบว่า aspirin และ indomethacin มี ฤทธิ์อันคัปปลิงต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย ซึ่งความเข้มข้นของ NSAIDs ส่วนใหญ่ เช่น aspirin, indomethacin และ acidic NSAIDs ตัวอื่นๆ แสดงฤทธิ์อันคัปปลิงที่ความเข้มข้นต่ำ (0.03 mM – 1.5 mM) และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ความเข้มข้นสูง (Kawai et al., 1985; Mahmud et al., 1996; Somasundaram et al., 1997) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Somasundaram และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า indomethacin, aspirin และ DNP ในช่วงความ เข้มข้น 30-1000 μ M แสดงฤทธิ์กระตุ้นการหายใจ (อันคัปปลิง) ของไมโตคอนเดรียของตับหนูขาว

และ Krause และคณะ (2003) ทำการศึกษาและพบว่า NSAIDs (diclofenac, indomethacin และ SC-236 ซึ่งเป็น selective COX-2 inhibitor) มีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เป็นยาที่ใช้กันแพร่หลายมากในการบำบัดอาการอักเสบของข้อ กล้ามเนื้อ แต่ยาในกลุ่ม NSAIDs มีผลเสียต่อร่างกายที่สำคัญคือ ทำให้เกิดอันตรายต่อทางเดินอาหาร โดยทำให้มีอาการตั้งแต่เล็กน้อยเช่น ปวดท้อง ไปจนถึงขั้นรุนแรงเป็นแผลและถึงขั้นแผลทะลุเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ได้มีความพยายามที่จะแก้ไขหรือป้องกันผลเสียต่อทางเดินอาหารของ NSAIDs ตั้งแต่มีการใช้ยาร่วม (co-administration) เช่น ยาลดกรด (antacids) ยาต้านฮิสตามีนชนิด H₂-receptor antagonist และ proton pump inhibitors และปัจจุบันได้มีการพัฒนาตัวยา NSAIDs ในกลุ่ม specific COX-2 inhibitors เช่น celecoxib และ rofecoxib ขึ้นมา อย่างไรก็ตาม specific COX-2 inhibitors เหล่านี้ ก็ยังคงมีผลเสียต่อทางเดินอาหารได้แม้จะน้อยกว่า NSAIDs ที่มีใช้อยู่เดิม (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000) กระบวนการที่ NSAIDs ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหารนั้น มีความซับซ้อนและไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Wallace, 1992; Whittle, 1992; Somasundaram et al, 1995) กลไกที่ NSAIDs ทำให้เกิดแผลในทางเดินอาหารอาจแบ่งออกเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับ PGs (Prostaglandin dependent) และไม่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGs (Prostaglandin independent) แต่กลไกที่สำคัญคือการที่ NSAIDs ยับยั้ง COX-1 มีผลให้การสร้าง PGs ลดลง เป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดแผลทางเดินอาหาร ส่วนกลไกทางด้านที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGs เช่น NSAIDs แสดงคุณสมบัติเป็น ion trapping , NSAIDs มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย เป็นกลไกเสริม (Somasundaram et al, 2000; Jacob, 2001) ได้มีความพยายามศึกษาถึงรายละเอียดของ คุณสมบัติของ NSAIDs ที่จะใช้นำมาอธิบายถึงกลไกการทำให้เกิดแผลในด้านที่ไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้าง PGs พบว่า NSAIDs ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย และมีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (Whitehouse, 1964; Mahmud, 1996; Mingatto; 1996; Petrescu, 1997; Moreno-Sanchez, 1999; Jacob, 2001) รมบวนการสร้างพลังงานของไมโตคอนเดรีย มีการสังเคราะห์ ATP ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร ทำให้เกิด intestinal permeability เพิ่มขึ้นส่งผลให้ GI barrier function เสียไป (Schoen and Vender, 1989; Mahmud; 1996; Mahmud, 1998; Somasundaram et al, 1997; Sigthorsson et al, 2000) ซึ่ง intestinal epithelial barrier มีความสำคัญโดยมีหน้าที่หลัก 3 ประการคือ (1) Absorption คือ ทำหน้าที่ขนส่ง fluid, electrolyte และสารอาหารต่างๆผ่านผนังลำไส้ (intestinal wall) (2) Protection คือทำหน้าที่ปกป้องไม่ให้สารพิษ antigen หรือ pathogenic molecules ดูดซึมเข้าสู่

กระแสเลือด (3) Immune function คือทำหน้าที่ปล่อย IgA ซึ่งไปจับกับ bacteria หรือ antigen ในการปกป้องไม่ให้มาทำลาย epithelial cell (Miller, 1997)

ผลการศึกษากฤทธิ์อันค้ำปลิงของยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ indomethacin, piroxicam และ nimesulide พบว่าในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 2 mM NSAIDs ทั้ง 3 ชนิด แสดงฤทธิ์อันค้ำปลิงต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีฤทธิ์กระตุ้นอัตราการหายใจ state 4 ซึ่งความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียได้สูงสุดของ NSAIDs แต่ละชนิดมีค่าไม่เท่ากัน โดยจะมีค่าเท่ากับ 0.2, 0.5 และ 0.1 mM ตามลำดับ (ตารางที่ 4) จากผลการศึกษาผลของ NSAIDs ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย พบว่า NSAIDs ทั้งสามชนิดไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity ซึ่งทำการเปรียบเทียบกับ DNP (ตารางที่ 6) ซึ่งเป็นสาร uncoupler ซึ่งสาร DNP นี้มีคุณสมบัติกระตุ้น ATPase ทำให้เกิดการสลายตัวของ ATP (ATP hydrolysis) ทำให้ Pi ถูกปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น (Cambell, 1995; Lehninger et al, 2000; Garrett and Grisham, 2002) ได้มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์อันค้ำปลิงของ NSAIDs น่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเปิดของ PTP (Szewczyk and Wojtczak, 2002)โดยมีการศึกษามาก่อนแล้วว่า nimesulide กระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ไหลออกของ Ca^{2+} และแสดงฤทธิ์กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ PTP (Mingatto et al., 2000) piroxicam ที่ความเข้มข้นต่ำๆแสดงฤทธิ์กระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ไหลออกของ Ca^{2+} และกระตุ้นให้มีการเปิดของ PTP ใน renal cortex mitochondria (Pigoso et al., 1998) ส่วน indomethacin ซึ่งเป็น carboxylic acid แสดงคุณสมบัติเป็น protonophore คือมีลักษณะเป็น hydrophobic weak acid จะไปจับกับโปรตอนแล้วพาผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียเข้าสู่ matrix ได้ (McLaughlin and Dilger, 1980) (รูปที่ 9)

Leite และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษากฤทธิ์ในการป้องกัน (protective effect) ของ metronidazole ต่อการเกิดอันค้ำปลิงของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ที่เกิดจาก NSAIDs โดยผลการศึกษาพบว่า metronidazole สามารถลดการเกิดแผลในลำไส้ของหนูขาว และลดค่า intestinal permeability ที่เพิ่มขึ้น จาก indomethacin ได้ (in vivo) และเมื่อทำการศึกษาในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวพบว่า หนูในกลุ่มที่ได้รับ metronidazole มีอัตราการหายใจ state 4 ของไมโตคอนเดรียที่เพิ่มขึ้นจาก indomethacin ลดลงได้ ซึ่ง Somasundaram (1995) ได้เสนอแนวความคิดว่า การเกิดอันค้ำปลิงของกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย NSAIDs เป็นกลไกหนึ่งของ NSAIDs ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดแผลทางเดินอาหาร ซึ่งผลจากการศึกษานี้เป็นแนวความคิดในงานวิจัยโดยมีสมมติฐานว่า สารใดที่สามารถยับยั้งฤทธิ์อันค้ำปลิงของ NSAIDs

(*in vitro*) ได้ ก็อาจจะมีผลทำให้อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นต่อระบบทางเดินอาหารเนื่องจาก NSAIDs ลดลงได้

ผลการศึกษานอนุพันธ์ เอน เฮพทาโนอิล อะนิไลด์ ซึ่งได้แก่ CU-18-07, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 ต่อฤทธิ์อันคัปปลิงของ NSAIDs ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย พบว่า

(1) เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย indomethacin (0.2 mM) และเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท พบว่า CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50% (IC_{50}) จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-09, CU-18-15, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ CU-18-07 มีผลน้อยมากในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท CU-18-09, CU-18-10, CU-18-14, CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมี IC_{50} จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-15, CU-18-10, CU-18-09, CU-18-14 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ CU-18-07 และ CU-18-13 ไม่มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย

(2) เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย piroxicam (0.5 mM) พบว่า เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท สารทุกตัวมีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีค่า IC_{50} จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-15, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-14, CU-18-13, CU-18-07 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท สารทุกตัวมีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีค่า IC_{50} จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-10, CU-18-09, CU-18-15, CU-18-14, CU-18-07, CU-18-13 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

(3) เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย nimesulide (0.1 mM) พบว่า เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท สารทุกตัวมีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีค่า IC_{50} จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-09, CU-18-15, CU-18-10, CU-18-14, CU-18-13, CU-18-07 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท CU-18-09, CU-18-10, CU-18-13, CU-18-14 และ CU-18-15 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีค่า IC_{50} จากน้อยไปมากสรุปได้ดังนี้คือ CU-18-13, CU-18-09, CU-18-10, CU-18-15, CU-18-14 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

Omeprazole ซึ่งเป็น PPIs เป็นยากลุ่มหนึ่งซึ่งใช้ในการรักษาและป้องกันการเกิดแผลในทางเดินอาหารจาก NSAIDs (Byron and Feldman, 1998; Chan and Leung, 2002) เมื่อนำมา

ศึกษาในฤทธิ์ทางด้านการยับยั้งฤทธิ์อันค้ำปลิงของ NSAIDs โดยศึกษาในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ผลการศึกษาพบว่า เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย indomethacin (0.2 mM) และ nimesulide (0.1 mM) omeprazole มีผลลดการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ในปริมาณน้อย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท ในขณะที่เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท omeprazole แสดงฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย piroxicam (0.5 mM) พบว่า omeprazole มีผลลดการหายใจของ ไมโตคอนเดรียได้เล็กน้อย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท ในกรณีของ omeprazole นั้น ตัวยาจะออกฤทธิ์ได้นั้นจะต้องอยู่ในตัวกลางที่เป็นกรด ส่วนที่ได้ผลไม่ชัดเจนในงานวิจัยนั้นอาจจะเป็นการศึกษา *in vitro*

Metronidazole ซึ่งเป็น antibiotic ตัวหนึ่งซึ่งใช้ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารที่มีภาวะติดเชื้อ *H. pylori* (Hoogerwerf and Pasricha, 2001, Rang et al., 2003) จากการศึกษาของ Leite และคณะ (2001) ทำการศึกษาแบบ *in vivo* พบว่า metronidazole สามารถลดแผลในลำไส้หนูขาวที่ได้รับ metronidazole ซึ่งพบว่า metronidazole มีฤทธิ์ลดฤทธิ์อันค้ำปลิงของไมโตคอนเดรียจาก indomethacin ได้ ในการศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ผลการศึกษาพบว่า เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยใช้ indomethacin (0.2 mM) metronidazole มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้เล็กน้อย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท ในขณะที่เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท metronidazole มีผลกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย nimesulide (0.1 mM) metronidazole มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ในปริมาณต่ำ และเมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย piroxicam (0.5 mM) พบว่า metronidazole ไม่มีผลในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับ biotransformation ของ metronidazole ในร่างกายเปลี่ยนไปเป็น 1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole (Pendland et al., 1994)

จากการพิจารณาโครงสร้างของสารร่วมกับการออกฤทธิ์ของ อนุพันธ์ เอน เฮพทานอลิโดอะนิไลด์ในการปกป้องฤทธิ์อันค้ำปลิงจาก NSAIDs หากพิจารณาหมู่ของสารที่เติมลงไปใน benzene ring โดยการเติมหมู่ $-OCH_3$ (CU-18-07) หรือเติมหมู่ $-NO_2$ (CU-18-09 และ CU-18-10) หรือเติมหมู่ $-OCH_3$ ร่วมกับหมู่ $-NO_2$ (CU-18-14 และ CU-18-15) หรือไม่มีการเติมหมู่ใดๆเลย (CU-18-13) พบว่าจะมีคุณสมบัติเหมือนกันคือ การออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย NSAIDs เมื่อใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท ยกเว้น

เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดย indomethacin พบว่า CU-18-07 และ CU-18-13 ไม่มีผลยับยั้งฤทธิ์อันค้ำปลิงของ indomethacin เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท และเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารทดสอบต่อฤทธิ์อันค้ำปลิงของ NSAIDs ทั้งสามชนิดจากน้อยไปมาก สรุปได้ว่า CU-18-09, CU-18-10 และ CU-18-15 มีค่า IC_{50} ต่ำอยู่ในช่วงสามอันดับแรก และจากข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ ททัยรัตน์ (2546) พบว่า การเติมหมู่ $-OCH_3$ ลงไปใน benzene ring สารจะมีฤทธิ์กดการหายใจน้อยที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการเติมหมู่ $-NO_2$ ไม่ว่าจะที่ตำแหน่ง meta หรือ para ก็ตาม สารจะมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP แต่ความแรงในการยับยั้งการหายใจที่ Complex I จะต่างกัน คือการเติมหมู่ $-NO_2$ ในตำแหน่ง para (CU-18-09) จะแรงกว่าตำแหน่ง meta (CU-18-10) ถึง 5 เท่า ดังนั้นเมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารแล้ว CU-18-15 น่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาต่อไปเป็นสารที่ใช้ร่วมกับ NSAIDs ในการลดอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลในด้านอื่นๆด้วย เช่น การให้สารชนิดนี้ร่วมกับ NSAIDs แล้วทำให้ฤทธิ์ในการลดการอักเสบของ NSAIDs เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ มีการศึกษาฤทธิ์เกี่ยวกับด้านพิษวิทยาของสารชนิดนี้และควรมีการศึกษาทดลอง *in vivo* โดยให้ร่วมกับ NSAIDs แล้ววัดอัตราการเกิดแผลในทางเดินอาหาร เป็นต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

หทัยรัตน์ เชื้อนแสน. ผลของอนุพันธ์เอซิดอะมิโนไพริดีนและเอซิดอะนินต่อหน้าที่กระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.

ภาษาอังกฤษ

Alberto, L. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual NSAIDs. Lancet 1994; 343: 769-772.

Al-Nasser, I. A. Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A. Toxicol Lett 1999; 105: 1-8.

Altman, D. V. Drug used in gastrointestinal diseases. In: Katzung, B. G., Basic & Clinical Pharmacology, 5th ed, 888-892. USA: Appleton&Lange, 1992.

Anders, W. U. Effect of omeprazole and ranitidine on ulcer healing and relapse rates in patients with benign gastric ulcer. N Eng J Med 1989; 320: 69-75.

Andrew, H. S. Medical treatment of peptic ulcer disease. JAMA 1996; 275: 622-629.

Ateshkadi, A., Lam, N. P., and Johnson, C. A. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. Clin Pharm 1993; 12: 34-48.

Avers, C. J. Molecular Cell Biology, 305-362. California: Benjamin/Cummings Publishing, 1986.

- Bardhan, K. D. The prevention and healing of NSAID damage by misoprostol. Br J Rheumatol 1993; 32: 990-995.
- Bennett, P. N., and Brown, M. J. Oesophagus, stomach and duodenum. Clinical Pharmacology, 9 th ed, 625-632. Spain: Churchill Livingstone, 2003.
- 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 1975; 376: 492-504.
- Boelsterli, U. A. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology 2003; 192: 307-322.
- Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Vargas, R. B., Davis, B., et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. N Eng J Med 2000; 343: 1520-1528.
- Brody, T. M., Lerner, J. L., and Minneman, K. P. Pain and inflammation control with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Human Pharmacology Molecular to Clinical, 3 rd ed, 411. USA: Mosby-Year Book, 1998.
- Brune, K., Schweitzer, A., and Eckert, H. Parietal cells of the stomach trap salicylates during absorption. Biochem Pharmacol 1977; 26: 1735-1740.
- Bayron, C., and Feldman, M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The American Journal of Medicine 1998; 104: 413-421.
- Cambell, M. K. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 3 rd ed, 391-417. New York: Wiley-Liss, 1995.

Chan, F. K., and Leung, W. K. Peptic-ulcer disease. Lancet 2002; 360: 933-941.

Chance, E., and Williams, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymology. 1956; 17: 65-134.

Chey, W. D., and Scheiman, J. M. Peptic ulcer disease. In: Friedman, S. L., McQuaid, K. R., Grendell, J. H. Current Diagnosis&Treatment in Gastroenterology, 2 nd ed, 323-341. USA : McGraw-Hill, 2003.

Davies, N. M., Saleh, J. Y., and Skjodt, N. M. Detection and prevention of NSAID-induced enteropathy. J Pharm Pharm Sci 2000; 3: 137-155.

Edwin, N. L. Gastroduodenal mucosa and dyspeptic symptoms in arthritic patients during chronic NSAID use. Am J Med 1987; 82: 1153-1158.

Ehsanullah, R. S. B., Page, M. C., Tildesley, G., and Wood, J. R. NSAID- induced gastroduodenal damage: effect of ranitidine propylaxis. Gastroenterology 1988; 94: A111.

Erecinska, M., and Wilson, D. F. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitors of mitochondrial functions, 199-210. Oxford: Pergamon, 1981.

Fenn, G. C. Review article: controversies of NSAID-induced gastroduodenal damage- do they matter?. Aliment Pharmacol Ther 1994; 8: 15-26.

Fiske, O. H., and Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 1925; 66: 375-400.

Fowler, B. A., Kleinow, K. M., Squibb, K. S., Lucier, G. W. and Hayes, A. W. Organelles as tools in toxicology. Principles and Methods of Toxicology, 3 rd ed, 1201-1228. USA: Raven Press Ltd, 1994 .

Fowler, B. A., and Woods, J. S. The transplacental toxicity of methyl mercury to fetal rat liver mitochondria: morphometric and biochemical studies. Lab Invest 1977; 36: 122-130.

Fowler, B. A., and Woods, J. S. The effects of prolonged oral arsenate exposure on liver mitochondria of mice: morphometric and biochemical studies . Lab Invest 1979; 50: 177-187.

Fowler, B. A., Woods, J. S., and Schiller, C. M. Studies of hepatic mitochondrial structure and function: morphometric and biochemical evaluation of *in vivo* perturbation by arsenate. Lab Invest 1979; 41: 313-320.

Frolich, J. C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci 1997; 18: 30-34.

Fromm, D. How do non-steroidal anti-inflammatory drugs affect gastric mucosal defense?. Clin Invest Med 1987; 10: 251-258.

Garrett, R. H., and Grisham, C. M. Electron transport and oxidative phosphorylation. Principles of Biochemistry with a Human Focus, 519-551. Philadelphia: Harcourt College, 2002.

Graham, D. Y. Prevention of NSAID – induced gastric ulcer with misoprostol: Multicentre, Double-blind, Placebo controlled Trial. Lancet 1988;DEC3: 1277-1280.

Graham, D. Y. Prevention of gastrododenal injury induced by chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. Gastroenterology 1989; 96: 675-681.

Graham, D. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. Ann Intern Med 1993; 119: 257-262.

Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.

Ann Rev Biochem 1985; 54: 1015-1069.

Haugaard, N., Lee, N. H., Kostrzewa, R., Horm, R. S., and Haugard, E. S. The role of sulhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochem.Biophys. Acta. 1969; 172: 198-204.

Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., and van Ackem, K. Lipid mediators in inflammatory disorders. Drugs 1998; 55: 487-496.

Hodgson, E., and Smart, R. C. Effects of toxicants on electron transport and oxidative phosphorylation. Introduction to biochemical toxicology, 3 rd ed, 309-324. New York: John Wiley & Sons, 2001.

Hogeboom, G. H. Fractionation of cell components of animal tissues. In: Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. Methods in enzymology, vol I. 16-19. New York: Academic Press, 1955.

Hollander, D. Gastrointestinal complication of NSAIDs: prophylactic and therapeutic strategies. Aliment Pharmacol Ther 1994; 96: 274-281.

Hoogerwerf, W. A., and Pasricha, P. J. Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. In: Wonsiewicz, M. J., Morriss, J. M. Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of the Therapeutics, 10 th ed, 1005-1020. USA: McGraw-Hill, 2001.

Hui, W. M. Update on treatment of duodenal ulcer disease. Drug Today 1991; 27: 55-63.

Insel, P. A. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman, J. G. and Limbird, L. E. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 th ed, 617-644. New York: McGraw-Hill, 1996.

- Jacob, M., Bjarnason, I., Rafi, S., Wrigglesworth, J., and Simpson, R. J. A study of the effects of indomethacin on liver mitochondria from rats, mice and humans. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 1837-1842.
- Jacob, M., Bjarnason, I., and Simpson, R. Effects of indomethacin on energy metabolism in rat and human jejunal *in vitro*. Clinical Science 2001; 101: 493-498.
- Jacob, M., Bjarnason, I., and Simpson, R. Effects of indomethacin on energy metabolism in rat jejunal tissue *in vivo*. Clinical Science 2002; 102: 541-546.
- John, F. R. Upper and lower GI bleeding in the elderly. Gastro Clin NA 1990; 19: 293-317.
- Jones, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. The American Journal of Medicine 2001; 110(1A): 4S-7S.
- Jouzeau, J-Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., and Netter, P. Cyclo-oxygenase isoenzymes, how recent findings affect thinking about non-steroidal anti-inflammatory drugs. Drugs 1997; 53: 563-582.
- Kam, P. C. and See, A. U. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. Anesthesia 2000; 55: 442-449.
- Kawai, K., Shiojiri, H., Fukushima, H., et al. The inhibition of mitochondrial respiration by indomethacin, a non-steroid anti-inflammatory agent possessing inhibitory effect on prostaglandin biosynthesis. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1985; 48: 267-274.
- Krause, M. M., Brand, M. D., Krauss, S., Meisel, C., Vergin, H., Burmester, G. R., et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and a selective cyclooxygenase 2 inhibitor uncouple mitochondria in intact cells. Arthritis & Rheumatism 2003; 48:1438-44.

Laurence, D. R., Bennett, P. N., and Brown, M. J. Clinical Pharmacology, 8 th ed, 249-251. New York: Churchill Livingstone, 1997.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Principles of Biochemistry. 3 rd ed, 659-721. New York: Worth Publishers, 2000.

Leite, A. Z. A., Sipahi, A. M., Damiao, A. O. M. C., Coelho, A. M. M., Garcez, A. T., Machado, M. C. C., et al. Protective effect of metronidazole on uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation induced by NSAIDs: a new mechanism. Gut 2001; 48: 163-167.

Lipsky, L. P. E., Abramson, S. B., Crofford, L., Dubois, R. N., Simon, L. S., and van de Putte, L. B. A. The classification of cyclooxygenase inhibitors [editorial]. J Rheumatol 1998; 25: 2298-303.

Lowry, O. H., Roseveoufh, N. J., Farr, A. L., and Randal, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.

Mahmud, T., Rafi, S. S., Scott, D. L., Wrigglesworth, J. M., and Bjarnason I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Arthritis & Rheumatism 1996; 39: 1998-2003.

Mahmud, T., Scott, D. L., and Bjarnason, I. A unifying hypothesis for the mechanism of NSAID related gastrointestinal toxicity. Ann Rheum Dis 1996; 55: 211-213.

Mahmud, T., Somasundaram, S., Sigthorsson, G., Simpson, R. J., Rafi, S., Foster, R., et al. Enantiomers of flurbiprofen can distinguish key pathophysiological steps of NSAID enteropathy in the rat. Gut 1998; 43: 775-782.

- Marie, R. G. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and death from peptic ulcer in elderly persons. Ann Int Med 1988; 109: 359-363.
- Masubuchi, Y., Yamada, S., and Horie, T. Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochem Pharmacol 1999; 58: 861-865.
- McEvoy, G. K. (ed.). AHFS Drug Information, 40 th ed, 2608-2696. MD: American Society of Hospital Pharmacist Inc., 2000.
- McGuigan, J. E. Peptic ulcer and gastritis. In: Wilson, J. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 12 th ed, vol 2, 1229-1238. New York: McGraw-Hill, 1991.
- McLaughlin, S. G., and Dilger, J. P. Transport of protons across membranes by weak acids. Physiol Rev 1980; 60: 825-863.
- Michael, P. S. NSAIDs and pain free peptic ulceration in the elderly. BMJ 1988; 297: 833-834.
- Miller, G. L. Protein determination for large numbers of samples. Anal Chem 1959; 31: 964.
- Miller, A. L. The pathogenesis, clinical implications, and treatment of intestinal hyperpermeability. Alternative Medicine Review 1997; 2: 330-345.
- Mingatto, F. E., Cardozo Dos Santos, A., Rodrigues, T., Pigoso, A. A., Uyemura, S. A., and Curti, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. Br J Pharmacol 2000; 131: 1154-1160.

- Mingatto, F. E., Santos, A. C., Uyemura, S. A., Jordan, M.C., and Curti, C. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. Arch Biochem Biophys 1996; 334: 303-308.
- Moreno-Sanchez, R., Bravo, C., Vasquez, C., Ayala, G., Silveira, L. H., and Martinez-Lavin, M. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. Biochem Pharmacol 1999; 57: 743-752.
- Myers, D. K., and Slater, E. C. The enzyme hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria I. Activities at difference pH value. Biochem J 1957; 67: 558-572.
- Norman, H. G. Peptic ulcer disease in elderly. Gastro Clin NA 1990; 19: 255-271.
- Pendland, S. L., Piscitelli, S. C., Schreckenberger, P. C., and Danziger, L. H. In vitro activities of metronidazole and its hydroxy metabolite against *Bacteroides* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1994; 38: 2106-2110.
- Petrescu, I., and Tarba, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. Biochim Biophys Acta 1997; 1318: 385-394.
- Pigoso, A. A., Uyemura, S. A., Santos, A. C., Rodrigues, T., Mingatto, F. E., and Curti, C. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of the mechanisms involved. Int J Biochem Cell Biol 1998; 30: 961-995.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., and Moore, P. K. The gastrointestinal tract. Pharmacology, 5 th ed, 367-72. UK: Churchill Livingstone, 2003.

- Richardson, C. T. Peptic ulcer: pathogenesis. In: Wyngaarden, J. B., Smith, L. H., Bennett, J. C., eds. Cecil Textbook of Medicine, 19 th ed, vol 1. 652-5. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992.
- Richardson, C., and Emery, P. The clinical implications of inhibitor of the inducible form of cyclooxygenase. Drug saf 1996; 15: 249-60.
- Schoen, R. T., and Vender, R. J. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. Am J Med 1989; 86: 449-458.
- Senior, A. E. The structure of mitochondrial ATPase. Biochem Biophys Acta 1973; 301: 249-277.
- Sherine, E. G. Risk for serious gastrointestinal complication related to use of NSAIDs. A meta-analysis. Ann Int Med 1991; 115: 787-796.
- Sigthorsson, G., Jacob, M., Wrigglesworth, J., Somasundaram, S., Tavares, I., Foster, R., et al. Comparison of indomethacin and nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on key pathophysiologic steps in the pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in the rat. Scand J Gastroenterol 1998; 33: 728-735.
- Sigthorsson, G., Tibble, J., Mahmud, T., and Bjarnason, I. NSAID-induced gastrointestinal damage: the biochemical consequences of the 'ion trapping' hypothesis. Inflammopharmacology 2000; 8: 31-41.
- Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The CLASS study: a randomized controlled trial. JAMA 2000; 284: 1247-1255.

- Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J. M., Macpherson, A. J. S., Bjarnason, I. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. Scand J Gastroenterol 1995; 30: 289-299.
- Somasundaram, S., Rafi, S., Hayllar, J., Sigthorsson, G., Jacob, M., Price, A. B., et al. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAIDs induced injury to the rat intestine. Gut 1997; 41: 344-353.
- Somasundaram, S., Rafi, S., Jacob, M., Sigthorsson, G., Mahmud, T., Sherwood, R., et al. Intestinal tolerability of nitroxybutyl-flurbiprofen in rats. Gut 1997; 40: 608-613.
- Somasundaram, S., Sigthorsson, G., Simpson, R. J., Watts, J., Jacob, M., Tavares, I. A., et al. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAIDs-enteropathy in the rat. Aliment Pharmacol Ther 2000; 14: 639-650.
- Sonnenberg, A. Comparison of different strategies for treatment of duodenal ulcer. Br Med J 1985; 290: 1185-1187.
- Sordahl, L. A., Johnson, C., Blailock, Z. R., and Schwartz, A. The mitochondria. Methods in Pharmacology, 247-250. New York: Meredith Corporation, 1971.
- Steinmeyer, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis Res 2000; 2: 379-385.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol Rev 2002; 54: 101-127.
- Tomada, T., Kurashige, T., Hayashi, Y., and Enzan, H. Primary changes in liver damage by aspirin in rats. Acta Paediatr Jpn 1998; 40: 593-596.

- Tomada, T., Takeda, K., Kurashige, T., Enzan, H., and Miyahara, M. Acetylsalicylate (ASA)-induced mitochondrial dysfunction and its potentiation by Ca^{2+} . Liver 1994; 14: 103-108.
- Tygart, G. N. T. Treatment of peptic ulcer. Digestion 1998; 59: 446-452.
- Tyler, D. D. Respiratory enzyme systems of mitochondria. In: The mitochondria in health and disease, 269-352. New York: VCH Publishers, 1991.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38: 97-120.
- Vote, D., Vote, J. G., and Pratt, C. W. Electron transport and oxidative phosphorylation. Fundamentals of Biochemistry, 3rd ed, 492-528. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- Wallace, J. L. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy and cytoprotection: Pathogenesis and mechanisms re-examined. Scand J Gastroenterol 1992; 27: 3-8.
- Wallace, K. B., and Starkov, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. Ann Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 353-388.
- Weinbach, E. C. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosine triphosphatase. J Biol Chem 1956; 221: 609-618.
- Whitehouse, M. W. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs-III. Uncoupling of oxidative phosphorylation in a connective tissue (cartilage) and liver mitochondria by salicylate analogues: relationship of structure to activity. Biochem Pharmacol 1964;13: 319-336.

Whittle, B. J. R. Unwanted effects of aspirin and related agents on the gastrointestinal tract. In: Vane, J. R., and Botting, R. M. Aspirin and Other Salicylates, 465-509. London: Chapman & Hall Medical, 1993.

Yoshida, Y., Singh, I., and Darby, C. P. Effect of salicylic acid and calcium on mitochondrial functions. Acta Neurol Scand 1992; 85: 191-196.

Zubay, G. Electron transport and oxidative phosphorylation. In: Biochemistry, 3 rd ed, 381. USA: Wm. C. Brown Publishers, 1993.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรวราณี กาญจนวนิชกุล เกิดเมื่อวันที่ 14 มิถุนายน พ.ศ.2517ที่จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิตจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2545 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่งเภสัชกร ระดับ 6 ฝ่ายเภสัชกรรมชุมชน โรงพยาบาลย่านตาขาว จังหวัดตรัง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย