

ผลของ 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออลต่อการทำงานของ  
ไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท



นางสาวกวิณิดา จียาศักดิ์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

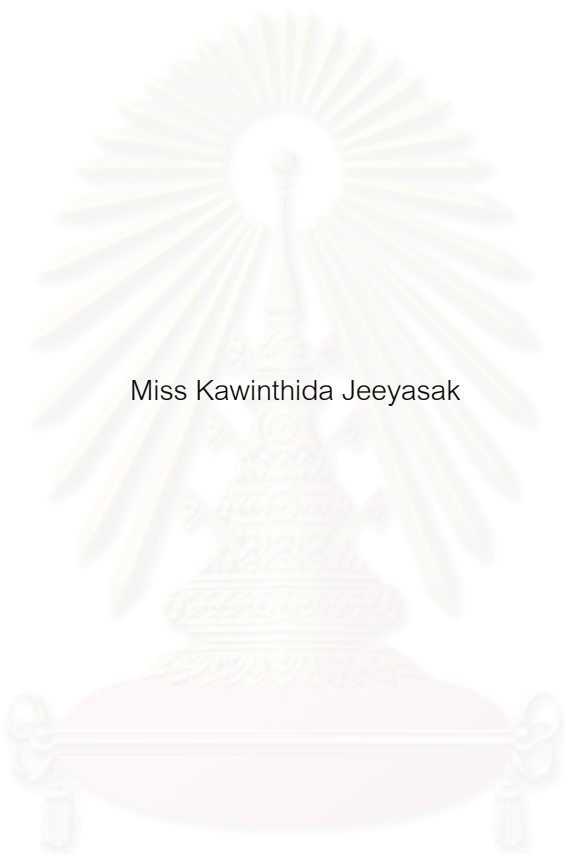
สาขาวิชาเภสัชวิทยา      ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF 8(14),15-ISOPIMARADIENE-3 $\beta$ ,18-DIOL ON THE FUNCTION OF  
MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER



Miss Kawinthida Jeeyasak

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Science

Chulalongkorn University

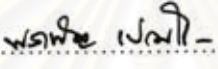
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

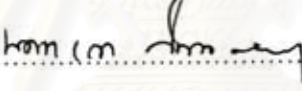
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของ 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออกซ์ต่อ  
การทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท  
โดย นางสาวกวิณิดา จิยาศักดิ์  
สาขาวิชา เกษษวิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ

---

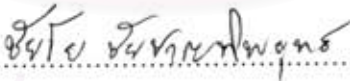
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


  
..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

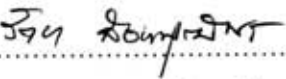
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พ.ต.ท. หญิง สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตยา ลือชาพุมิพร)

กวินริดา จิยาศักดิ์ : ผลของ 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออลต่อการ  
ทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท. (EFFECTS OF 8(14),15-  
ISOPIMARADIENE-3 $\beta$ ,18-DIOL ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA  
ISOLATED FROM RAT LIVER) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. วิทยา จันทสูตร,  
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 127 หน้า.

8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออล เป็นสารประกอบหลักของสิ่งสกัดเอทิล  
อะซีเตตจากแก่นไม้แดง ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสาร 8(14),15-ไอโซไพมา  
ราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออล ต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท พบว่าสาร  
8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออลนั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้ง state 3 (กระตุ้นด้วย ADP)  
และ state 3u (กระตุ้นด้วย DNP) respiration ของกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียได้กรณี  
ที่ใช้สับสเตรทเป็นชนิด NAD<sup>+</sup>-linked แต่การยับยั้งดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้นถ้าใช้สับสเตรทเป็นชนิด  
FAD-linked สาร 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออล ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการ  
ออกซิไดซ์ NADH จากภายนอกใน osmotic-shocked mitochondria รวมถึงยับยั้งการหายใจของ  
ไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมเมื่อใช้สับสเตรทเป็นชนิด NAD<sup>+</sup>-linked ด้วย  
แต่พบว่าสาร 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออล นั้นไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงการ  
ทำงานของเอนไซม์ ATPase ทั้งในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DNP และสาร  
ดังกล่าวยังมีผลทำให้ค่า RCI ลดลงได้แปรผกผันตามความเข้มข้นของสาร พบว่า dithiothreitol  
ไม่สามารถลดฤทธิ์ของสารในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ แต่ bovine  
serum albumin สามารถลดฤทธิ์ของสารในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียได้  
กล่าวโดยสรุปคือ สาร 8(14),15-ไอโซไพมาราไดอิน-3 เบต้า,18-ไดออล นั้นแสดงฤทธิ์ในการเป็น  
สารยับยั้งการถ่ายทออคซิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรียตรงตำแหน่ง site I  
เช่นเดียวกับ rotenone โดยไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา.....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 4976552633 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: 8(14),15-ISOPIMARADIENE-3 $\beta$ ,18-DIOL / *XYLIA XYLOCARPA* / MITOCHONDRIA / RAT LIVER / OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

KAWINTHIDA JEEYASAK : EFFECTS OF 8(14),15-ISOPIMARADIENE-3 $\beta$ ,18-DIOL ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER.  
 THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT, THESIS  
 COADVISOR : ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, Ph.D., 127 pp.

8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol is a principle substance in the ethyl acetate extracted from the heartwood of *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub. In this study was designed to investigate the effects of 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol on the function of mitochondria isolated from rat liver. 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol showed the inhibitory effects on state 3 (ADP-stimulated), state 3u [2,4-dinitrophenol (DNP)-stimulated] respiration with NAD<sup>+</sup>-linked substrate. However, these results could not be observed when the substrate was FAD-linked substrate. 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol also inhibited the NADH oxidation in osmotic-shocked mitochondria and calcium-stimulated mitochondrial respiration with NAD<sup>+</sup>-linked substrate. In addition, 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol had no effect on both mitochondrial ATPase activity and DNP stimulated mitochondrial ATPase activity. The Respiratory Control Index (RCI) was decreased correlated with concentration of the compound. Dithiothreitol had no influence on the respiratory inhibition of the compound while this inhibitory effect was attenuated by bovine serum albumin. In summary 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol act as site I inhibitor of mitochondrial electron transport chain as same as rotenone while it had no effect on mitochondrial ATPase activity.

Department.....Pharmacology..... Student's Signature..... Kawinthida Jeeyasak  
 Field of Study.....Pharmacology..... Principal Advisor's Signature..... Withaya Janthasoot  
 Academic Year.....2007..... Co-advisor's Signature..... Chaiyo Chaichantipyuth

## กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านและให้คำปรึกษาที่ดียิ่ง ตลอดจนให้คำแนะนำ ให้ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนสกัดสารทดสอบให้ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัลย์ประเสริฐ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ และคำปรึกษา ตลอดจนการศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาตรี ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพจนีย์ พวงไพโรจน์ที่ได้ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

และท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
สมมติฐานของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. แดง.....	4
2. ไมโตคอนเดรีย.....	6
หน้าที่และความสำคัญของไมโตคอนเดรีย.....	6
ลักษณะและโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย.....	7
กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรีย.....	11
การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ.....	12
ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันและการสังเคราะห์ ATP... ..	18
ทฤษฎีเกี่ยวกับการสังเคราะห์ ATP.....	19
การเกิดพิษต่อไมโตคอนเดรีย.....	21
การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโตคอนเดรีย.....	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	28
วัสดุและอุปกรณ์.....	28
สัตว์ทดลอง.....	28
สารเคมี.....	28

เครื่องมือและอุปกรณ์.....	29
วิธีการวิจัย.....	29
การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง.....	29
การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูแรท.....	30
การเตรียมไมโทคอนเดรียให้อยู่ในสภาวะที่ช็อกด้วยแรงดันออสโมติก.....	33
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	33
การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย.....	34
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	35
การศึกษาผลของสารทดสอบต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ใน state 3 respiration เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน.....	41
การศึกษาผลของสารทดสอบต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ใน state 3u respiration เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน.....	42
การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH จากภายนอก เป็นสับสเตรท.....	44
การศึกษาผลของปัจจัยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องหรือส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol.....	45
การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของ ของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท.....	46
การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	47
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	48
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	49
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	49
ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	51



ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	51
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	52
ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	52
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	53
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท.....	53
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	53
ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	54
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	54
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	54
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	102
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท.....	102

ผลของปัจจัยอื่นๆ ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	
ผลของ BSA.....	104
ผลของ DTT.....	104
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	
ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	105
ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของ	
ไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม.....	105
รายการอ้างอิง.....	109
ภาคผนวก.....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	127



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า
1. เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย.....	10
2. ส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complexes ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย.....	17
3. การแบ่งภาวะต่างๆ ของการหายใจของไมโตคอนเดรีย.....	37
4. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration และ state 4 respiration รวมถึงค่า respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	61
5. ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration และ state 4 respiration รวมถึงค่า respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	68
6. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	115
7. ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	116
8. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	117
9. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	118
10. ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	119

ตารางที่

11. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	120
12. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท.....	121
13. ผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	122
14. ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	123
15. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของ เอนไซม์ ATPase ทั้งในกรณีที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	124
16. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	125

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะของลำต้น ใบ ดอก ฝักและเมล็ดของไม้แดง.....	5
2. โครงสร้างทางเคมีของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol.....	6
3. ลักษณะและโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย.....	8
4. โครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโตคอนเดรีย.....	9
5. ลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP).....	9
6. ความสัมพันธ์ระหว่างวัฏจักรเครปส์, ลูกโซ่การหายใจ และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	11
7. ลักษณะโครงสร้างของ flavin mononucleotide (FMN) และ flavin adenine dinucleotides (FAD).....	13
8. การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Coenzyme Q.....	13
9. ลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b, และ c รวมทั้งลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ.....	14
10. การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจผ่านสารตัวกลาง ต่างๆ ทั้ง 4 complexes.....	16
11. การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจไปตาม complex ต่างๆ ตามค่า redox potential ( $E_0$ ) ที่เพิ่มขึ้น และตำแหน่งที่เกิดการสังเคราะห์ ATP.....	19
12. การควบคู่ (coupling) กันระหว่างการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP.....	20
13. ลักษณะและโครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase หรือ $F_1F_0$ -ATPase.....	21
14. ตำแหน่งต่างๆ ที่ตัวยับยั้งออกฤทธิ์ต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนใน ลูกโซ่การหายใจและ/หรือกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	25
15. กระบวนการควบคุมสมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์ .....	27
16. ขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation.....	32
17. ลักษณะของ Gilson Oxygen chamber.....	36
18. ลักษณะของ Clark oxygen electrode.....	37
19. ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI.....	38
20. ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตรา การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	39

รูปที่	หน้า
21. Oxygraph tracing มาตรฐานของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	49
22. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	56
23. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	59
24. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตรา การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	60
25. Oxygraph tracing แสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	62
26. กราฟแสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	66
27. กราฟแสดงผลของ rotenone ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	67
28. Oxygraph tracing มาตรฐานของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	69
29. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	70
30. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	73
31. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	74

32. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	77
33. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตรา การใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	78
34. Oxygraph tracing แสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	79
35. กราฟแสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	82
36. กราฟแสดงผลของ rotenone ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	83
37. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตรา การใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	84
38. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	87
39. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตรา การใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท.....	88
40. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท.....	92
41. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท.....	93

รูปที่

42. กราฟแสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์  
ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol  
เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท..... 94
43. กราฟแสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของ  
สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol  
เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....95
44. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของ  
เอนไซม์ ATPase ทั้งในกรณีที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP..... 96
45. Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตรา  
การใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้น  
ด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท..... 97
46. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้  
ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม  
เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท..... 100
47. กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้  
ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม  
เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท..... 101



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	=	adenosinetriphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	=	calcium ion
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
°C	=	degree celcius
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl ether) N,N,N',N'- tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH <sub>2</sub>	=	reduced flavin adenine dinucleotide
g	=	gram
g	=	centrifugal force unit (gravity)
H <sup>+</sup>	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
IC <sub>50</sub>	=	median inhibitory concentration
kg	=	kilogram
LD <sub>50</sub>	=	mean lethal dose
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
mOsm	=	milliosmole
μg	=	microgram
μl	=	microliter

$\mu\text{m}$	=	micrometer
$\mu\text{M}$	=	micromolar
N	=	normality
$\text{NAD}^+$	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
n atoms	=	nanoatoms
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
O	=	oxygen
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
rpm	=	revolution per minute
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent
<	=	less than



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรนั้นกำลังเป็นสาขาที่นักวิจัยกำลังให้ความสนใจกันอย่างกว้างขวาง ประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งที่อุดมไปด้วยพืชสมุนไพรนานาชนิด โดยหลายชนิดก็มีการนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ มาตั้งแต่สมัยโบราณ ซึ่งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรนั้นก็มีการค้นคว้าวิจัยหาสมุนไพรชนิดใหม่ๆ ที่อาจมีแนวโน้มในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป หรือเป็นการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสมุนไพรที่มีการนำมาประโยชน์แล้ว เพื่อนำไปศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร นอกจากนี้ก็อาจจะเป็นการศึกษาวิจัยเบื้องต้นในแง่พิษวิทยาเพื่อนำไปประเมินถึงความปลอดภัยในการนำไปใช้ เพื่อให้ทราบว่าสมุนไพรที่มีใช้กันมาแต่โบราณนั้นมีความปลอดภัยมากน้อยเพียงใด และมีโอกาสในการเกิดพิษได้หรือไม่ อย่างไร เพื่อให้การนำเอาสมุนไพรหรือสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เป็นสารบริสุทธิ์ชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากแก่นของไม้แดงซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยามาตั้งแต่สมัยโบราณ ไม้แดงหรือต้นแดงนี้มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Xylocarpus xylocarpa* (Roxb.) Taub จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae (Smitinand, 2001) ในแง่ประโยชน์ทางยาของแก่นไม้แดงนั้นมีระบุในตำรายาไทยว่าใช้เป็น ส่วนผสมของยาแก้โรคหทัยโลหิต (อาการมะเร็งที่มดลูกและรังไข่ในเพศหญิง หรือมะเร็งปอดในเพศชาย) ส่วนการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านจะใช้แก่นไม้แดง 1 กำมือมาต้มน้ำดื่มเพื่อรักษาอาการไข้หวัด และอาการตกเลือด โดยดื่มวันละ 1 แก้ว ทุกวันจนกว่าจะหาย (ห้ามใช้ในสตรีมีครรภ์) หรืออาจจะนำแก่นไม้แดง 1 กำมือมาต้มน้ำดื่มก่อนนอนเป็นยาถ่ายก็ได้ (มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, 2538)

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol นั้นมีเพียงการศึกษาที่พบว่าสารชนิดนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการกินอาหารของปลวกในระดับสูง ในขณะที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของกล้าผักกาด (Sittiwong, 2003) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในแง่กลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทั้งในสัตว์ทดลองและในระดับเซลล์หรือระดับออร์กาเนลล์ที่สำคัญๆ นั้นยังไม่มีผู้ทำการศึกษาแต่อย่างใด ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงได้ออกแบบการทดลองขึ้น เพื่อศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย (เป็นออร์กาเนลล์

ที่มีหน้าที่สำคัญภายในเซลล์) ที่แยกจากเซลล์ของตับหนูแรท โดยการศึกษาจะเป็นแบบ *in vitro* เนื่องจากต้องการทราบผลของสารที่มีต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียโดยตรง และผลที่ได้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของสาร 8(14), 15-isopimaradiene-3 $\beta$ , 18-diol ในการประเมินโอกาสในการทำให้เกิดพิษ และกลไกในการก่อให้เกิดอาการพิษ เพราะไมโทคอนเดรียนั้นเป็นออร์แกเนลล์ที่มีความสำคัญมากในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต ทำหน้าที่เป็นแหล่งผลิตพลังงานให้กับเซลล์ (Nisoli และคณะ, 2004) โดยพบว่าร้อยละ 95 ของสารพลังงานสูงคือ adenosine triphosphate (ATP) ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์นั้นถูกสร้างโดยไมโทคอนเดรีย (Nadanaciva และคณะ, 2007) และไมโทคอนเดรียก็มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Fowler และคณะ, 1994) โดยการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกันในวิถีต่างๆ ระหว่าง metabolic routes กับกระบวนการอื่นของเซลล์โดยรวม นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียก็ยังมีบทบาทที่สำคัญอื่นๆ อีกมากมาย เช่น บทบาทในการควบคุมสมดุลของแคลเซียม (Ca<sup>2+</sup> homeostasis) ภายในเซลล์ (Cardoso และคณะ, 2001) บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ (cell signalling) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis (apoptotic cell death) (Schapira, 2006) เป็นต้น ดังนั้นยาหรือสารเคมีใดๆ ที่มีผลไปรบกวนการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียย่อมอาจจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของเซลล์ได้ไม่ทางตรงก็ทางอ้อม

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท ได้แก่ กระบวนการหายใจ (กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน) การทำงานของเอนไซม์ ATPase การหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ช็อกด้วยแรงดันออกซิเจน และการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

### สมมติฐานของงานวิจัย

สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol มีผลเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรทได้

### ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย

2. ศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase
3. ศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ซ็อกด้วยแรงดันออสโมติก
4. ศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสาร 8(14), 15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่มีต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ กระบวนการหายใจ (ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน) การทำงานของเอนไซม์ ATPase การหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ซ็อกด้วยแรงดันออสโมติก และการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม ผลที่ได้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในการนำไปประเมินด้านพิษวิทยาโดยอาศัยกลไกในการก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย

## บทที่ 2

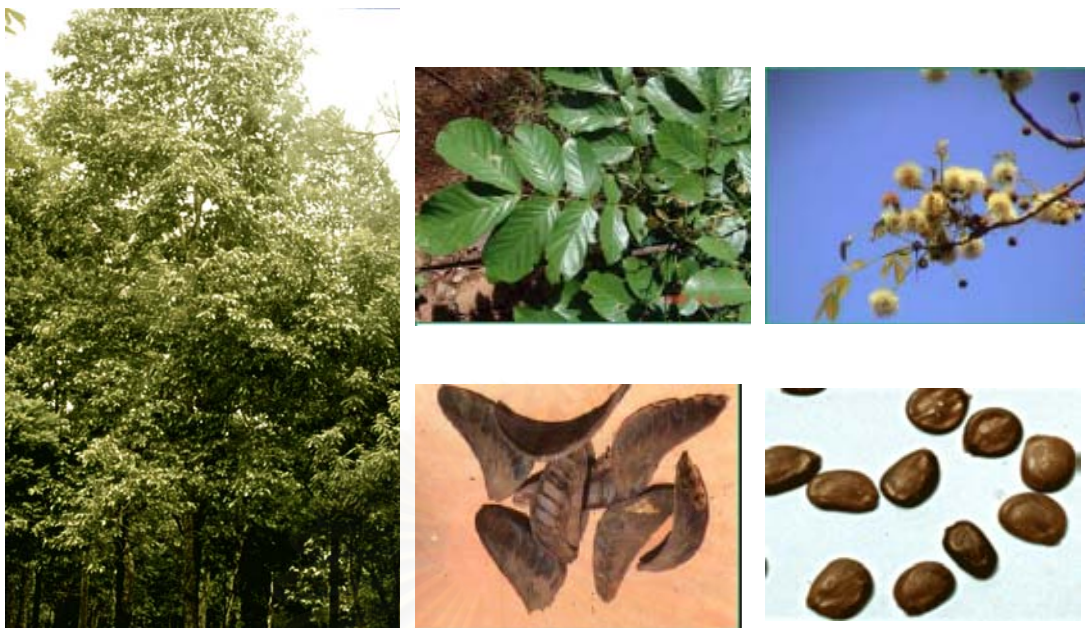
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. แดง (Iron wood)

แดงมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub ชื่อภาษาอังกฤษคือ Iron wood นอกจากนี้ก็ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีกในภาษาไทย ซึ่งจะเรียกแตกต่างกันไปตามถิ่นที่พบ เช่น กร้อม ควาย ไคว เพอร์จะลาน จาลาน ตะกร้อม ปราณ ไพรน์ ผ้าน เพี้ย สะกรอม เป็นต้น แดงหรือไม้แดงมีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 15-30 เมตร ลำต้นมักโค้งงอ แตกกิ่งต่ำ เปลือกต้นสีครีมอมน้ำตาล แตกล่อนเป็นสะเก็ดแผ่นบางๆ กิ่งก้านและยอดอ่อนมีขนละเอียดสีเหลือง ลักษณะภายในของเนื้อไม้เป็นสีแดงเรื่อๆ หรือสีน้ำตาลอมแดง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้นเรียงสลับ ประกอบด้วย 2 ซ่อใบแตกออกเป็น 2 ง่าม ใบย่อย 4-5 คู่ รูปไข่หรือรูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 3-7 เซนติเมตร ยาว 7-20 เซนติเมตร ใบอ่อนสีน้ำตาลแดง ดอกออกเป็นช่อแบบช่อกระจุกแน่นทรงกลม คล้ายดอกกระถินออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ กลีบดอกสีขาวหรือขาวนวล ผลเป็นฝักรูปไตหรือขนมเป็ยกปุ่น แบน แข็ง ฝักแก่มีสีน้ำตาลอมเทา เมล็ดมีสีน้ำตาล ลักษณะเป็นมัน แบนเรียวและแหลม ยาวรีหรือเกือบกลม (นันทวัน บุญยะประกาศ และ อรุณช ไซค์ชัยเจริญพร, 2541; มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, 2538) (รูปที่ 1) ไม้แดงสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในป่าเบญจพรรณ ป่าไม้สัก และป่าเต็งรัง (Gardner, Sidisunthorn และ Anusarnsunthom, 2000) ไม้แดงสามารถจำแนกหมวดหมู่ตามพฤกษานุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom	Plantae
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Fabales
Family	Leguminosae
Genus	<i>Xylia</i>
Species	<i>xylocarpa</i>

(Smitinand, 2001; <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Xylia> [2551, มีนาคม 20])

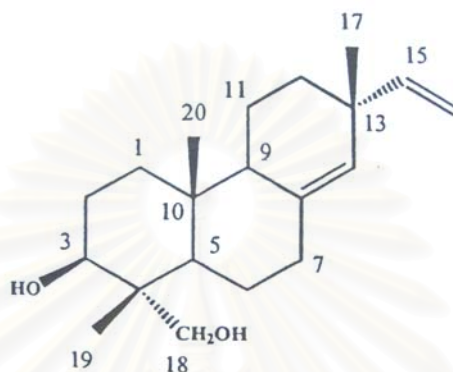


**รูปที่ 1** ลักษณะของลำต้น ใบ ดอก ฝัก และเมล็ดของไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub) (<http://www.tistr.or.th/sakaerat/Plant%20in%20Sakaerat/plant%20list/056แดง.pdf> [2551, มีนาคม 20])

ในตำรายาไทย เปลือกต้น ซึ่งมีรสฝาดใช้สมานธาตุ แก่นใช้ผสมเพื่อเป็นยาแก้โรคกษัยโลหิต (อาการมะเร็งที่มดลูกและรังไข่ในเพศหญิง หรือมะเร็งปอดในเพศชาย) ดอกใช้ผสมเพื่อเป็นยาแก้ไข้ บำรุงหัวใจ ส่วนที่มีการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านจะใช้เปลือกต้นผสมกับสมุนไพรอื่น ต้มน้ำดื่ม แก้ประดง (อาการโรคผิวหนังมีผื่นคันเป็นเม็ดขึ้นคล้ายผด คันมาก และมักมีไข้ร่วมด้วย) แก่น 1 กำมือ ต้มน้ำดื่มก่อนนอนเป็นยาถ่าย เปลือกต้นหรือแก่น 1 กำมือ ต้มน้ำดื่ม แก้อาการซำในและตกเลือด โดยดื่มวันละ 1 แก้ว ทุกวันจนกว่าจะหาย (ห้ามใช้ในสตรีมีครรภ์) เมล็ดก็สามารถรับประทานได้ (มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, 2538)

มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากแก่นไม้แดง พบว่าสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากแก่นไม้แดงสามารถแยกเป็นสารบริสุทธิ์ได้ 8 ชนิด ได้แก่  $\beta$ -sitosterol, 8(14),15-isopimaradiene, 8(14),15-isopimaradiene-3-one, 3-oxomanoyl oxide, 8(14),15-isopimaradiene-3 $\alpha$ -ol, 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ -ol, 8(14),15-isopimaradiene-18-oic acid และ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol โดยสารบริสุทธิ์ทั้ง 8 ชนิดนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการกินอาหารของปลวกในระดับสูง ในขณะที่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของกล้าผักกาด (Sittiwong, 2003)

สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารประเภท diterpene ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่สกัดได้จากแก่นของไม้แดงด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต แล้วแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ลักษณะของสารที่สกัดแยกได้จะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีลักษณะมันวาว มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{20}H_{32}O_2$  น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 304 จุดหลอมเหลวอยู่ที่  $152.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

## 2. ไมโตคอนเดรีย

### หน้าที่และความสำคัญของไมโตคอนเดรีย

ในเซลล์ยูคาริโอตจะประกอบไปด้วยออร์แกเนลล์หลายชนิดที่มีบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกันไป เพื่อให้เซลล์นั้นสามารถดำรงชีวิตและทำหน้าที่ต่างๆ ได้ตามปกติ (Fowler และคณะ, 1994) โดยการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ก็มีความจำเป็นที่จะต้องอาศัยพลังงาน ซึ่งออร์แกเนลล์หลักที่ทำหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์และเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ก็คือ ไมโตคอนเดรีย ดังนั้นจะพบไมโตคอนเดรียได้ในเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด ภายในไมโตคอนเดรียจะมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน อาทิเช่น ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดไขมัน ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดอะมิโน ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน ผลที่ได้จากปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าว จะทำให้ได้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเซลล์ (Avers, 1986; Garrette และ Grisham, 2002; Murphy และ Smith, 2007; Voet, Voet และ Pratt, 2006) โดยพบว่าร้อยละ 95 ของ ATP ที่เกิดขึ้นในเซลล์เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันซึ่งเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Nadanaciva และคณะ, 2007)



## ลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย

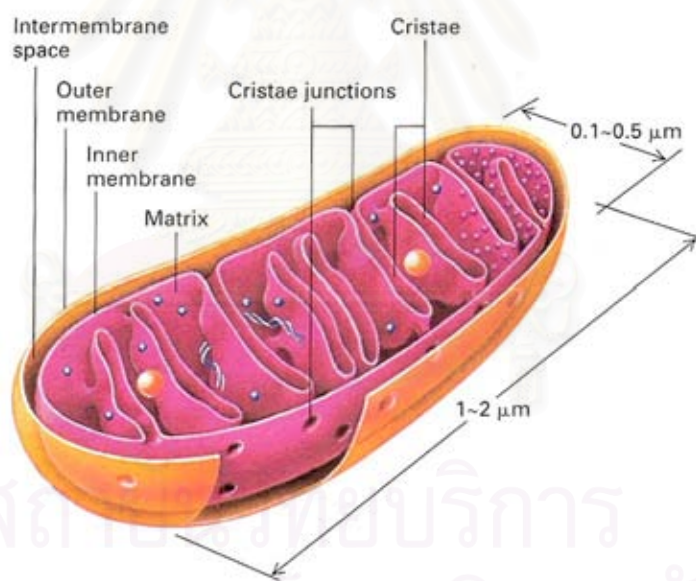
ไมโทคอนเดรียจะมีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปในเซลล์แต่ละชนิด เช่น ในเซลล์ตับจะมีลักษณะค่อนข้างกลม ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ส่วนใน fibroblasts จะมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย เป็นต้น จำนวนของไมโทคอนเดรียที่พบในแต่ละเซลล์ก็จะไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดและกิจกรรมของเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรียที่เซลล์ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีจำนวนอยู่ระหว่าง 800-2,000 แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วจะไม่มีไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2006) นอกจากนี้ขนาดของไมโทคอนเดรียที่พบในแต่ละเซลล์ก็จะไม่เท่ากัน แต่โดยทั่วไปแล้วไมโทคอนเดรียจะมีขนาดกว้างประมาณ 0.5  $\mu\text{m}$  และยาวประมาณ 1  $\mu\text{m}$  (Voet และคณะ, 2006) ซึ่งแม้ว่าไมโทคอนเดรียนั้นจะมี ขนาด รูปร่างและจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ แต่โดยทั่วไปก็จะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายกัน คือมีส่วนประกอบหลักที่สำคัญอยู่ 3 ส่วน คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก เยื่อหุ้มชั้นใน และ เมทริกซ์ โดยระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นในจะเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายในดังแสดงในรูปที่ 3

1. เยื่อหุ้มชั้นนอก มีลักษณะของผิวเรียบ มีส่วนประกอบเป็นไขมัน 30-40% และโปรตีน 60-70% (Devlin, 2002) ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกนั้นมี phosphatidylinositol ในปริมาณที่สูง (Garrett และ Grisham, 1999) และมีโปรตีนจัดเรียงตัวกันเป็นช่องที่เรียกว่า porin หรือ voltage-dependent anion channel (VDAC) ซึ่งยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งไอออนต่างๆ สามารถผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (Voet และ Voet, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้ในโครงสร้างจะมีส่วนที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในที่เรียกว่า contact site และที่บริเวณ contact site จะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition pore (PTP) วางอยู่ (รูปที่ 4,5) ในสภาพที่เปิดจะยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1,500 daltons สามารถผ่านเข้าออกระหว่างเมทริกซ์กับไซโตพลาสซึมได้อย่างอิสระ ปัจจัยที่ทำให้ PTP เปิดได้ ได้แก่ ปริมาณแคลเซียมที่สะสมอยู่ในไมโทคอนเดรียมากขึ้น หรือสภาวะที่มี mitochondrial transmembrane potential ต่ำ ที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกนี้มีเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้เป็น marker enzyme คือ เอนไซม์ monoamine oxidase (Szewczyk และ Wojtczak, 2002) (ตารางที่ 1) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารสื่อประสาทเอมีนต่างๆ เช่น epinephrine, norepinephrine และ dopamine เป็นต้น (Davison, 1958)

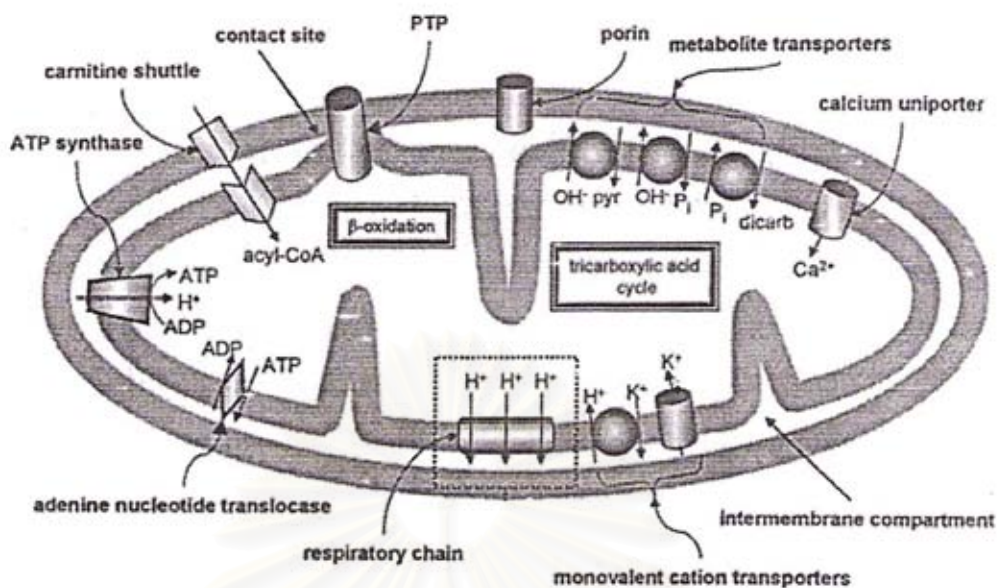
2. เยื่อหุ้มชั้นใน จะมีความยืดหยุ่นและพื้นที่ผิวมากกว่าเยื่อหุ้มชั้นนอก มีส่วนประกอบเป็นโปรตีนประมาณ 80% และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่มาก ลักษณะโครงสร้างจะพับไปพับมายื่นเข้าไปในส่วนของเมทริกซ์ ที่เรียกว่า cristae เยื่อหุ้มชั้นในจะมีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและไอออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่จะยอมให้เฉพาะ  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{NH}_3$  ผ่านเข้าออกได้อย่าง

อิสระ ส่วนสารอื่นๆ จำพวก hydrophilic metabolites และ inorganic ions ที่สำคัญต่อกระบวนการชีวเคมีของเซลล์จะสามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในได้ต้องอาศัย specific channels และ carrier proteins ที่เยื่อหุ้มชั้นในนี้จะเป็นบริเวณที่เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนของลูกโซ่การหายใจ ดังนั้นก็มีเอนไซม์ต่างๆ ที่สำคัญอยู่ในบริเวณนี้ ได้แก่ respiratory chain enzymes และ ATP synthase หรือ  $F_1F_0$  ATPase (ตารางที่ 1) เป็นต้น

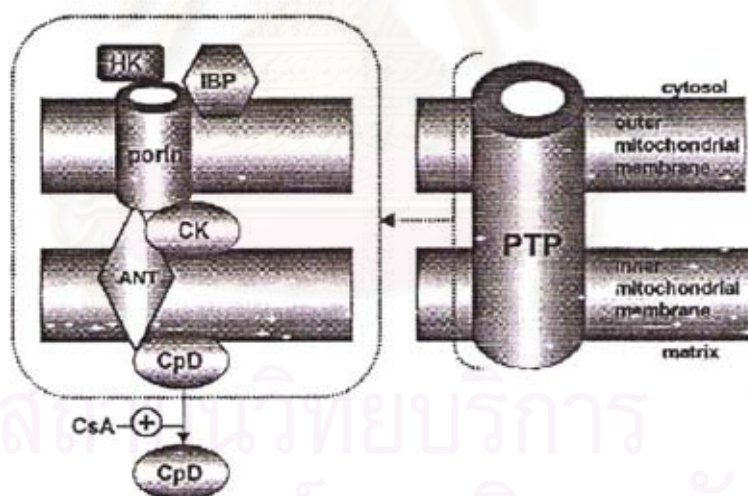
3. เมทริกซ์ (matrix) จะอยู่ถัดจากเยื่อหุ้มชั้นในเข้าไป มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายวุ้นภายใน matrix จะประกอบไปด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (ยกเว้นเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งจะอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย) เอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดไขมัน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 นอกจากนี้ภายใน matrix ก็ยังประกอบด้วย mitochondrial DNA (mtDNA), ไรโบโซม และโปรตีนที่จำเป็นต้องใช้ในกระบวนการ transcription ของ mtDNA และกระบวนการ translation ของ mRNA (Devlin, 2006; Szewczyk และ Wojtczak, 2002)



รูปที่ 3 ลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Lodish และคณะ, 2004)



รูปที่ 4 โครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย  
(Szewczyk และ Wojtczak, 2002)



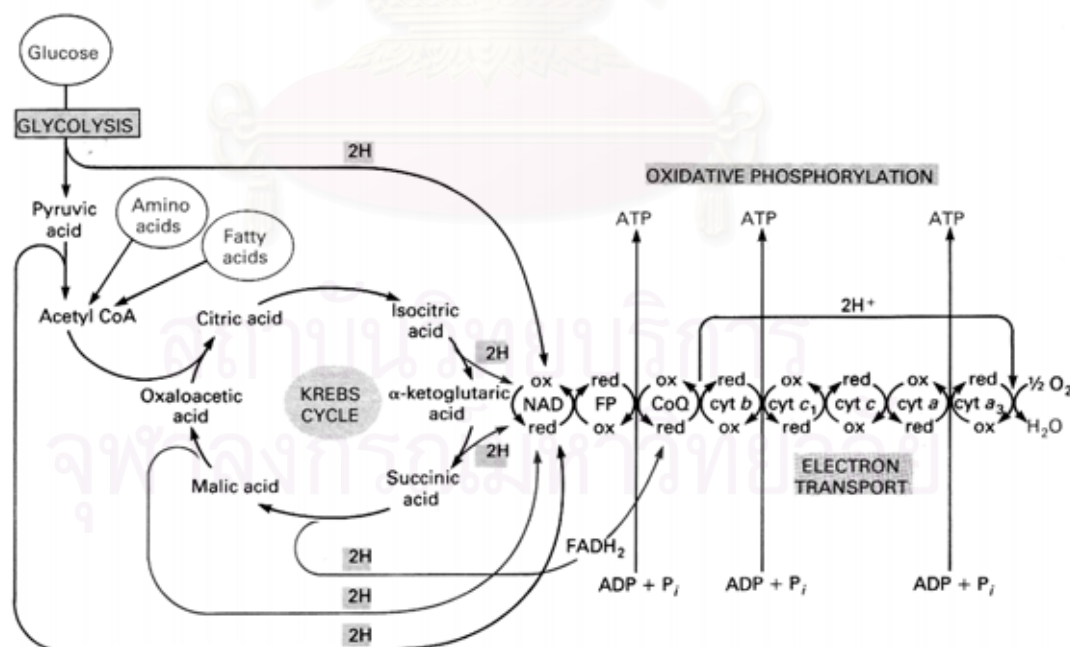
รูปที่ 5 ลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP) ภาพด้านขวาแสดงให้เห็นว่า PTP จะอยู่บริเวณ contact site ซึ่งเชื่อมระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ส่วนภาพด้านซ้ายแสดงให้เห็นส่วนประกอบบริเวณ contact site ได้แก่ peripheral benzodiazepine receptor, HK: hexokinase, ANT: adenine nucleotide translocase, CK: creatine kinase (พบในไมโทคอนเดรียของเซลล์กล้ามเนื้อ), CpD: cyclophilin D (เป็นบริเวณที่ cyclosporine A มาจับได้) (Szewczyk และ Wojtczak, 2002)

ตารางที่ 1 เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2006)

Outer Membrane	Intermembrane Space	Inner Membrane	Matrix
Monoamine oxidase Kynurenine hydroxylase Nucleoside diphosphate kinase Phospholipase A Fatty acyl-CoA synthetases NADH: cytochrome-c reductase (rotenone-insensitive) Choline phosphotransferase	Adenylate kinase Nucleoside diphosphate kinase Creatine kinase	Succinate dehydrogenase F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase NADH dehydrogenase $\beta$ -Hydroxybutyrate dehydrogenase Cytochrome <i>b</i> , <i>c</i> <sub>1</sub> , <i>c</i> , <i>a</i> , <i>a</i> <sub>3</sub> Carnitine: acyl-CoA transferase Adenine nucleotide translocase Mono-, di-, and tricarboxylate transporters Glutamate-aspartate transporters Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase complex Citrate synthase Isocitrate dehydrogenase $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase complex Aconitase Fumarase Succinyl-CoA synthetase Malate dehydrogenase Fatty acid $\beta$ -oxidation system Glutamate dehydrogenase Glutamate-oxaloacetate transaminase Ornithine transcarbamoylase dehydrogenase Carbamoyl phosphate synthetase I Heme synthesis enzymes

## กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรีย

โดยทั่วไปแล้วเมื่อรับประทานสารอาหารที่ให้พลังงานต่างๆ เข้าไป ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต สารอาหารต่างๆ ดังกล่าวนั้นจะต้องถูกย่อยสลายให้มีขนาดโมเลกุลเล็กๆ ก่อนเพื่อร่างกายสามารถดูดซึมและนำไปใช้ได้ เช่น โปรตีนก็จะถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน ไขมันถูกย่อยได้เป็นกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส จากนั้นสารอาหารโมเลกุลเล็กๆ ต่างๆ เหล่านี้ก็จะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการต่างๆ ไปเป็น acetyl coenzyme A (acetyl CoA) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ต่อไป หลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์ก็จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และไฮโดรเจนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลางต่าง ๆ เกิดการถ่ายทอด reducing equivalent (ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง) โดยมี  $\text{NAD}^+$  และ  $\text{FAD}$  มารับ และกลายเป็น  $\text{NADH}$  และ  $\text{FADH}_2$  จากนั้น  $\text{NADH}$  และ  $\text{FADH}_2$  ก็จะถ่ายทอด reducing equivalent ผ่านทางลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียต่อไป โดยมีออกซิเจนเป็นตัวมารับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายกลายเป็นน้ำ และระหว่างที่เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนั้นจะมีพลังงานอิสระเกิดขึ้น พลังงานที่เกิดขึ้นนี้มากพอที่จะถูกเอนไซม์ ATP synthase (อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย) นำไปสร้างเป็น ATP จากปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน ของ ADP ได้ วิธีการสร้าง ATP โดยใช้พลังงานที่ได้จากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (รูปที่ 6)

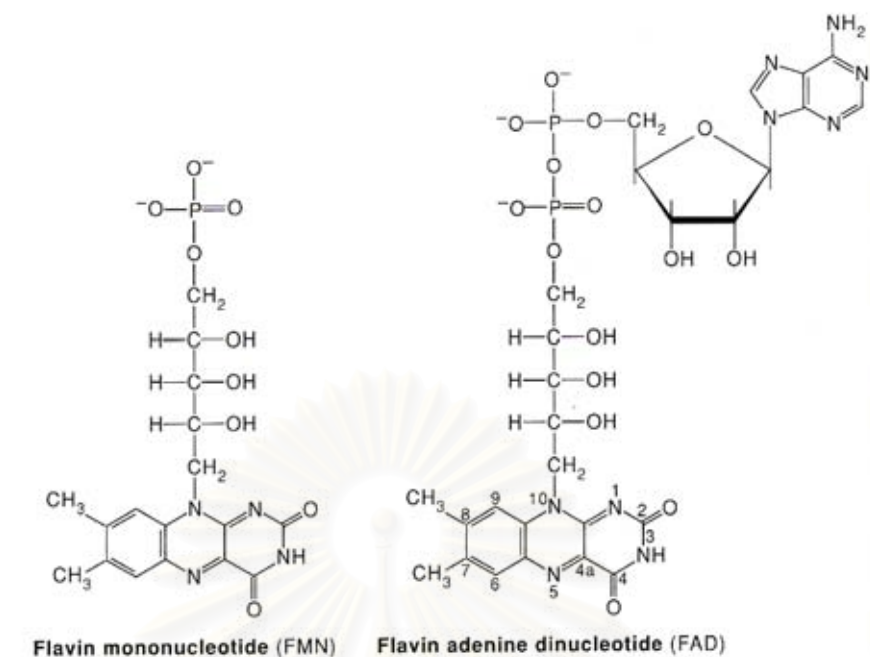


รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างวัฏจักรเครปส์, ลูกโซ่การหายใจ และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (Avers, 1986)

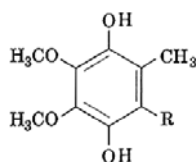
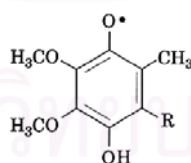
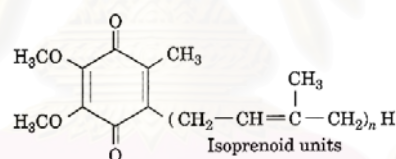
## การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Devlin, 2002; Voet, 1995)

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันหลายขั้นตอนของสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนซึ่งมีการจัดเรียงตัวกันอยู่ในรูปของ complex ต่างๆ 4 complexes แต่ละ complex ก็จะถูกประกอบด้วยเอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอน ตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่มี prosthetic group และโปรตีนโครงสร้างที่ทำให้ complex คงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้ก็ยังมีตัวขนส่งอิเล็กตรอนขนาดเล็กทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex ได้แก่ cytochrome c และ coenzyme Q หรือ ubiquinone (พัชรา วีระกะลัส, 2544) ตัวอย่างของตัวขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Garrett และ Grisham, 1999; Zubay, 1993) ได้แก่

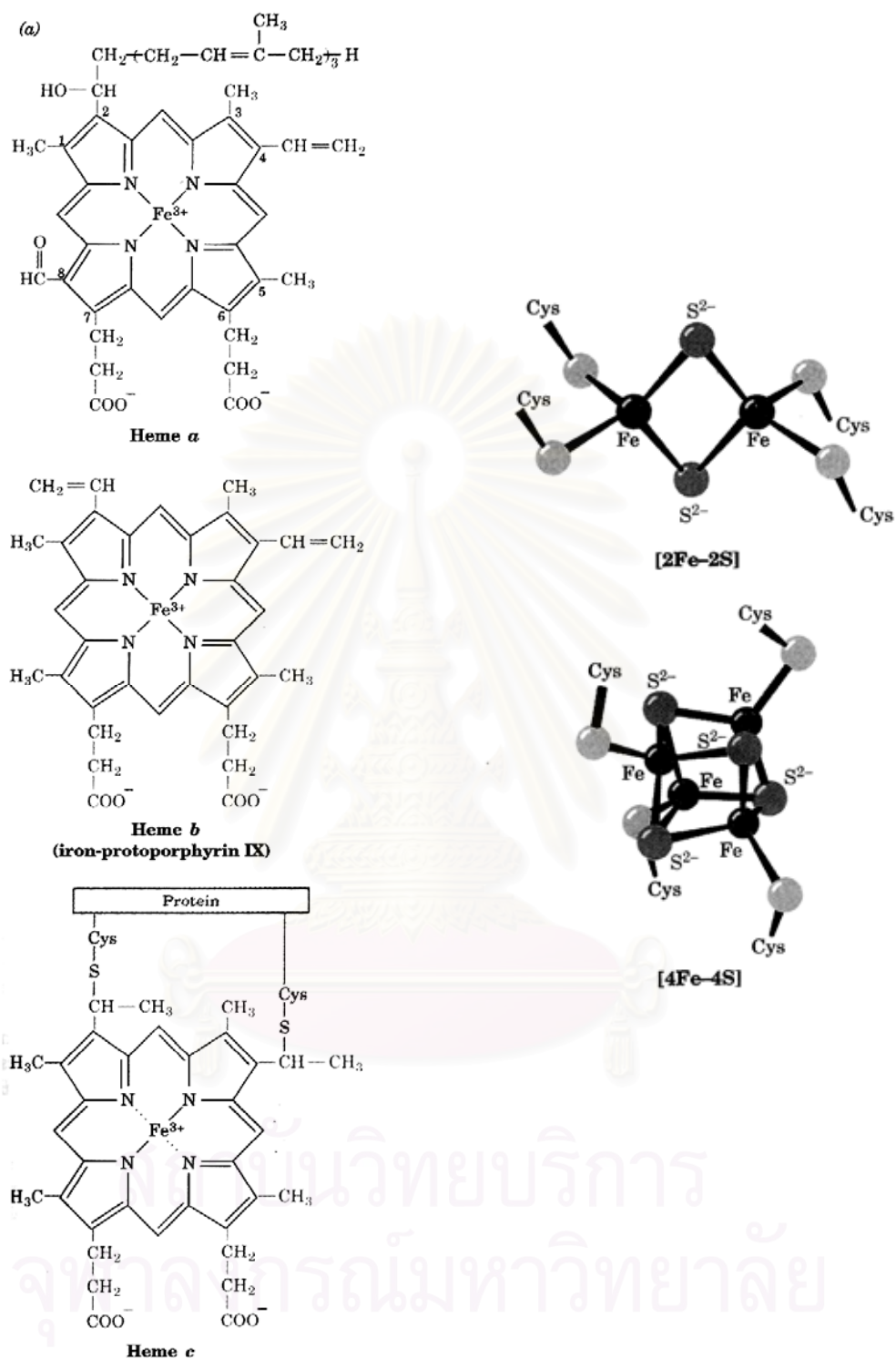
1. Flavoprotein เป็นโปรตีนที่มี prosthetic group เชื่อมอยู่ เช่น Flavin mononucleotide (FMN) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex I ส่วน flavin adenine dinucleotides (FAD) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex II (รูปที่ 7)
2. Coenzyme Q หรือ ubiquinone (CoQ หรือ UQ) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในชั้นไขมัน ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex I, II และ III (รูปที่ 8)
3. Cytochrome เป็นโปรตีนที่มี heme เป็น prosthetic group ได้แก่ cytochrome *b*, *c*, *c*<sub>1</sub>, *a* และ *a*<sub>3</sub> ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนได้ครั้งละ 1 ตัว เมื่อ cytochrome อยู่ในสภาพออกซิไดซ์ โมเลกุลของเหล็กที่อยู่ภายในจะอยู่ในรูปเฟอร์ริก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) แต่เมื่อรับอิเล็กตรอนมา 1 ตัวจะทำให้โมเลกุลของเหล็กที่อยู่ภายในเปลี่ยนจากเฟอร์ริก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) เป็นเฟอร์รัส ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ทำให้ cytochrome อยู่ในสภาพรีดิวซ์ และเมื่อส่งอิเล็กตรอนไป 1 ตัวก็จะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพออกซิไดซ์ตามเดิม (รูปที่ 9)
4. Iron-sulfur protein (Fe-S protein) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบ และการรับส่งอิเล็กตรอนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{3+}$  คล้ายกับใน cytochrome แต่อะตอมของเหล็กจะจับอยู่กับอะตอมของซัลเฟอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์แล้วเกิดเป็น Fe-S center ไม่ได้อยู่ในรูปของ heme เหมือนกับใน cytochrome (รูปที่ 9)
5. Protein-bound copper จะทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนครั้งละ 1 ตัว ซึ่งก็จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง  $\text{Cu}^+$  และ  $\text{Cu}^{2+}$



รูปที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของ flavin mononucleotide (FMN) ซึ่งเป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex I และ flavin adenine dinucleotides (FAD) ซึ่งเป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex II (Zubay, 1993)



รูปที่ 8 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Coenzyme Q (Voet และคณะ, 2006)



รูปที่ 9 ด้านซ้ายแสดงลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b, และ c ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ cytochrome a, b และ c ตามลำดับ ส่วนด้านขวาแสดงลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ (Voet และคณะ, 2006)



การถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจผ่านสารตัวกลางต่างๆ ทั้ง 4 complexes จะมีหลายขั้นตอนเป็นไปตามค่า redox potential ( $E_0$ ) ที่เพิ่มขึ้นโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (รูปที่ 10) ซึ่งแต่ละ complex ก็จะมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

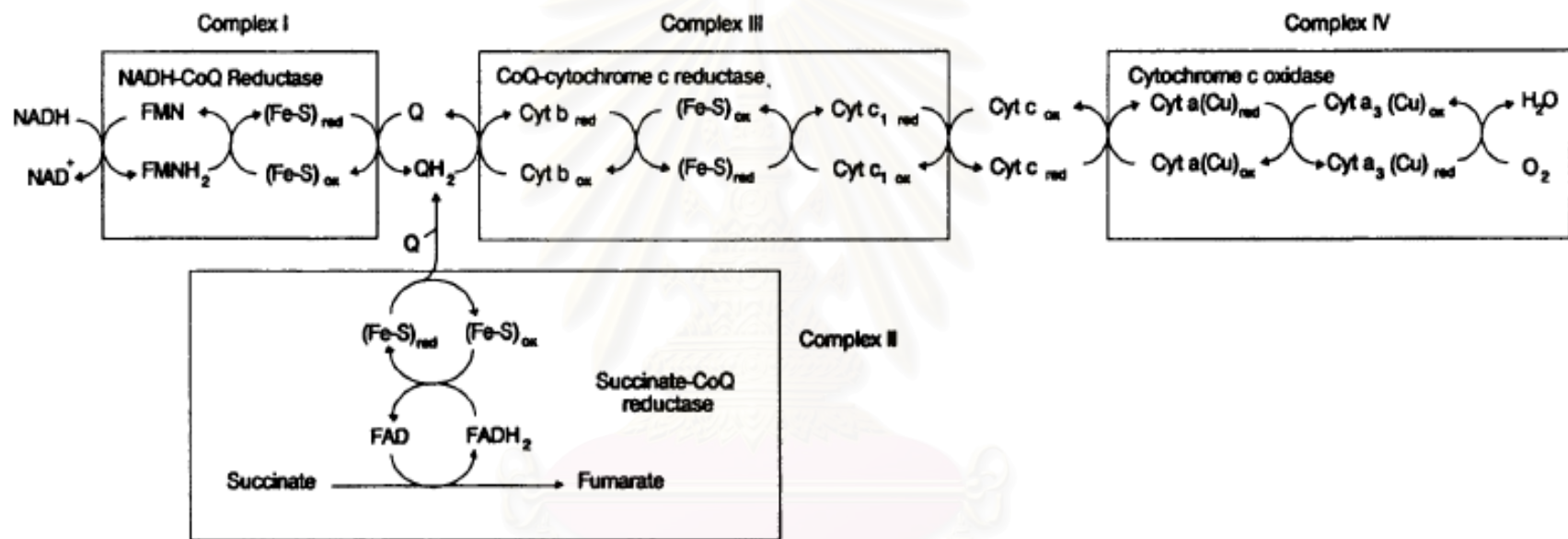
1. complex I หรือ NADH dehydrogenase หรือ NADH-ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ NADH ที่อยู่ใน matrix ของไมโทคอนเดรีย แล้วส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ coenzyme Q โดยเริ่มแรก FMN จะรับอิเล็กตรอนจาก NADH จากนั้นจะส่งต่อไปให้  $Fe^{3+}$  ใน Fe-S protein ซึ่งอิเล็กตรอนจาก Fe-S protein ก็จะถูกส่งต่อไปยัง coenzyme Q

2. complex II หรือ succinate dehydrogenase หรือ ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ succinate ได้เป็น fumarate และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปให้ coenzyme Q เช่นเดียวกับ complex I โดยเริ่มจาก FAD มารับอิเล็กตรอนจาก succinate ผ่านไปตาม Fe-S centers แล้วจึงส่งต่อไปยัง coenzyme Q

3. complex III หรือ ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase หรือ cytochrome  $bc_1$  complex ประกอบด้วย cytochrome  $b$ , cytochrome  $c_1$  และ iron-sulfur protein ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก coenzyme Q ไปยัง cytochrome  $c$  ซึ่ง cytochrome  $c$  เป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic protein ขนาดเล็ก อยู่บนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เมื่อ cytochrome  $c$  จับกับ complex III ก็จะได้รับอิเล็กตรอนจาก complex III ทำให้กลายเป็น reduced cytochrome  $c$  จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามผิวของเยื่อหุ้มแล้วไปจับกับ subunit II ของ complex IV ทำให้เกิดการส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ยัง complex IV ต่อไป

4. complex IV หรือ cytochrome  $c$  oxidase ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome  $c$  ไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับโปรตอน ( $H^+$ ) กลายเป็นน้ำ โดยเริ่มจาก  $Cu_A$  รับอิเล็กตรอนจาก cytochrome  $c$  แล้วส่งต่อไปยัง cytochrome  $a$  และ cytochrome  $a_3-Cu_B$  เพื่อส่งต่อไปให้ออกซิเจนในที่สุด

สถาบันนวัตกรรมการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจผ่านสารตัวกลางต่างๆ ทั้ง 4 complexes (Bhagavan, 2002)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complexes ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Avers, 1986)

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

เราสามารถแบ่งสับสเตรทที่ไมโทคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และทำให้มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. สับสเตรทชนิด NAD<sup>+</sup>-linked ได้แก่ glutamate, malate, pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์ในไมโทคอนเดรีย สับสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ NAD<sup>+</sup> ได้เป็น NADH และ H<sup>+</sup> ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I

2. สับสเตรทชนิด FAD-linked ได้แก่ succinate ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์ในไมโทคอนเดรียจะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น FADH<sub>2</sub> ซึ่งจะ

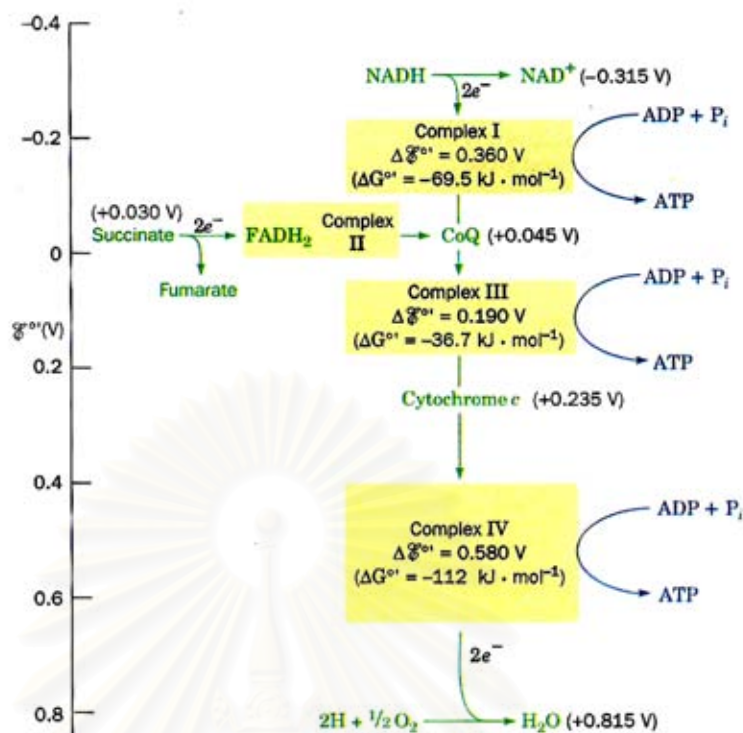
ให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, Nelson และ Cox, 2000; Mathews, Holde และ Ahern, 2000)

### ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันและการสังเคราะห์ ATP

ในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกลูกโซ่การหายใจโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน จาก NADH หรือ  $FADH_2$  ไปยังออกซิเจนผ่านตัวกลางต่างๆ ที่รับส่งอิเล็กตรอนก็จะมี การปลดปล่อยพลังงานอิสระออกมาจำนวนหนึ่ง ซึ่งมากพอที่จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ Pi โดยกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันซึ่งสามารถพบได้ในลูกลูกโซ่การหายใจทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณ complex I, complex II และ complex III หรือเรียกว่า site I, site II และ site III ตามลำดับ เพราะทั้ง 3 ตำแหน่งนั้นพลังงานอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้นมีค่ามากกว่า 30.5 กิโลจูลต่อโมล (kJ/mol) (พลังงานที่ต้องใช้ในการสร้าง ATP 1 โมล) (Voet และคณะ, 2006) จึงสามารถเกิดการสังเคราะห์ ATP ได้ ส่วนที่ complex II นั้นพบว่าพลังงานอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมามีค่าน้อยกว่า 30.5 กิโลจูลต่อโมล ดังนั้นจึงไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้น (รูปที่ 11)

ในสภาวะปกติแล้วทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และการสังเคราะห์ ATP นั้นจะเกิดขึ้นควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณีก็พบว่าทั้ง 2 กระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไม่โตคอนเดรียที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่ดีหรือเก็บนานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไมโตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น สารประเภท uncouplers เช่น DNP (2,4 dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) เป็นต้น สารประเภทนี้จะสามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็วโดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger และคณะ, 2000)

สถานนวยทยบรกร  
จุพาลงกรณัฒหาวิททยาลัย

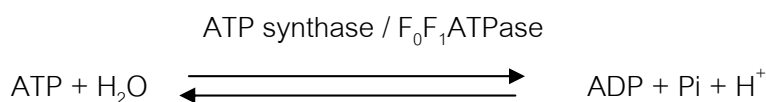


รูปที่ 11 การถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจไปตาม complex ต่างๆ ตามค่า redox potential ( $E_0$ ) ที่เพิ่มขึ้น และตำแหน่งที่เกิดการสังเคราะห์ ATP (Voet และคณะ, 2006)

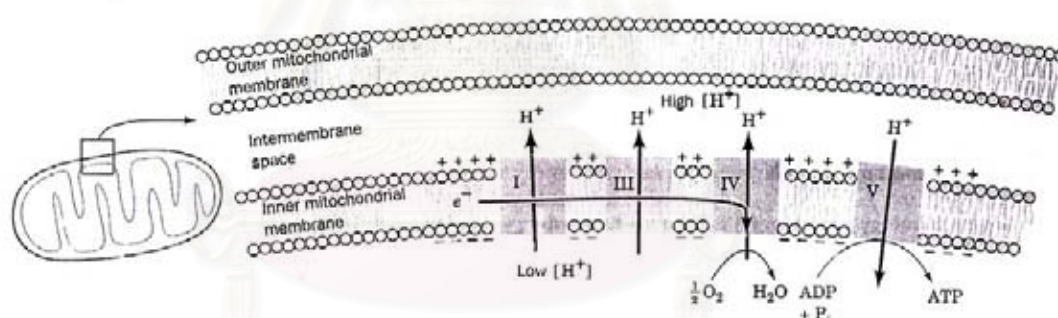
### ทฤษฎีเกี่ยวกับการสังเคราะห์ ATP

การสังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรียนั้นจำเป็นต้องใช้พลังงานจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจนั้นจะมีการสงวนไว้ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดหรือทฤษฎีมากมายเพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ แต่ปัจจุบันทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับคือ chemiosmotic theory ซึ่งถูกเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี 1961 โดยเสนอไว้ว่า ในขณะที่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump)  $H^+$  จาก matrix ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ทำให้ที่ intermembrane space มีความเข้มข้นของ  $H^+$  มาก และที่ matrix มีความเข้มข้นของ  $H^+$  น้อย จึงเกิดความแตกต่างของประจุ หรือ proton gradient ขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นใน ทำให้เกิด electrical gradient ซึ่งรวมเรียกว่า electrochemical proton gradient หรือ proton-motive force (Voet และคณะ, 2006) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ไมโทคอนเดรียนั้นต้องเป็น intact ไมโทคอนเดรีย คือสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของโปรตอนได้ และ electrochemical proton gradient นี้เองจะเป็นส่วนที่ให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์

ATP จาก ADP และ Pi (รูปที่12) โดยโปรตอนจาก intermembrane space จะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F<sub>0</sub> domain ของเอนไซม์ ATP synthase หรือ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase และไปกระตุ้น F<sub>1</sub> domain ให้สังเคราะห์ ATP ขึ้นจากปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันของ ADP ดังแสดงในสมการ



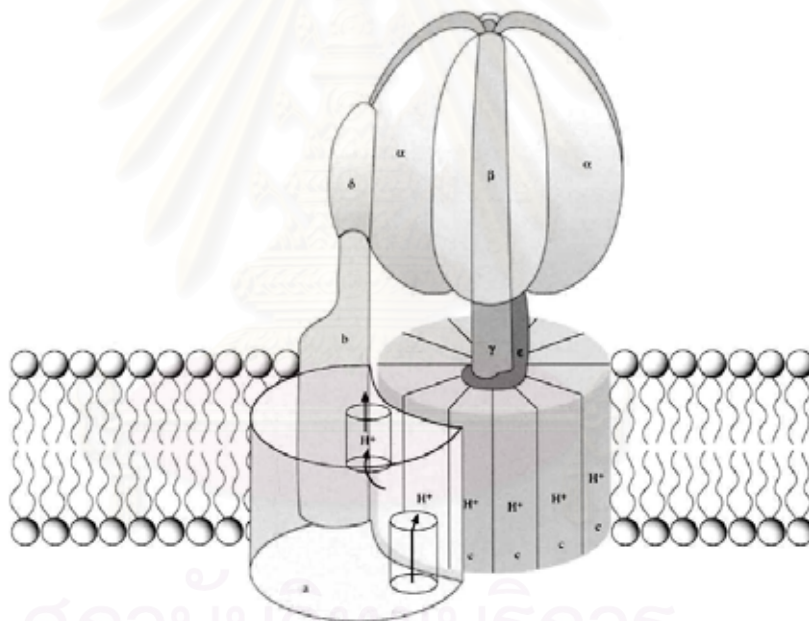
จากสมการแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์และปฏิกิริยาการสลาย ATP นั้นเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ โดยในสภาวะปกติเอนไซม์ ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาไปในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ แต่ในกรณีที่ได้รับสารใดๆ ก็ตามที่ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดสภาวะ uncoupling ขึ้น นั่นคือทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันและฟอสฟอริเลชันแยกออกจากกัน จะมีผลทำให้ electrochemical proton gradient เสียไป พบว่าในสภาวะเช่นนี้ F<sub>1</sub> domain ซึ่งปกติจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ATP กลับไปกระตุ้นให้มีการสลาย ATP ขึ้นมาแทนเพื่อเป็นการผลัดดันให้เกิด electrochemical proton gradient ขึ้นอีกทางหนึ่ง ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดการสลาย ATP นั้นเป็นผลจาก ATPase activity ที่เพิ่มขึ้น (ในสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ) (Danishefsky, 1980; Zubay, 1993; Devlin, 2006; Lehninger และคณะ, 2000; Voet และคณะ, 2006)



รูปที่ 12 การควบคู่ (coupling) กันระหว่างการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP (Voet และคณะ, 2006)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จะเกิดขึ้นได้จะต้องอาศัยเอนไซม์ ATP synthase หรือ F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase ซึ่งจัดว่าเป็น complex V ของลูกโซ่การหายใจ พบว่าโครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าวจะประกอบไปด้วยโปรตีนหลายหน่วยย่อยมารวมกัน (multisubunit protein) มีน้ำหนักโดยรวมมากกว่า 500,000 daltons มี head protein เป็นส่วนหัวของเอนไซม์ เรียกว่า F<sub>1</sub> domain (F<sub>1</sub> ATPase) ประกอบด้วยวงแหวนจำนวน 6 subunits คือ 3 $\alpha$  และ 3 $\beta$  และยังมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบย่อยอีก 3 ชนิดคือ  $\gamma$ ,  $\delta$  และ  $\epsilon$  ยื่นจากผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียไปยัง matrix อีกส่วนของเอนไซม์จะเป็น F<sub>0</sub> domain ซึ่งเป็น transmembrane H<sup>+</sup> carrier ประกอบด้วยวงแหวน

โปรตีน 10-14 subunits ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถหมุนได้ จึงเรียกได้อีกอย่างว่า rotor ring ที่  $F_1$  domain จะมีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแขนยื่นยาวออกมา (elongated arm) ไปสัมผัสกับส่วน  $F_0$  domain ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า stator ขณะที่  $H^+$  เคลื่อนที่ผ่านช่องที่เกิดขึ้นระหว่างรอยสัมผัสของ rotor และ stator จะทำให้เกิดการหมุนของ rotor ring ซึ่งการหมุนนี้จะทำให้เกิดการหมุนของ rotating stalk อย่างรวดเร็ว ผลที่เกิดขึ้นคือ เกิดการเปลี่ยนรูปของพลังงานที่เกิดจาก proton motive force เปลี่ยนไปเป็นพลังงานกล (mechanical energy) แล้วเปลี่ยนรูปอีกครั้งไปเป็นพลังงานเคมีโดยอาศัย head protein ซึ่งจะมี binding site สำหรับ ADP และ Pi เป็นตัวช่วยผลักดันให้เกิดการสร้าง ATP ซึ่งเอนไซม์ ATP synthase จะสามารถสร้าง ATP ได้มากกว่า 100 โมเลกุลต่อวินาทีโดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านของ  $H^+$  โดยการสร้าง ATP 1 โมเลกุลจะอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านประมาณ 3-4 โปรตอน (รูปที่ 13) (Alberts และคณะ, 2002; Garrett และ Grisham, 2002; Karp, 2002; Lehninger และคณะ, 2000)



รูปที่ 13 ลักษณะและโครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase หรือ  $F_1F_0$ -ATPase (Bhagavan, 2002)

### การเกิดพิษต่อไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียนั้นมีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ ดังนั้นสารใดก็ตามที่รบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรียก็จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ได้ จากการที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียนั้นมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านที่ไม่ยอมให้สารต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ การจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกได้ต้องอาศัย

specific channels และ carrier proteins เยื่อหุ้มชั้นในจึงเป็นเป้าหมายของการเกิดพิษต่อไมโทคอนเดรีย โดยสารเคมีหรือสารพิษอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียได้โดยการเพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มชั้นในนี้ หรือโดยการยับยั้งการขนส่งของ specific channels และ carrier proteins ก็ได้ อย่างไรก็ตามก็ตีกลไกการเกิดพิษส่วนใหญ่จะเกิดจากการเปลี่ยนคุณสมบัติของการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะมีผลทำให้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้ในรูปของ electrochemical proton gradient ถูกนำมาใช้ในการสร้างและปลดปล่อยออกมาในรูปพลังงานความร้อนแทน ดังนั้นไมโทคอนเดรียจึงสูญเสียพลังงานที่ได้จากการเมตาบอลิซึม (Wallace และ Starkov, 2000)

นอกจากความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรียดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ยังพบว่ามีสารอีกหลายประเภทที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียด้วยกลไกอื่นๆ อีก ซึ่งสามารถแบ่งสารที่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

### 1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Wallace และ Starkov, 2000; Devlin, 2002)

1.1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex I (site I) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q โดยทั่วไปแล้ว complex I จะเป็นตำแหน่งที่เกิดความเสียหายได้ง่ายที่สุดในลูกโซ่การหายใจ มีสารเคมีมากกว่า 60 ชนิดทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ทราบแล้วว่ามีผลยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ complex I ยกตัวอย่างเช่น rotenone, rhein, ptericidin, amytal, ยากลุ่ม barbiturates, mercurials, demerol เป็นต้น และพบว่าโครงสร้างของเอนไซม์ใน complex I และความไวต่อตัวยับยั้งของ complex I นั้นจะไม่เหมือนกันในแต่ละ species โดยพบว่าไมโทคอนเดรียจากแมลงและปลาจะไวต่อการยับยั้งที่ complex I มากที่สุด ในขณะที่ไมโทคอนเดรียจากพืชและรามักจะไม่ค่อยไวต่อสารยับยั้ง ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าไมโทคอนเดรียที่ไวต่อสารยับยั้งมากที่สุดเป็นไมโทคอนเดรียจากเซลล์ประสาท

1.2 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex II คือสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก succinate ไปยัง coenzyme Q เช่น malonate ซึ่งออกฤทธิ์เป็น competitive inhibitor ของ succinate ในการแข่งขันกับเอนไซม์ succinate dehydrogenase ตัวยับยั้งอื่นๆ เช่น carboxin, thenoyl trifluoroacetone (TTFA) เป็นต้น

1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex III (site II) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก cytochrome *b* ไปยัง cytochrome *c* ตัวอย่างเช่น myxothiazol (จากเชื้อ myxobacterium *Myxococcus fulvus*), antimycin A, funicolusin, zinc ion เป็นต้น ซึ่งความไวต่อตัวยับยั้งของ complex III ในแต่ละ species ก็จะไม่แตกต่างกัน



1.4 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอติเลคตรอนที่ complex IV (site III) คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอติเลคตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน โดยถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถถ่ายทอติเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้แล้ว ยังทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ด้วย ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ เช่น cyanide, azide, carbon monoxide เป็นต้น

## 2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชัน หรือการสังเคราะห์ ATP ซึ่งได้แก่

2.1 oligomycin และ dicyclohexycarbodiimide (DCDD) สารทั้ง 2 ชนิดนี้ออกฤทธิ์โดยการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase ปกติแล้วที่  $F_0$  domain ของเอนไซม์ ATP synthase นั้นจะมี subunit c ทำหน้าที่จัดเรียงตัวเป็นช่องเพื่อให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่าน  $F_0$  domain และไปกระตุ้น  $F_1$  domain ให้สังเคราะห์ ATP ต่อไป พบว่า DCDD จะออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ subunit c ดังกล่าวนี้อ ทำให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่านไปไม่ได้ ในทำนองเดียวกัน oligomycin ก็ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ ATP synthase โดยการไปจับกับ subunit ของ  $F_0$  domain ทำให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่านไปไม่ได้เช่นกัน เมื่อไม่เกิดการเคลื่อนที่ผ่านของโปรตอน การทำงานของเอนไซม์ ATP synthase ก็จะถูกยับยั้ง และการสังเคราะห์ ATP ก็จะไม่เกิดขึ้น (Garrett และ Grisham, 1999)

2.2 atractyloside ออกฤทธิ์โดยการไปยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการสังเคราะห์ ATP จึงถูกยับยั้งเพราะขาด ADP ที่เป็นสารตั้งต้นที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP นั้นเอง (Lehninger และคณะ, 2000)

2.3 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB) เป็น aromatic disulfide ออกฤทธิ์โดยการไปทำปฏิกิริยากับหมู่ sulfhydryl (-SH) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำให้การส่งผ่าน  $P_i$  จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรียถูกยับยั้ง การสังเคราะห์ ATP จึงถูกยับยั้งเพราะขาด  $P_i$  ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard และคณะ, 1969)

2.4 N-ethylmaleimide (NEM) หรือ mersalyl จะมีผลไปยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งจะช่วยให้ไมโทคอนเดรียขาด  $P_i$  เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้  $P_i$  ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Erecinska และ Wilson, 1981)

## 3. สารที่ออกฤทธิ์ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดสภาวะ uncoupling

สารในกลุ่มนี้เรียกว่า uncouplers ออกฤทธิ์ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันและฟอสฟอริลเลชันแยกออกจากกัน จากการที่สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น  $H^+$  carrier หรือ proton-ionophore ซึ่งสามารถทำให้โปรตอนที่อยู่ใน intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้อย่างอิสระ โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATP synthase สารเหล่านี้จะทำให้

proton gradient ถูกทำลาย ดังนั้นไมโทคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่ ทำให้เกิดการออกซิไดซ์สับสเตรทและใช้ออกซิเจนในสภาวะที่สูงกว่าปกติ นั่นคือ ยังเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจอยู่ แต่จะไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP และทำให้พลังงานที่ถูกปลดปล่อยออกมาในระหว่างที่เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนนั้นถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนแทน (Garrett และ Grisham, 1999) ในสภาวะเช่นนี้  $F_1$  domain ซึ่งในสภาวะปกติจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ATP กลับมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ขึ้นมาแทน เพื่อเป็นการผลักดันให้เกิด proton gradient ขึ้น โดยการกระตุ้นให้เกิดการสลาย ATP นั้นเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase มี activity เพิ่มขึ้น ซึ่งถ้าไมโทคอนเดรียอยู่ในสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ

สามารถแบ่งสารในกลุ่มนี้ตามกลไกในการออกฤทธิ์ได้ดังนี้ คือ (Erecinska และ Wilson, 1981; Hanstein, 1976; Wallace และ Stakov, 2000)

3.1 สารที่ออกฤทธิ์เป็น structural uncoupling ได้แก่ สารต่างๆ รวมถึงกระบวนการใดๆ ที่มีผลไปทำให้ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียเสียไป ซึ่งมีผลทำให้การควบคุมการหายใจ (respiratory control) และประสิทธิภาพในการเกิดฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรียลดลง และมีผลเพิ่ม ATPase activity ด้วย ตัวอย่างเช่น detergent, phospholipase และการ sonicate เป็นต้น

3.2 ionophores คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออกของ  $H^+$  และ cation เช่น  $K^+$  ดังนั้นพลังงานที่ได้จาก electrochemical gradient จึงถูกนำมาใช้ในการผลักดัน cation เข้าสู่ matrix แทน สามารถแบ่งสารในกลุ่มนี้ตามกลไกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

3.2.1 channel type สารในกลุ่มนี้จะจัดเรียงตัวเป็นช่องที่บริเวณชั้นไขมันของไมโทคอนเดรียทำให้อิออน เช่น  $H^+$  และ  $K^+$  สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้ ตัวอย่างเช่น gramicidin เป็นต้น

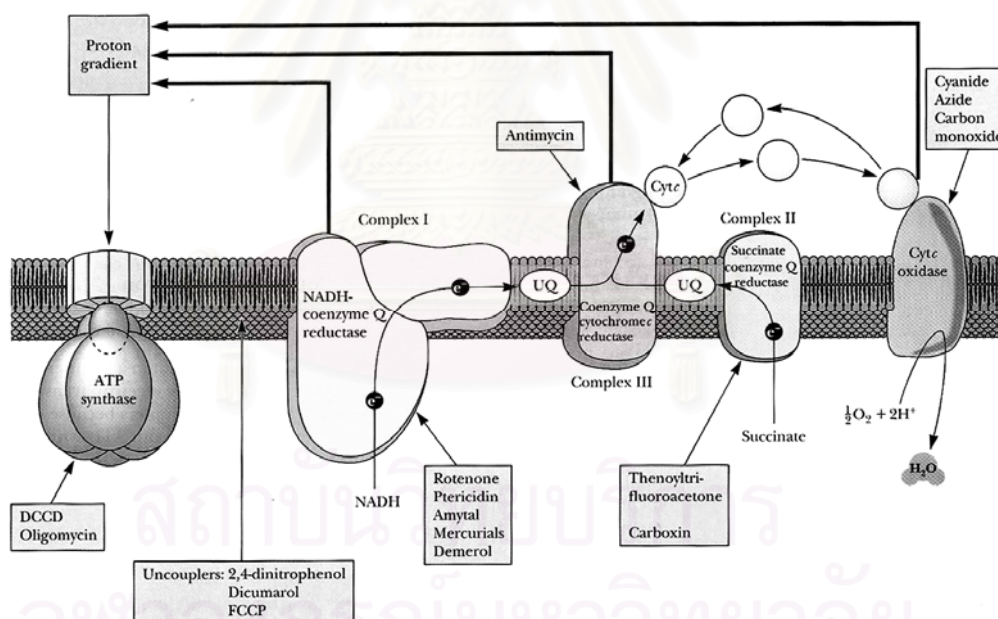
3.2.2 carrier type สารกลุ่มนี้จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายได้ในไขมัน (lipid-soluble-complex) กับอิออน แล้วเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ตัวอย่างเช่น valinomycin, nigericin เป็นต้น

3.3 สารพวก phenols และ anionic aromatic compounds อื่นๆ สารกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid ทำให้สามารถจับกับ  $H^+$  ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน แล้วเคลื่อนที่เข้าไปใน matrix แยกตัวให้  $H^+$  ซึ่งการจับและการแตกตัวนี้เกิดจากการที่ด้านใน matrix มี pH สูงกว่าด้านนอก ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ 2,4-dinitrophenol (DNP), carbonyl

cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), carbonyl cyanide *m*-chlororophenylhydrazone) (CCCP) เป็นต้น

3.4 สารที่ออกฤทธิ์ทำให้เกิดสภาวะ uncoupling โดยเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะโควาเลนต์ ได้แก่ alkylating agents เช่น สารจำพวก mustard gas และ electrophiles เช่น isothiocyanates สารเหล่านี้มีรายงานการเกิดสภาวะ uncoupling แต่ยังไม่ทราบกลไกการเกิดที่แน่นอน

3.5 indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดสภาวะ uncoupling ด้วยกลไกต่างๆ เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP ( $F_1$  ATPase) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งเป็นสารจากพืชที่มี phenolic groups อยู่ในโครงสร้าง สามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 nmole/mg protein ส่วน arsenic กับ cadmium ทำให้เกิด uncoupling โดยการไปจับกับหมู่ sulfhydryl อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่ม indirect uncouplers นี้จะไม่มีผลไปกระตุ้น ATPase activity



รูปที่ 14 ตำแหน่งต่างๆ ที่ตัวยับยั้งออกฤทธิ์ต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจและ/หรือกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (Garrett และ Grisham, 1999)

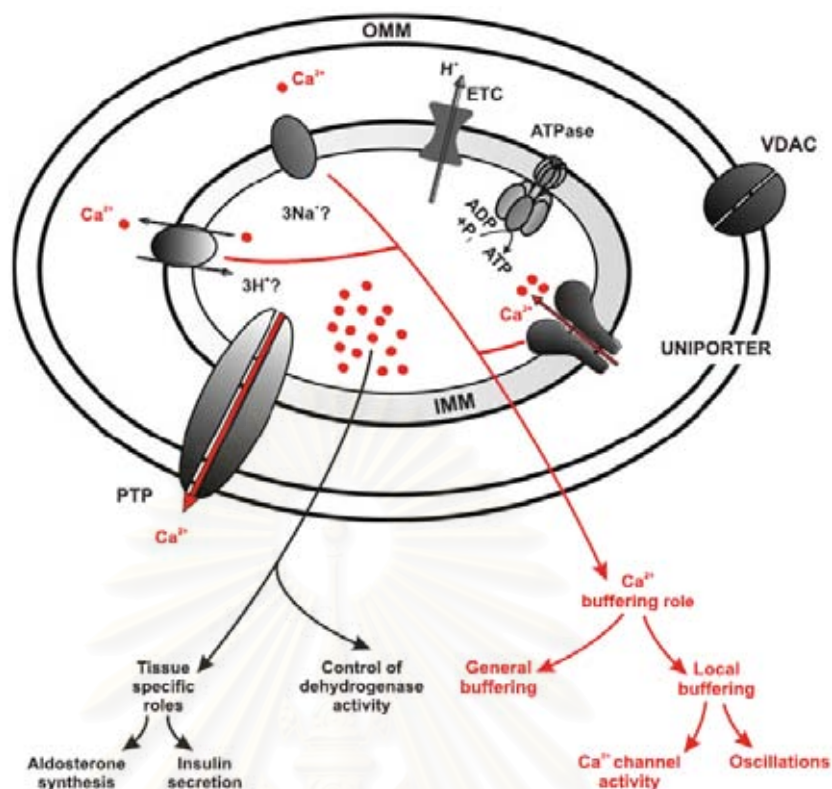
### การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโทคอนเดรีย

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าไมโทคอนเดรียมีหน้าที่ที่สำคัญในการสังเคราะห์ ATP (Carafoli, 2003; Devlin, 2002) ให้แก่เซลล์ แต่นอกเหนือจากหน้าที่ดังกล่าวไมโทคอนเดรียก็ยังมี

อีกหน้าที่ซึ่งมีความสำคัญเช่นเดียวกันคือ หน้าที่ในการควบคุมสมดุลของอิออนบวก (cation) ต่างๆ ภายในเซลล์ทั้ง monovalent และ divalent cation โดยเฉพาะอย่างยิ่งการควบคุมสมดุลของแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis) โดยการนำแคลเซียมเข้าไปเก็บสะสมไว้ใน matrix ซึ่งเป็นการควบคุม metabolic activity ทั้งของไมโทคอนเดรียเองและของเซลล์ด้วย เพราะแคลเซียมที่อยู่ใน matrix ของไมโทคอนเดรียจะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ pyruvate dehydrogenase, เอนไซม์  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase และเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase และแคลเซียมที่อยู่ใน matrix ก็ยังเป็น positive modulator ต่อการสร้าง ATP และสามารถควบคุมการทำงานของ metabolite transporters บางชนิด ส่วนแคลเซียมภายในเซลล์ก็จะมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ยังมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์แบบ necrosis และ apoptosis ด้วย กล่าวคือ ถ้าใน cytosol มีปริมาณแคลเซียมมากเกินไป อาจมีผลไปกระตุ้น hydrolyzing enzymes และทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ necrosis ได้ ส่วนกรณีที่มีปริมาณแคลเซียมต่ำทั้งใน cytosol และในแหล่งเก็บสะสม ได้แก่ ไมโทคอนเดรีย และ endoplasmic reticulum จะสามารถพบ anti-apoptotic Bcl-2 family อยู่ในปริมาณสูง ทำให้สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ได้ เป็นต้น (Giacomello และคณะ, 2007)

การขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมภายในไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง Ca uniporter ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และต้องอาศัยความต่างศักย์ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (proton motive force หรือ electrochemical potential) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ดังนั้นถ้าสารใดๆ ก็ตามมีผลไปทำลาย electrochemical potential ของไมโทคอนเดรีย เช่น uncoupler, respiratory chain inhibitor ก็จะทำให้การขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมภายในไมโทคอนเดรียถูกยับยั้งได้ ส่วนการขนส่งแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นได้หลายทาง (Bernardi, 1999; Carafoli, 2003) (รูปที่ 15) ดังนี้

1. sodium-independent calcium exchange เป็นการนำ  $\text{Ca}^{2+}$  ออกจาก matrix โดยการแลกเปลี่ยนกับ  $\text{H}^+$  ประมาณ 3 โมเลกุล
2. sodium calcium exchange เป็นการนำ  $\text{Ca}^{2+}$  1 โมเลกุลออกจาก matrix โดยการแลกเปลี่ยนกับ  $\text{Na}^+$  ประมาณ 3 โมเลกุล
3. ผ่านทาง permeability transition pore (PTP)



รูปที่ 15 กระบวนการควบคุมสมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์ โดยการนำแคลเซียมเข้ามาสะสมภายในไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง uniporter ส่วนการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง  $\text{Ca}^{2+}/3\text{H}^{+}$  antiport system,  $\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^{+}$  antiport และ PTP รวมทั้งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของแคลเซียมต่อการทำงานต่างๆ ของเซลล์ (ETC: electron transport chain, VDAC: voltage-dependent anion channel, OMM: outer mitochondrial membrane, IMM: inner mitochondrial membrane, PTP: permeability transition pore) (Giacomello และคณะ, 2007)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### 1. วัสดุและอุปกรณ์

##### 1.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม สัตว์ทดลองดังกล่าวจะถูกนำมาพักเพื่อปรับสภาพร่างกายก่อนนำมาทำการทดลอง อย่างน้อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  มีแสงสว่างพอเหมาะ จัดให้มีช่วงมืดสลับกับช่วงสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมง มีระบบระบายอากาศ และเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงที่มีวัสดุรองนอน โดยเลี้ยงดูสัตว์ทดลองด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และมีน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการ และปฏิบัติกับสัตว์ทดลองตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ

##### 1.2 สารเคมี

###### แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

###### สารทดสอบ

สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol จากแก่นไม้แดง ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

###### สารเคมีอื่นๆ

สารเคมีจากบริษัท Sigma ได้แก่ adenosine 5' diphosphate (ADP), adenosine 5' triphosphate (ATP), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, ammonium molybdate, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ), 2,4-dinitrophenol (DNP), dithiothreitol (DTT), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, HEPES, L-glutamic acid, magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ), malic acid, nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH), potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic anhydrous ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), rotenone, sodium bisulfate, sodium hydroxide (NaOH), sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate monobasic, sodium potassium tartrate, sodium sulfite, succinic acid, sucrose, trichloroacetic acid (TCA)

สารเคมีจากบริษัท E. Merck ได้แก่ absolute ethanol, sodium carbonate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), hydrochloric acid (HCl), potassium hydroxide (KOH)

### 1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Heidolph motor drive tissue homogenizer (Type 50203 RZR 2)
2. Thomas glass homogenizer tube with teflon pestle
3. pH-meter
4. Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge (Himac model CR20B3) และ Rotor (model RPR 18-3)
5. Oxygraph
  - Biological Oxygen Monitor (YSI Model 53)
  - Clark Oxygen Electrode (YSI 5331)
  - Gilson Oxygen chamber
  - Strip chart recorder (Gilson recorder model N2)
  - Oxygen Probe Service Kit (YSI 5775) ประกอบด้วย
    - Clark-type membrane booklets (Std.)
    - $\text{O}_2$  Probe Solution: half saturated KCl solution
    - O-rings
6. Temperature controlled circulator water bath
7. UV / Visible spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)
8. Autometric pipette ขนาด 200, 1,000 และ 5,000  $\mu\text{l}$  (Gilson, France)
9. Hamilton microsyringe 10 และ 25  $\mu\text{l}$
10. Vortex mixer (Velp. Scientifica, Europe)

## 2. วิธีการวิจัย

### 2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่ 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 2  $\mu\text{l}$ , 0.1 M ATP (pH 7.2) 150  $\mu\text{l}$ , 250 mg/ml BSA 20-120  $\mu\text{l}$ , 0.4 M  $\text{CaCl}_2$  2  $\mu\text{l}$ , 1.05 M DTT 2  $\mu\text{l}$ , 0.05 M DNP 2-6  $\mu\text{l}$ , 1 mM EGTA (pH 7.2), 1 M HEPES buffer (pH 7.2), 2.5% ammonium molybdate, 1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) 10  $\mu\text{l}$ ,

0.2 M NADH ใน 1% NaHCO<sub>3</sub> 10  $\mu$ l, 0.5 M NaOH, 1 M succinate (pH 7.2) 10  $\mu$ l, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 2.3 M KCl, 0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 M sucrose และ 20% w/v trichloroacetic acid

สารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่ สารทดสอบ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณที่ใช้ครั้งละ 10  $\mu$ l และ 5 mg/ml rotenone 2  $\mu$ l

ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลาย 1 N KOH และ 1 N HCl

## 2.2 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูแรท

เตรียมโดยวิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myer และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย ทำการปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate ของหนูแรทโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C โดยขั้นตอนการเตรียมไมโทคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

### ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

นำสลับหนูแรทด้วยอีเธอร์ แล้วทำ cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เทราดสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 100 ml ลงบนตับและช่องท้อง แล้วรีบตัดตับ ออกมาอย่างรวดเร็ว ล้างทันทีด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 50 ml และล้าง ต่อด้วย homogenizing medium (ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA, pH 7.2) ที่เย็นจัดหลายๆ ครั้งจนเลือดหมด แช่ตับใน homogenizing medium ปริมาตรประมาณ 60-70 ml จากนั้นใช้กรรไกรตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างเลือดโดยใช้สารละลาย homogenizing medium หลังจากนั้นนำชิ้นตับเล็กๆ แช่ใน homogenizing medium เทแบ่งใส่หลอด Thomas glass homogenizer ที่แช่เย็นจัด แล้วทำการ homogenize ด้วยเครื่อง Homogenizer (Heidolph Type 50203 RZR 2) ประมาณ 6-7 ครั้ง จนกระทั่งได้ liver homogenate ปริมาตรประมาณ 60-80 ml นำมาเทใส่หลอด centrifuge เพื่อนำไปปั่นแยกต่อไป

### ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่บรรจุอยู่ในหลอด centrifuge มาทำการปั่นแยกเพื่อให้ได้ไมโทคอนเดรีย โดยใช้ High Speed Refrigerated Centrifuge (Hitachi Himac model CR20B3) และใช้ rotor (model RPR 18-3) ซึ่งจะทำการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ (รูปที่ 16)

ครั้งที่ 1: นำ liver homogenate มาปั่นแยกที่ 600  $\times$  g (2,500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifuge หลอดใหม่ สำหรับส่วนที่เป็น pellets ให้ทิ้งไป



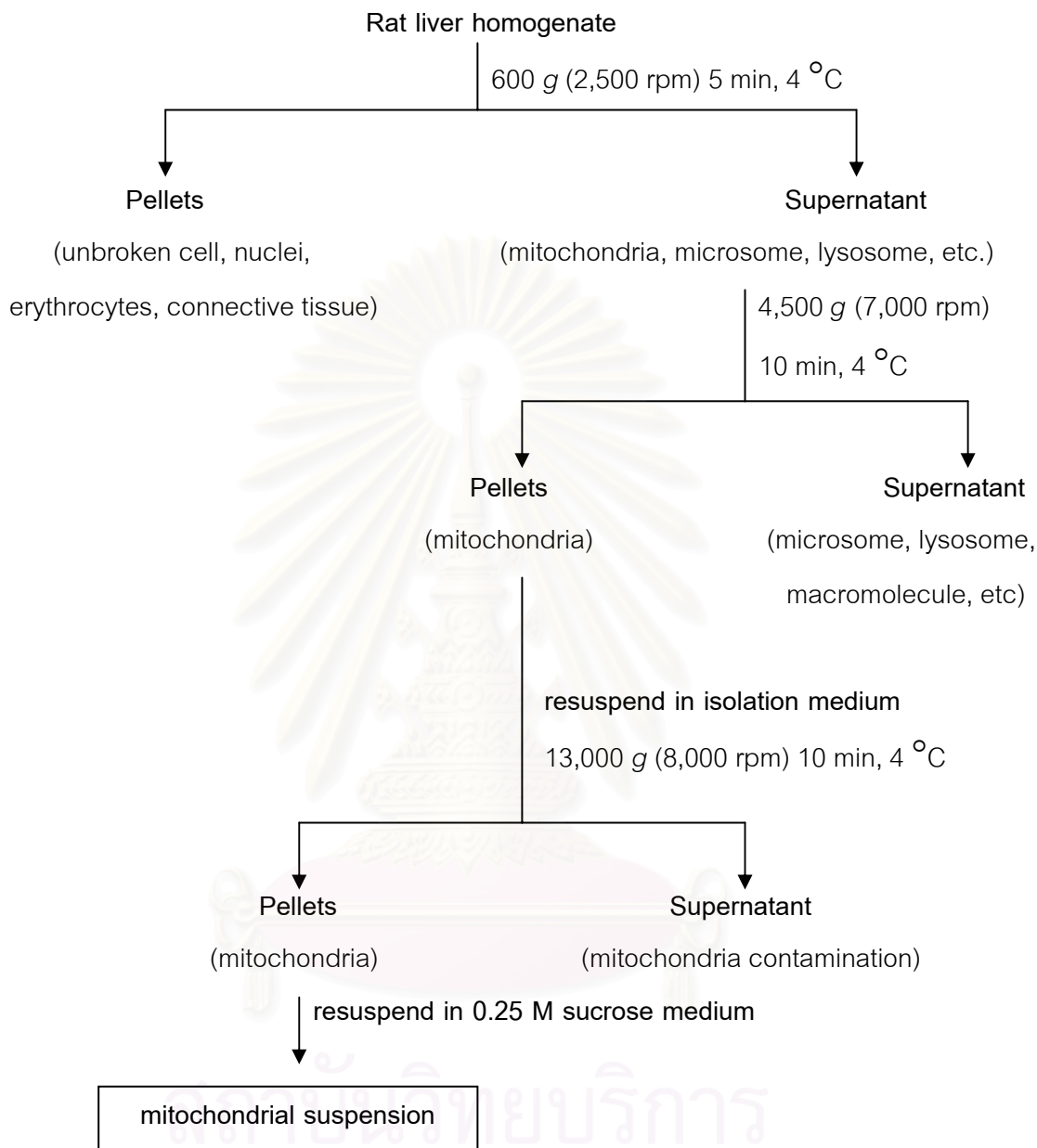
(หมายเหตุ: ส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้คือ ไมโทคอนเดรีย และไม่โครโซม

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

ครั้งที่ 2: นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นแยกต่อที่  $4,500 \times g$  (7,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินแยก supernatant fluid ทิ้งไป เอาเฉพาะส่วน pellets มา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำการ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้ตะกอนของไมโทคอนเดรียกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่ 3: นำมาปั่นแยกต่อที่  $13,000 \times g$  (8,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินส่วน supernatant fluid ทิ้งไป ส่วนของ pellets นั้นจะมีชั้นของไมโครโซมสีชมพูเกาะกันอย่างหลวมๆ อยู่ชั้นบนของตะกอน ให้กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml แล้ว homogenize เบาๆ ด้วยมือ จะได้ mitochondrial suspension จากนั้นจึงนำ mitochondrial suspension ที่ได้ไปแช่เก็บในภาชนะแช่แข็งตลอดการทดลอง

(หมายเหตุ: ไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการวิจัยจะต้องมีค่า respiratory control index (RCI) มากกว่า 4 ขึ้นไป)



รูปที่ 16 ขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955; Myers และ Slater, 1957)

### 2.3 การเตรียมไมโทคอนเดรียให้อยู่ในสภาวะที่ช็อกด้วยแรงดันออสโมติก (osmotic-shocked mitochondria)

นำ mitochondrial pellets ที่ได้จากการปั่นแยกครั้งที่ 3 ในข้อ 2.2 มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 เท่าจากที่เตรียมได้ หมุนกวนช้าๆ ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก็จะทำให้ได้ osmotic-shocked mitochondria จากนั้นจึงนำ osmotic-shocked mitochondria ที่ได้เก็บในภาชนะแช่แข็งเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 2.4 การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ และศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40 mM (60 mOsm)
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM (6 mOsm)
	KCl	92 mM (184 mOsm)
	(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm)	

ซึ่งเตรียมได้จาก	HEPES buffer, pH 7.2	1 M ปริมาณ 2 ml
	MgCl <sub>2</sub>	0.05 M ปริมาณ 2 ml
	KCl	2.3 M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2 จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml จะได้เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm

2.4.2 incubation medium สำหรับการศึกษาค่าผลของสารต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40 mM (60 mOsm)
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM (6 mOsm)
	KCl	92 mM (184 mOsm)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM

ซึ่งเตรียมได้จาก	HEPES buffer, pH 7.2	1 M ปริมาณ 2 ml
	MgCl <sub>2</sub>	0.05 M ปริมาณ 2 ml
	KCl	2.3 M ปริมาณ 2 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.025 M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2 จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml

2.4.3 hypotonic incubation medium สำหรับการศึกษากลไกของสารต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะช็อกด้วยแรงดันออสโมติก

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40	mM (60 mOsm)
	MgCl <sub>2</sub>	2	mM (6 mOsm)
	KCl	29.5	mM (59 mOsm)
	(เป็น hypotonic buffer ความเข้มข้นรวม 125 mOsm)		
ซึ่งเตรียมได้จาก	HEPES buffer, pH 7.2	1	M ปริมาณ 2 ml
	MgCl <sub>2</sub>	0.05	M ปริมาณ 2 ml
	KCl	0.7375	M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2 จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml จะได้เป็น hypotonic buffer ความเข้มข้นรวม 125 mOsm

## 2.5 การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ปริมาณไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับหนูแรท สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณหรือความเข้มข้นของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียในการทดลองนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายต่างๆ จะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

ขั้นตอนการปฏิบัติการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

1. เจือจาง mitochondrial suspension ปริมาณ 10  $\mu$ l ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้

สารละลาย A

2. ดูดสารละลาย A ปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reducing agent 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำกลั่น 1 ml ส่วนในกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A)

3. เติม Folin - Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ  $3 \times 100$ ) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น mg/ml

(หมายเหตุ: การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

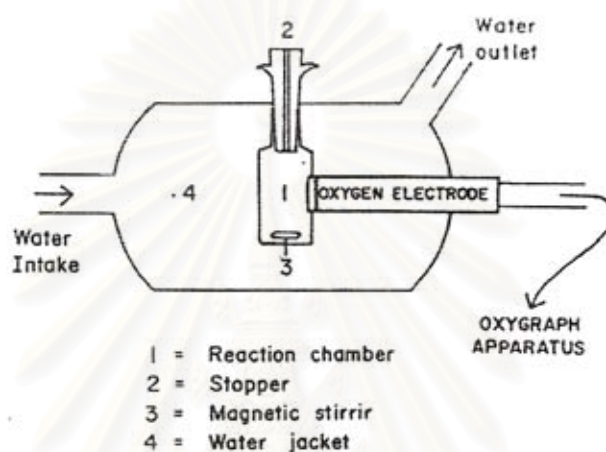
- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วน ของ 0.5%  $\text{CuSO}_4$  ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วน ของ 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

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

## 2.6 การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson reaction chamber ซึ่งมีความจุประมาณ 2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุ (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุมีช่องสำหรับเติมสารต่างๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber สามารถติดตามดูอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนด้วย Clark oxygen electrode ซึ่งต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดโดย oxygen electrode จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งมีหน้าปัดบอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ สามารถบันทึกอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนด้วย Gilson recorder (model N2) สามารถบันทึกผลที่ได้ออกมาบนกระดาษบันทึก ในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลง

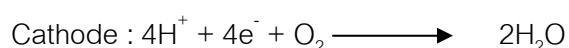
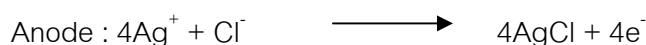
ปริมาณออกซิเจนในสภาวะต่างๆ เรียกว่า polarographic tracing หรือ oxygraph tracing โดยในระหว่างการวิจัยนั้นการ incubate ไมโตคอนเดรียกับสารต่างๆ ใน reaction chamber จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนสารละลายให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา และที่บริเวณชั้นนอกสุดของ chamber (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ก็จะมีน้ำจากเครื่อง water bath (ที่ตั้งค่ากำหนดอุณหภูมิไว้ที่  $37^{\circ}\text{C}$ ) ไหลผ่านเข้าออกตลอดเวลา ทำให้สามารถควบคุมอุณหภูมิใน reaction chamber ให้คงที่ที่  $37^{\circ}\text{C}$  ได้ (รูปที่ 17)



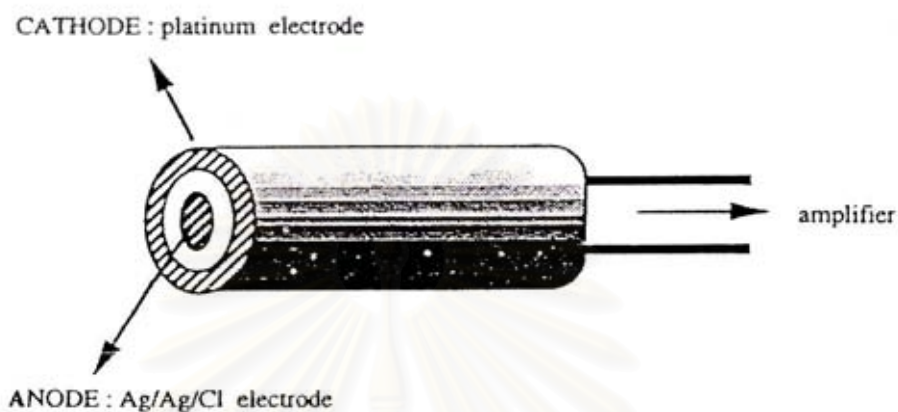
**รูปที่ 17** ลักษณะของ Gilson Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor และ recorder)

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะมีค่าที่ระดับ 100% saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆ ลดลง วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode (รูปที่ 18) ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode เมื่อต้องการใช้งานจะใช้ half saturated KCl solution ระบายขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ



ปกติระหว่างขั้วทั้ง 2 จะมี polarizing voltage 0.8 volts เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้น จะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้วเกิดขึ้น และกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแส recorder บันทึกได้เป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตาม ปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้



รูปที่ 18 ลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว Cathode

### การแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโทคอนเดรียมีหลายประการ เช่น ออกซิเจน, สับสเตรท, ADP + Pi หรือ uncoupler เป็นต้น ซึ่ง Chance และ William (1956) ได้ จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยาออกเป็น 6 ภาวะ ดังตารางที่ 3

### ตารางที่ 3 การแบ่งภาวะ (state) ต่างๆ ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย

State	Condition
1	มีเพียง O <sub>2</sub>
2	มี O <sub>2</sub> และ ADP
3 (active state)	มี O <sub>2</sub> , ADP และ Substrate
3u	มี Uncoupler
4 (resting state)	มี O <sub>2</sub> และ Substrate
5	มีเพียง Substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess calcium

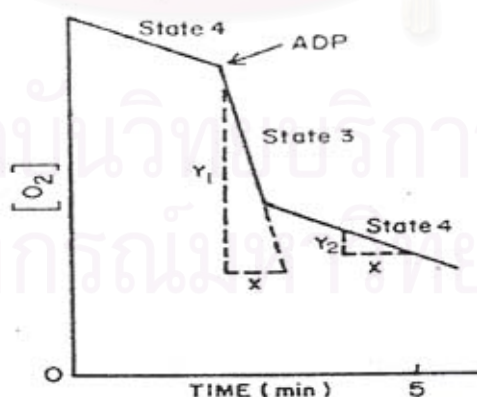
### การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance และ William จะแบ่งการหายใจของไมโทคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ยังได้แสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ซึ่งค่า RCI นี้แสดงถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือ เป็น intact mitochondria หรือไม่ ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีค่า RCI = 4-8 การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้ (รูปที่ 19)

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

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 19 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้งสอง states ยาวเท่ากัน ดังนั้น

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



รูปที่ 19 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



### การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

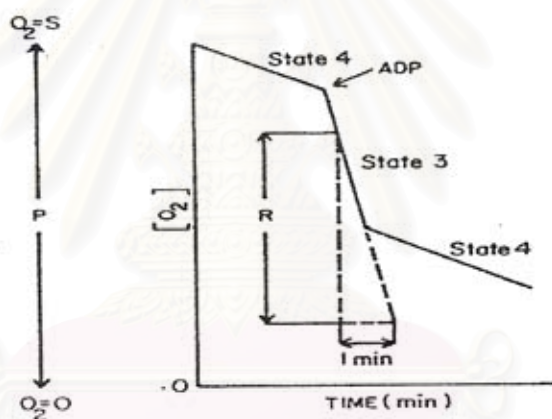
จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 20 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 20 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ได้ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และคุณสมบัติของการทดลอง กล่าวคือ ถ้า reaction mixture มีปริมาณมาก ก็จะมีออกซิเจนละลายอิมตัวอยู่ได้มาก หรือถ้าคุณสมบัติต่ำ ก็จะมีออกซิเจนละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีคุณสมบัติสูง ซึ่งการคำนวณหาค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture 1 ml (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา ก็จะได้

จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์ใน reaction mixture ทั้งหมด (S) ซึ่งค่า A สามารถหาได้จากสมการ

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

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์ในน้ำ 1 ml

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำให้การทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ที่ 0°C และ 760 mmHg) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37°C

p = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

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

เมื่อแทนค่า s, p, N และ V ลงในสมการ จะทำให้สามารถคำนวณหาค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์ในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ 37°C ได้เท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน n atoms O/ml/min ได้ จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 20 เช่นกัน ตามสูตรการคำนวณดังนี้ คือ

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมัตว์อยู่ในน้ำ 1 ml

โดยค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งในการวิจัยจะควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C ดังนั้นค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

## 2.7 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน

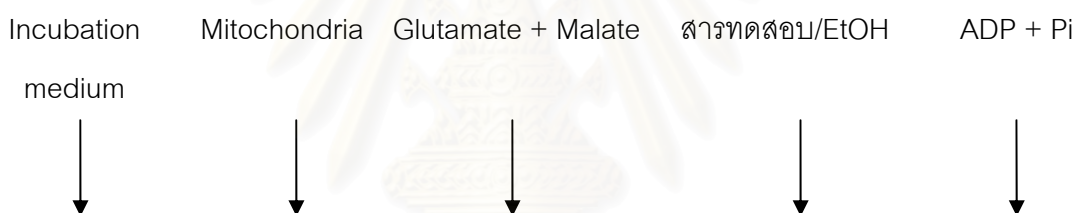
2.7.1 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด NAD<sup>+</sup>-linked)

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3 respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



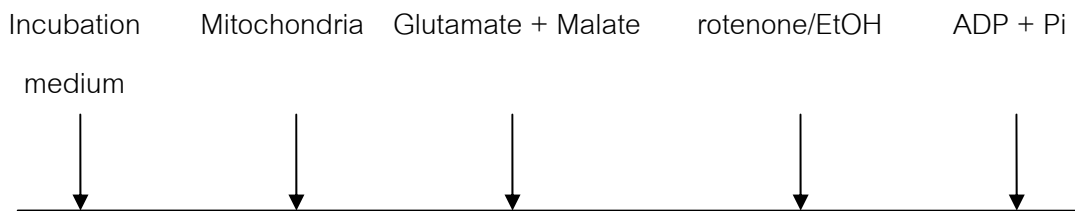
2.7.2 การศึกษาผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด NAD<sup>+</sup>-linked)

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3 respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



2.7.3 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด FAD-linked)

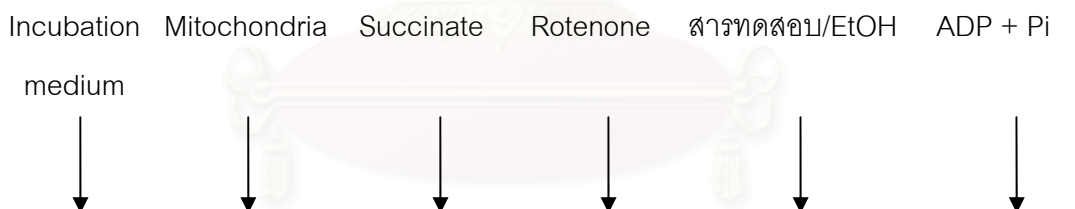
1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติม complex I inhibitor คือ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3 respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



2.8 การศึกษาผลของสารทดสอบต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน

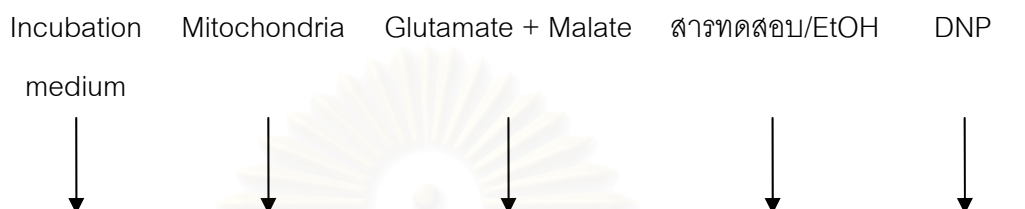
2.8.1 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด NAD<sup>+</sup>-linked)

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$ )

4) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3u respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



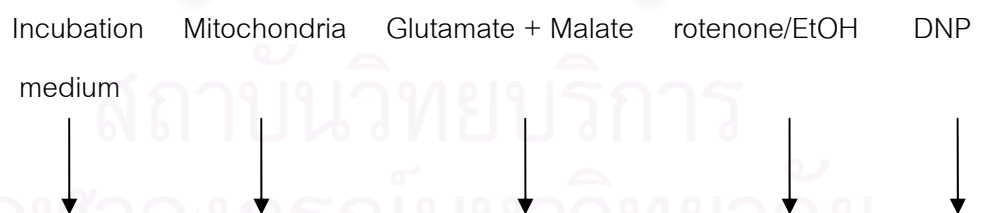
2.8.2 การศึกษาผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด  $\text{NAD}^+$ -linked)

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ทำตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$

3) เติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$ )

4) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3u respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม

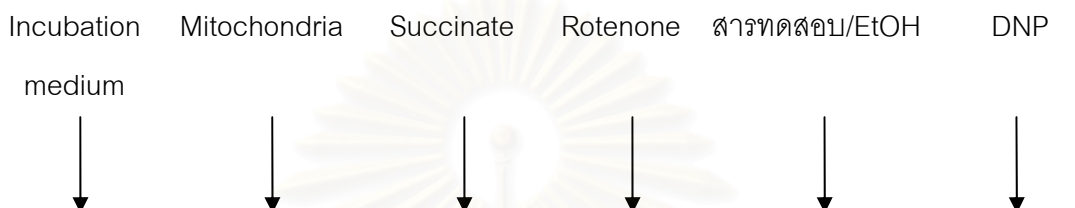


2.8.3 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (สับสเตรทชนิด FAD-linked)

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ทำตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$

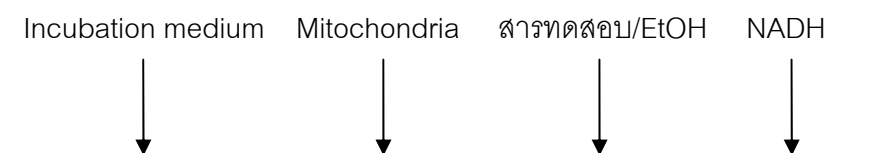
- 3) เติม complex I inhibitor คือ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l
- 4) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)
- 5) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3u respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



## 2.9 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH จากภายนอก (exogenous NADH) เป็นสับสเตรท

ในการทดลองมีการเตรียมไมโทคอนเดรียใน hypotonic solution ทำให้เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียนั้นบวม (De Robertis และ De Robertis, 1987) และได้เป็น osmotic-shocked mitochondria (เพื่อให้ exogenous NADH ที่เติมลงไปนั้นสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียเข้าไปได้ (Lehninger และคณะ, 2000) ปกติแล้วถ้าเป็น intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ exogenous NADH ได้ เพราะ exogenous NADH ที่เติมลงไปมีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียเข้าไปได้) จากนั้นจึงนำ osmotic-shocked mitochondria ที่เตรียมได้มาทำการศึกษาต่อโดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้ คือ

- 1) เติม hypotonic incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป
- 2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l) ตามด้วยการเติมสับสเตรท คือ 0.2 M NADH ใน 1% NaHCO<sub>3</sub> ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงไป เพื่อกระตุ้นการหายใจ แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนที่ได้กับกลุ่มควบคุม



## 2.10 การศึกษาผลของปัจจัยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องหรือส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ได้แก่

2.10.1 การศึกษาผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

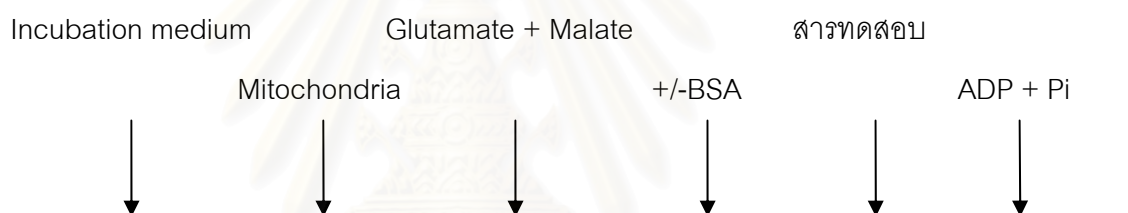
1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ทำตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

2) เติมสับสเตรท คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติม BSA ในขนาดต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะไม่เติม BSA)

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นที่ทำการศึกษาปริมาณ 10  $\mu$ l

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3 respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม



2.10.2 การศึกษาผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ทำตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป

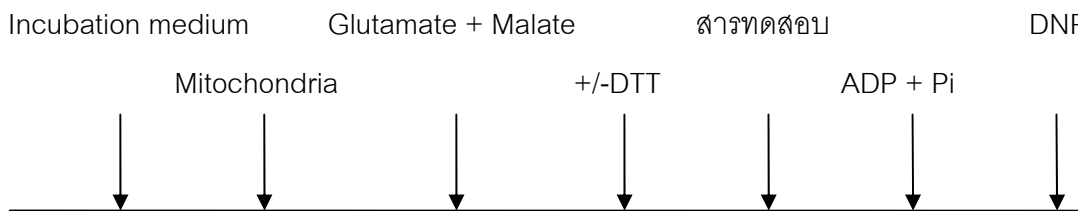
2) เติมสับสเตรท คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติม 1.05 M DTT ปริมาณ 2  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะไม่เติม DTT)

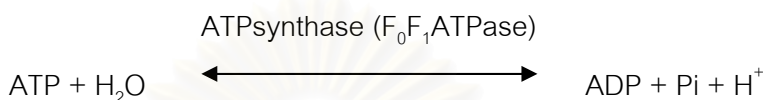
3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นที่ทำการศึกษาปริมาณ 10  $\mu$ l

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อกระตุ้นให้เกิด state 3 respiration แล้วจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ได้กับกลุ่มควบคุม

5) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



## 2.11 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท



จากสมการแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ATPase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ ATP ได้เป็น ADP,  $\text{P}_i$  และ  $\text{H}^+$  ดังนั้นในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้คือ

1. การวัดจำนวน  $\text{H}^+$  ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina และ Slater, 1975)
2. การวัดปริมาณของ  $\text{P}_i$  ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

ซึ่งในงานวิจัยนี้จะศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียจากการวัดปริมาณ  $\text{P}_i$  ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ซึ่งมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญ ดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลง centrifuge tube ที่มี 20% w/v ของ trichloroacetic acid ปริมาณ 1 ml อยู่ก่อน แล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ  $\text{P}_i$  ที่เกิดขึ้น ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske และ Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนด ก็นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ  $\text{P}_i$  จากกราฟมาตรฐานของ  $\text{P}_i$  ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าตัวอย่าง

ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติโดยละเอียด ดังนี้คือ

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะควบคุมอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37 °C



2. เติม mitochondrial suspension 200  $\mu$ l
3. เติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l หรือ 0.0275 M DNP ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วรอเวลา 1 นาที (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)
4. เติม 0.1 M ATP 150  $\mu$ l แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้ว ทำการหยุดปฏิกิริยาทันที โดยดูด reaction mixture มาปริมาณ 1 ml แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20% w/v trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant ปริมาณ 1 ml (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml แทน ถ้าทำ standard curve ของ Pi ใช้น้ำกลั่น 1 ml ของ  $K_2HPO_4$  ที่ความเข้มข้น 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 เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ  $3 \times 2 = 6$ ) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายตัวของ ATP

(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 ละลายไม่หมด ให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน)

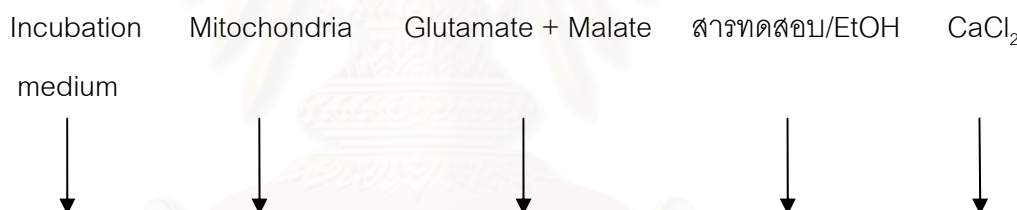
## 2.12 การศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

การควบคุมสมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์เป็นอีกบทบาทหนึ่งที่มีความสำคัญของไมโทคอนเดรีย (Giacomello และคณะ, 2007) ไมโทคอนเดรียจะทำหน้าที่นำแคลเซียมเข้าไปสะสมไว้ภายใน matrix ซึ่งการที่แคลเซียมจะถูกขนส่งเข้าไปภายในไมโทคอนเดรียได้นั้นก็ต้องอาศัย

ความต่างศักย์ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical proton gradient ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ในการศึกษาจะมีการเติมแคลเซียมลงไปในปฏิกิริยาเพื่อไปกระตุ้นอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย และสามารถติดตามผลของสารทดสอบต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้จากอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่เปลี่ยนแปลงไปนั่นเอง

ขั้นตอนและวิธีปฏิบัติ มีดังนี้คือ

- 1) เติม incubation medium ลงใน reaction chamber จากนั้นก็ทำตามด้วยการเติมไมโทคอนเดรียลงไป
- 2) เติมสับสเตรทสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l
- 3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l (ในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)
- 4) เติม 0.4 M  $\text{CaCl}_2$  ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



### 3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of the mean) การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองจะใช้ the two-tailed paired Student's t-test ส่วนในกรณีที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มการทดลองที่มากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไปจะใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบผลด้วย Scheffe multiple comparison test โดยจะใช้โปรแกรม SPSS version 13.0 ในการประมวลผลข้อมูลทั้งหมด และจะตัดสินผลการทดลองว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4

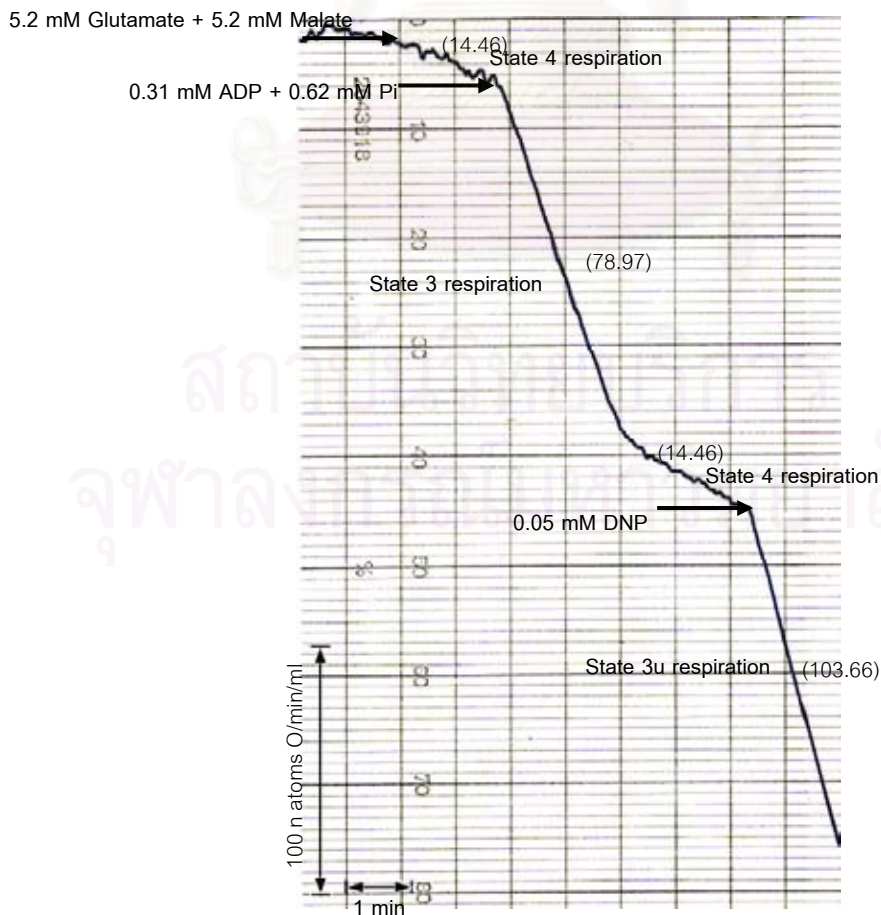
### ผลการวิจัย

1. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 21 Oxygraph tracing มาตรฐานของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.79 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.914 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



จากรูปที่ 21 เป็น control respiratory response แสดงถึงอัตราการใช้ออกซิเจนตามปกติของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรทใน state ต่างๆ ของ oxygraph tracing ตัวเลขที่กำกับทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆ มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยามีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน medium และมีการเติม glutamate + malate ซึ่งเป็นสับสเตรทลงไปเป็นปริมาณที่มากเกินไป อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรกมีค่า 14.46 n atoms O/min/ml เรียกระยะนี้ว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP + Pi ลงไปในปฏิกิริยา พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 78.97 n atoms O/min/ml เรียกระยะการหายใจของไมโตคอนเดรียที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากเกิดการสร้าง ATP จากการเติม ADP + Pi นี้ว่า state 3 respiration จนกระทั่งเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไป อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียก็จะลดลงเป็น 14.46 n atoms O/min/ml กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม การที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโตคอนเดรีย ค่า respiratory control index (RCI) เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ โดยสามารถคำนวณได้จาก อัตราการหายใจใน state 3 / อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้นค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปนี้จึงมีค่าเท่ากับ  $78.97/14.46 = 5.46$  และพบว่าการเติม DNP ซึ่งเป็นสารประเภท uncoupler ลงไปในปฏิกิริยาจะมีผลทำให้การควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรียเสียไป โดย DNP จะสามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ต้องมี ADP ในปฏิกิริยา (ไม่มีการสร้าง ATP เกิดขึ้น) ทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วจนกระทั่งออกซิเจนนั้นหมดไปจาก reaction medium อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้ก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 103.66 n atoms O/min/ml เรียกระยะนี้ว่า state 3u respiration

รูปที่ 22 B, C, D, E และ F แสดงถึงผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M), 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) และ 200  $\mu$ g (342.30  $\mu$ M) ตามลำดับ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M), 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) และ 200  $\mu$ g (342.30  $\mu$ M) สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเป็น  $58.67 \pm 4.66$ ,  $39.70 \pm 4.12$ ,  $30.57 \pm 4.95$  และ  $30.45 \pm 0.40$  ตามลำดับ (รูปที่ 23) เมื่อนำมาคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration พบว่าขนาดสารสูงสุดที่ทำการทดสอบ

นั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้ร้อยละ  $70.86 \pm 0.38$  และค่า  $IC_{50}$  ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อ state 3 respiration มีค่าเท่ากับ  $79.92 \mu\text{g}$  ( $136.79 \mu\text{M}$ ) (รูปที่ 24) นอกจากนี้ยังพบว่าสารทดสอบขนาด  $40 \mu\text{g}$  ( $68.46 \mu\text{M}$ ) และ  $60 \mu\text{g}$  ( $102.69 \mu\text{M}$ ) ทำให้ค่า RCI ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4

## 2. ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 25 B, C, D, E, F, G และ H แสดงถึงผลของ rotenone ในขนาดต่างๆ ตั้งแต่  $9.90 \text{ ng}$  ( $21.76 \text{ nM}$ ),  $14.85 \text{ ng}$  ( $32.65 \text{ nM}$ ),  $19.80 \text{ ng}$  ( $43.53 \text{ nM}$ ),  $29.70 \text{ ng}$  ( $65.30 \text{ nM}$ ),  $39.60 \text{ ng}$  ( $87.06 \text{ nM}$ ),  $49.50 \text{ ng}$  ( $108.82 \text{ nM}$ ),  $59.40 \text{ ng}$  ( $130.59 \text{ nM}$ ) ตามลำดับ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่า rotenone ทุกขนาดที่ทำการศึกษามีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 26 และเมื่อนำมาคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration (รูปที่ 27) พบว่าขนาดสารสูงสุดที่ทำการทดสอบนั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้ร้อยละ  $88.23 \pm 0.29$  และค่า  $IC_{50}$  ของ rotenone ต่อ state 3 respiration มีค่าเท่ากับ  $13.54 \text{ ng}$  ( $29.77 \text{ nM}$ ) นอกจากนี้ยังพบว่า rotenone ขนาด  $9.90 \text{ ng}$  ( $21.76 \text{ nM}$ ),  $14.85 \text{ ng}$  ( $32.65 \text{ nM}$ ) สามารถทำให้ค่า RCI ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

## 3. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 28 เป็น control respiratory response เช่นเดียวกับรูปที่ 21 แต่มีการเปลี่ยนสับสเตรท จาก glutamate + malate มาเป็น succinate แทน และมีการเติม  $0.01 \text{ mM}$  rotenone ลงไปด้วยเพื่อยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของ complex I จากรูปพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration และ state 3 respiration มีค่าเท่ากับ 21.35 และ 96.54 n atoms O/min/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า RCI จึงมีค่าเท่ากับ  $96.54/21.35 = 4.52$  และเมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา ซึ่งสามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียทำให้เกิด state 3u respiration ขึ้น อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มขึ้นเป็น  $163.72 \text{ n atoms O/min/ml}$

ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาดต่างๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท แสดงในรูปที่

29 B, C, D, E และ F พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทุกขนาดที่ทำการศึกษานั้นไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 30)

#### 4. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 31 B, C, D, E และ F แสดงผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาดต่างๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นการหายใจด้วย DNP ทำให้เกิด state 3u respiration ขึ้น เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในทุกขนาดที่ทำการศึกษาได้แก่ ขนาด 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M), 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) และ 200  $\mu$ g (342.30  $\mu$ M) สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 32) และคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ  $38.40 \pm 2.86$ ,  $57.06 \pm 4.60$ ,  $71.45 \pm 2.20$ ,  $77.60 \pm 4.36$  และ  $80.17 \pm 0.36$  ตามลำดับ (รูปที่ 33) และค่า  $IC_{50}$  ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อ state 3u respiration มีค่าเท่ากับ 51.87  $\mu$ g (88.78  $\mu$ M)

#### 5. ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 34 B, C, D, E, F, G และ H แสดงผลของ rotenone ในขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 9.90 ng (21.76 nM), 14.85 ng (32.65 nM), 19.80 ng (43.53 nM), 29.70 ng (65.30 nM), 39.60 ng (87.06 nM), 49.50 ng (108.82 nM) และ 59.40 ng (130.59 nM) ตามลำดับ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นการหายใจด้วย DNP ทำให้เกิด state 3u respiration ขึ้น เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท จากผลการทดลองพบว่า rotenone ทุกขนาดที่ทำการศึกษาศาสามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 35) และเมื่อนำมาคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration พบว่าขนาดสารสูงสุดที่ทำการทดสอบนั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้ร้อยละ  $93.49 \pm 0.11$  และค่า  $IC_{50}$  ของ rotenone ต่อ state 3u respiration มีค่าเท่ากับ 10.83 ng (23.81 nM) (รูปที่ 36)

**6. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท**

รูปที่ 37 B, C, D, E และ F แสดงผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาดต่างๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นการหายใจด้วย DNP ทำให้เกิด state 3u respiration ขึ้น เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทุกขนาดที่ทำการทดสอบไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 38

**7. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท**

รูปที่ 39 B, C, D, E, F และ G แสดงผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาดต่างๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในทุกขนาดที่ทำการศึกษา ได้แก่ ขนาด 10  $\mu$ g (17.12  $\mu$ M), 20  $\mu$ g (34.23  $\mu$ M), 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) และ 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) นั้นสามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 40) ซึ่งคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งได้เท่ากับ  $27.79 \pm 0.98$ ,  $66.14 \pm 1.37$ ,  $70.37 \pm 1.30$ ,  $78.56 \pm 1.57$ ,  $81.21 \pm 0.61$  และ  $81.64 \pm 0.17$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 41 กล่าวคือสารทดสอบนั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้แปรผันตามขนาดของสาร

**8. ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท**

จากผลการทดลองในรูปที่ 42 ซึ่งเป็นการศึกษาผลของ BSA ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) นั้นสามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเติม BSA 5 mg ลงไปในปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 นาที ก่อนการเติมสารก็ไม่สามารถลดความสามารถของสารในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าการเติม BSA 10 และ 20 mg ลงไปในปฏิกิริยาก่อนการเติมสารนั้นจะสามารถลดความสามารถของสารในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้ โดยทำให้ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน

state 3 respiration ที่ลดลงไปนั้นเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติม BSA

#### 9. ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

จากผลการทดลองในรูปที่ 43 แสดงให้เห็นว่าการเติม 1.05 mM DTT ลงไปในปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 นาที ก่อนการเติมสารทดสอบนั้นไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงความสามารถของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol [ขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M)] ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนทั้งใน state 3 และ state 3u respiration (กรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 10. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

จากรูปที่ 44 พบว่าสาร DNP (เป็นสารประเภท uncoupler) มีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลาย ATP (ซึ่งใช้เอนไซม์ ATPase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) นั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสาร DNP นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้ ในขณะที่สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในทุกขนาดที่ทำการศึกษา ได้แก่ 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) และ 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) นั้นไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาโดยการให้สารทดสอบในขนาด 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) ร่วมกับสาร DNP ก็พบว่าสารทดสอบนั้นไม่มีผลไปรบกวนการออกฤทธิ์ของ DNP ในการไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน กล่าวคือสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol นั้นไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase ทั้งในกรณีที่ถูกระตุ้นและไม่ถูกระตุ้นด้วยสาร DNP

#### 11. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 45 B, C, D และ E แสดงผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) และ 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) ตามลำดับ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทุกขนาดที่ทำการศึกษามีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน



สภาวะที่ถูกระตุ้นด้วยแคลเซียมลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามขนาดของสารที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 46) เมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งพบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M), 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M), 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) และ 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) นั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนได้ร้อยละ  $31.44 \pm 1.46$ ,  $44.04 \pm 1.47$ ,  $68.63 \pm 1.59$  และ  $81.16 \pm 0.41$  ตามลำดับ (รูปที่ 47)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

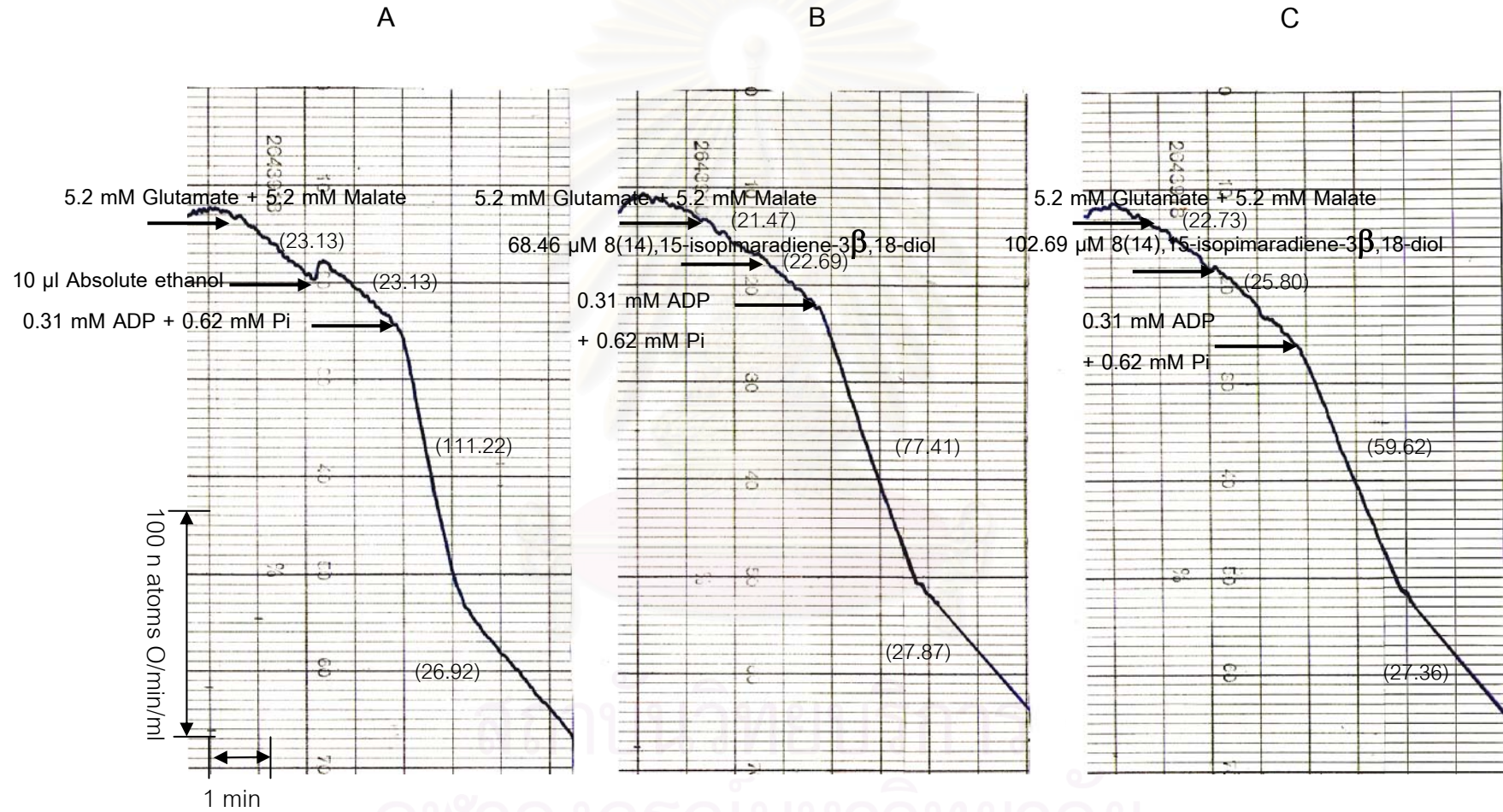
รูปที่ 22 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.91 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

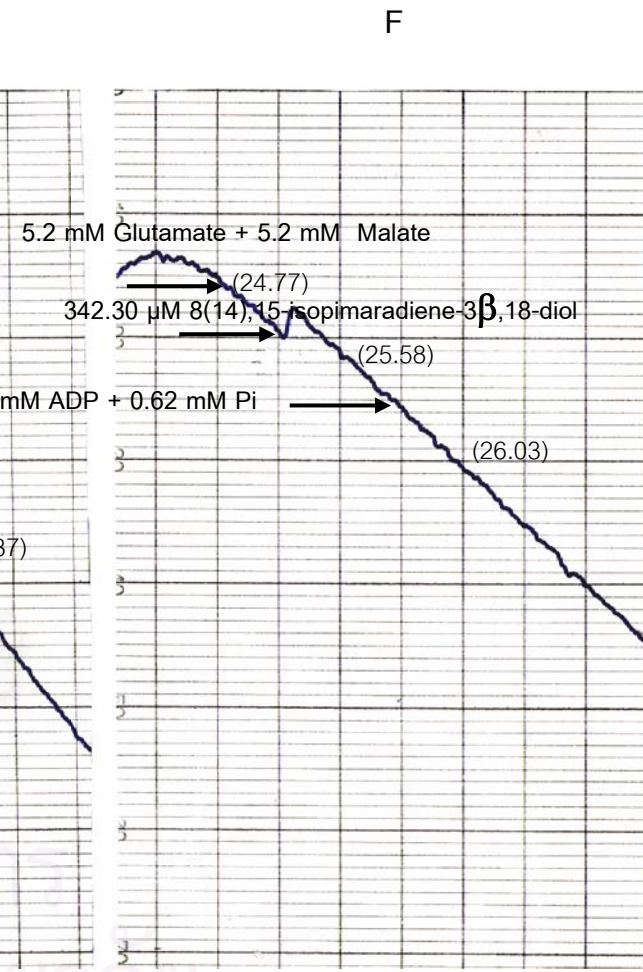
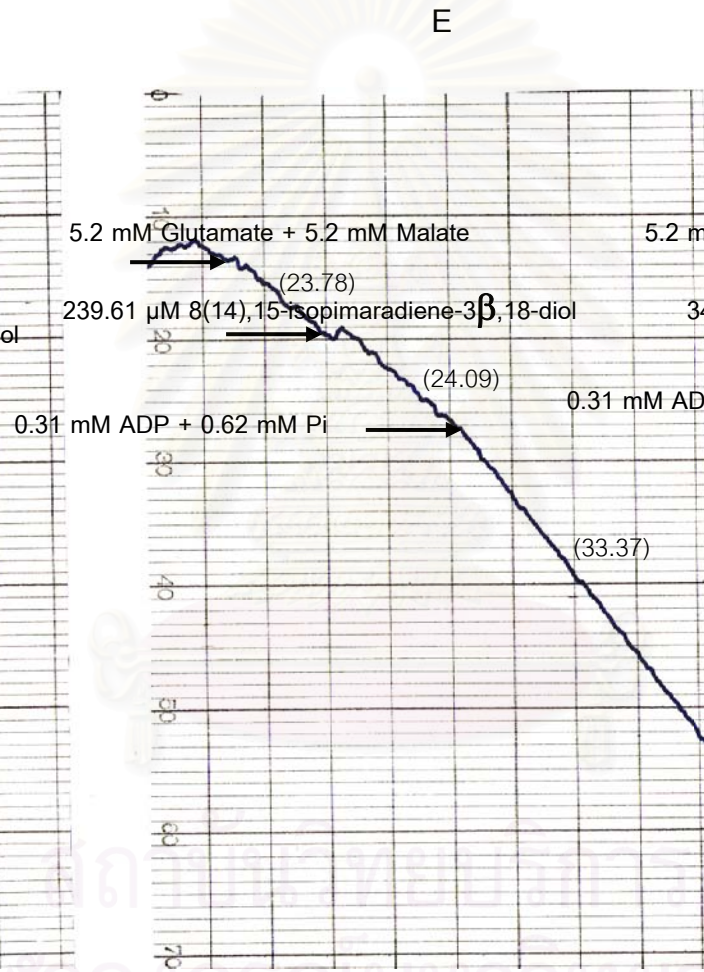
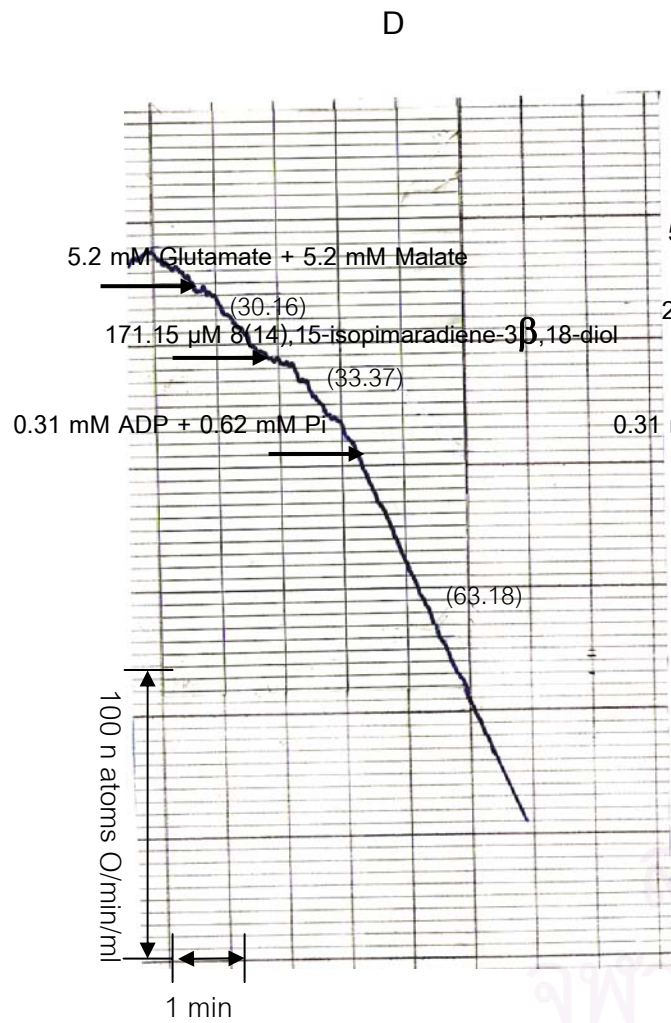
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



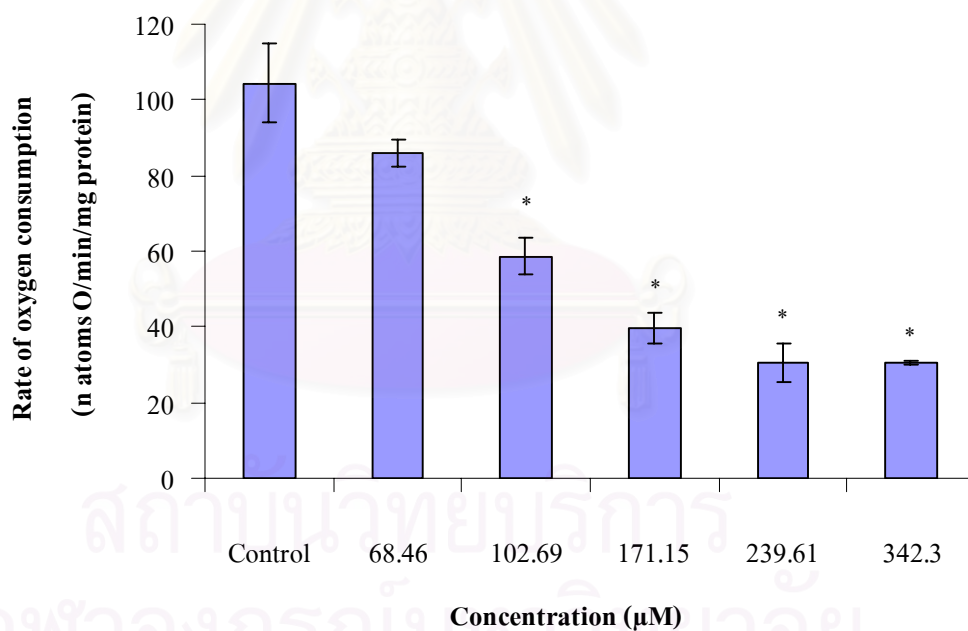
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

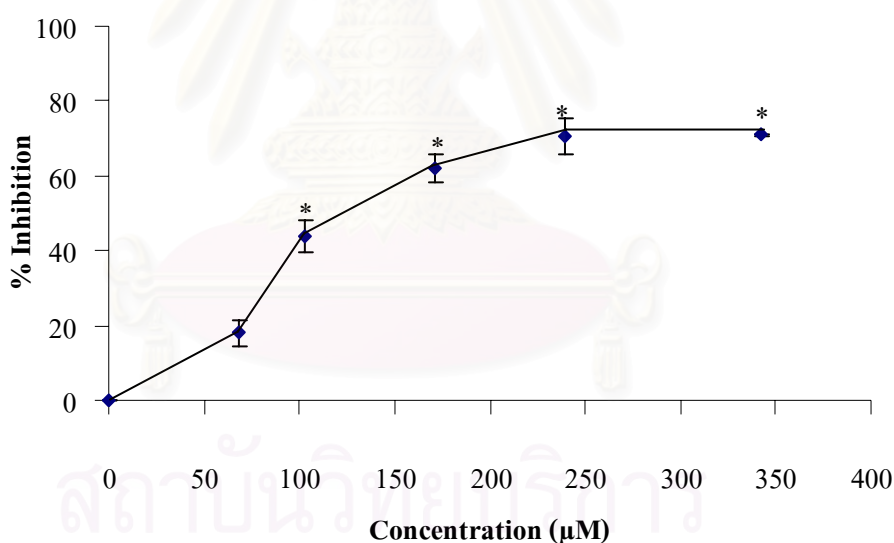


\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 24 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

IC<sub>50</sub> คำนวณโดยใช้ probit analysis มีค่าเท่ากับ 79.92  $\mu$ g (136.79  $\mu$ M)

ตารางที่ 4 ผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration และ state 4 respiration รวมถึงค่า respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n = 5)

ปริมาณของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)		Respiratory Control Index (RCI)
		State 3 respiration	State 4 respiration	
Control	0.00	104.48 $\pm$ 10.42	18.02 $\pm$ 1.20	5.78 $\pm$ 0.31
40	68.46	85.75 $\pm$ 3.58	24.62 $\pm$ 0.95	3.49 $\pm$ 0.11*
60	102.69	58.67 $\pm$ 4.66*	20.96 $\pm$ 2.18	2.83 $\pm$ 0.14*
100	171.15	39.70 $\pm$ 4.12*	(n.m.)	(n.m.)
140	239.61	30.57 $\pm$ 4.95*	(n.m.)	(n.m.)
200	342.30	30.45 $\pm$ 0.40*	(n.m.)	(n.m.)

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

(n.m.) = not measurable (ไม่สามารถวัดค่าได้)

รูปที่ 25 Oxygraph tracing แสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

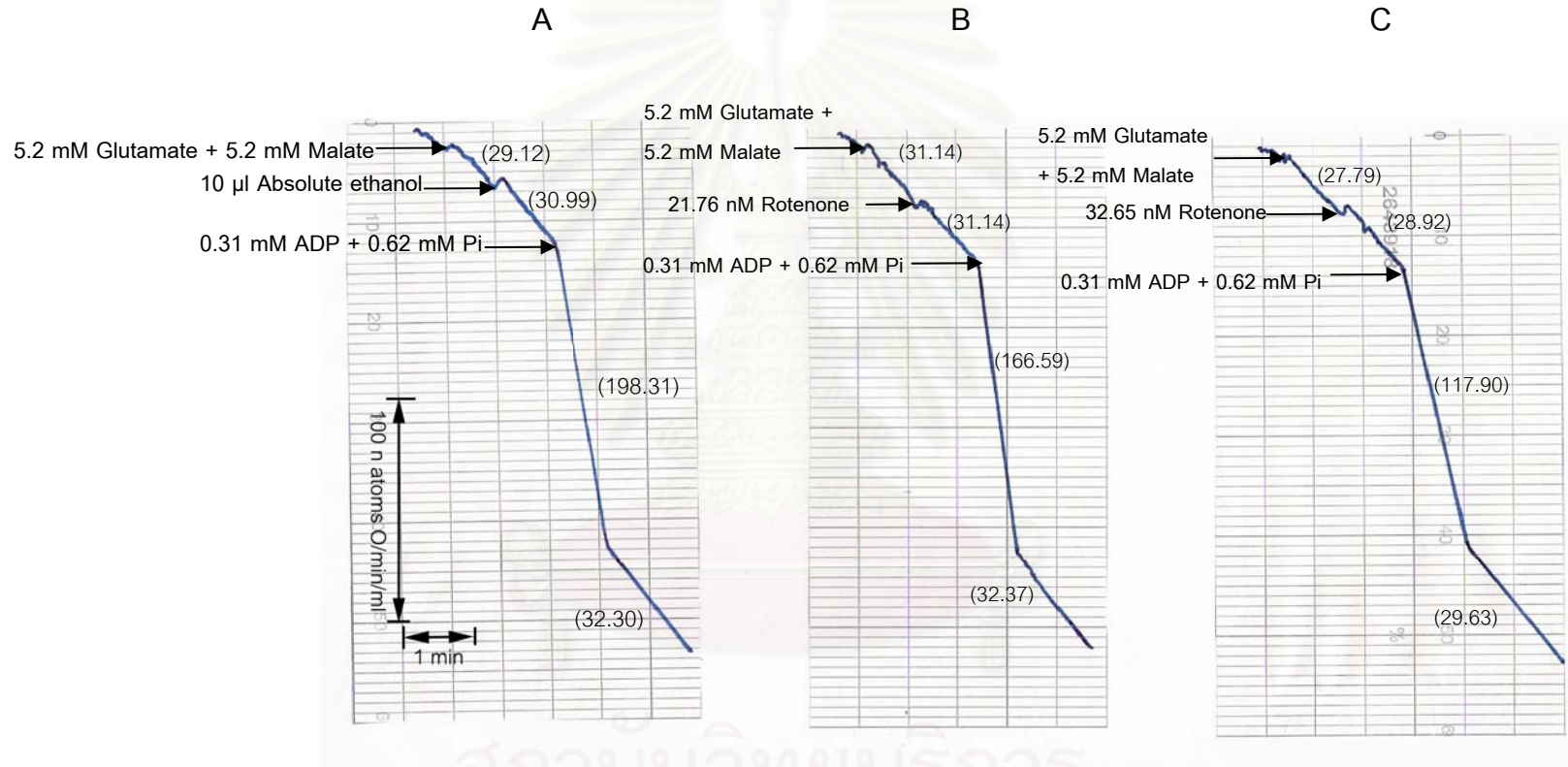
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.57 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml

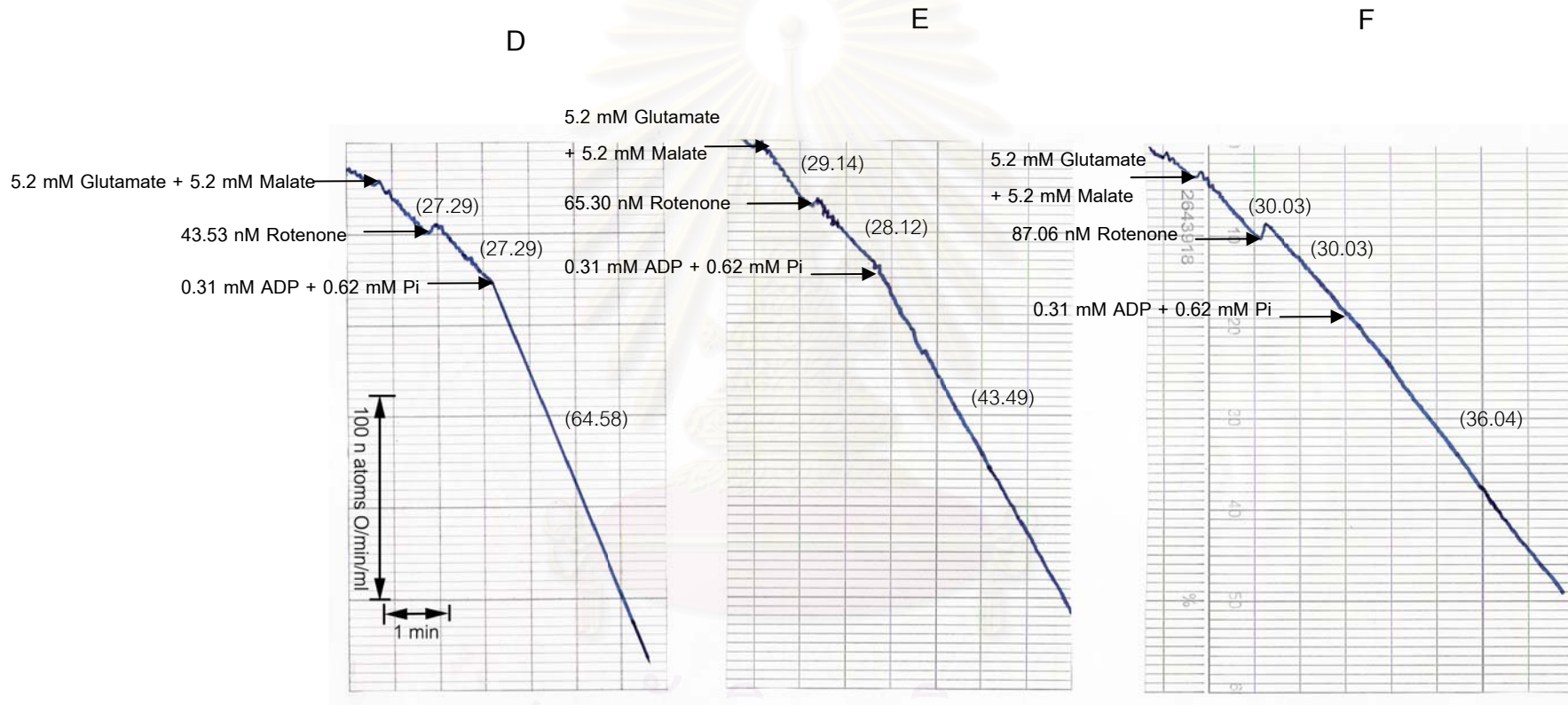


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





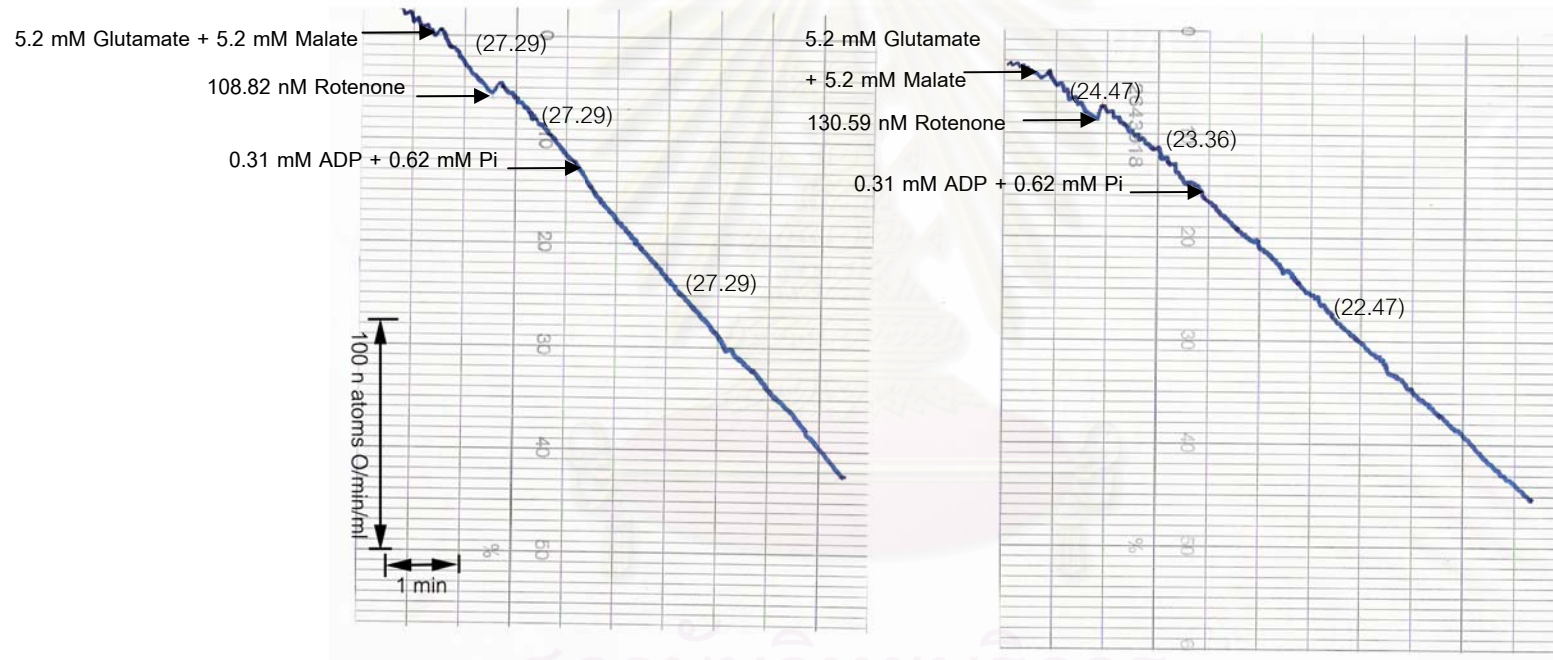
สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

G

H

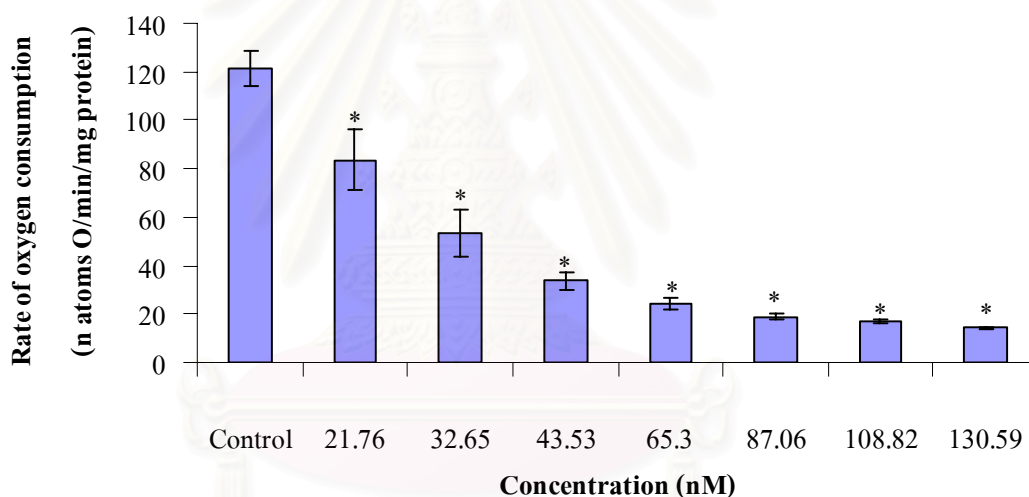


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 กราฟแสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



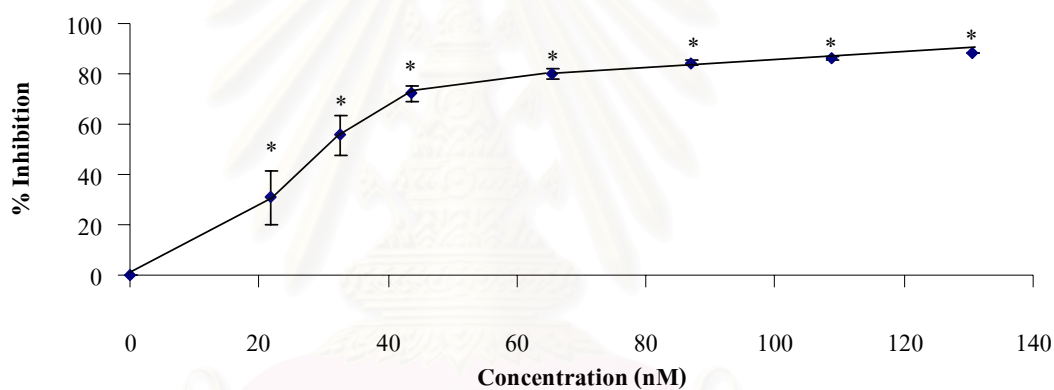
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันนวัตกรรมการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของ rotenone ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

$IC_{50}$  คำนวณโดยใช้ probit analysis มีค่าเท่ากับ 13.54 ng (29.77 nM)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration และ state 4 respiration รวมถึงค่า respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ rotenone (ng)	ความเข้มข้นของ rotenone (nM)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)		Respiratory Control Index (RCI)
		State 3 respiration	State 4 respiration	
Control	0.00	121.23 $\pm$ 7.43	18.78 $\pm$ 1.01	6.46 $\pm$ 0.21
9.90	21.76	83.75 $\pm$ 12.84*	18.55 $\pm$ 0.86	4.43 $\pm$ 0.49*
14.85	32.65	53.54 $\pm$ 9.59*	17.36 $\pm$ 0.67	3.03 $\pm$ 0.45*
19.80	43.53	33.65 $\pm$ 3.77*	(n.m.)	(n.m.)
29.70	65.30	24.18 $\pm$ 2.51*	(n.m.)	(n.m.)
39.60	87.06	18.92 $\pm$ 1.05*	(n.m.)	(n.m.)
49.50	108.82	16.79 $\pm$ 0.62*	(n.m.)	(n.m.)
59.40	130.59	14.27 $\pm$ 0.35*	(n.m.)	(n.m.)

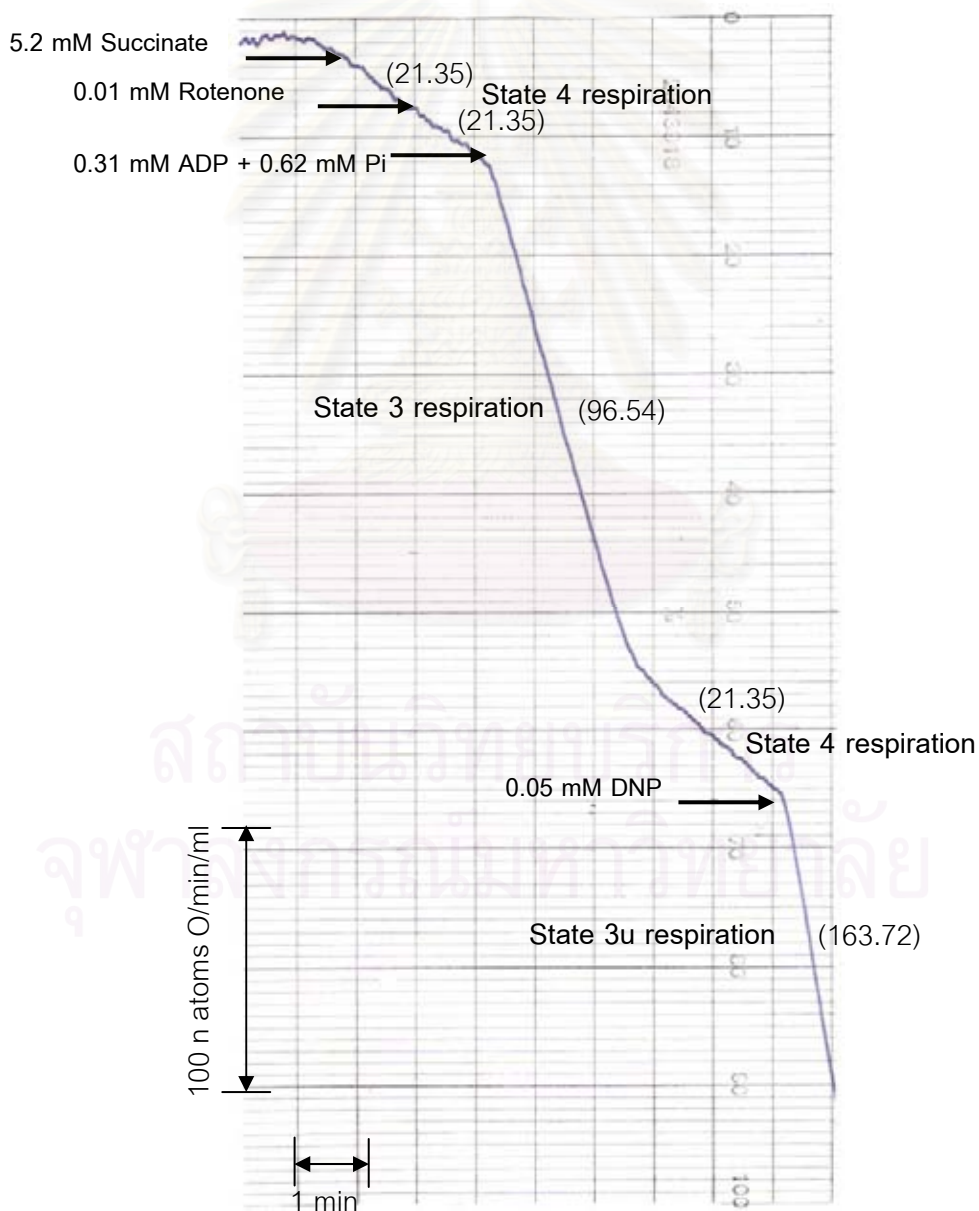
\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

(n.m.) = not measurable (ไม่สามารถวัดค่าได้)

รูปที่ 28 Oxygen tracing มาตรฐานของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.79 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.916 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



รูปที่ 29 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

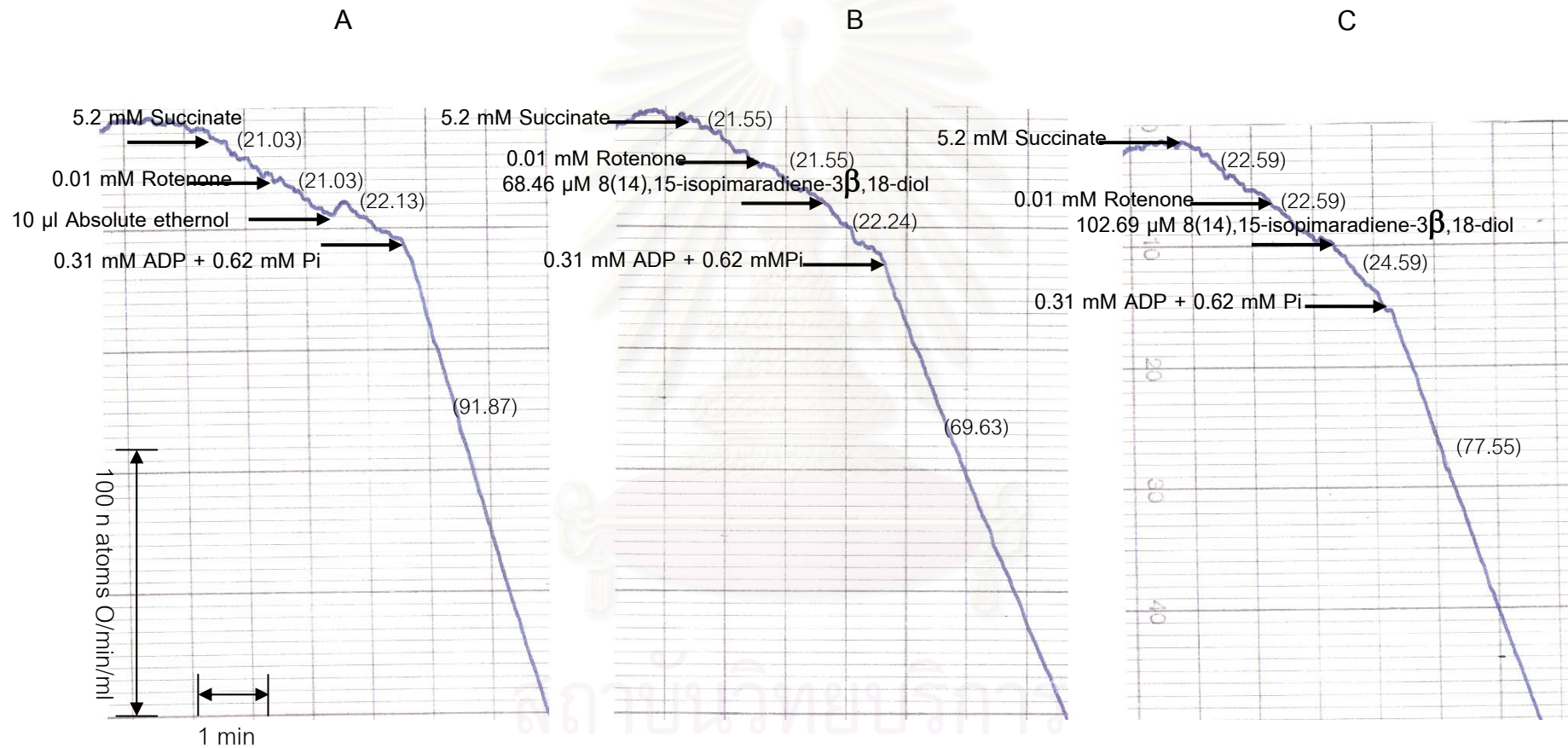
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.69 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml

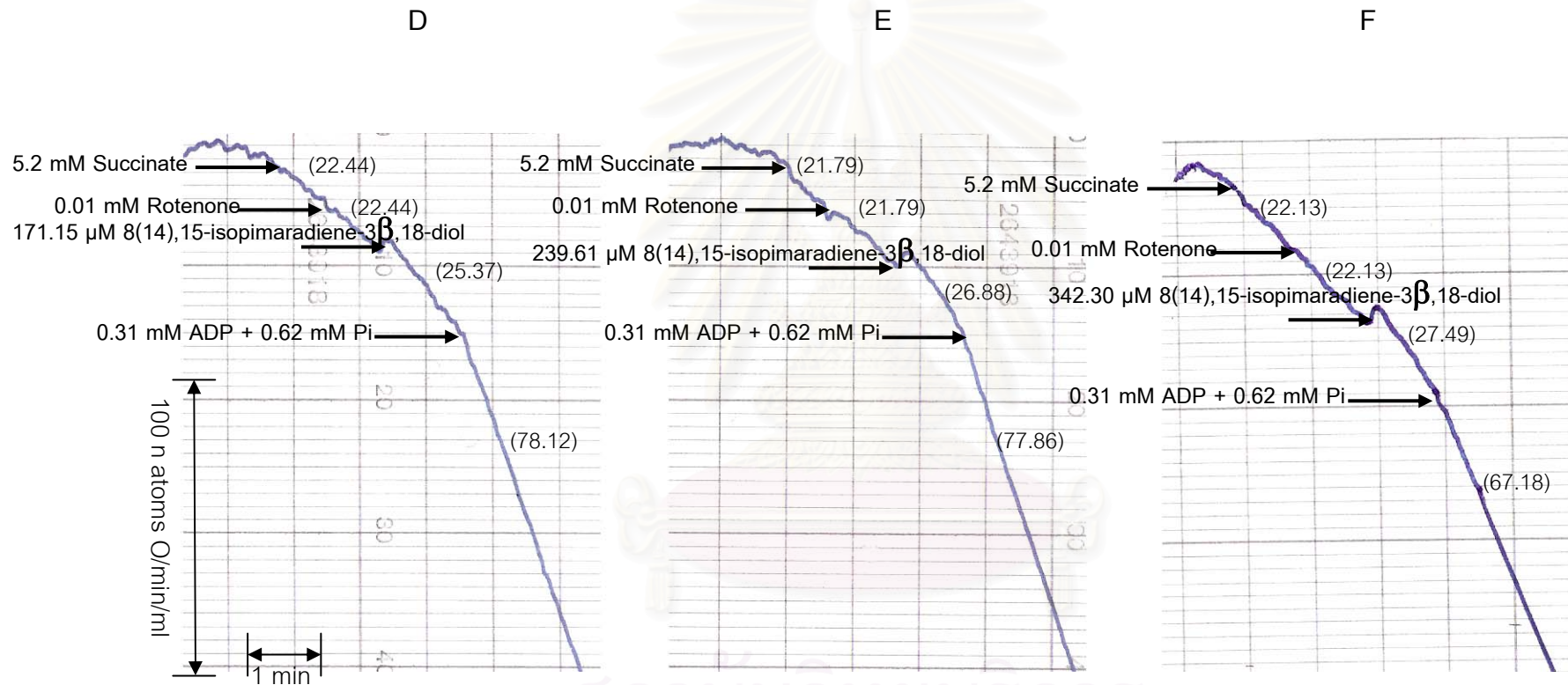


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

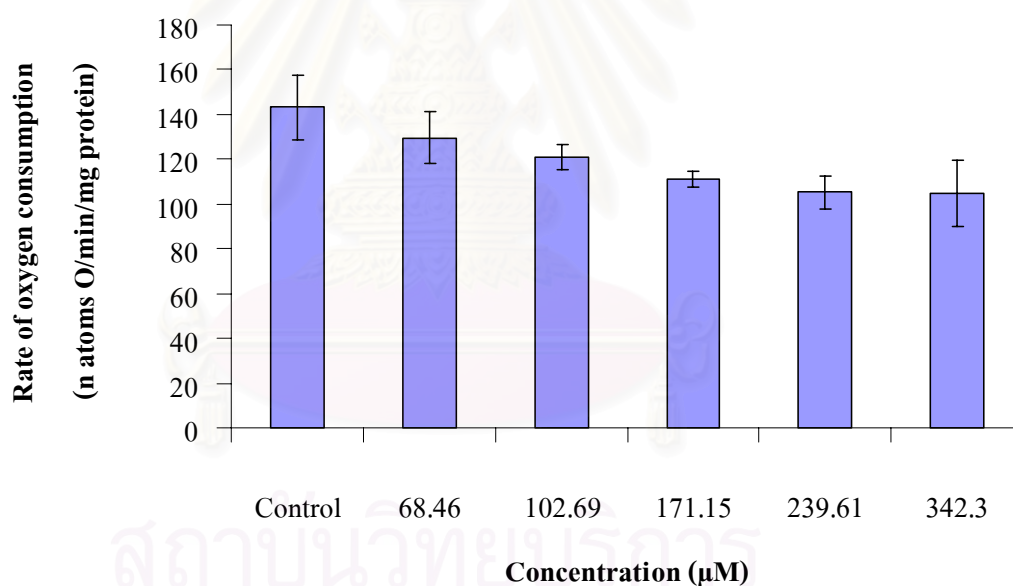


สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.70 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

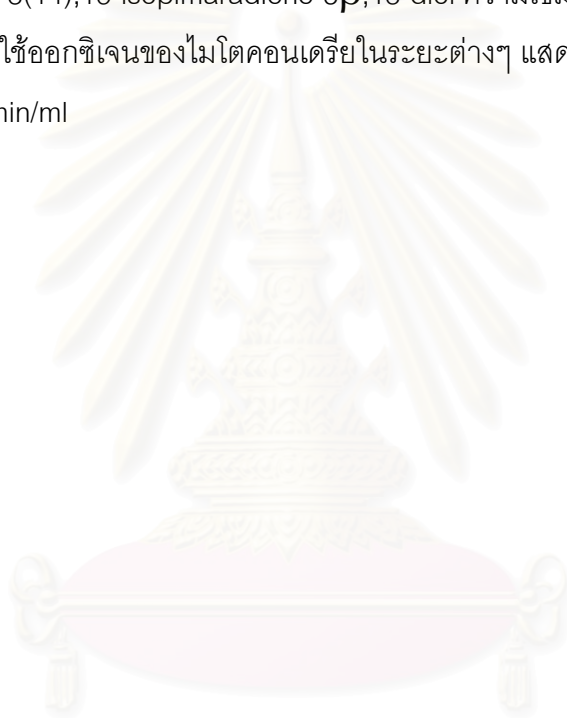
แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



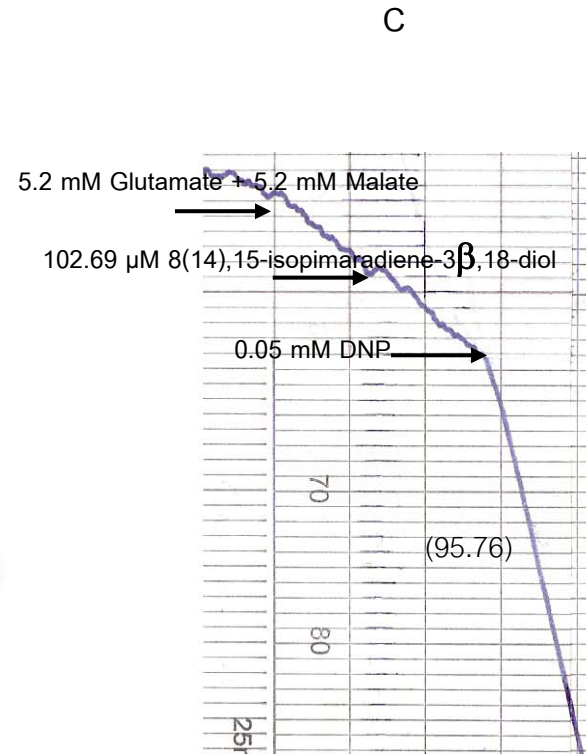
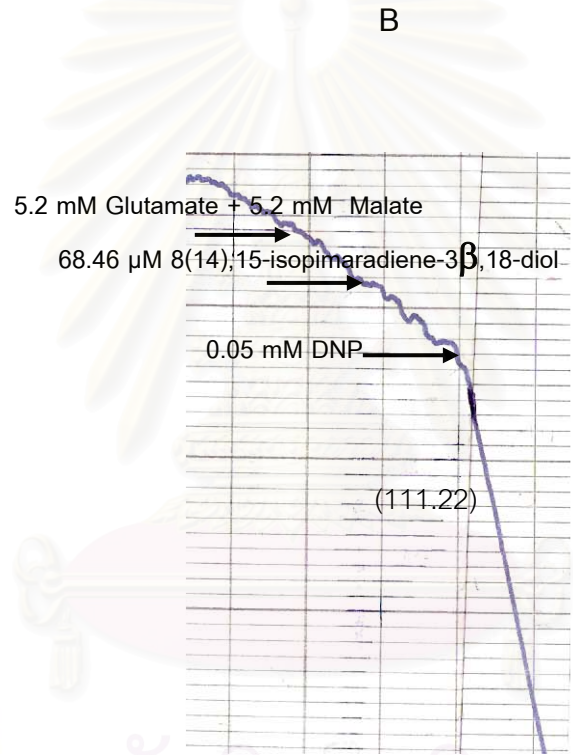
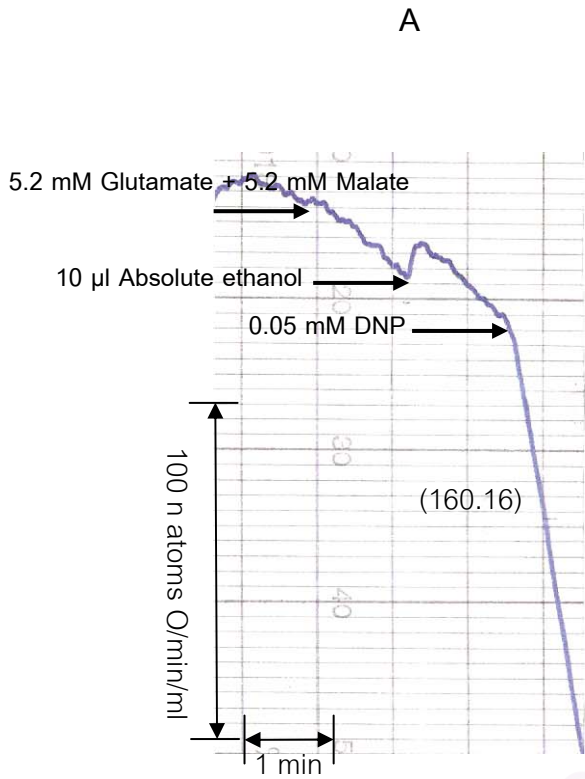
รูปที่ 31 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.99 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

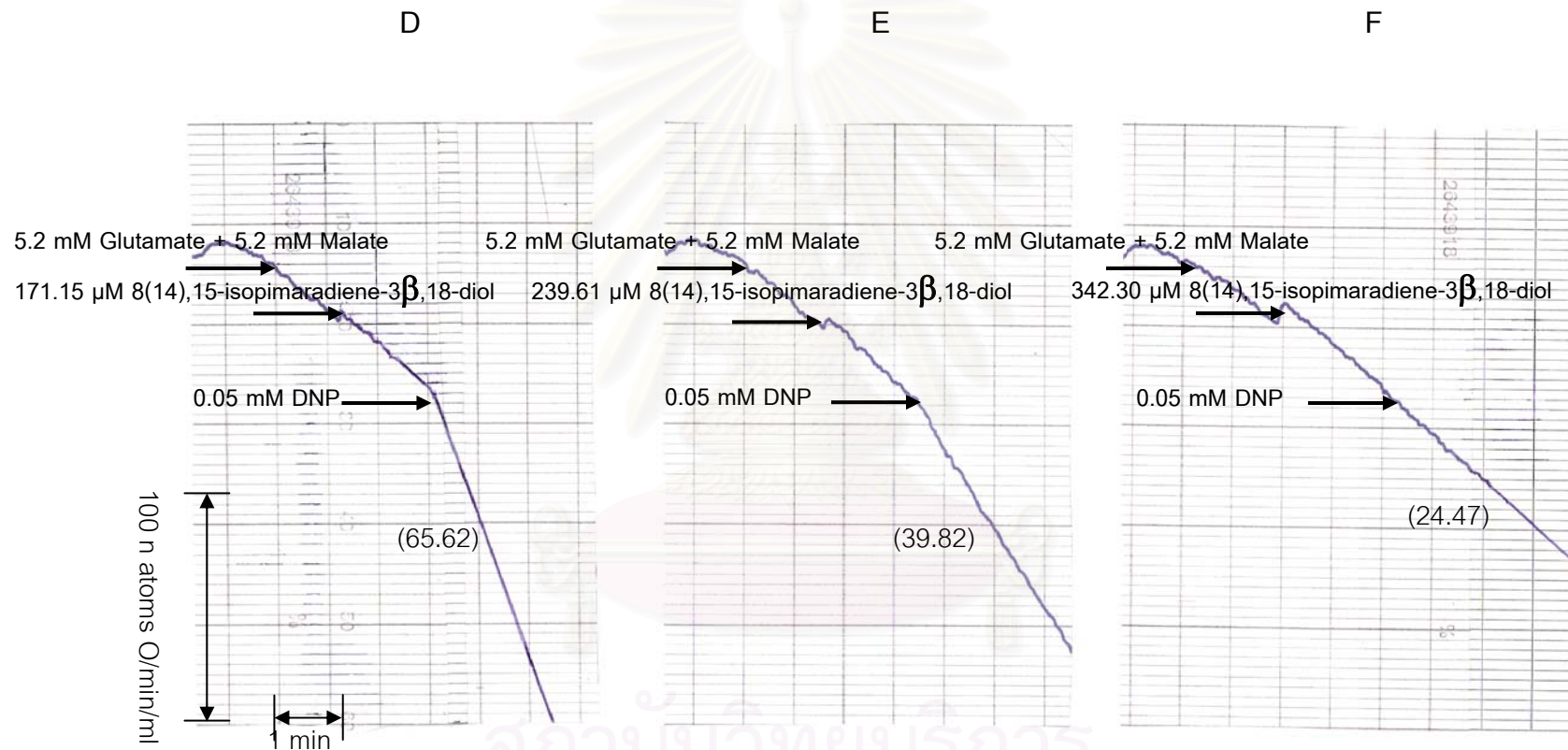
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



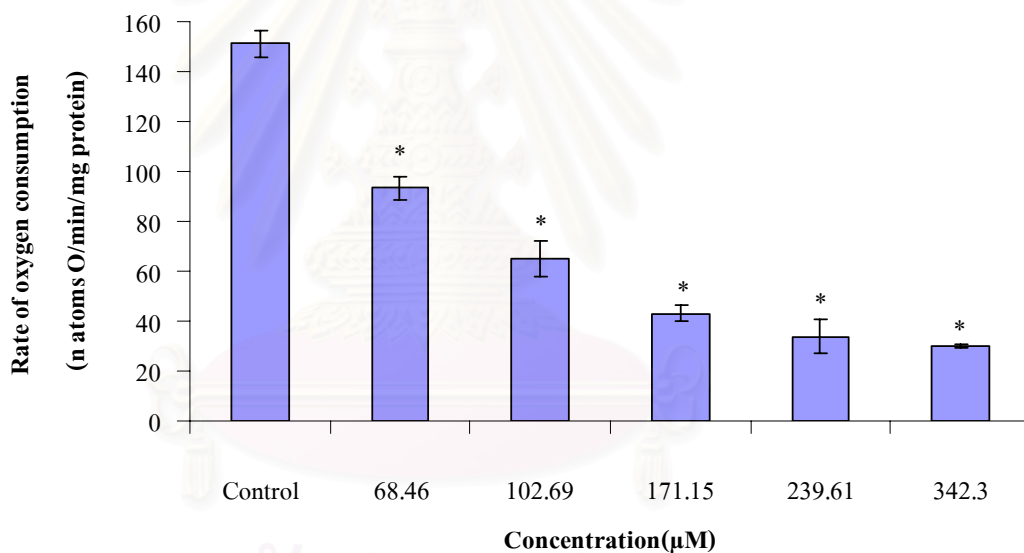
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

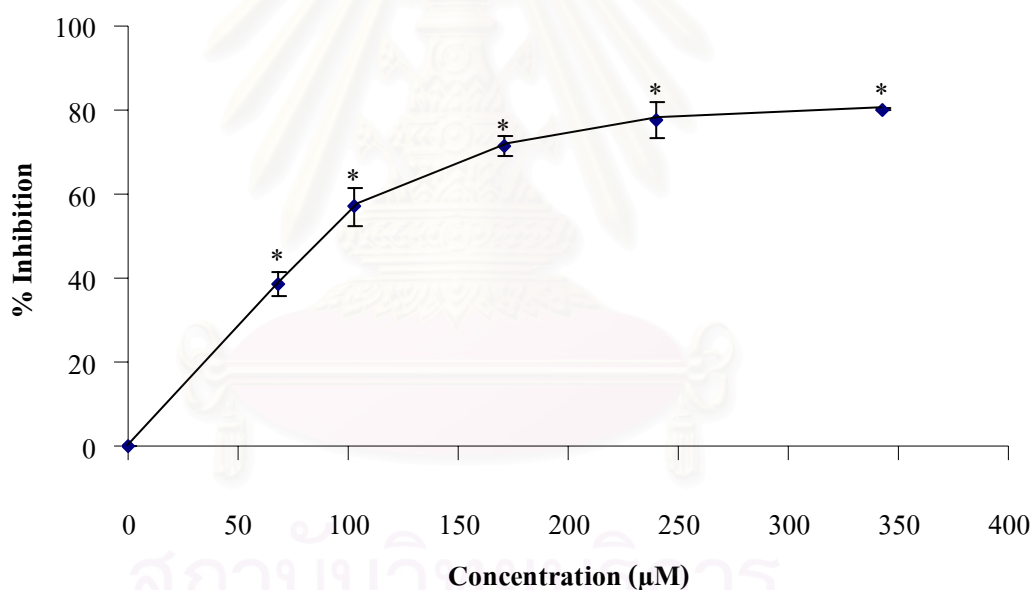
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.16 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 33 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.16 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

IC<sub>50</sub> คำนวณโดยใช้ probit analysis มีค่าเท่ากับ 51.87  $\mu$ g (88.78  $\mu$ M)



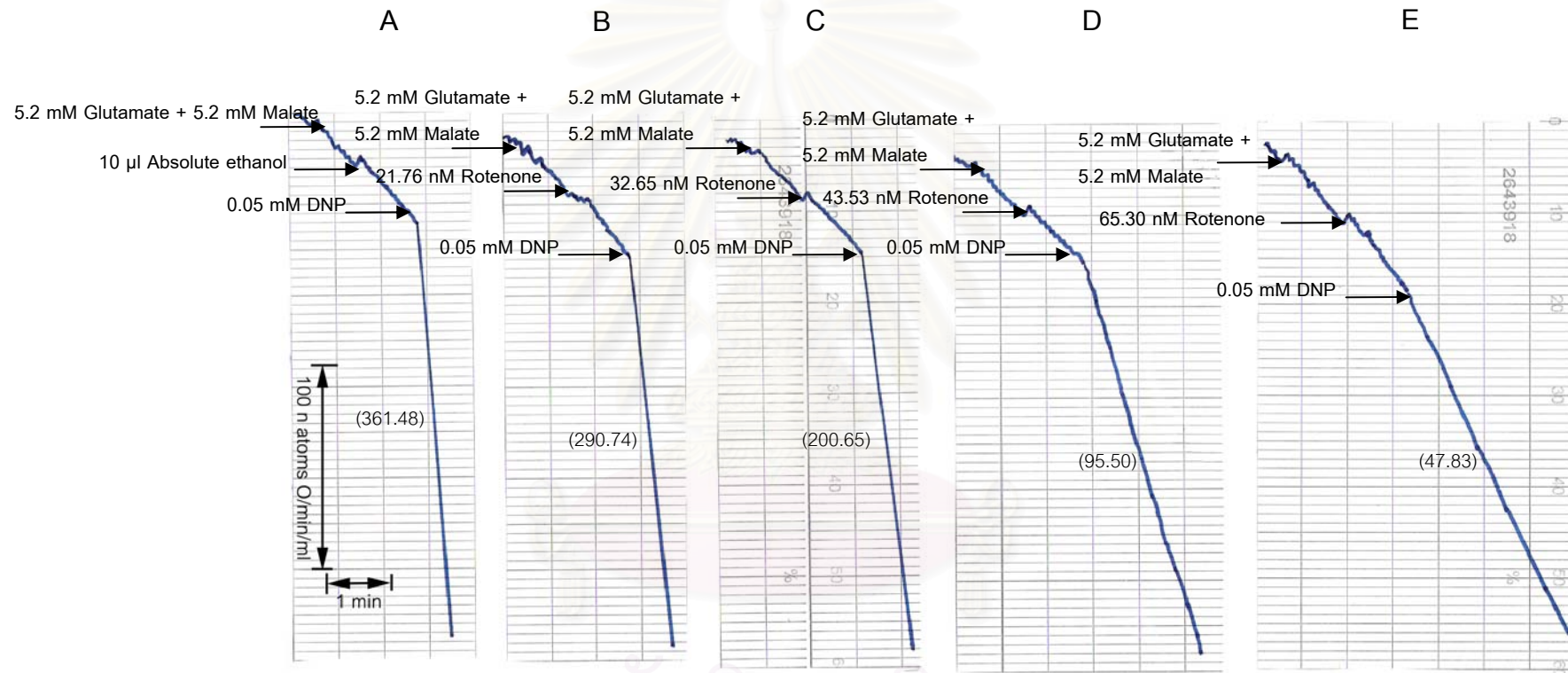
รูปที่ 34 Oxygraph tracing แสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

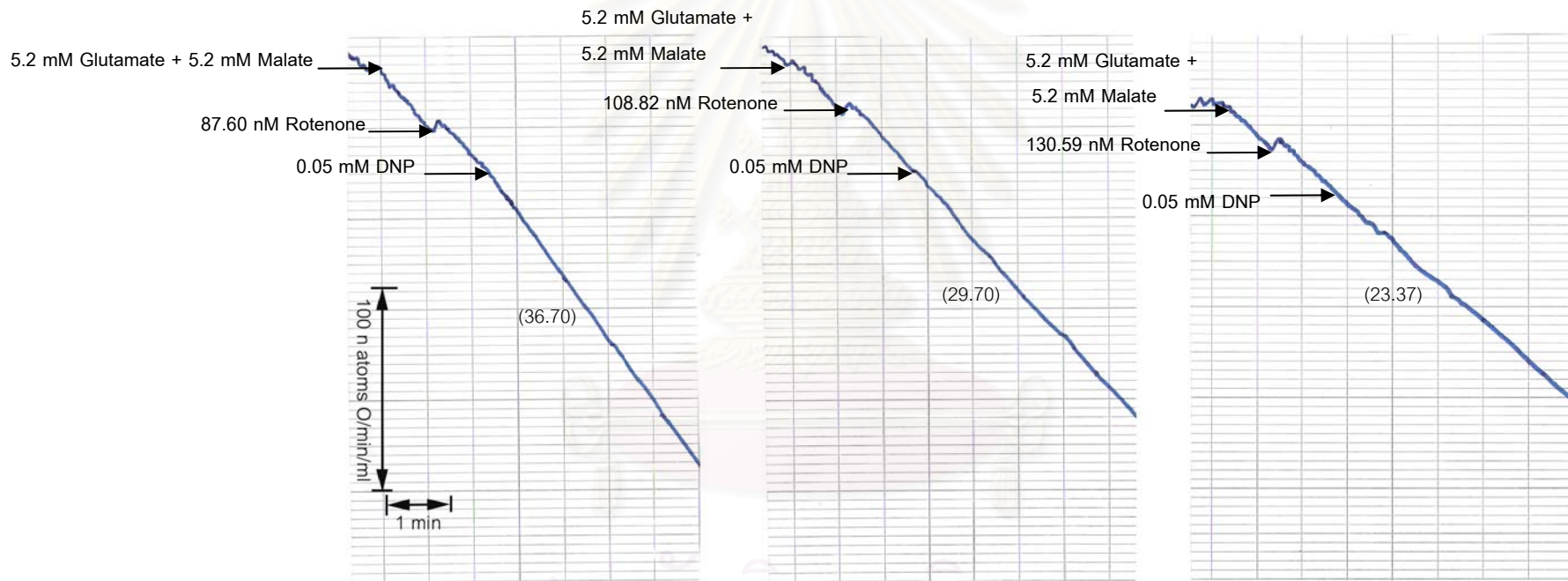


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

F

G

H

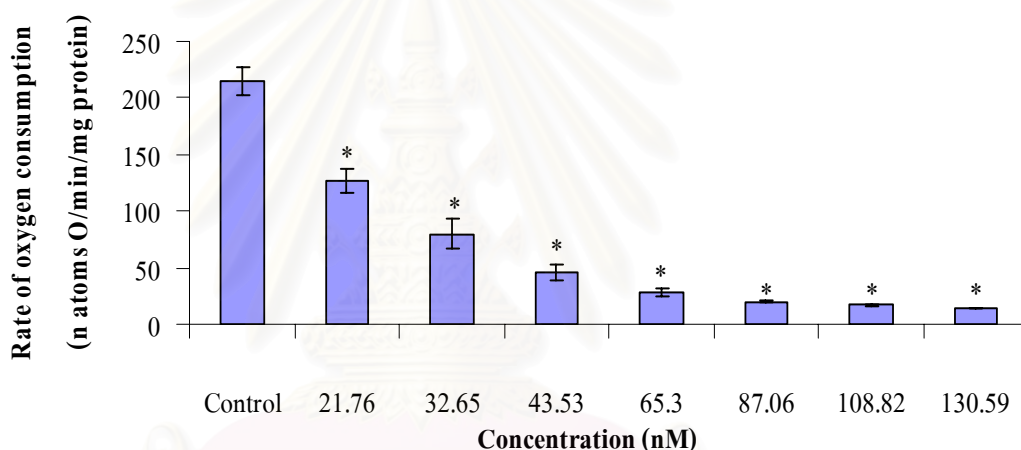


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35 กราฟแสดงผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



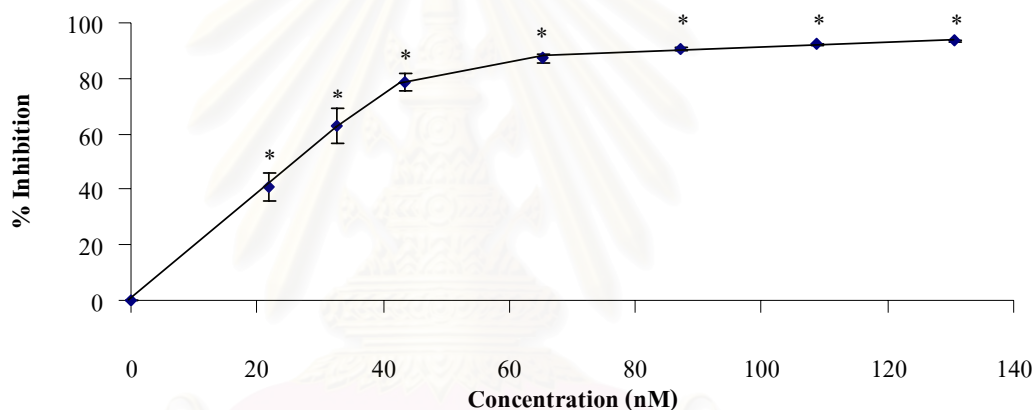
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 กราฟแสดงผลของ rotenone ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

$IC_{50}$  คำนวณโดยใช้ probit analysis มีค่าเท่ากับ 10.83 ng (23.81 nM)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

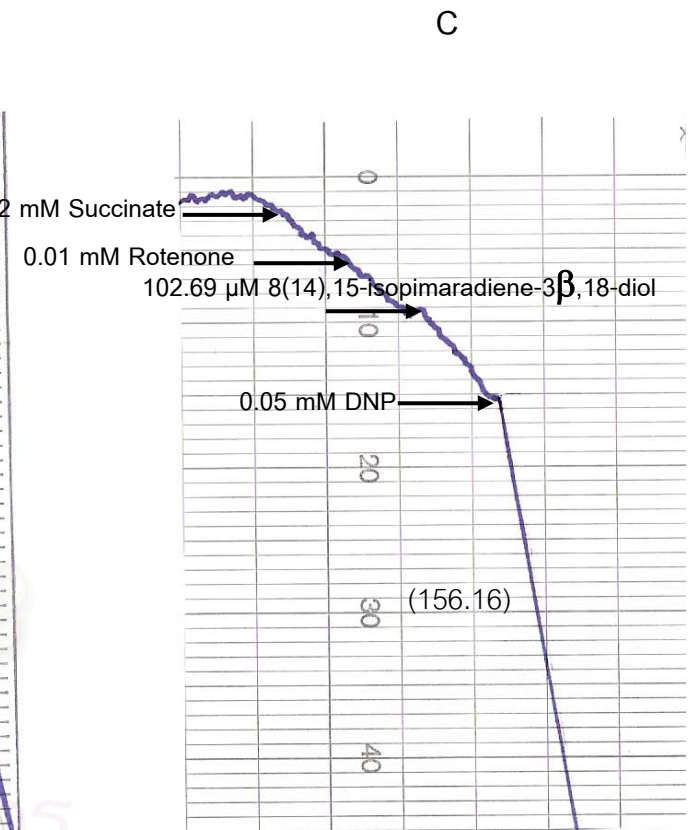
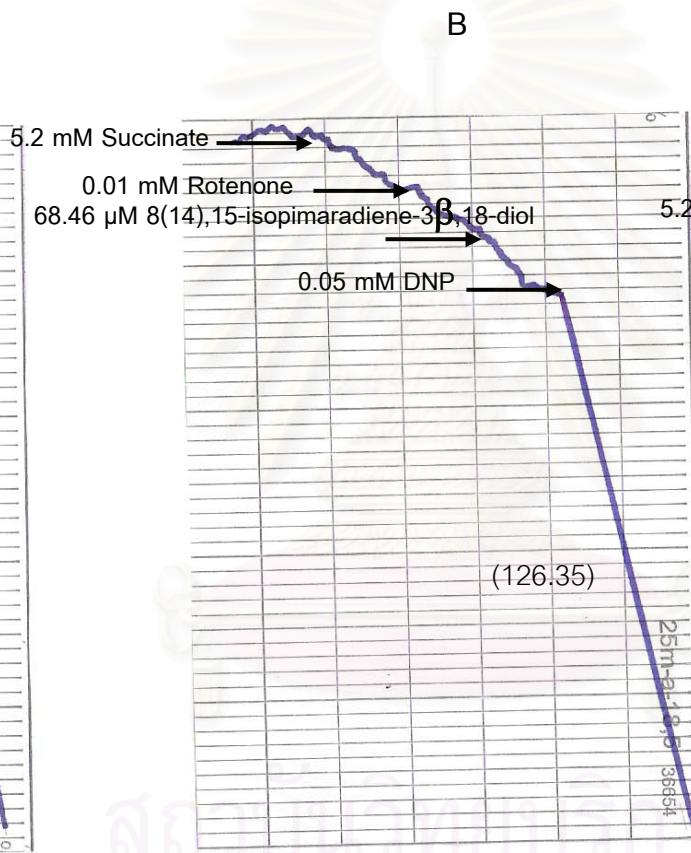
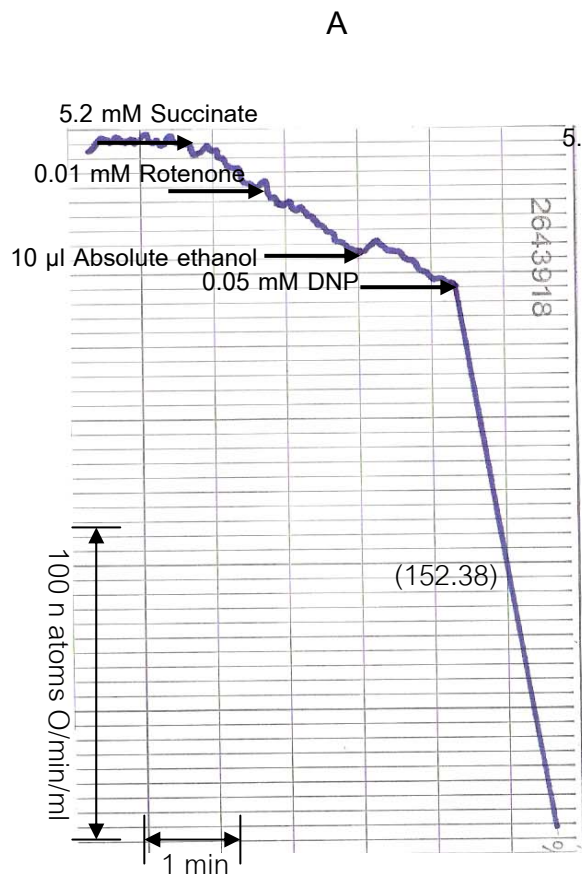
รูปที่ 37 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.73 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

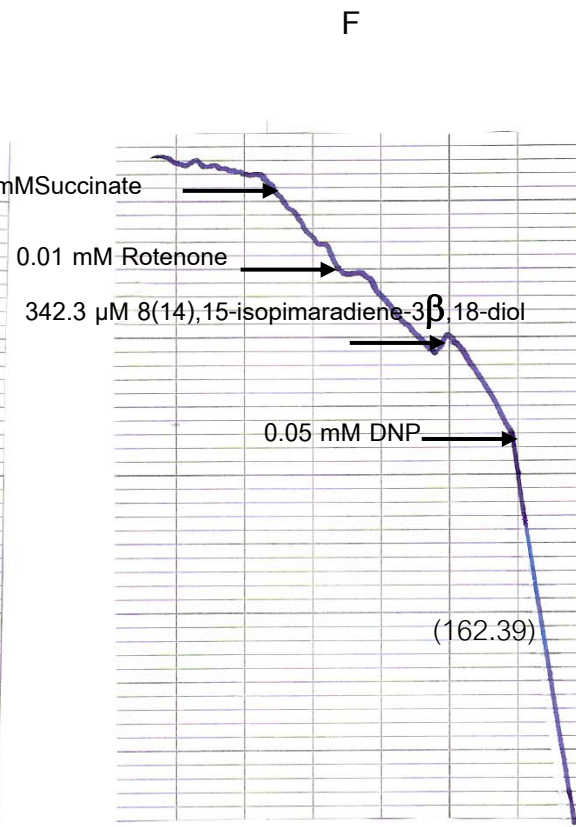
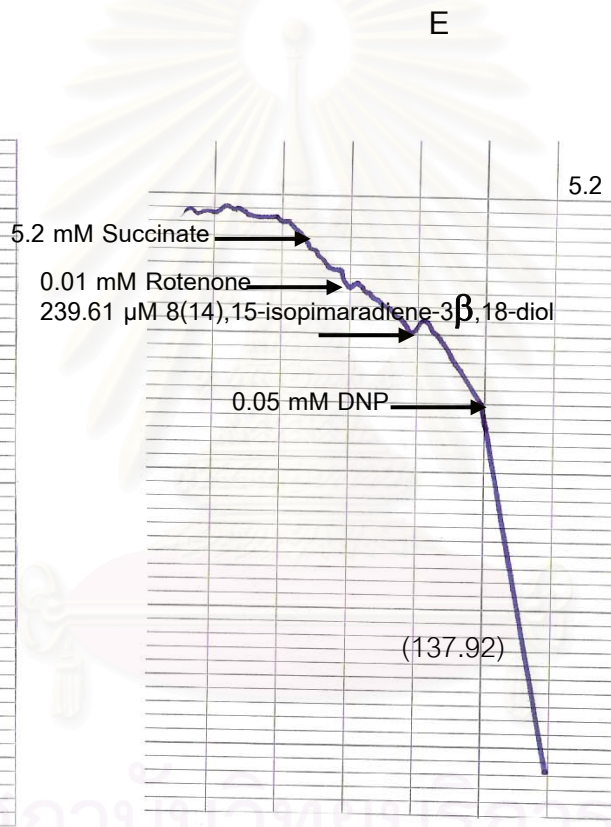
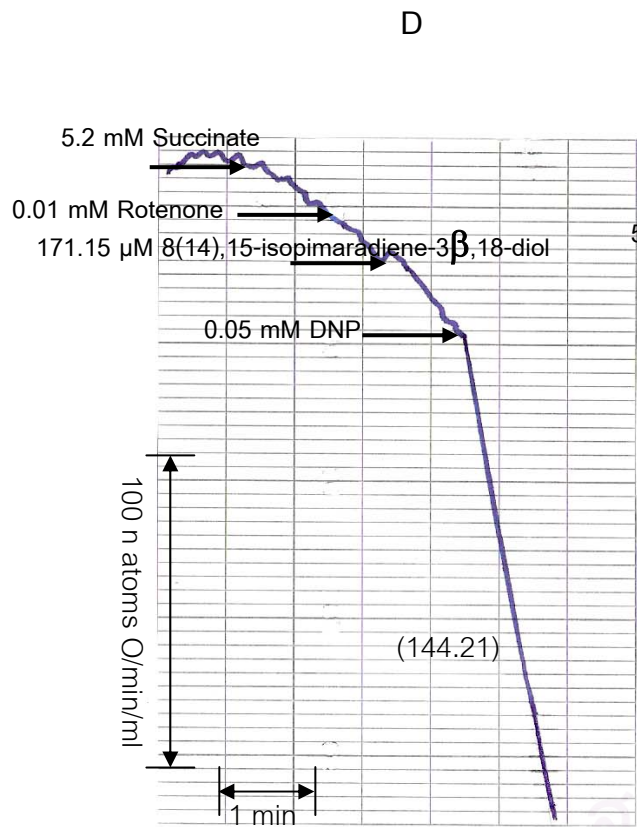
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยชีวการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



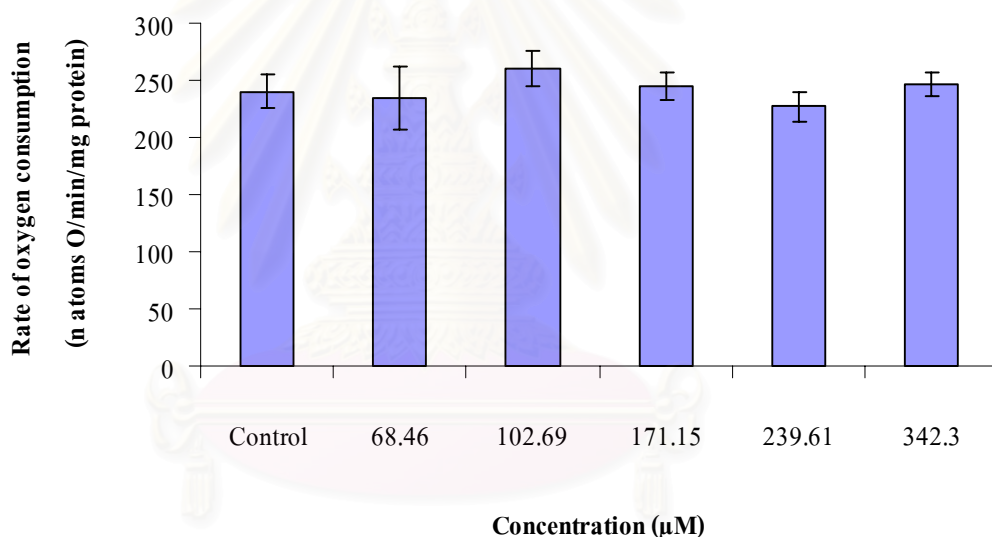
สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 38 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.73 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ศูนย์วิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

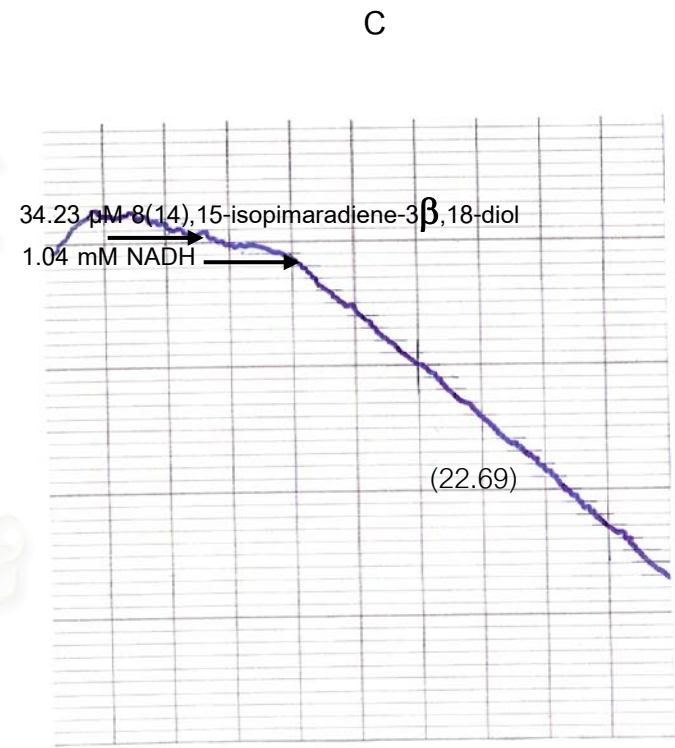
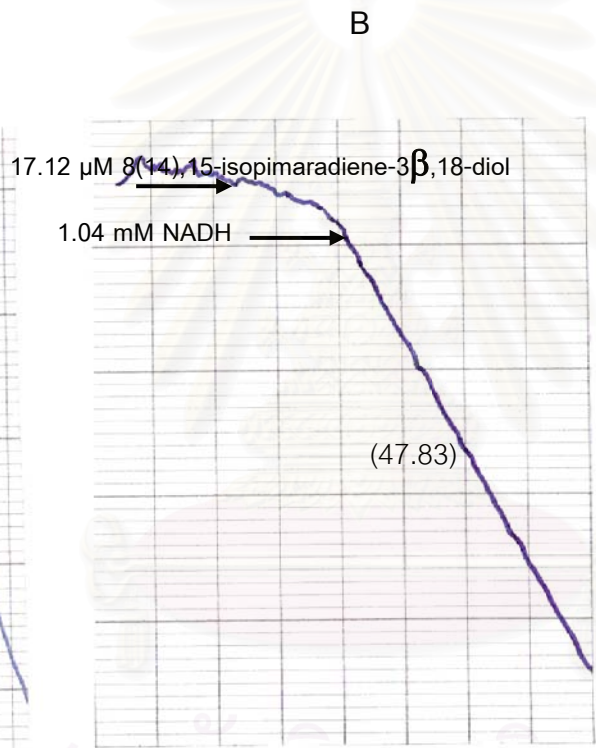
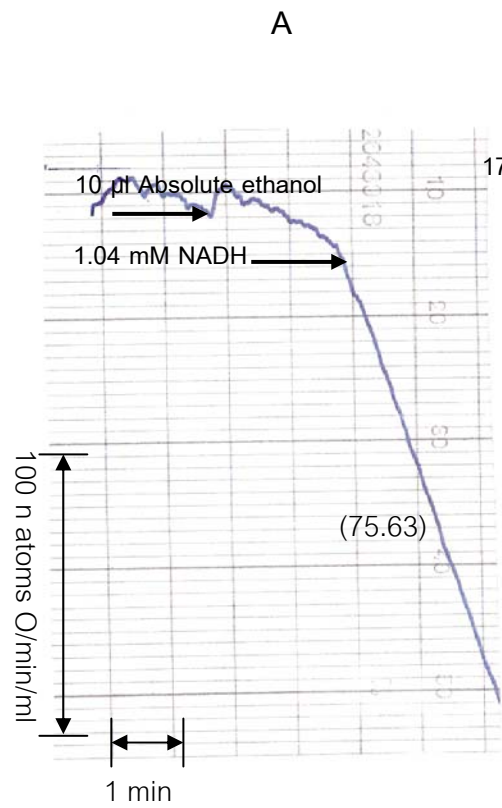
รูปที่ 39 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.62 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

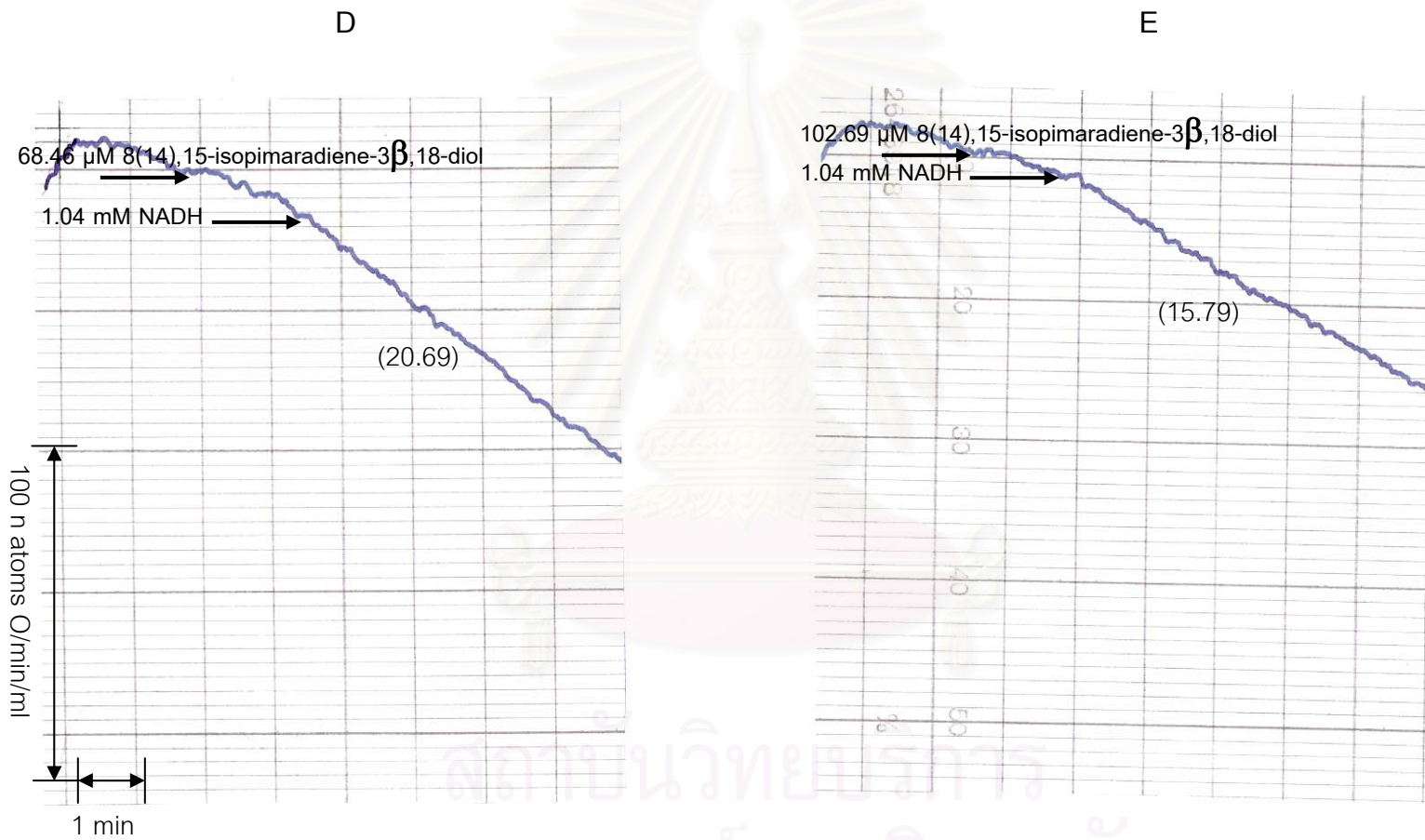
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



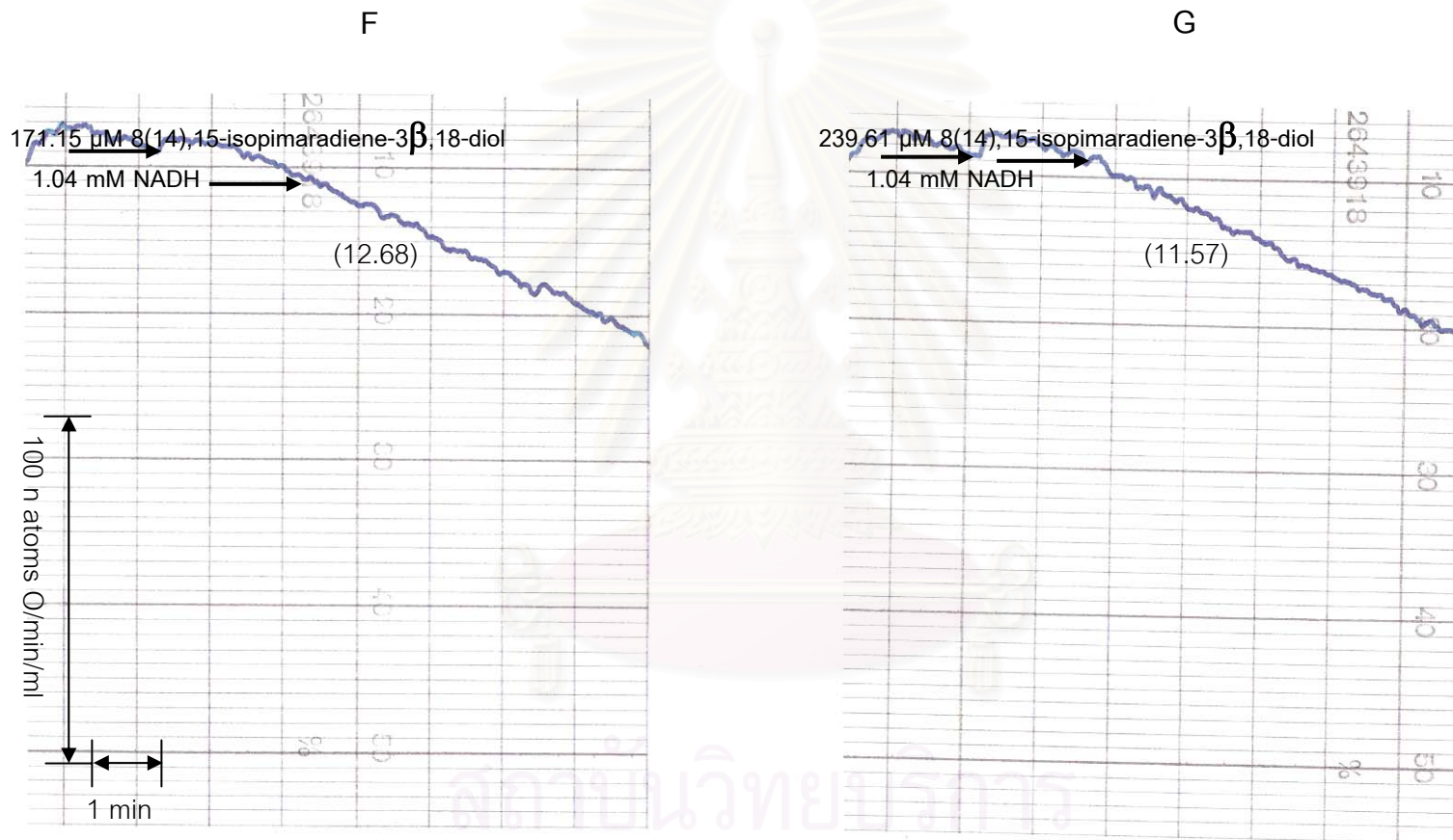
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

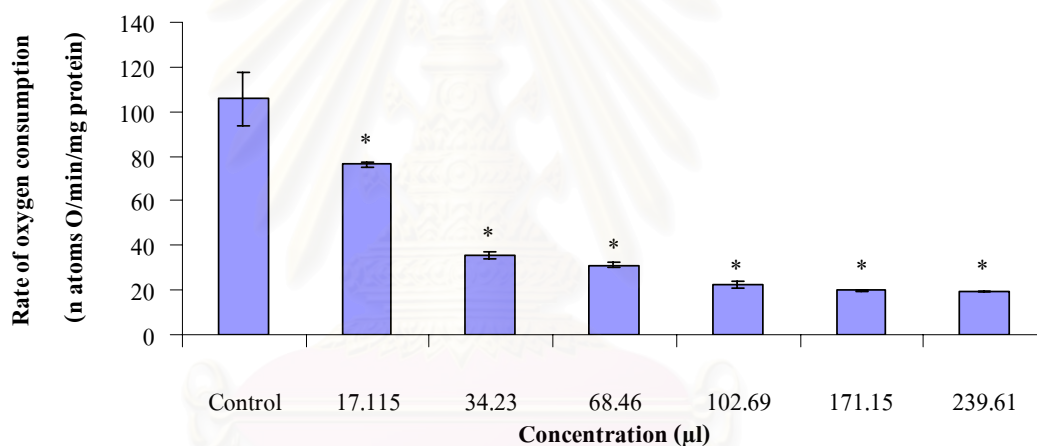


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 40 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.62 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

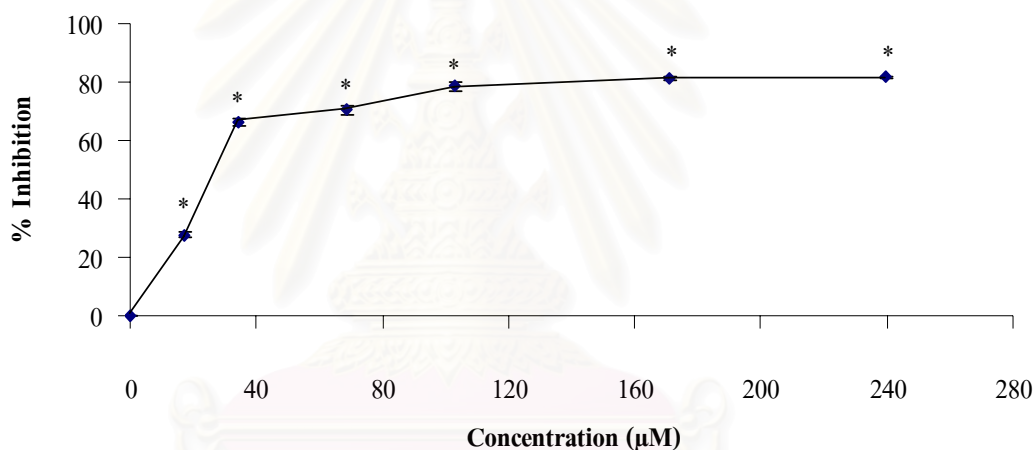


\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 41 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.62 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



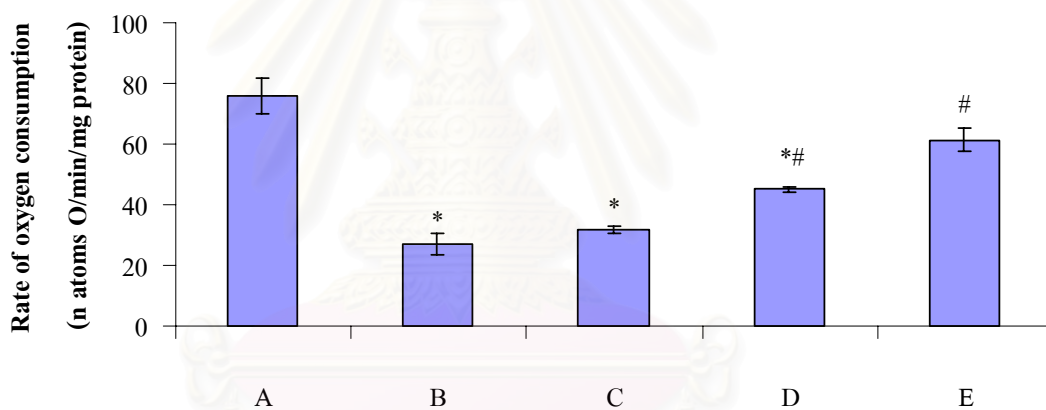
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42 กราฟแสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.96 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.932 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะไม่เติม BSA ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม BSA ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M)

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ A

#  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ B

A = absolute ethanol

B = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol (control)

C = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + 5 mg BSA

D = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + 10 mg BSA

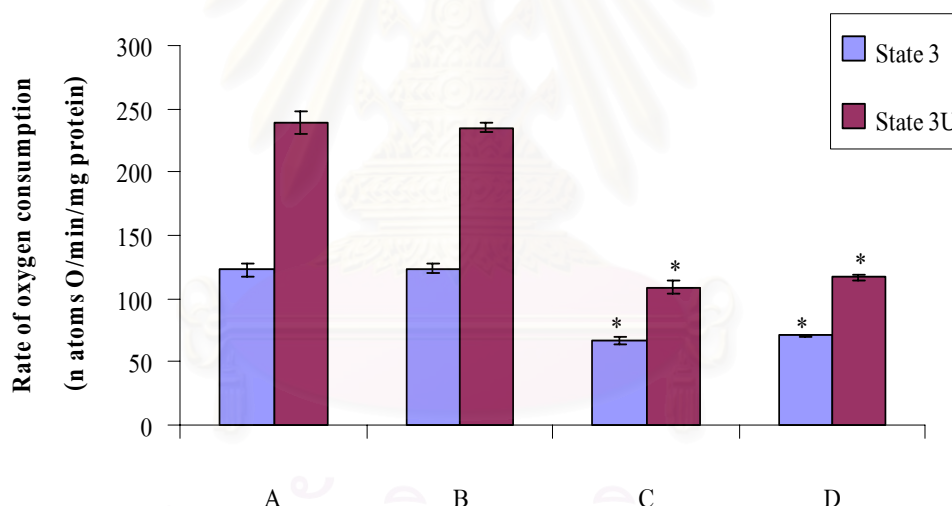
E = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + 20 mg BSA



รูปที่ 43 กราฟแสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 1.05 mM DTT 2  $\mu$ l, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.54 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.926 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะไม่เติม DTT ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม DTT ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M)

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ A

A = absolute ethanol

B = absolute ethanol + 1.05 mM DTT

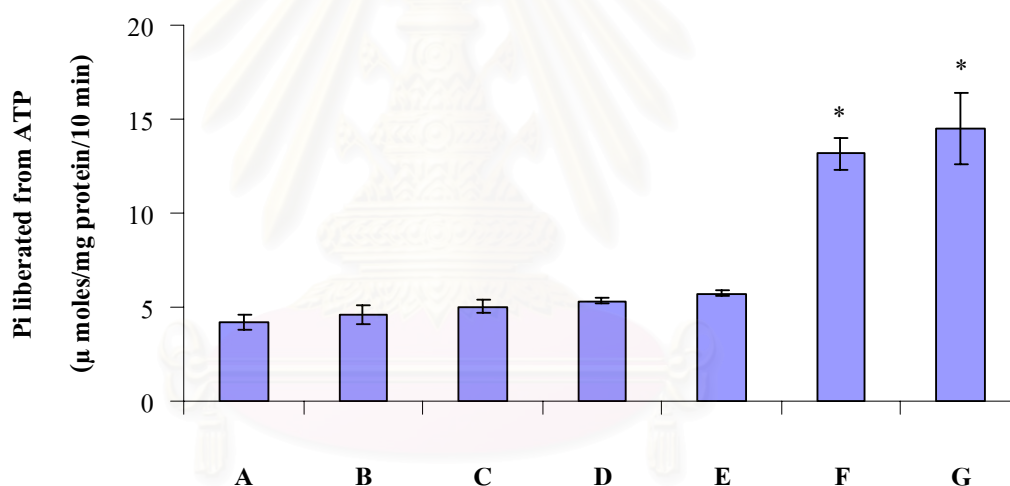
C = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol (control)

D = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + 1.05 mM DTT

รูปที่ 44 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของ เอนไซม์ ATPase ทั้งในกรณีที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose และส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.90 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

A = absolute ethanol (control)

B = 40  $\mu$ g (68.46  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

C = 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

D = 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

E = 140  $\mu$ g (239.61  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

F = 0.17 mM DNP

G = 0.17 mM DNP + 100  $\mu$ g (171.15  $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

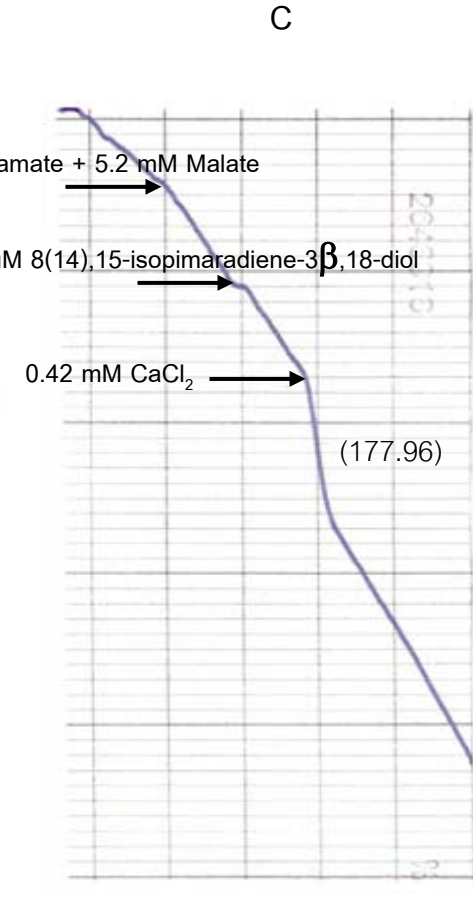
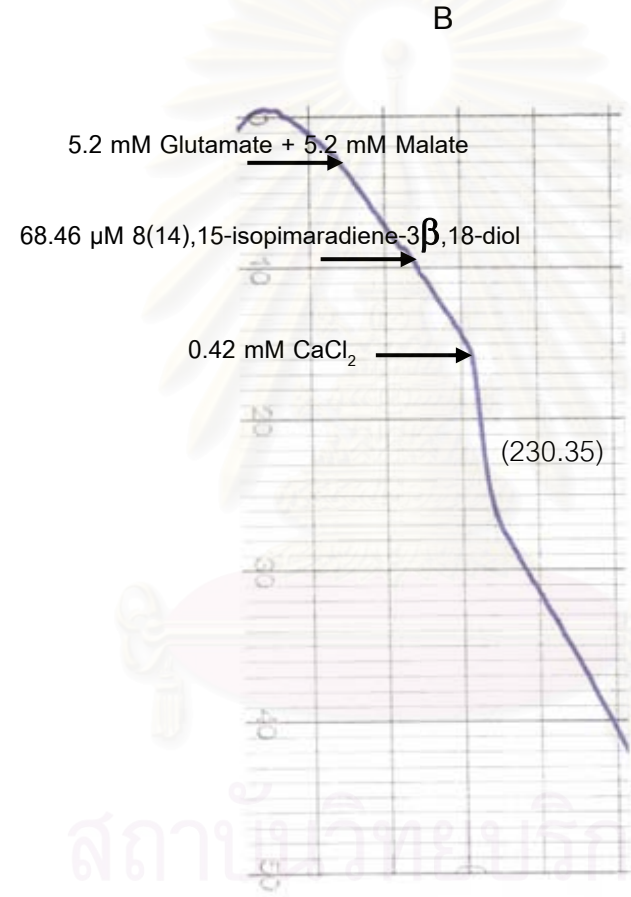
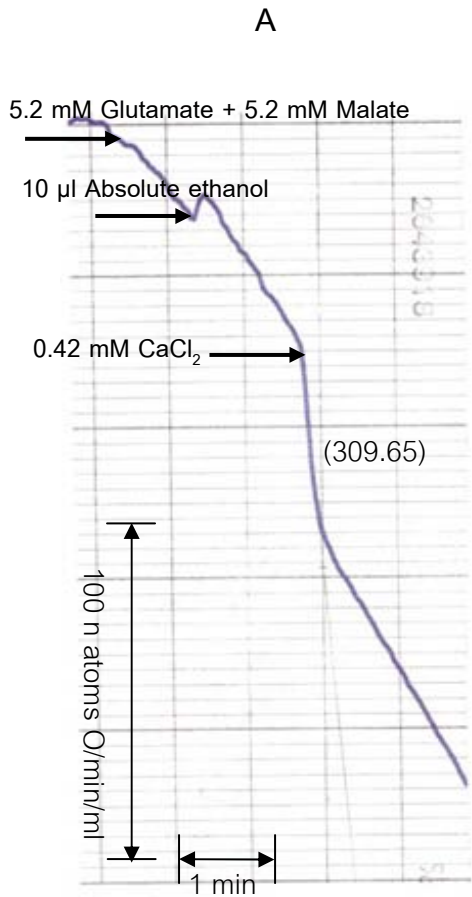
รูปที่ 45 Oxygraph tracing แสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.34 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

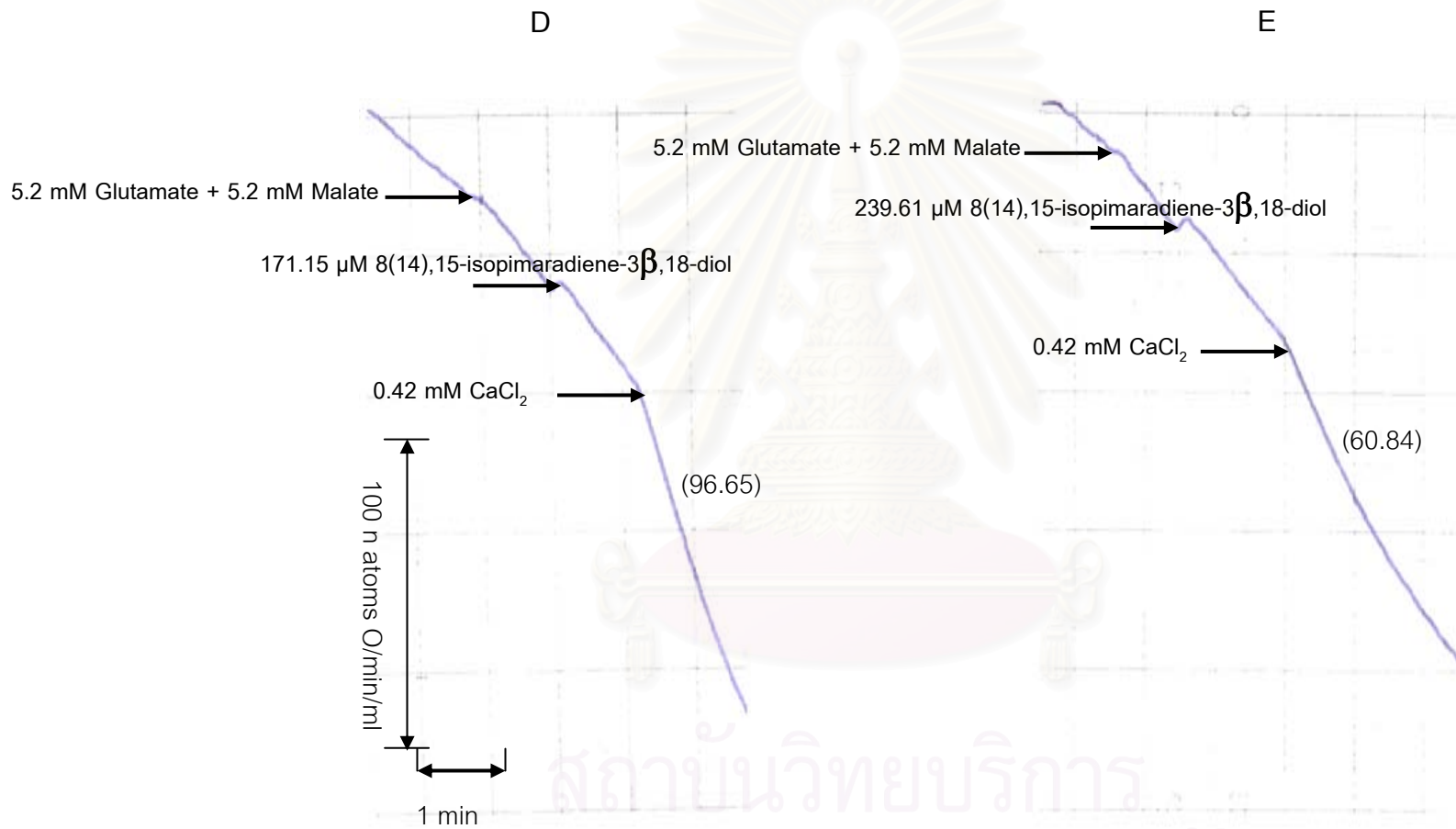
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บมีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



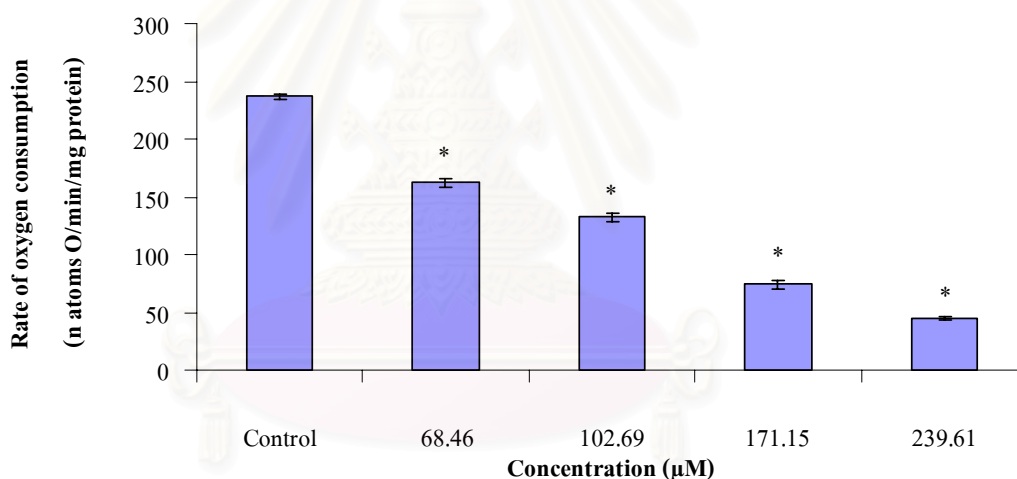
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 46 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

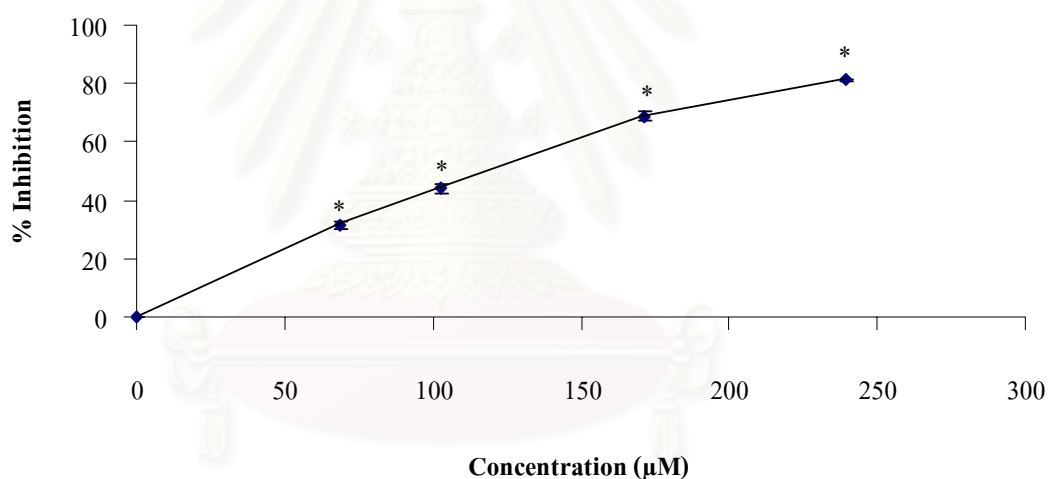
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.33 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 47 กราฟแสดงผลของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.33 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ศูนย์บริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของตับหนูแรท เป็นการศึกษาแบบ *in vitro* และจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol จากแก่นไม้แดงนั้นมีผลเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียได้ ดังต่อไปนี้

#### 1. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท

จากผลการศึกษา เมื่อใช้สับสเตรทชนิด NAD<sup>+</sup>-linked คือ glutamate + malate (ซึ่งเป็นสับสเตรทที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์ใน matrix ของไมโทคอนเดรียแล้วจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I) พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol จะออกฤทธิ์ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u respiration โดยในระยะ state 3 respiration สารจะเริ่มแสดงฤทธิ์ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ขนาด 102.69  $\mu$ M ขึ้นไป (รูปที่ 24) ส่วนในระยะ state 3u สารจะแสดงฤทธิ์การยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกขนาดที่ทำการศึกษา (รูปที่ 33) และฤทธิ์การยับยั้งของสารจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามขนาดของสาร แต่เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็นชนิด FAD-linked คือ succinate (ซึ่งเป็นสับสเตรทที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์ใน matrix ของไมโทคอนเดรียแล้วจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II) สารจะไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียทั้งใน state 3 (รูปที่ 30) และ state 3u respiration (รูปที่ 38) จากผลการศึกษาแสดงว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol อาจไปมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I (site I inhibitor)

การออกฤทธิ์เป็น site I inhibitor ของสารนั้นสามารถยืนยันได้จากผลการศึกษาเพิ่มเติมใน osmotic-shocked mitochondria ซึ่งไมโทคอนเดรียถูกทำให้อยู่ในสภาวะ uncoupling ทำได้โดยการ incubate ไมโทคอนเดรียอยู่ใน hypotonic incubation medium จึงมีผลทำให้เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียนั้นบวม (De Robertis และ De Robertis, 1987) ทำให้ exogenous NADH ที่ใช้เป็นสับสเตรทนั้น สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียเข้าไปสู่ภายใน matrix ของไมโทคอนเดรียได้โดยตรง (Lehninger และคณะ 2000) ไมโทคอนเดรียจึงสามารถ



ออกซิไดซ์ exogenous NADH ได้ (ถ้าเป็น intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ exogenous NADH ได้ เพราะ NADH มีขนาดโมเลกุลใหญ่ จึงไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียได้) จากนั้น NADH ก็จะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ห่วงโซ่การหายใจที่ complex I ได้โดยตรง แล้วจึงเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปตาม complex ต่างๆ ของห่วงโซ่การหายใจต่อไป จากผลการศึกษาพบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในทุกขนาดที่ทำการศึกษานั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 41) โดยฤทธิ์การยับยั้งก็จะเพิ่มขึ้นแปรผันตามขนาดสารทดสอบเช่นเดียวกับในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท จึงเป็นการยืนยันว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจที่ NADH-ubiquinone oxidoreductase หรือ complex I

อย่างที่ได้อ้างไว้ข้างต้นว่า complex I มักจะเป็นตำแหน่งที่เกิดความเสียหายได้ง่ายที่สุดในห่วงโซ่การหายใจ มีสารเคมีหลายชนิดทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ทราบแล้วว่ามียุทธียับยั้งการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียที่ complex I (รูปที่ 14) ยกตัวอย่างเช่น rotenone ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในรากของโล่ตีนหรือหางไหล [*Derris elliptica* (Roxb.) Benth] (เป็นสมุนไพรในวงศ์ Leguminosae เช่นเดียวกับไม้แดง) (Wallace และ Starkov, 2000) ที่เคยนำมาใช้ป้องกันและกำจัดแมลง แต่เนื่องจากมีพิษมากภายหลังจึงไม่นิยมนำมาใช้ กลไกการเกิดพิษที่สำคัญของ rotenone ก็คือยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรียที่ NADH-ubiquinone oxidoreductase หรือ complex I นั้นเอง เมื่อเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ระหว่าง rotenone กับ สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol จากค่า IC<sub>50</sub> พบว่า rotenone นั้นมีความแรงในการยับยั้งมากกว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทั้งในระยะ state 3 และระยะ state 3u respiration นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ยังสามารถทำให้ค่า RCI ของไมโทคอนเดรียลดลงได้ (ตารางที่ 4) ค่า RCI เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของไมโทคอนเดรียในการเกิดการควบคู่กัน (coupling) กันระหว่างพลังงานที่เกิดจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจกับกระบวนการฟอสฟอริเลชัน (กระบวนการสร้าง ATP) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol อาจทำให้ความสามารถในการสร้างพลังงาน ATP ของไมโทคอนเดรียลดลงได้

## 2. ผลของปัจจัยอื่นๆ ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol

### 2.1 ผลของ BSA

ปกติแล้วเมื่อยาหรือสารเคมีถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว ส่วนหนึ่งก็จะจับกับ plasma protein คือ albumin เป็นส่วนใหญ่ กลายเป็น bound drug ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ออกฤทธิ์ ส่วนที่ไม่จับกับ plasma protein ก็จะกลายเป็น free drug ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Gilman และคณะ, 1985; Katzung, 1998) ดังนั้นถ้ายาหรือสารเคมีใดมี protein binding สูงก็จะออกฤทธิ์ได้ลดลง ส่วนถ้ายาหรือสารเคมีใดมี protein binding ต่ำก็จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดี ในการศึกษาเราใช้ BSA ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ มาเป็นตัวแทนของ albumin ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในกระแสเลือด จากผลการศึกษาในรูปที่ 42 ที่พบว่า BSA ในขนาด 10 และ 20 mg นั้นสามารถลดฤทธิ์ของสารในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลดังกล่าวจะแปรผันตามขนาดของ BSA ที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าสารอาจจะมีความสามารถในการจับกับโปรตีนในกระแสเลือดได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบว่าผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้จะมีผลสำคัญในทางคลินิกหรือไม่ อย่างไร

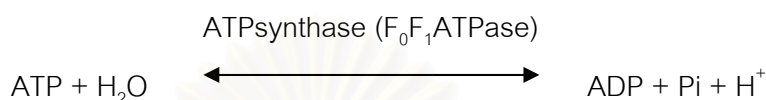
### 2.2 ผลของ DTT

จากการที่หมู่ sulfhydryl มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์บางชนิด รวมถึงการทำงานของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรียซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกจากไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ก็ยังมีผลต่อการเกิดกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรียด้วย (Godinot และคณะ, 1981; Lequoc และ Lequoc, 1982; Robillard และ Konings, 1982) และเนื่องจากสาร DTT เป็นสารที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของหมู่ sulfhydryl ได้ (Cleland, 1964) การทดลองนี้จึงออกแบบขึ้นเพื่อศึกษาว่าการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย นั้นเกี่ยวข้องกับสารที่ไปจับกับหมู่ sulfhydryl ของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรียหรือไม่ ซึ่งจากผลการทดลองในรูปที่ 43 ที่พบว่า การเติม 1.05 mM DTT ลงไปใน reaction medium ก่อนการเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol นั้นไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของสารในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u respiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งหมายความว่า DTT นั้นไม่สามารถลดผลของสารในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย (โดยการไปยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ) นั้นไม่ได้เกิดจากการที่สารไปจับกับหมู่

sulfhydryl ของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย

### 3. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

เอนไซม์ ATPase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลาย ATP ไปเป็น ADP, Pi และ H<sup>+</sup> ได้ดังสมการ



ในสภาวะปกติเอนไซม์ ATPase จะมี activity ต่ำ (เนื่องจากเอนไซม์ ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ) แต่ในกรณีที่ได้รับสาร uncoupler เช่น DNP เข้าไป จะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ ATPase ถูกกระตุ้นได้ เพราะ DNP มีคุณสมบัติเป็น H<sup>+</sup> carrier หรือ proton-ionophore สามารถทำให้โปรตอนที่อยู่ใน intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้อย่างอิสระ โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATP synthase เพราะฉะนั้นจะทำให้ proton gradient ที่เคยมีอยู่ถูกทำลาย ดังนั้นไมโทคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่โดยการไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย ATP เพื่อให้ได้ H<sup>+</sup> ออกมาทดแทน การศึกษานี้จะวัด activity ของเอนไซม์ ATPase ที่เพิ่มขึ้นจากปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลาย ATP

จากผลการศึกษานี้พบว่า สาร DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler นั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการสลาย ATP ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากเหตุผลดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ส่วนสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ทุกขนาดที่ทำการศึกษาขึ้นไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase (ในการสลาย ATP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกรณีที่ให้ร่วมกับสาร DNP และในกรณีที่ไม่ได้ให้ร่วมกับสาร DNP แสดงว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษาขึ้นไม่มีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase และไม่มีผลไปรบกวนการออกฤทธิ์ของสาร DNP ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ด้วย

### 4. ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

ไมโทคอนเดรียนั้นนอกจากจะมีหน้าที่ที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์แล้ว ยังมีอีกหน้าที่ซึ่งมีความสำคัญเช่นเดียวกันคือ หน้าที่ในการควบคุมสมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์ (Ca<sup>2+</sup> homeostasis) โดยการนำแคลเซียมเข้าไปเก็บสะสมไว้ภายใน matrix ซึ่งเป็นการควบคุม

metabolic activity ทั้งของไมโทคอนเดรียเองและของเซลล์ด้วย การขนส่งแคลเซียมเข้าไปเก็บสะสมใน matrix ของไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นได้นั้นต้องอาศัยความต่างศักย์ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ proton motive force หรือ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ดังนั้นถ้าสารใดก็ตามไปมีผลเปลี่ยนแปลง electrochemical potential ของไมโทคอนเดรีย เช่น uncoupler, respiratory chain inhibitor ก็จะทำให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียได้ ดังนั้นถ้ามีการเติม  $Ca^{2+}$  ลงไปในปฏิกิริยา ไมโทคอนเดรียก็จะถูกกระตุ้นการหายใจและรับเอา  $Ca^{2+}$  เข้าไปเก็บสะสมใน matrix ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในช่วงนี้จะเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อแคลเซียมเข้าไปสะสมภายใน matrix หมดแล้วอัตราการใช้ออกซิเจนก็จะลดลง ซึ่งจากผลการศึกษาในรูปที่ 47 พบว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 40 – 140  $\mu$ g (68.46 – 239.61  $\mu$ M) นั้นสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม (เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และฤทธิ์ในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารทดสอบที่เพิ่มขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่าสารนั้นสามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจใน complex I ได้ เพราะเมื่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจถูกยับยั้งก็จะทำให้ขาด proton motive force ซึ่งใช้ในการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมภายในไมโทคอนเดรีย แคลเซียมก็จะเข้าไปสะสมภายใน matrix ได้น้อยลง อัตราการใช้ออกซิเจนจึงลดลงตามไปด้วย ซึ่งการที่สารมีผลไปยับยั้งการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรีย นั้น จะมีความสำคัญอย่างไรต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ก็เป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาต่อไป

**จากการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท ได้ดังนี้**

1. สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol มีฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I หรือเรียกว่า site I inhibitor เช่นเดียวกับ rotenone แต่ความแรงในการยับยั้งที่ complex I ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol จะน้อยกว่า rotenone ถึง 4,594.89 เท่า เมื่อเปรียบเทียบจากค่า  $IC_{50}$  ของสารต่อระยะ state 3 respiration ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท (กรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท) และเมื่อพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อระยะดังกล่าว ซึ่งเท่ากับ 136.79  $\mu$ M พบว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง จึงอาจกล่าวได้ว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เป็น weak site I inhibitor ต่อไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูแรท

2. BSA ขนาด 10 และ 20 mg นั้นสามารถฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration ได้ แสดงว่าสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol นั้นอาจจะมีความสามารถในการจับกับโปรตีนในกระแสเลือดได้

3. DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u respiration ได้ แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียั้นไม่เกี่ยวข้องกับการที่สารไปจับกับหมู่ sulfhydryl (-SH) ของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย

4. สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษานั้นไม่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกรณีที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยสาร uncoupler คือ DNP

5. สาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในทุกขนาดที่ทำการศึกษา มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

6. การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ *in vitro* ซึ่งผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่เกิดขึ้นเป็นการออกฤทธิ์ของสารโดยตรงต่อไมโตคอนเดรีย อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลว่าสารนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกระบบเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกายเปลี่ยนแปลงแล้วได้สารที่เป็น active/toxic metabolite เกิดขึ้นหรือไม่ อย่างไร ซึ่งคิดว่าน่าจะเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารมากขึ้น

จากการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากสิ่งสกัดเอทิลอะซีเตตของแก่นไม้แดงเพียงชนิดเดียว แต่ในการนำมาใช้ประโยชน์โดยทั่วไปของแก่นไม้แดงนั้นยังไม่มีหรือนำสารสกัดเดี่ยวๆ มาใช้เพียงตัวเดียว ผลต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการนำมาแก่นไม้แดงมาใช้นั้นอาจเป็นผลโดยรวมของสารหลายๆ ชนิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายใน ดังนั้นการศึกษานี้อาจทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารประกอบตัวอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบภายในแก่นไม้แดงด้วย รวมไปถึงอาจศึกษาผลของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากแก่นไม้แดง ซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของการได้รับสารหลายๆ ตัวร่วมกัน นอกเหนือไปจากการศึกษาผลของสารเพียงตัวเดียว แล้วทำการเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นต่อไมโตคอนเดรียกับผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ได้ในครั้งนี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของสมุนไพรตัวนี้มากขึ้น

เนื่องจากข้อมูลที่มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรรหัสแมรี่ได้แก่ carnosic acid, carnosol, rosmanol และ epirosmanol ซึ่งเป็นสารประเภท diterpene นั้นแสดงฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation ภายในไมโทคอนเดรียและไมโครโซมได้ (Haraguchi และคณะ, 1995) ดังนั้น การศึกษาในแง่การป้องกันการเกิด lipid peroxidation ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ซึ่งเป็นสารประเภท diterpene เช่นกันนั้น ก็เป็นประเด็นที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป และไมโทคอนเดรียเองก็เป็นต้นแบบที่ดีในการศึกษาในแง่นี้ เพราะในขั้นตอนการถ่ายทอด อิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรียนั้นมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย จึงมีโอกาที่จะเกิด reactive oxygen species (ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ) ต่างๆ ขึ้นได้ เช่น superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) และ hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) เป็นต้น และเมื่อมีอนุมูลอิสระต่างๆ เหล่านี้เกิดขึ้นก็มีโอกาสที่จะเกิด lipid peroxidation ได้ ผลจากการเกิด lipid peroxidation ก็ส่งผลให้เยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียสูญเสียความทรงตัวและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ (Haraguchi และคณะ, 1995) ซึ่งอาจก่อให้เกิดพยาธิสภาพตามมาได้ เช่นเกิด aging, apoptosis เป็นต้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช ไชคชัยเจริญพร. 2541. สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน. เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน.

พัชรา วีระกะลัส. 2544. พลังงานและเมแทบอลิซึม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเภสัชพิษวิทยา. 2538. สยามไภษัชยพิภพ: ภูมิปัญญาของชาติ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. พืชกินได้ในป่าสะแกราช. [online].

(n.d.). Available from: <http://www.tistr.or.th/sakaerat/Plant%20in%20Sakaerat/plant%20list/056แดง.pdf> [2008, march 20]

### ภาษาอังกฤษ

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. Energy conversion: Mitochondria and chloroplast. Molecular biology of the Cell. 4<sup>th</sup> ed. pp. 767-829. New York: Garland Science.

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

Bernardi, P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. Physiol. Rev. 79: 1127-1146.

Bertina, R. M., and Slater, E. C. 1975. The effect of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone-induced ATPase of rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 376: 492-504.

Bhagavan, N. V. 2002. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. Medical Biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. pp 247-274. Hawaii: Academic Press.

Carafoli, E. 2003. Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. Trends Biochem. Sci. 28(4): 175-180.

- Cardoso, C. M. P., Custodio, J. B. A., Almeida L. M., and Moreno A. J. M. 2001. Mechanisms of the Deleterious Effects of Tamoxifen on Mitochondrial Respiration Rate and Phosphorylation Efficiency. Toxicology and Applied Pharmacology. 176: 145-152.
- Chance, E., and Williams, G. R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymology. 17: 65-134.
- Cleland, W. W. 1964. Dithiothreitol, A new protective reagent for SH group. Biochemistry. 3: 480-482.
- Danishefsky, I. 1980. Biochemistry for medical sciences. 1<sup>st</sup> ed. Boston: Little Brown and Company.
- Davison, A. N. 1958. Physiological role of monoamine oxidase. Physiol. Rev. 38: 729-747.
- De Robertis, E. D. P., and De Robertis, E. M. F. 1987. Cell and molecular biology. 18<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Devlin, T. M. 2002. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical correlations. 5<sup>th</sup> ed. pp. 561-589. New York: Wiley-Liss.
- Devlin, T. M. 2006. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical correlations. 6<sup>th</sup> ed. pp. 550-573. New York: Wiley-Liss.
- Erecinska, M., and Wilson, D. F. 1981. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitors of mitochondrial functions. pp. 199-210. Oxford: Pergamon Press.
- Fiske, O. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- Fowler, B. A., Kleinow, K. M., Squibb, K. S., Lucier, G. W., and Hayes, A. W. 1994. Organelles as Tools in Toxicology. Principles and Methods of Toxicology. 3<sup>rd</sup> ed. pp. 1201-1208. New York: Raven Press.
- Gardner, S., Sidisunthorn, P., and Anusarnsunthorn, V. 2000. A Field Guide to Forest Trees of Northern Thailand. Bangkok: Kobfai Publishing Project.
- Garrett, R., H., and Grisham, C. M. 1999. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 673-708. Philadelphia: Saunders College Publishing.



- Garrett, R., H., and Grisham, C. M. 2002. Electron transport and oxidative phosphorylation. Principles of Biochemistry with a Human Focus. pp 519-551. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., and Pozzan, T. 2007. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. Cell Death and Differentiation. 14: 1267-1274.
- Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W., and Murad, F. 1985. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 7<sup>th</sup> ed. New york: Macmillian.
- Godinot, C., Gautheron, D. C., Galente, Y., and Hatefi, Y. 1981. Labeling of thiols involved in the activity of complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. J. Biol. Chem. 256: 6776-6782.
- Hanstein, W. G. 1976. Uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta. 456: 129-148.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., and Yagi, A. 1995. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpinoids from *Rosmarinus officinalis*. Planta Med. 61: 333-336.
- Haugaard, N., Lee, N. H., Kostrzewa, R., Horm, R.S., and Haugard, E. S. 1969. The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 172: 198-204.
- Hogeboom, G. H. 1955. Fractionation of cell components of animal tissues. In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.). Methods in enzymology. Vol. 1. pp. 16-19. New york: Academic Press.
- Karp, G. 2002. Aerobic respiration and the mitochondrion. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. 3<sup>rd</sup> ed. pp. 183-217. New york: John Wiley & Sons.
- Katzung, B. G. 1998. Basic & Clinical Pharmacology. 7<sup>th</sup> ed. pp. 1-62. USA: Appleton & Lange.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2000. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Principles of Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 659-721. New york: Worht.
- Le-quoc, K., and Le-quoc, D. 1982. Control of the mitochondrial inner membrane permeability by sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 216: 639-651.

- Lodish, H., et al. 2004. Cellular energetics. Molecular cell biology. 5<sup>th</sup> ed. pp. 301-330.  
New York: W.H. Freeman and Company.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mathews, C.K., Holde, K. E. and Ahern, K. G. 2000. Electron transport, oxidative phosphorylation, and oxygen metabolism. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. pp. 522-557.  
An imprint of Addison Wesley Longman.
- Miller, G. L. 1959. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem. 31: 964-965.
- Murphy, M. P., and Smith, R. A. J. 2000. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 41: 235-250.
- Murphy, M. P., and Smith, R. A. J. 2007. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47: 629-656.
- Myers, D. K., and Slater, E. C. 1957. The enzyme hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondrial. Activities at difference pH value. Biochem. J. 67: 588-572.
- Nadanaciva, S., Bernal, A., Aggeler, R., Capaldi, R., and Will, Y. 2007. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. Toxicology in Vitro. 21: 902-911.
- Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M. O. 2004. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. Biochemical Pharmacology. 67: 1-15.
- Robillard, G. T., Konings, W. N. 1982. A hypothesis for the role of dithiol-disulfide interchange in solute transport and energy-transducing process. Eur. J. Biochem. 127: 597-604.
- Schapira, A. H. V. 2006. Mitochondrial disease. Lancet. 368: 70-82.
- Sittiwong, W. 2003. Insect Control Agents from Heartwood of *Xylia xylocarpa* Taub.  
Master's Thesis. Department of Chemistry, Graduate School, Chulalongkorn University.
- Smitinand, T. 2001. The Forest Herbarium, Royal Forest Department. Thai Plant Names.  
revised edition. Bangkok: TISTR Press.

- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol. Rev. 54: 101-127.
- Voet, D., and Voet, J. G. 1995. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 563-598. New York: John Wiley & Sons.
- Voet D., Voet, J. G., and Pratt C. W. 2006. Oxidative phosphorylation and electron transport. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 545-589. New York: John Wiley & Sons.
- Wallace, K. B., and Starkov, A. A. 2000. Mitochondria targets of drug toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 353-388.
- Weinbach, E. C. 1956. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 221: 609-618.
- Wikipedia, the free encyclopedia. 2008. Xylia xylocarpa [online]. Available from: <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Xylia> [2008, March 20]
- Zubay, G. 1993. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. pp 379-411. USA: Wm. C. Brown Communications.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n = 5)

ปริมาณของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration
Control	0.00	104.48 $\pm$ 10.42	0.00 $\pm$ 0.00
40	68.46	85.75 $\pm$ 3.58	17.93 $\pm$ 3.42
60	102.69	58.67 $\pm$ 4.66*	43.85 $\pm$ 4.46*
100	171.15	39.70 $\pm$ 4.12*	62.01 $\pm$ 3.94*
140	239.61	30.57 $\pm$ 4.95*	70.74 $\pm$ 4.74*
200	342.30	30.45 $\pm$ 0.40*	70.86 $\pm$ 0.38*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 7 ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ rotenone (ng)	ความเข้มข้นของ rotenone (nM)	อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration
Control	0.00	121.23 $\pm$ 7.43	0.00 $\pm$ 0.00
9.90	21.76	83.75 $\pm$ 12.84*	30.92 $\pm$ 10.59*
14.85	32.65	53.54 $\pm$ 9.59*	55.83 $\pm$ 7.91*
19.80	43.53	33.65 $\pm$ 3.77*	72.24 $\pm$ 3.11*
29.70	65.30	24.18 $\pm$ 2.51*	80.05 $\pm$ 2.07*
39.60	87.06	18.92 $\pm$ 1.05*	84.39 $\pm$ 0.87*
49.50	108.82	16.79 $\pm$ 0.62*	86.15 $\pm$ 0.51*
59.40	130.59	14.27 $\pm$ 0.35*	88.23 $\pm$ 0.29*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 8 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM, ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.70 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n = 5)

ปริมาณของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3 respiration (n atoms O/min/mg protein)
Control	0.00	143.11 $\pm$ 14.28
40	68.46	129.66 $\pm$ 11.84
60	102.69	120.78 $\pm$ 5.46
100	171.15	111.28 $\pm$ 3.63
140	239.61	105.20 $\pm$ 7.59
200	342.30	104.53 $\pm$ 14.79

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 9 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.16 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3u respiration
Control	0.00	151.33 $\pm$ 5.34	0.00 $\pm$ 0.00
40	68.46	93.22 $\pm$ 4.32*	38.40 $\pm$ 2.86*
60	102.69	64.98 $\pm$ 6.96*	57.06 $\pm$ 4.60*
100	171.15	43.20 $\pm$ 3.33*	71.45 $\pm$ 2.20*
140	239.61	33.90 $\pm$ 6.60*	77.60 $\pm$ 4.36*
200	342.30	30.02 $\pm$ 0.54*	80.17 $\pm$ 0.36*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ตารางที่ 10 ผลของ rotenone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนและร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.59 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร rotenone ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากการทดลอง (n=5)

ปริมาณของ rotenone (ng)	ความเข้มข้นของ rotenone (nM)	อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration
Control	0.00	215.24 $\pm$ 12.74	0.00 $\pm$ 0.00
9.90	21.76	126.86 $\pm$ 10.74*	41.06 $\pm$ 4.99*
14.85	32.65	80.03 $\pm$ 13.48*	62.82 $\pm$ 6.26*
19.80	43.53	45.91 $\pm$ 6.59*	78.67 $\pm$ 3.06*
29.70	65.30	27.71 $\pm$ 3.17*	87.13 $\pm$ 1.47*
39.60	87.06	20.12 $\pm$ 1.17*	90.65 $\pm$ 0.54*
49.50	108.82	16.85 $\pm$ 0.53*	92.17 $\pm$ 0.25*
59.40	130.59	14.02 $\pm$ 0.24*	93.49 $\pm$ 0.11*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 11 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u respiration เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.73 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจน state 3u respiration (n atoms O/min/mg protein)
Control	0.00	240.47 $\pm$ 14.75
40	68.46	234.43 $\pm$ 26.92
60	102.69	259.99 $\pm$ 15.62
100	171.15	244.23 $\pm$ 11.91
140	239.61	226.75 $\pm$ 13.76
200	342.30	246.25 $\pm$ 10.27

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 12 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ exogenous NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.62 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจน
Control	0.00	105.65 $\pm$ 11.88	0.00 $\pm$ 0.00
10	17.12	76.29 $\pm$ 1.03*	27.79 $\pm$ 0.98*
20	34.23	35.77 $\pm$ 1.45*	66.14 $\pm$ 1.37*
40	68.46	31.31 $\pm$ 1.38*	70.37 $\pm$ 1.30*
60	102.69	22.65 $\pm$ 1.66*	78.56 $\pm$ 1.57*
100	171.15	19.85 $\pm$ 0.64*	81.21 $\pm$ 0.61*
140	239.61	19.39 $\pm$ 0.18*	81.64 $\pm$ 0.17*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 13 ผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.96 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.932 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะไม่เติม BSA ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม BSA ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M)

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

การทดลอง	อัตราการใช้ออกซิเจน state 3 (n atoms O/min/mg protein)
Absolute ethanol	75.92 $\pm$ 5.65
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol (control)	27.15 $\pm$ 3.58*
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + BSA 5 mg	31.83 $\pm$ 1.03*
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + BSA 10 mg	45.19 $\pm$ 0.92* <sup>#</sup>
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + BSA 20 mg	61.43 $\pm$ 3.59 <sup>#</sup>

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

<sup>#</sup> p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 14 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 1.05 mM DTT 2  $\mu$ l, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.54 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.926 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะไม่เติม DTT ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M) ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติม DTT ก่อนเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ในขนาด 60  $\mu$ g (102.69  $\mu$ M)

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

การทดลอง	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)	
	state 3	state 3u
Absolute ethanol	122.63 $\pm$ 4.71	239.57 $\pm$ 8.96
Absolute ethanol + 1.05 mM DTT	123.35 $\pm$ 3.70	234.95 $\pm$ 3.58
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol (control)	66.83 $\pm$ 2.29*	109.04 $\pm$ 5.16*
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol + 1.05 mM DTT	70.98 $\pm$ 0.95*	116.79 $\pm$ 2.74*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 15 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ทั้งในกรณีที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose และส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.90 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

การทดลอง	ปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจาก ปฏิกิริยาการสลาย ATP ( $\mu$ moles/mg protein/10 min)
Control	4.20 $\pm$ 0.45
40 $\mu$ g (68.46 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	4.61 $\pm$ 0.51
60 $\mu$ g (102.69 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	5.04 $\pm$ 0.37
100 $\mu$ g (171.15 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	5.33 $\pm$ 0.17
140 $\mu$ g (239.61 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	5.74 $\pm$ 0.11
0.17 mM DNP	13.17 $\pm$ 0.83*
0.17 mM DNP + 100 $\mu$ g (171.15 $\mu$ M) 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol	14.48 $\pm$ 1.92*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 16 ผลของสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา: 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.33 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C โดยการทดลองในกลุ่มควบคุม (control) จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนในกลุ่มทดลองจะเติมสาร 8(14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l


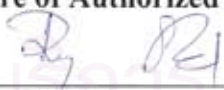
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง (n=5)

ปริมาณของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 8(14),15- isopimaradiene- 3 $\beta$ ,18-diol ( $\mu$ M)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)	ร้อยละของการ ยับยั้งอัตราการ ใช้ออกซิเจน
Control	0.00	236.88 $\pm$ 2.13	0.00 $\pm$ 0.00
40	68.46	162.40 $\pm$ 3.46*	31.44 $\pm$ 1.46*
60	102.69	132.57 $\pm$ 3.49*	44.04 $\pm$ 1.47*
100	171.15	74.30 $\pm$ 3.76*	68.63 $\pm$ 1.59*
140	239.61	44.62 $\pm$ 0.96*	81.16 $\pm$ 0.41*

\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



## Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

<b>Certificate of Project Approval</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Original <input type="checkbox"/> Renew
<b>Animal Use Protocol No. 08-33-003</b>	<b>Approval No. 08-33-003</b>
<b>Protocol Title</b> Effects of 8 (14),15-isopimaradiene-3 $\beta$ ,18-diol on the function of mitochondria isolated from rat liver	
<b>Principal Investigator</b> Mr. Withaya Janthasoot	
<b>Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)</b> This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.	
<b>Date of Approval</b> March 24, 2008	<b>Date of Expiration</b> March 24, 2009
<b>Applicant Faculty/Institution</b> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd., Pathumwan BKK-THAILAND. 10330	
<b>Signature of Chairperson</b> 	<b>Signature of Authorized Official</b> 
<b>Name and Title</b> <b>WITHAYA JANTHASOOT</b> Chairman	<b>Name and Title</b> <b>RUNGPETCH SAKULBUMRUNGSIL, Ph.D.</b> Associate Dean (Research and Academic Service)
<p><i>The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.</i></p> <p><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p>	



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกวิณธิดา จียาศักดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน 2523 ที่จังหวัดมุกดาหาร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2547 จากนั้นก็ได้เข้ารับราชการในตำแหน่งเภสัชกรที่โรงพยาบาลมุกดาหาร จังหวัดมุกดาหาร จนกระทั่ง ปัจจุบันและได้รับอนุมัติให้ลาศึกษาต่อในปีการศึกษา 2549 ในหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย