บทที่ 1

บทนำ

คนไทยสมัยก่อนมีวิถีชีวิตที่สัมพันธ์และสอดคล้องกับธรรมชาติรอบตัว คนไทยมีประสบการณ์ในการสังเกต เรียนรู้และถ่ายทอดวิถีชีวิตจากคนรุ่นก่อนมายังคนรุ่นหลังอย่างต่อเนื่อง คนไทยในแต่ละภาคได้เลือกสรรไม้พื้นเมืองมาเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพได้อย่างเหมาะสม (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2538)

สมุนไพรเป็นสิ่งที่คุ้นเคยกับคนไทยมานานแล้วทั้งในด้านยาบำบัดรักษาโรค เป็นอาหารและเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง แม้ในบางช่วงที่ผ่านมาความสนใจที่จะใช้สมุนไพรอาจลดลงไปบ้าง แต่ในปัจจุบันสมุนไพรกลับมาได้รับความสนใจอีกครั้งหนึ่ง โดยจะเห็นได้จากการที่รัฐบาลโดยกระทรวงสาธารณสุขได้สนับสนุนให้ประชาชนปลูกสมุนไพรภายในหมู่บ้านเพื่อใช้รักษาตนเองและสนับสนุนให้มีการนำสมุนไพรมาใช้รักษาผู้ป่วยในโรงพยาบาลชุมชน จึงนับเป็นนิมิตหมายอันดีที่ประชาชนจะให้ความสนใจใช้สมุนไพรอย่างจริงจัง เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการบำบัดรักษาโรค เพื่ออนุรักษ์ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมและเพื่อประหยัดรายจ่ายของครอบครัว ในการซื้อยาแผนปัจจุบันมาใช้ อีกทั้งจะเป็นการช่วยประเทศชาติในการลดดุลการค้าที่จะต้องสั่งซื้อยาจากต่างประเทศเข้ามาใช้ได้อย่างมากอีกด้วย (วันดี กฤษณพันธ์, 2537)

อย่างไรก็ตามการศึกษาสมุนไพรในทางวิทยาศาสตร์นั้น ได้มีการศึกษาถึงการสกัดและแยกสารสำคัญต่าง ๆ ที่คาดว่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรนั้น ๆ ตัวอย่างเช่น quinine ซึ่งเป็น alkaloid ที่ได้จากเปลือกต้น *Cinchona succirubra* และ atropine เป็น anticholinergic alkaloid ที่ได้จากรากของต้น *Atropa belladonna* เป็นต้น โดยมีการศึกษาทางพฤกษเคมีเพื่อหาสูตรโครงสร้างสมุนไพรเหล่านี้ และการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารที่สกัดออกมาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) หรือชิ้นส่วนของอวัยวะของสัตว์ทดลอง (*in vitro*)

ในการทำวิจัยครั้งนี้ จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสำคัญที่นำมาสกัดและทำให้บริสุทธิ์จากสมุนไพรที่ชื่อ หนอนตายหยาก ซึ่งจะเป็นการศึกษาฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

หนอนตายหยาก *Clitoria macrophylla* Wall.

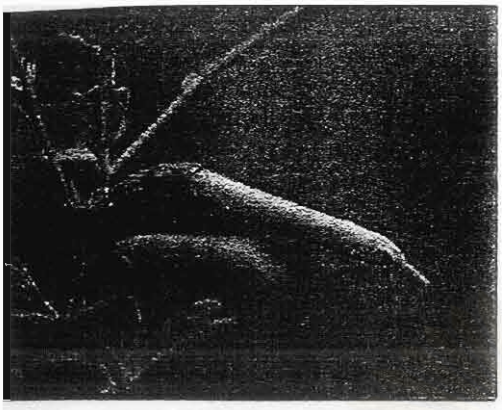
ชื่อพ้องคือ *Clitoria hanceana* Hemsl. จัดอยู่ในกลุ่มพืชมีดอก สามารถจำแนกหมวดหมู่ตามพฤกษานุกรมวิชานได้ดังนี้

Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Subdivision	Angiospermae
Class	Dicotyledoneae
Order	Rosales
Family	Fabaceae
Subfamily	Papilionoideae
Genus	Clitoria
Species	*Clitoria macrophylla* Wall.

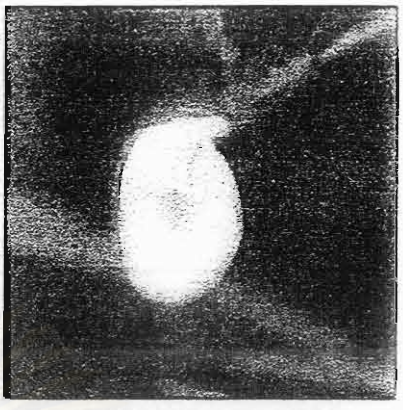
(Fernald, 1950)

วงศ์ย่อย Papilionoideae เป็นพืชมีดอก พบว่ากระจายทั่วไปทั่วโลก ลักษณะทั่วไปเป็นพืชที่ลำต้นมีเนื้ออ่อน (herbs) ไม้พุ่ม (shrubs) หรือไม้ยืนต้น (trees) ใบเป็นแบบใบเดี่ยวหรือใบรวม ส่วนของดอกไม่ได้สัดส่วนกัน (zygomorphic) กลีบนอกมี 5 กลีบโดยปกติจะติดกัน กลีบในมี 5 กลีบ โดยทั่วไปขนาดไม่เท่ากัน ซ้อนเหลื่อมไม่ติดกัน 2 กลีบหน้าตรงด้านล่างติดกันตอนโคน เกสรตัวผู้จะติดอยู่ระดับเดียวกันกับกลีบใน และมี 10 อัน อาจจะติดเป็นแท่ง (monodelphous) หรือติดกันเป็น 2 กลุ่ม (diadelphous) อับเกสรตัวผู้จะแตกตามยาว ผลเป็นฝัก (legume) หรือฝักไม่แตกเมื่อสุก (indehiscent) บางครั้งจะติดกันและแตกออกปล้องละ 1 เมล็ด เมล็ดจะไม่มีหรือขาดอาหารที่สะสมภายในเมล็ด (endosperm) (Hutchinson, 1959)

Clitoria macrophylla Wall. พบได้มากในแถบภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ดังนี้ หนอนตายหยาก อัญชันป่า หำพะยาว เอื้องชันป่า (จังหวัดเชียงใหม่) หมากแปบผี(จังหวัดเลย) (เต็ม สมิตินันทน์, 2523)



(1)

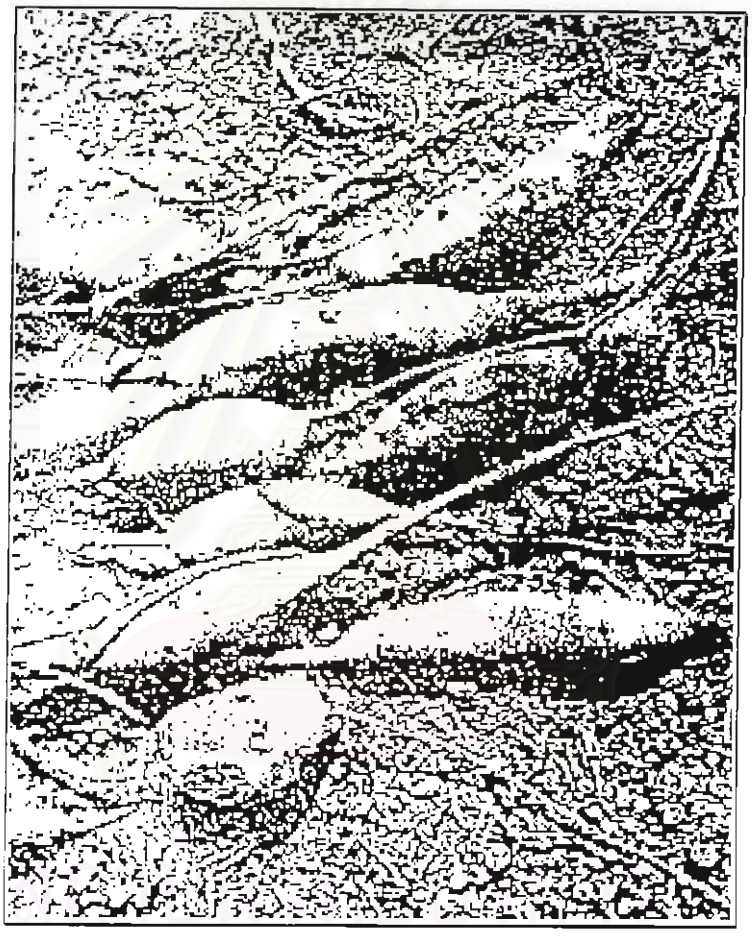


(2)

(3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของต้นหนอนตายหยาก (1) ผล, (2) ดอก, (3) ลำต้นเป็นไม้เลื้อย



รูปที่ 2 แสดงลักษณะรากของสมุนไพรหนอนตายหยาก

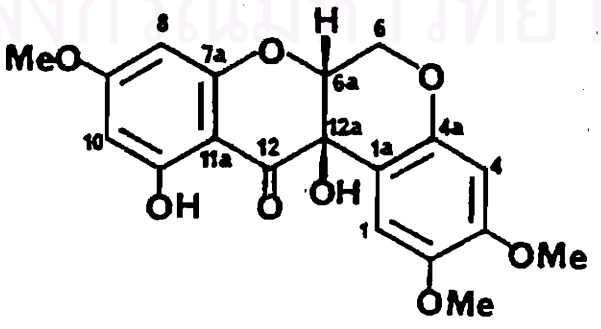
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *Clitoria macrophylla* Wall. อยู่ในวงศ์ Fabaceae เป็นไม้เลื้อย ใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ใบย่อยรูปขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมไข่กลับ กว้าง 3-6 ซม. ยาว 7-15 ซม. เนื้อใบหนาและเหนียว ท้องใบสีเทา ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ กลีบดอกรูปดอกถั่ว สีขาว ผลเป็นฝักยาวประมาณ 5 ซม. แบนนูน มี 6-8 เมล็ด (วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล และคณะ, บรรณาธิการ, 2539)

ในประเทศไทยสมุนไพรชื่อหนอนตายหยากนั้นยังพบในพืชวงศ์ Stemonaceae ซึ่งจะพบว่ามีสารพวก alkaloid เรียกว่า stemonine ส่วน *Clitoria macrophylla* Wall. มีชื่อว่าหนอนตายหยากเช่นกันแต่จากการศึกษาทางด้านพฤกษเคมีครั้งแรกโดยกองวิจัยทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการสกัดรากของ *Clitoria macrophylla* Wall. ด้วย chloroform ไม่พบสารพวก alkaloid แต่พบสารสำคัญซึ่งเป็น rotenoid คือ clitoriacetal (Taguchi , Panida Kanchanapee and Thanomwang Amatayakul, 1977)

นอกจากนี้มีการนำรากของหนอนตายหยากมาศึกษาต่อ พบว่าสามารถแยก rotenoid ตัวใหม่ คือ 6-deoxyclitoriacetal มีลักษณะผลึกเป็นรูปดอกกุหลาบมีสีขาว (white rosette crystals) มีจุดหลอมเหลวที่ 130-131 ^{0}C เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ clitoriacetal พบว่ามีความคล้ายคลึงในโครงสร้างของ 6-deoxyclitoriacetal โดยเมื่อนำไปศึกษาต่อโดยใช้ HR mass spectrum พบว่าสูตรโมเลกุลของ 6-deoxyclitoriacetal คือ $C_{19}H_{18}O_5$ มีน้ำหนักโมเลกุล 374 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า clitoriacetal 16 mu แสดงให้เห็นว่ามี oxygen น้อยกว่า clitoriacetal 1 อะตอม พบสัญญาณของ methylene carbon resonance ที่ δ 63.5 โดยใช้ ^{13}C - NMR spectrum ทำให้ทราบว่าเป็นอนุพันธ์ 6-deoxy ของ clitoriacetal (Lin et al., 1992)



รูปที่ 3 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 6-deoxyclitoriacetal (Lin et al., 1992)

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

พืชวงศ์ย่อย Papilionoideae ในประเทศไทยที่มีรายงานว่าใช้เป็นสมุนไพรและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ อันได้แก่

- *Abrus precatorius* Linn. หรือ มะกล่ำตาหนู ในเมล็ดมีสาร abrin โดยเฉพาะที่เปลือกมีสารนี้สะสมในปริมาณสูง ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดท้อง และจะทำให้ตับและไตบวม น้ำท่วมปอด ชักและตายในที่สุด (วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, 2532) เมื่อสกัดสารจากเมล็ดด้วย 50% alcohol และให้ทางปากแก่หนูขาว (abino rats) เพศผู้ในขนาด 250 mg/ml น้ำหนักตัว พบว่ากดการเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิ (ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์, 2534)
- *Derris elliptica* Bentham. พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รากของหางไหลมีสารจำพวก rotenone ซึ่งเป็นพิษต่อปลา ชาวพื้นเมืองใช้จับปลาโดยทำให้ปลาเป็นอัมพาต (Klaassen, 1996) ในประเทศไทยมีสมุนไพรสกุล Derris ที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง คือ หางไหลหรือโล่ติ้น (*D. elliptica*, หางไหลแดง และ *D. malaccensis*, หางไหลขาว) ชาวบ้านรู้จักนำรากหางไหลซึ่งมีน้ำยาสีขาวมาทุบแช่น้ำ แล้วนำน้ำที่ได้มาใช้รดต้นผักตามสวนผัก เพื่อฆ่าแมลงและตัวหนอนตลอดจนใช้เบื่อปลาในห้วยหนองคลองบึงมาช้านานแล้ว นอกจากนี้หางไหลยังใช้เป็นยาฆ่าหิด เหา เรือด และไร (เอมอร โสมนะพันธุ์, 2534) rotenone ใช้เป็นยาฆ่าแมลงอย่างกว้างขวางซึ่งเป็นพิษน้อยในมนุษย์ (Gossel, 1994) การใช้น้ำสกัดจากรากหางไหลเป็นยาฆ่าแมลงเป็นที่ปลอดภัยแก่ผู้ใช้ เพราะสาร rotenone สลายตัวได้ง่าย ไม่ติดค้างอยู่บนพืชที่ใช้ฉีด จึงเหมาะเป็นยาฆ่าแมลงแก่พืชผักสวนครัวและพืชปลูกในบ้าน (พยอม ตันติวัฒน์, 2521)
- *Clitoria ternatea* Linn. พบว่าสารสีน้ำเงินในกลีบดอกเป็นสารจำพวก anthocyanin (วันดี กฤษณพันธ์, 2538) เมล็ดใช้เป็นยาระบาย แต่มักทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน รากมีรสขม ใช้เป็นยาขับปัสสาวะและใช้เป็นยาระบายเช่นกัน แต่นิยมใช้รากของอัญชันชนิดที่มีดอกสีขาว (พยอม ตันติวัฒน์, 2521)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ชาวเขาเผ่าอีก้อ ใช้หนอนตายหยากทั้งต้น ตำพอก ห้ามเลือด รักษาแผลสด แผลฉลอก (วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล และคณะ, บรรณาธิการ, 2539) ส่วนในเมืองไทยใช้เป็นยาแผนโบราณในการรักษาโรคผิวหนัง (skin disease) ปราบศัตรูพืชในทางเกษตรกรรมและกสิกรรมการเลี้ยงสัตว์ จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของรากของ *Clitoria macrophylla* Wall. พบสาร Clitoriacetal ($C_{19}H_{18}O_9$) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักจำพวก rotenoid ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory และ antipyretic activity ต่อมาได้มีการแยก rotenoid ตัวใหม่ที่นอกเหนือจาก Clitoriacetal คือสาร 6-deoxyclitoriacetal เมื่อนำมา ทดสอบในหลอดทดลองพบว่า มี strong cytotoxic activity ต่อ culture P-388 lymphocytic leukemia cells แต่ไม่มีผลต่อ cultured KB cells (Taguchi, Panida Kanchanapee and Thanomwang Amatayakul, 1977; Lin et al., 1992)

นอกจาก 6-deoxyclitoriacetal มี cytotoxic effect ต่อ cell มะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิดแล้ว จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารนี้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจากอวัยวะต่าง ๆ ที่แยกจากกายพบว่า 6-deoxyclitoriacetal 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาวทั้งที่เกิดขึ้นเองและเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine (ACh) 5×10^{-6} M, oxytocin 5×10^{-3} IU/ml เมื่อใช้ 6-deoxyclitoriacetal 0.4 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย serotonin (5 - HT) 1×10^{-8} - 1×10^{-4} M และ Norepinephine (NE) 1×10^{-11} - 1×10^{-7} M แบบความเข้มข้นสะสม และยังสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาว จากการกระตุ้นด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์แบบความเข้มข้นสะสม (0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM) 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 0.15 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภาได้เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine (Ach) 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M และ histamine 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M จากการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวจากการกระตุ้นต่าง ๆ ได้ ซึ่งน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ผ่านทั้งทาง receptor operated Ca^{2+} channel และ voltage - dependent Ca^{2+} channel (การะเกด สายบรรดาศักดิ์, 2540)

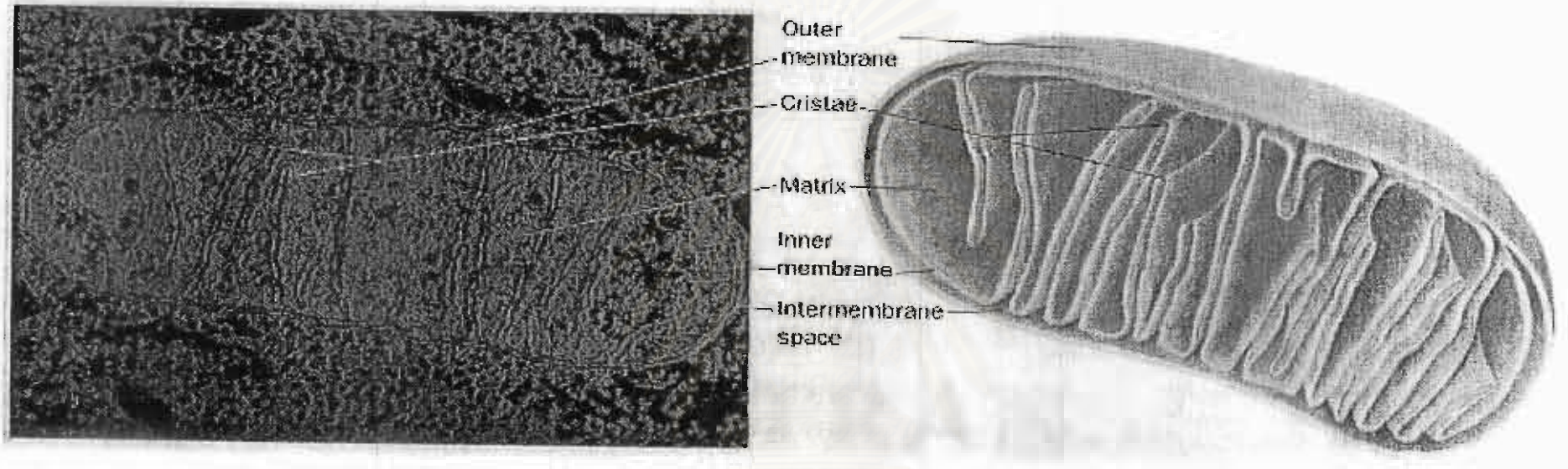
ส่วนฤทธิ์อื่น ๆ ยังไม่มีข้อมูล ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ *in vitro*

การหายใจของไมโตคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน
(Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญภายในเซลล์และเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (powerhouse of the cell) เนื่องจากมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย อาทิเช่น ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle or citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้ได้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน(aerobic eukaryotic) (Avers,1986)

ไมโตคอนเดรียจะมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ เช่น มีลักษณะกลม(football-shaped) ในเซลล์ตับ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) ในเซลล์ไต และใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างที่ซับซ้อน (complex irregular structure) ในยีสต์ นอกจากนี้ขนาดและจำนวนที่พบจะแตกต่างกันไป มักพบไมโตคอนเดรียอยู่ใกล้กับโครงสร้างของเซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับแหล่งของเชื้อเพลิง (fuel) ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่าง ๆ (Lehninger, 1975) และแม้ขนาด จำนวน รูปร่างจะแตกต่างกัน แต่โดยลักษณะรวม ๆ แล้วจะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายใน ผนังชั้นในจะห่อหุ้มของเหลวมีลักษณะคล้ายเจล (gel) เรียกว่า matrix

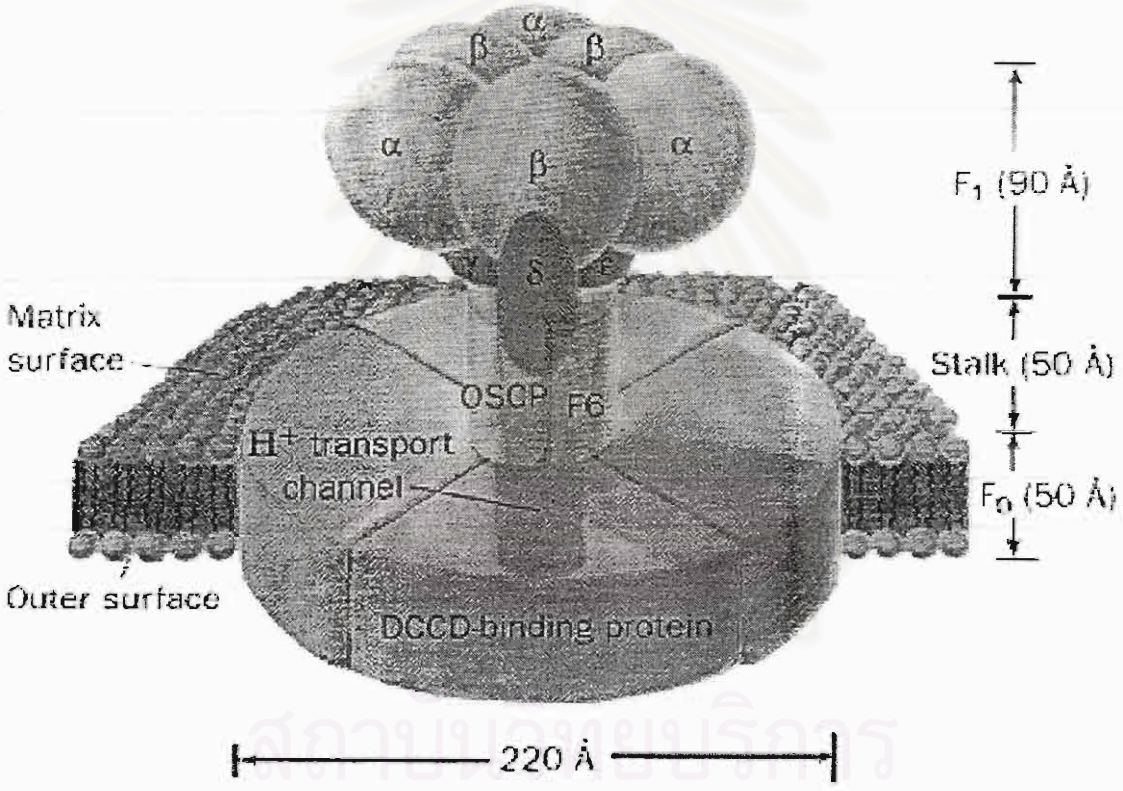
ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition), permeability และเอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะของผิวที่เรียบ (smooth and unfold) หุ้มล้อมรอบผนังชั้นใน ประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งอิออนต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ เอนไซม์ที่อยู่ผนังชั้นนอกคือ monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ผนังชั้นในจะยืดหยุ่น (elastic) และมีพื้นที่ผิวมากกว่า เนื่องจากมีการพับ (fold) เข้าไปใน matrix ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากขึ้น ส่วนภายในผนังชั้นในประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และไขมันเป็นส่วนน้อย มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอิออนต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable)



(a) (b)

รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของไมโตคอนเดรีย (Voet and Voet, 1990)
(a) ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอน (b) ภาพจำลองการตัดขวาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase (F_0F_1-ATPase) (Voet and Voet, 1990)

แต่จะยอมให้ เฉพาะ O_2, CO_2 และ H_2O รวมทั้ง respiratory chain protein, transport protein ได้แก่ ATP, ADP, pyruvate, Ca^{2+} และ phosphate ดังนั้นการผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) (Lehninger, 1975; Sartorell, Erecinska and Wilson, 1981; Voet and Voet, 1990) ส่วนภายในผนังชั้นในจะมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme และ enzyme ATPsynthase ส่วนใน matrix นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์แล้วยัง ประกอบด้วย DNA, ribosome และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

บริเวณ cristae เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จะเห็นโครงสร้างทรงกลมที่เรียกว่า spherical knob หรือ headpieces ยื่นออกมาจากผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase (ATP synthase and/or ATP hydrolase) เรียกว่า F_1 (coupling factor one) ประกอบด้วยโปรตีน (peripheral membrane protein) มีคุณสมบัติละลายน้ำ (water-soluble) มีโปรตีน 5 subunit ได้แก่ α_3, β_3, γ, δ และ ε น้ำหนักโมเลกุล 360,000-380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ซึ่งส่วนของ F_1 subunit จะยื่นเข้าไปใน matrix โดยติดอยู่กับผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 5) ในสภาวะปกติ เมื่อมี Mg^{2+} เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น ADP + Pi อย่างช้า ๆ แต่จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi (รูปที่ 6) ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase คือ F_0 (membrane sector) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000 daltons เป็นส่วนที่ฝังอยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย คุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water- insoluble) ประกอบด้วย 3 subunit คือ a, b และ c รวมทั้งส่วนของ DCCD-binding proteolipid F_0 ทำหน้าที่เป็น H^+ conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space โดยทำหน้าที่เป็นช่องที่ส่งผ่านโปรตอนเข้าออก membrane ได้ เมื่อนำ 2 subunit มารวมกัน จะเรียกว่า F_0F_1 - ATPase มีรูปร่างเป็นแบบดรัมเบล (dumbbell-shaped) เป็นส่วนที่สังเคราะห์ ATP ได้ ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง F_0 และ F_1 เรียก stalk sector เป็นส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase เช่นกัน ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ OSCP (oligomycin-sensitivity-conferring protein) และ coupling factor 6 (F_6) F_0 ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) โดยขัดขวางการขนส่งโปรตอนของ F_0 ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยา ATP synthase ในส่วนของ oligomycin จะไปจับกับส่วน subunit ของ F_0 (แต่ไม่จับกับ OSCP) และ DCCD ทำปฏิกิริยากับ single Glu residue ซึ่งเป็น 1 ใน subunit ของ F_0 ใน mammalian (Avers, 1986; Senior, 1988; Stryer, 1988; Futai, Noumi and Maeda, 1989; Voet and Voet, 1990; Abeles, Frey and Jencks, 1992; Devlin, 1992)

ตารางที่ 1 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย (Devlin, 1992)

Outer membrane	**Intermembrane space**	Inner membrane	**Matrix**
Monoamine oxidase	Adenylate kinase	F_1-ATPase	Citrate synthase
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside diphosphate kinase	Succinate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase
Nucleoside diphosphate kinase		Cytocromes b, c_1, c, a, a_3	Succinyl CoA synthetase
Phospholipase A		NADH dehydrogenase	Malate dehydrogenase
Fatty acyl CoA synthetases		Carnitine : acyl CoA transferase	Isocitrate dehydrogenase
NADH : cytochrome c reductase (rotenone-insensitive)		β-Hydroxybutyrate dehydrogenase	Fatty acid β-oxidation system
Choline phosphotransferase		Adenine nucleotide translocase	α-Ketoglutarate dehydrogenase
		Mono-, di-, tricarboxylate translocase	Aconitase
		Glutamate-aspartate translocase	Fumarase
			Glutamate dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate transaminase
			Ornithine transcarbamoylase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

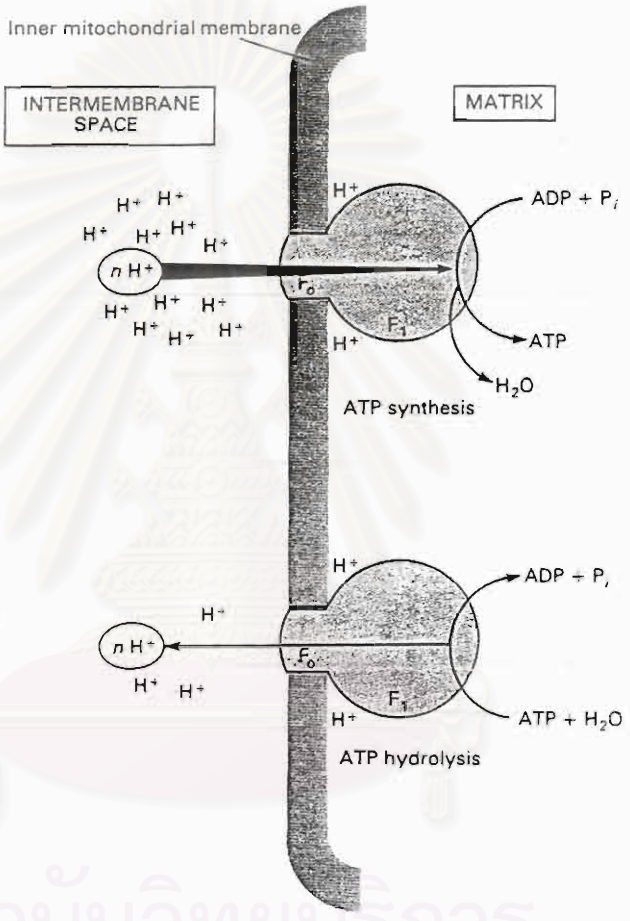
ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่หายใจ 4 complex ที่อยู่ภายในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Aver, 1986)

Complexes	Components
I, NADH dehydrogenase complex	NAD
	FMN
	Iron sulfur (FeS) centers
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
II, Succinate dehydrogenase complex	FAD
	Iron sulfur (FeS) centers
	Cytochrome b_{558}
III, Cytochrome *b*-c_1 complex	Cytochrome *b*
	Cytochrome c_1
	Nonheme iron protein
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
IV, Cytochrome oxidase complex	Cytochrome *a*
	Cytochrome a_3
	Copper
	Phospholipids

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงถึงส่วนต่าง ๆ ของ electron-transfer complexes (Abeles, Frey and Jencks, 1992)

Proteins	Molecular weight	Cofactors	Number of proteins
Complex I	1×10^6	Fe_4S_4, Fe_2S_2, FMN	26
Complex II	> 100,000	Fe_4S_4, Fe_2S_2, FAD	4
Complex III	450,000	2 Cyt *b*, Cyt c_1	> 6
Complex IV	200,000	Cyt *a*, Cyt a_3, Cu	> 7



รูปที่ 6 แสดง F_0-F_1 ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP **(De Robertis and De Robertis, 1987)**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรียนั้น เริ่มจากสารอาหารต่าง ๆ ที่รับประทานเข้าไปได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ถูกย่อยสลายให้ได้โมเลกุลเล็ก ๆ เช่น โปรตีนถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส และไขมันถูกย่อยจนได้กรดไขมัน (fatty acid) สารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิสมเพื่อให้ได้ acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediates) ที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Krebs'cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวัฏจักรเครปส์ ขุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ไปรีดิวซ์ (reduce) NAD^+ และ FAD ไปเป็น $NADH + H^+$ และ $FADH_2$ (Darnell, Lodish and Baltimore, 1986) ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain or electron transport chain) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด (Lehninger, 1975) คือ

1. Pyridine-linked dehydrogenase ได้แก่ β-hydroxybutyrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase เป็นต้น ซึ่งต้องการ NAD^+ หรือ $NADP^+$ ตัวใดตัวหนึ่งเป็น coenzyme ยกเว้น glutamate dehydrogenase ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง NAD^+ หรือ $NADP^+$

2. Flavin-linked dehydrogenase หรือ flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเลคตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenase จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenase ตรงที่จะ bond กับเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะ bound กับ coenzyme

3. Iron-sulfur protein ประกอบไปด้วยเหล็ก (iron และ acid-labile sulfur) ได้แก่ ferredoxin

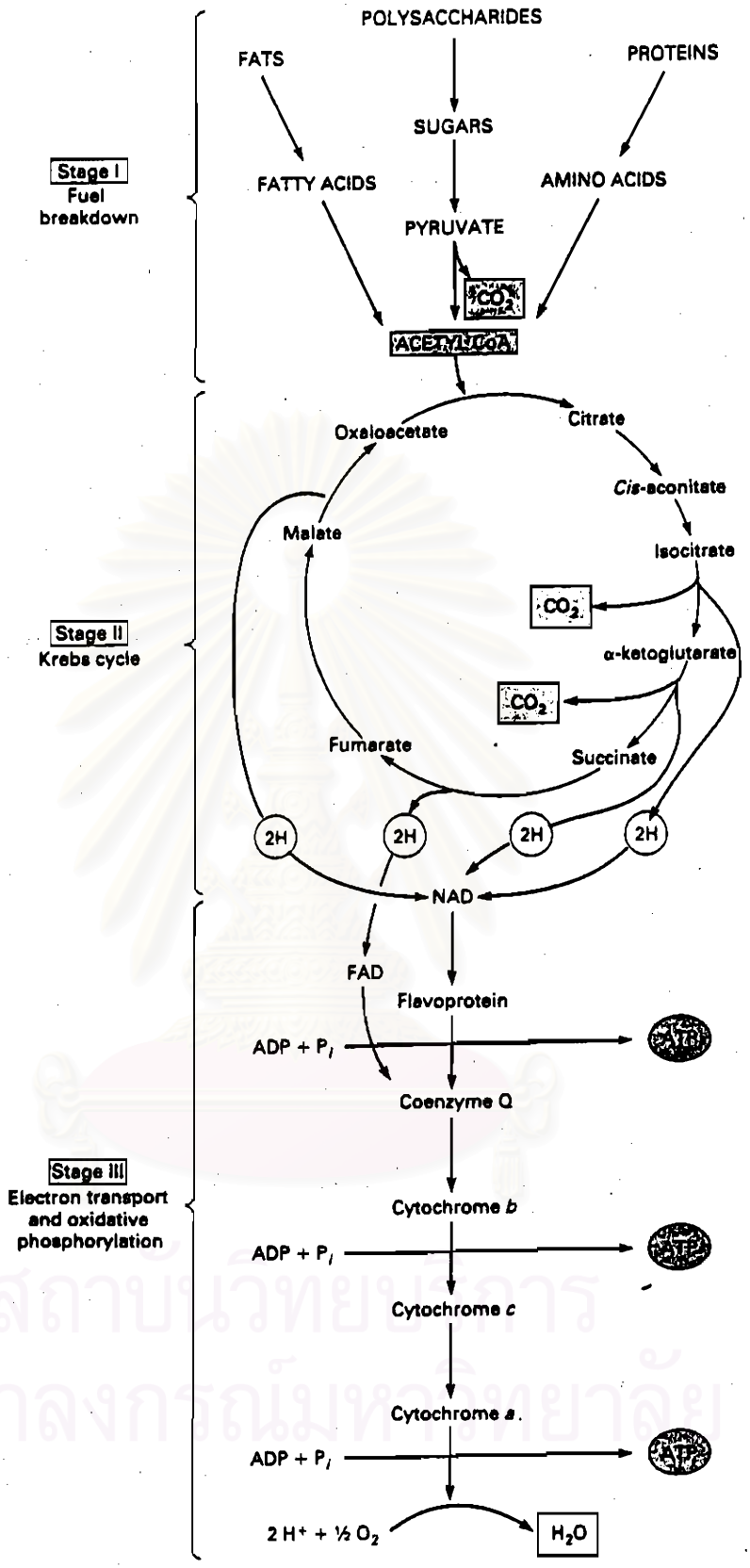
4. ระบบ cytochromes ประกอบด้วย iron-porphyrin เป็น prosthetic groups ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dehydrogenase systems ต่าง ๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b, c_1, c, a, a_3

5. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone

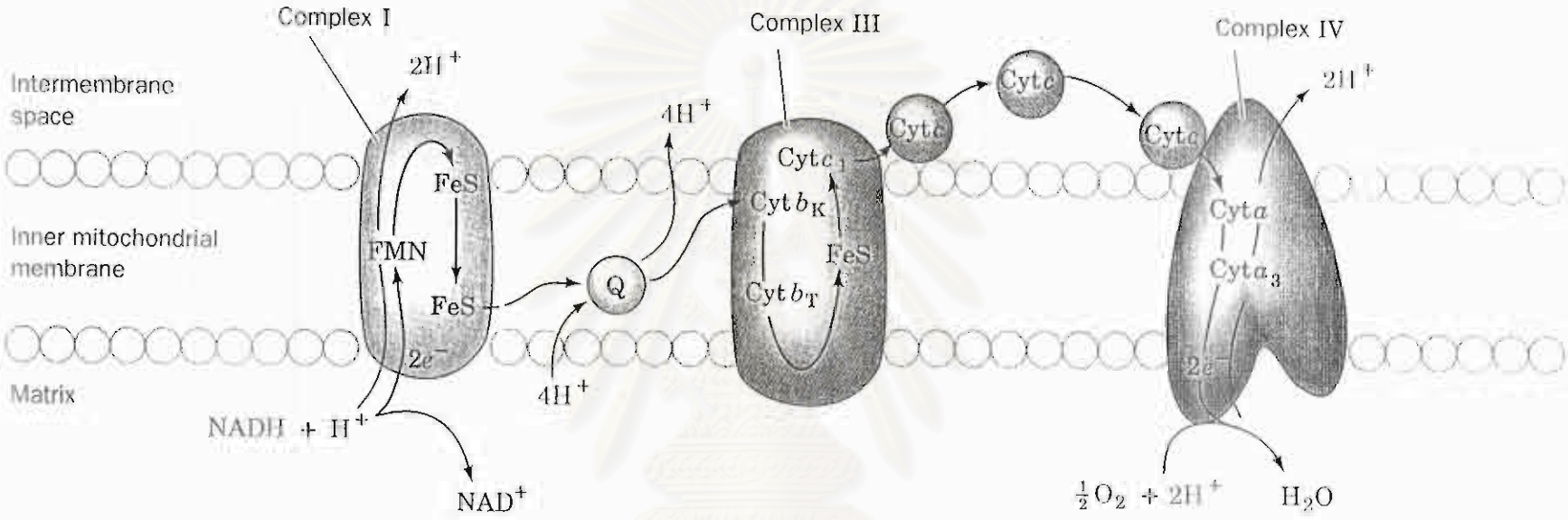
การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชัน (oxidative - reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับ ตามค่า E_0' (พลังงานอิสระ) ของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนและมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H^+ กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 7)

สับสเตรทที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่าง ๆ ของลูกโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ NAD^+ - linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate, α-ketoglutarate ซึ่งสับสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น $NADH + H^+$ จะให้อิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I อีกพวกหนึ่งคือ FAD - linked substrate ได้แก่ saccinate ไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยจะไปรีดิวซ์ FAD เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนแล้วเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1975) ดังรายละเอียดในรูปที่ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle respiration chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (Avers, 1986)



รูปที่ 8 แสดงลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนใน respiratory chain (Voet and Voet,1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ลูกโซ่การหายใจแบ่งออกเป็น 4 complexes (ตารางที่ 2, 3) (Hatefi, 1985) คือ

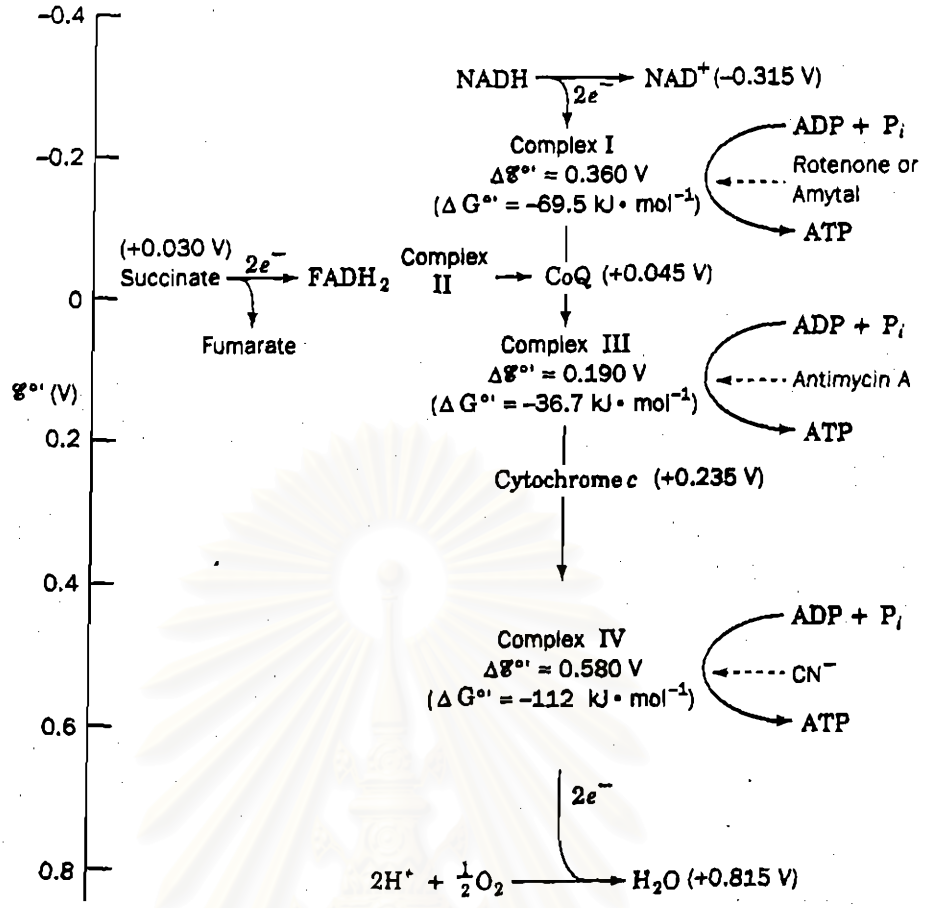
- complex I หรือ NADH : Ubiquinone Oxidoreductase ซึ่งจะ Catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง Ubiquinone, ferricyanide และ NAD

- complex II หรือ Succinate : Ubiquinone Oxidoreductase จะ Catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก Saccinate ไปยัง Ubiquinone (coenzyme Q)

- complex III หรือ Ubiquinol : Cytochrome C Oxidoreductase จะ Catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง Cytochrome C และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่ละกลไกของการส่งผ่านอิเลคตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

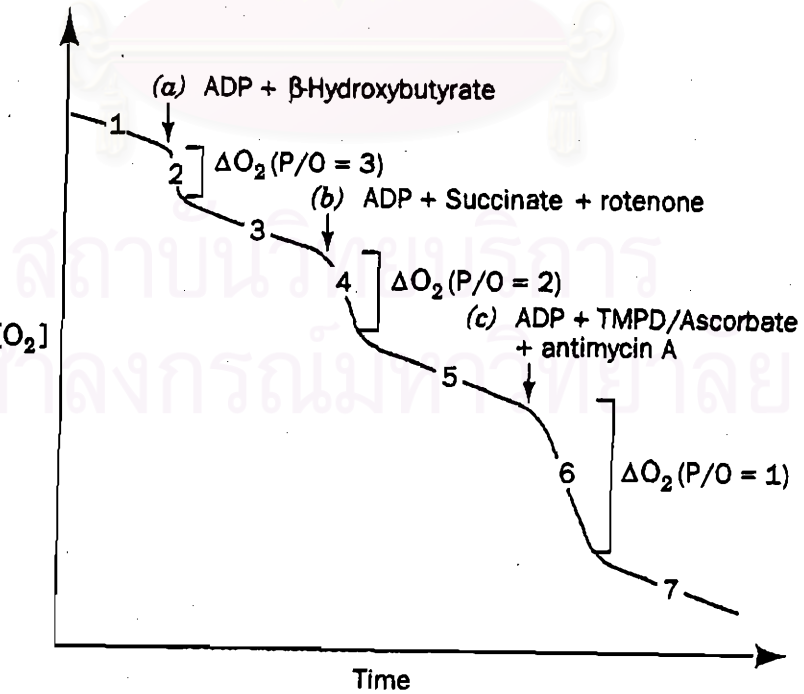
- complex IV หรือ Ferrocytochrome C : Oxygen Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome C ไปยังโมเลกุลออกซิเจน

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจนโดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด จะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมามากพอในการสังเคราะห์ ATP โดยการเกิด phosphorylation ของ ADP เรียกกระบวนการที่เกิดนี้ว่ากระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) จะพบ 3 ตำแหน่งในลูกโซ่การหายใจที่ปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอในการนำไปใช้สังเคราะห์ ATP ตำแหน่งต่าง ๆ และพลังงานอิสระที่ปลดปล่อย ดังแสดงในรูปที่ 9 การคำนวณจาก P/O ratio (ADP/O)ทำให้รู้ว่าการสังเคราะห์โมเลกุลของ ATP นั้น ในแต่ละช่วงของลูกโซ่การหายใจ เท่ากับ 3, 2 และ 1 โมเลกุลตามลำดับ (รูปที่ 10) ส่วนการคำนวณ P/O ratio จะกล่าวรายละเอียดในบทที่ 2



รูปที่ 9 แสดงถึงค่าพลังงานอิสระขณะที่อิเลคตรอนถูกส่งผ่านในช่วงต่าง ๆ ของลูกโซ่การหายใจ

(Voet and Voet, 1990)



รูปที่ 10 แสดงการสังเคราะห์ ATP จากการคำนวณได้จาก P/O ratio ในลูกโซ่การหายใจ

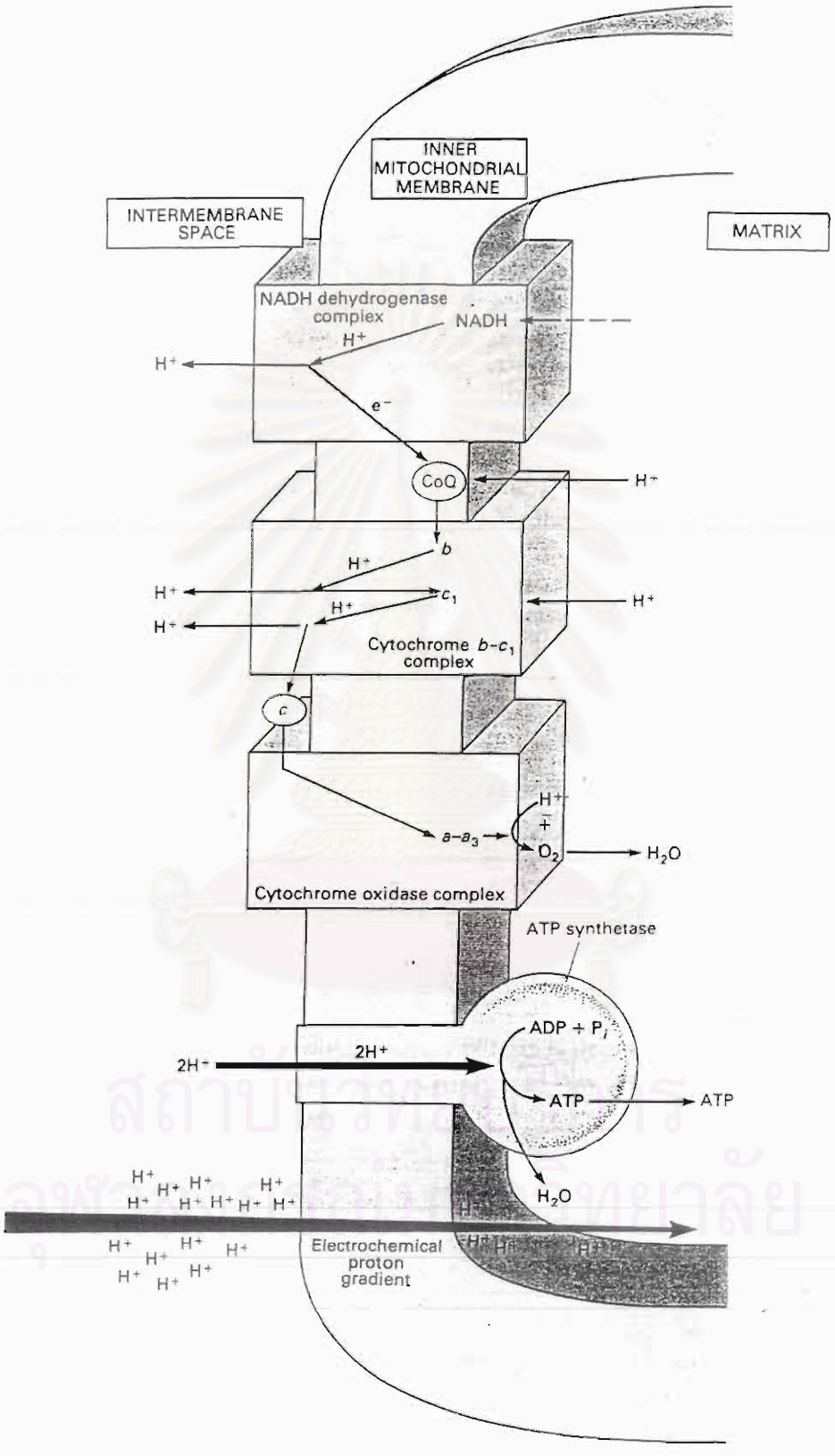
(Voet and Voet, 1990)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสภาวะปกติการส่งผ่านอิเลคตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณีทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้คุณภาพไม่ดี หรือเก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไมโตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ได้แก่ DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorphenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้ สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ซับสเตรทในถูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็ว โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger, 1975)

การสังเคราะห์ ATP ในไมโตคอนเดรียนั้น จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเลคตรอนในถูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอนไปตามถูกโซ่การหายใจนั้นจะมีการสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดมากมายเพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ เช่น chemical coupling, conformational coupling และ chemiosmotic coupling hypothesis แต่ในปัจจุบันแนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับ คือ " chemiosmotic coupling hypothesis " ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี ค.ศ. 1961 (Boyar et al., 1977; Mitchell, 1977; Aver, 1986)

หลักสำคัญของ chemiosmotic coupling hypothesis คือ ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในถูกโซ่การหายใจ จะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) proton(H^+) จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ทำให้เกิด pH gradient และ proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ proton(H^+) ระหว่าง matrix กับ intermembrane space ทั้งนี้เนื่องจาก proton(H^+) มีประจุบวก (positive charge) จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประจุขึ้นที่ผนังชั้นในทำให้เกิด membrane potential และ electrical gradient ซึ่งทั้งหมดรวมเรียกว่า electrochemical gradient หรือ proton motive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือ ไมโตคอนเดรียที่สามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตอนได้ จากนั้นเมื่อ electrochemical gradient จะเป็นส่วนที่ให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi โดย proton (H^+) จากภายนอกจะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F_o และไปกระตุ้น F_1 ให้สร้าง ATP (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Avers, 1986)

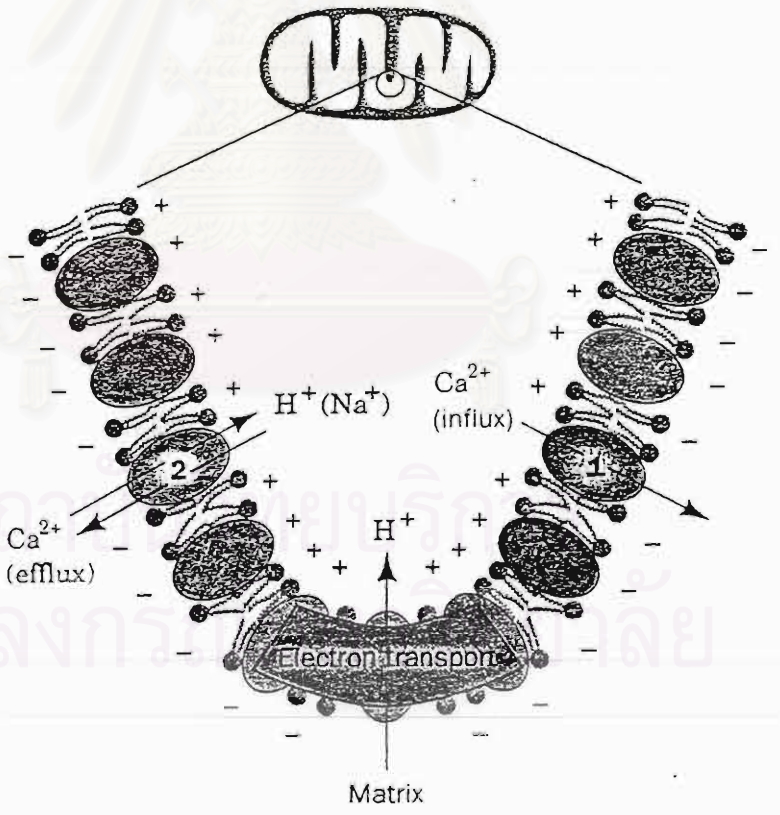
จึงกล่าวได้ว่า proton (H^+) เป็นตัวสำคัญในการเกิดการเชื่อมโยงระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชัน ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจนหากมีการทำลาย proton - gradient (collapse proton gradient) โดยสารใด ๆ ก็ตาม จะทำให้เกิดอันคัปปลิง (uncoupling) ของไมโตคอนเดรียขึ้น นั่นคือปฏิกิริยา oxidation - reduction และ phosphorylation จะถูกแยกออกจากกัน เช่น กรณี aging mitochondria ที่มีโครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลาย หรือกรณีของสารเคมี DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น proton - ionophore สามารถนำเอา proton (H^+) จากภายนอกเข้าไปใน matrix ได้โดยไม่ผ่าน F_0F_1 complex สารเหล่านี้จะทำให้ proton gradient เสียไปเป็นการทำลาย electrochemical gradient หรือ proton motive force ดังนั้นไมโตคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่ โดยการออกซิไดซ์สับสเตรทไปเรื่อย ๆ นั่นคือ ยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจแต่ไม่เกิด gradient หรือเกิดเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่เพียงพอในการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ทำให้มีการสร้าง ATP ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย แม้ว่าไมโตคอนเดรียยังสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทและใช้ออกซิเจนในอัตราที่สูงกว่าปกติ พบว่าในสภาวะเช่นนี้ F_1 ซึ่งปกติจะกระตุ้นการสร้าง ATP กลับกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้เกิด proton gradient อีกทางหนึ่ง ซึ่งผลในการกระตุ้นการสลาย ATP นั่นคือการเพิ่ม ATPase activity สาร uncoupler จะกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งในสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ เนื่องจาก ATPsynthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (Danishesky,1980)

$$ATP + H_2O \xleftarrow{F_0F_1\text{ - ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

ในส่วนการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยไมโตคอนเดรียนั้น พบว่าบทบาทของแคลเซียมคล้าย cAMP ทำหน้าที่เหมือน second messenger โดยความเข้มข้นในไซโตซอล (cytosol) เป็นตัวถูกควบคุมได้อย่างแม่นยำ ภายใน cell พบ endoplasmic reticulum (ER) , extracellular spaces และไมโตคอนเดรียทำหน้าที่เก็บสะสมแคลเซียม ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียเป็นตัวทำให้เกิดระบบการไหลเข้า (influx) และการไหลออก (efflux) ของแคลเซียม การไหลเข้าของแคลเซียมใช้แรงขับของความต่างศักย์ระหว่างผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นประจุลบ (negative inside) ทำให้ดึงกับประจุบวก อัตราการไหลเข้าจะแปรผันตามความเข้มข้นของแคลเซียมที่ภายนอก เพราะค่า K_M ของการขนส่งแคลเซียมด้วยระบบนี้จะมากกว่าความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอล ส่วนการไหลออกของแคลเซียมจะมีแรงขับอิสระโดยอาศัยการขนส่งอิเลคตรอนหรือเกิด proton gradient ระหว่าง

ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย หรือในไมโตคอนเดรียของหัวใจจะใช้ Na^+ gradient แทน แคลเซียมออกจาก matrix เฉพาะในการแลกเปลี่ยนกับ proton (H^+) หรือ Na^+

ขบวนการแลกเปลี่ยนนี้จะเกิดขึ้นด้วยความเร็วสูงสุด ไมโตคอนเดรียจะทำหน้าที่เสมือนบัฟเฟอร์ (buffer) ต่อแคลเซียมในไซโตซอล ถ้าความเข้มข้นของแคลเซียมเพิ่ม อัตราการไหลเข้าของแคลเซียมในไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขณะที่การไหลออกของแคลเซียมจะคงที่ เพราะว่าความเข้มข้นของแคลเซียมจะเพิ่มขึ้น ขณะที่ความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลลดลงเท่ากับจุดเริ่มต้น ในทางตรงกันข้ามการลดลงของความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอล ทำให้อัตราการไหลเข้าลดลง เป็นสาเหตุให้การไหลออกของความเข้มข้นของแคลเซียม และความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลกลับมายังจุดเริ่มต้นเหมือนเดิม



รูปที่ 12 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) ในไมโตคอนเดรีย (Voet and Voet, 1990)

สารที่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันหรือสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย แบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

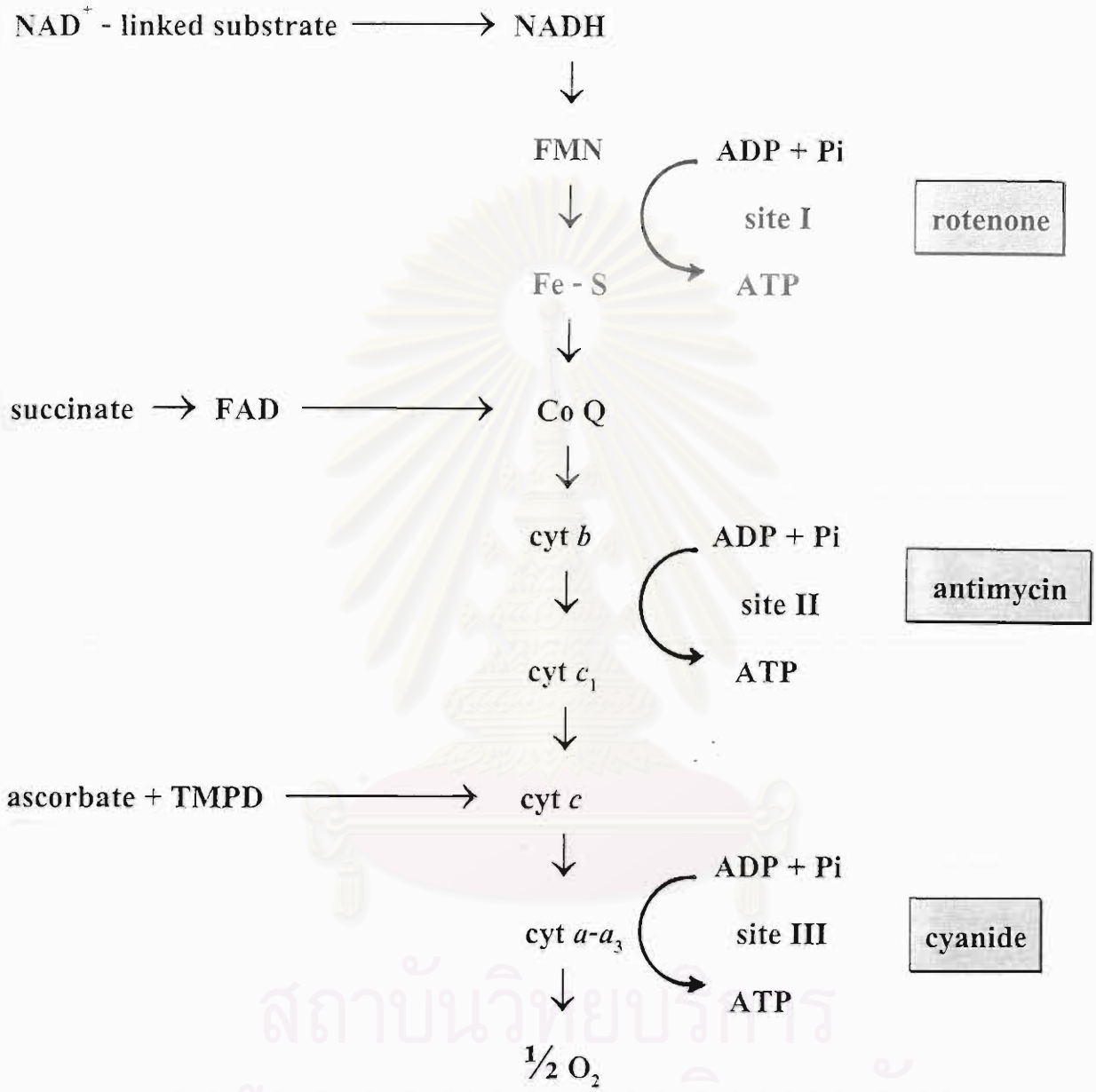
1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Danishefsky, 1980; Hatefi, 1985; Voet and Voet, 1990; Abeles, Frey and Jencks, 1992) (รูปที่ 13) ได้แก่

1.1 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ใน complex I คือจาก NADH dehydrogenase ไปยัง Coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone (เป็นสารพิษจากพืช ทำให้เกิดพิษในปลาและใช้เป็น insecticide) , amytal, pipericin A, barbiturates, dimerol และ mercurials สารประเภทนี้ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ Site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ succinate เป็นสับสเตรท เนื่องจาก succinate จะส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

1.2 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ใน complex II คือจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (Site II) ได้แก่ antimycin A (antibiotic) แต่จะไม่สามารถยับยั้งสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอน ในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น Ascorbate + TMPD ซึ่งสามารถส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง

1.3 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ใน complex IV คือจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide , azide และ carbon monoxide ซึ่งจะไปยับยั้งที่ cytochrome oxidase (cytochrome aa_3) นั่นคือ ถ้ามีการยับยั้งที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทใดก็ตาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจ (Hatefi, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารจำพวก uncoupler สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+-carrierหรือ proton- ionophores สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระและทำลาย electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน ทำให้มีผลการยับยั้ง phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP แต่ยังทำให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้นการสลาย ATP ด้วย (Lehninger, 1975 ; Heytler, 1981)

สาร uncouplers ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน เป็นกรดอ่อน และในสูตรโครงสร้างมักมี aromatic ring อยู่ด้วย นักวิจัยสามารถแบ่งสาร uncouplers ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะทางเคมี และการออกฤทธิ์ (Heytler, 1981) ดังนี้

2.1 Classical uncouplers หรือเรียกว่า DNP - like, weak - acid, direct และ H^+- ionophores uncoupler เช่น 2,4-dinitrophenol (DNP), carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weakly acid) ที่มี pKa ระหว่าง 4.5 - 6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxy, heterocyclic - NH, amide, hydrazone - NH, carboxyl, sulfhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ทำลาย proton gradient โดยจะเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (unionize acid) ทำให้ proton (H^+) สามารถผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H^+ - channel ของ F_1 - F_0 complex

2.2 The alkali - metal ionophores ได้แก่พวก antibiotics เช่น gramicidin, tyrothricin, tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ คือ นำเอา cation เช่น K^+ เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย ในกรณีของ valinomycin ซึ่งผ่านเข้าทางผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคู่ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์สับสเตรทจะถูกนำไปใช้ในการ transport นำ cation เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย แทนที่จะใช้ในการสังเคราะห์ ATP

2.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้ด้วยกลไกต่าง ๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein)ที่อยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 factor) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งเป็น

สารจากพืชที่มี phenolic groups อยู่ในโครงสร้าง สามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 nmole/mg protein ส่วน arsenic ทำให้เกิด uncoupling โดยจับกับ sulfhydryl groups อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่ม indirect uncouplers นี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

3. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

3.1 oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยไปยับยั้งที่ F_o ของเอนไซม์ ATPsynthase ทำให้ไม่สามารถส่งผ่านโปรตอนจาก F_o ไปยัง F_1 ได้ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันรวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้เมื่อไมโตคอนเดรียอยู่ในภาวะ uncoupling (Senior, 1973; Voet and Voet, 1990)

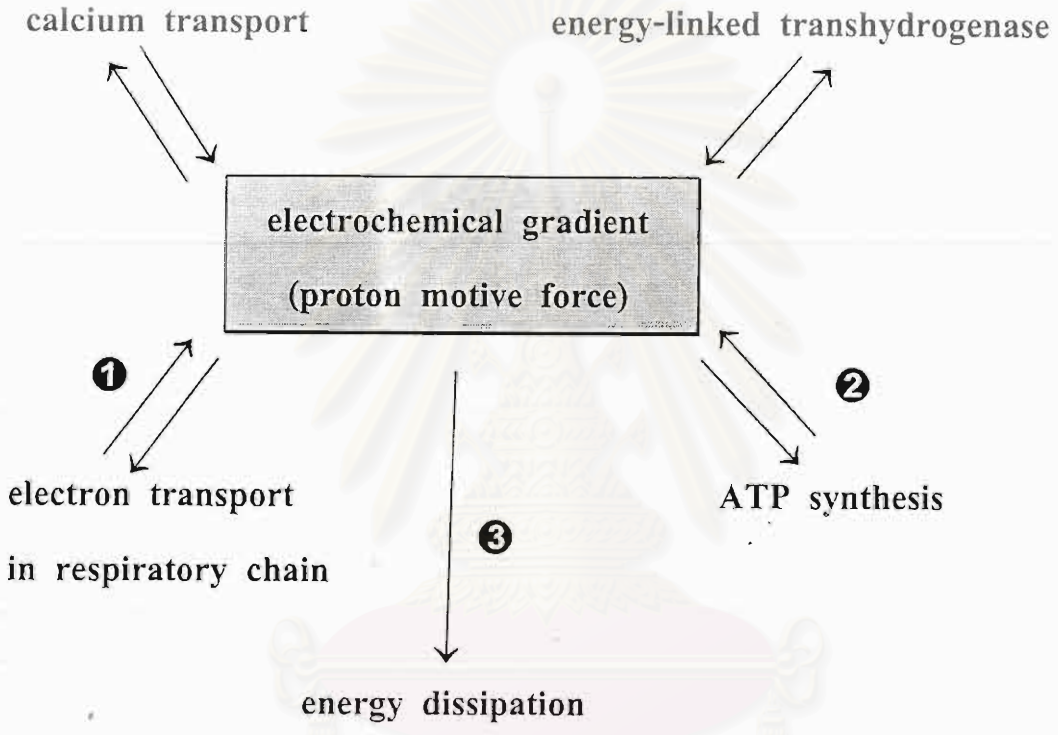
3.2 atractyloside จะยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1975)

3.3 DTNB (5, 5′ - dithio - bis - 2 - nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน Pi จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด Pi ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

3.4 N-ethylmaleimide (NEM) หรือ mersalyl จะมีผลยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งทำให้ไมโตคอนเดรียขาด Pi เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้ Pi ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Sartorelli, Erecinska and Wilson, 1981)

สุดท้ายนี้จะกล่าวถึงคือ เรื่องเกี่ยวกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้อยู่ในรูป electrochemical gradient หรือ proton motive force ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้จากการส่งผ่านอิเลคตรอน นอกจากจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอื่น ๆ เช่น ใช้ในการขนส่งอิออน (ions) ต่าง ๆ เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การสะสมแคลเซียมและการสังเคราะห์ NADPH โดย energy-linked

transhydrogenase ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ เหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 14 (Lehninger, 1975; Hanstein, 1976; Daniskefsky, 1980)



รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ (high energy electrochemical gradient) และตำแหน่งต่าง ๆ ที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไปออกฤทธิ์

❶ สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ

❷ สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP + Pi เช่น oligomycin, DTNB เป็นต้น

❸ สารที่มีฤทธิ์ uncoupling เช่น DNP, FCCP เป็นต้น

(Hanstein, 1976)

จากข้อมูลเท่าที่มีของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญ 6-deoxyclitoriacetal ยังมีน้อยมาก ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติเป็นพิษต่อ cell (cytotoxic effect) และยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ เส้นเลือด มดลูก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย agonists ต่าง ๆ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ในด้านอื่น ๆ อีกเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสำคัญ 6-deoxyclitoriacetal ที่สกัดจากรากของหนอนตายหยากต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับหนูขาว ในหัวข้อต่อไปนี้

1. ผลต่อกระบวนการหายใจ (respiratory chain) และออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน
2. ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial ATPase
3. ผลของ cation เช่น แคลเซียมต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบผลของ 6-deoxyclitoriacetal ซึ่งเป็นสารสำคัญจากรากของต้นหนอนตายหยากต่อกระบวนการหายใจและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันและอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารตัวนี้ต่อไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้
2. สามารถนำข้อมูลทางเภสัชวิทยา และ/หรือ พิษวิทยาของ 6-deoxyclitoriacetal ที่เพิ่มขึ้นมาใช้เป็นแนวทางการปรับปรุง ในการที่นำสารสกัดนี้มาใช้เป็นยาในทางคลินิกต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย