ผลของคีโตโคนาโซลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

นายศักดิพัฒน์ แสงสุริยงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-852-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17704336

Effect of Ketoconazole on Bioenergetic Functions of Isolated Rat Liver Mitochondria.

Mr. Sakdipat Sangsuriyong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 1996

ISBN 974-634-852-3

Thesis Title	**EFFECT OF KETOCONAZOLE ON BIOENERGETIC FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA**
By	**Mr. Sakdipat Sangsuriyong**
Department	**Pharmacology**
Thesis Advisor	**Associate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.**

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

Santi Thoongsuwan

.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thungsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

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

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

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

(Associate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.)

Prasan Dhumma-upakorn **.....Member**

(Associate Professor Prasan Dhumma-upakorn, Ph.D.)

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

(Assistant Professor Withaya Janthasoot)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศักดิพัฒน์ แสงสุรยงค์ : ผลของคีโตโคนาโซลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (EFFECT OF KETOCONAZOLE ON THE BIOENERGETIC FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกร ฐฑะพงษ์ , 98 หน้า. ISBN 974-634-852-3

การศึกษาผลของคีโตโคนาโซลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานที่สำคัญของไมโตรคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวพบว่าคีโตโคนาโซลมีผลทำให้อัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u ของไมโตคอนเดรียลดลงเมื่อใช้ NAD^+-linked substrates (glutamate + malate, α-ketoglutarate, β-hydroxybutyrate และ pyruvate + malate) เป็นสับสเตรท โดยคีโตโคนาโซลอาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจที่ complex I เป็นผลให้กระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชั่น และความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ของไมโตคอนเดรียลดลง คีโตโคนาโซลมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชั่นได้มากขึ้น เมื่อ pH ของ incubation medium เป็นเบส ในขณะที่ bovine serum albumin สามารถทำให้ฤทธิ์ของคีโตโคนาโซลลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ dithiothreitol ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยคีโตโคนาโซล คีโตโคนาโซลไม่มีผลต่อ ATPase activity การกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียมถูกยับยั้งได้ด้วยคีโตโคนาโซล นอกจากนี้ คีโตโคนาโซลยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง monoamine oxidase ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไปถึงผลของคีโตโคนาโซลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียดังกล่าวว่าเกี่ยวข้องหรือไม่กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของตัวยานี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##c775432 :MAJOR PHARMACOLOGY
KEY WORD: : RAT LIVER MITOCHONDRIA/KETOCONAZOLE/MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS
SAKDIPAT SANGSURIYONG : EFFECT OF KETOCONAZOLE ON THE BIOENERGETIC FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR :ASSO. PROF. PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D. 98 pp. ISBN 974-634-852-3

The study investigates the effects of ketoconazole on the bioenergetic functions of isolated rat liver mitochondria. Ketoconazole decreased rate of state 3 and 3u respiration with NAD^+-link substrate (glutamate,α-ketoglutarate, β-hydroxybutyric acid, pyruvate) probably by inhibit complex I of the respiratory chain leading to lessen oxidative phosphorylation and ATP synthesis. The inhibitory effect of ketoconazole probable declined when the incubation medium pH was acidic, but not significantly. Bovine serum albumin attenuated the action of ketoconazole. Dithiothreitol could not influence inhibition of ketoconazole. No any effect on ATPase activity while ketoconazole could suppress MAO activity. And express inhibitory effect on calcium stimulated respiration. It remains to be determined whether these mitochondrial effects of ketoconazole contribute to the pharmacological and/or toxicological action of this drug.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

Acknowledgements

I would like to express my sincerely thanks to my thesis advisor, Asso. Prof.Prakorn Chudapongse, Ph.D., for his guidance and encouragement . Special thanks to Asso. Prof.Pornpen Pramyothin, Ph.D., head of the Department of Pharmacology, Assi. Prof.Withaya Janthasoot, and all instructors in the Department of Pharmacology for their valuable instruction and guidance. I also thank Chulalongkorn University Graduate School for financial support, and all my friends that always make me feel happy here all the times.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my family for their love and understanding to me.

SAKDIPAT SANGSURIYONG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

Page

Thai abstract..... IV

English abstract..... V

Acknowledgements..... VI

List of tables..... .. ix

List of figures..... x

List of abbreviations..... xiv

Chapter

I. Introduction

Ketoconazole:

Chemical structure and properties..... 1

Pharmacological and toxicological actions of ketoconazole..... 2

Mechanism of action..... 7

Pharmacokinetics 7

The mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system..... 17

II. Materials and Methods

Animals 33

Preparation of intact rat liver mitochondria..... 33

Measurement of mitochondrial oxygen consumption rates..... 37

The study of mitochondrial monoamine oxidase activity..... 43

Measurement of mitochondrial ATPase activity..... 43

Determination of mitochondrial protein..... 45

Reagents and drug..... 46

Contents (continue)

	Page
Statistics	47
III. Results	
Effect of ketoconazole on oxidative phosphorylation by isolated rat liver mitochondria	49
Effect of ketoconazole on mitochondria oxidation of NADH	50
Factors influencing the effect of ketoconazole on oxidative phosphorylation by isolated rat liver mitochondria	51
Effect of ketoconazole on calcium-stimulated respiration by isolated rat liver mitochondria	53
Effect of ketoconazole on ATPase activity of isolated rat liver mitochondria	53
Effect of ketoconazole on mitochondria monoamine oxidase (MAO) activity	54
IV. Discussion and conclusion	85
References	92
Vitae	98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of tables

Table		Page
1.	In vitro activity of ketoconazole against dermatophytes and yeasts.....	3
2.	In vitro activity of ketoconazole against dimorphic and other fungi.....	4
3.	Influence of pH on inhibition by ketoconazole of state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	71
4.	Effect of ketoconazole on ATPase activity of rat liver mitochondria in the presence and absence of DNP.....	81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of figures

Figure		Page
1.	The chemical structure of ketoconazole.....	1
2.	The time-related development of mycelium from the inoculated yeast cells and the influence of low and high dose of ketoconazole.....	11
3.	The exposure to low dose of ketoconazole results in the characteristic deposition of osmiophillic vescles(arrow) in the cell wall of growth inhibited yeast whereas a high dose induces complete necrosis.....	12
4.	Plasma concentration of ketoconazole in 12 fasted male volunteers given various doses just before breakfast.....	13
5.	Mean area under the plasma concentration time curves after ketoconazole administration, as in fig 4.....	14
6.	Correlation of fuel breakdown, krebs cycle, electron transport chain and oxidative phosphorylation.....	20
7.	Electron transport chain, coupling sites, and inhibitors.....	23
8.	The measured redox potentials and their corresponding free-energy changes in each steps of electron transport from NADH to oxygen.....	24

List of figures (continue)

Figure Page

9. Schematic illustration of the coupled processes of electron transport and oxidative phosphorylation..... 26
10. Components of the F_1F_0-ATPase complex..... 28
11. The mitochondrial F_1F_0-ATPase may act reversibly as a synthetase or as a hydrolase..... 30
12. Utilization of mitochondrial protonmotive force in various processes..... 32
13. Illustration of mitochondrial preparation..... 36
14. Gilson reaction chamber..... 37
15. Clark oxygen electrode..... 38
16. An oxygraph tracing illustrating the measurement of RCI value..... 40
17. An oxygraph tracing illustrating the measurement of P/O ratio..... 40
18. An oxygraph tracing illustrating the measurement of oxygen consumption rate..... 40
19. Tracings demonstrating inhibitory effect of ketoconazole on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates..... 57
20. Inhibition by ketoconazole of state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates..... 59
21 Effect of ketoconazole on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria

List of figures (continue)

Figure		Page
	with succinate as substrate.....	61
22.	Inhibition by ketoconazole of state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with α-ketoglutarate as substrate.....	63
23.	Inhibition by ketoconazole of state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with β-hydroxybutyrate as substrate.....	65
24.	Inhibition by ketoconazole of state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with pyruvate plus malate as substrates.....	67
25.	Effect of ketoconazole on NADH-stimulated respiration of osmotic-shocked rat liver mitochondria.....	69
26.	Illustrative tracings of the effect dithiothreitol (DTT) on the inhibitory effect of ketoconazole on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	73
27.	Effect of dithiothreitol (DTT) on the inhibitory effect of ketoconazole on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates.....	75
28.	Attenuation by bovine serum albumin (BSA) of ketoconazole induced inhibitory effect on state 3 and state 3u respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as	

List of figures (continue)

Figure Page

substrates..... 77

29.Effect of ketoconazole on calcium-stimulated respiration of rat liver mitochondria with glutamate plus malate as substrates..... 79

30.Effect of ketoconazole on monoamine oxidase (MAO) activity of rat liver mitochondria..... 83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	=	adenosine 5/ -diphosphate
ATP	=	adenosine 5/ -triphosphate
BSA	=	bovine serum albumin
Ca^{2+}	=	calcium ion
Co Q	=	coenzyme Q, ubiquinone
Cyt.	=	Cytochrome
$CaCl_2$	=	calcium chloride
^0C	=	degree Celsius
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
DCCD	=	dicyclohexylcarbodiimide
DTNB	=	5,5/ -dithio-bis-2-nitrobenzoate
DMSO	=	dimethylsulfoxide
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)N,N,N/,N/-tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
$FADH_2$	=	reduced flavin adenine dinucleotide
FMN	=	flavin mononucleotide
Fe-S	=	iron-sulfur center
g	=	centrifugal force unit (gravity)
gm	=	gram
H^+	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N/-2-ethane-sulfonic acid.
KCl	=	potassium chloride
KH_2PO_4	=	potassium dihydrogen phosphate
M	=	molar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย