

การยืมยืมหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับพลังงาน

ของไมโครคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดยเอมิ โอตา โรน

นางสาวณัฐาศิริ แซ่ยิบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-111-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018661

119194605

INHIBITION OF ENERGY-LINKED FUNCTIONS
OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA
BY AMIODARONE

MISS NUTTASIRI SAE YIB

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

Department of Pharmacology

Graduate School


Chulalongkorn University

1992

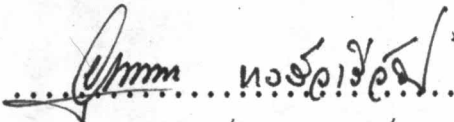
ISBN 974-581-111-4

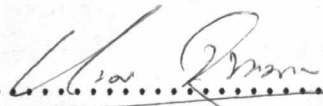
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การยบยั้งหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับ
หนูขาวโดยเอมิโอดาโรน
โดย นางสาวฐาศิริ แซ่ยิบ
ภาควิชา เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุกะพงษ์


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

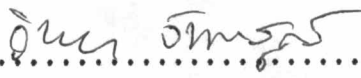

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วาริวัฒน์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุกะพงษ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



ผู้ประพันธ์ : การยับยั้งหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนู
ขาวโดยเอมิโอดาโรน (INHIBITION OF ENERGY-LINKED FUNCTIONS OF ISOLATED
RAT LIVER MITOCHONDRIA BY AMIODARONE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ประกร
จันทพงษ์, 100 หน้า. ISBN 974-581-111-4

Amiodarone มีผลสองอย่างต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้
สับสเตรทชนิด NAD^+ -linked หรือ succinate กล่าวคือ มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาในระยะแรก และตามด้วย
การยับยั้งการหายใจในระยะหลัง พบว่า amiodarone มีฤทธิ์บางประการที่มีลักษณะคล้าย DNP เช่น
ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ถูกยับยั้งโดย oligomycin, ลดอัตราส่วน ADP/O และค่า RCI และสามารถ
กระตุ้น ATPase activity ที่ถูกยับยั้งโดย oligomycin ได้เช่นเดียวกับ DNP แต่อย่างไรก็ตาม
การเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ยับยั้งของ amiodarone
ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างไปจาก DNP amiodarone สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย (ทั้ง
state 4, state 3 และ state 3u respiration) เมื่อใช้สับสเตรทชนิด NAD^+ -linked หรือ
succinate แต่ไม่มีผลยับยั้งการหายใจเมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท ผลเหล่านี้
สนับสนุนรายงานที่ว่า amiodarone ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ระดับของ
complex I และ complex II DTT ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงทั้งฤทธิ์ยับยั้งและฤทธิ์การยับยั้งการ
หายใจของไมโทคอนเดรียโดย amiodarone Mg^{2+} มีผลยับยั้งในขณะที่ bovine serum albumin
มีผลเพิ่มฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย amiodarone ไม่มีผลต่อ
การทำงานของเอนไซม์ MAO กลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของ amiodarone ต่อการหายใจ
ของไมโทคอนเดรียยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของ
ไมโทคอนเดรียน่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของสารนี้

ภาควิชา เภสัชวิทยา
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

C375344 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD : MITOCHONDRIA/AMIODARONE/CALCIUM TRANSPORT/ATPase/MONOAMINE
OXIDASE

NUTTASIRI SAEYIB : INHIBITION OF ENERGY-LINKED FUNCTIONS OF ISOLATED
RAT LIVER MITOCHONDRIA BY AMIODARONE. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.
PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D. 100 pp. ISBN 974-581-111-4.

Amiodarone had a biphasic effect on respiratory activity of rat liver mitochondria supported by NAD^+ -linked substrates or succinate. Initially, amiodarone uncoupled the mitochondria which was followed by marked inhibition of state 4 respiration. This compound exhibited some DNP-like effects on oxidative phosphorylation, e.g., the uncoupling effect was not inhibited by oligomycin, lowered ADP/O ratio as well as RCI value and activated the oligomycin-sensitive ATPase activity. However, in contrast to DNP, the amiodarone-induced uncoupling activity is almost unaffected by varying pH of incubation medium. Amiodarone inhibited mitochondrial respiration (state 4, state 3 and state 3u) supported by NAD^+ -linked substrates or succinate but did not affect respiration when ascorbate + TMPD were electron donors. These results supported previous finding that amiodarone inhibited the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. DTT did not alter the uncoupling and inhibitory effects of this compound on mitochondrial respiration. The inhibition of mitochondrial respiration induced by amiodarone was diminished by Mg^{2+} but enhanced by bovine serum albumin. Amiodarone did not inhibit the mitochondrial MAO activity. The molecular mechanism of the biphasic effect of amiodarone is unclear. Nevertheless, the mitochondrial actions of amiodarone are likely to be involved in the pharmacological and/or toxicological effects of this compound.

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา.....
สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....
ปีการศึกษา.....2534.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ
รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำ
แนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา และเนื่องจากท่านในการวิจัยครั้งนี้
บางส่วนได้รับมาจากทงงบประมาณแผ่นดิน จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วาริวิธน์ หัวหน้าภาควิชา
เภสัชวิทยา ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ และขอขอบ
พระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมชาย เมฆอรุณเรือง หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี ที่อนุญาตให้ใช้
เครื่อง refrigerated centrifuge ตลอดการวิจัย

ณัฐศิริ แซ่ยิบ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่	
1 บทนำ	1
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของ amiodarone	1
การหายใจและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย	10
2 อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย	23
สัตว์ทดลอง	23
การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับของหนูขาว	23
การ incubate ไมโทคอนเดรียและ incubation medium	25
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ	27
การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ, อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ	28
การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย	32
การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย	34
การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี .	35
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 ผลการวิจัย	
ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนู ขาว	38
1. ผลของ amiodarone ในขนาดต่าง ๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย	38
2. ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดย amiodarone, ADP และ DNP	74
3. ผลของ amiodarone ในขนาด 20 μ M และ 50 μ M ที่มีต่อค่าดัชนีความคมการหายใจ และอัตราส่วน ADP/O	74
3.1 กรณีที่ให้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	74
3.2 กรณีที่ให้ succinate เป็นสับสเตรท	74
4. ผลของสารบางอย่างต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย	75
4.1 ผลของ oligomycin ที่มีต่อผลการกระตุ้นการหายใจโดย amiodarone เมื่อให้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	75
4.2 ผลของ DTT และ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย	75
ผลของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาว	76
1. ผลของ amiodarone ต่อ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย	76
1.1 กรณีที่ให้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	76
1.2 กรณีที่ให้ succinate เป็นสับสเตรท	76
1.3 กรณีที่ให้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท	76
2. ผลของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อให้ NAD^+ -linked substrates ชนิดต่าง ๆ	77
2.1 กรณีที่ให้ β -hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท	77
2.2 กรณีที่ให้ pyruvate เป็นสับสเตรท	77
2.3 กรณีที่ให้ α -ketoglutarate เป็นสับสเตรท	77

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 ผลของ amiodarone ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรทโดยเปรียบเทียบกับ DNP	78
4 ผลของสารบางอย่างและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน incubation medium บางประการต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย ...	78
4.1 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium	78
4.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone	79
4.3 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	79
4.4 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท	80
4.5 ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone	80
4.6 ผลของ bovine serum albumin	81
ผลของ amiodarone ที่มีต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย	81
ผลของ amiodarone ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP	82
ผลของ amiodarone ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity	83
4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	84
เอกสารอ้างอิง	92
ประวัติผู้เขียน	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงถึง mitochondrial membrane transport system	13
2	แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย	13
3	ผลของ amiodarone ต่อค่าดัชนีความคมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท	45
4	ผลของ amiodarone ต่อ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท	50
5	ผลของ amiodarone และ DNP ต่ออัตราการให้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท	55
6	ผลของ amiodarone เปรียบเทียบกับผลของ DNP ในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย	68

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงสูตร โครงสร้างทางเคมีของ amiodarone	2
2	แสดงลักษณะ โครงสร้าง โดยทั่วไปของ ไมโทคอนเดรีย	12
3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs cycle, respiratory chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation	12
4	แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระในขณะที่อิเล็กตรอนถูกส่งผ่านในลูกโซ่การหายใจ และตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ	15
5	แสดงการเตรียม inverted submitochondrial vesicle เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง โครงสร้างและหน้าที่ของ ไมโทคอนเดรีย ..	18
6	แสดง โครงสร้างและองค์ประกอบของ เอนไซม์ ATP synthase (F_1F_0 -ATPase)	18
7	แสดงถึงการควบคุมระหว่างการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจกับการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน อธิบายโดย chemiosmotic theory	20
8	แสดงถึงปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ใช้ electrochemical gradients ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ	20
9	แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation	24
10	แสดง incubation chamber ซึ่งมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลออกมาได้ทันทีทาง oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)	25
11	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI	29
12	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O	29
13	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่าง ๆ	29
14	ผลของ amiodarone ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นลิบสเตรท	40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	Dose-response curve ของ amiodarone ที่มีต่อ state 4 respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท	42
16	ผลเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดย amiodarone ADP และ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็นสับสเตรท	44
17	ผลของ oligomycin ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย	47
18	ผลของ DTT และ DTNB ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย	49
19	ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ β -hydroxybutyrate และ pyruvate เป็นสับสเตรท	52
20	ผลของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ α -ketoglutarate เป็นสับสเตรท	54
21	ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย	57
22	ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย	59
23	ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	61
24	ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท	63
25	ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	65
26	ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ amiodarone ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	67

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
27	ผลของ amiodarone ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดย แคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นลิบสเตรท	69
28	ผลของ amiodarone ต่อ monoamine oxidase activity ของ ไมโทคอนเดรีย	72

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มคอ.	=	ไมโครอะตอม
มล.	=	มิลลิลิตร
Amio	=	amiodarone
ADP	=	adenosine-5'-diphosphate
ATP	=	adenosine-5'-triphosphate
Alc	=	alcohol (ethanol)
BSA	=	bovine serum albumin
°C	=	degree Celsius
Ca ²⁺	=	calcium ion
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTNB	=	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate
DTT	=	dithiothreitol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N,N, N'N'-tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	=	reduced flavin adenine dinucleotide
FMN	=	flavin mononucleotide
g	=	centrifugal force unit (gravity)
Glu	=	glutamate
H ⁺	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
K ⁺	=	potassium ion
Mal	=	malate
M	=	molar
mM	=	millimolar

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

mg	=	milligram
Mg ²⁺	=	magnesium ion
min	=	minute
ml	=	milliliter
mOsm	=	milliosmolar
uatom	=	microatom
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
NAD ⁺	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
natom	=	nanoatom
O	=	oxygen
Oligo	=	oligomycin
Par	=	pargyline
P _i	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute
suc	=	succinate
TMPD	=	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
Tyr	=	tyramine
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent