

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลของ CU-763-10-01 ที่มีต่อการหายใจ และ กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ของ ไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

1. ผลของ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรีย

1.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 22 แสดง oxygraph tracings ซึ่งได้จากการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ โดย polarographic oxygen electrode technique ดังรายละเอียด ที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ตัวเลขที่กำกับอยู่ที่ระยะต่างๆ ของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะ (state) ต่างๆ โดยคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

tracing 22 A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการ ทดลอง ในระยะแรกของ tracing 22A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียง ไมโตคอนเดรีย ใน incubation medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณมากเพียงพอที่ จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ระยะนี้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min ระยะนี้คือ state 4 respiration เมื่อมีการเติม ADP + Pi ลงไป จึงพบว่าอัตราการ ใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 200.21 n atoms O/ml/min เรียกระยะนี้ว่า state 3 respiration จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียจะลดลงเป็น 33.37 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเติม และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่า ไมโตคอน- เดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ

ไมโทคอนเดรีย และเรียกค่าที่แสดงถึงการควบคุมการหายใจนี้ว่า respiratory control index (RCI) และเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จาก อัตราการหายใจใน state 3 / อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้น RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองนี้จึง เท่ากับ $200.21/33.37 = 6.00$ และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจของไมโทคอนเดรียนี้เสียไป โดยที่ DNP สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้ว่า不会有 ADP อยู่ก็ตาม (ทำให้ไม่มีการสร้าง ATP) เรียกกระแสนี้ว่า state 3u respiration ซึ่งมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจน อย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จะเห็นได้จากอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียนี้จะเพิ่มขึ้นเป็น $294.75 \text{ n atoms O/ml/min}$ และการใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \cong 0$) ส่วนค่า $ADP/O = 256.32/83.42 = 3.07$ ซึ่งหมายถึง ไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล (วิธีคำนวณในบทที่ 2)

tracing 22 B, 22 C, 22 D แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสาร ในขนาด $5 \mu\text{g}$ ($8.24 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{g}$ ($41.22 \mu\text{M}$) และ $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) ก่อน 2 นาที จากนั้นเติม $ADP + P_i$ พบว่า CU-763-10-01 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลง เป็น 83.42 , 44.49 และ $33.37 \text{ n atoms O/ml/min}$ ตามลำดับ และเมื่อ เติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ลดลง เป็น 127.91 , 50.05 และ $33.37 \text{ n atoms O/ml/min}$ ตามลำดับ

รูปที่ 23 แสดง dose-response curve ของ CU-763-10-01 พบว่าในขนาด $5 \mu\text{g}$ ($8.24 \mu\text{M}$), $10 \mu\text{g}$ ($16.49 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{g}$ ($41.22 \mu\text{M}$), $35 \mu\text{g}$ ($57.72 \mu\text{M}$), $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$), $65 \mu\text{g}$ ($107.18 \mu\text{M}$), $75 \mu\text{g}$ ($123.68 \mu\text{M}$), $85 \mu\text{g}$ ($140.16 \mu\text{M}$) และ $100 \mu\text{g}$ ($165.00 \mu\text{M}$) ที่มีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และผลดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่ให้ (dose-dependent) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเรื่อยๆ และเริ่มคงที่ ที่ขนาดตั้งแต่ $65 \mu\text{g}$ (A) และเมื่อคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์ (% Respiration) เพื่อหาขนาดของ CU-763-10-01 ที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ (IC_{50}) ซึ่งจะเท่ากับ $4 \mu\text{g}$ ($6.60 \mu\text{M}$) (B)

1.2 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 24 เป็น oxygraph tracings แสดงผลของ CU-763-10-01 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

tracing 24 A แสดง control respiratory response โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ กล่าวคือ ใน state 4 respiration มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 77.86 n atoms O/ml/min ในระยะนี้จะเติม rotenone ขนาด 10 μg (เพื่อยับยั้งการส่งอิเล็กตรอนในลูกลูโซหายใจใน complex I) ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนยังคงเดิม จากนั้นเติม ADP + Pi (เข้าสู่ state 3 respiration) อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 311.43 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้จนหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 88.98 n atoms O/ml/min กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP ซึ่งจะเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เท่ากับ 322.55 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($\text{O}_2 \cong 0$) ส่วนค่า $\text{ADP/O} = 256.32/133.47 = 1.92$ ซึ่งหมายถึงไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 2 โมเลกุล

tracing 24 B, 24 C, 24 D แสดงผลของ CU-763-10-01 อัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสาร ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU-763-10-01 จะลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ 294.75, 266.94 และ 255.82 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และ เมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ไม่เปลี่ยนแปลง (5 μg) หรือ ลดลงเพียงเล็กน้อย คือ 322.55, 305.87 และ 294.75 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

รูปที่ 25 แสดง dose-response curve ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 10 μg (16.49 μM), 25 μg (41.22 μM), 35 μg (57.72 μM), 50 μg (82.45 μM), 65 μg (107.18 μM), 75 μg (123.68 μM), 85 μg (140.16 μM) และ 100 μg (165.00 μM) ซึ่งสารในขนาด 5, 10, 25, 35 และ 50 μg จะมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 น้อยมาก อย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ถ้าเพิ่มขนาดของสารให้สูงขึ้นคือ 65, 75, 85 และ 100 μg จะมีผล

ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนใน state 3u respiration สารในขนาด 5, 10, 25, 35, 50 และ 65 μg จะมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนน้อยมาก อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มขนาดสารเป็น 75, 85 และ 100 μg จะมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (A) และ เมื่อคำนวณเป็น เปอร์เซนต์การยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย (% Respiration) (B)

1.3 เมื่อใช้ α -ketoglutarate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 26 เป็น oxygraph tracings แสดงผลของ CU-763-10-01 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

tracing 26 A แสดง control respiratory response โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ กล่าวคือ ใน state 4 respiration มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min จากนั้นเติม ADP + Pi เข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 100.10 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้จนหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP ซึ่งจะเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 83.42 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($\text{O}_2 \cong 0$) ส่วนค่า $\text{ADP/O} = 256.32/83.42 = 3.07$ ซึ่งหมายถึง ไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 26 B, 26 C, 26 D แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสาร ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU-763-10-01 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลง เป็น 66.74, 38.93 และ 33.37 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ลดลง เป็น 72.30, 44.49 และ 33.37 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

รูปที่ 27 กราฟแสดงผล ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3 และ state 3u พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.4 เมื่อใช้ β -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 28 เป็น oxygraph tracings แสดงผลของ CU-763-10-01 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

tracing 28 A แสดง control respiratory response โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ กล่าวคือ ใน state 4 respiration มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min จากนั้นเติม ADP + Pi เข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 94.54 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้จนหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP ซึ่งจะเข้าสู่ state 3u respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 77.86 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($\text{O}_2 \cong 0$) ส่วนค่า $\text{ADP/O} = 256.32/83.42 = 3.07$ ซึ่งหมายถึง ไมโทคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 28 B, 28 C, 28 D แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 สามารถลดอัตราการหายใจ ใน state 3 และ state 3u respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสาร ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU-763-10-01 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลง เป็น 44.49, 33.37 และ 27.81 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ลดลง เป็น 61.17, 33.37 และ 27.81 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

รูปที่ 29 กราฟแสดงผล ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3 และ state 3u พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ผลของ CU-763-10-01 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria

รูปที่ 30 เป็น oxygraph tracings แสดงผลของ CU-763-10-01 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

tracing 30 A ในระยะที่ osmotic-shocked mitochondria อยู่ในช่วง preincubate จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ $27.81 \text{ n atoms O/ml/min}$ และเมื่อเติมยับยั้งสเตรท คือ NADH ลงไปเพื่อให้เกิด state 3u respiration ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น $111.23 \text{ n atoms O/ml/min}$ จนไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนหมด chamber

tracing 30 B osmotic-shocked mitochondria จะ preincubate กับ CU-763-10-01 ขนาด $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) จากนั้นเมื่อเติม NADH พบว่า CU-763-10-01 ในขนาดดังกล่าวมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ลดลง เป็น $38.93 \text{ n atoms O/ml/min}$

ตารางที่ 3 แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด $5 \mu\text{g}$ ($8.24 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{g}$ ($41.22 \mu\text{M}$) และ $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ผลของสารบางตัวหรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางประการใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น สับสเตรท

3.1 ผลของ rotenone

ตารางที่ 4 ผลที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุมนั้น อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เท่ากับ $121.30 \pm 4.27 \text{ n atoms O/min/mg protein}$ เมื่อเติม rotenone ขนาด 2.5 ng หรือ CU-763-10-01 ขนาด $5 \mu\text{g}$ ($8.24 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{g}$ ($41.22 \mu\text{M}$) และ $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 50.07 ± 4.83

หรือ 52.77 ± 3.02 , 29.63 ± 2.54 และ 21.04 ± 3.51 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และถ้า preincubate ไมโตคอนเดรียกับ rotenone ขนาด 2.5 ng จากนั้นเติม CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นเป็น 31.96 ± 4.47 , 21.96 ± 1.09 และ 17.38 ± 1.23 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนผลที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3u กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุมนั้น อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เท่ากับ 127.45 ± 2.56 n atoms O/min/mg protein เมื่อเติม rotenone ขนาด 2.5 ng หรือ CU-763-10-01 ขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 62.93 ± 6.94 หรือ 67.23 ± 2.22 , 32.88 ± 3.02 และ 19.66 ± 3.67 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และถ้า preincubate ไมโตคอนเดรียกับ rotenone ขนาด 2.5 ng จากนั้นเติม CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นเป็น 33.99 ± 7.21 , 20.03 ± 0.87 และ 14.62 ± 1.39 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6

ตารางที่ 5 ผลที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุม อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เท่ากับ 113.00 ± 4.13 n atoms O/min/mg protein เมื่อเติมสารลงในสภาวะที่ incubation medium มี pH ที่ต่างกันคือ 7.2 (control), 6.8 และ 7.6 ตามลำดับ ผลคือ เมื่อเติมสารขนาด 5 μg (8.24 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 48.11 ± 1.08 , 37.00 ± 1.76 และ 41.41 ± 2.63 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเติมสารขนาด 25 μg (41.22 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 30.22 ± 1.55 , 25.10 ± 2.33 และ 26.35 ± 1.76 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ และ เมื่อเติมสารขนาด 50 μg (82.45 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 22.20 ± 1.94 , 18.81 ± 1.29 และ 19.63 ± 1.20 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ จะเห็นว่าในสภาวะที่เป็นกรดมากขึ้น (pH 6.8) จะมีผลทำให้ CU-763-10-01 ขนาด 5 μg (8.24 μM) และ 25 μg (41.22 μM) สามารถลดอัตราการใช้

ออกซิเจนใน state 3 มากกว่าที่ pH 7.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนผลดังกล่าว เมื่อสารมีขนาด 50 μg (82.45 μM) นั้นพบว่า ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนในสภาวะที่เป็นต่างมากขึ้น (pH 7.6) ผลของ CU-763-10-01 ขนาด 5 μg (8.24 μM) จะลดอัตราการใช้ออกซิเจน มากกว่า pH 7.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนผลดังกล่าวเมื่อสารมีขนาด 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) นั้น ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนผลที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3u กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุม อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เท่ากับ 124.10 ± 5.05 n atoms O/min/mg protein เมื่อเติมสารลงไป ในสภาวะที่ incubation medium มี pH ที่ต่างกันคือ 7.2 (control), 6.8 และ 7.6 ตามลำดับ ผลคือ เมื่อเติมสารขนาด 5 μg (8.24 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 68.13 ± 4.79 , 38.49 ± 2.89 และ 61.31 ± 4.99 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเติมสารขนาด 25 μg (41.22 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 35.46 ± 3.66 , 23.22 ± 2.99 และ 29.91 ± 1.24 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ และ เมื่อเติมสารขนาด 50 μg (82.45 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 22.20 ± 1.94 , 16.95 ± 1.19 และ 18.81 ± 1.29 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ จะเห็นว่าในสภาวะที่เป็นกรดมากขึ้น (pH 6.8) จะมีผลทำให้ CU-763-10-01 ทั้ง 3 ขนาด ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u มากกว่าที่ pH 7.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้น (pH 7.6) ผลของ CU-763-10-01 ทั้ง 3 ขนาด ต่อการลดอัตราการใช้ออกซิเจน เมื่อเทียบกับ pH 7.2 นั้น แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

3.3 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

การศึกษารูปผลของ BSA ในขนาดต่างๆ กัน คือ 5, 10 และ 20 mg ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ตามรูปที่ 31 ในกลุ่มควบคุมอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เท่ากับ 110.59 ± 4.73 n atoms O/min/mg protein เมื่อให้ BSA ขนาด 20 mg อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เป็น 114.83 ± 4.91 n atoms O/min/mg protein แสดงว่า BSA ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ ADP หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ BSA ไม่มีผลกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ไม่จับกับ ADP + Pi และ สับสเตรทที่ใช้คือ glutamate + malate เมื่อเติม CU-763-10-01 ขนาด 5 μg (8.24 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 จะลดลงเป็น 53.50 ± 2.77 n atoms O/min/mg protein และ เมื่อให้ BSA ขนาด 5, 10 และ 20 mg ก่อน

เติม CU-763-10-01 ขนาด 5 μg (8.24 μM) พบว่า BSA ขนาดต่างๆ สามารถลดฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้ง state 3 respiration ลดลง เป็น 64.34 ± 3.10 , 73.16 ± 3.35 และ 82.02 ± 4.67 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.4 ผลของ dithiothreitol (DTT)

รูปที่ 32 เป็น oxygraph tracings แสดงผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการลดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

tracing 32 A แสดง control respiratory response ขณะที่อยู่ใน state 4 respiration มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min เมื่อเติม ADP + Pi อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 นี้จะเพิ่มขึ้นเป็น 200.21 n atoms O/ml/min และ เมื่อ ADP ถูกใช้จนหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min และเข้าสู่ state 4 อีกครั้ง และเมื่อเติม DNP อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u จะเพิ่มขึ้นเป็น 294.75 n atoms O/ml/min

tracing 32 B เมื่อเติม 1.04 mM DTT อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min เมื่อเติม ADP + Pi อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เพิ่มขึ้นเป็น 200.21 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้จนหมดอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเท่ากับ 33.37 n atoms O/ml/min คือกลับเข้าสู่ state 4 และเมื่อเติม DNP อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u จะเพิ่มขึ้นเป็น 289.19 n atoms O/ml/min จะเห็นว่า DTT ไม่มีผลต่อ ADP และ DNP ที่เติมลงไป

tracing 32 C แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ในขนาด 50 μg (82.45 μM) สามารถลดอัตราการหายใจ ใน state 3 และ state 3u เป็น 33.37 และ 33.37 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

tracing 32 D เมื่อเติม 1.04 mM DTT ก่อนเติม CU-763-10-01 ในขนาด 50 μg (82.45 μM) พบว่าอัตราการหายใจ ใน state 3 และ state 3u เท่ากับ 33.37 และ 33.37 n atoms O/ml/min ตามลำดับ แสดงว่า 1.04 mM DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย

รูปที่ 33 กราฟแสดงผล 1.04 mM DTT ต่อ CU-763-10-01 ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย พบว่าเมื่อเติม 1.04 mM DTT ก่อน แล้วจึงเติม CU 763 10 01 ขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) อัตราการหายใจใน state 3 และ state 3u จะมีความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ 1.04 mM DTT อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) หรือกล่าวคือ DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียนั่นเอง

4. ผลของ CU-763-10-01 ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อให้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม โดยปกติ ไมโทคอนเดรียจะนำพลังงานที่ได้จากการส่งต่ออิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ มาใช้ในการสะสม แคลเซียม ดังนั้นเมื่อไมโทคอนเดรียใน incubation medium มีสับสเตรทในปริมาณที่มากพอ และเมื่อเติม 0.42 mM CaCl_2 ลงในปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะเพิ่มขึ้นสูง เมื่อการสะสมแคลเซียมเป็นปริมาณที่เพียงพอแล้วอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลง ตามรูปที่ 34 ในกลุ่มควบคุมเมื่อได้รับแคลเซียม อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 105.96 ± 5.74 n atoms O/min/mg protein ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารในขนาดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ก่อนแล้วจึงเติม แคลเซียม พบว่าสารจะมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเป็น 48.50 ± 2.63 , 29.16 ± 1.09 และ 22.76 ± 0.88 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

5. ผลของ CU-763-10-01 ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

ผลของ CU-763-10-01 ต่อ ATPase activity โดยวัดปริมาณ P_i ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (ตามวิธีการในบทที่ 2) ตามตารางที่ 6 แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg (8.24 μM), 25 μg (41.22 μM) และ 50 μg (82.45 μM) ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนู พบว่ามีปริมาณของ P_i เป็น 0.44 ± 0.04 , 0.43 ± 0.05 และ 0.43 ± 0.04 $\mu\text{mole}/10$ min/mg protein ตามลำดับ ส่วนไมโทคอนเดรียในสภาวะปกติจะมี

ATPase activity ในการสลาย ATP มีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.04 $\mu\text{mole}/10 \text{ min}/\text{mg}$ protein ผลดังกล่าวแสดงว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อกระตุ้น ATPase activity ด้วย 0.10 mM DNP วัดการสลายของ ATP จากปริมาณ P_i มีค่าเท่ากับ 2.45 ± 0.06 $\mu\text{mole}/10 \text{ min}/\text{mg}$ protein เมื่อเติม oligomycin ขนาด $10 \mu\text{g}$ ปริมาณ P_i มีค่า 0.50 ± 0.04 $\mu\text{mole}/10 \text{ min}/\text{mg}$ protein และเมื่อให้ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นพบว่าปริมาณ P_i ที่เกิดขึ้น เท่ากับ 2.44 ± 0.06 , 2.43 ± 0.04 และ 2.43 ± 0.02 $\mu\text{mole}/10 \text{ min}/\text{mg}$ protein ตามลำดับ ผลดังกล่าวมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

6. ผลของ CU-763-10-01 ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

รูปที่ 35 tracing 35 A แสดงการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย (ก่อนเติมสับสเตรททุกกลุ่มจะได้รับ rotenone ขนาด $10 \mu\text{g}$ เพื่อยับยั้งการ ออกซิไดซ์จาก endogenous substrate) กลุ่มควบคุม เมื่อเติม 0.10 mM tyramine ไมโทคอนเดรียจะมีอัตราการใช้ออกซิเจน เท่ากับ $44.49 \text{ n atoms O}/\text{ml}/\text{min}$ เมื่อเติม 0.05 mM pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase incubate ก่อนเติม tyramine จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม tyramine มีค่าเป็น $16.68 \text{ n atoms O}/\text{ml}/\text{min}$ (tracing 35 B) และ เมื่อเติม CU-763-10-01 ในขนาด $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) incubate ก่อนเติม tyramine อัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม tyramine มีค่าเป็น $16.68 \text{ n atoms O}/\text{ml}/\text{min}$ (tracing 35 C)

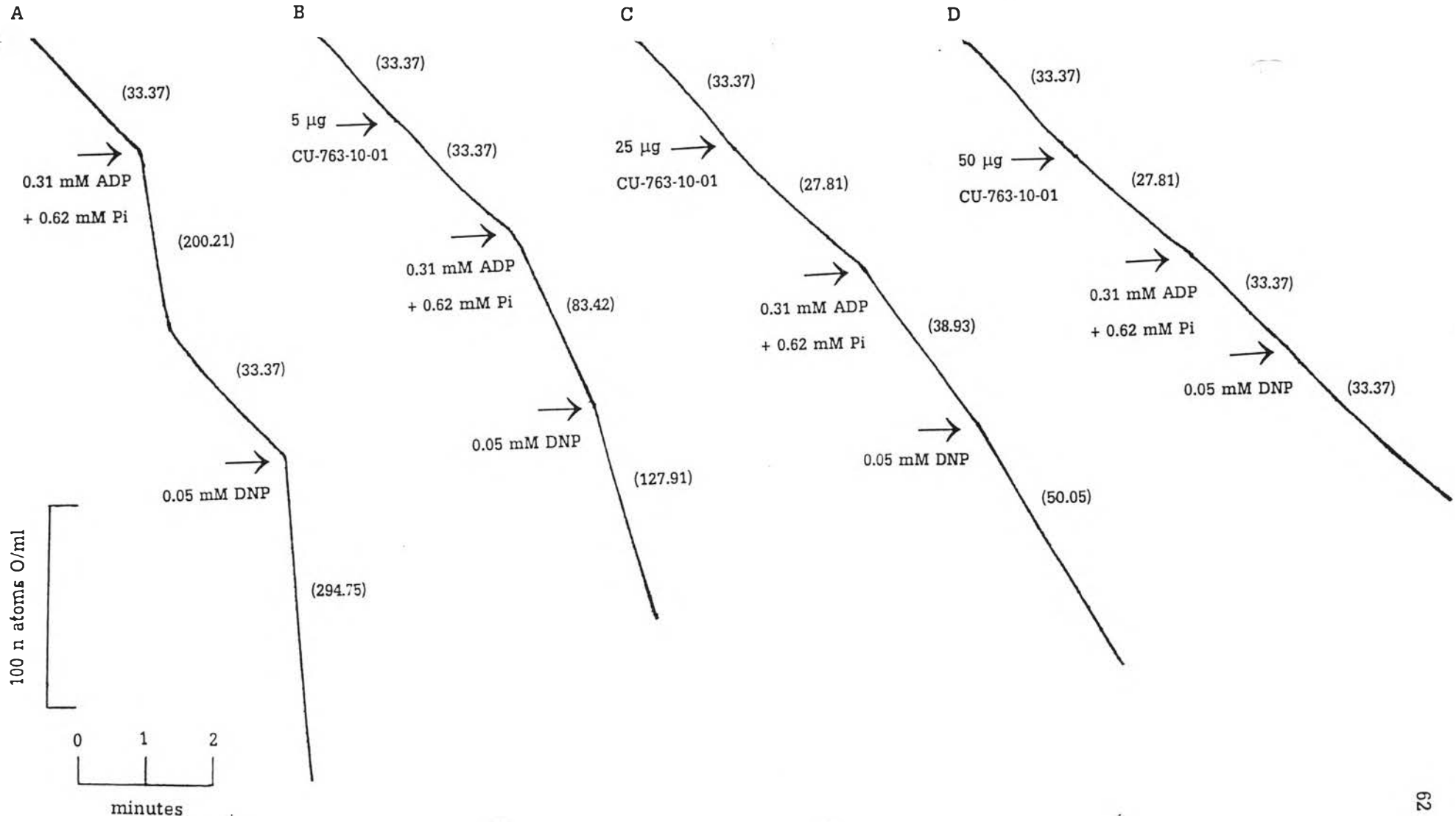
ตารางที่ 7 แสดงผลของ pargyline และ CU-763-10-01 ในขนาด $5 \mu\text{g}$ ($8.24 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{g}$ ($41.22 \mu\text{M}$) และ $50 \mu\text{g}$ ($82.45 \mu\text{M}$) ต่อการออกซิไดซ์ tyramine พบว่า ทั้ง pargyline และ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังกล่าว จะสามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนที่เกิดจาก tyramine หรือ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

รูปที่ 22 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate/malate เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาด 5, 25 และ 50 μg ไมโทคอนเดรีย 1.95 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



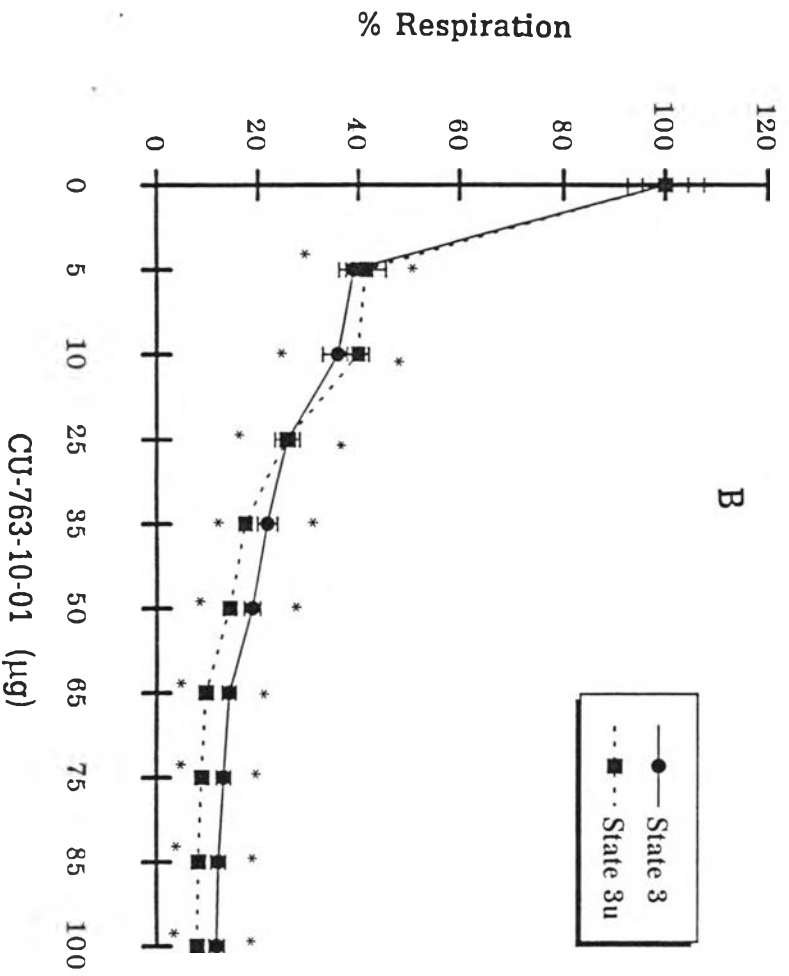
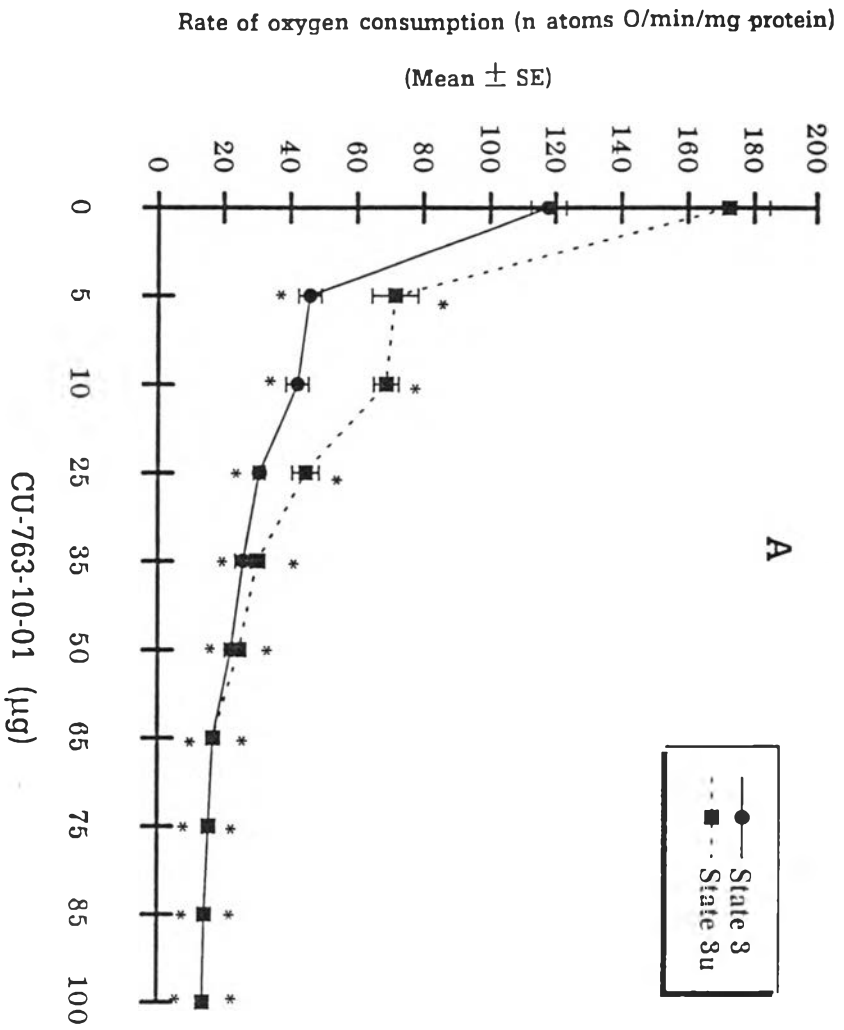
รูปที่ 23 Dose-response curve ของ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นให้สเตรท (A) และ เมื่อคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์ (% Respiration) (B)

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในรูป ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.30 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดง แทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

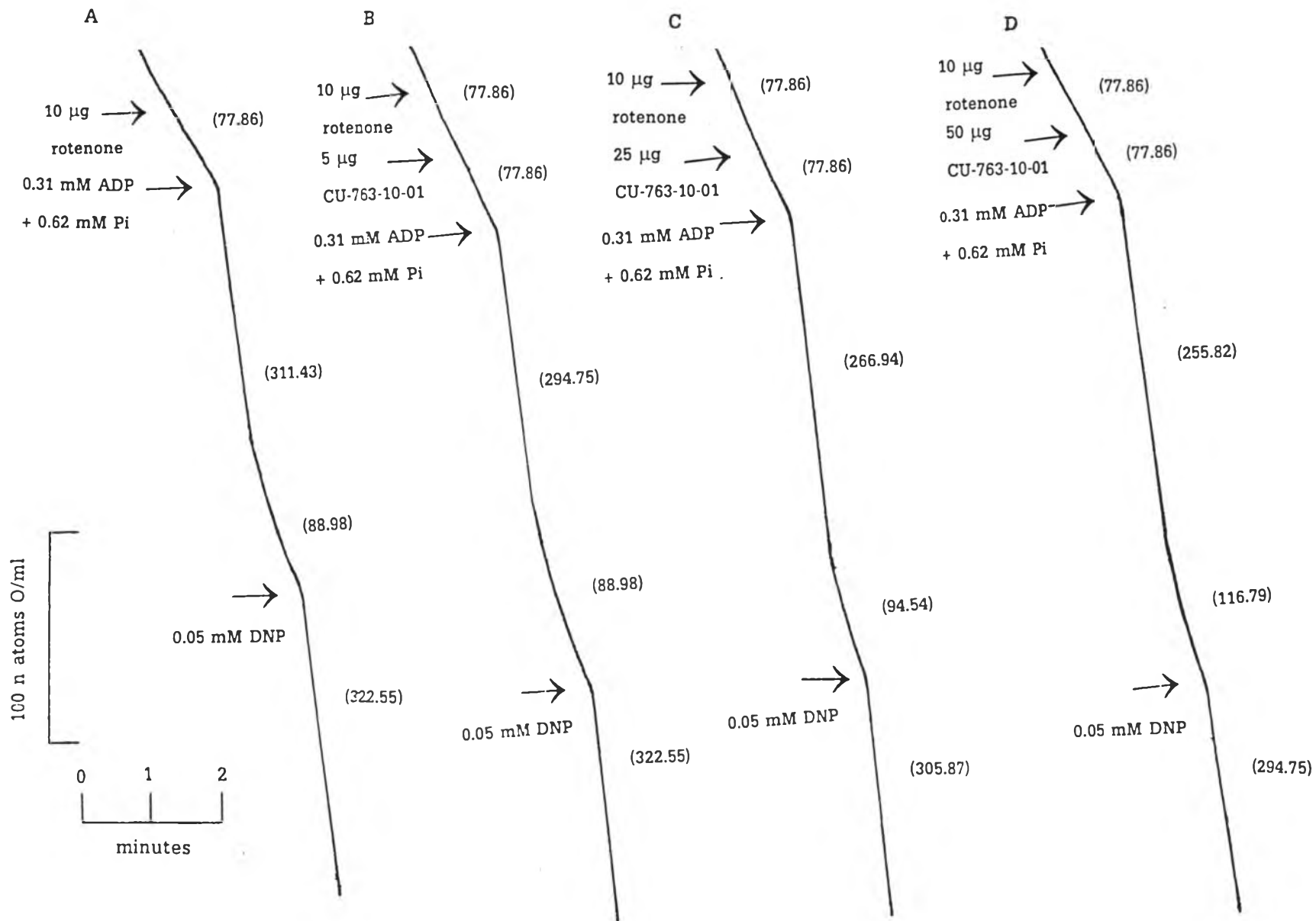
n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 24 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, rotenone ขนาด 10 μg และ CU-763-10-01 ขนาด 5, 25 และ 50 μg ไมโทคอนเดรีย 2.10 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

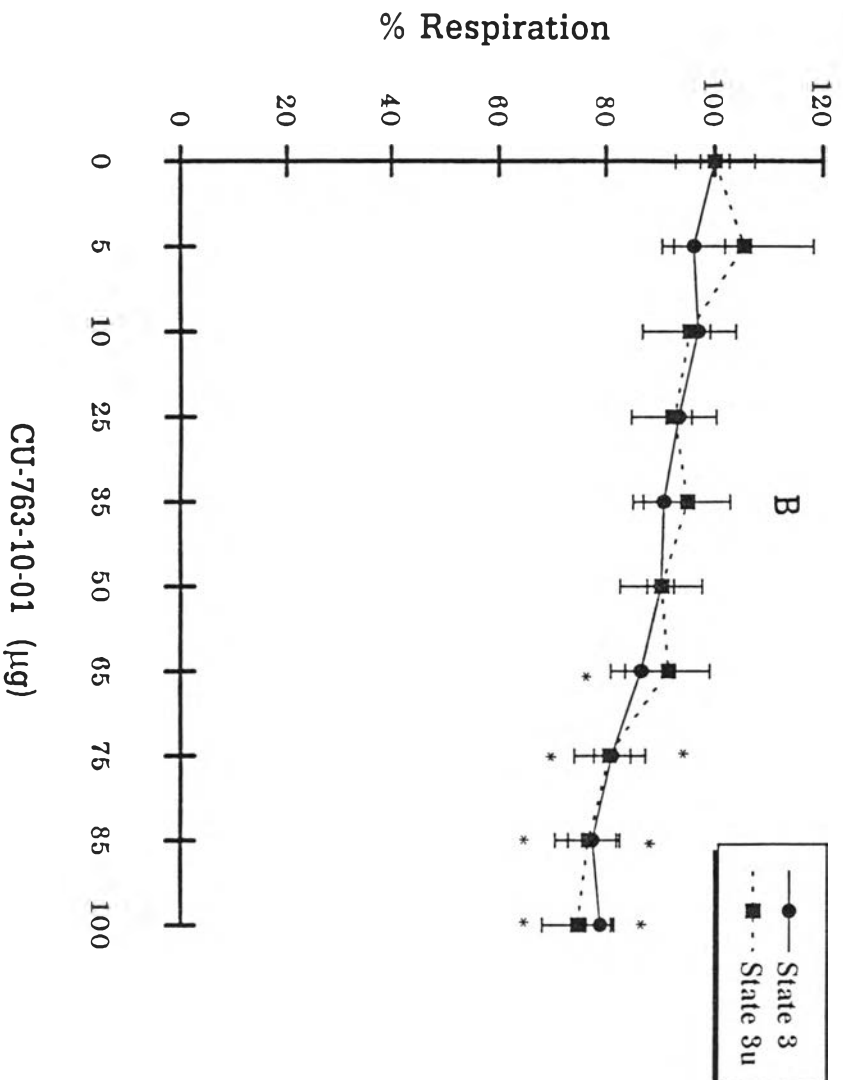
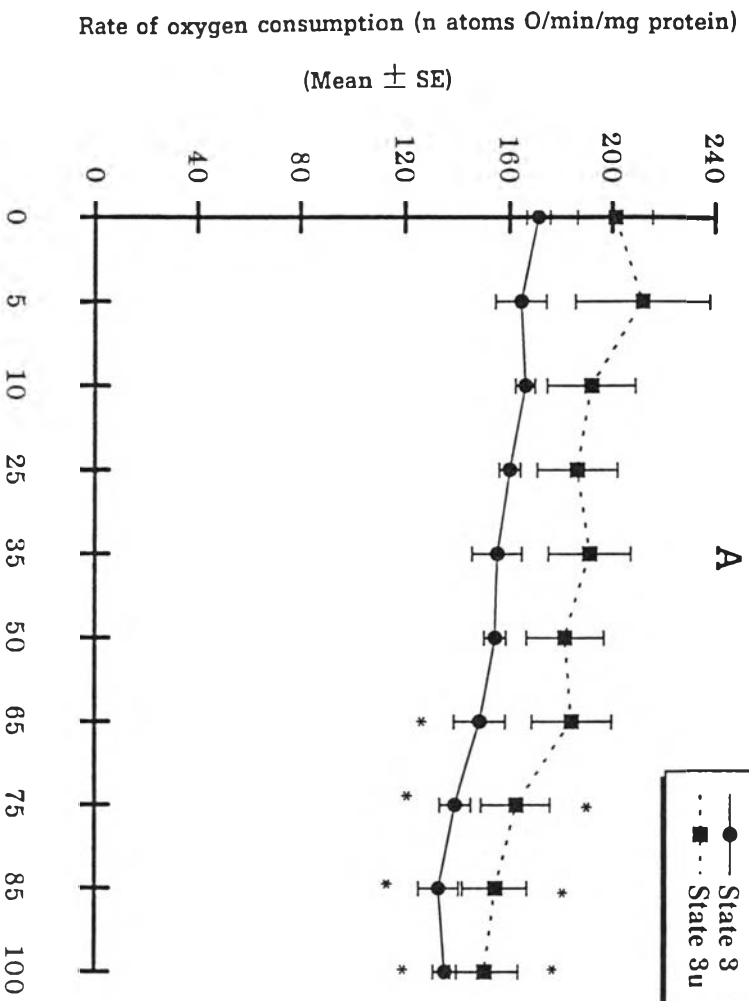


รูปที่ 25 Dose-response curve ของ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (A) และ เมื่อคำนวณเป็น เปอร์เซนต์ (% Respiration) (B)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, rotenone ขนาด 10 µg และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.96 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 4 การทดลอง

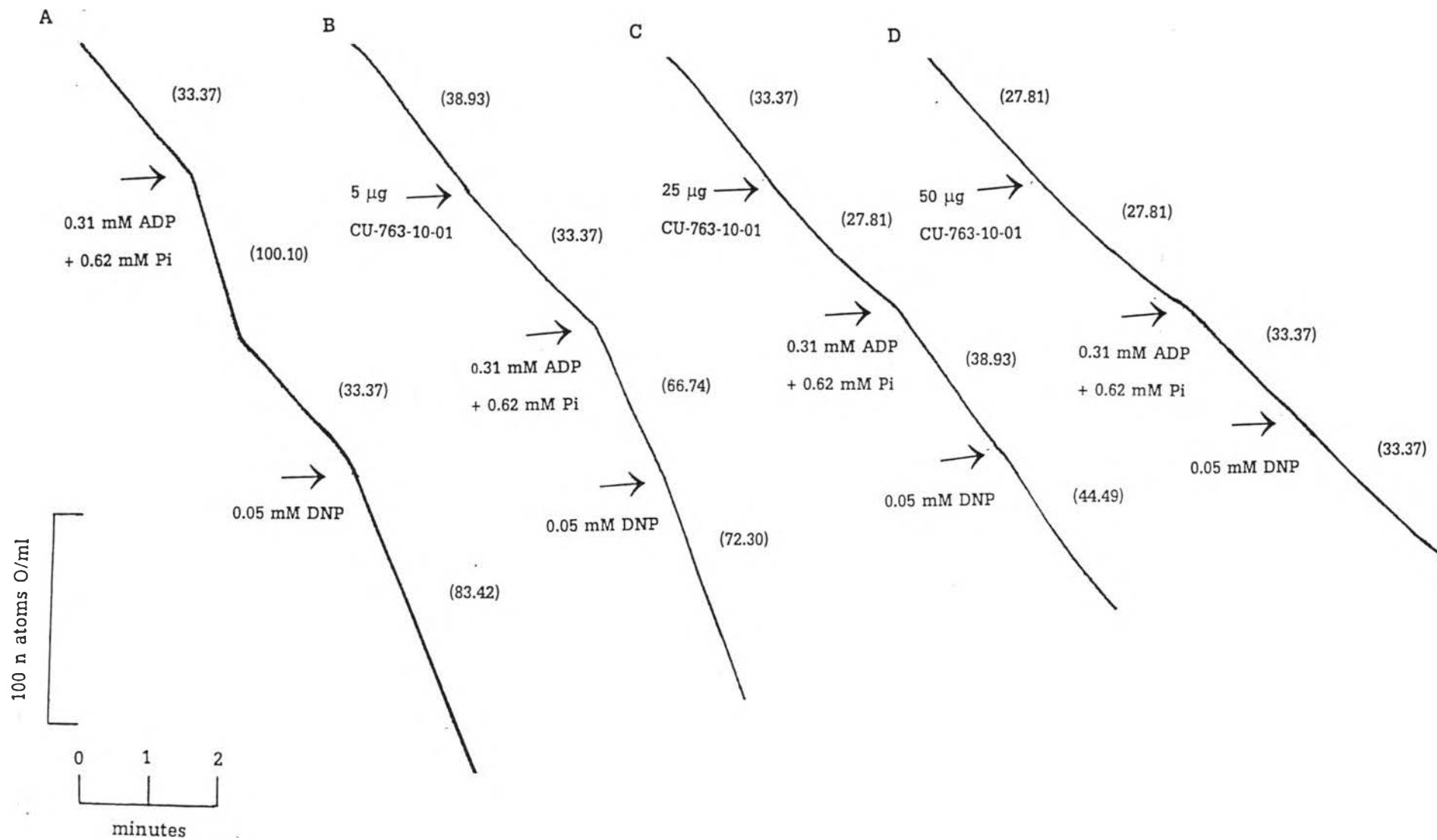
n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 26 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ α -ketoglutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM α -ketoglutarate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาด 5, 25 และ 50 μg ไมโทคอนเดรีย 1.95 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



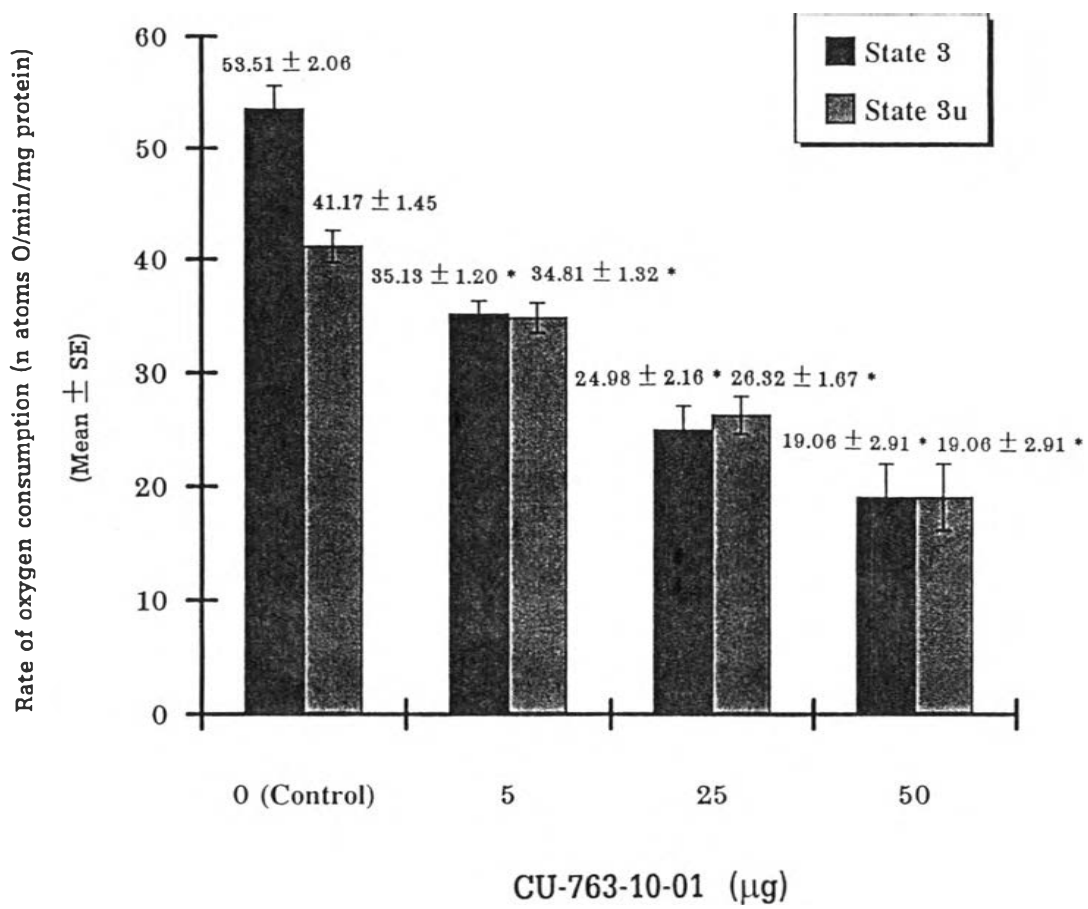
รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ α -ketoglutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM α -ketoglutarate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในรูป ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

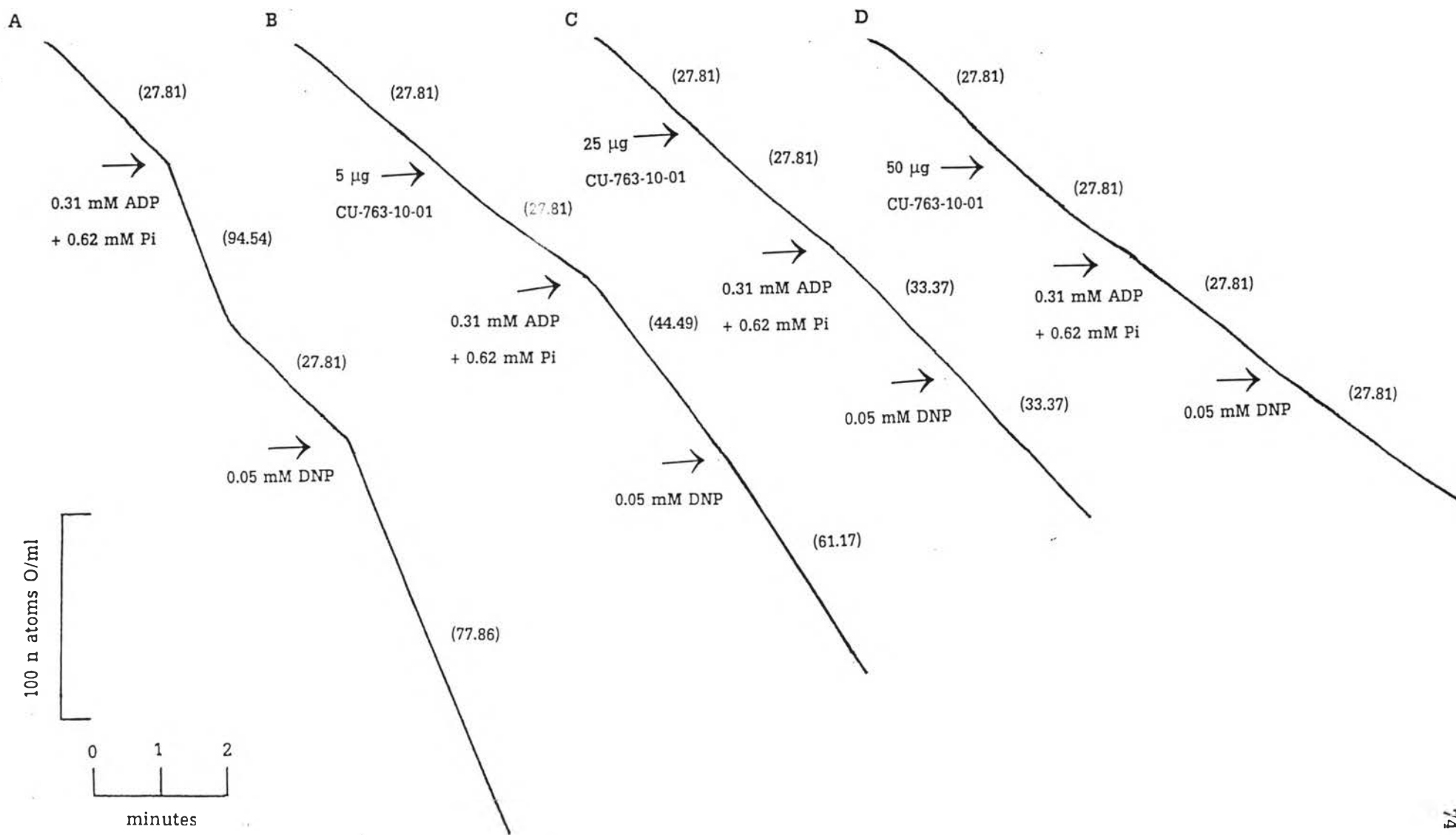
n = 4 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 28 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ β -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM β -hydroxybutyrate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาด 5, 25 และ 50 μg ไมโทคอนเดรีย 1.95 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

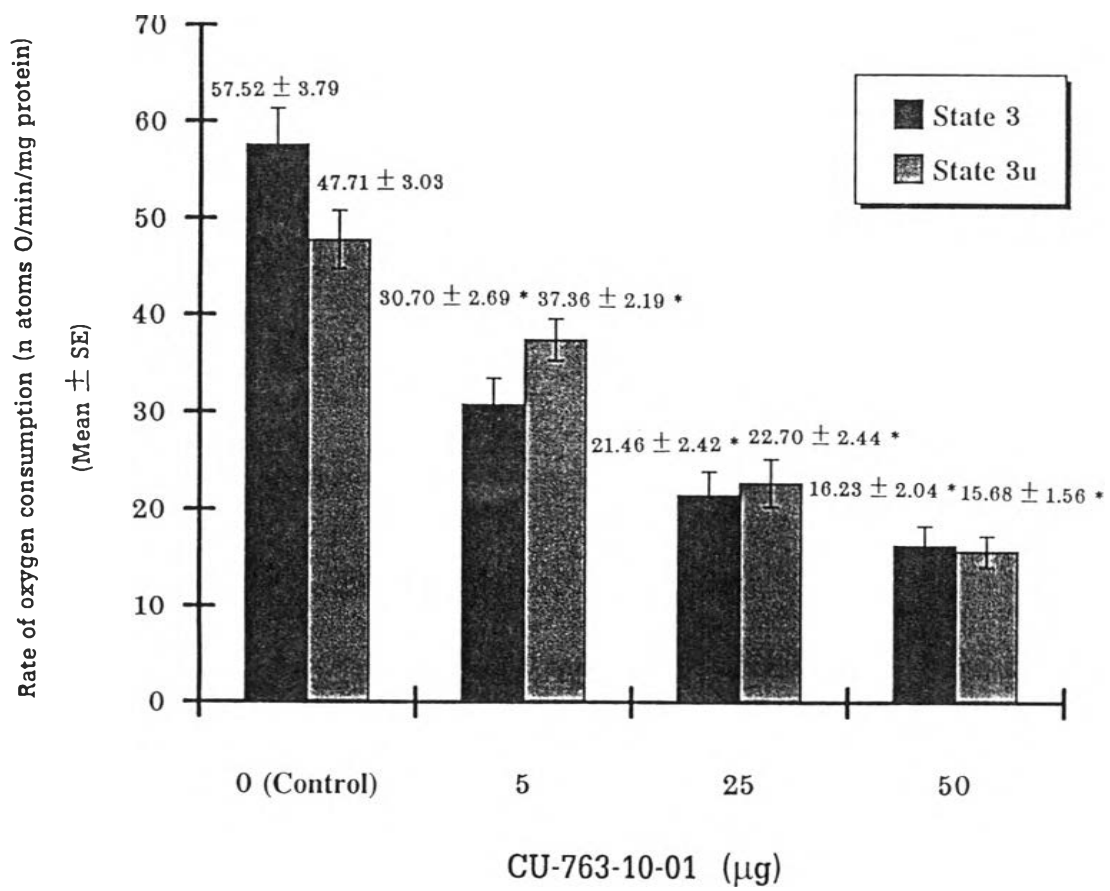


รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ β -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM β -hydroxybutyrate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในรูป ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.03 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย
จาก 4 การทดลอง

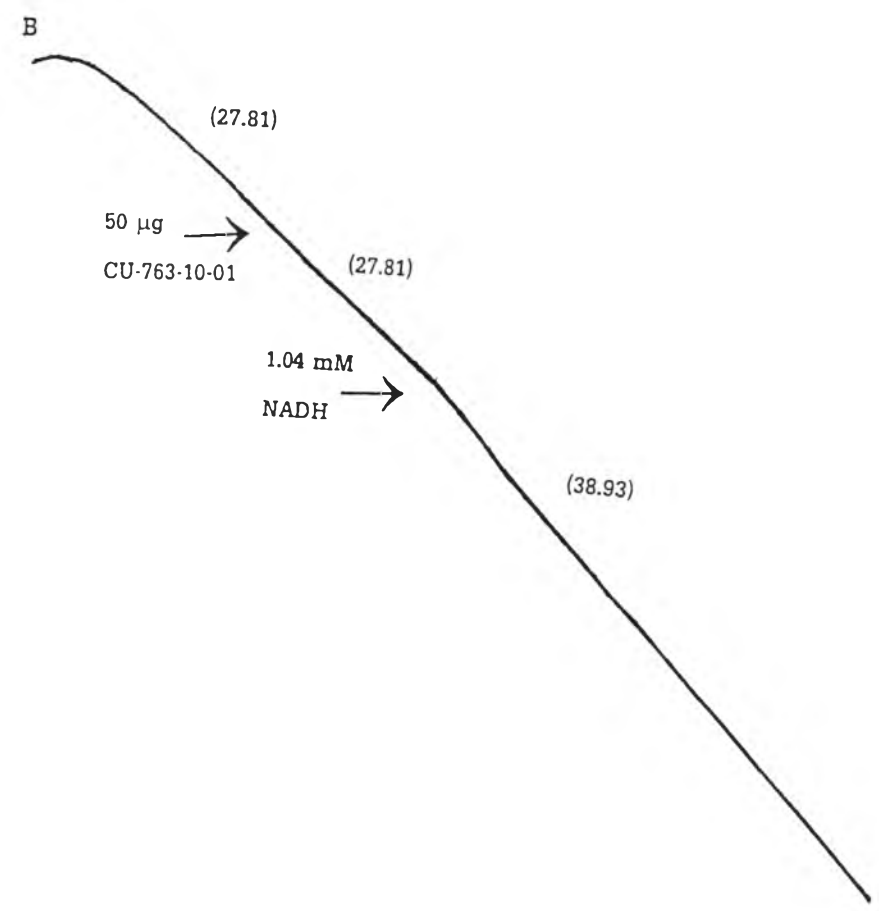
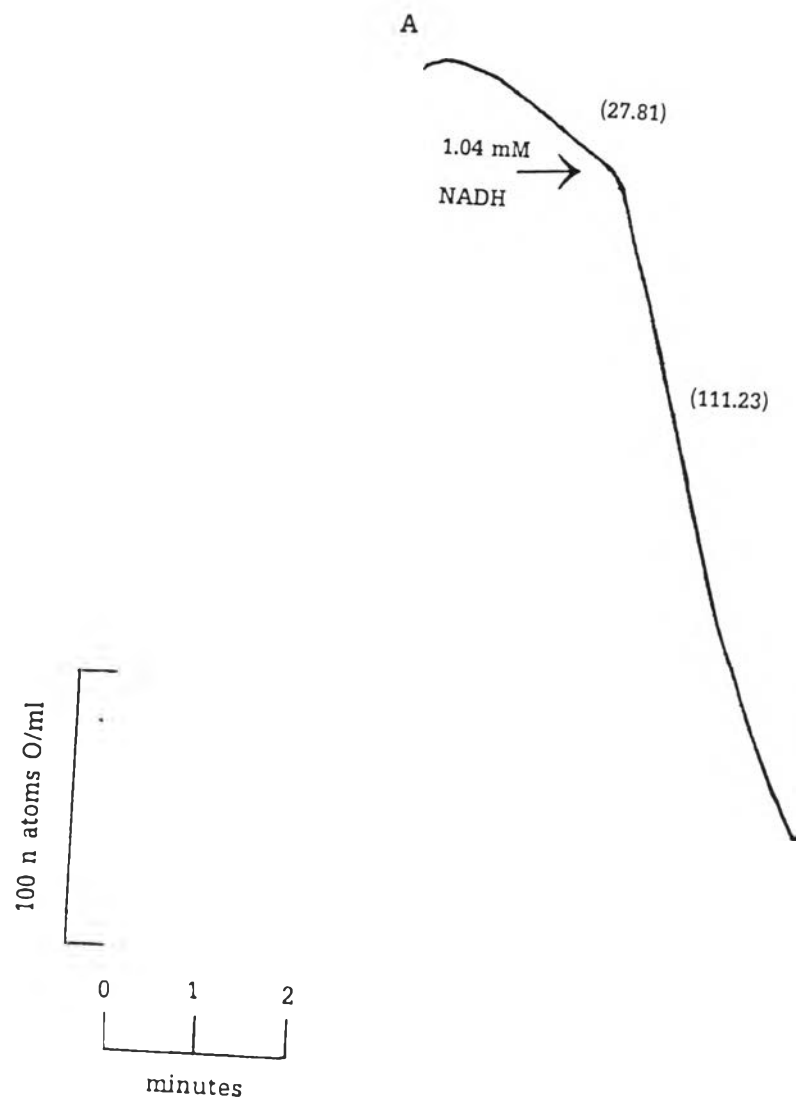
n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 30 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 50 μg ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นตัวสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 27.66 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และ CU-763-10-01 ขนาด 50 μg ไมโทคอนเดรีย 2.70 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



ตารางที่ 3 ผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)
Control	38.07 ± 1.77
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)	26.40 ± 2.56 *
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)	23.13 ± 2.16 *
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)	18.92 ± 1.71 *

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 27.66 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตาราง ไมโทคอนเดรีย 2.96 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

n = 4 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 4 ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของ rotenone และ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3u
Control	121.30 ± 4.27	127.45 ± 2.56
2.5 ng rotenone	$50.07 \pm 4.83^*$	$62.93 \pm 6.94^*$
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)	$52.77 \pm 3.02^*$	$67.23 \pm 2.22^*$
5 μg CU-763-10-01 + 2.5 ng rotenone	$31.96 \pm 4.47^*$	$33.99 \pm 7.21^*$
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)	$29.63 \pm 2.54^*$	$32.88 \pm 3.02^*$
25 μg CU-763-10-01 + 2.5 ng rotenone	$21.96 \pm 1.09^*$	$20.03 \pm 0.87^*$
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)	$21.04 \pm 3.51^*$	$19.66 \pm 3.67^*$
50 μg CU-763-10-01 + 2.5 ng rotenone	$17.38 \pm 1.23^*$	$14.62 \pm 1.39^*$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, rotenone ขนาด 2.5 ng และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในตาราง ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.18 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ตารางที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3u
Control (pH 7.2)	113.00 \pm 4.13	124.10 \pm 5.05
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)		
pH 7.2 (control)	48.11 \pm 1.08	68.13 \pm 4.79
pH 6.8	37.00 \pm 1.76*	38.49 \pm 2.89*
pH 7.6	41.41 \pm 2.63*	61.31 \pm 4.99
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)		
pH 7.2 (control)	30.22 \pm 1.55	35.46 \pm 3.66
pH 6.8	25.10 \pm 2.33*	23.22 \pm 2.99*
pH 7.6	26.35 \pm 1.76	29.91 \pm 1.24
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)		
pH 7.2 (control)	22.20 \pm 1.94	22.20 \pm 1.94
pH 6.8	18.81 \pm 1.29	16.95 \pm 1.19*
pH 7.6	19.63 \pm 1.20	18.81 \pm 1.29

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl (pH 6.8, 7.2, 7.6) 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปดังแสดงไว้ในตาราง ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.05 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย
จาก 4 การทดลอง

n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control

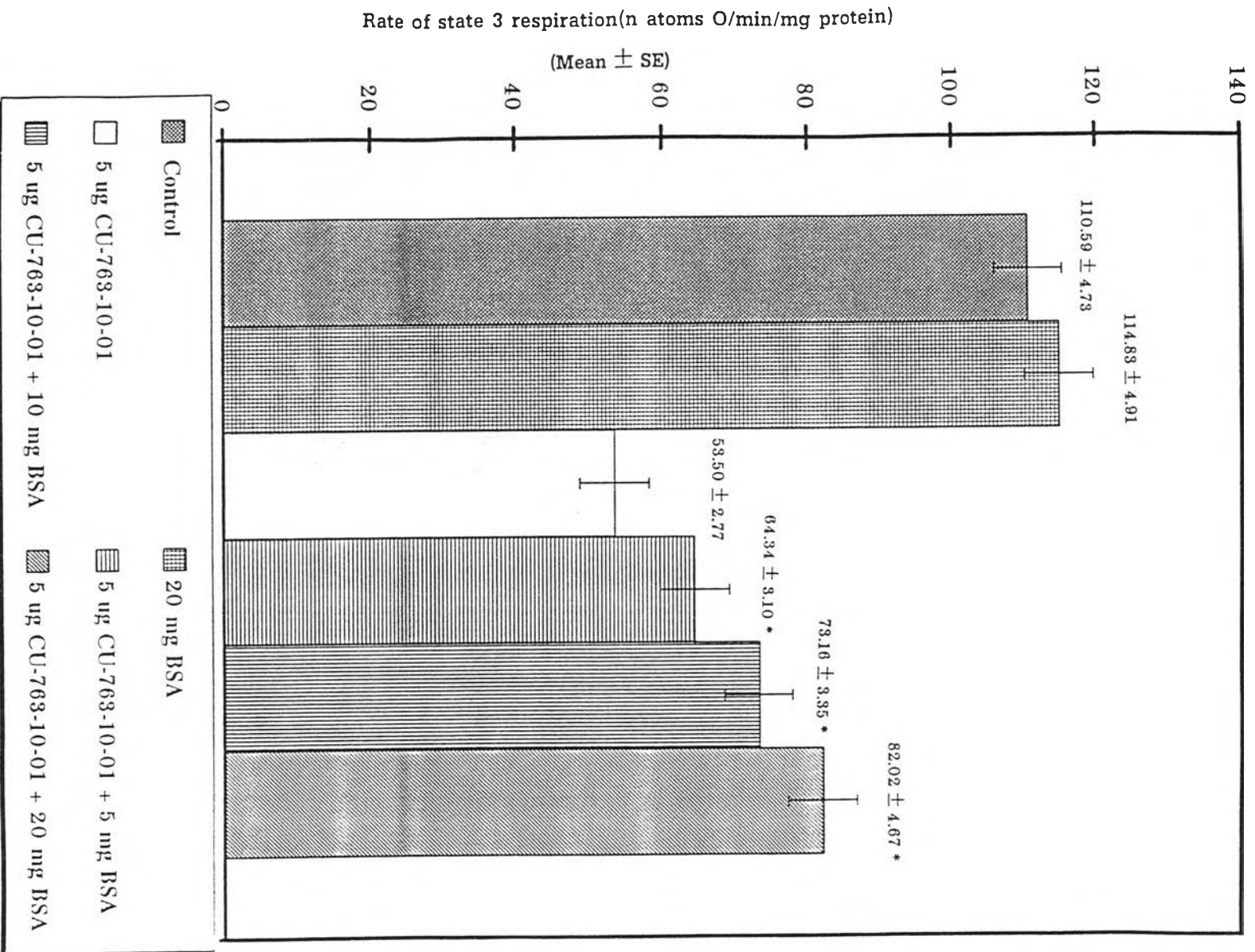
รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5 μg ในการยับยั้ง state 3 respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, BSA 5, 10 และ 20 mg และ CU-763-10-01 ขนาด 5 μg ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.31 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

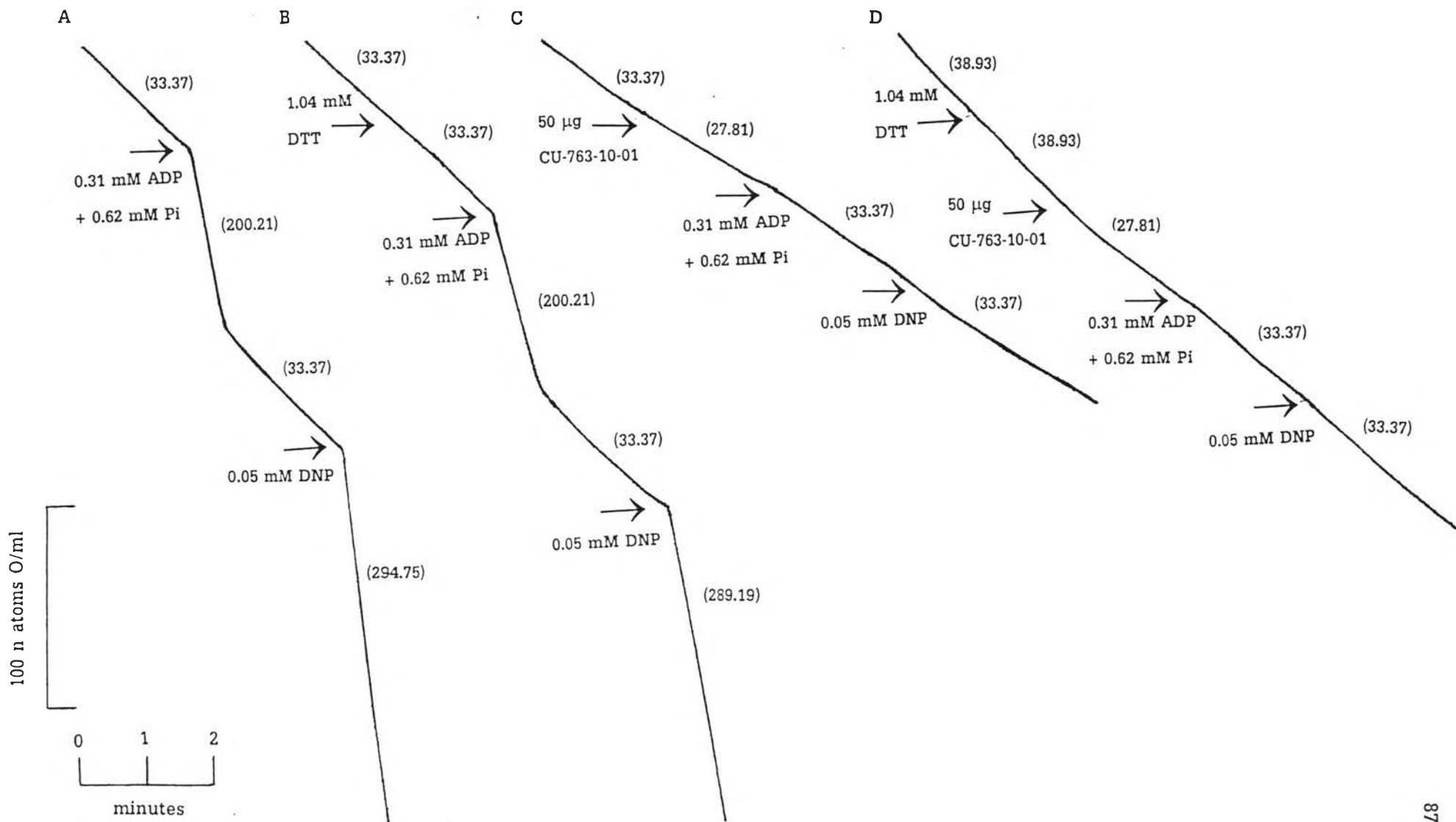
n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



รูปที่ 32 Tracing แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในขนาด 50 μg ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 1.05 mM DTT และ CU-763-10-01 ขนาด 50 μg ไมโทคอนเดรีย 1.95 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



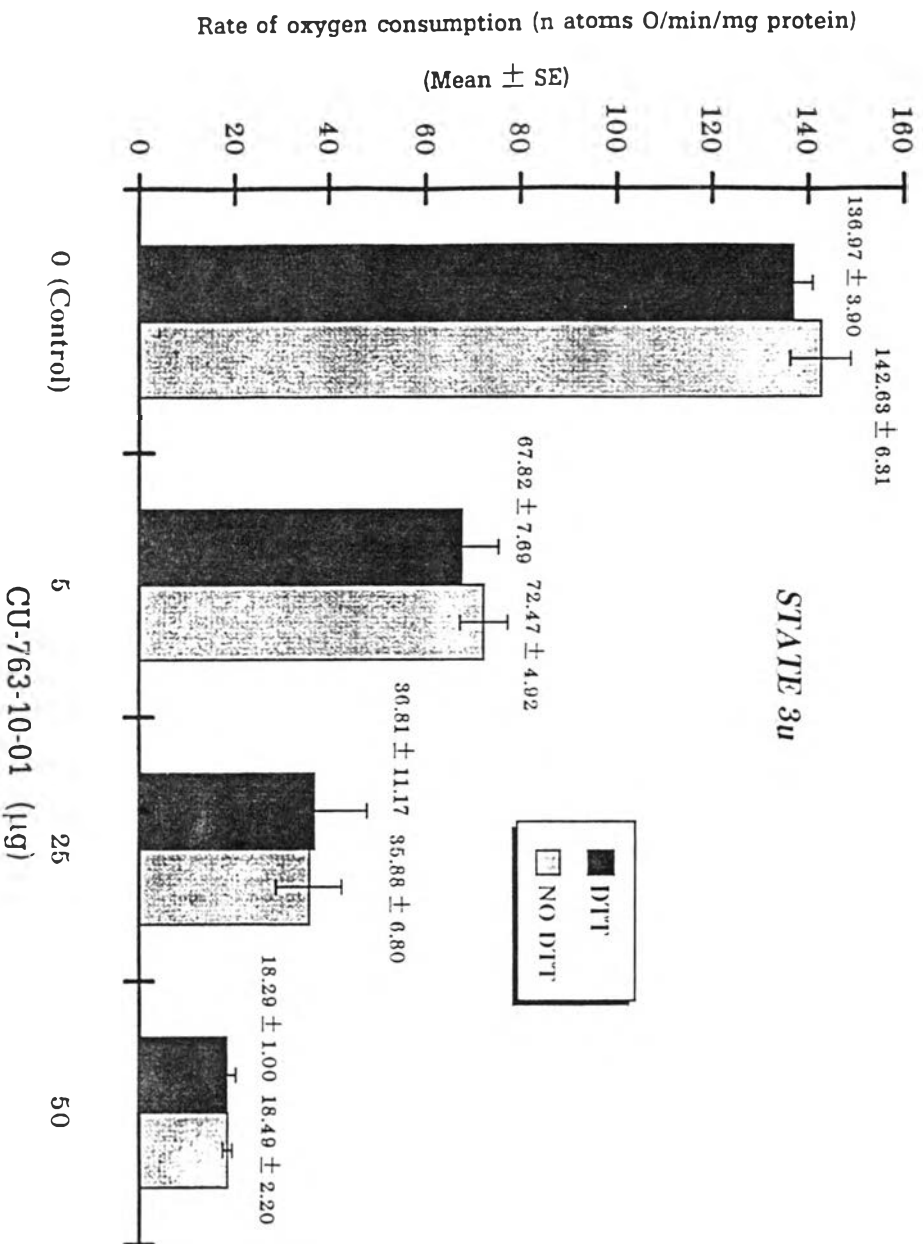
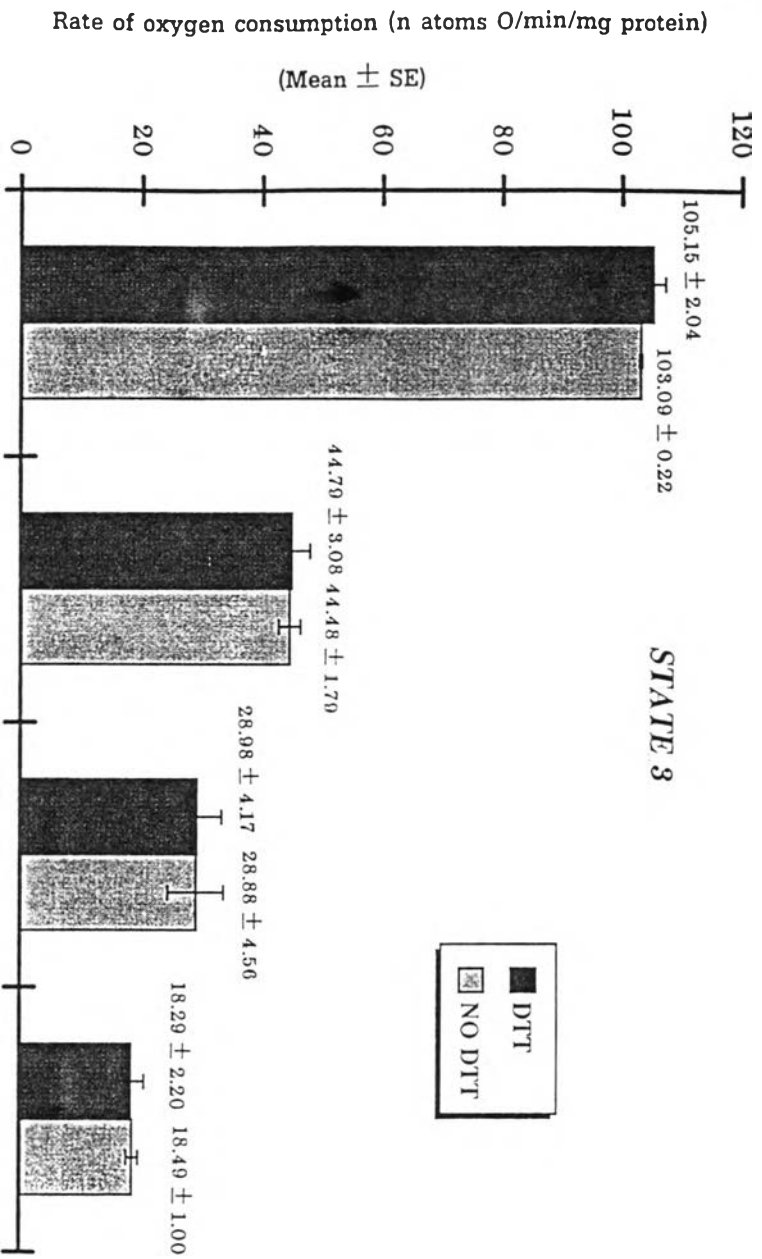
รูปที่ 33 กราฟแสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 1.05 mM DTT และ CU 763 10 01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในรูป ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.73 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

n = 4 * p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ control



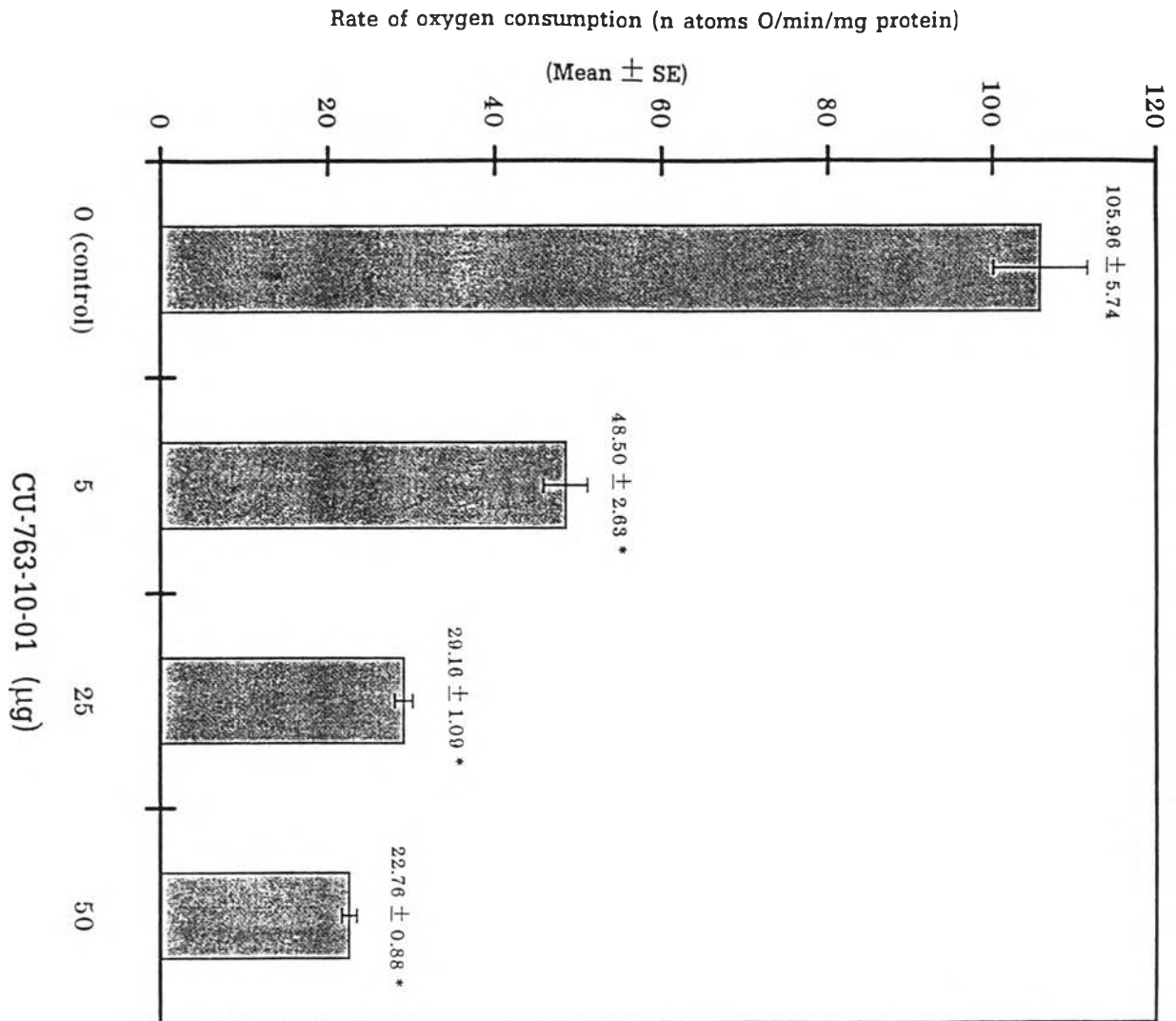
รูปที่ 34 กราฟแสดงผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 0.94 mM potassium phosphate, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.42 mM CaCl_2 และ CU-763-10-01 ขนาดต่างๆ ที่เติมลงไปอีกดังแสดงไว้ในรูป ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.11 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

n = 4 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control



ตารางที่ 6 ผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ที่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย

Experiments	ATPase activity ($\mu\text{mole Pi}/10\text{min}/\text{mg protein}$)
Without DNP	
Control	0.45 ± 0.04
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)	0.44 ± 0.04
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)	0.43 ± 0.05
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)	0.43 ± 0.04
With 0.10 mM DNP	
Control	2.45 ± 0.06
10 μg oligomycin	0.50 ± 0.04
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)	2.44 ± 0.06
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)	2.43 ± 0.04
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)	2.43 ± 0.02

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 16.78 mM sucrose, 5.03 mM ATP, 0.10 mM DNP, oligomycin ขนาด 10 μg และ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตาราง ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 5.60 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml อุณหภูมิ 37°C

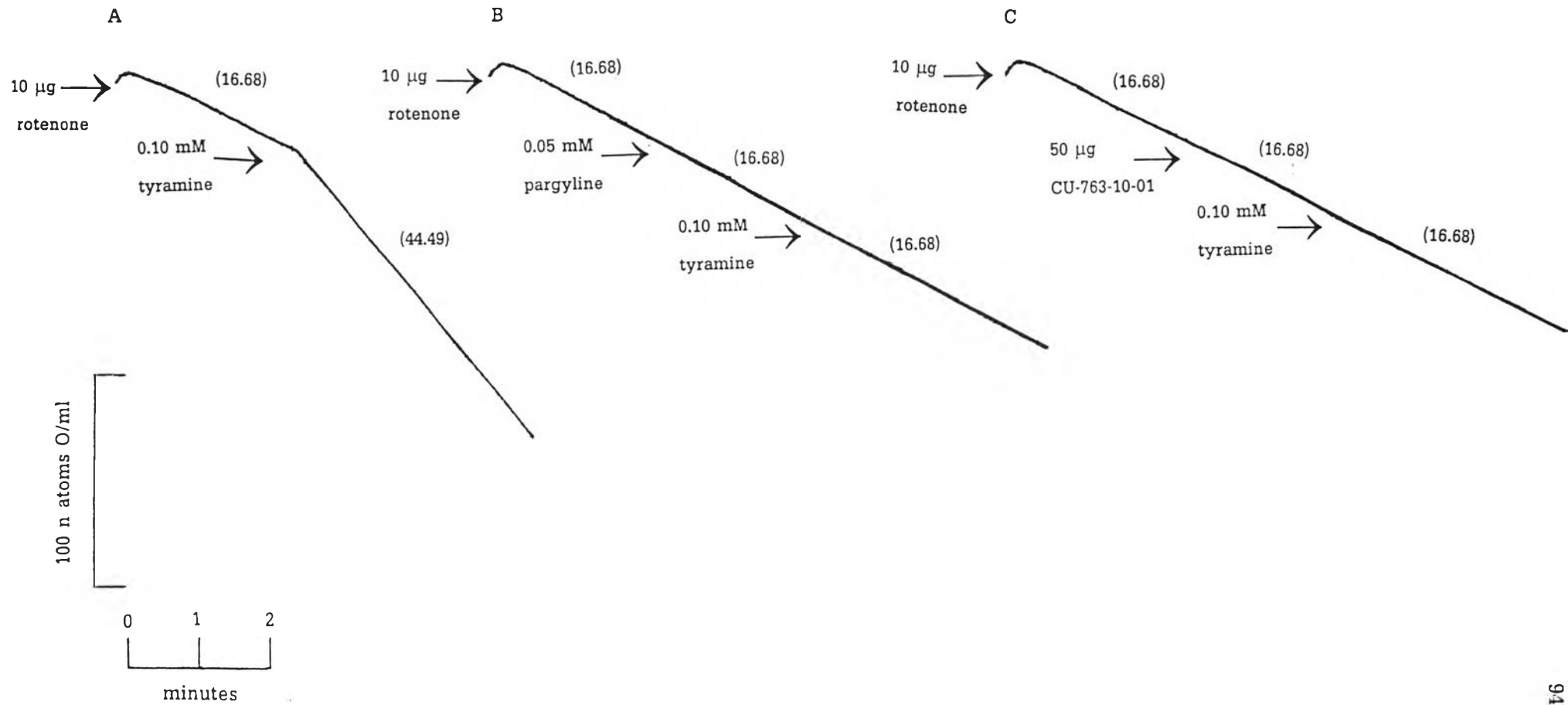
ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

จาก 4 การทดลอง

รูปที่ 35 Tracing แสดงผลของ CU-763-10-01 ขนาด 50 μg ที่มีผลต่อ monoamine oxidase activity ของไมโทคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.02 mM sucrose, rotenone ขนาด 10 μg , 0.10 mM tyramine, 0.05 mM pargyline และ CU-763-10-01 ขนาด 50 μg ไมโทคอนเดรีย 3.30 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.09 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ที่แสดงไว้ในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นจำนวน n atoms O/ml/min



▶ ตารางที่ 7 ผลของ CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25 และ 50 μg ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโทคอนเดรีย

Experiments	Rate of oxygen consumption after 0.10 mM tyramine (n atoms O/min/mg protein)
Control	14.75 \pm 1.44
0.05 mM pargyline	7.07 \pm 1.13 *
5 μg CU-763-10-01 (8.24 μM)	10.71 \pm 1.29 *
25 μg CU-763-10-01 (41.22 μM)	9.05 \pm 1.19 *
50 μg CU-763-10-01 (82.45 μM)	7.07 \pm 1.13 *

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 , pH 7.2, 13.02 mM sucrose, rotenone ขนาด 10 μg , 0.10 mM tyramine, 0.05 mM pargyline (18.78 μg) และ CU-763-10-01 ในขนาดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตาราง ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.45 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย
จาก 4 การทดลอง

n = 4 * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control