บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ที่สกัดจากรากหนอนตายหยากต่อการหายใจและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว

1. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่าง ๆ ของไมโตคอนดรีย

1.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 22A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองในระยะแรกของ tracing 22A ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยามีเพียงไมโตคอนเดรียใน incubation medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทอยู่ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ระยะนี้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียยังต่ำอยู่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min ระยะนี้คือ state 4 respiration (ส่วนประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาคือ ไมโตคอนเดรีย ออกซิเจนและสับสเตรท) ระยะต่อไปของ oxygraph tracing เรียกว่า state 3 respiration เกิดจากการเติม ADP + Pi ลงไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP ขึ้น (ADP + Pi $\rightarrow$ATP) ซึ่งจะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นเป็น 144.59 n atoms O/ml/min จนกระทั่ง ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกิริยา อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย จะลดลงเป็น 22.25 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม และการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโตคอนเดรีย ค่าที่แสดงถึงการควบคุมการหายใจคือ respiratory control index (RCI) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ ซึ่งค่า RCI นี้จะคำนวณได้จาก อัตราการหายใจใน sate 3 /อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้น RCI ของ ไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 22 จึงเท่ากับ 144.59/22.25 = 6.50 และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler จะทำให้การควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรียนี้เสียไป โดยที่

DNP สามารถกระตุ้นให้มีการหายใจได้คล้าย state 3 respiration แม้จะไม่มี ADP ก็ตาม (ไม่มีการสร้าง ATP) เรียกระยะนี้ว่า state 3U respiration ซึ่งมีผลทำให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วติดต่อกันไป จะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะนี้เพิ่มเป็น 172.40 n atoms O/ml/min และการใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \cong 0$) ส่วนค่า P/O = 256.32/94.54 = 2.71 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล (วิธีคำนวณในบทที่ 2)

tracing 22B แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 6-deoxyclitoriacetal ไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration

tracing 22C, 22D, 22E แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ไม่มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 4 แต่สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสารในขนาด 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลงเป็น 72.30, 13.90 และ 8.34 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U ลดลงเป็น 55.61, 19.46 และ 8.34 n atoms O/ml/min ตามลำดับ เมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา

Dose-response curve ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทรูปที่ 23 จะเห็นได้ว่าความแรงในการลดอัตราการใช้ออกซิเจนจะแปรผันตามขนาดสารที่ให้ (dose-dependent) โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งพบว่ามีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 คือเริ่ม ตั้งแต่ขนาด 0.6 μg (0.84 μM) และ ใน state 3U ตั้งแต่ขนาด 0.3 μg (0.42μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเรื่อย ๆ จนเริ่มคงที่และมีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำสุด ที่ขนาดตั้งแต่ 2.0 μg (2.79 μM) จนถึง 5.0 μg (6.96 μM) ดังแสดงในกราฟ (A) เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (% respiration) เพื่อหาขนาดที่สามารถยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ซึ่งเท่ากับ 0.8 μg (1.11 μM) และค่า IC_{50} สำหรับการกระตุ้นการหายใจด้วย DNP มีค่าเป็น 0.3 μg (0.42 μM) กราฟ (B)

1.2 เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

control respiratory response (เช่นเดียวกับรูป 22A) ซึ่งแสดงถึงอัตราการใช้ออกซิเจนตามปกติของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น succinate เติม 10 μg rotenone เพื่อยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจ complex I ตามรูปที่ 24 A อัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม rotenone เท่ากับ 58.39 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 55.61 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก จากนั้นเติม ADP + Pi เพื่อเข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมาก เท่ากับ 272.50 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเท่ากับ 61.17 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม และเมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 316.99 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \cong 0$) ส่วนค่า ADP/O = 256.32/150.15 = 1.70 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 2 โมเลกุล (วิธีคำนวณในบทที่ 2)

ส่วน DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 6-deoxyclitoriacetal นั้นไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration (รูป 24B)

tracing 24C, 24D, 24E แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ไม่มีผลต่ออัตราการหายใจใน state 4 และอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสารตั้งแต่ในขนาด 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า 6-deoxyclitoriacetal ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเติม DNP ลงไปในปฏิกิริยา พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในการศึกษาถึง Dose-response curve ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท จะเห็นได้ว่าขนาดสารที่เพิ่มขึ้นไม่มีผล หรือมีผลเปลี่ยนแปลงน้อยมากต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กราฟ (A) และค่า % Respiration กราฟ (B) (รูปที่ 25)

จากทั้งสองกรณี แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนเฉพาะในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ส่วนในกรณีที่ใช้ saccinate เป็นสับสเตรทไม่มีผล จะเห็นได้ว่า 6-deoxyclitoriacetal มีผลทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้วัดการทำงานของไมโตคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 4 การทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.8, 2 และ 5 μg สามารถลดค่า RCI และอัตราส่วน P/O อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4)

1.3 ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate + malate

1.3.1 เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็นสับสเตรท

เมื่อทำการศึกษาผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็นสับสเตรท ได้ผลคือ

ตามรูป 26 tracing 26A แสดงใน state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม DMSO เท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่าเดิม และเป็นการแสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration จากนั้นเติม ADP + Pi เพื่อเข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมาก เท่ากับ 112.35 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 27.81 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เท่ากับ 116.79 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \cong 0$) ส่วนค่า ADP/O = 256.32/88.98 = 2.88 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 26B, 26C, 26D แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือ เมื่อเติมสารในขนาด 0.5 μg(0.7 μM), 0.8 μg (1.11 μM) และ 2.0 μg (2.79μM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า 6-deoxyclitoriacetal ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลง เป็น 55.61, 38.93 และ

25.03 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U ลดลงเป็น 58.39, 55.61 และ 38.93 n atoms O/ml/min ตามลำดับเช่นกัน

รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5 μg (0.7 μM), 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.3.2 เมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับ 1.3.1 โดยเปลี่ยนสับสเตรทที่ใช้เป็น β-hydroxybutyrate จะได้ผลดังนี้คือ

state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม DMSO เท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และเป็นการแสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลกระตุ้นต่อ state 4 respiration (รูป 28A) จากนั้นเติม ADP + Pi เพื่อเข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมาก เท่ากับ 144.59 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 27.81 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเท่ากับ 127.91 n atoms O/ml/min การใช้ออกซิเจนนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไป จนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber ($O_2 \cong 0$) ส่วนค่า ADP/O = 256.32/94.54 = 2.71 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียสามารถสร้าง ATP ได้ประมาณ 3 โมเลกุล

tracing 28B, 28C, 28D แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ state 3U respiration กล่าวคือเมื่อเติมสารในขนาด 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) ก่อนเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า 6-deoxyclitoriacetal ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลง เป็น 83.42, 27.81 และ 16.68 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U ลดลงเป็น 72.30, 44.49 และ 22.25 n atoms O/ml/min ตามลำดับเช่นกัน

รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ซึ่งพบว่าในขนาด 0.5 μg (0.7 μM) และ 0.8μg (1.11 μM) จะมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U ลดลงอย่างมีไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ที่ขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) จะมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3 และ state 3U อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถยับยั้งการหายใจใน state 3 และ state 3U ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+ - lined substrate ทั้ง 3 ชนิด คือ glutamate + malate, α-ketoglutarate และ β-hydroxybutyrate

2. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน osmotic-shocked mitochondria

รูปที่ 30 oxygraph tracing แสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ใน osmotic-shocked mitochondria กล่าวคือ

tracing 30A เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย DMSO (ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของ 6-deoxyclitoriacetal) นาน 1 นาทีหลังจากเติม DMSO มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min ซึ่งเท่ากันกับอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนการเติม DMSO จากนั้นจึงเติม NADH อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 50.05 n atoms O/ml/min จนไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนใน chamber จนหมด

tracing 30B จากการทดลอง เมื่อทำการ preincubate osmotic-shocked mitochondria ด้วย 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) นาน 1 นาที ต่อจากนั้นเติม NADH ซึ่งเป็นสับสเตรทเพื่อให้เกิด state 3U พบว่าในขนาดของสารที่ให้นี้ ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3U จะมีค่าเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min ซึ่งลดลงจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการหายใจในสภาวะ osmotic-shocked mitochondria ซึ่งพบว่าในขนาด 0.5 μg (0.7 μM) และ 0.8μg (1.11 μM) มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบ

เทียบกับ control ส่วนสารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) จะมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

3. ปัจจัยอื่น ๆ หรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางประการใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

3.1 ผลของ rotenone

ในตารางที่ 5 แสดงผลของการให้ rotenone ร่วมกับ 6-deoxyclitoriacetal ต่ออัตราการออกซิเจนใน state 3 และ state 3U โดยในกลุ่ม control จะใช้ DMSO ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เท่ากับ 57.31 ± 5.69 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 20 ng rotenone พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 24.88 ± 5.70 n atoms O/ml/min ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) หรือลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของ control (rotenone เป็นสารที่ใช้ยับยั้ง complex I) ส่วนกรณีที่เติม 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5 μg(0.7 μM), 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) มีค่าเท่ากับ 42.11 ± 4.77, 35.43 ± 6.00, 16.52 ± 4.13 และ 6.99 ± 0.76 n atoms O/ml/min ตามลำดับ ยกเว้นสารในขนาด 0.5 μg (0.7 μM) จากนั้นหากทำการ preincubate ไมโตคอนเดรียกับ 20 ng rotenone และเติมสารในขนาดดังกล่าวข้างต้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เท่ากับ 11.07 ± 1.98, 11.82 ± 4.00, 8.42 ± 3.11 และ 8.67 ± 2.13 n atoms O/ml/min ตามลำดับ ส่วนอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U พบว่าในกลุ่ม control จะใช้ DMSO ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3U เท่ากับ 72.52 ± 4.82 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม 20 ng rotenone พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 31.97 ± 8.72 n atoms O/ml/min ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ส่วนกรณีที่เติม 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5 μg(0.7 μM), 0.8 μg (1.11 μM), 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เท่ากับ 33.59 ± 6.39, 24.98 ± 4.23, 17.17 ± 2.09 และ 8.71 ± 1.07 n atoms O/ml/min ตามลำดับ จากนั้นหากทำการ preincubate ไมโตคอนเดรียกับ 20 ng rotenone และเติมสารในขนาดดังกล่าวข้างต้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงมากยิ่งขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เท่ากับ 14.13 ± 2.43, 14.42 ± 4.54, 9.96 ± 3.45 และ 9.89 ± 2.33 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

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

ตารางที่ 6 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการหายใจในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ใน state 3 (pH 7.2) พบอัตราการใช้ออกซิเจนในกลุ่ม control เท่ากับ 39.63 ± 5.57 n atoms O/ml/min ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 9.17 ± 1.16 และ 6.30 ± 0.53 n atoms O/ml/min ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเติม 6-deoxyclitoriacetal ลงใน incubation medium (pH 6.8) พบว่าสารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) มีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลง เท่ากับ 8.97 ± 0.91 และ 5.28 ± 0.64 n atoms O/ml/min ตามลำดับและใน incubation medium (pH7.6) เท่ากับ 12.79 ± 2.32 และ 7.53 ± 1.35 n atoms O/ml/min ตามลำดับเช่นกัน ใน state 3U อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงทุก ๆ ค่า pH ที่ incubation medium(pH 7.2) พบอัตราการใช้ออกซิเจนในกลุ่ม control เท่ากับ 45.80 ± 2.14 n atoms O/ml/min โดยเมื่อเติมสารขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) อัตราการใช้ออกซิเจนใน (pH7.2) จะลดลงเท่ากับ 12.44 ± 2.04 และ 7.51 ± 0.70 n atoms O/ml/min ตามลำดับ ส่วนอัตราการใช้ออกซิเจนใน (pH6.8) จะลดลงเท่ากับ 10.99 ± 1.27 และ 5.98 ± 0.56 n atoms O/ml/min ตามลำดับ และ อัตราการใช้ออกซิเจนใน (pH7.6) จะลดลงเท่ากับ 15.87 ± 2.92 และ 12.13 ± 3.62 n atoms O/ml/min ตามลำดับ จากตารางจึงกล่าวได้ว่าที่ทุก ๆ pH ของ incubation medium เมื่อเติม 6-deoxyclitoriacetal ลงไปจะทำให้เกิดการลดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่อเปรียบเทียบกับ control ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยไม่มีความแตกต่างกันของ pH ใน incubation medium ที่ใช้

3.3 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

รูปที่ 32 กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของการเติม BSA ในขนาดต่าง ๆ คือ 5, 10, 20 และ 30 mg ต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 จากกราฟจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติมสารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) เป็นกลุ่ม control โดยไม่มีการเติม BSA เท่ากับ 11.73 ± 2.00 n atoms O/ml/min และเมื่อเติม BSA ในขนาด 5 mg มีผลทำให้อัตราการหายใจที่ลดลงจากฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal มีค่าเพิ่มขึ้น คือมีการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 20.31 ± 2.00 n atoms O/ml/min อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อเติม BSAในขนาด 10, 20 และ 30 mg พบว่าสามารถลดผลการยับยั้ง state 3

respiration ของ 6-deoxyclitoriacetal หรือมีการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เท่ากับ 24.33 ± 2.48, 38.47 ± 6.97 และ 45.84 ± 2.96 n atoms O/ml/min

3.4 ผลของ dithiothreitol (DTT)

รูปที่ 33 แสดง tracing 33A แสดง control respiratory response แสดงใน state 4 respiration ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติม DMSO เท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่าเดิม จากนั้นเติม ADP + Pi เพื่อเข้าสู่ state 3 respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างสูงมาก เท่ากับ 139.03 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 27.81 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิมอีกครั้ง เมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นสูงมากเท่ากับ 216.89 n atoms O/ml/min

tracing 33 B แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติม 1.04 mM DTT โดยการนำไป preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม DMSO พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min และหลังเติมเท่ากับ 27.81 n atoms O/ml/min ซึ่งถือว่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่อเติม ADP +Pi อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 เพิ่มขึ้นเป็น 133.47 n atoms O/ml/min เมื่อ ADP ถูกใช้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 27.81 n atoms O/ml/min กลับเข้าสู่ state 4 respiration ตามเดิม เมื่อเติม DNP เพื่อเข้าสู่ state 3U respiration อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เท่ากับ 189.08 n atoms O/ml/min จึงกล่าวได้ว่า DTT ไม่มีผลต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เนื่องจากอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียไม่เปลี่ยนแปลง

tracing 33C แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U เท่ากับ 19.46 และ 25.03 n atoms O/ml/min ตามลำดับ

tracing 33D เมื่อเติม 1.04 mM DTT 1 นาทีก่อนการเติม 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) อัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min เท่ากันกับหลังการเติม 6-deoxyclitoriacetal และเมื่อเติม ADP + Pi พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U เท่ากับ 16.68 และ 25.03 n atoms O/ml/min ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่า 1.04 mM DTT ไม่สามารถลด

ผลการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3U ของ 6-deoxyclitoriacetal ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05)

รูปที่ 34 กราฟแสดงผลของ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อทำการทดลองเป็น 4 การทดลองและหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติม DTT ใน state3 และ state 3U เท่ากับ 99.96 ± 7.47 และ 119.35 ± 2.39 n atoms O/ml/min ตามลำดับ จึงถือว่า DTT ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control และเมื่อให้ DTT ร่วมกับสารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเท่ากับ 16.46 ± 1.57 และ 21.02 ± 1.75 n atoms O/ml/min ใน state 3 และ state 3U ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนพอ ๆ กับให้สารในขนาด 2.0 μg (2.79μM) อย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่า DTT ไม่สามารถลดฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3U ของ 6-deoxyclitoriacetal ได้นั่นเอง

4. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

4.1 ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ

รูปที่ 35 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (ตามวิธีการในบทที่ 2) จากรูปจะเห็นได้ว่า 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดตั้งแต่ 0.5-20 μg (0.7- 27.85 μM) สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้มากขึ้นตามขนาดสารที่เพิ่มขึ้น โดยที่ในขนาด 10 μg (13.93μM) มีปริมาณ Pi ที่วัดได้เท่ากับในขนาด 20 μg (27.85 μM) คือ 0.41 ± 0.02 μmole/10 min/mg protein แสดงว่าปริมาณ Pi ที่ออกมามีค่าคงที่แล้ว จากรูปกล่าวได้ว่า 6-deoxyclitoriacetal ขนาดตั้งแต่ 0.5-20 μg (0.7- 27.85 μM) สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)

4.2 ผลของ oligomycin และ atractyloside

ตารางที่ 7 แสดงผลของ ATPase activity เมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP โดยพบว่าเมื่อทำการเติม 0.10 mM DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ โดยทำให้มีการสลายตัวของ ATP ไปเป็น ADP + Pi ได้ ทำให้สามารถวัดปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยออกมาได้ มีค่าเท่ากับ 1.5983 ± 0.143 μmole/10 min/mg protein ในส่วนของ DMSO ขนาด 10 μl มีค่าเท่ากับ 1.8037 ±0.156 μmole/10 min/mg protein ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 6-deoxyclitoriacetal ไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และเมื่อทดสอบใช้ 0.10 mM DNP ร่วมกับ oligomycin และ atractyloside โดยทำให้มี Pi ที่ปลดปล่อยออกมาลดน้อยลงเป็น 0.3262 ± 0.018 และ 0.6447 ± 0.052 μmole/10 min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งถือว่า oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งการกระตุ้น ATPase activity ของ DNP ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

ส่วนในกรณีสภาวะปกติคือไม่มี DNP ปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยออกมากรณีที่ไม่ใช้และใช้ DMSO เท่ากับ 0.1756 ± 0.006 และ 0.1988 ± 0.018 μmole/10 min/ mg protein จึงถือว่า DMSO ไม่มีผลในการกระตุ้น ATPase activity ส่วน 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 5 μg (6.96 μM) และ 20 μg (27.85 μM) มีผลกระตุ้น ATPase activity ได้เท่ากับ 0.3747 ± 0.012 และ 0.4120 ± 0.018 μmole/ 10 min/mg protein เช่นกันกับ DNP แต่ถือว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นอ่อนกว่า DNP มาก แต่หากเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมสารใดเลยถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) และเมื่อศึกษาถึงผลของการใช้ oligomycin ร่วมกับ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 5 μg (6.96 μM) และ 20 μg (27.85 μM) พบว่ามีปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยออกมาเท่ากับ 0.2593 ± 0.025 และ 0.2826 ± 0.030 μmole/10 min/ mg protein ตามลำดับ กล่าวคือลดลงจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) และเมื่อให้ atractyloside ร่วมกับ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 5 μg (6.96 μM) และ 20 μg (27.85 μM) พบว่ามีปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยออกมามีค่าเท่ากับ 0.2996 ± 0.024 และ 0.3876 ± 0.056 μmole/10 min/ mg protein ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตได้ว่า atractyloside สามารถยับยั้งการกระตุ้น ATPase activity ได้ในสารขนาด 5 μg (6.96 μM) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ส่วนในขนาด 20 μg (27.85 μM) มีความแตกต่างจากกลุ่ม control อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P> 0.05$)

5. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย Ca^{2+} (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 36 oxygraph tracing แสดงผลของ Ca^{2+} ต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

tracing 36A แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรีย เมื่อ preincubate ไมโตคอนเดรียด้วย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ 6-deoxyclitoriacetal

tracing 36B แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติม Ca^{2+} ในสภาวะที่มี Pi อยู่ พบว่า Ca^{2+} สามารถกระตุ้นไมโตคอนเดรียให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนได้เช่นเดียวกับการเติม ADP + Pi โดยตามปกติไมโตคอนเดรียจะนำพลังงานที่ได้จากการขนส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจหรือ proton gradient มาใช้ในการขนส่ง Ca^{2+} เพื่อนำ Ca^{2+} มาสะสมบริเวณ endoplasmic reticulum (ER) ดังนั้นเมื่อเติม 0.42 mM $CaCl_2$ลงไปในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากเพียงพอและมี Pi อยู่ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขึ้นสูง และอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดเมื่อ Ca^{2+} ถูกสะสมเป็นที่เรียบร้อย จากรูปแสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม control เมื่อได้รับ Ca^{2+} อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็น 211.33 n atoms O/ml/min และ ลดลงมาที่ 22.25 n atoms O/ml/min

tracing 36C เมื่อมีการเติม 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) พบว่าสารมีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) เท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min

รูปที่ 37 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5 μg (0.7 μM), 0.8 μg (1.11μM) และ 2.0 μg (2.79μM) ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วย Ca^{2+} จากรูปพบว่าสารในขนาด 0.5 μg (0.7 μM), 0.8 μg (1.11μM) และ 2.0 μg (2.79μM) มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 62.97 ± 3.36, 32.27 ± 0.88 และ 12.57 ± 0.86 n atoms O/ml/min ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P< 0.05$)

6. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

รูปที่ 38 แสดง oxygraph tracing เป็นการศึกษาผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อเอนไซม์ MAO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย โดยมี tyramine เป็นสับสเตรท ก่อนจะเติมสับสเตรททุกกลุ่มจะได้รับ 10 μg rotenone ซึ่งทำหน้าที่เป็น respiratory chain inhibitor ซึ่งจะยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrate ของไมโตคอนเดรีย เพื่อให้การใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการออกซิไดซ์ tyramine โดย monoamine oxidase เท่านั้น

tracing 38A แสดงการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในกลุ่ม control ซึ่งใช้ 10 μl DMSO ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนการเติม tyramine มีอัตราการใช้ออกซิเจนได้เท่ากับ 16.68 n atoms O/ml/min และหลังจากเติม DMSO เท่ากับ 11.12 n atoms O/ml/min เมื่อมีการเติม 0.01 mM tyramine มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 30.59 n atoms O/ml/min

tracing 38B แสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย หลังการเติม 0.01 mM tyramine มีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 22.25 n atoms O/ml/min ซึ่งถดถองเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

tracing 38C แสดงผลการใช้ pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 1 นาที ก่อนการเติม tyramine ซึ่งมีอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนและหลังเติม tyramine ได้เท่ากับ 5.56 n atoms O/ml/min จึงกล่าวได้ว่า pargyline สามารถยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนที่เกิดจาก tyramine ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

รูปที่ 39 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79μM) และ 5 μg (6.96 μM) เมื่อทำการทดลองเป็น 4 การทดลองและหาค่าเฉลี่ยพร้อมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 5.67 ± 0.41 และ 5.95 ± 0.73 n atoms O/ml/min ซึ่งถดถองเล็กน้อยแตกต่างจาก control อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

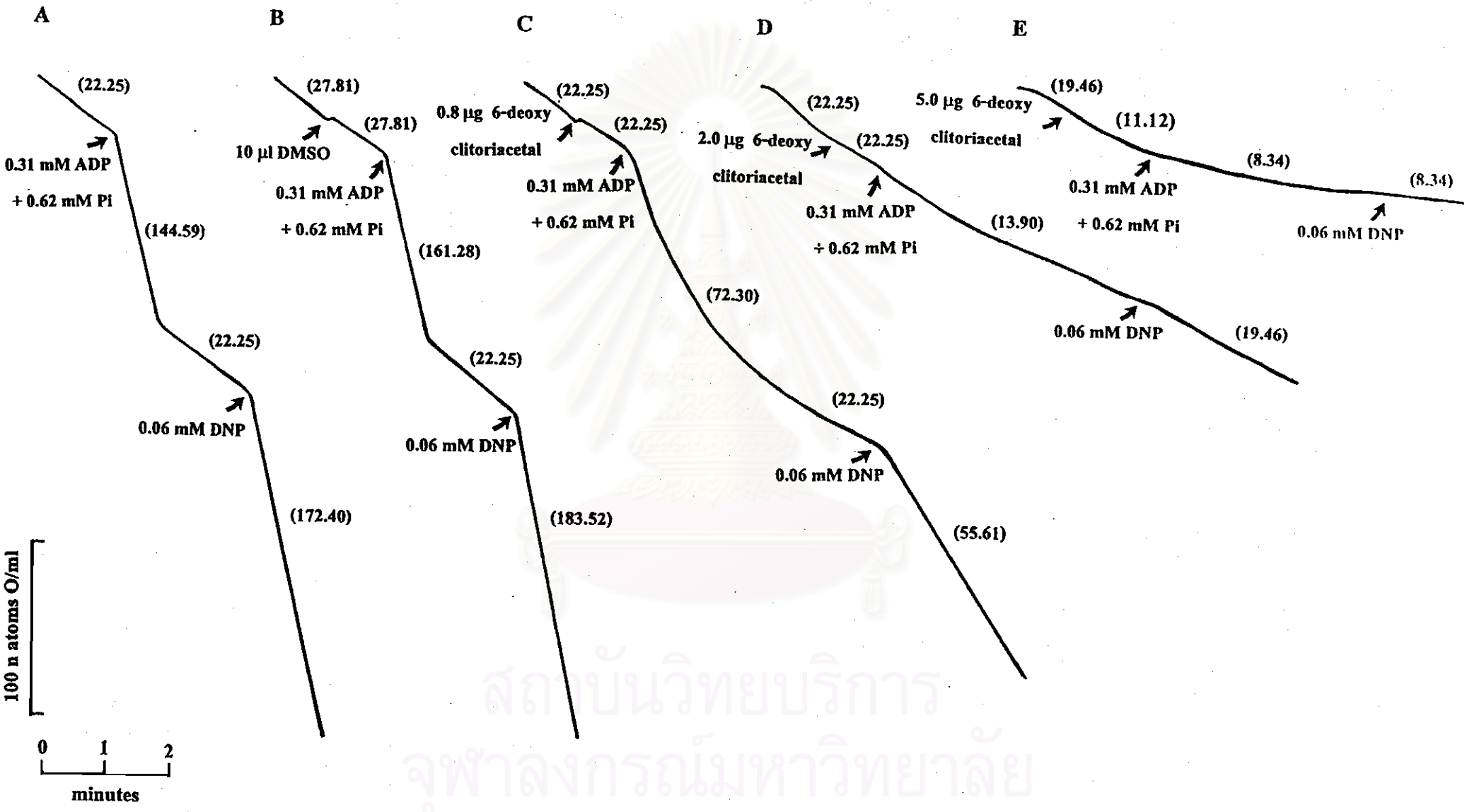
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 Tracing แสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย 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 และไมโตคอนเดรีย 1.75 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ความเข้มข้น 0.8, 2, 5 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 Dose-response curve ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (A) และ เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (% Respiration) (B)

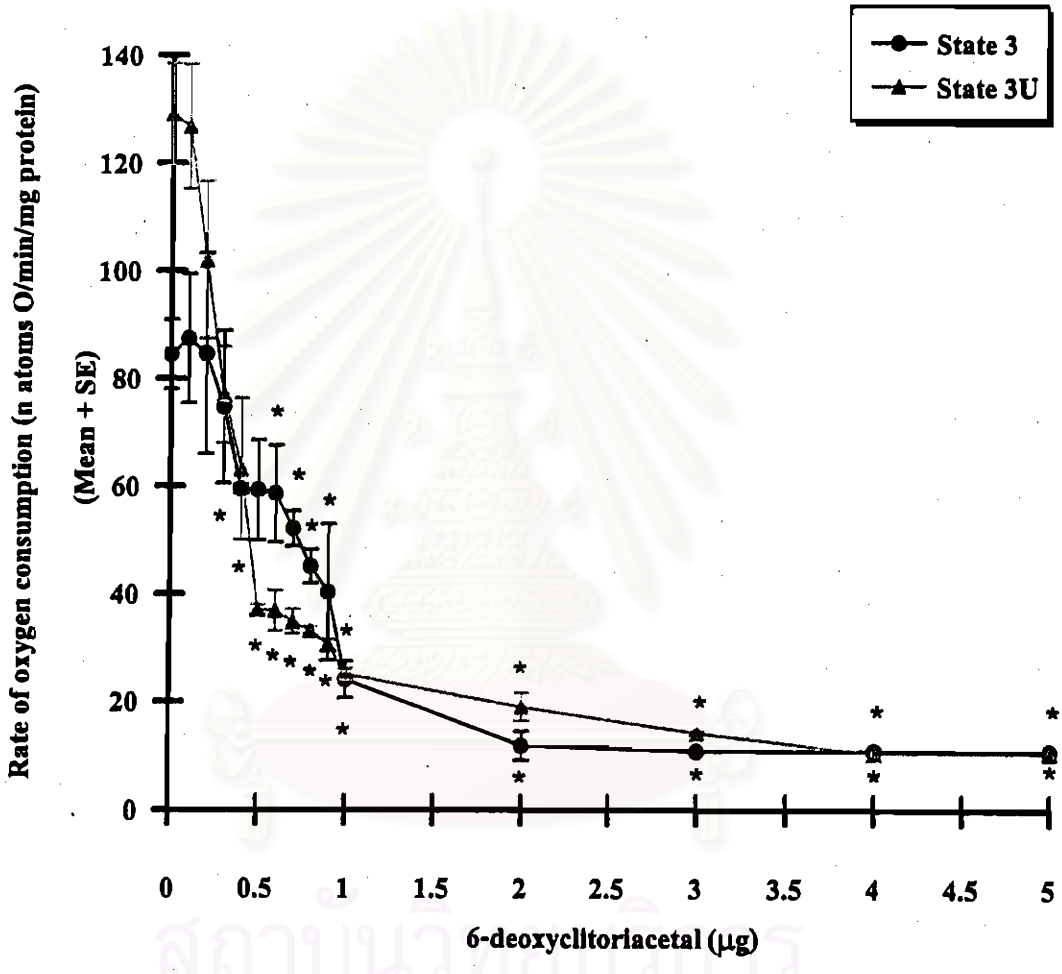
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.90 mg protein/ml. 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

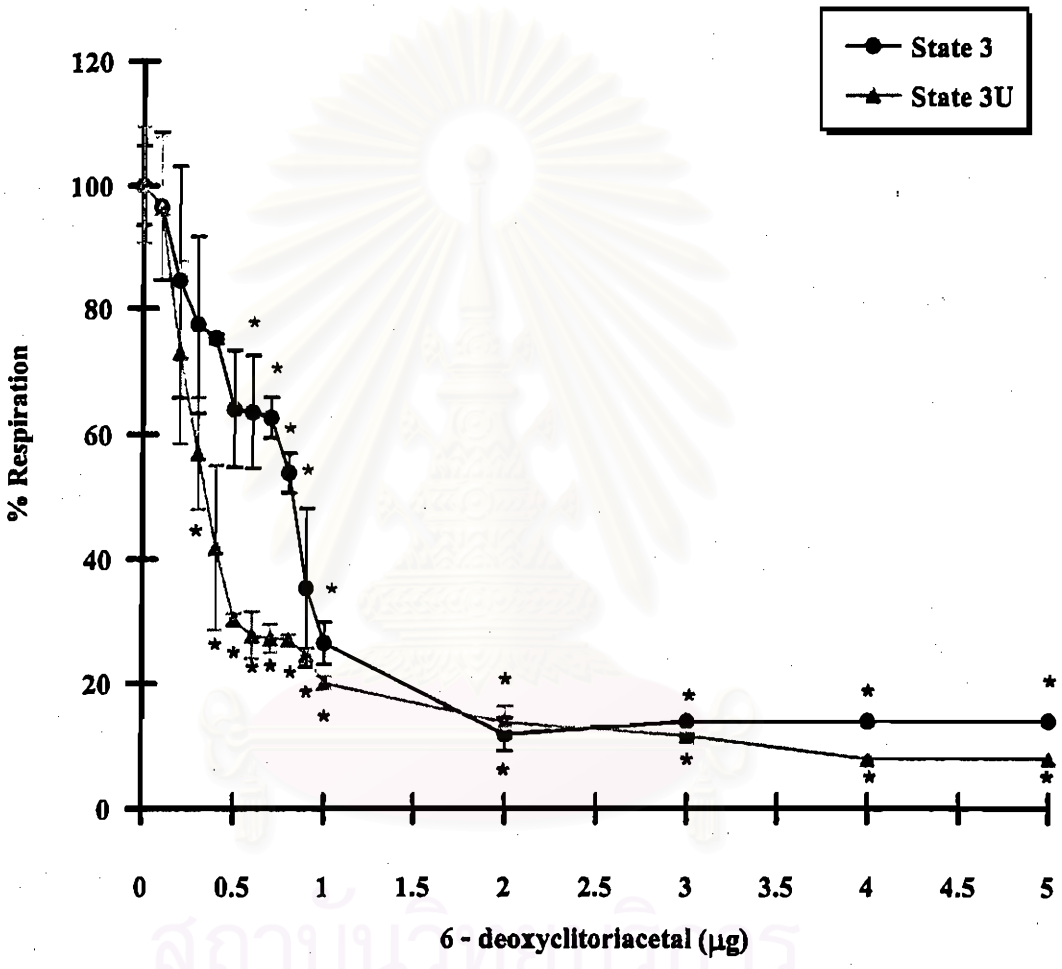
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B



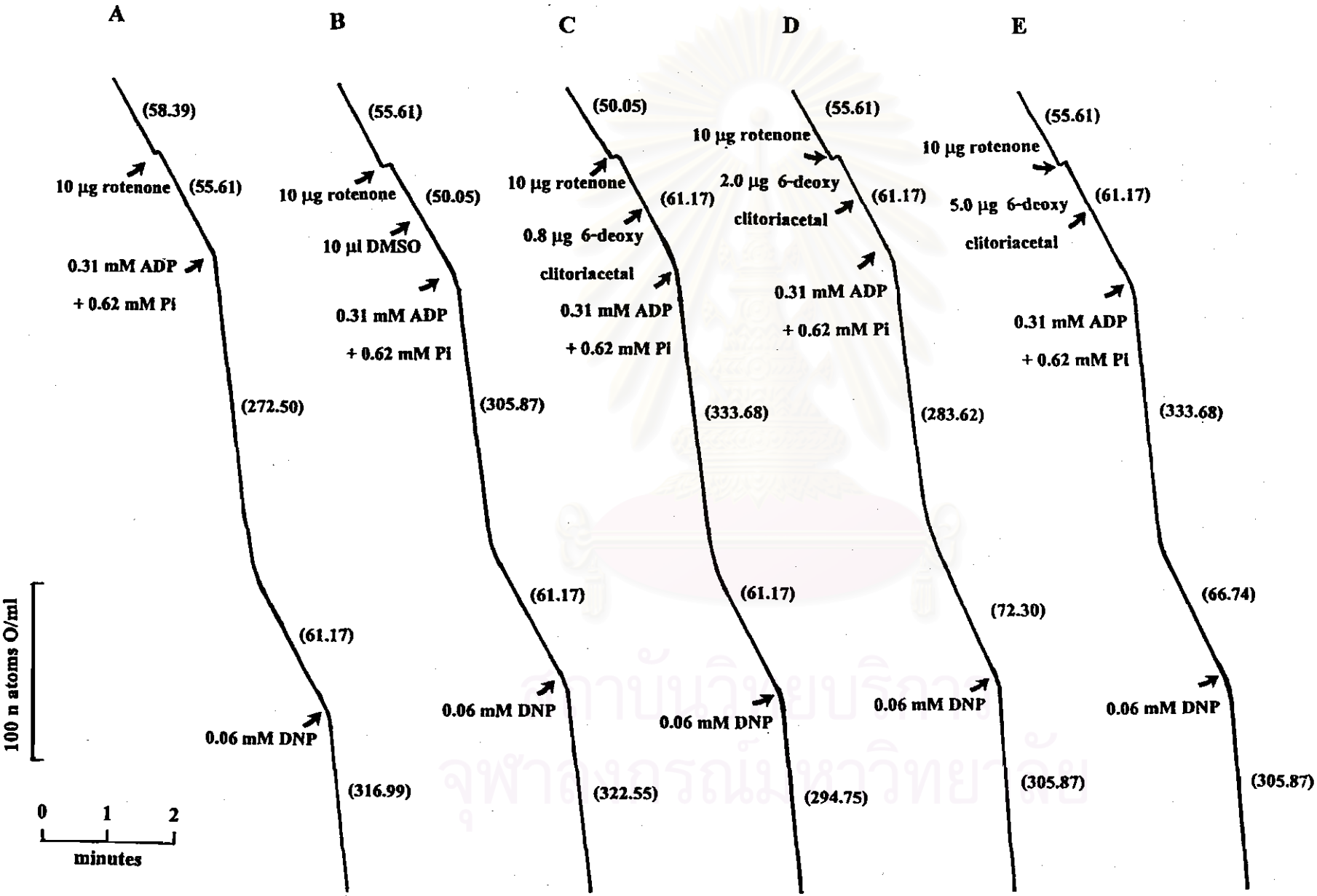
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 Tracing แสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย 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 และ ไมโตคอนเดรีย 2.49 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ความเข้มข้น 0.8, 2.0, 5.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 Dose-response curve ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท (A) และเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (% Respiration) (B)

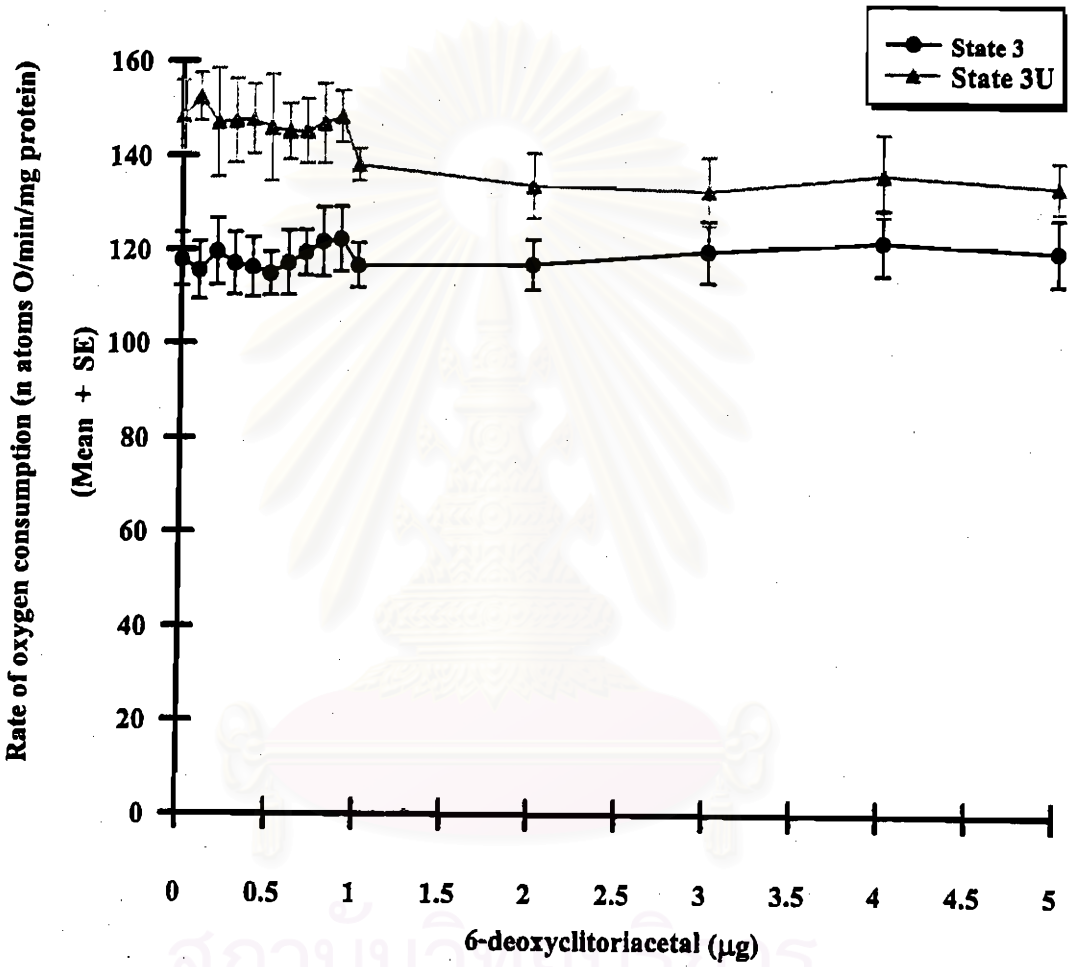
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 13.02 mM sucrose , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.05 mg protein/ml. 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

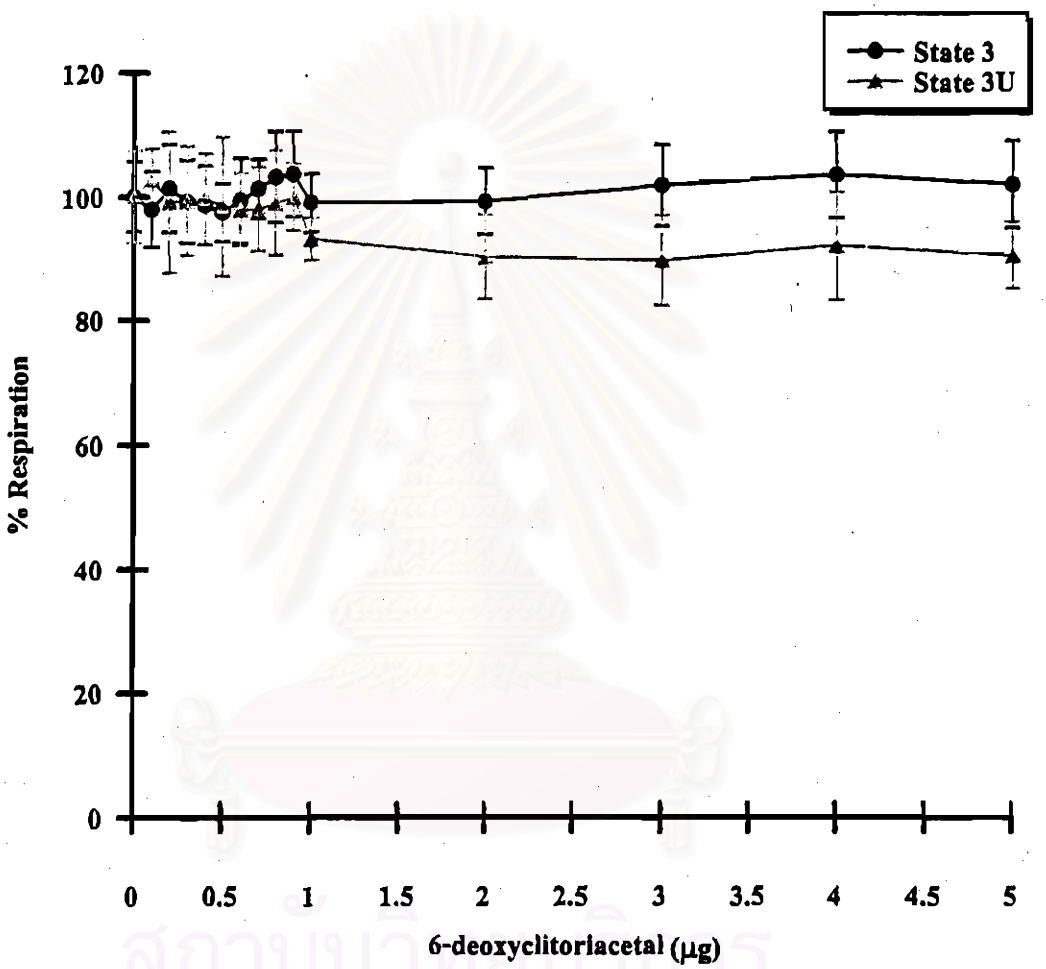
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) อัตราส่วน P/O และต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

Experiments	RCI	P/O	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
			state 3	state 3U
10 µl DMSO (control)	6.14 ± 0.43	2.72 ± 0.15	77.69 ± 8.83	99.87 ± 11.50
0.8 µg 6-deoxyclitoriacetal	3.60 ± 0.39*	2.50 ± 0.18	40.79 ± 4.08* (47.50%)	34.11 ± 3.86* (65.84%)
2.0 µg 6-deoxyclitoriacetal	1.49 ± 0.46*	0*	15.23 ± 4.55* (80.40%)	17.54 ± 3.75* (82.43%)
5.0 µg 6-deoxyclitoriacetal	0.77 ± 0.14*	0*	7.18 ± 1.41* (90.76%)	8.99 ± 1.98* (91.00%)

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

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 และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.68 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในตาราง ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 µl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

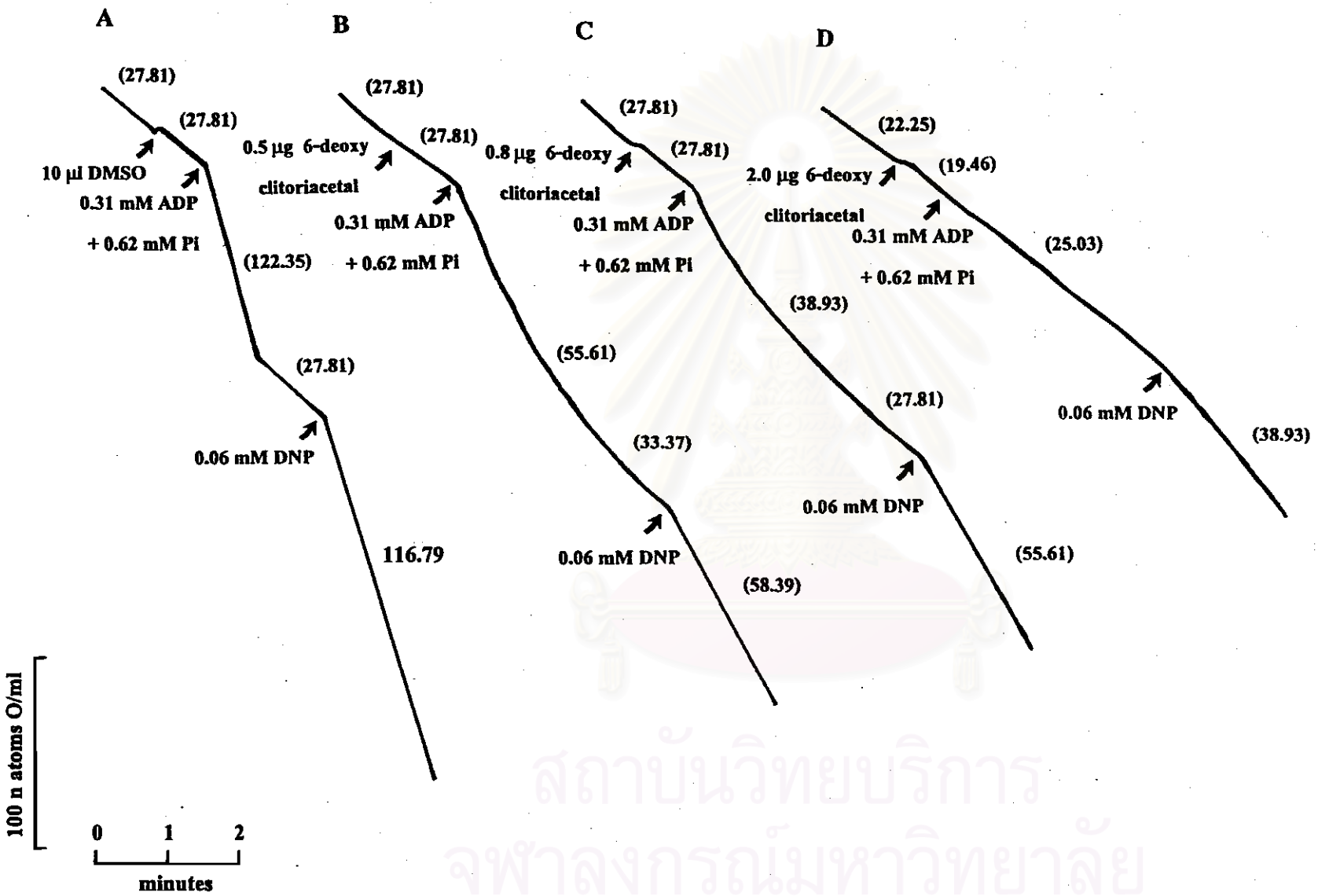
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลองและตัวเลขในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 26 Tracing แสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.5, 0.8, 2.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย 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 และ ไมโตคอนเดรีย 1.91 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ความเข้มข้น 0.5, 0.8, 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

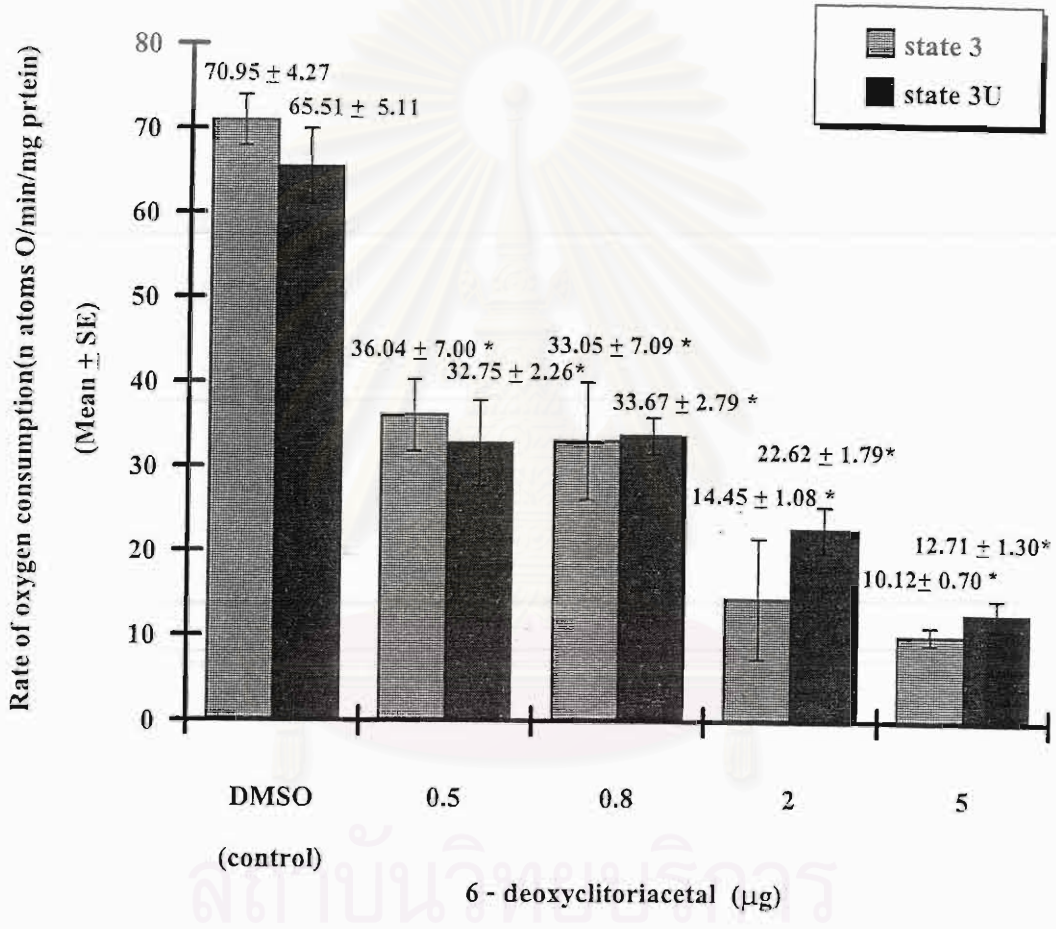
รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5, 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ α - ketoglutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM α - ketoglutarate , 13.02 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.00 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



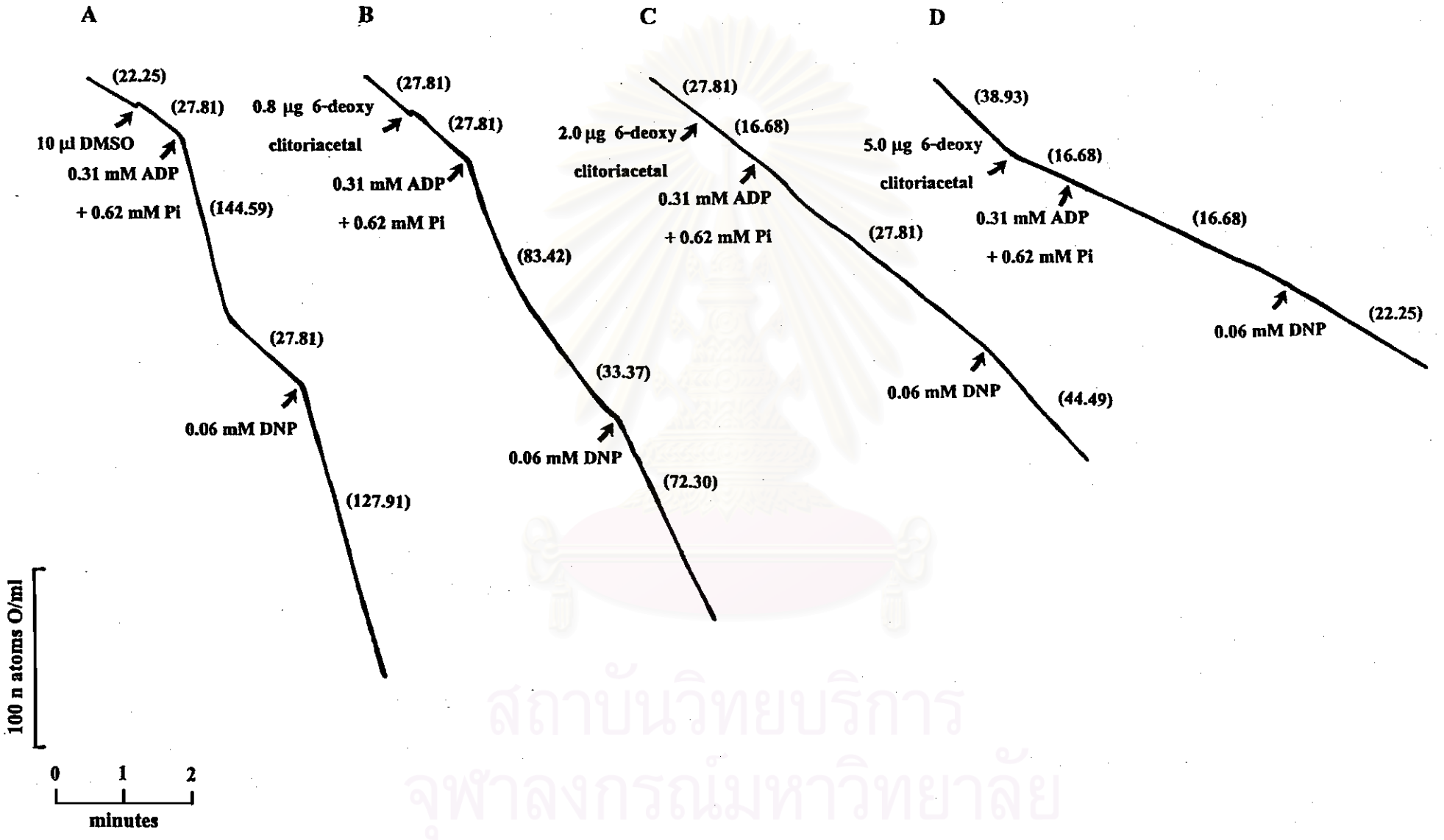
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 28 Tracing แสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ β - hydroxybutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM β - hydroxybutarate , 13.02 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรีย 2.30 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ความเข้มข้น 0.8, 2.0, 5.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

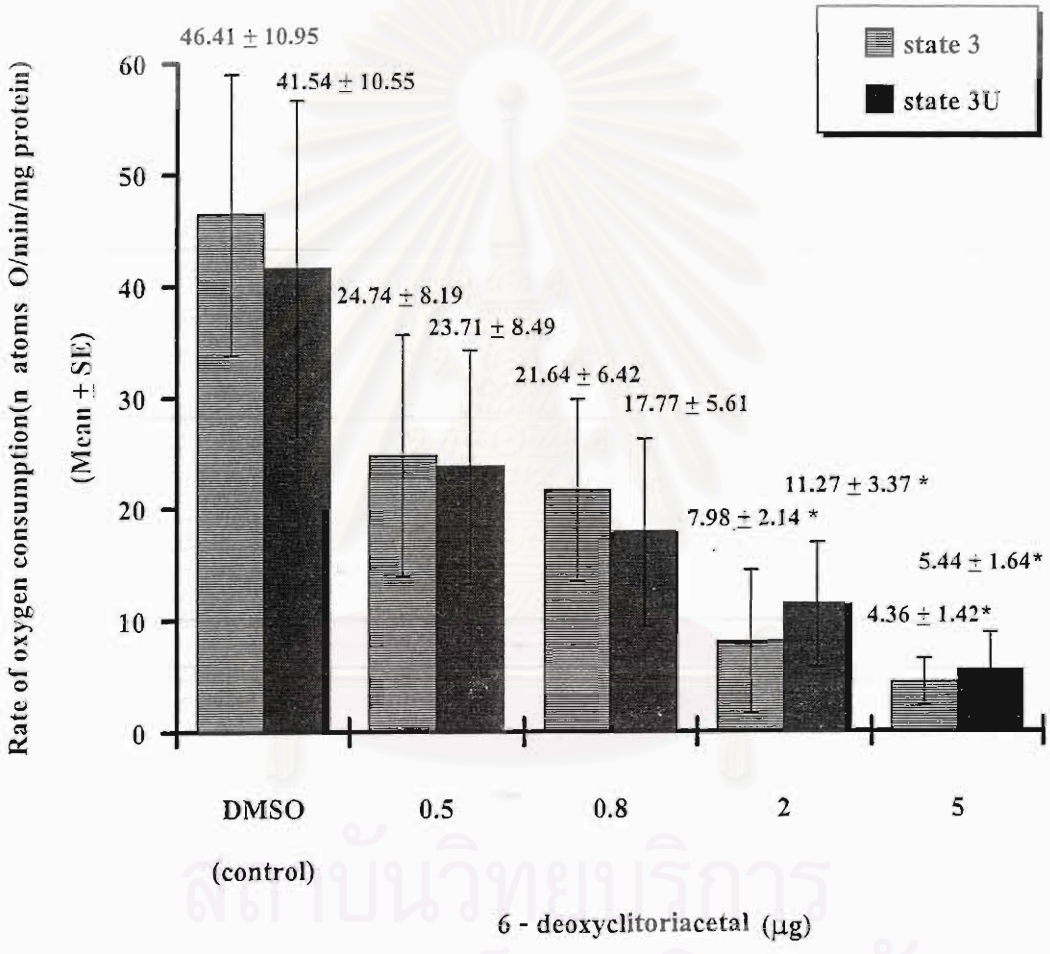
รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.5, 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ β - hydroxybutarate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM β - hydroxybutarate , 13.02 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรีย 2.49 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



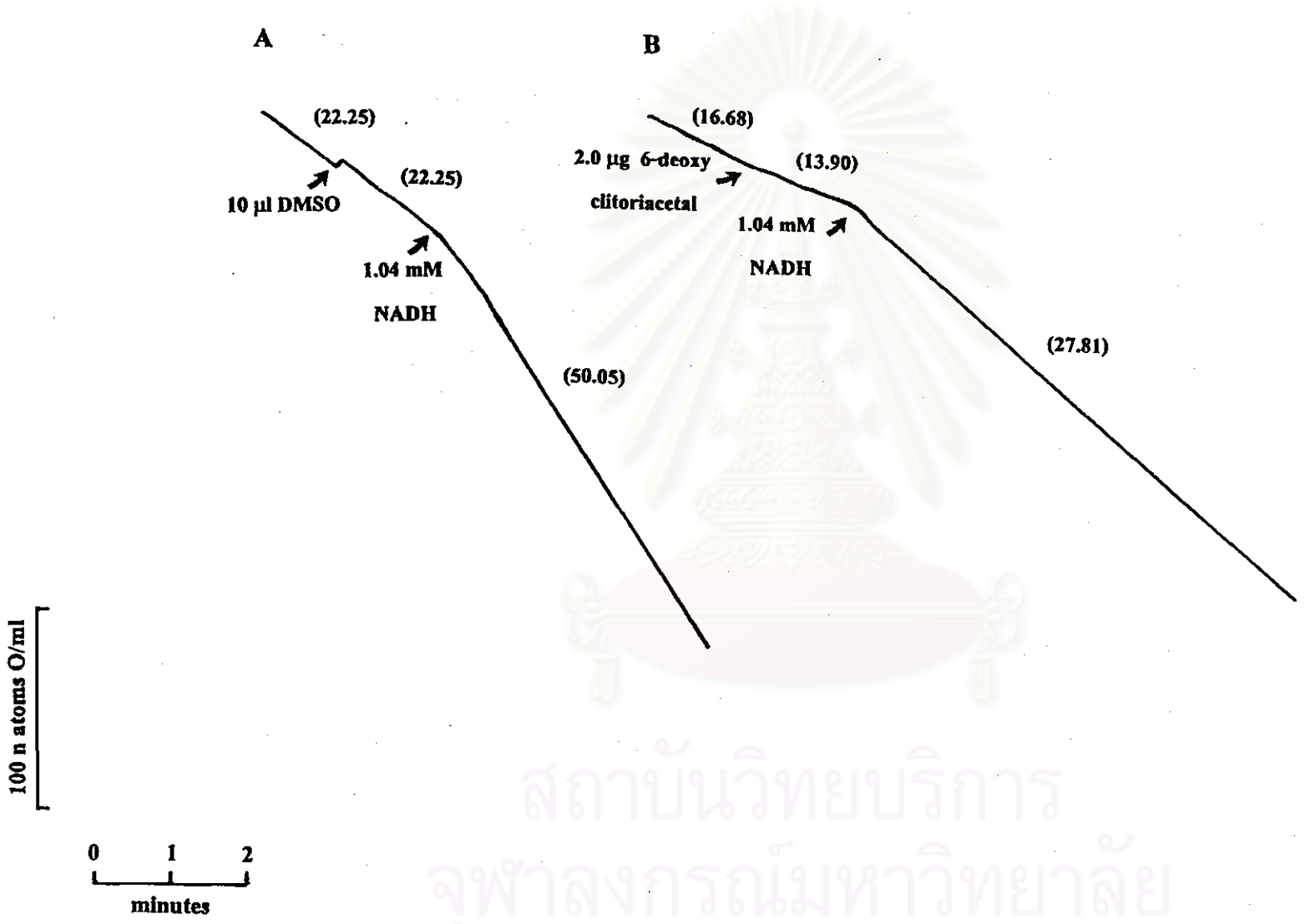
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 Tracing แสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 2.0 μg ที่มีต่อ state 3U respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรีย 1.52 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 6-deoxyclitoriacetal ความเข้มข้น 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

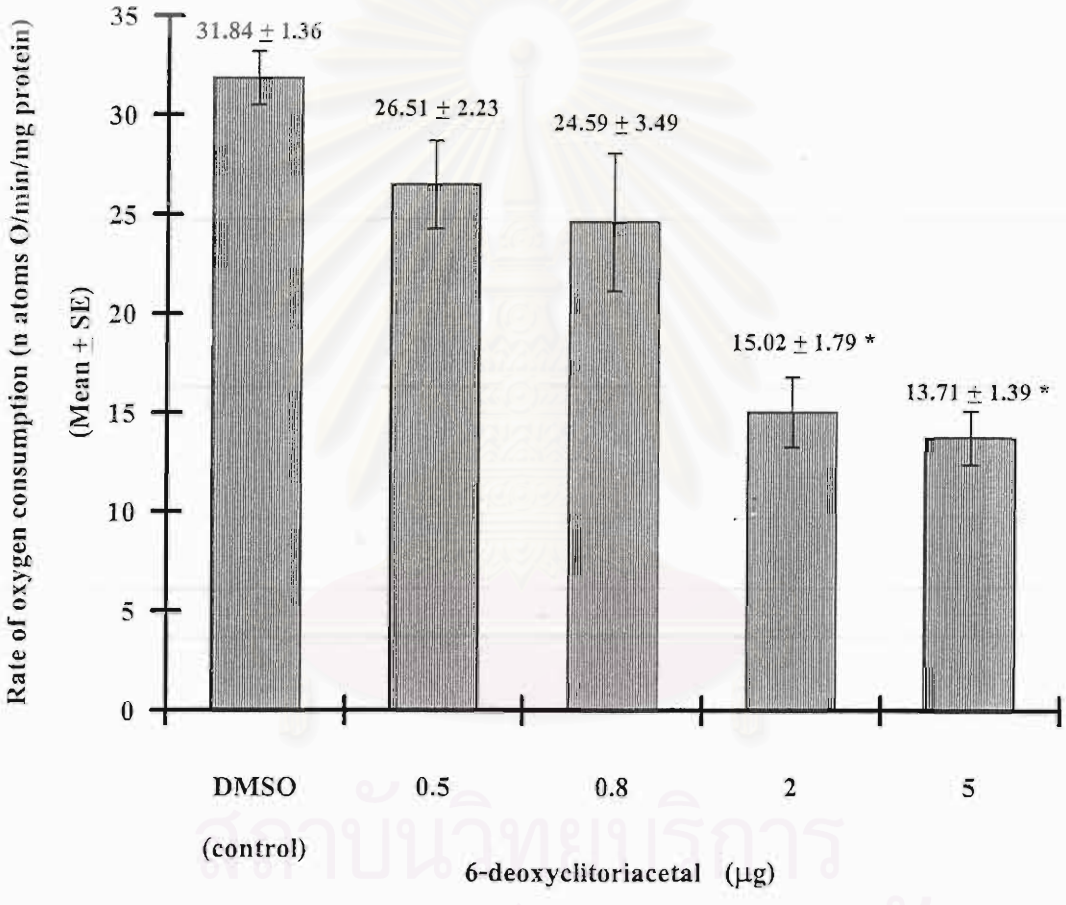
รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ 6-dexyclitoriaectal ในขนาด 0.5, 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีต่อ state 3U respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 1.04 mM NADH, 0.52 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.72 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามถงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมถงไปดังแสดงในรูป ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของ rotenone ที่มีผลในการออกฤทธิ์รวมกับ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.8, 2.0, 5.0 μg ที่มีผลยับยั้งอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 และ state 3U เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3U
DMSO (control)	57.31 ± 5.69	72.52 ± 4.82
20 ng rotenone	24.88 ± 5.70*	31.97 ± 8.72*
0.5 μg 6-deoxyclitoriacetal (0.7 μM)	42.11 ± 4.77	33.59 ± 6.39*
0.5 μg 6-deoxyclitoriacetal + 20 ng rotenone	11.07 ± 1.98*	14.13 ± 2.43*
0.8 μg 6-deoxyclitoriacetal (1.11 μM)	35.43 ± 6.00*	24.98 ± 4.23*
0.8 μg 6-deoxyclitoriacetal + 20 ng rotenone	11.82 ± 4.00*	14.42 ± 4.54*
2.0 μg 6-deoxyclitoriacetal (2.79 μM)	16.52 ± 4.13*	17.17 ± 2.09*
2.0 μg 6-deoxyclitoriacetal + 20 ng rotenone	8.42 ± 3.11*	9.96 ± 3.45*
5.0 μg 6-deoxyclitoriacetal (6.96 μM)	6.99 ± 0.76*	8.71 ± 1.07*
5.0 μg 6-deoxyclitoriacetal + 20 ng rotenone	8.67 ± 2.13*	9.89 ± 2.33*

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

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 และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.06 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, rotenone ขนาด 20 ng และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในตาราง ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37^0C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 6 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitariacetal ในขนาด 0.8, 2.0, 5.0 μg ต่อ state 3 และ state 3U respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

Experiments	Rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3	State 3U
pH 6.8		
DMSO (control)	63.19 ± 9.67	64.24 ± 13.43
2 μg 6-deoxyclitoriacetal (2.79 μM)	8.97 ± 0.91*	10.99 ± 1.27*
5 μg 6-deoxyclitoriacetal (6.96 μM)	5.28 ± 0.64*	5.98 ± 0.56*
pH 7.2		
DMSO (control)	39.63 ± 5.57	45.80 ± 2.14
2 μg 6-deoxyclitoriacetal (2.79 μM)	9.17 ± 1.16*	12.44 ± 2.04*
5 μg 6-deoxyclitoriacetal (6.96 μM)	6.30 ± 0.53*	7.51 ± 0.70*
pH 7.6		
DMSO (control)	53.31 ± 11.25	84.99 ± 13.21
2 μg 6-deoxyclitoriacetal (2.79 μM)	12.79 ± 2.32*	15.87 ± 2.92*
5 μg 6-deoxyclitoriacetal (6.96 μM)	7.53 ± 1.35*	12.13 ± 3.62*

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

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 และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.81 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในตาราง ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

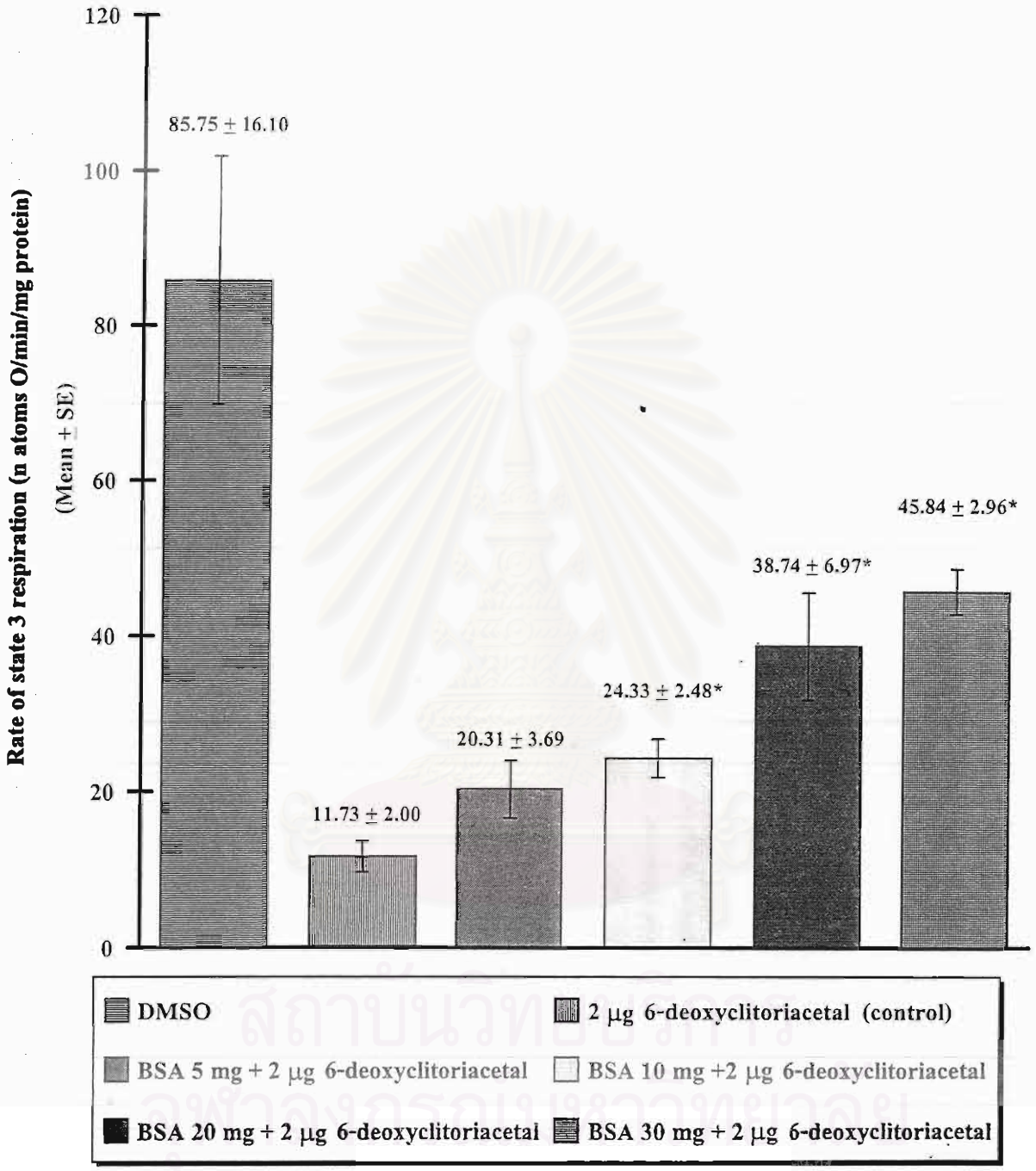
รูปที่ 32 กราฟแสดงผลของ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

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 และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.61 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, BSA 5,10 และ 20 mg. และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

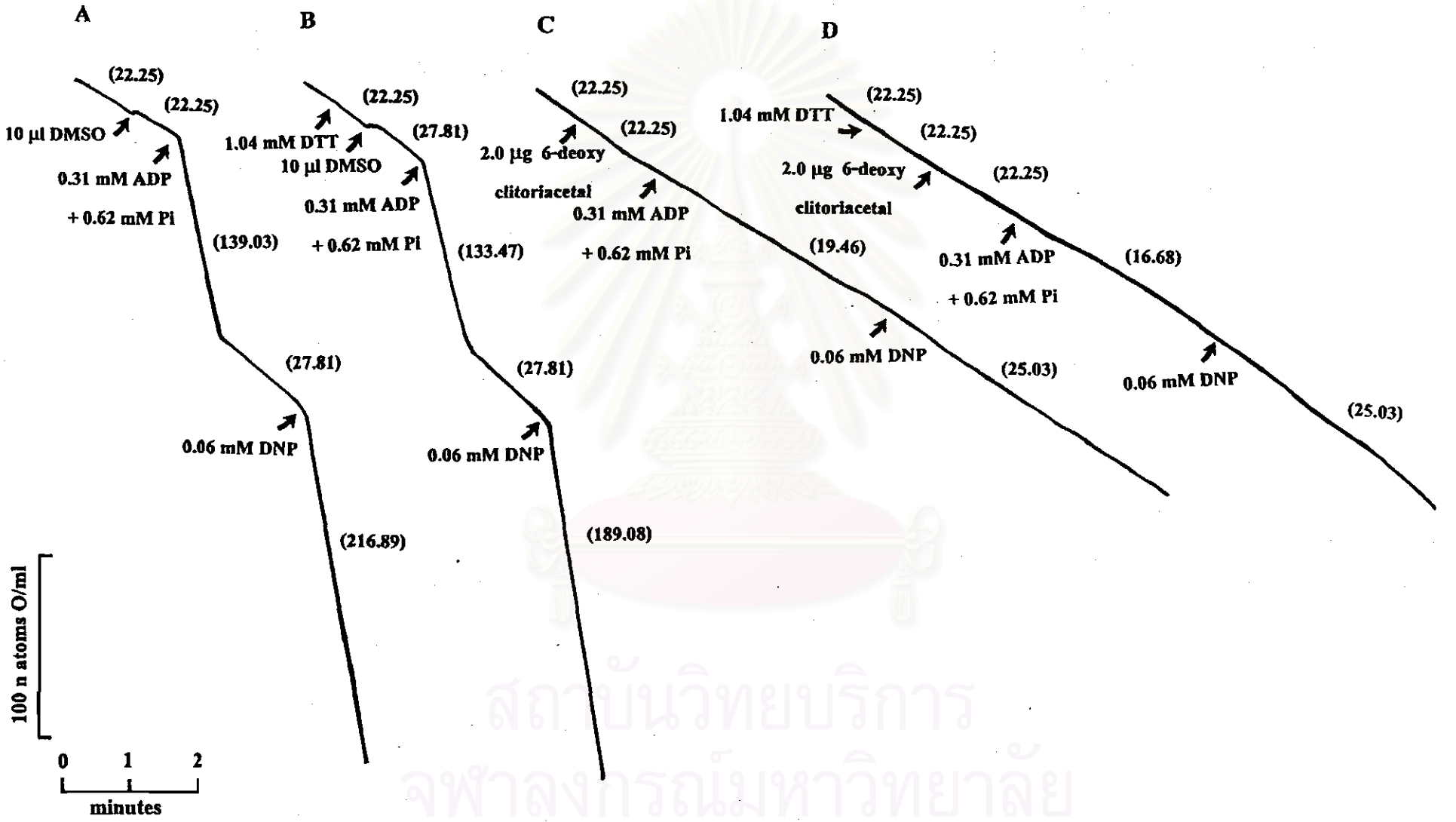

Rate of state 3 respiration (n atoms O/min/mg protein)
(Mean + SE)
120
100
80
60
40
20
0
85.75 ± 16.10
11.73 ± 2.00
20.31 ± 3.69
24.33 ± 2.48*
38.74 ± 6.97*
45.84 ± 2.96*
DMSO
2 µg 6-deoxyclitoriacetal (control)
BSA 5 mg + 2 µg 6-deoxyclitoriacetal
BSA 10 mg +2 µg 6-deoxyclitoriacetal
BSA 20 mg + 2 µg 6-deoxyclitoriacetal
BSA 30 mg + 2 µg 6-deoxyclitoriacetal

รูปที่ 33 Tracing แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย 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 และไมโตคอนเดรีย 1.29 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, 1.05 mM DTT และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

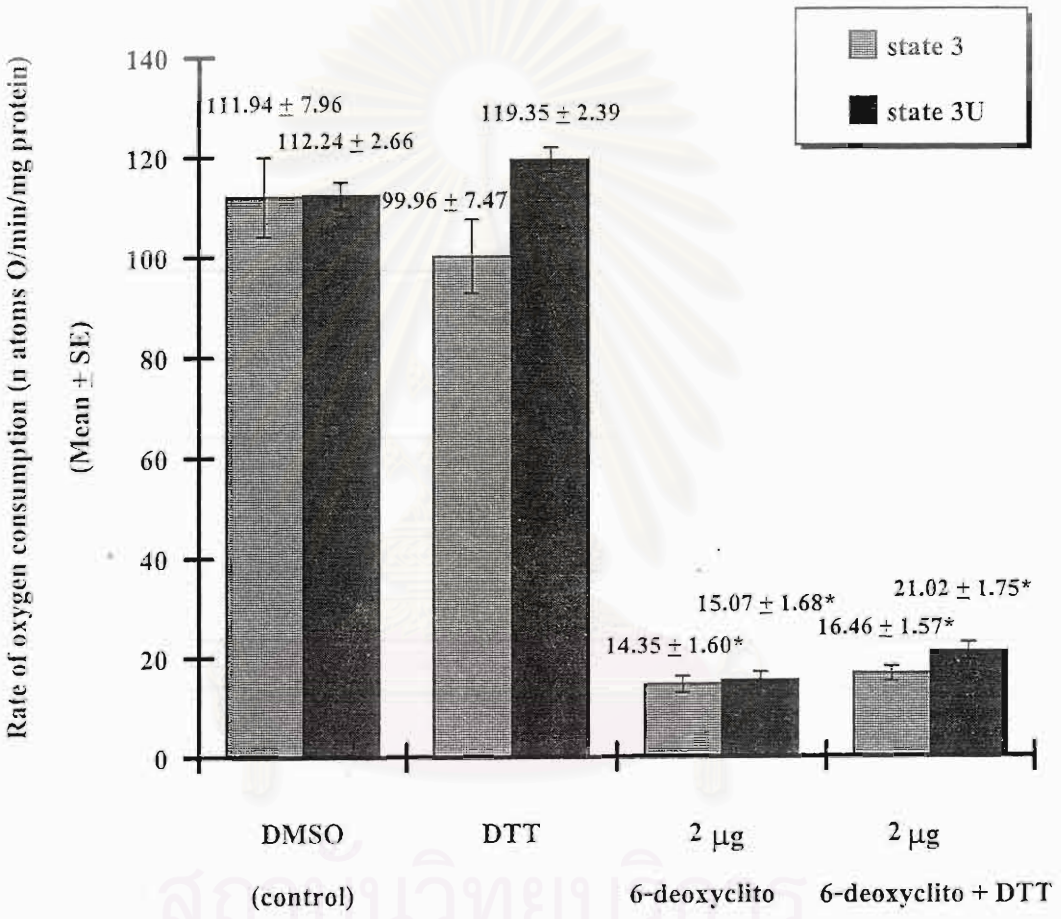
รูปที่ 34 กราฟแสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg ต่อการอัตราหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

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 และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.39 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.06 mM DNP, 1.05 mM DTT และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

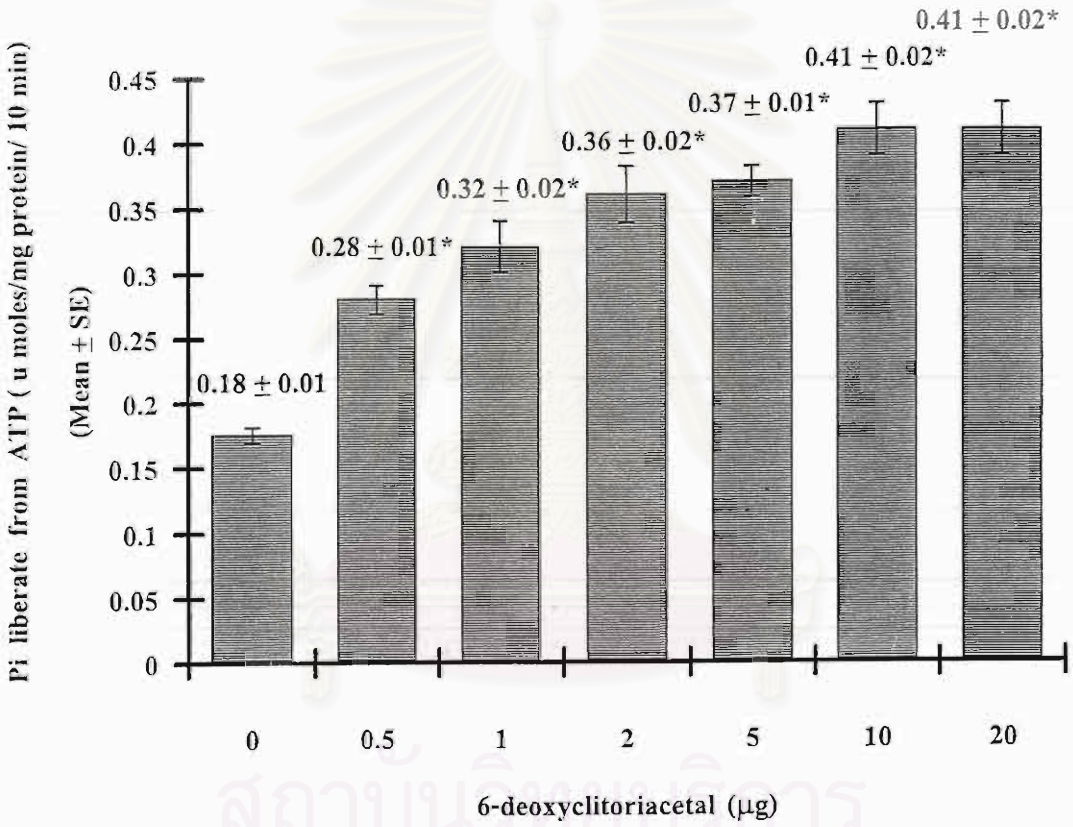
รูปที่ 35 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่อการกระตุ้น ATPase activity ไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 16.78 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.54 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.03 mM ATP และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาดต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังแสดงในรูป ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลของ oligomycin และ atractyloside ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0, 5.0 และ 20 μg ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย เมื่อเทียบกับมีหรือไม่มี DNP

Experiments	Pi liberated from ATP (μ moles/mg protein/10 min)
<u>With 0.10 mM DNP</u>	
0.10 mM DNP	1.5983 ± 0.143
DMSO (control)	1.8037 ± 0.156
10 μg oligomycin	0.3262 ± 0.018*
100 μg atractyloside	0.6447 ± 0.052*
<u>No DNP</u>	
none	0.1756 ± 0.006
DMSO	0.1988 ± 0.018
5 μg 6-deoxyclitoriacetal (6.96 μM) (control)	0.3747 ± 0.012
5 μg 6-deoxyclitoriacetal + 10 μg oligomycin	0.2593 ± 0.025*
5 μg 6-deoxyclitoriacetal + 100 μg atractyloside	0.2996 ± 0.024*
20 μg 6-deoxyclitoriacetal (27.85 μM) (control)	0.4120 ± 0.018
20 μg 6-deoxyclitoriacetal + 10 μg oligomycin	0.2826 ± 0.030*
20 μg 6-deoxyclitoriacetal + 100 μg atractyloside	0.3876 ± 0.056 NS

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

NS $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 16.78 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.50 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.03 mM ATP, 0.10 mM DNP, DMSO, 10 μg oligomycin, 100 μg atractyloside และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0, 5.0 และ 20 μg ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

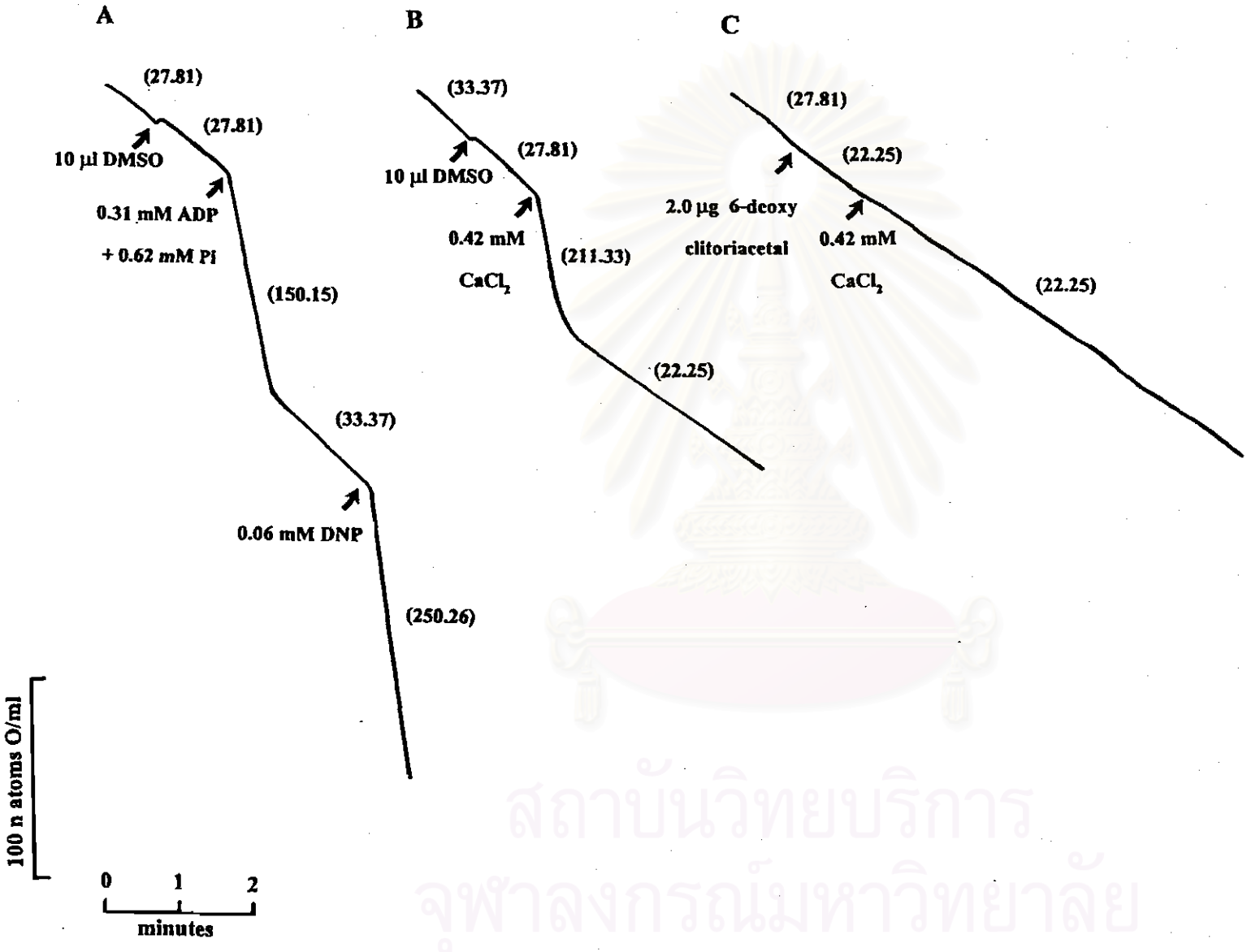
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 Tracing แสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) 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, 0.94 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.04 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.42 mM $CaCl_2$ และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

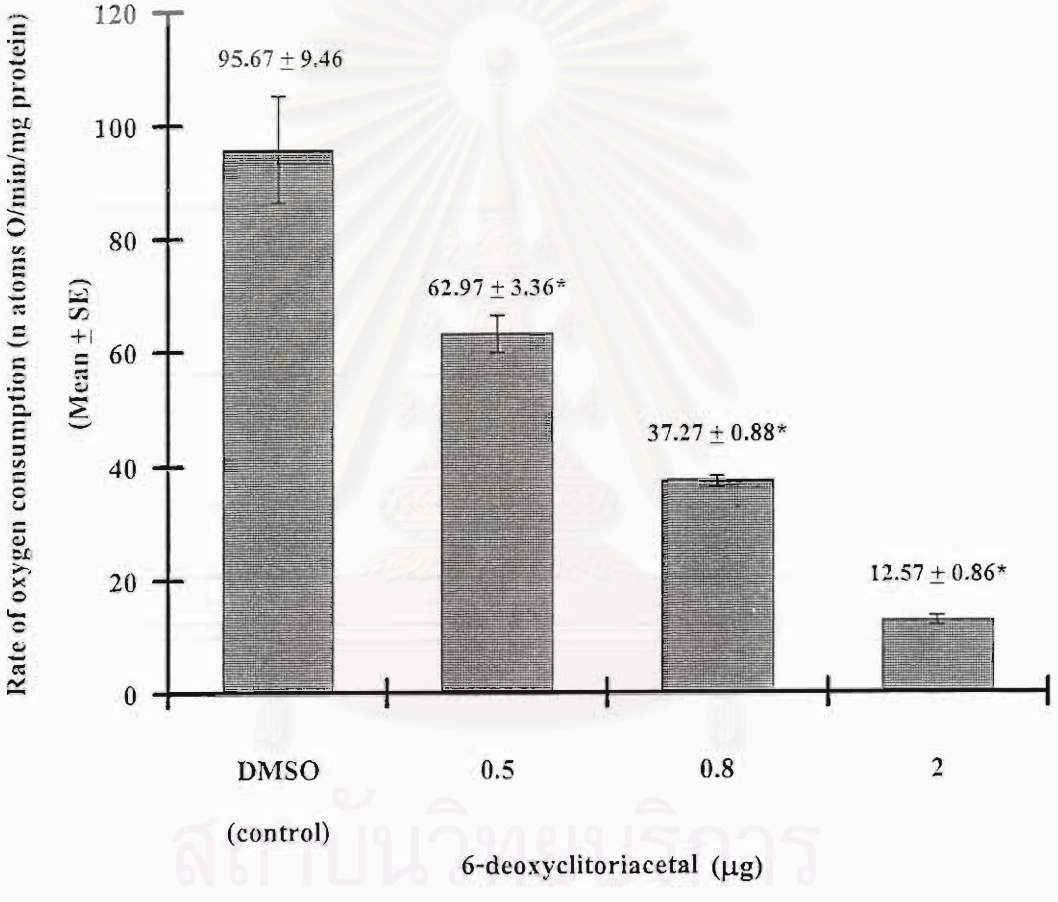
รูปที่ 37 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5, 0.8 และ 2.0 μg ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

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, 0.94 mM potassium phosphate , 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.01 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกคือ 0.42 mM $CaCl_2$ และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



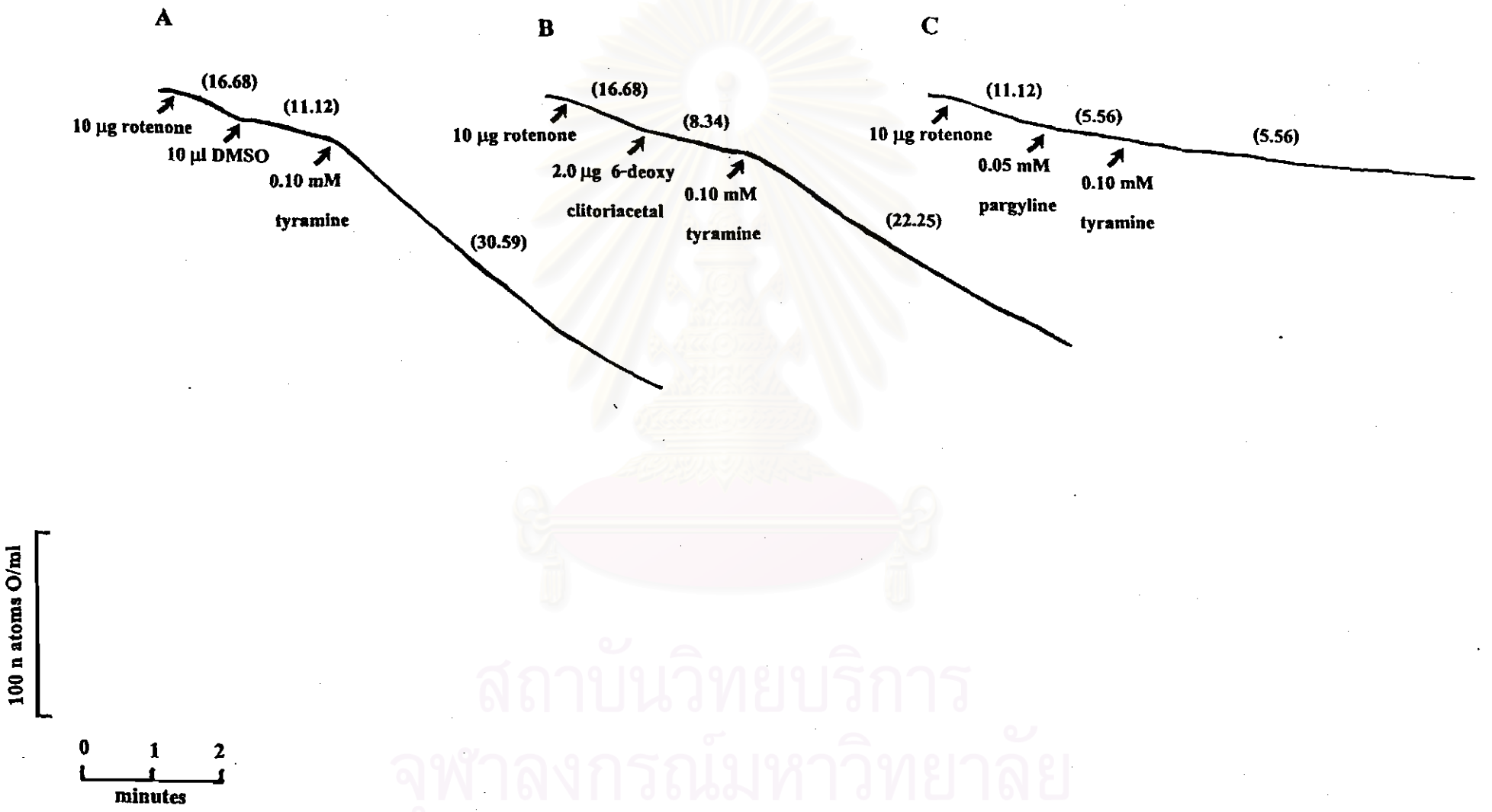
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 Tracing แสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ที่มีผลต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.02 mM sucrose, 10 μg rotenone และไมโตคอนเดรีย 4.72 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงใน รูปคือ 0.10 mM tyramine, 0.05 mM pargyline, และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/ml/min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

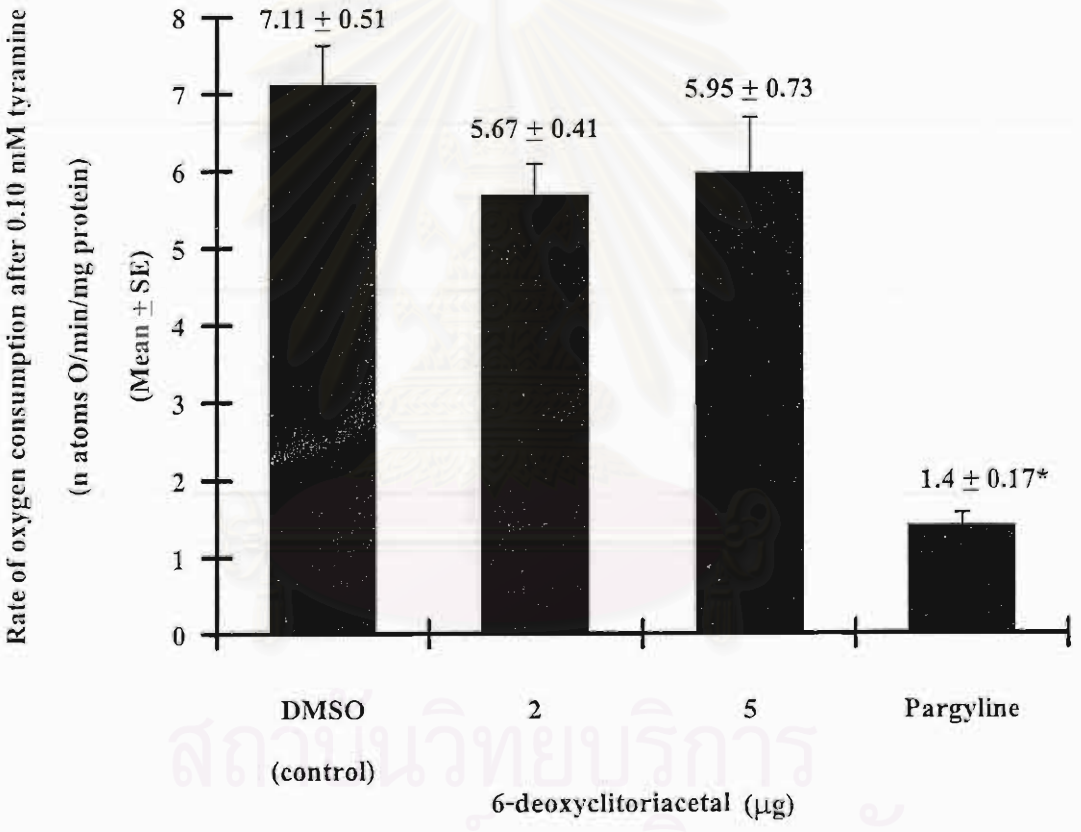
รูปที่ 39 กราฟแสดงผลของ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0, 5.0 μg ที่มีผลต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยใช้ tyramine เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2, 13.02 mM sucrose, 10 μg rotenone และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.11 mg protein/ml. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูปคือ 0.10 mM tyramine, 0.05 mM pargyline และ 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0,5.0 μg ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 μl. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml. อุณหภูมิ 37 ^{0}C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

n = 4 (*) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย