

ผลของอิพิแกลโลคาทีซินแกเลตต่อกระบวนการหายใจและ
สมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว



นางสาวพรทิพา ตระการรังสี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา


คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1390-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON RESPIRATORY FUNCTION AND
MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA



Miss Porntipa Trakarnrungsee

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1390-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของอีพิเกลโลคาที่ซินเกลเลตต่อกระบวนการหายใจและสมรรถนะ
ของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
โดย นางสาวพรทิพา ตระการรังสี
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันตีสิริระ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันตีสิริระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช)

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

พรทิพา ตระการรังสี : ผลของอีพิแกลโลคาทีชินแกลเลตต่อกระบวนการหายใจและ
 สมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
 (EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON RESPIRATORY FUNCTION
 AND MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY OF ISOLATED RAT LIVER
 MITOCHONDRIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.วิทยา จันทสูตร, 103 หน้า. ISBN
 974-53-1390-4.

การศึกษาผลของอีพิแกลโลคาทีชินแกลเลต (EGCG) ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลที่มีปริมาณ
 มากที่สุดในชาเขียวต่อกระบวนการหายใจ และสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของ
 ไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวพบว่า EGCG ที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 454.48 μM กระตุ้น
 อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 แต่ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ซึ่งมีผลทำให้ค่า RCI
 ลดลงเมื่อใช้กลูตาเมตและมาเลตเป็นสับสเตรท จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า EGCG ไป
 รบกวนการควบคุมระหว่างกระบวนการหายใจและการฟอสฟอริเลชันหรืออาจกล่าวได้ว่า EGCG มี
 ฤทธิ์เป็นสาร uncoupler ฤทธิ์ในการกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของ EGCG สามารถถูกยับยั้ง
 ด้วย bovine serum albumin และเมื่อใช้ซักซิเนตเป็นสับสเตรทพบว่า EGCG ไม่มีผล
 เปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 แต่ยังคงมีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3
 และลดค่า RCI เช่นเดียวกับเมื่อใช้กลูตาเมตและมาเลตเป็นสับสเตรท นอกจากนี้ EGCG ยังมี
 ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP แต่ในกรณีที่การหายใจถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม
 EGCG เฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษานั้น (908.96 μM) จึงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง
 การหายใจได้ EGCG ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 219.54 μM สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์
 ATPase ส่วนผลต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (MAO) พบว่า EGCG มีผล
 ยับยั้งได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B แต่สามารถยับยั้ง MAO-A ได้แรงกว่า MAO-B

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิติ.....

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2547.....

#4676576433 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: EPIGALLOCATECHIN GALLATE / EGCG / RESPIRATORY FUNCTION /
MONOAMINE OXIDASE / MITOCHONDRIA

PORNTIPA TRAKARNRUNGSEE : EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN
GALLATE ON RESPIRATORY FUNCTION AND MONOAMINE OXIDASE
ACTIVITY OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT, 103 pp. ISBN 974-53-1390-4.

The effects of epigallocatechin gallate (EGCG), a major component in green tea polyphenols on respiratory function and monoamine oxidase activity of isolated rat liver mitochondria have been investigated. It was found that EGCG at high concentration ($\geq 454.48 \mu\text{M}$) stimulated state 4 respiration, decreased state 3 respiration and RCI index when used glutamate plus malate as substrate. These results suggested that EGCG interfered the coupling between respiration and phosphorylation or EGCG acted as uncoupler. The respiratory stimulation of this compound was antagonized by bovine serum albumin. When succinate was used as substrate, the results on state 3 respiration and RCI index were similar to those using glutamate plus malate as substrate but state 4 respiration was not affected by EGCG. DNP-stimulated respiration was inhibited by EGCG but in case of Ca-stimulated respiration only the highest concentration of EGCG in this study ($908.96 \mu\text{M}$) showed inhibitory effect. The concentration of EGCG $\geq 219.54 \mu\text{M}$ could stimulate ATPase activity. EGCG inhibited both MAO-A and MAO-B activity, but inhibitory effect on MAO-A more potent than MAO-B.

Department....PHARMACOLOGY.. Student 's signature.....

Field of study..PHARMACOLOGY.. Advisor 's signature.....

Academic year....2004.....

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกด้าน ให้คำปรึกษาที่ดีเยี่ยม ตลอดจนคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันตสิระ หัวหน้าภาควิชาเกษตรชีววิทยา ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเกษตรชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ และคำปรึกษา ตลอดจนการศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาตรี ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

และท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษา และให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ชาเขียว.....	5
ข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์.....	5
ประเภทของชา.....	6
กรรมวิธีการผลิตชาเขียว.....	7
ส่วนประกอบทางเคมีของชาเขียว.....	8
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ catechins ในชาเขียว.....	8
ข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ของ epigallocatechin gallate.....	11
ขนาดรับประทานและความเป็นพิษ.....	12
ดูกลไกการหายใจและการสังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรีย.....	13
ลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย.....	15
ส่วนประกอบของ respiratory chain.....	19
การถ่ายทอดอิเล็กตรอนใน respiratory chain.....	22
การสังเคราะห์ ATP.....	26
ความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย.....	29
การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโทคอนเดรีย.....	32
Monoamine oxidase.....	34
Multiple forms ของ monoamine oxidase.....	34

ประโยชน์ของ monoamine oxidase inhibitors ในทางการแพทย์.....	34
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	37
สัตว์ทดลอง.....	37
สารเคมี.....	37
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา.....	38
วิธีการวิจัย.....	39
การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว.....	39
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	41
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	41
การศึกษาผลของ EGCG ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย.....	47
การศึกษาผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม.....	48
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	48
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase.....	50
การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย.....	51
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	52
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	53
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	53
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	54
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	55
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	55
ผลของ EGCG ต่อไมโตคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP	55

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะ ที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	56
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	56
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A.....	57
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B.....	57
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	90
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	90
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	91
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูก กระตุ้นด้วย DNP.....	92
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	92
ผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	92
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูก กระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	93
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	93
ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase.....	94
รายการอ้างอิง.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	103

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของ EGCG หลังจากให้ EGCG และ Polyphenon E โดยการรับประทาน.....	11
2. แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย.....	16
3. แสดงตัวอย่างสับเสตรทของเอนไซม์ monoamine oxidase จากการศึกษาในหนูขาว.....	36
4. แสดงสัดส่วนสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในแต่ละ tissues ของหนูขาว.....	36
5. แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration, state 3 respiration และ RCI ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับเสตรท...	64
6. แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration, state 3 respiration และ RCI ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับเสตรท.....	70
7. แสดง % การยับยั้งของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	74
8. แสดงผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับเสตรท.....	78
9. แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับเสตรท.....	84
10. แสดงผลของ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin	86
11. แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A.....	87
12. แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-B.....	88
13. แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B.....	89

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร catechins ในชาเขียว.....	1
2. แสดงลักษณะของต้นชาประกอบด้วย ใบ ดอกและผล.....	6
3. แสดงความสัมพันธ์ของกระบวนการสลายสารอาหาร, citric acid cycle หรือ Krebs cycle, electron transport chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation.....	14
4. แสดงลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย.....	17
5. แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย.....	18
6. แสดงลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP).....	18
7. แสดงลักษณะโครงสร้างของ flavin mononucleotide (FMN) และ flavin adenine dinucleotides (FAD).....	20
8. แสดงการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Coenzyme Q.....	20
9. แสดงลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ และลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b และ c.....	21
10. แสดงส่วนประกอบและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย.....	23
11. แสดงการเปลี่ยนแปลง redox potential และ free energy ระหว่างขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจ.....	24
12. แสดงสรุปการเกิด aerobic oxidation ของ pyruvate และ fatty acid, electron transport chain และการสร้าง ATP ที่เกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย.....	25
13. แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase.....	27
14. แสดง chemiosmotic hypothesis and electron transport chain.....	28
15. แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation.....	31
16. แสดงกลไกการเกิด uncoupling ของ 2,4-Dinitrophenol (DNP).....	31
17. แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย.....	33
18. แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifuge.....	40
19. แสดง Gilson 's Oxygen chamber.....	42
20. แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode.....	43
21. ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหา RCI.....	46

รูปที่	หน้า
22. ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	46
23. แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	58
24. แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	59
25. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration ของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	61
26. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration ของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	62
27. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	63
28. แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	65
29. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration ของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	67
30. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration ของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	68
31. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	69
32. แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	71
33. กราฟแสดง % การยับยั้งของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	73
34. แสดง oxygraph tracing ผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	75
35. กราฟแสดงผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	77

รูปที่	หน้า
36. แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่อไมโตคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้ง กระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบ กับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	79
37. แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท.....	81
38. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูก กระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	83
39. กราฟแสดงผลของ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin.....	85
40. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A.....	87
41. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-B.....	88
42. กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B.....	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	=	adenosinetriphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
Ca ²⁺	=	calcium ion
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
° C	=	degree celcius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNP	=	2,4-dinitrophenol
EGCG	=	epigallocatechin gallate
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	=	reduced flavin adenine dinucleotide
g	=	gram
<i>g</i>	=	centrifugal force unit (gravity)
H ⁺	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
5-HT	=	5-hydroxytryptamine
IC ₅₀	=	median inhibitory concentration
kg	=	kilogram
M	=	molar
MAO	=	monoamine oxidase
MAO-A	=	monoamine oxidase A
MAO-B	=	monoamine oxidase B
MPP ⁺	=	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	=	<i>N</i> -methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRSA	=	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
μ atoms	=	microatoms
μg	=	microgram

μl	=	microlite
μM	=	micromolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
NAD^+	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
n atoms	=	nanoatoms
ng	=	nanogram
O	=	oxygen
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute
S.E.	=	standard error of mean
TCA	=	trichloroacetic acid
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent

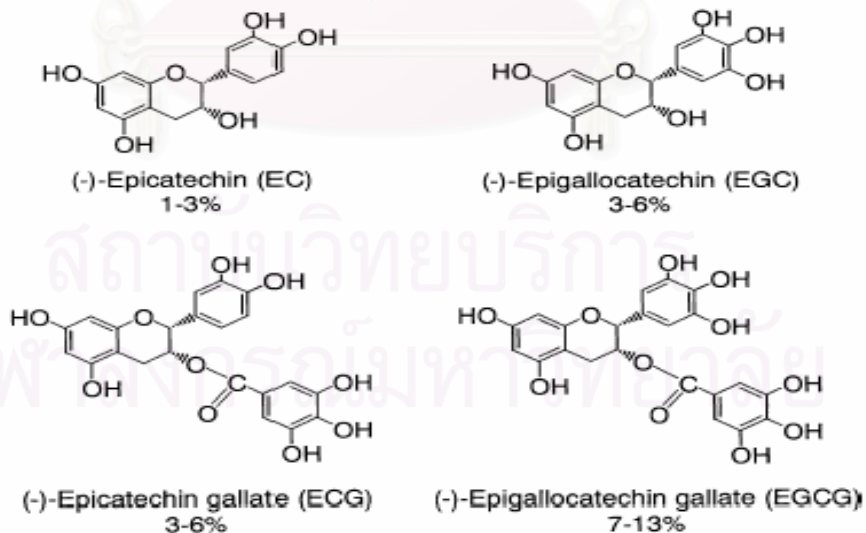
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชาเป็นเครื่องดื่มที่นิยมกันมากทั่วโลกเป็นอันดับสองรองจากน้ำ ในแต่ละปีจะมีการผลิตชาเพื่อบริโภคประมาณ 2.5 ล้านเมตริกตัน โดยชาที่บริโภคกันทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอูหลง แต่ชาทั้ง 3 ชนิดก็ผลิตมาจากต้นชาชนิดเดียวกัน คือ *Camellia sinensis* L. ความแตกต่างของชาแต่ละชนิดเกิดจากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน ชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก แต่จะให้ความร้อนตั้งแต่เก็บใหม่ๆ เพื่อทำลายเอนไซม์ในใบชา ป้องกันการเกิด oxidation การผลิตชาดำจะมีขั้นตอนการหมัก ซึ่งทำให้ catechins ในใบชาถูก oxidation กลายเป็น theaflavins และ thearubigins ส่วนชาอูหลงจะผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน ในปัจจุบันมีงานวิจัยศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ประโยชน์ของชาต่อสุขภาพมากมาย ซึ่งต่างแสดงให้เห็นว่าชาเขียวเป็นชาที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด เนื่องจากชาเขียวมี catechins ชนิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์มากกว่าชาชนิดอื่นๆ โดยสาร catechins นี้จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบ polyphenols ซึ่งในชาเขียวมีอยู่หลายชนิดดังแสดงในรูปที่ 1 โดยประเภทที่มีมากที่สุด คือ (-)-epigallocatechin gallate – EGCG (Yang and Wang, 1993; Kuroda and Hara, 1999)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร catechins ในชาเขียว ตัวเลขแสดงปริมาณ catechins เป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Muto et al., 2001)

สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ catechins ในชาเขียวที่น่าสนใจมีหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Koo and Cho, 2004) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Yang and Wang, 1993) ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Kuroda and Hara, 1999) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหรือไวรัส (Zhao et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002) ฤทธิ์ป้องกันการเกิด atherosclerosis (Miura et al., 2001) ฤทธิ์ในการลดน้ำหนัก (Kao, et al, 2000) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Koo and Cho, 1999) ฤทธิ์ลดความดันโลหิต (Liu, 2003) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมอีกมากทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* เพื่อยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยารวมทั้งความปลอดภัยในการที่จะนำสาร catechins ในชาเขียวมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคในมนุษย์

เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญทำหน้าที่สร้างพลังงานให้แก่เซลล์ในรูปของ ATP จากกระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นถ้าสารใดก็ตามมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรีย อาจทำให้เกิดผลทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาได้ และจากที่ผ่านมามีการศึกษาของ Moini และคณะ (1999) เป็นการศึกษาหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า polyphenols ที่อยู่ในพืชบางชนิดมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ โดยพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ French maritime pine ทำการศึกษาทั้งในสารสกัดผสมของ polyphenols หลายชนิด และ polyphenol เดี่ยวๆ ที่มีอยู่ในพืชชนิดนี้ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดผสมของ polyphenols หลายชนิดมีผลยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และที่สำคัญคือ polyphenol เดี่ยวๆ ในการศึกษาที่มีชนิดที่พบในชาเขียวด้วยเช่นเดียวกัน คือ epicatechin gallate ซึ่งมีผลยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้เล็กน้อย ดังนั้นจึงน่าจะสนใจว่า EGCG ซึ่งเป็น polyphenols ชนิดที่มีมากที่สุดที่พบในชาเขียว และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เด่นชัดเจนนอกกว่าตัวอื่นๆ จะมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียหรือไม่ อย่างไร ซึ่งในปัจจุบันก็ยังไม่มียางานการวิจัยถึงผลดังกล่าว แต่ก็มียางานวิจัยที่กล่าวถึงความเกี่ยวข้องระหว่าง EGCG กับไมโทคอนเดรีย เช่น

- งานวิจัยของ Chen และคณะ (2003) พบว่า EGCG มีผลต่อไมโทคอนเดรียของเซลล์ HT-29 colon adenocarcinoma ทำให้ cytochrome c หลุดออกจากไมโทคอนเดรีย ช่วยทำให้เซลล์มะเร็งตาย

- งานวิจัยของ Zheng และ Ramirez (2000) ศึกษาผลของ polyphenols ชนิดต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ F_0F_1 -ATPase / ATP synthase ของไมโทคอนเดรียจากสมองหนู พบว่า EGCG สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 17 \mu M$

นอกจากนี้ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียยังมีเอนไซม์ monoamine oxidase-MAO ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารสื่อประสาทพวกเอมีน เช่น dopamine,

serotonin ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาก็มีงานวิจัยที่กล่าวถึงความเกี่ยวข้องระหว่าง EGCG กับ monoamine oxidase ได้แก่ งานวิจัยของ Levites และคณะ (2001) ศึกษาผลของ EGCG ในการป้องกัน *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) เหนี่ยวนาให้เกิด dopaminergic neurodegeneration โดยกลไกหนึ่งที่ถูกวิจัยสนใจคือ EGCG ไปยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง MPTP ไปเป็น active metabolite (MPP⁺) ได้หรือไม่ ผลการศึกษาพบว่า EGCG สามารถยับยั้ง MAO-B ใน homogenate ของสมองหนู เมื่อใช้ phenylethylamine เป็นสับสเตรท โดยมี IC₅₀ = 662 μM แต่เนื่องจาก IC₅₀ ที่ได้มีค่ามากกว่าของ deprenyl (IC₅₀ = 6 nM) ซึ่งเป็น selective irreversible inhibitor ของ MAO-B มาก ดังนั้นผลการป้องกันไม่น่าเกิดจากกลไกนี้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาผลของ EGCG ต่อเอนไซม์ monoamine oxidase ทั้งชนิด MAO-A และ MAO-B ในไมโตคอนเดรีย ดังนั้นจึงน่าสนใจศึกษาเรื่องนี้เช่นเดียวกัน เพราะจะทำให้ทราบผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO ทั้งสองชนิด ซึ่งผลการศึกษาอาจทำให้ได้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ EGCG เพิ่มเติม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ต่อกระบวนการหายใจ และสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโตคอนเดรีย

สมมติฐานของงานวิจัย

epigallocatechin gallate มีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการหายใจและสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโตคอนเดรีย

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสาร

2. ศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกระตุ้นด้วยแคลเซียม

3. ศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

4. ศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบผลของ epigallocatechin gallate ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญของชาเขียว ต่อกระบวนการหายใจและสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโตคอนเดรีย เพื่อนำข้อมูลเพิ่มเติมที่ได้จากการวิจัยมาพิจารณาถึงความปลอดภัย หรือฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนี้ต่อร่างกาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาร epigallocatechin gallate ที่นำมาศึกษานี้เป็นสาร catechins ที่สำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชาเขียว ดังนั้นในเบื้องต้นจะกล่าวถึงเรื่องของชาเขียวและสาร catechins ที่สำคัญ รวมทั้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจของสาร catechins โดยเฉพาะ epigallocatechin gallate ต่อมาจะกล่าวถึงเรื่องของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์สำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ ทั้งในด้านลักษณะและโครงสร้าง ส่วนประกอบและการถ่ายทอดดีเอ็นเอของลูกโซ่ การหายใจ กระบวนการสร้าง ATP การขนส่งและการสะสมแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย สารต่างๆ ที่มีผลรบกวนหรือเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรีย รวมทั้งหน้าที่และการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ที่อยู่บริเวณ outer membrane ของไมโทคอนเดรียด้วย

ชาเขียว

ปัจจุบันทั่วโลกนิยมดื่มชาเป็นเครื่องดื่มมากกว่า 2 ใน 3 ของประชากรทั้งหมด โดยชาที่นิยมดื่มกันมากที่สุด คือ ชาดำ ประมาณ 78% เป็นที่นิยมมากในประเทศแถบตะวันตกและบางประเทศในเอเชีย ส่วนชาอูหลงนิยมดื่มกันน้อยประมาณ 2% มักพบบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน ชาเขียวนิยมดื่มมากในประเทศแถบเอเชียประมาณ 20% (Yang and Wang, 1993) โดยชาวจีนและชาวญี่ปุ่นรู้จักดื่มชาเขียว และมีการบันทึกเล่าถึงคุณประโยชน์ของชาเขียวต่อสุขภาพมานานนับพันปี ความก้าวหน้าของงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันก็ยืนยันข้อมูลดังกล่าว ซึ่งมีผลทำให้เกิดกระแสนิยมในการดื่มชาเขียวกันอย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังมีแนวโน้มในการนำสาร catechins ในชาเขียวมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคอีกด้วย

ข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์

ต้นชาเป็นพืชในวงศ์ Theaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* L. มี 2 สายพันธุ์หลัก คือ สายพันธุ์ของจีนที่ใบมีขนาดเล็ก และสายพันธุ์อัสสัมที่ใบมีขนาดใหญ่กว่า ต้นชามีใบเรียวยาวแหลมลักษณะคล้ายรูปไข่ มีสีเขียวเข้ม ขอบใบหยัก การจัดเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับ 1 ใบต่อ 1 ช่อ ชาเป็นไม้ยืนต้นที่สูงได้ถึง 10-15 เมตร หากปล่อยให้โตตามธรรมชาติ แต่ชาสวนชามักตัดแต่งต้นชาให้เป็นพุ่มเตี้ยสูงประมาณ 1-1.5 เมตร เพื่อความสะดวกในการเก็บใบชา ดอกชามีทั้งดอกเดี่ยวและดอกช่อ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ สีขาว กลิ่นหอมเล็กน้อย และเมื่อดอกเจริญเต็มที่ที่ได้รับการผสมเกสรแล้วก็จะให้ผลชา ซึ่งมีลักษณะเป็นแคปซูล เปลือกหุ้มผลหนา สีน้ำตาลปนเขียว ภายในผลมีช่อง 3 ช่องและมีเมล็ดในช่องแคปซูล 1-3 เมล็ด ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของ

ผล ต้นชาเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิระหว่าง 10°C ถึง 30°C มีฝนตกกระจายสม่ำเสมอตลอดทั้งปีและดินมีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย โดยธรรมชาติชาจะขยายพันธุ์โดยเมล็ด แต่ในการปลูกชาของชาวสวนจะใช้วิธีการปักชำหรือต่อกิ่ง ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตปริมาณมากและคุณภาพดีกว่า (ดาเรศ บรรเทึงจิตร, 2547; ศุภนารถ เกตุเจริญ และ อัญชลี พัดมีเทศ, 2541)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของต้นชาประกอบด้วยใบ ดอกและผล

ประเภทของชา

ชาที่นิยมดื่มกันทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 3 ประเภท คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอูหลง โดยชาทั้งสามประเภทนี้ก็ผลิตมาจากต้นชาชนิดเดียวกัน แต่จะแตกต่างกันที่กระบวนการผลิตชา (ดาเรศ บรรเทึงจิตร, 2547) ดังนี้

1. ชาดำ (black tea หรือ fully-fermented tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักแบบเต็มรูปแบบ กล่าวคือหลังจากเก็บใบชามาแล้ว ใบชาจะถูกนำมาผึ่งลมนาน 5 – 20 ชั่วโมง ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดย oxidizing enzymes ใบชาจากสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อชงน้ำชาจะมีสีเข้มและมีกลิ่นรสเข้มข้น

2. ชาเขียว (green tea หรือ non – fermented tea) เป็นชาที่ไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก โดยใบชาหลังจากเก็บมาแล้ว จะถูกนำไปให้ความร้อนทันทีเพื่อทำลายเอนไซม์ในใบชา ป้องกันการเกิด oxidation ทำให้ใบชายังคงมีสีเขียว เมื่อชงน้ำชาจะมีสีเขียวอ่อน กลิ่นหอมอ่อนๆ รสชาตินุ่มนวล

3. ชาอูหลง (oolong tea หรือ semi – fermented tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเช่นเดียวกับชาดำ แต่ระยะเวลาในการหมักจะสั้นกว่า ชาประเภทนี้จะมีสีและกลิ่นอยู่ระหว่างชาเขียวและชาดำ น้ำชาจากชาอูหลงจะมีกลิ่นหอม รสชาติขุ่นคอบ

กรรมวิธีการผลิตชาเขียว

ชาเขียวผลิตมากในประเทศญี่ปุ่นและจีน ประเทศจีนผลิตชาเขียว 50 % ส่วนประเทศญี่ปุ่นผลิตเฉพาะชาเขียว โดยชาเขียวที่มีคุณภาพดีที่สุด ผลิตจากใบชาที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิ ในการเก็บใบชาต้องเก็บยอดชาอ่อนอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ใบชาช้ำ ใบชาคุณภาพดีจะเป็นส่วนยอดอ่อนที่ม้วนตัวอยู่ที่ปลายกิ่งแต่ละกิ่งของต้นชา และใบอ่อน 2 ใบแรกเท่านั้น นอกนั้นจะเป็นใบที่แก่ จัดว่าเป็นใบชาที่มีคุณภาพด้อย หลังจากเก็บใบชาแล้วจะไม่มีการผึ่งใบชาหรือผึ่งเพียงช่วงเวลาสั้นๆ แล้วให้ความร้อนทันทีเพื่อทำลายเอนไซม์ในใบชา ซึ่งทำให้สาร catechins ที่สำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชาเขียวไม่ถูก oxidation เปลี่ยนแปลงไปเป็น theaflavins และ thearubigins อย่างเช่นที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักของชาดำและชาอูหลง ขั้นตอนในการผลิตชาเขียวประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ (steaming) หรือคั่วในกระทะ (panfiring)
2. การนวดคลึง (rolling) เพื่อให้เนื้อเยื่อของใบชาถูกทำลายทำให้สารต่างๆ ในใบชาแตกตัวง่ายในขณะชงน้ำชา
3. การอบแห้ง (drying) เพื่อนำความชื้นออกจากใบชา

ในการผลิตชาเขียวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้นานๆ จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการนวดคลึงและการอบแห้งหลายๆ ครั้ง สำหรับความแตกต่างของชาเขียวจีนและญี่ปุ่นจะอยู่ที่กรรมวิธีการผลิตในขั้นตอนการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน โดยจีนจะใช้วิธีคั่วใบชาในกระทะ ส่วนญี่ปุ่นให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ แต่จากนั้นก็จะนำมานวดคลึงและอบแห้งเช่นเดียวกัน (ดาเรศ บรรเทงจิตร, 2547)

ส่วนประกอบทางเคมีของชาเขียว

ในชาเขียวมีสาร polyphenols อยู่หลายชนิด เช่น flavanols flavandiols ซึ่งสารเหล่านี้ อาจมีมากถึง 30 % ของน้ำหนักแห้ง โดย polyphenols ที่มีมากที่สุดในชาเขียว คือ flavanols หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า catechins สำหรับ catechins ที่สำคัญในชาเขียว ได้แก่

1. (-) – epigallocatechin-3-gallate (EGCG)
2. (-) – epigallocatechin (EGC)
3. (-) – epicatechin-3-gallate (ECG)
4. (-) – epicatechin (EC)

catechins ชนิดที่มีมากที่สุดในชาเขียว คือ epigallocatechin gallate และยังเป็นสาร catechins ชนิดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเด่นชัดเจนนอกเหนือจากตัวอื่นๆ ด้วย โครงสร้างทางเคมีและปริมาณสาร catechins ชนิดต่างๆ ที่สำคัญในชาเขียวแสดงไว้ในรูปที่ 1 นอกจากนี้ในชาเขียวยังมีสารอื่นๆ อีก เช่น caffeine, theobromine, theophylline, theanine, fluoride, amino butyric acid, polysaccharide, วิตามินต่างๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี (ดาเรศ บรรเทิงจิตร, 2547; Yang and Wang, 1993; Kuroda and Hara, 1999)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ catechins ในชาเขียว

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant / free radical scavenging effect)

ข้อดีหรือประโยชน์ส่วนใหญ่ของชาเขียว เกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ catechins โดยสารเหล่านี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระทั้ง reactive oxygen และ nitrogen species รวมทั้งยังสามารถจับกับ metal ions ทำให้ช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Koo and Cho, 2004) ความสามารถของ catechins ในใบชาต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ภายในเซลล์จากการทดลองแบบ *in vitro* เรียงตามลำดับได้ดังนี้ EGCG > EGC ≥ ECG > EC (Murakami et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นที่แสดงให้เห็นว่า ผู้ที่ดื่มชาเขียวจะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในพลาสมาเพิ่มขึ้น เนื่องจากความสามารถของสาร catechins ในการจับอนุมูลอิสระ ทำให้ชะลอการใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกายให้ช้าลง เป็นการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย ช่วยลดความเสียหายจากปฏิกิริยา oxidation ที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลขนาดใหญ่ในร่างกาย เช่น DNA ไขมัน โปรตีน (Rietveld and Wiseman, 2003)

2. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer effect)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทั้งในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และทางระบาดวิทยา แสดงให้เห็นว่าสาร catechins ในชาเขียวสามารถยับยั้ง ป้องกันการเกิดและการเจริญของมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งเต้านม มะเร็ง

ปอด มะเร็งผิวหนัง มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งตับ เป็นต้น (Kuroda, 1999) โดยกลไกในการต้านมะเร็งของชาเขียวมีการนำเสนอไว้หลายกลไก ที่สำคัญที่สุด คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร catechins ในชาเขียว โดยสารเหล่านี้จะไปจับกับ promoters หลายชนิดที่ทำให้เกิดมะเร็ง หรือไปจับกับสารก่อมะเร็งที่มีคุณสมบัติ electrophilic รวมทั้งยังสามารถจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสัมผัสกับรังสีหรือแสงยูวีได้ (Yang and Wang, 1993; Kuroda and Hara, 1999) นอกจากนี้ยังมีกลไกต้านมะเร็งอื่นๆ อีกที่มีการนำเสนอไว้ เช่น

- สามารถยับยั้งการสร้าง nitroso compounds ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์แรง โดยการยับยั้งปฏิกิริยา nitrosation ที่เกิดขึ้นในทางเดินอาหาร (Yang and Wang, 1993)

- สามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งที่ยังไม่มีฤทธิ์ให้กลายเป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์ (Muto et al., 2001)

- สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis จากหลายกลไก เช่น

- EGCG สามารถยับยั้ง TNF- α gene expression (Taraphdar, 2001)

- EGCG สามารถเหนี่ยวนำ cell cycle arrest ในช่วง G₀/G₁ phase (Lambert and Yang, 2002)

- สามารถยับยั้งกระบวนการ metastasis ของเซลล์มะเร็ง เช่น จากกลไกที่ EGCG สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenases ได้ (Kuroda and Hara, 1999)

- สามารถยับยั้งกระบวนการ angiogenesis โดยไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ serine proteinases, metalloproteinases และ vascular endothelial growth factor (Koo and Cho, 2004)

3. ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic effect)

ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของ catechins ที่มีอยู่ในชาเขียวสามารถตรวจพบได้ในหลาย microbial systems เช่น *S. typhimurium*, *B. subtilis*, และ *E. coli* (Kuroda and Hara, 1999) สำหรับใน mammalian cell systems งานวิจัยของ Kuroda (1996) แสดงให้เห็นว่า ECG และ EGCG สามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำโดย 4-Nitroquinolin 1-oxide ในเซลล์ Chinese hamster V79 เมื่อให้ catechins หลังจากให้ 4-Nitroquinolin 1-oxide แล้ว ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของ catechins ภายในเซลล์เกิดจากสารนี้สามารถป้องกันหรือยับยั้ง reactive molecule ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ รวมทั้งช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นในกระบวนการ tumor promotion และ progression นอกจากนี้ใน *in vivo* animal tests ก็ยืนยันฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของชาเขียวเช่นเดียวกัน โดยพบว่าหนูขาวที่ได้รับน้ำสกัดจากชาเขียว 24 ชั่วโมงก่อนฉีด aflatoxin B1 สามารถยับยั้งการเกิด chromosome aberration ในเซลล์

ไขกระดูกจากการเหนี่ยวนำโดย aflatoxin B1 ได้ แต่จะไม่พบฤทธิ์การยับยั้งดังกล่าวในหนูกลุ่มที่ได้รับชาดำหรือกาแฟ (Ito et al., 1989)

4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหรือไวรัส (antibacterium / antiviral effect)

มีหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า EGCG และ catechins อื่นๆ ในชาเขียวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และไวรัสได้ เช่น

- EGCG สามารถเสริมฤทธิ์ β -lactams ในการกำจัดเชื้อ MRSA โดยคาดว่าเกิดจาก EGCG สามารถจับกับ peptidoglycan ครอบกวนความแข็งแรงของผนังเซลล์ เสริมฤทธิ์การทำลายผนังเซลล์ของ β -lactams (Zhao et al., 2001)

- EGCG สามารถยับยั้ง human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ได้ โดยไปรบกวนวงจรชีวิตของ HIV-1 ในหลายขั้นตอน เช่น ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ยับยั้งการจับของไวรัสกับผิวเซลล์ (Yamaguchi et al., 2002)

5. ฤทธิ์ป้องกันการเกิด atherosclerosis (antiatherosclerotic effect)

สาร catechins ในชาเขียวสามารถป้องกันการเกิด atherosclerosis ใน apoprotein E-deficient mice โดยพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชาเขียวในน้ำดื่ม 0.8 กรัม / ลิตร เป็นเวลา 14 สัปดาห์สามารถลดพื้นที่บริเวณที่เกิด fatty streak lesion และน้ำหนักของเส้นเลือดแดง aorta ได้ 23 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มธรรมดา (Miura et al., 2001)

6. ฤทธิ์ในการลดน้ำหนัก (antiobesity effect)

มีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของชาเขียวในการลดน้ำหนักในหลายๆ งานวิจัย เช่น งานวิจัยของ Kao และคณะ (2000) แสดงให้เห็นว่าการให้ EGCG ขนาด 85 mg/kg ทาง IP แก่หนูขาว Sprague Dawley เพศผู้เป็นเวลา 7 วัน น้ำหนักของหนูลดลงกว่าน้ำหนักเริ่มต้น 15-21% โดยพบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับ EGCG จะกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีการนำเสนอกลไกอื่นๆ ในการลดน้ำหนักของ catechins ในชาเขียว เช่น

- catechins สามารถยับยั้งเอนไซม์ catechol O-methyltransferase (COMT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลาย norepinephrine ดังนั้นผลของ norepinephrine ในการกระตุ้นให้เกิด thermogenesis และ fat metabolism จะยาวนานขึ้น (Dulloo et al., 1999)

- EGCG และ ECG สามารถยับยั้งเอนไซม์ fatty acid synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างกรดไขมัน (Wang et al., 2003)

นอกจากนี้ catechins ในชาเขียวยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ อีก เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Koo and Cho, 1999) ฤทธิ์ neuroprotective action (Levites et al., 1999) ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต (Liu et al., 2003) มีฤทธิ์เป็น immunomodulator (Matsunaga et al., 2002) เป็นต้น

ข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ของ epigallocatechin gallate

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ EGCG ในผู้ที่รับประทาน EGCG และ polyphenon E (สารสกัดผสมของ catechins ในชาเขียวที่สกัด caffeine ออกแล้ว) แบบ single-dose ในการศึกษาของ Chew และคณะ (2001) ได้ข้อมูลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของ EGCG หลังจากให้ EGCG และ Polyphenon E โดยการรับประทาน (Chow et al., 2001)

parameter	200 mg		400 mg		600 mg		800 mg	
	EGCG	Polyphenon E	EGCG	Polyphenon E	EGCG	Polyphenon E	EGCG	Polyphenon E
AUC(min•µg/ml)	22.5±7.3	21.9±12.0	35.4±21.5	52.2±22.8	101.9±99.7	79.7±39.2	167.1±57.0	161.4±57.0
C _{max} (ng/ml)	73.7±25.3	72.7±66.4	111.8±98.6	125.3±50.4	169.1±139.6	165.7±126.9	438.5±284.4	377.6±149.8
T _{max} (min)	127.1±76.6	144.7±90.7	108.7±26.4	170.9±64.7	180.0±84.8	216.0±53.7	240.6±84.6	249.0±85.4

จากการศึกษาพบว่า การรับประทาน EGCG ทั้ง 2 สูตรที่ปริมาณ EGCG เท่ากันจะให้ระดับสารนี้ในพลาสมาใกล้เคียงกัน การขจัด EGCG ออกจากร่างกายส่วนใหญ่ขจัดทางน้ำดี ส่วน EGC และ EC ขจัดทางปัสสาวะ

ต่อมา Chow และคณะ (2003) ได้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ EGCG และ polyphenon E แบบ multiple-dose ในคนพบว่าถ้าให้ EGCG และ polyphenon E ในขนาด 800 mg วันละครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะทำให้ค่า AUC เพิ่มขึ้นมากกว่า 60 % แต่ถ้าให้ในขนาด 400 mg วันละ 2 ครั้ง จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์อย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับชาเขียวที่นำมาชงดื่มกันทั่วไป ในงานวิจัยของ Lee และคณะ (2002) พบว่าหลังจากดื่มชาเขียวในรูปของแข็ง 20 mg/kg ชงกับน้ำร้อน 200 ml จะทำให้มีค่า mean peak plasma EGCG level เท่ากับ 0.17 µM

จากหลายๆ งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการให้ EGCG โดยการรับประทานจะมีค่า bioavailability ที่ต่ำมาก คือ น้อยกว่า 1 % เนื่องจากการดูดซึมต่ำและมี first-pass metabolism สูง (Zaveri, 2003)

ขนาดรับประทานและความเป็นพิษ

การดื่มชาเขียวโดยทั่วไปมีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง แต่อย่างไรก็ตามในชาเขียวจะมี caffeine อยู่ด้วย ดังนั้นถ้าดื่มมากเกินไปอาจทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ หงุดหงิด วิตกกังวล ใจสั่นได้ จากการทดลองหาปริมาณสารสำคัญในชาเขียวของ Yang and Wang (1993) จากชาเขียวของจีนผลิตภัณฑ์หนึ่งพบว่าชาเขียว 1 ถ้วย (200 ml) ประกอบด้วยสาร catechins ต่างๆ โดยประมาณดังนี้ EGCG 142 mg, EGC 65 mg, ECG 28 mg, EC 17 mg และมี caffeine อยู่ 76 mg ทั้งนี้ปริมาณของสาร catechins ในชาเขียวจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ของชา การปลูก การเก็บ การผลิต รวมทั้งขั้นตอนในการชงชาด้วย การดื่มชาเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพโดยทั่วไปขนาดรับประทานจะอยู่ในช่วง 3-10 ถ้วยต่อวัน นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการรับประทานสารสกัดชาเขียวเพื่อสุขภาพ โดยสารสกัดชาเขียวที่ดีควรมีปริมาณ polyphenols ทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 80 % ขนาดในการรับประทานต่อวันประมาณ 500-1500 mg (Arjuna, 2000)

สำหรับ EGCG ซึ่งเป็น polyphenols ชนิดที่มีปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเด่นชัดที่สุดในชาเขียว มีการศึกษาความเป็นพิษในหนู mouse โดยให้สารทางปาก พบว่า EGCG มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 2,170 mg/kg (NLM, 2004) ส่วนความเป็นพิษในคนมีรายงานการเกิด green tea – induced asthma ในคนงานผลิตชาเขียว ซึ่งจากงานวิจัยของ Shirai และคณะ (1997) แสดงให้เห็นว่า EGCG สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง histamine ไปมีผลต่อหลอดลมทำให้เกิด asthma ในบุคคลที่สัมผัสได้ จัดเป็น allergy type I

กลไกการหายใจและการสังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรีย

เมื่อร่างกายได้รับสารอาหารที่ให้พลังงานจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ซึ่งจะถูกลดลงสลายได้เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก จากนั้นสารโมเลกุลขนาดเล็กเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย ภายในเซลล์ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงสารที่ได้รับด้วยกระบวนการต่างๆ ทำให้ได้ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ โดยออกานелที่ทำหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานนี้ก็คือ ไมโทคอนเดรีย

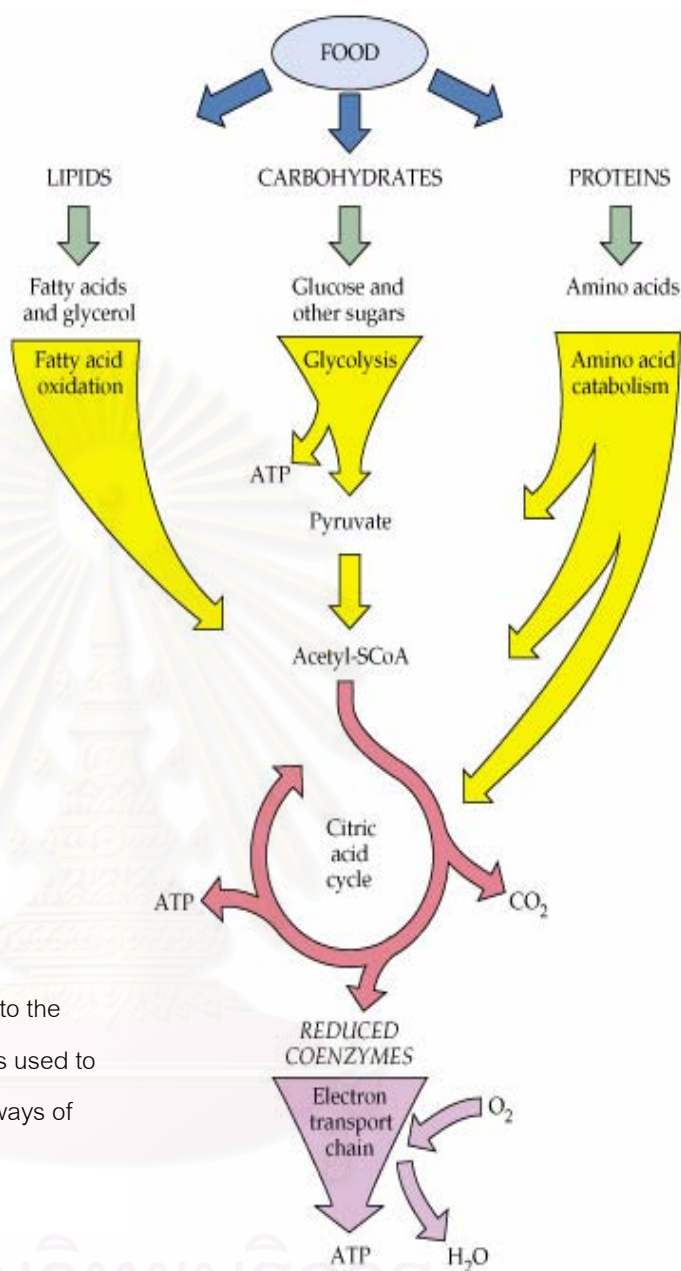
สารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตจะถูกลดลงได้เป็น monosaccharide ที่สำคัญคือ กลูโคส กลูโคสจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการ glycolysis ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทำให้ได้เป็น pyruvate จากนั้น pyruvate จะผ่านเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ภายในไมโทคอนเดรีย pyruvate จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปได้เป็น Acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ ส่วนไขมันจะถูกลดลงได้เป็นกรดไขมัน จากนั้นก็จะผ่านกระบวนการต่างๆ เปลี่ยนแปลงได้เป็น Acetyl CoA เข้าสู่วัฏจักรเครบส์เช่นเดียวกัน สำหรับโปรตีนเมื่อถูกลดลงแล้วจะได้กรดอะมิโน ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกนำไปสร้างเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย แต่ส่วนที่เกินความต้องการจะถูกนำไปสร้างเป็นกลูโคสหรือกรดไขมันเก็บสะสมในร่างกาย หรืออาจถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น Acetyl CoA แล้วส่งเข้าสู่วัฏจักรเครบส์เช่นกัน (รูปที่ 3) หลังจากการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครบส์จะทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และที่สำคัญคือ พลังที่ปล่อยออกมาในรูป reducing equivalent (hydrogen หรือ อิเลคตรอนที่มีพลังงานสูง) ซึ่งมี NAD^+ , NADP^+ , และ FAD มารับ กลายเป็น NADH , NADPH และ FADH_2 ตามลำดับ จากนั้น NADH และ FADH_2 จะถ่ายทอด reducing equivalent ไปให้ O_2 โดยอาศัย respiratory chain หรือ electron transport chain ที่อยู่ในเมมเบรนชั้นในของไมโทคอนเดรีย พลังงานที่เกิดขึ้นจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะถูก ATP synthase นำไปสร้าง ATP จาก ADP และ P_i วิธีการสร้าง ATP นี้เรียกว่า oxidative phosphorylation (พัชรา วีระกะลีส, 2544; Garrett and Grisham, 1999; Lodish et al., 2004)

Stage 1. Bulk food is digested in the mouth, stomach, and small intestine to yield small molecules.

Stage 2. Sugar, fatty acid, and amino acid molecules are degraded in the cytoplasm of cells to yield acetyl-SCoA.

Stage 3. Acetyl-SCoA is oxidized inside mitochondria by the citric acid cycle to yield CO_2 and reduced coenzymes.

Stage 4. The energy transferred to the reduced coenzymes in stage 3 is used to make ATP by the coupled pathways of electron transport and oxidative phosphorylation.



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของกระบวนการสลายสารอาหาร, citric acid cycle หรือ Krebs cycle, electron transport chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (McMurry and Castellion, 1995)

ลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ในเซลล์ยูคาริโอต มีขนาด รูปร่างและปริมาณแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เซลล์นั้นอยู่และอัตราการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรียที่ตับจะมีรูปร่างค่อนข้างกลม (nearly spherical) ส่วนไมโทคอนเดรียที่กล้ามเนื้อหัวใจมีรูปร่างยาวหรือทรงกระบอก (long or cylindrical) รวมทั้งยังมีจำนวนของ cristae ภายในไมโทคอนเดรียมากกว่า ไมโทคอนเดรียที่เซลล์ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีจำนวนอยู่ระหว่าง 800-2,000 ไมโทคอนเดรีย แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วจะไม่มีไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2002) หรือใน sperm cell จะมีไมโทคอนเดรียเพียง 50-75 ไมโทคอนเดรีย (Metzler, 2003) โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียมีขนาดกว้างประมาณ 0.5 μm และยาวประมาณ 1 μm (Voet, 1990) มีเยื่อหุ้มล้อมรอบ 2 ชั้น (รูปที่ 4) คือ

1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) เป็นเยื่อที่มีลักษณะผิวเรียบ ประกอบด้วยไขมัน 30-40 % , โปรตีน 60-70 % (Devlin, 2002) โดยที่เยื่อหุ้มชั้นนอกนี้จะมีโปรตีนที่วางตัวทำให้เกิดช่องให้สารผ่านได้แบบไม่เฉพาะเจาะจงที่เรียกว่า porin อยู่ ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกมีคุณสมบัติยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 10,000 daltons ผ่านได้อย่างอิสระ (Voet, 1990) นอกจากนี้ในโครงสร้างจะมีส่วนที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในเรียกว่า contact site และที่บริเวณนี้จะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition pore (PTP) (รูปที่ 5 และ 6) ซึ่งในสภาพที่ปิดจะยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจนถึงน้ำหนักโมเลกุล 1,500 daltons สามารถผ่านเข้าออกระหว่าง matrix กับไซโตพลาสซึมอย่างอิสระ โดยปัจจัยที่จะทำให้ PTP เปิดได้ เช่น แคลเซียมที่สะสมอยู่ในไมโทคอนเดรีย สภาวะที่มี mitochondrial transmembrane potential ต่ำ เอนไซม์สำคัญที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก คือ monoamine oxidase ซึ่งเป็น marker ของเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Szewczyk and Wojtczak, 2002) และนอกจากนี้ยังมีช่องว่างที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในเรียกว่า intermembrane space ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง ATP

2. เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) เป็นเยื่อหุ้มที่มีพื้นที่ผิวมากกว่าชั้นนอก เนื่องจากเยื่อหุ้มชั้นในนี้จะพับไปพับมายื่นเข้าไปในส่วนของ matrix ซึ่งจะเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เยื่อหุ้มชั้นในนี้จะประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80% มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและไอออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่จะให้เฉพาะ O_2 , CO_2 , H_2O และ NH_3 ผ่านเข้าออกอย่างอิสระ ส่วนสารจำพวก hydrophilic metabolites และ inorganic ions ที่สำคัญต่อกระบวนการชีวเคมีของเซลล์จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มชั้นในได้โดยอาศัย specific channels และ carrier protein ที่อยู่ในเยื่อชั้นนี้ นอกจากนี้ที่เยื่อหุ้มชั้นในยังมีเอนไซม์ต่างๆ ที่ทำหน้าที่เฉพาะ

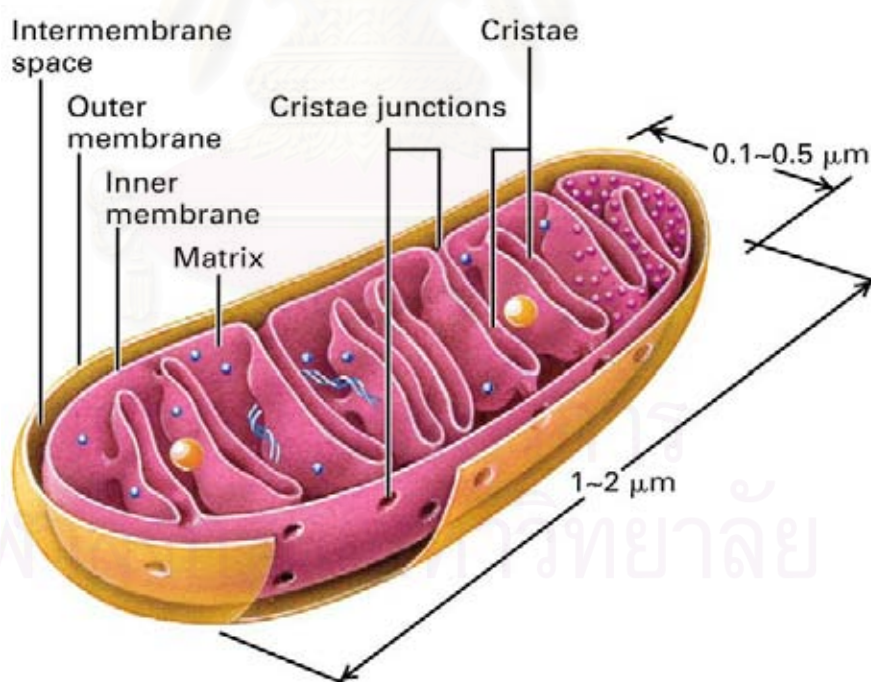
เช่น respiratory chain enzyme, ATP synthase (Devlin, 2002; Szweczyk and Wojtczak, 2002) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2002)

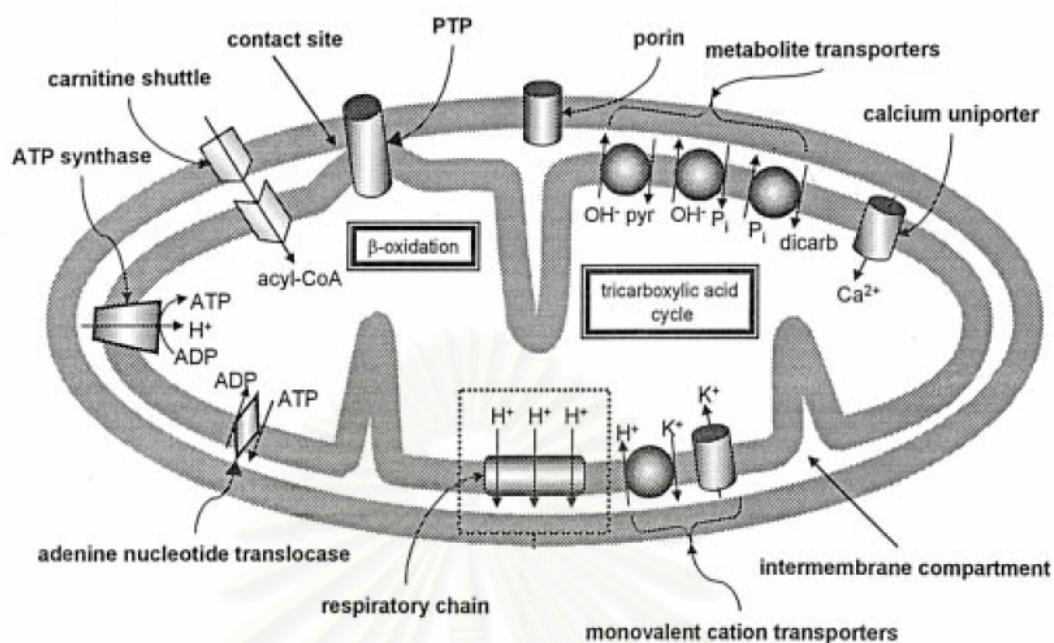
Outer Membrane	Intermembrane Space	Inner Membrane	Matrix
Monoamine oxidase	Adenylase kinase	Succinate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside diphosphate kinase	F ₁ F ₀ ATP synthase	Citrate synthase
Phospholipase A		NADH dehydrogenase	Isocitrate dehydrogenase
Fatty acyl-CoA Synthetases		β -hydroxybutyrate dehydrogenase	α -Ketoglutarate dehydrogenase
NADH:cytochrome-c reductase (rotenone-insensitive)		Cytochromes b,c ₁ ,c,a,a ₃	Aconitase
Cholin phosphotransferase		Carnitine:acyl-CoA transferase	Fumarase
		Adenine nucleotide Translocase	Succinyl-CoA synthetase
		Mono-,di-,and tricarboxylate translocase	Malate dehydrogenase
		Glutamate-aspartate Translocase	Fatty acid β -oxidation system
		Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	Glutamate dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate transaminase
			Ornithine transcarbamoylase
			Carbamoyl phosphate synthetase I
			Heme synthesis enzymes

ส่วนภายในไมโทคอนเดรียจะเรียกว่า matrix ภายในจะประกอบไปด้วยเอนไซม์ต่างๆ ในวัฏจักรเครปส์ ยกเว้นเอนไซม์ succinate dehydrogenase จะอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการ fatty acid oxidation นอกจากนี้ยังมี mitochondrial DNA (mtDNA), ribosome, และโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการ transcription ของ mtDNA และกระบวนการ translation ของ mRNA (Devlin, 2002)

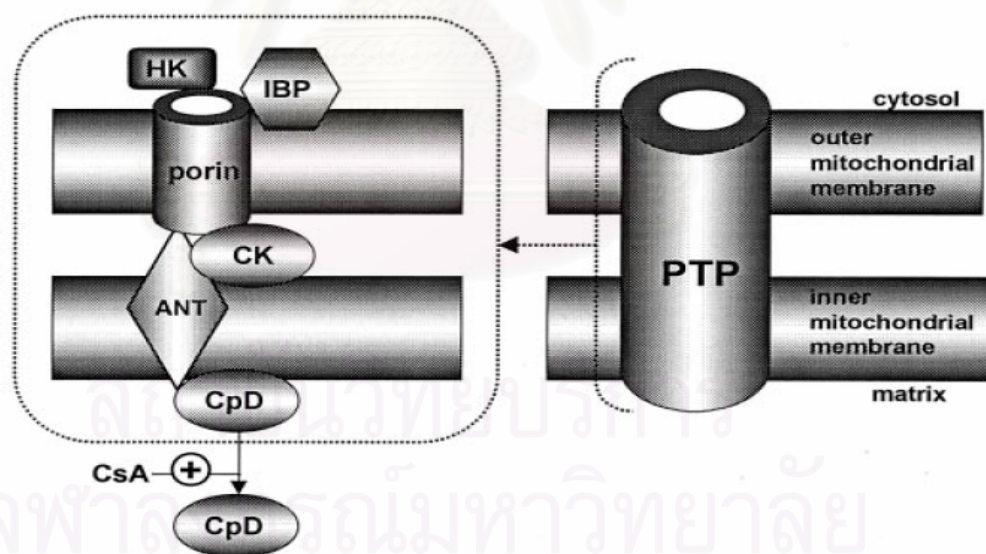
ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ชนิดเดียวที่มี DNA เป็นของตัวเอง มีลักษณะเป็น circular DNA ที่บรรจุคำสั่งของ polypeptide chains ประมาณ 24 polypeptides ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบของ complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจหรือเป็นส่วนสำคัญอื่นๆ ของ energy-coupling machinery แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนส่วนใหญ่ในไมโทคอนเดรียจะสังเคราะห์จาก DNA ในนิวเคลียสแล้วจึงขนส่งเข้าสู่ไมโทคอนเดรียด้วยกลไกที่ซับซ้อน (Szewczyk and Wojtczak, 2002)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Lodish et al., 2004)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย (Szewczyk and Wojtczak, 2002)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP) ภาพด้านขวาแสดงให้เห็นว่า PTP จะอยู่บริเวณ contact site ซึ่งเชื่อมระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ส่วนภาพด้านซ้ายแสดงให้เห็นส่วนประกอบบริเวณ contact site ได้แก่ peripheral benzodiazepine receptor, HK : hexokinase, ANT : adenine nucleotide translocase, CK : creatine kinase (พบในไมโทคอนเดรียของเซลล์กล้ามเนื้อ), CpD : cyclophilin D (เป็นบริเวณที่ cyclosporine A มาจับได้)

ส่วนประกอบของ respiratory chain

ในช่วงปี ค.ศ. 1948-1950 Eugene Kennedy และ Albert Lehninger ได้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสร้าง ATP จะเกิดคู่กับปฏิกิริยา oxidation (oxidative phosphorylation) และกระบวนการนี้เกิดขึ้นภายใน mitochondria ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าในส่วนของ oxidation จะเกิดขึ้นโดย electron transport chain หรือ respiratory chain และในส่วนของ phosphorylation จะเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ATP synthase (Zubay, 1993)

Electron transport chain ในไมโทคอนเดรียประกอบด้วยตัวขนส่งอิเล็กตรอนชนิดต่างๆ จัดเรียงตัวกันอยู่ในรูปของ complex ต่างๆ 4 complex อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH และ FADH_2 ไปยังออกซิเจน แต่ละ complex ประกอบด้วยเอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอน, ตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่มี prosthetic group, และโปรตีนโครงสร้างที่ทำให้ complex คงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้ยังมีตัวขนส่งอิเล็กตรอนขนาดเล็กทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex ได้แก่ cytochrome c และ coenzyme Q หรือ ubiquinone (พัชรา วีระกะลัส, 2544)

ตัวขนส่งอิเล็กตรอนใน electron transport chain ได้แก่ (Garrett and Grisham, 1999; Zubay, 1993)

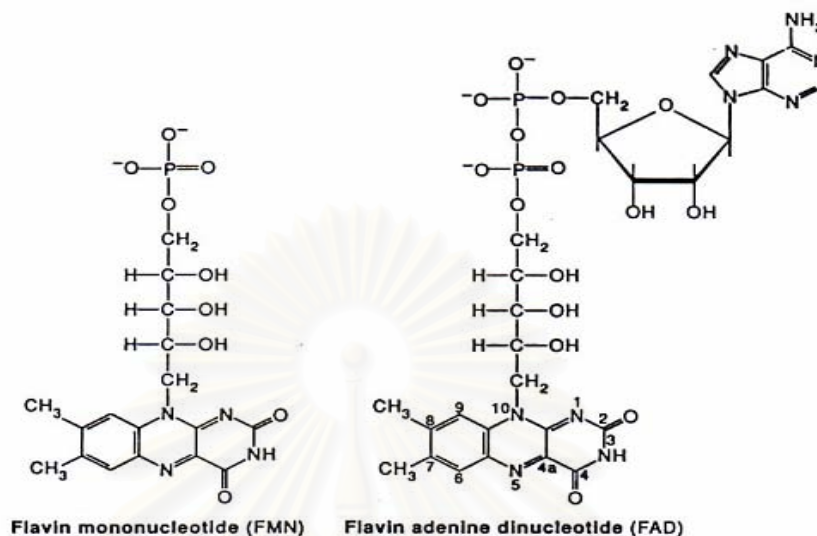
1. flavoprotein เป็นโปรตีนที่มี prosthetic group เชื่อมอยู่ prosthetic group ได้แก่ flavin mononucleotide (FMN) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex I และ flavin adenine dinucleotides (FAD) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex II (รูปที่ 7)

2. coenzyme Q หรือ ubiquinone (CoQ หรือ UQ) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ได้ในชั้นไขมัน ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex I, II และ III (รูปที่ 8)

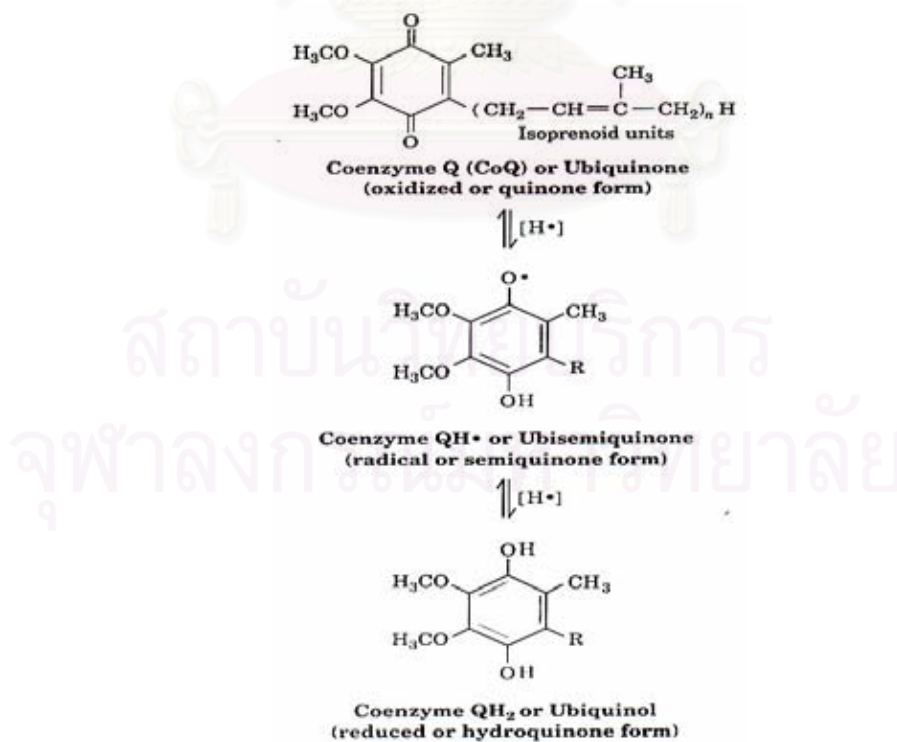
3. cytochrome เป็นโปรตีนที่มี heme เป็น prosthetic group ได้แก่ cytochrome b, c, c_1 , a, และ a_3 ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนได้ครั้งละ 1 ตัว โดย cytochrome เมื่ออยู่ในสภาพออกซิไดซ์ โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนมา 1 ตัวจะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพรีดิวซ์ โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ซึ่งเมื่อส่งอิเล็กตรอนไป 1 ตัวก็จะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพออกซิไดซ์ตามเดิม (รูปที่ 9)

4. Iron-sulfur protein เป็นโปรตีนทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบแต่เหล็กไม่ได้อยู่ในรูป heme เหมือนกับ cytochrome แต่ใน Fe-S โปรตีนนี้จะอะตอมของเหล็กจะจับอยู่กับอะตอมของซัลเฟอร์ด้วยพันธะโคเวเลนต์แล้วเกิดเป็น Fe-S center การรับส่งอิเล็กตรอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง Fe^{2+} และ Fe^{3+} (รูปที่ 9)

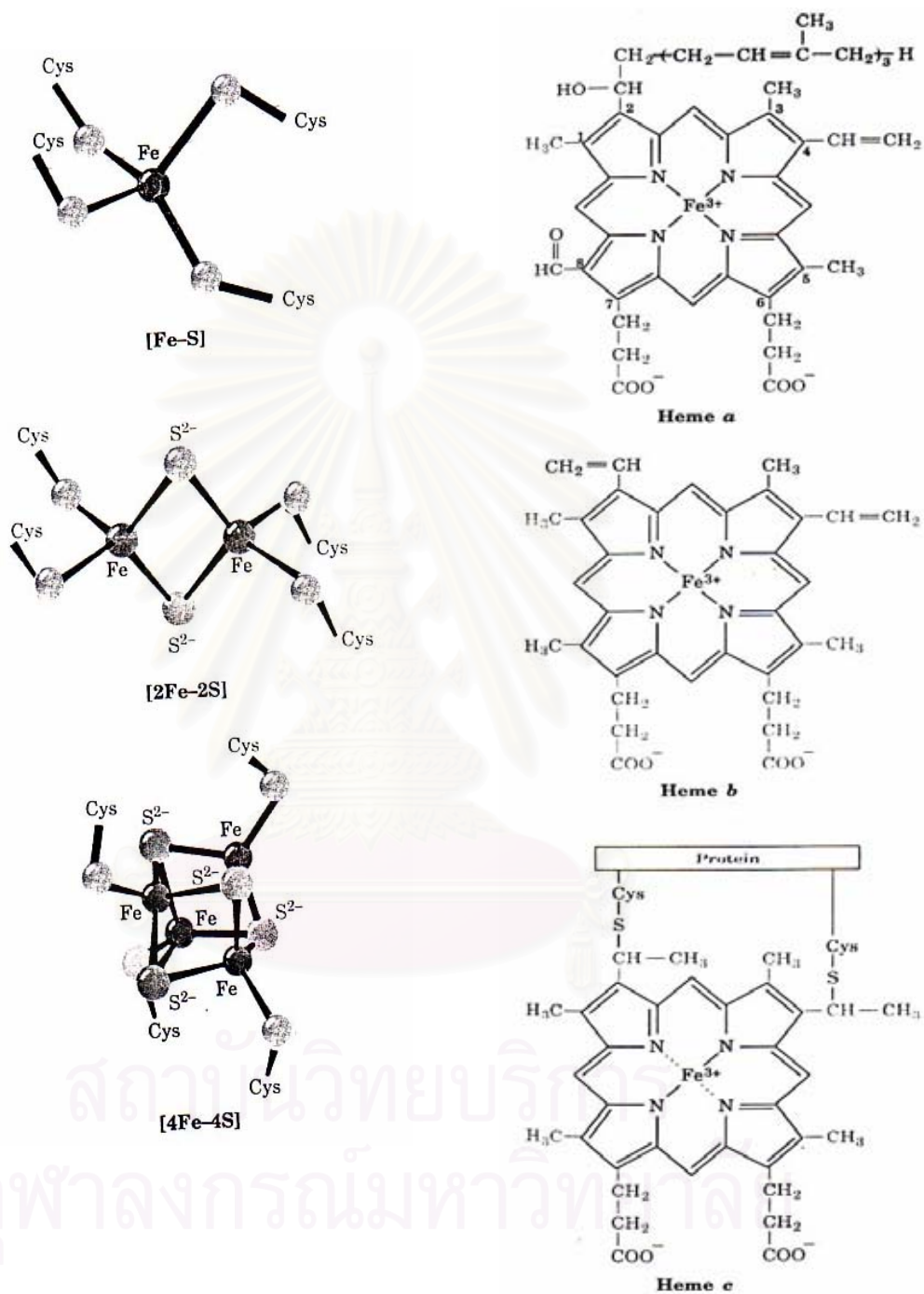
5. Protein-bound copper จะขนส่งอิเล็กตรอนครั้งละ 1 อิเล็กตรอน ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง Cu^+ และ Cu^{2+}



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



รูปที่ 8 แสดงการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Coenzyme Q (Voet, 1990)



รูปที่ 9 ด้านซ้ายแสดงลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ ส่วนด้านขวาแสดงลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b และ c ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ cytochrome a, b และ c ตามลำดับ (Voet,1990)

สับสเตรทที่ไม่โตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์ และทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจแบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. NAD⁺-linked substrates เช่น glutamate, malate, pyruvate, α -ketoglutarate เป็นสับสเตรทที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาในไมโตคอนเดรียโดยวัฏจักรเครบส์จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H⁺) ไปรีดิวซ์ NAD⁺ ได้เป็น NADH + H⁺ ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex 1

2. FAD-linked substrates ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนอะตอม (2H⁺) ที่ปลดปล่อยออกมาจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น FADH₂ ให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Mathews and Holde, 1990 ; Lehninger et al., 2000)

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนใน respiratory chain (Devlin, 2002; Voet, 1990)

อิเล็กตรอน หรือ reducing equivalent (ใน NADH หรือ FADH₂) ถูกถ่ายทอดไปยังสารที่มีค่า redox potential (E₀) เป็นบวกเพิ่มขึ้นตามลำดับ ทำให้ระหว่างถ่ายทอดอิเล็กตรอนมีพลังงานปล่อยออกมา สารสุดท้ายที่มารับอิเล็กตรอน คือ O₂ ซึ่งจะกลายเป็น H₂O ดังรูปที่ 11

โดยในตอนแรกสับสเตรทที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงสารอาหารที่ให้พลังงานต่างๆ จะอยู่ในสภาพออกซิไดซ์ จากนั้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจะส่งอิเล็กตรอนไปยัง coenzyme NAD⁺ และ FAD เกิดเป็น NADH หรือ FADH₂ ซึ่งจะส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้กับ complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจซึ่งประกอบด้วย 4 complex ดังนี้ (รูปที่ 10)

1. complex I หรือ NADH dehydrogenase หรือ NADH-ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ NADH ที่อยู่ใน matrix ของไมโตคอนเดรีย แล้วส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ coenzyme Q โดยเริ่มแรก FMN จะรับอิเล็กตรอนจาก NADH จากนั้นจะส่งต่อไปให้ Fe³⁺ ใน Fe-S protein ซึ่งอิเล็กตรอนจาก Fe-S protein ก็จะถูกส่งต่อไปยัง coenzyme Q

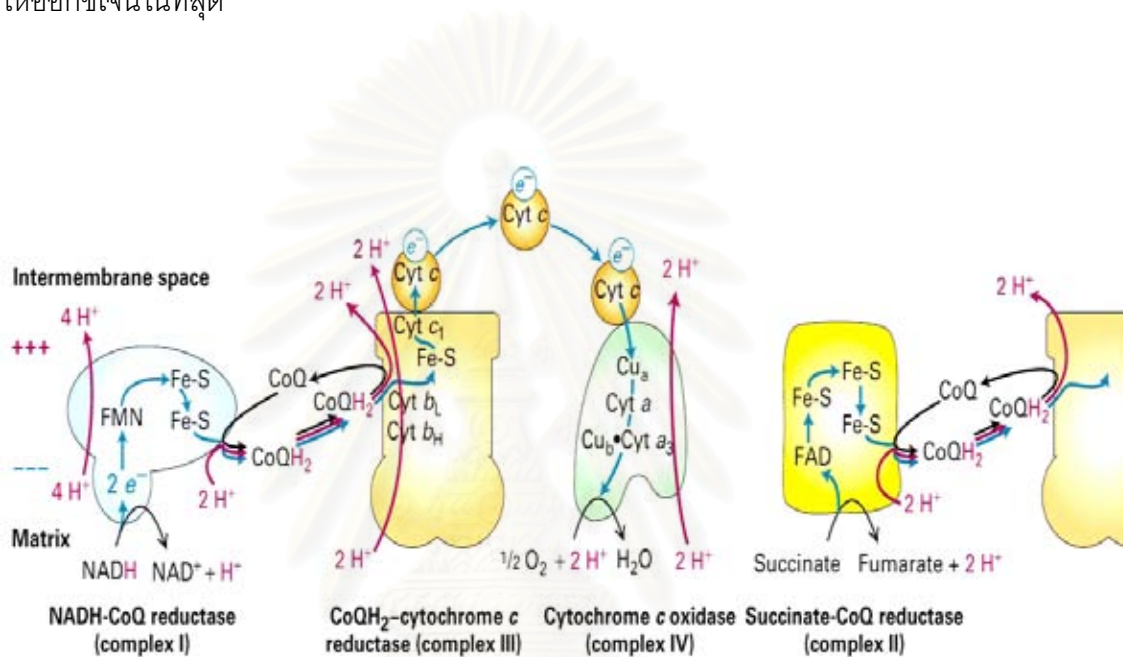
2. complex II หรือ succinate dehydrogenase หรือ ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ succinate ได้เป็น fumarate และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปให้ FAD แล้วผ่านไปตาม Fe-S centers เพื่อส่งต่อไปให้ coenzyme Q

3. complex III หรือ cytochrome bc₁ complex หรือ ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase ประกอบด้วย cytochrome b, cytochrome c₁ และ iron-sulfur protein ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก coenzyme Q ไปยัง cytochrome c

cytochrome c เป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic protein ขนาดเล็ก อยู่บนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียชั้นใน เมื่อ cytochrome c จับกับ complex III จะได้รับอิเล็กตรอนทำให้กลายเป็น reduced cytochrome c จากนั้นจะเคลื่อนที่

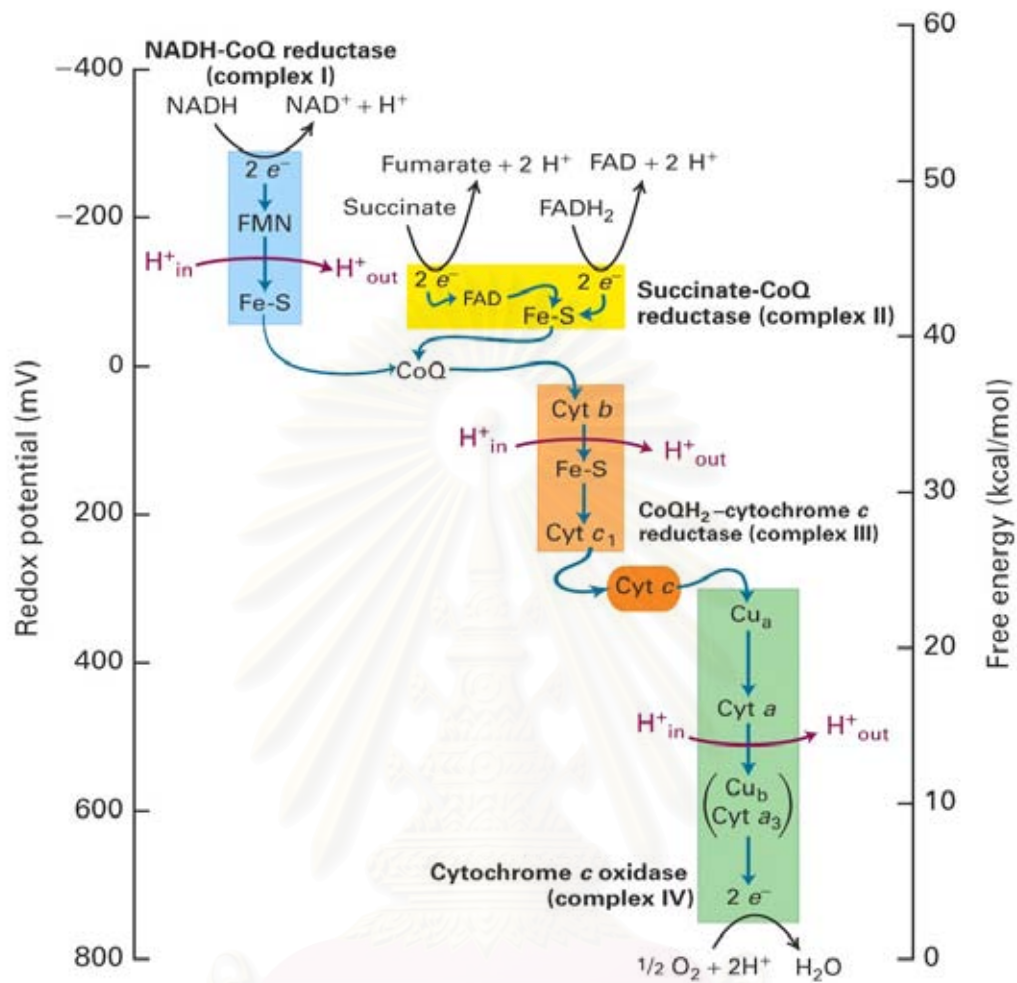
ไปตามผิวของเมมเบรนจับกับ subunit II ของ complex IV หรือ cytochrome c oxidase แล้วส่งต่ออิเล็กตรอนให้ Cu_A site

4. complex IV หรือ cytochrome c oxidase ทำหน้าที่ในขนส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลของออกซิเจนทำให้ออกซิเจนถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ โดยเริ่มจาก Cu_A รับอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ส่งต่อไปยัง cytochrome a และ cytochrome a_3 - Cu_B แล้วส่งให้ออกซิเจนในที่สุด

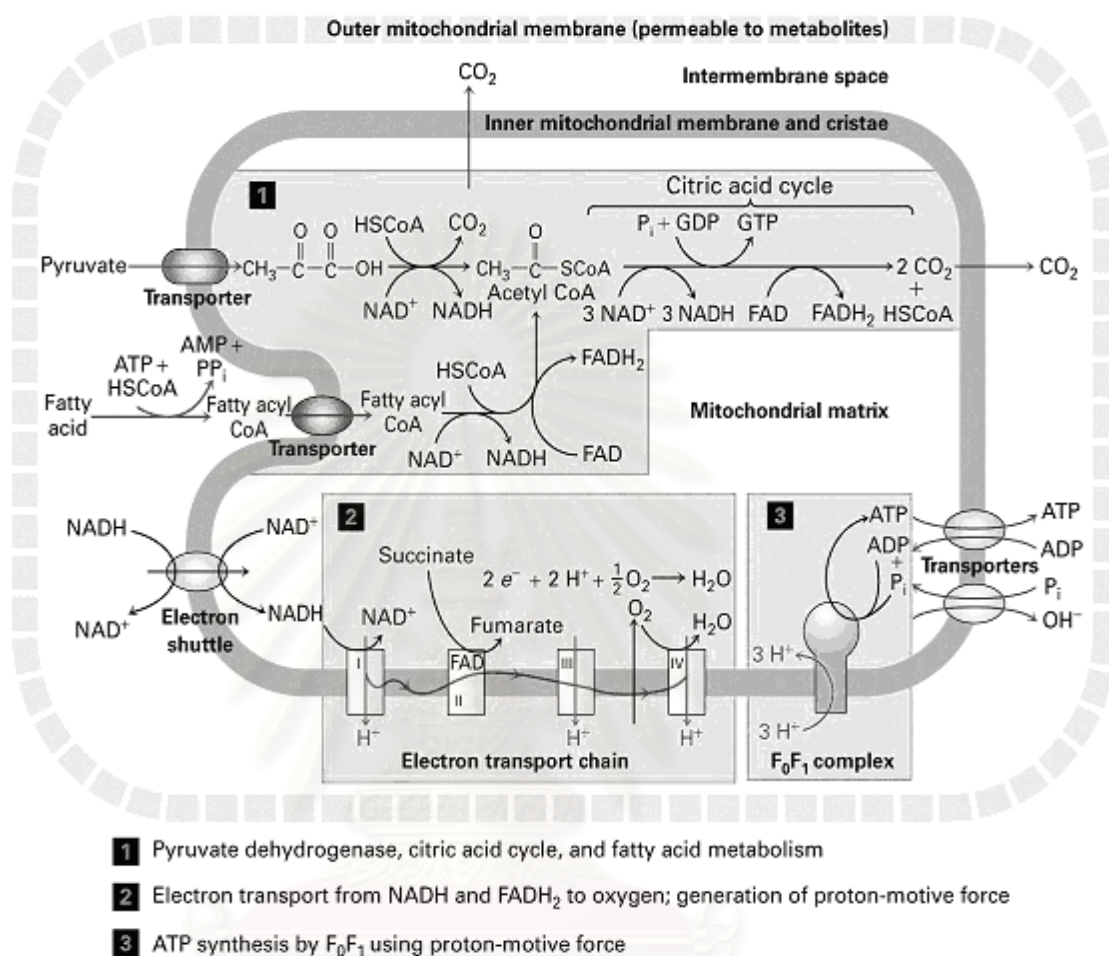


รูปที่ 10 แสดงส่วนประกอบและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย (Lodish et al., 2004)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลง redox potential และ free energy ระหว่างขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจ (Lodish et al., 2004)



รูปที่ 12 แสดงสรุปการเกิด aerobic oxidation ของ pyruvate และ fatty acid, electron transport chain และการสร้าง ATP ที่เกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย (Lodish et al., 2004)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์ ATP

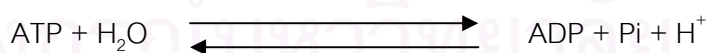
Chemiosmotic theory

กลไกของการเกิด oxidative phosphorylation เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP มีหลายทฤษฎี โดยทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับมากที่สุด คือ chemiosmotic hypothesis ซึ่งนำเสนอโดย Peter Mitchell ในปี 1961 โดยกล่าวไว้ว่า พลังงานที่ได้จากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจะถูกนำไปใช้ในการผลักโปรตอนจากใน matrix ของไมโทคอนเดรียออกสู่อินเตอร์เมมเบรนสเปซ ซึ่งทำให้เกิด electrochemical gradient ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และจาก gradient ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกิดเป็น electrochemical potential หรือ proton-motive force เป็นแหล่งพลังงานนำไปใช้สร้าง ATP (Voet,1990)

การเกิด proton-motive force

ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADH และ FADH_2 ไปยังออกซิเจน การขนส่งอิเล็กตรอนผ่าน complex I, III และ IV จะเกิดพลังงานนำไปใช้ในการผลักโปรตอนจากใน matrix ออกสู่อินเตอร์เมมเบรนสเปซ การขนส่ง 2 อิเล็กตรอนจาก 1 NADH จนถึงออกซิเจนจะมีการผลักโปรตอนออกไป 10 โปรตอน (complex I ผลักได้ 4 โปรตอน, complex III ผลักได้ 4 โปรตอน และ complex IV ผลักได้ 2 โปรตอน) แต่ถ้าเป็นการขนส่งอิเล็กตรอนจาก FADH_2 ไปยังออกซิเจนโดยไม่ผ่าน complex I ก็จะมีโปรตอนออกไปได้เพียง 6 โปรตอน การผลักโปรตอนดังที่กล่าวมาแล้วมีผลทำให้ด้านนอกมีโปรตอนมากกว่าด้านใน matrix (chemical gradient) และทำให้ด้านนอกมีประจุบวกมากกว่าด้านใน (electrical gradient) หรือรวมเรียกว่าเกิด electrochemical gradient ซึ่งเป็นพลังงานเชิงเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า electrochemical potential หรือ proton-motive force นั่นเอง และเมื่อโปรตอนจาก intermembrane space ไหลกลับสู่ matrix ทางเอนไซม์ ATP synthase ($\text{F}_1\text{-F}_0\text{-ATPase}$) พลังงานดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนรูปนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP จาก $\text{ADP} + \text{P}_i$ ดังสมการ

ATP synthase ($\text{F}_1\text{-F}_0\text{-ATPase}$)

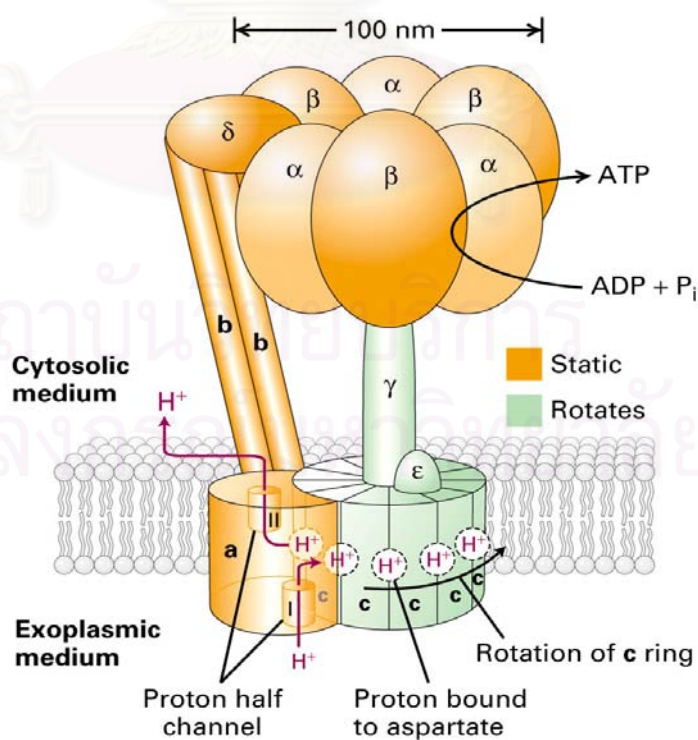


ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ระหว่างการ synthesis และ hydrolysis โดยถ้าสารใดก็ตามที่ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ของไมโทคอนเดรีย คือทำให้ oxidation และ phosphorylation แยกออกจากกัน เช่น DNP จะมีผลทำให้ electrochemical gradient เสียไป ในสถานะเช่นนี้จะกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ซึ่งเป็นผลจาก ATPase activity ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถวัด ATPase activity ได้โดยการวัดปริมาณ P_i ที่เกิดจากการสลาย ATP (Danishefsky,1980; Devlin, 2002; Zubay, 1993)

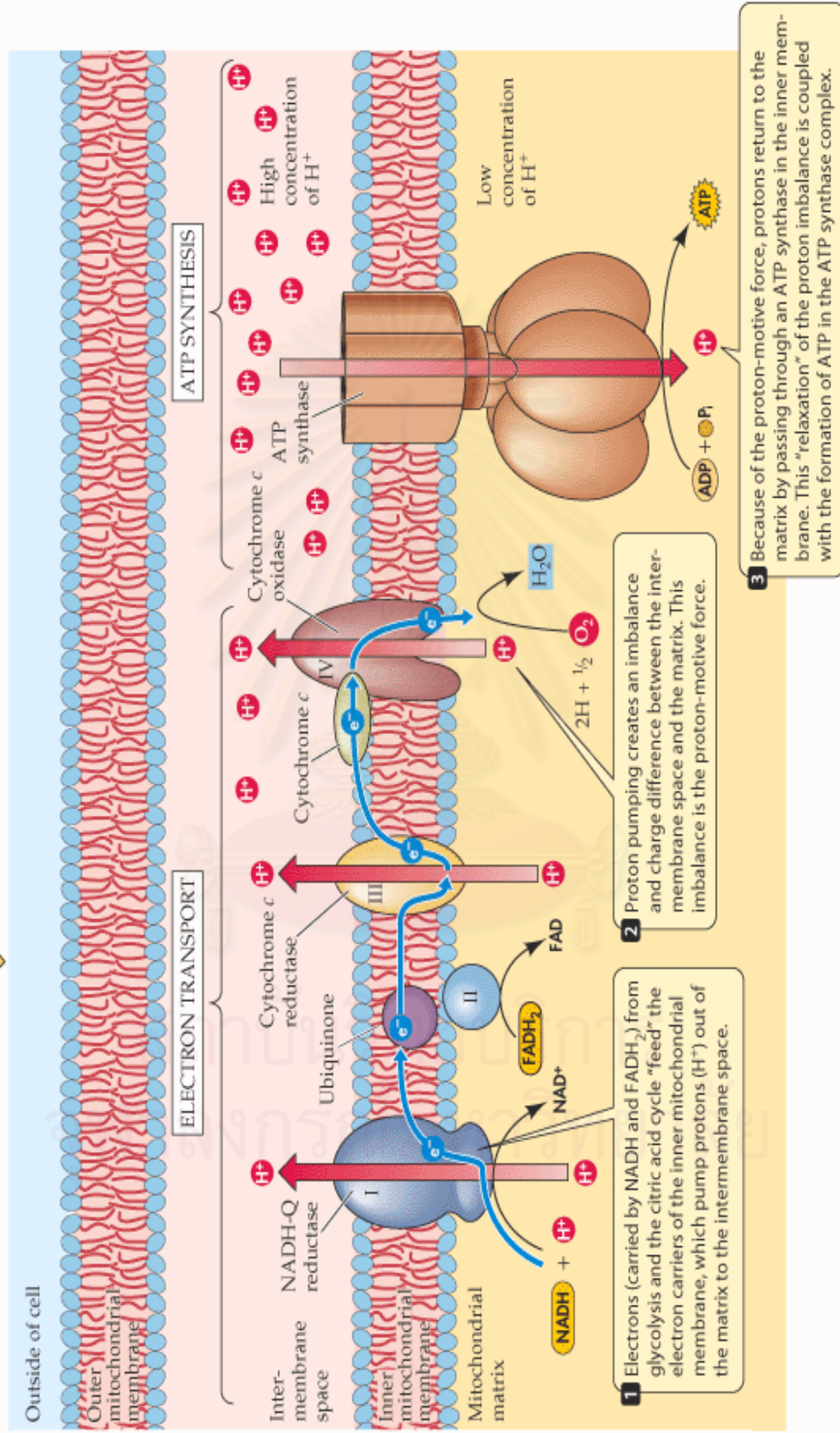
ATP synthase และการสังเคราะห์ ATP

การสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรีย จะต้องอาศัยเอนไซม์ ATP synthase หรือ F_1-F_0 -ATPase ซึ่งจัดว่าเป็น complex หนึ่งของลูกโซ่การหายใจ โครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase ประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ F_1 และ F_0 ส่วนของ F_0 จะประกอบไปด้วย integral membrane protein 3 ชนิด ในรูปที่ 13 F_0 จะเป็นส่วน a, b, และ c โดยส่วน a มี 1 subunit ส่วน b มี 2 subunit และส่วน c มี 12 subunit ในไมโทคอนเดรียของสัตว์ สำหรับส่วน c จะเรียงตัวเป็นวงแหวนรูปโดนัท ในส่วนของ F_1 จะประกอบไปด้วย α 3 subunit, β 3 subunit, และส่วนของ γ , δ , ϵ อย่างละ 1 subunit โดยส่วนของ γ จะมีลักษณะเป็นวงที่ขนาดพอดีกับส่วนตรงกลางของวงแหวน c-subunit ของ F_0 ส่วนของ ϵ จะเชื่อมติดกับ γ และบางส่วนของ c-subunit ของ F_0 สำหรับส่วนของ α และ β จะเรียงตัวในลักษณะ hexamer ($\alpha\beta\alpha\beta$) อยู่บนส่วนยอดของ γ subunit

เอนไซม์ ATP synthase จะฝังตัวอยู่ในเมมเบรน โดยมีส่วนของ F_1 เรียงตัวในลักษณะของ knob ยื่นเข้าไปในส่วนของ matrix และเมื่อโปรตอนไหลจาก intermembrane space กลับเข้าสู่ matrix ทาง ATP synthase จะทำให้ส่วนวงแหวน c-subunit ของ F_0 และส่วน ϵ และ γ ของ F_1 เกิดการหมุน มีผลทำให้ส่วน β -subunit ของ F_1 เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ ADP และ P_i ที่จับอยู่กับส่วน β -subunit ของ F_1 เกิดการสังเคราะห์เป็น ATP (Devlin, 2002; Lodish, 2004)



รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase (Lodish et al., 2004)



รูปที่ 14 แสดง chemiosmotic hypothesis and electron transport chain (Doroquez, 2004)

ความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย

สารพิษที่จะมีผลต่อการสร้างพลังของไมโทคอนเดรีย อาจเกิดขึ้นโดยไปรบกวนการเกิด electrochemical gradient หรือไปทำลาย electrochemical gradient พิษเฉียบพลันของสารยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจะทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเกิดอาการต่างๆ เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง, ความดันโลหิตต่ำ, ปวดหัว, เหนื่อยง่าย, สับสน เป็นต้น (Wallace and Starkov, 2000) นอกจากนี้สารพิษมีผลไปยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจแล้ว ยังมีสารพิษที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียด้วยกลไกอื่นๆ อีก โดยสามารถแบ่งสารที่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ดังนี้

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

1.1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex I คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q โดยทั่วไป complex I จะเป็นจุดเกิดความเสียหายได้ง่ายที่สุดในลูกโซ่การหายใจ มีสารเคมีมากกว่า 60 ชนิดทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ทราบแล้วว่ามีผลยับยั้ง complex I เช่น rotenone, rhein, ptericidin, amytal, ยาพวก barbiturate, mercurials, demerol เป็นต้น

1.2 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex II คือ สารที่ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก succinate ไปยัง coenzyme Q เช่น malonate ซึ่งออกฤทธิ์เป็น competitive inhibitor ของ succinate ในการจับกับเอนไซม์ succinate dehydrogenase, carboxin, thenoyl trifluoroacetone (TTFA)

1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex III คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c เช่น myxothiazol, antimycin A, funiculosin, zinc ion เป็นต้น

1.4 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex IV คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน โดยถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนแล้วยังทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม ตัวอย่างสาร เช่น cyanide, azide, carbon monoxide เป็นต้น

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP เช่น

- oligomycin ออกฤทธิ์โดยไปจับกับโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในส่วน F_0 ของ ATP synthase

แล้วทำให้ไม่เกิดการไหลของโปรตอนผ่าน F_0 มีผลทำให้โปรตอนบริเวณ intermembrane space มากจนทำให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนเกิดขึ้นต่อไปไม่ได้ (Garrett and Grisham, 1999)

- atractyloside ออกฤทธิ์ยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger et al., 2000)

- DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน P_i จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำให้ขาด P_i ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

3. สารที่ออกฤทธิ์ uncoupling

สารในกลุ่มนี้เรียกว่า uncoupler สาร uncoupler จะออกฤทธิ์โดยทำให้โปรตอนที่อยู่ ใน intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATP synthase ดังนั้น gradient ของโปรตอนที่เคยมีอยู่นั้นก็เลยหายไป ซึ่งมีผลทำให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP ถูกแยกออกจากกัน กล่าวคือการถ่ายเทอิเล็กตรอนยังคงเกิดขึ้นแต่จะไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP และทำให้พลังงานที่ได้รับจากสารอาหารถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนแทน (Garrett and Grisham, 1999)

กลไกการเกิด uncoupling มีหลายกลไก สามารถแบ่งสาร uncoupler ตามกลไกการเกิดได้ดังนี้ (Hanstein, 1976; Wallace and Starkov, 2000)

3.1 สารที่ออกฤทธิ์เป็น structural uncoupling ได้แก่ สารและรวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่มีผลทำให้ความแข็งแรงของ inner membrane เสียไป ซึ่งมีผลทำให้ respiratory control ลดลง เพิ่ม ATPase activity และประสิทธิภาพในการ phosphorylation ลดลง เช่น detergent, phospholipase, การ sonicate เป็นต้น

3.2 ionophores สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามกลไก ได้แก่

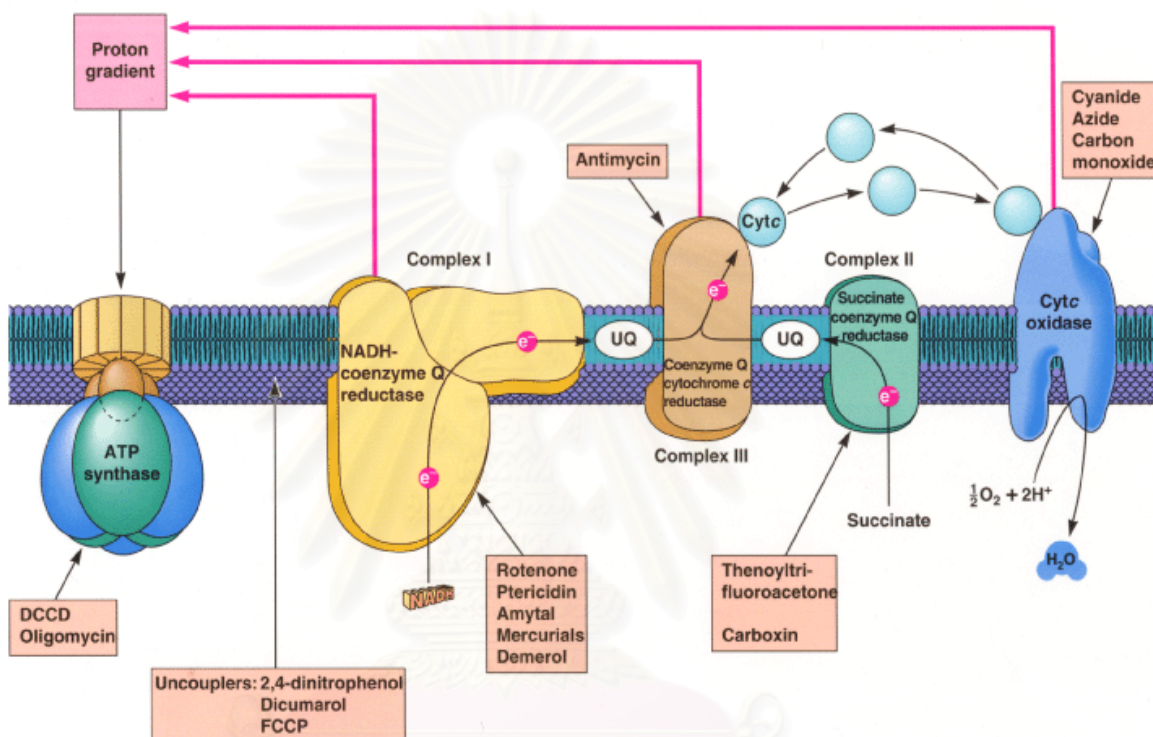
3.2.1 channel type สารในกลุ่มนี้จะเรียงตัวเป็นช่องในชั้นไขมันของไมโทคอนเดรีย เช่น gramicidin เป็นต้น

3.2.2 carrier type โดยการ form เป็น lipid-soluble-complex กับ ion แล้วเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย เช่น valinomycin, nigericin เป็นต้น

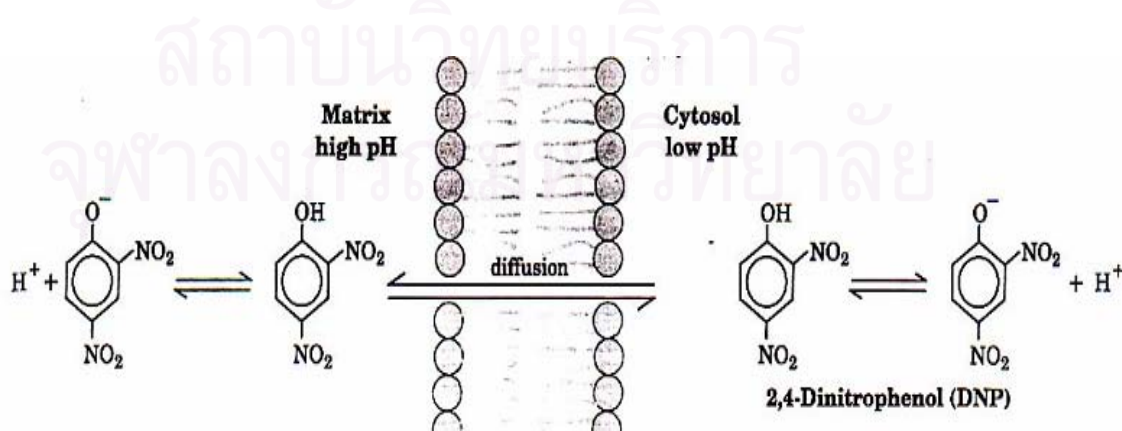
3.3 สารพวก phenols และ anionic aromatic compounds อื่นๆ สารกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid ทำให้สามารถจับกับ H^+ ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน แล้วเคลื่อนที่เข้าไปใน matrix แยกตัวให้ H^+ การจับและการแตกตัวเช่นนี้ได้เนื่องจากด้านใน matrix จะมี pH สูงกว่าด้านนอก (รูปที่ 16) เช่น DNP (2,4-dinitrophenol), FCCP (carbonyl cyanide p-

trifluoromethoxyphenylhydrazine), CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) เป็นต้น

3.4 สารที่ออกฤทธิ์ uncoupling โดยเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะโควาเลนต์ ได้แก่ alkylating agents เช่น สารจำพวก mustard gas และ electrophiles เช่น isothiocyanates สารเหล่านี้มีรายงานการเกิด uncoupling แต่ยังไม่ทราบกลไกการเกิดที่แน่นอน



รูปที่ 15 แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation (Garrett and Grisham, 1999)



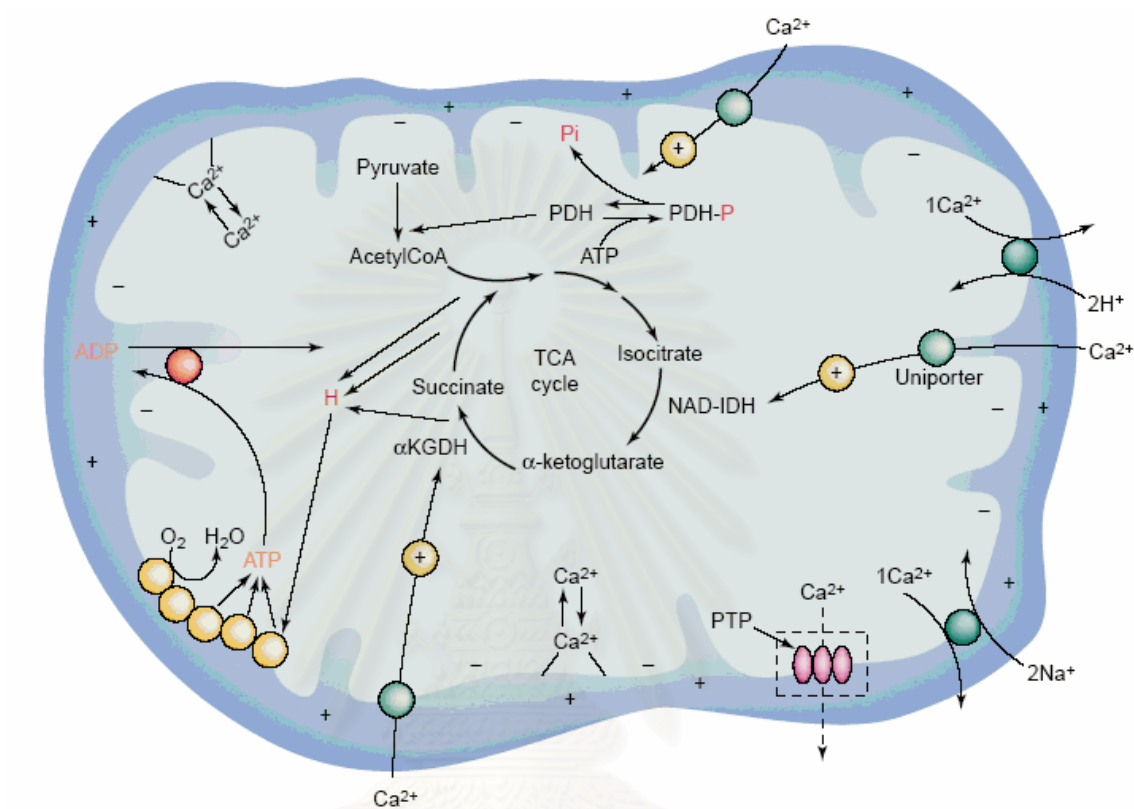
รูปที่ 16 แสดงกลไกการเกิด uncoupling ของ 2,4-Dinitrophenol (DNP) (Voet, 1990)

การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโทคอนเดรีย

แคลเซียมมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้มีการกระตุ้น หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ การหดหรือการคลายตัวของกล้ามเนื้อ การส่งสัญญาณของสารสื่อประสาท รวมทั้งการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย ปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่าไมโทคอนเดรียเป็นอีกออร์แกเนลล์หนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการสะสมแคลเซียมและควบคุมการเปลี่ยนแปลง intracellular Ca^{2+} signaling ของเซลล์ นอกจากนี้หน้าที่ในการสังเคราะห์ ATP (Carafoli, 2003; Devlin, 2002)

การขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง Ca uniporter ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และต้องอาศัย membrane potential ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจ (Murphy and Smith, 2000) ดังนั้นถ้าสารใดก็ตามไปมีผลทำลาย electrochemical potential ของไมโทคอนเดรีย เช่น uncoupler, respiratory chain inhibitor ก็จะทำให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียได้ สำหรับการขนส่งแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นได้หลายทาง (Bernardi, 1999; Carafoli, 2003) ดังนี้ (รูปที่ 17)

1. sodium-independent calcium exchange เป็นการนำ 1 Ca^{2+} ออกจาก matrix โดยแลกเปลี่ยนกับ H^+ 2 โมเลกุล
2. sodium calcium exchange เป็นการนำ 1 Ca^{2+} ออกจาก matrix โดยแลกเปลี่ยนกับ 2 Na^+
3. ผ่านทาง permeability transition pore

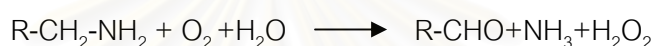


รูปที่ 17 แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย (Carafoli, 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Monoamine oxidase

monoamine oxidase (MAO) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มี flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นองค์ประกอบ ค้นพบครั้งแรกโดย Hare ในปี 1928 เรียกว่า tyramine oxidase ซึ่งต่อมามีผู้ค้นพบเอนไซม์อีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการ oxidation ของ amine ได้แก่ adrenaline oxidase และ aliphatic amine oxidase แต่ภายหลัง Zeller ได้ตั้งชื่อรวมกันว่า monoamine oxidase เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เหมือนกันหลายประการ เอนไซม์ monoamine oxidase จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของ neurotransmitters และ biogenic amines เช่น tryptamine , dopamine, norepinephrine, epinephrine, serotonin เป็นต้น (Davison, 1958) ดังสมการ



Multiple forms ของ monoamine oxidase

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า monoamine oxidase มี 2 isozymatic forms คือ MAO-A และ MAO-B ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทและความไวต่อ inhibitor โดย MAO-A จะเด่นในการออกซิไดซ์ serotonin ซึ่งเป็น neurotransmitters และสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทบางชนิดได้เช่นเดียวกับ MAO-B ได้แก่ tyramine, adrenaline และ dopamine ส่วน MAO-B จะเด่นในการออกซิไดซ์สารพวก arylalkylamines เช่น benzylamine และมีส่วนร่วมในการเมแทบอลิซึม exogenous amines (Binda et al., 2004; Houslay and Tipton, 1976) สำหรับความไวต่อ inhibitor MAO A จะมีความไวในการยับยั้งด้วย clorgyline ส่วน MAO B จะมีความไวในการยับยั้งด้วย pargyline (Urbanc et al., 1991) อย่างไรก็ตาม ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทและความไวต่อการยับยั้งของเอนไซม์ monoamine oxidase นี้ ไม่เหมือนกันในสัตว์แต่ละชนิด และแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างบริเวณหรืออวัยวะ ดังตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในแต่ละอวัยวะจะมีการกระจายของ isozymatic form ของ MAO แต่ละ isozymatic form แตกต่างกัน

ประโยชน์ของ monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) ในทางการแพทย์

ประโยชน์ในทางการแพทย์ที่สำคัญของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase คือการใช้เป็นยารักษาโรคซึมเศร้า เนื่องจากเมื่อมีการยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase โดยเฉพาะชนิดเอ ในระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้เกิดการสะสมของระดับ monoamine transmitter ในสมองเพิ่มขึ้น MAOI ตัวแรกที่นำมาใช้บรรเทาอาการซึมเศร้า คือ iproniazid โดยในราวปี 1957 ได้มีการค้นพบยานี้เพื่อนำมาใช้รักษาวัณโรค แต่ปรากฏว่าเมื่อใช้ยากับผู้ป่วยแล้ว

ผู้ป่วยมีอาการซึมเศร้าลดลง จึงได้มีการนำยานี้มาใช้รักษาผู้ป่วยโรคซึมเศร้าด้วย (Pletscher, 1966) และต่อมาก็มีการพัฒนา MAOI เพิ่มขึ้นอีกหลายตัว ซึ่งสามารถแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมีได้ 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ของ hydrazine เช่น phenelzine, isocarboxazid และอนุพันธ์ของสารอื่น (non-hydrazine) เช่น tranylcypromine

ปัญหาในการใช้ยาในกลุ่มนี้คือถ้ารับประทานอาหารที่มีสารเอมีนสูง จะทำให้เกิดความดันโลหิตสูงอย่างเฉียบพลัน หรือ cheese reaction ได้ แต่เนื่องจากในลำไส้ของคนสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-B มากกว่า MAO-A ดังนั้นถ้ามีความจำเพาะต่อ MAO-A มากกว่าก็น่าจะช่วยให้ผลข้างเคียงน้อยกว่ายา MAOI แบบไม่จำเพาะเจาะจง (Houslay and Tipton, 1976) ดังนั้นจึงมีการพัฒนายาที่เป็น reversible inhibitor ของ MAO-A เช่น moclobemide และ brofaromine

นอกจากนี้สารที่ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ก็สามารถใช้เป็นยารักษาโรค Parkinson ได้ เช่น deprenyl หรือ selegiline ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-B อย่างจำเพาะเจาะจงและยับยั้งแบบถาวร สำหรับการรักษานี้จะให้ selegiline ร่วมกับ L-dopa เพื่อทำให้ระดับของ dopamine ในสมองถูกทำลายน้อยลง นอกจากนี้ยังเชื่อว่า selegiline ยังสามารถลดการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องมาจากกระบวนการ oxidation ของ dopamine และสารพิษอื่นๆ โดยการออกฤทธิ์เป็น antioxidant (Aminoff, 1995)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างสับสเตรทของเอนไซม์ monoamine oxidase จากการศึกษาในหนูขาว (Houslay and Tipton, 1976)

Substrates for the A Species	Substrates for the Both Species	Substrates for the B Species
Serotonin	Tyramine	Benzylamine
Adrenaline	3-Methoxytyramine	2-Phenylethylamine
Noreadrenaline	Dopamine	4-Methoxy-2-phenylethylamine
Octopamine		Vanillylamine

ตารางที่ 4 แสดงสัดส่วนสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในแต่ละ tissues ของหนูขาว (Houslay and Tipton, 1976)

Tissues	Species A activity (percent of total)	Species B activity (percent of total)
Liver	40	60
Liver Parenchymal Cells	50	50
Denervated Liver	40	60
Kidney	70	30
Intestine	70	30
Intestinal Mucosa	60-70	30-40
Spleen	95	5
Lung	50	50
Testis	90	10
Brain	55	45
Superior Cervical Ganglia	90	10
Pineal Gland	15	85
Denervated Pineal Gland	5	95
Vas Deferens	50	50
Denervated Vas Deferens	35	65

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑล สาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่โรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ สภาวะในการเลี้ยงหนูทดลอง คือ เลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 °C จัดให้มีช่วงมืดและช่วงสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมงสลับกันใน 1 วัน และต้องเลี้ยงหนูให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมก่อนนำมาทดลองที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์

หมายเหตุ: จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละสภาวะการทดลองจะมีจำนวน 4 ตัวต่อ 1 สภาวะการทดลอง (n=4) โดยหนู 1 ตัวเมื่อเตรียมได้ไม่โตคอนเดรียแล้วจะนำมาทดสอบกับ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ control คือ การเติม DMSO ซึ่งเป็นสารละลายของ EGCG ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน

2. สารเคมี

ในการเตรียมสารเคมีจะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้งหรือ ultrapure water ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน ตัวอย่างสารที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้จะใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.1 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

สารทดสอบ

epigallocatechin gallate (EGCG) จากบริษัท Sigma Chemical

สารเคมีอื่นๆ

สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical ได้แก่

adenosine 5' diphosphate (ADP), adenosine 5' triphosphate (ATP), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic, ammonium molybdate, benzylamine hydrochloride, bovine serum albumin(BSA), calcium chloride (CaCl₂), copper sulfate (CuSO₄), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,4-dinitrophenol (DNP), Folin&Ciocalteu 's phenol reagent, HEPES,

5-hydroxytryptamine (5-HT), L-glutamic acid, magnesium chloride ($MgCl_2$), malate, oligomycin, potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4), potassium tartrate, rotenone, sodium bisulfite, sodium sulfite, sodium carbonate, sodium hydroxide, succinic acid, sucrose, sulfuric acid (H_2SO_4), tyramine, trichloroacetic acid (TCA)

สารเคมีจากบริษัท E.Merck, Darmstadt คือ

absolute ethanol, sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3), sulfuric acid (H_2SO_4), hydrochloric acid (HCl), potassium hydroxide (KOH)

2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

- ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่ 2.5% w/v ammonium molybdate, 0.3 M ADP+0.6 M Pi 2 μ l, 0.1 M ATP 150 μ l, 10 mg/ml atractyoside 10 μ l, 0.1 M benzylamine hydrochloride 10 μ l, 250 mg/ml BSA, 0.05-0.30 mg/ml BSA, 0.4 M $CaCl_2$ 10 μ l, 20 % w/v $C_2HCl_3O_2$, 0.05 M DNP 2 μ l, 1 M glutamate+1 M malate (pH7.4) 10 μ l, 0.1 M 5-HT 10 μ l, 40 mM HEPES buffer (pH 7.4), 92 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 M NaOH, 15% w/v sodium bisulfite, 20% w/v sodium sulfite, 1% w/v sodium potassium tartate 10 ml, 1 M succinate (pH7.4), 0.25 M sucrose และ 0.1 M tyramine hydrochloride

- ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO ได้แก่ สารทดสอบ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ 10 μ l และ 5 mg/ml rotenone 2 μ l

- ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้ของสารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่ 5 mg/ml oligomycin 2 μ l

3. เครื่องมือ

Clark 's oxygen electrode

Heidolph glass homogenizer (Type S0203 RZR 2)

Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac SCR 20 B, Rotor model RP18-3

Oxygen monitor (YSI model 5300)

pH meter

Strip chart recorder (Gilson model N2)

Spectrophotometer (Ultrospec II)

4. วิธีการวิจัย

4.1 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่งต่อมา Myers และ Slater (1957) ได้ดัดแปลงอีกเล็กน้อย การเตรียมตับและไมโทคอนเดรียควรแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจากตับหนูขาว ทำโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C

ขั้นตอนการเตรียมไมโทคอนเดรียแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ทำให้หนูตายทันทีโดยวิธี cervical dislocation ทำการผ่าตัดหน้าท้อง ตัดตับออกมาอย่างรวดเร็ว แล้วล้างทันทีด้วย homogenizing medium คือ 0.25 M sucrose (pH 7.4) ที่เย็นจัด ล้างหลายๆ ครั้ง จนหมดคราบเลือด แช่ตับใน homogenizing medium ใช้กรรไกรตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างเลือดอีกครั้งโดยสารถละลายเดิม เติม homogenizing medium ลงในดับที่ตัดละเอียดประมาณ 70-80 ml จากนั้นเทใส่หลอด homogenize ที่เย็นจัด โดยหลอด homogenize ที่บรรจุตับจะต้องอยู่ในภาชนะแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไป homogenize ด้วย Heidolph glass homogenizer (Type S0203 RZR 2) จนกระทั่งได้ liver homogenate นำไปใส่ในหลอด centrifuge เพื่อนำไปปั่นแยกต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้มาปั่นแยก (centrifuge) เพื่อให้ได้ไมโทคอนเดรีย โดยใช้ Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac SCR 20 B และ rotor model RP 18-3 โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (รูปที่ 18)

ครั้งที่ 1 นำ liver homogenate มาปั่นที่ 600 x g (2500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifuge ใหม่ สำหรับส่วนที่เป็น pellets ให้ทิ้งไป

หมายเหตุ: ส่วนที่เป็น supernatant ประกอบด้วย mitochondria, microsome

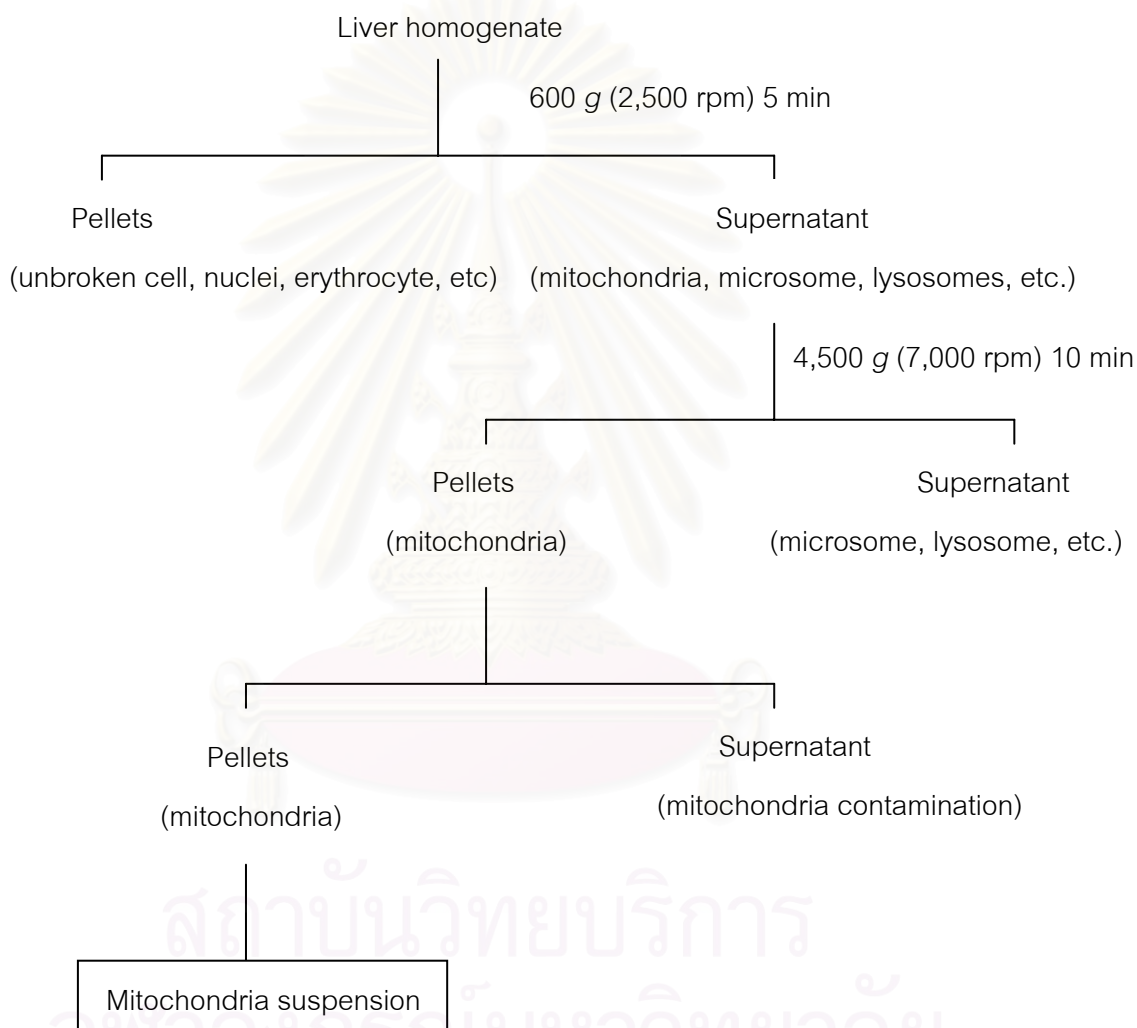
ส่วนที่เป็น pellets ประกอบด้วย nuclei, red blood cell, cell wall, unruptured cell

ครั้งที่ 2 นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นต่อที่ 4500 x g (7000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้แยก supernatant ทิ้งไปเอาเฉพาะส่วน pellets มา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำการ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้ตะกอนกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่ 3 นำมาปั่นต่อที่ 13000 x g (8000 rpm) นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้รินส่วน supernatant ทิ้งไป ส่วน pellets นั้นจะมีลักษณะเป็นชั้นของไมโครโซมสีชมพูอยู่ชั้นบนให้

กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ไล่ลงไปเล็กน้อยแล้วค่อยๆ เทออกด้วยความระมัดระวังทำซ้ำจนชั้นของไมโทคอนเดรียที่น้อยที่สุด จากนั้นทำการ resuspend ตะกอนไมโทคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose แต่เย็นในภาชนะใส่น้ำแข็งเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

หมายเหตุ : ไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการวิจัยจะต้องมีค่า RCI (Respiratory Control Index) มากกว่า 4



รูปที่ 18 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955; Myers and Slater, 1957)

4.2 การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

incubation medium ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งตามสภาวะการทดลองได้ดังนี้

1. incubation medium (pH 7.4) สำหรับศึกษาอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียประกอบด้วย

HEPES buffer	40	mM (60 mOsm)
MgCl ₂	2	mM (6 mOsm)
KCl	92	mM (184 mOsm)

2. incubation medium สำหรับการศึกษ้อัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม (Calcium stimulate respiration) ประกอบด้วย

HEPES buffer	40	mM (60 mOsm)
MgCl ₂	2	mM (6 mOsm)
KCl	92	mM (184 mOsm)
KH ₂ PO ₄	1	mM

3. incubation medium สำหรับการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ATPase ประกอบด้วย

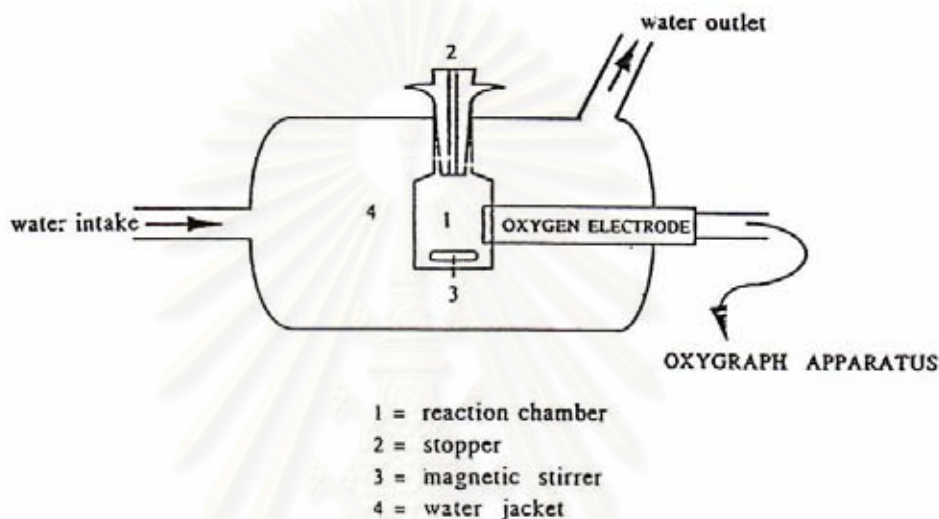
HEPES buffer	40	mM (60 mOsm)
MgCl ₂	2	mM (6 mOsm)
KCl	92	mM (184 mOsm)

4. incubation medium สำหรับการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ประกอบด้วย 0.025 M inorganic phosphate (KH₂PO₄) buffer pH 7.4

4.3 การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson 's reaction chamber ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรู สำหรับเติมสารต่างๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนได้ โดยใช้ Clark 's oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดโดย oxygen electrode จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งจะมีหน้าปัดบอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ สามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson 's recorder แล้วบันทึกผลที่ได้

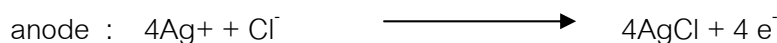
ออกมาในลักษณะของเส้นบันทึก (oxygraph tracing หรือ polarographic tracing) แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับออกซิเจน นอกจากนี้ในระหว่างการ incubate mitochondria เพื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ใน reaction chamber นั้นจะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 °C โดยใช้ น้ำที่มาจากเครื่อง water bath ที่กำหนดอุณหภูมิไว้ ไหลผ่านเข้าและออกส่วน chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้ตลอดเวลา (รูปที่ 19)



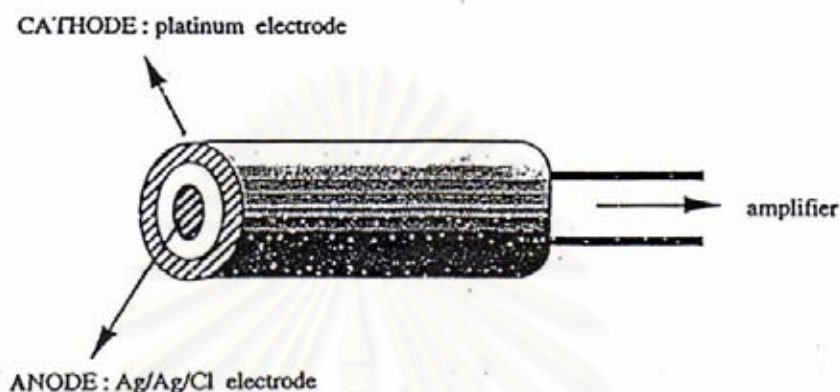
รูปที่ 19 แสดง Gilson's Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor และ recorder)

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

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ



ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้น จะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้วเกิดขึ้นและกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตาม ปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้



รูปที่ 20 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งเป็น Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

การแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโทคอนเดรียมีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน สับสเตรท ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญ ได้ดังนี้

state	condition
1	มีเพียง O ₂
2	มี O ₂ และ ADP
3 (active state)	มี O ₂ , ADP และ substrate
3u	มี uncoupler
4 (resting state)	มี O ₂ และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca ²⁺

การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index , RCI)

นอกจาก Chance and Willaim จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรียเป็น ภาวะต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phosphorylation ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้ (รูปที่ 21)

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

จากตัวอย่าง oxygraph tracing การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้งสอง state ยาวเท่ากันดังนี้

$$\text{RCI} = \frac{Y1/X}{Y2/X} = \frac{Y1}{Y2}$$

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 22 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตรของ reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลาย อิมตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิมตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่อมีอุณหภูมิสูง

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมิตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมิตัวใน incubation mixture 1 ml หาได้จากสมการ

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

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml

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

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21 %

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

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

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว ค่าคำนวณหาปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมิตัวในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ 37 °C มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น n atoms O /min/mg protein

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยจำนวน n atoms O/ml/min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 22เช่นกัน

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

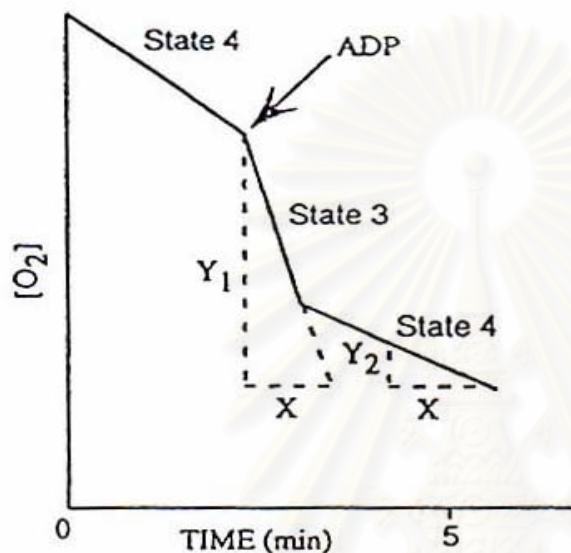
โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

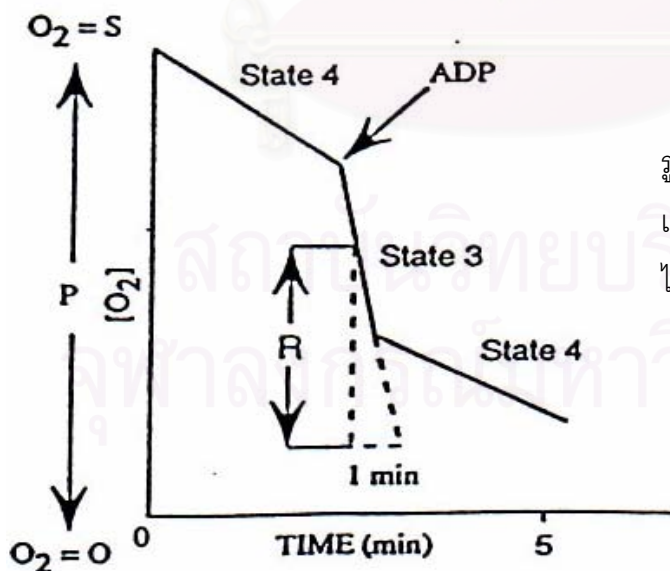
A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมิตัว อยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ $444.9 \text{ n atoms O/ml}$

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน



รูปที่ 21 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 22 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

4.4 การศึกษาผลของ EGCG ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

1. การศึกษาผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

1) เติม substrate สำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 4 ของการหายใจ เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μ l

3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3 ของการหายใจ

2. การศึกษาผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

1) เติม substrate สำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 μ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 4 ของการหายใจ เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μ l

3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3 ของการหายใจ

3. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DNP

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

2) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2 μ l เพื่อทำให้เกิด state 3u ของการหายใจ

3) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลง state 3u ของการหายใจ เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO

4. การศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของ EGCG ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย ได้แก่

- การศึกษาผลของ bovine serum albumin ต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG

- การศึกษาผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP

4.5 การศึกษาผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

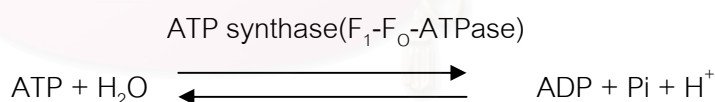
เนื่องจากการขนส่งแคลเซียมเข้าไมโทคอนเดรียต้องอาศัยความต่างศักย์ ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (membrane potential) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy and Smith, 2000) ดังนั้นเมื่อมีการเติม CaCl_2 ลงไปในปฏิกิริยาที่มี substrate มากพอและมี Pi อยู่ด้วยจะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อแคลเซียมหยุดการเข้าไปสะสมภายใน matrix อัตราการใช้ออกซิเจนก็จะลดลง

การศึกษาค้นคว้าผลของ EGCG ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม จะทำโดยการติดตามการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะการทดลองดังนี้

1. เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μl ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่
2. เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μl
3. เติม 0.4 M CaCl_2 ปริมาณ 10 μl เพื่อกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบกับผลการกระตุ้นการหายใจกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μl

4.6 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ATPase

เอนไซม์ ATPase สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ ATP ได้เป็น ADP, Pi และ H^+ ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ คือ



ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina and Slater, 1975)

2. โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

สำหรับในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลาย ATP โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆ ที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยา

ทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลง centrifuge tube ที่มี 20 % w/v ของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าตัวอย่าง

วิธีการวัดเพื่อหา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

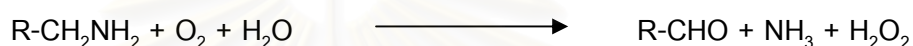
1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37 °C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยปรับหมุนวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันตลอดเวลา
2. เติม mitochondrial suspension 200 μ l
3. เติมสารละลายของสารที่ต้องการศึกษาแล้วรอเวลา 1 นาที (control เติม solvent ที่ใช้ละลายสารที่ต้องการศึกษาในปริมาตรที่เท่ากัน)
4. เติม 0.1 M ATP 150 μ l แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้วจึงดูด reaction mixture ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20 % w/v ของ trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที
6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน
7. ดูดส่วน supernatant 1 ml (ถ้าเป็น blank ใช้ น้ำกลั่น 1 ml แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml ของ K_2HPO_4 ที่มีความเข้มข้น 0.1 , 0.25 , 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน
8. เติม 2.5 % w/v ammonium molybdate 0.8 ml
9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ultrospec II) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample นำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve

หมายเหตุ : - Fiske Subbarow reducing agent ประกอบด้วย 15 % sodium bisulfite 97.5 ml, 20% sodium sulfite 2.5 ml และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 g

- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ที่ละลายไม่หมด ให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

4.7 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

monoamine oxidase เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียมีหน้าที่ในการออกซิไดซ์สารพวก amine โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียออกซิเดสได้ โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้ substrate และ incubation medium ที่เหมาะสม โดยในการทดลองใช้ sodium phosphate buffer pH 7.4 เป็น incubation medium ส่วน substrate ที่ใช้ได้แก่ 0.1 M tyramine เป็น substrate สำหรับ MAO-A และ MAO-B, 0.1 M 5-HT เป็น substrate สำหรับ MAO-A, 0.1 M benzylamine เป็น substrate สำหรับ MAO-B นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates ของไมโทคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจาก monoamine oxidase ออกซิไดซ์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ทำให้ทราบถึงการทำงานของ monoamine oxidase ได้

รูปแบบการทดลองศึกษาผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโทคอนเดรีย

1. การศึกษาผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A

1) เติม substrate สำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ปริมาณ 10 μl ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 μl อยู่

2) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μl

2. การศึกษาผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-B

1) เติม substrate สำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine ปริมาณ 10 μl ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 μl อยู่

2) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μ l

3. การศึกษาผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B

1) เติม substrate สำหรับ MAO-A และ MAO-B คือ 0.1 M tyramine ปริมาณ 10 μ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโตคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2 μ l อยู่

2) เติมสารทดสอบ คือ EGCG ในความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ control คือ DMSO ปริมาณ 10 μ l

4.8 การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปริมาณของไมโตคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมจากตับหนูขาวที่ใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียใช้วิธีของ Lowry (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ CuSO_4 ในสารละลายต่างจะเกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ที่ใช้ bovine albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าความเข้มข้นของ sample ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 μ l ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้สารละลาย A
2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลองเติม alkaline copper reducing 1 ml (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml ส่วนกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 , 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ultrospec II) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียหน่วยเป็น mg/ml

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5 % CuSO_4 ที่ละลายอยู่ใน 1 % w/v ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10 % NaCO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH
- Foline – phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin – Ciocalteu 's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 v/v และเตรียมใช้ทันที

4.9 การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.9.1 การแสดงผลการทดลองแสดงออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

- oxygraph tracing

เป็น oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลองซึ่งแสดงอัตราการหายใจออกซิเจนในระยะต่างๆ มีหน่วยเป็น $n \text{ atoms O/min/mg protein}$

- ตารางและกราฟ

4.9.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. ผลการทดลองแสดงเป็นค่า $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ จากการทดลอง 4 การทดลอง ($N = 4$) ในแต่ละสภาวะการทดลอง

2. ใช้สถิติชนิด one-way analysis of variance (ANOVA) ในการทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละคู่โดยใช้ Scheffe ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 23 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆ มีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/min/mg protein ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยา ได้แก่ ไมโตคอนเดรียซึ่ง incubate อยู่ใน medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทปริมาณมากเกินพอ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรกมีค่า 25.67 n atoms O/min/mg protein ระยะนี้เรียกว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP+Pi ลงไปในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้น พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 167.63 n atoms O/min/mg protein เรียกกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเติม ADP+Pi นี้ว่า state 3 respiration ซึ่งเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดลงเป็น 29.56 n atoms O/min/mg protein ซึ่งจะกลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม ค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 1 มีค่าเท่ากับ $167.63/29.56 = 5.67$ เมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป DNP สามารถกระตุ้นการหายใจทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction medium ระยะนี้เรียกว่า state 3u respiration ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น 219.80 n atoms O/ml/min/mg protein

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แสดงในรูปที่ 24 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate + malate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ จากนั้นเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพบว่า EGCG มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ ซึ่งจากตารางที่ 5 และรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่า EGCG ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ control คือ การเติม DMSO แทน EGCG ซึ่งการเลือกใช้ DMSO เป็น control เนื่องจาก DMSO เป็นสารละลาย EGCG ในการศึกษา และจาก tracing ในรูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย สำหรับฤทธิ์ในการกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของ EGCG มีไม่มากนัก โดยเมื่อนำค่าเฉลี่ยของ

อัตราการหายใจมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกระตุ้นที่เพิ่มขึ้นจาก control ได้ค่าดังนี้ คือ 55.64, 58.00, 64.58 % ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ตามลำดับ และหลังจากที่เติม ADP + Pi ลงใน reaction mixture ทำให้เกิด state 3 respiration พบว่า EGCG ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 26 และเมื่อนำค่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration หารด้วยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration จะได้ค่า RCI หรือดัชนีควบคุมการหายใจ ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phosphorylation พบว่า EGCG ทำให้ค่า RCI ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นและที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM EGCG มีผลทำให้ค่า RCI ลดลงจาก control มาก โดย control มีค่า RCI เท่ากับ 6.05 ± 0.62 แต่ EGCG ทั้ง 3 ความเข้มข้นทำให้ไมโตคอนเดรียมีค่า RCI เท่ากับ 3.20 ± 0.20 , 2.29 ± 0.14 และ 2.11 ± 0.17 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 27

2. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท แสดงในรูปที่ 28 ทำการศึกษาโดยการเติม succinate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ ทำให้เกิด state 4 respiration จากนั้นเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป พบว่า EGCG มีผลทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ลดลงได้บ้างเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูงๆ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 29 และหลังจากที่เติม ADP + Pi ลงใน reaction mixture เพื่อทำให้เกิด state 3 respiration พบว่า EGCG ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 30 และเมื่อนำอัตราการใช้ออกซิเจนจากทั้ง 2 state มาคำนวณหาค่า RCI พบว่า EGCG ทำให้ค่า RCI ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM EGCG มีผลทำให้ค่า RCI ลดลงจาก control มาก โดย control มีค่า RCI เท่ากับ 4.66 ± 0.25 แต่ EGCG ทั้ง 3 ความเข้มข้นทำให้ไมโตคอนเดรียมีค่า RCI เท่ากับ 2.75 ± 0.19 , 2.23 ± 0.15 และ 2.16 ± 0.17 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 31

3. ผลของ epigallocatechin gallate ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวในสถานะที่ถูกกระตุ้นการหายใจด้วย DNP แสดงในรูปที่ 32 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate + malate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่ จากนั้นกระตุ้นการหายใจโดยการเติม DNP ทำให้เกิด state 3u respiration จาก tracings จะเห็นได้ว่า DNP ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นมากอย่างรวดเร็ว และเมื่อเติม EGCG ลงไปพบว่า EGCG มีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้ ซึ่งเมื่อคิดเป็น % การยับยั้ง state 3u respiration ดังแสดงผลในตารางที่ 7 และในรูปที่ 33 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษาคือ 113.62 μM สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้ 46.18% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EGCG จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 908.96 μM พบว่า EGCG สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้อีกเพียง 12 % คือยับยั้งได้ 61.20 % สำหรับค่า IC_{50} ในการยับยั้ง state 3u respiration ของ EGCG = 398.11 μM

4. ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แสดงในรูปที่ 34 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate + malate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่ จากนั้นเติม EGCG ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (454.48 μM) พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นจากฤทธิ์การกระตุ้นการหายใจใน state 4 ของ EGCG จากนั้นเมื่อเติม BSA ลงไป พบว่า BSA ขนาด 10 และ 15 mg ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นจากการเติม EGCG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้เติม BSA ดังแสดงในรูปที่ 35 และตารางที่ 8

5. ผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ผลของ EGCG ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (454.48 μM) ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin แสดงในรูปที่ 36 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate + malate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่ จากนั้นเติม oligomycin หรือ atractyloside ลงไป ต่อมาจึงเติม ADP + Pi ซึ่งจาก tracing จะเห็นว่า การเติม ADP + Pi ไม่ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นหรือไม่เกิด state

3 respiration จากนั้นเติม DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler ลงไปพบว่าทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และในสภาวะการทดลองเดียวกัน แต่เติม EGCG ลงไปแทน DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียก็เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน แต่ผลการเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของ EGCG จะน้อยกว่า DNP มาก

6. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม แสดงในรูปที่ 37 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate+malate เป็นสับสเตรท ลงใน reaction mixture ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่ เติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปจากนั้นจึงกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยการเติม CaCl_2 พบว่า EGCG เฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ $908.96 \mu\text{M}$ มีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 38 และตารางที่ 9

7. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

จากรูปที่ 39 และตารางที่ 10 แสดงผลของ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase ทำการศึกษาโดยวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการสลาย ATP พบว่า DMSO ซึ่งใช้เป็นสารละลาย EGCG ในการศึกษาไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase เมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองที่ไม่เติม DMSO ส่วนกลุ่มการทดลองที่ได้รับ EGCG พบว่า EGCG มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase กล่าวคือ EGCG ที่ความเข้มข้น 0.73, 4.57, 18.30 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้เล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) แต่ EGCG ความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase โดยที่ความเข้มข้น 219.54, 292.72, 439.08 และ 585.44 μM มีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่เกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler พบว่ามีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่เกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน และในกรณีที่เติม oligomycin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase พบว่าทำให้อัตราการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ของทั้ง DNP และ EGCG ลดลง

8. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

จากรูปที่ 40 และ ตารางที่ 11 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ทำการศึกษาโดยเติมสับสเตรทสำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ โดย rotenone จะไปยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปเกิดจาก monoamine oxidase ออกซิไดซ์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว พบว่า EGCG มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 38.02 \mu M$ ลักษณะของ dose-response curve ของการยับยั้งสำหรับ MAO-A จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อขนาดเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นค่าหนึ่งการยับยั้งจะค่อนข้างคงที่ และที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ $227.24 \mu M$ EGCG มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A ได้ 77.73 %

9. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

จากรูปที่ 41 และ ตารางที่ 12 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ทำการศึกษาโดยเติมสับสเตรทสำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า EGCG มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้น้อย โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษา คือ $227.24 \mu M$ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B ได้ 32.87 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ $1136.20 \mu M$ ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B ก็เพิ่มขึ้นอีกเพียง 6% คือยับยั้งได้ 38.44 %

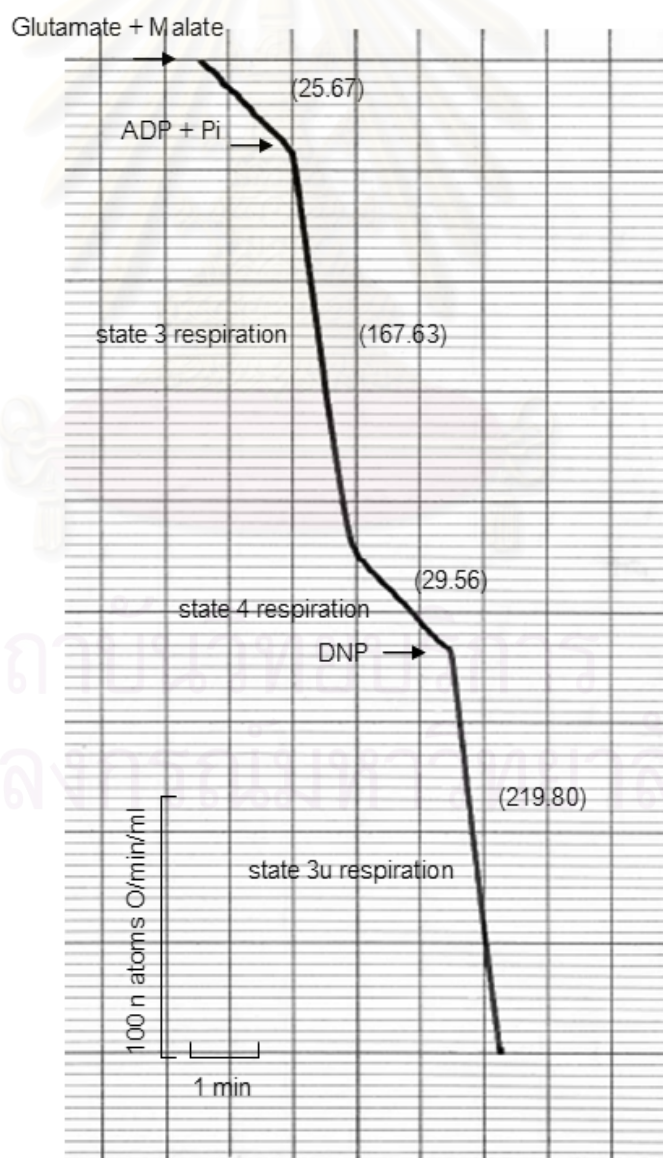
10. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

จากรูปที่ 42 และ ตารางที่ 13 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ทำการศึกษาโดยเติมสับสเตรทสำหรับทั้ง MAO-A และ MAO-B คือ 0.1 M tyramine ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า EGCG มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ในการออกซิไดซ์ tyramine ซึ่งเป็นสับสเตรทแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ไม่มากนัก โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษา คือ $227.24 \mu M$ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO ได้ 36.96 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ $1136.20 \mu M$ ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO ก็เพิ่มขึ้นอีก 12 % คือยับยั้งได้ 48.98 %

รูปที่ 23 แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 μ M DNP, 13.02 mM sucrose และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein



ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

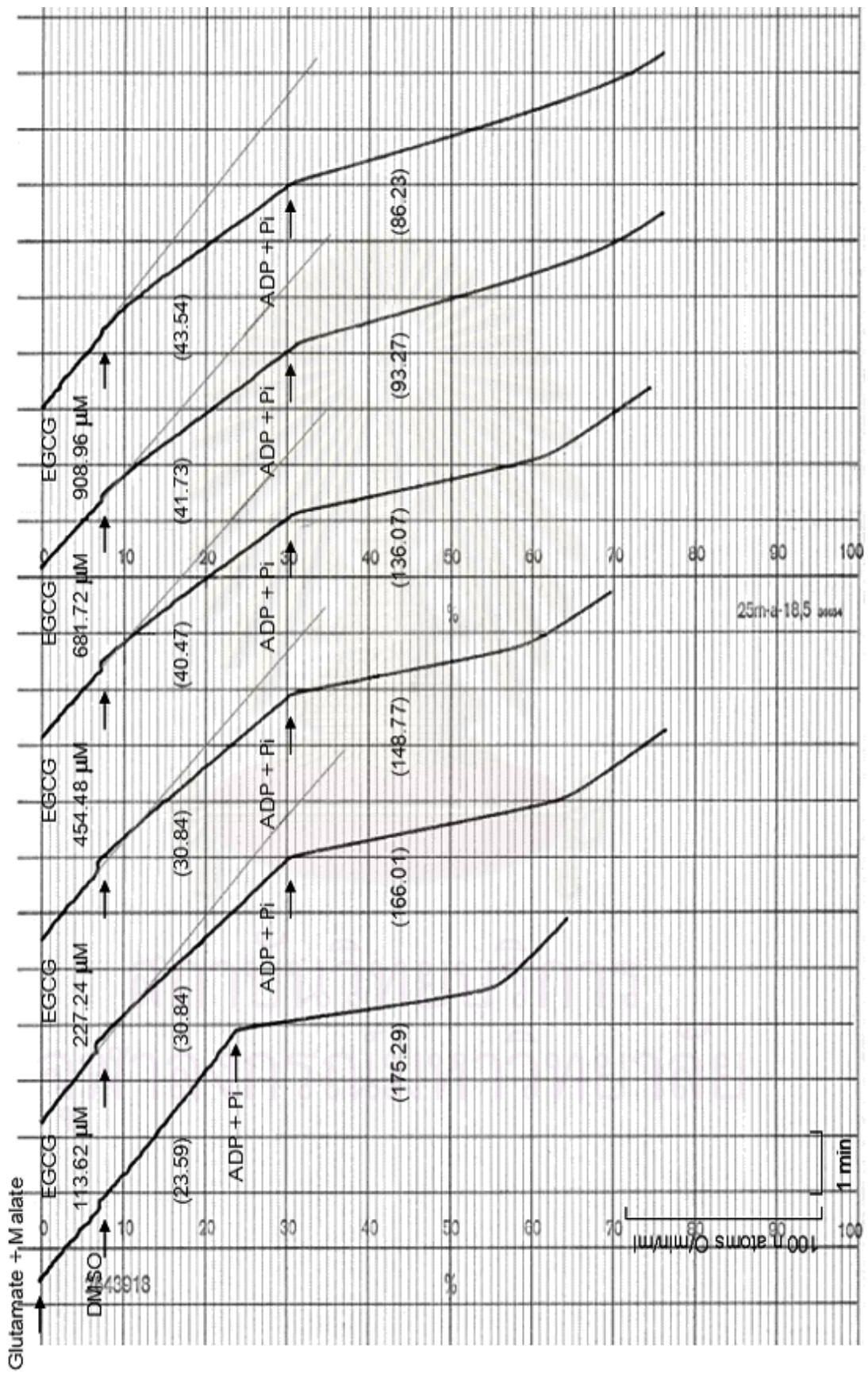
รูปที่ 24 แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

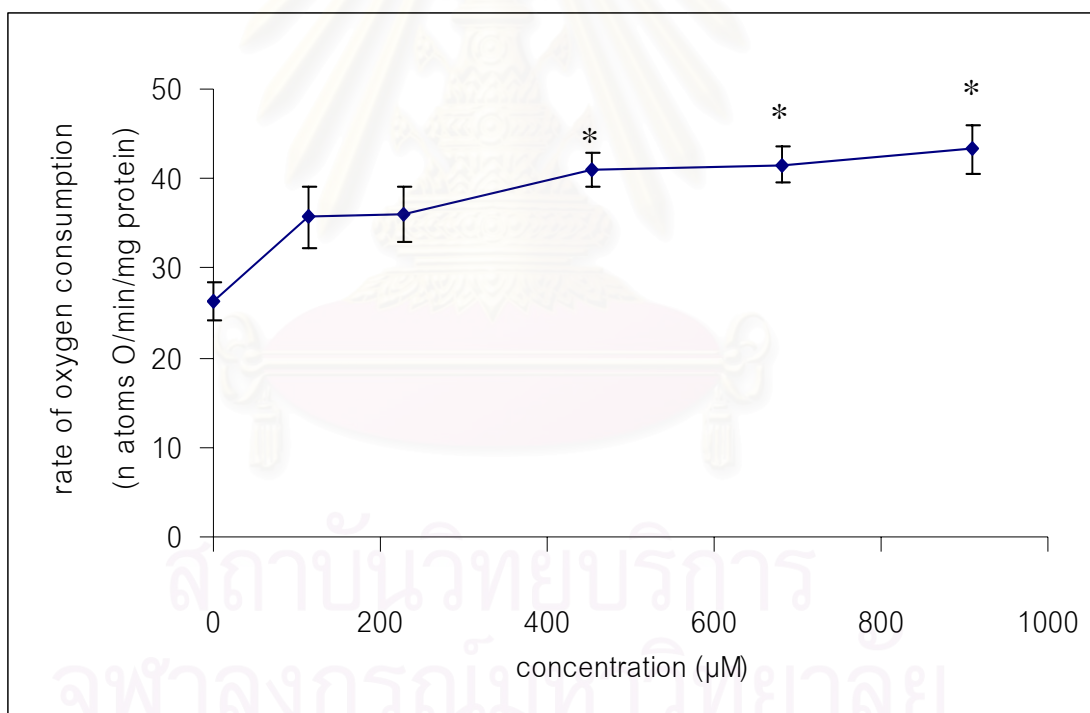


ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 25 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



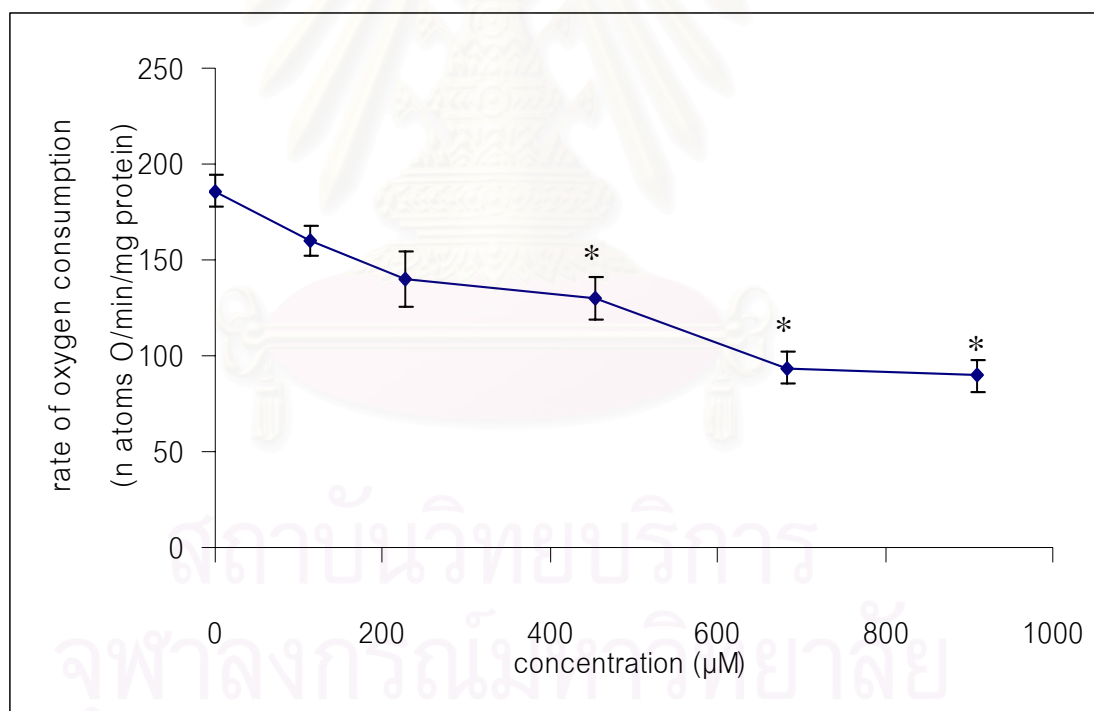
* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 26 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



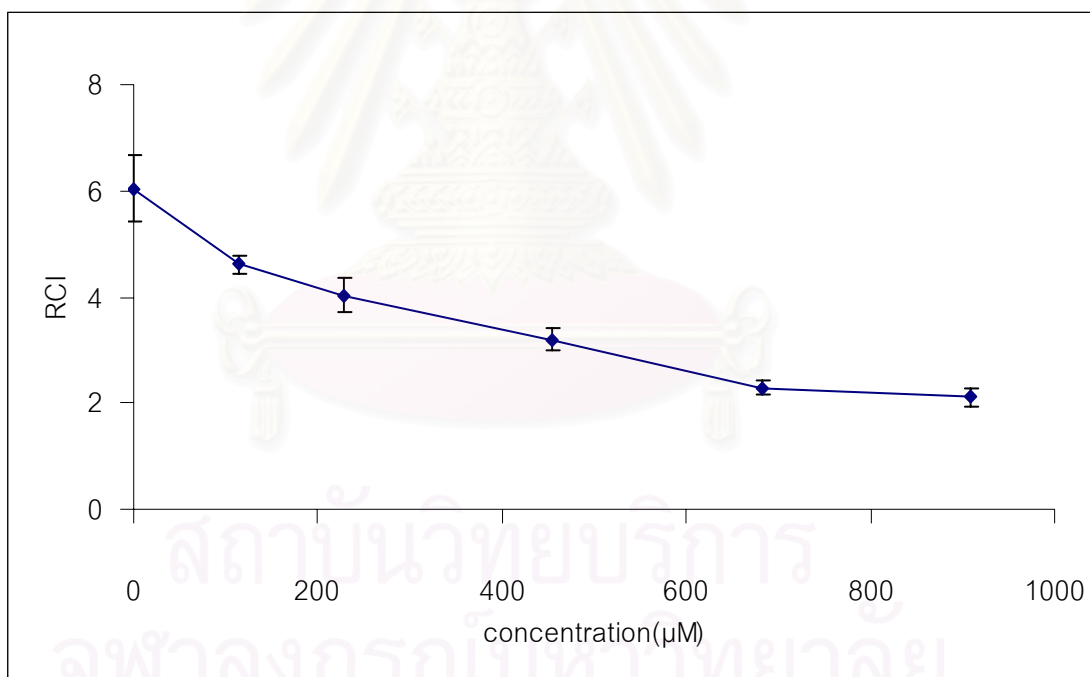
* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 5 แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration, state 3 respiration และ RCI ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.22 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

Concentration of EGCG (μ M)	Rate of oxygen consumption (n atom O/min/mg protein)		RCI
	State 4	State 3	
DMSO	26.31 \pm 2.21	185.71 \pm 8.22	6.05 \pm 0.62
113.62	35.68 \pm 3.52	160.18 \pm 8.01	4.62 \pm 0.17
227.24	35.96 \pm 3.11	140.05 \pm 14.71	4.04 \pm 0.31
454.48	40.95 \pm 1.83*	129.80 \pm 10.76*	3.20 \pm 0.20
681.72	41.57 \pm 2.02*	93.48 \pm 8.45*	2.29 \pm 0.14
908.96	43.30 \pm 2.70*	89.55 \pm 7.96*	2.11 \pm 0.17

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

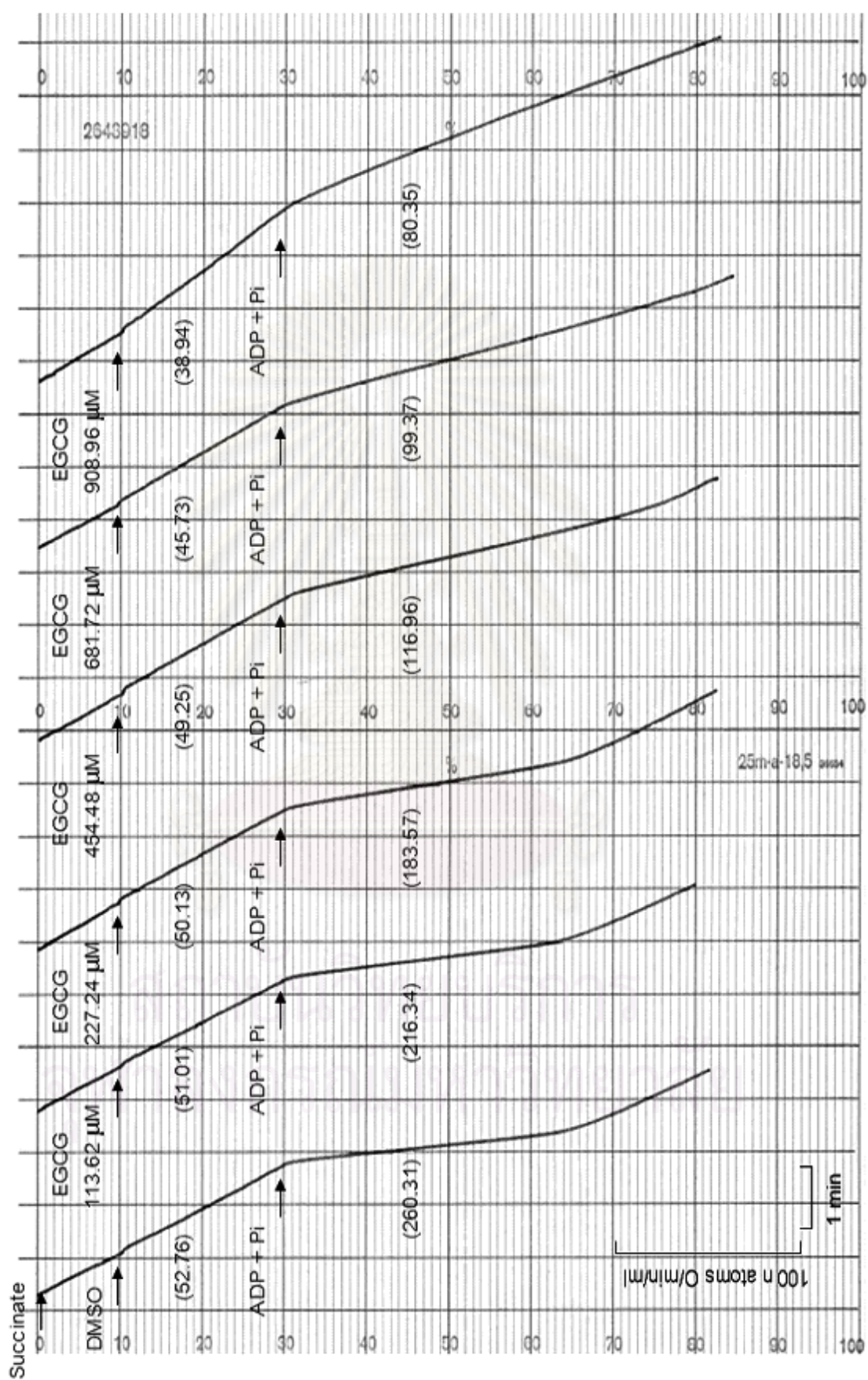
รูปที่ 28 แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.13 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

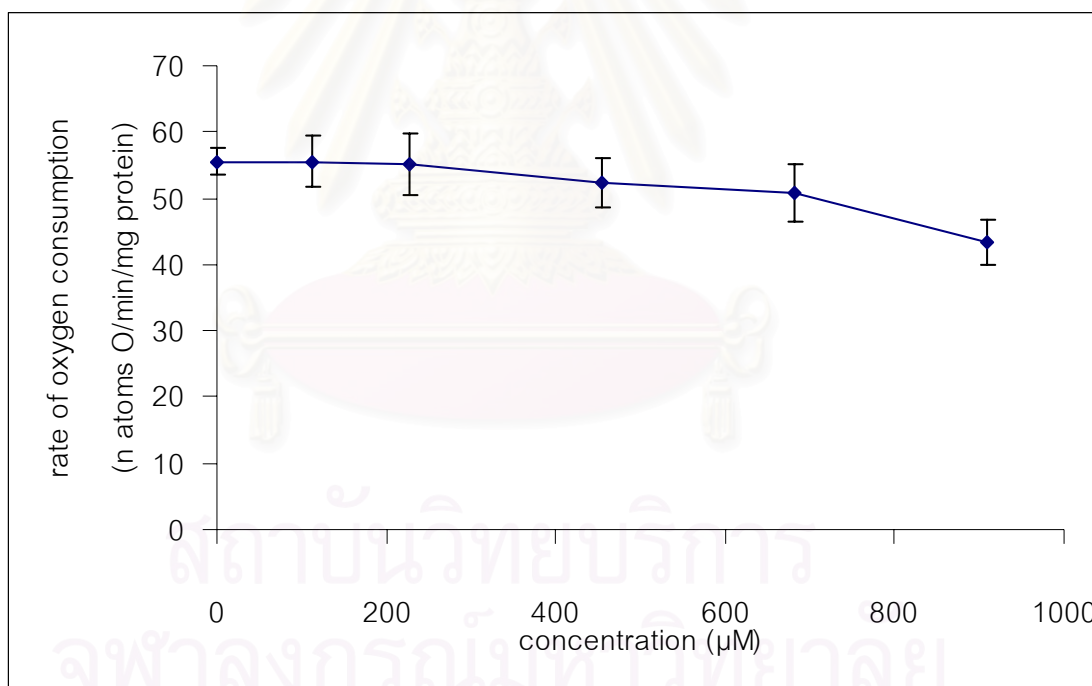


ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 29 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.13 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

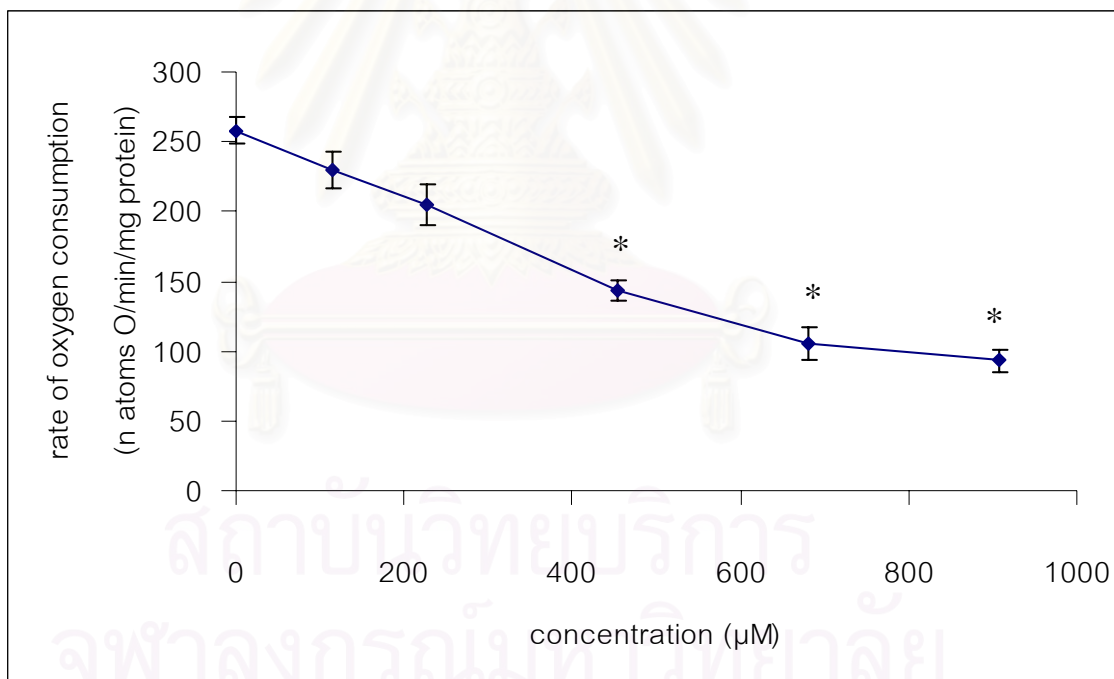


ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 30 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.13 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



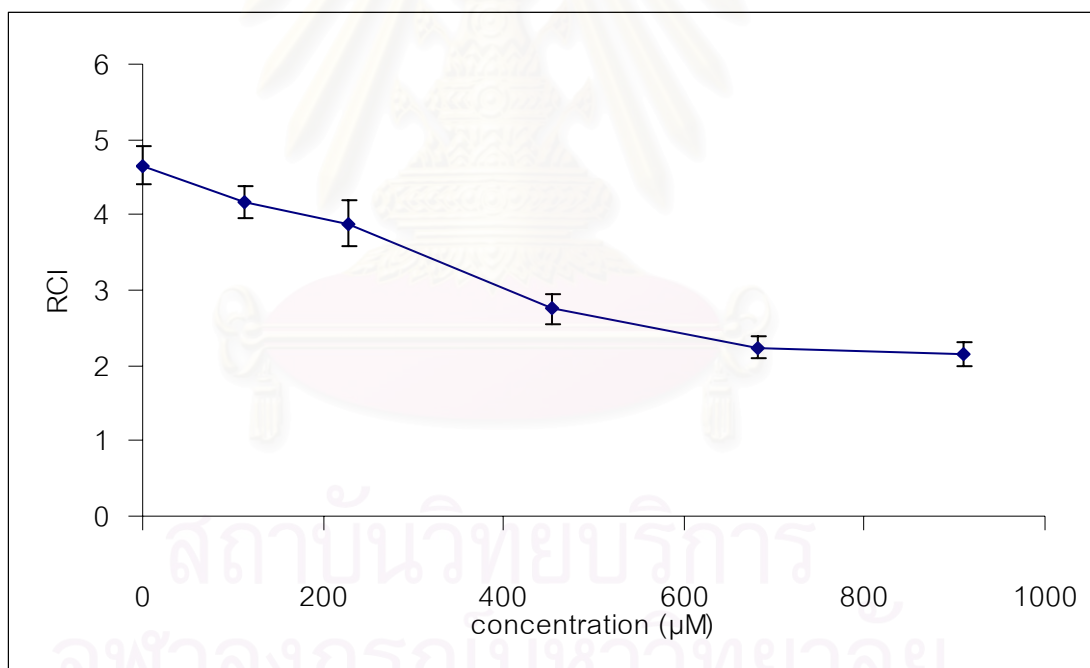
* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.13 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 6 แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 4 respiration, state 3 respiration และ RCI ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.13 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

Concentration of EGCG (μ M)	Rate of oxygen consumption (n atom O/min/mg protein)		RCI
	State 4	State 3	
DMSO	55.53 \pm 2.01	257.81 \pm 9.30	4.66 \pm 0.25
113.62	55.51 \pm 3.90	230.30 \pm 13.09	4.16 \pm 0.21
227.24	55.15 \pm 4.72	204.67 \pm 15.09	3.89 \pm 0.29
454.48	52.45 \pm 3.76	143.42 \pm 6.60*	2.75 \pm 0.19
681.72	50.71 \pm 4.34	105.80 \pm 11.74*	2.23 \pm 0.15
908.96	43.36 \pm 3.28	93.25 \pm 7.82*	2.16 \pm 0.17

* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

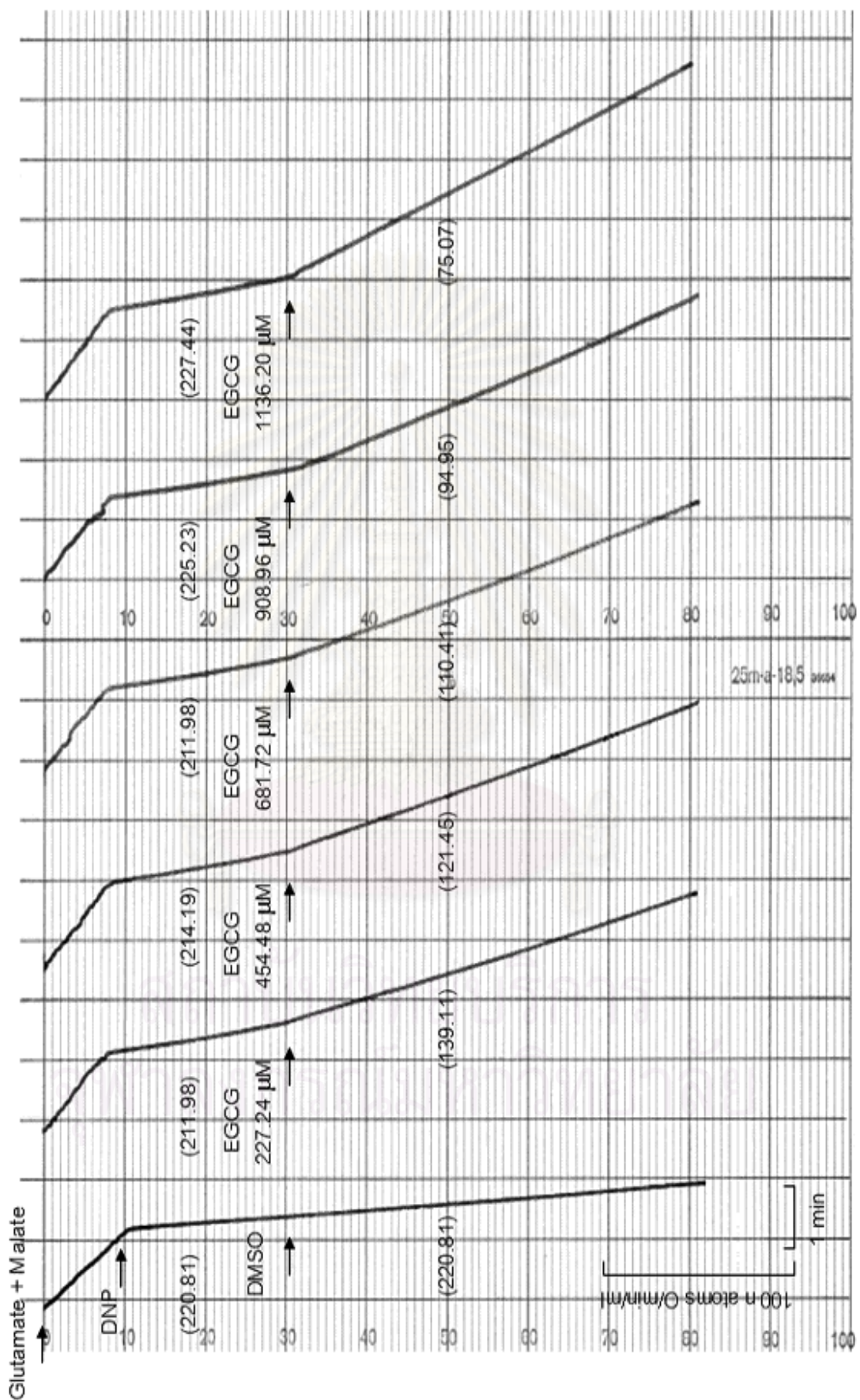
รูปที่ 32 แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 μ M DNP ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.88 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

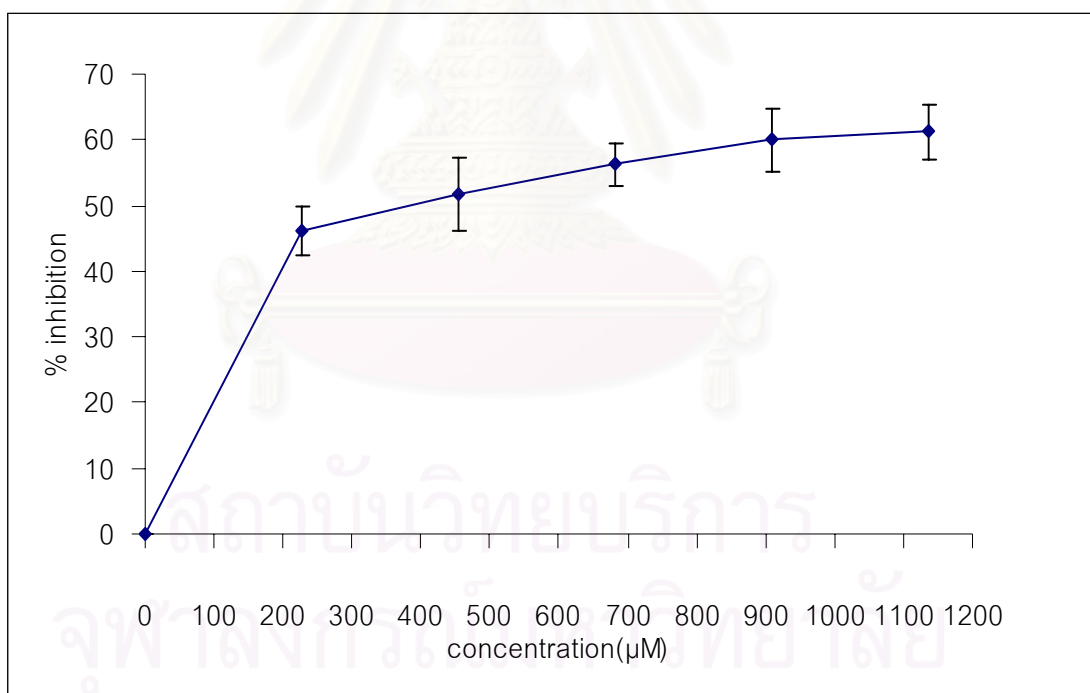


ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

รูปที่ 33 กราฟแสดง % การยับยั้งของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 μM DNP ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μl ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.88 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ตารางที่ 7 แสดง % การยับยั้งของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.05 μM DNP ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μl ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.88 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

Concentration of EGCG (μM)	% Inhibition of State 3u respiration
DMSO	0.00 ± 0.00
113.62	46.18 ± 3.63
227.24	51.73 ± 5.56
454.48	56.28 ± 3.25
681.72	60.03 ± 4.79
908.96	61.20 ± 4.28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

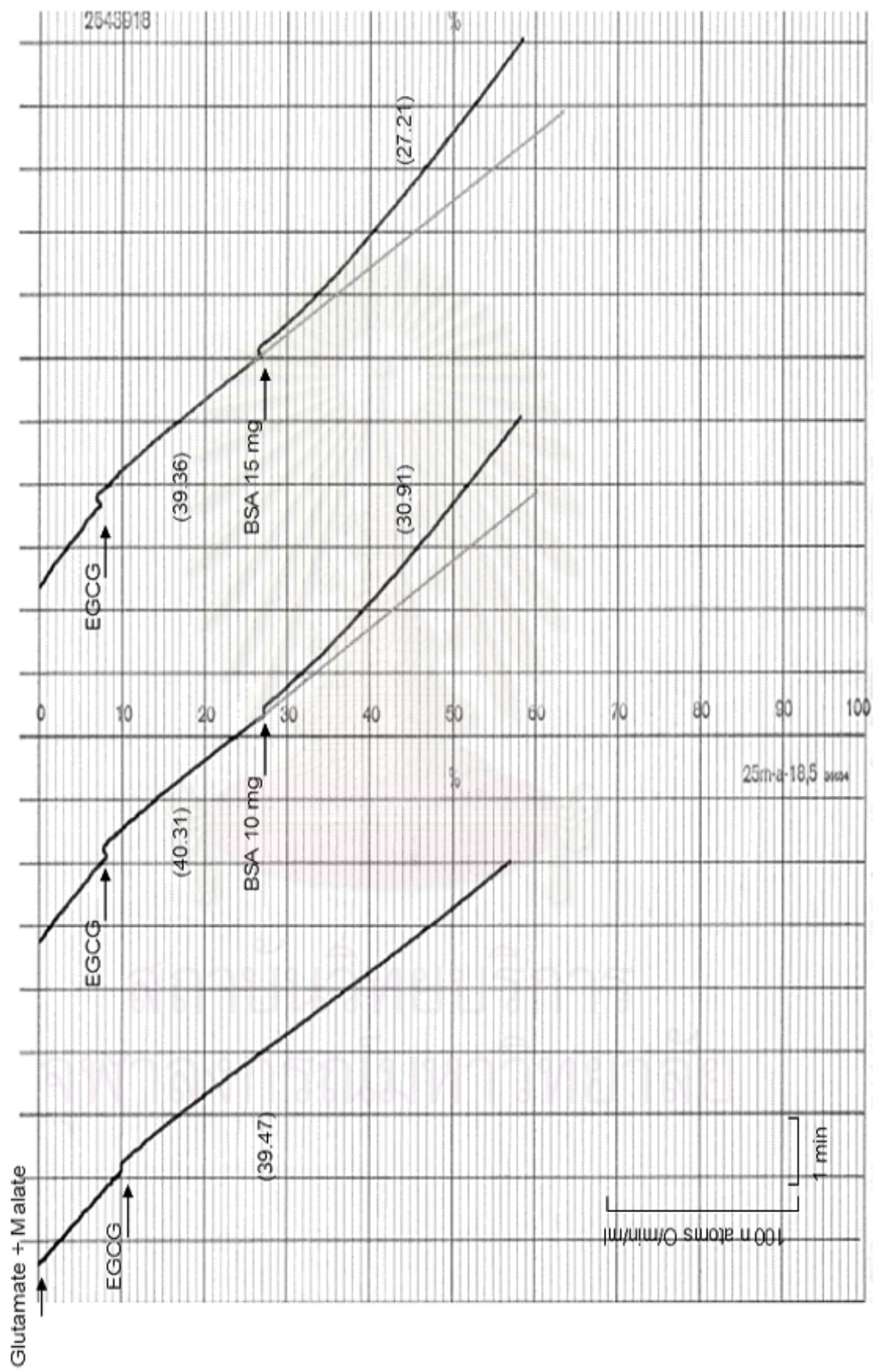
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 34 แสดง oxygraph tracing ผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 454.48 μ M EGCG การทดลองเพื่อศึกษาจะเติม BSA 10 และ 15 mg ส่วนการทดลองควบคุมจะไม่เติม BSA ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.10 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

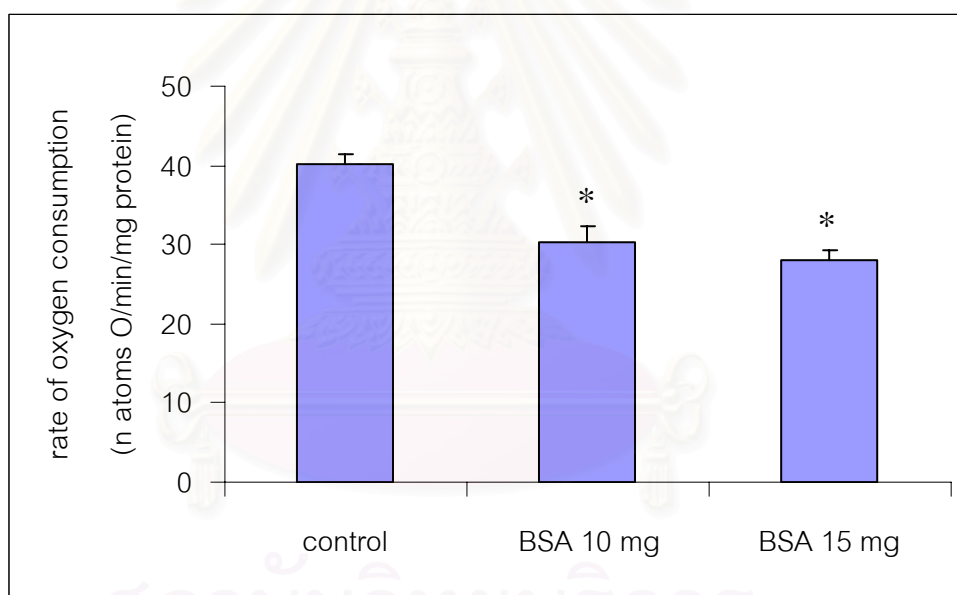
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 35 กราฟแสดงผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 454.48 μM EGCG ในการทดลองควบคุมจะไม่เติม BSA ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม BSA 10 และ 15 mg ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.10 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C



* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 8 แสดงผลของ BSA ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 454.48 μ M EGCG การทดลองเพื่อศึกษาจะเติม BSA 10 และ 15 mg ส่วนในการทดลองควบคุมจะไม่เติม BSA ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.10 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

condition	rate of oxygen consumption (n atoms O/min/mg protein)
454.48 μ M EGCG	40.17 \pm 1.19
454.48 μ M EGCG + BSA 10 mg	30.22 \pm 2.01*
454.48 μ M EGCG + BSA 15 mg	27.97 \pm 1.26*

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

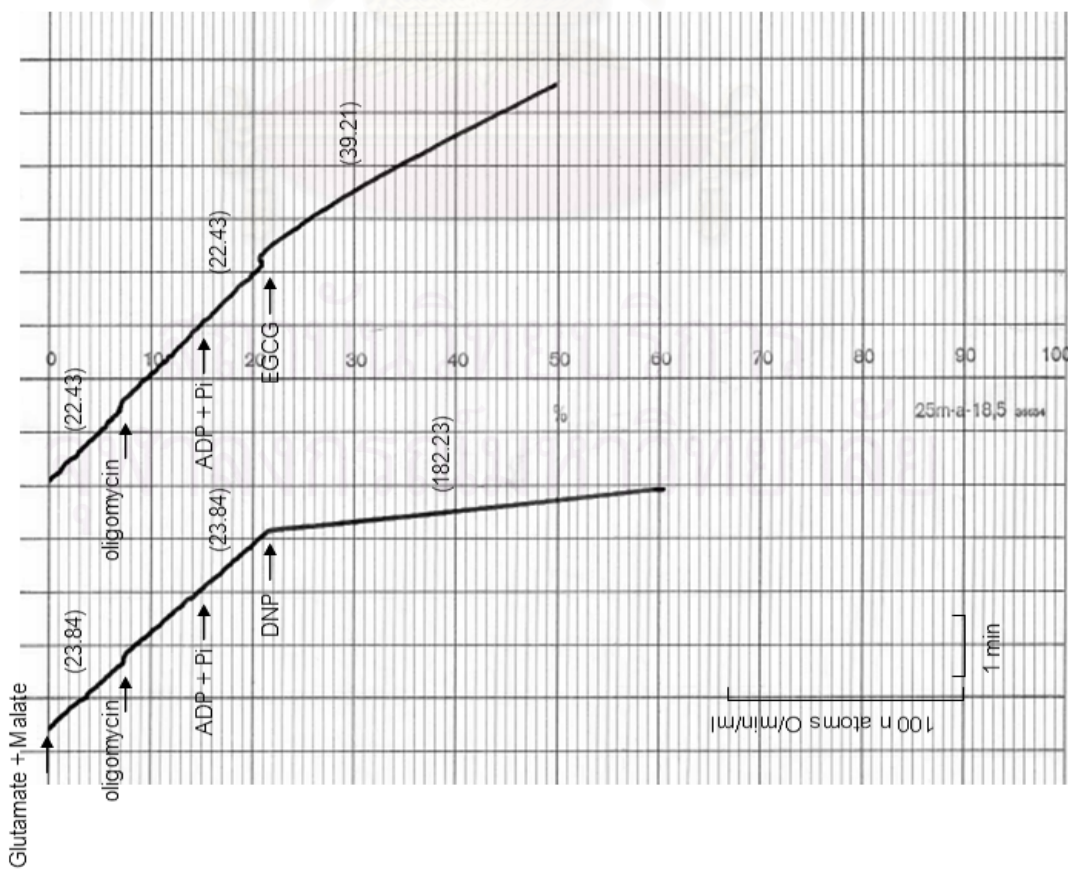
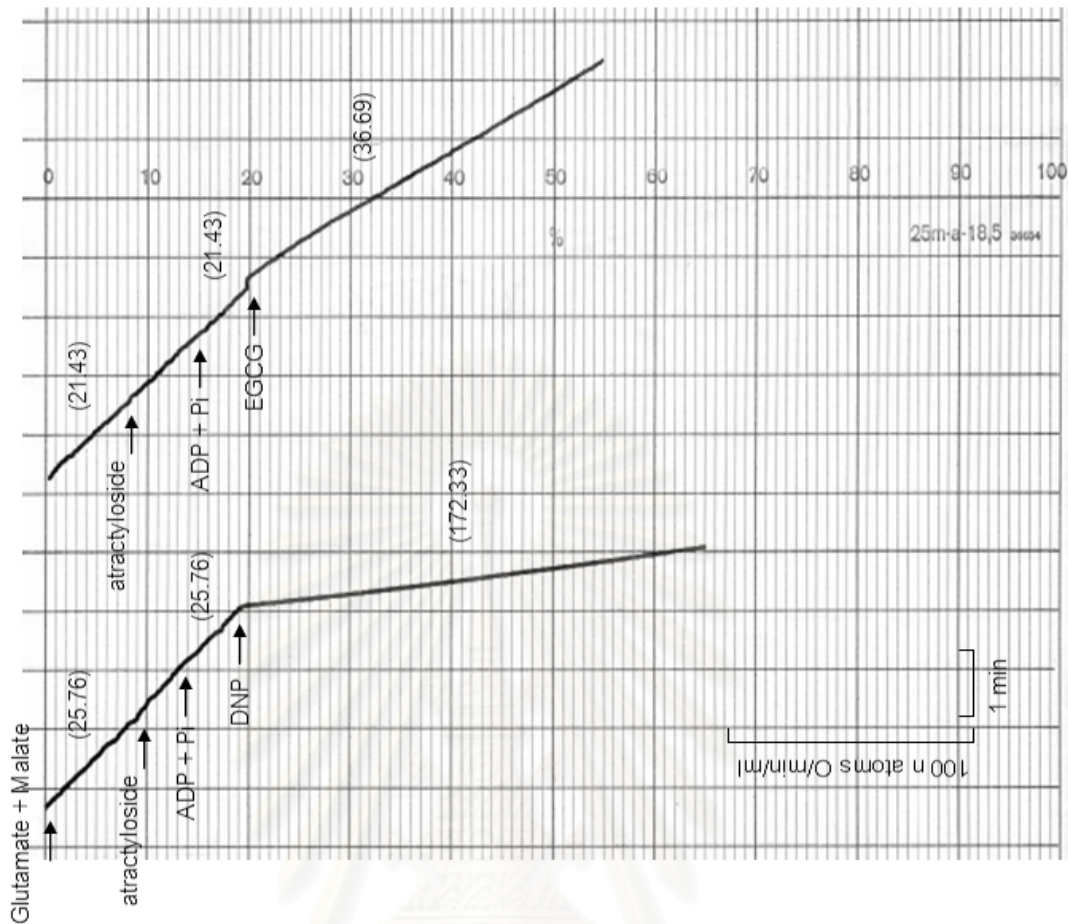
ผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 36 แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (454.48 μM) ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย atractyloside และ oligomycin เปรียบเทียบกับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM MgCl_2 , 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose สารทดสอบที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา 5 mg/ml oligomycin หรือ 10 mg/ml atractyloside ปริมาณ 10 μl , 0.05 M DNP ปริมาณ 2 μl , 400 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ EGCG ปริมาณ 10 μl ไมโทคอนเดรีย 2.48 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



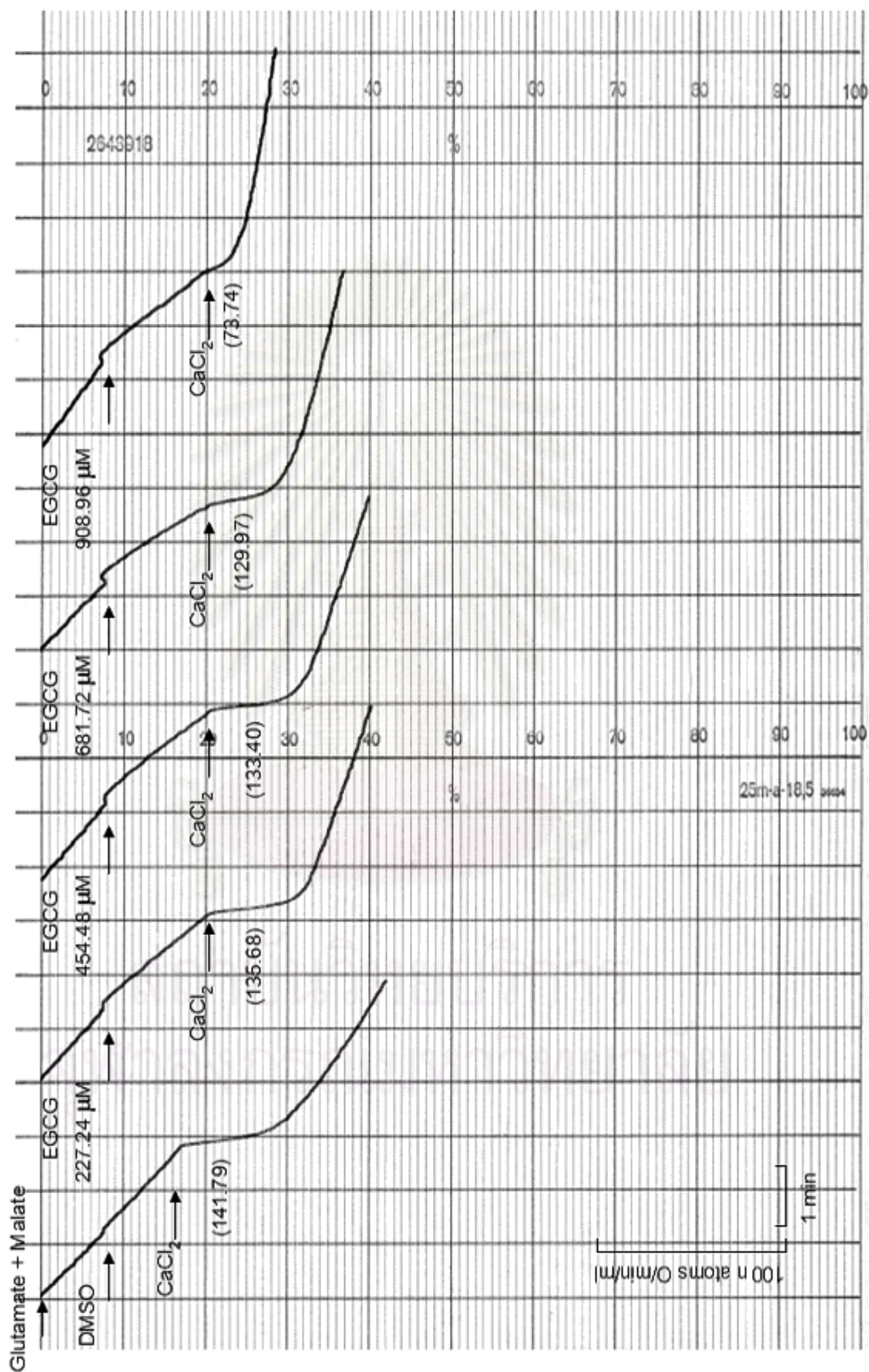
ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 37 แสดง oxygraph tracing ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.42 mM $CaCl_2$ ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

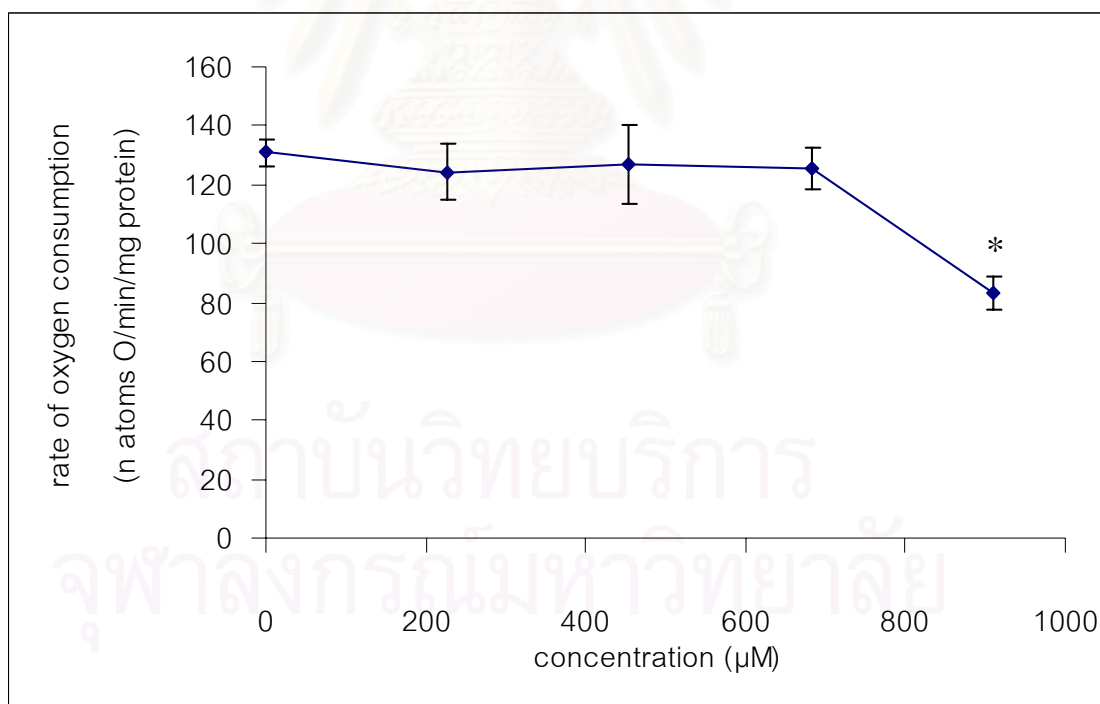


ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 38 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.42 mM $CaCl_2$ ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 9 แสดงผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.88 mM MgCl₂, 86.25 mM KCl, 5.21 mM glutamate + 5.21 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose, 0.42 mM CaCl₂ ในการทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 3.12 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

Concentration of EGCG (µM)	Rate of oxygen consumption (n atom O/min/mgprotein)
DMSO	130.91 ± 4.58
227.24	124.27 ± 9.69
454.48	126.82 ± 13.44
681.72	125.56 ± 6.96
908.96	83.14 ± 5.71*

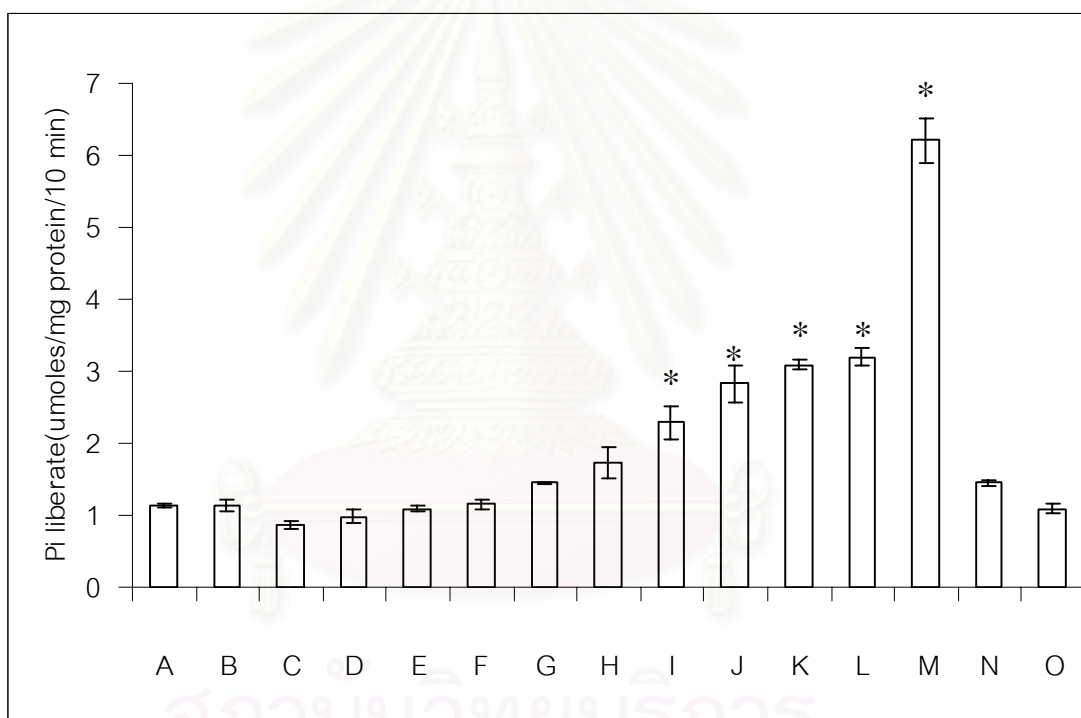
* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

รูปที่ 39 กราฟแสดงผลของ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบกับ DNP ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.74 mM MgCl₂, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.09 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.98 ml อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

A = none (เป็น medium อย่างเดียว), B = DMSO, C = 0.73 μ M EGCG, D = 4.57 μ M EGCG, E = 18.30 μ M EGCG, F = 36.59 μ M EGCG, G = 73.18 μ M EGCG, H = 146.36 μ M EGCG, I = 219.54 μ M EGCG, J = 292.72 μ M EGCG, K = 439.08 μ M EGCG, L = 585.44 μ M EGCG, M = 0.05 M DNP 2 μ l, N = 0.03 μ M DNP + 5 mg/ml oligomycin 2 μ l, O = 292.72 μ M EGCG + 5 mg/ml oligomycin 2 μ l

ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ตารางที่ 10 แสดงผลของ EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบกับ DNP ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 35.50 mM HEPES buffer pH 7.4, 1.74 mM MgCl₂, 81.17 mM KCl, 16.78 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.98 ml อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

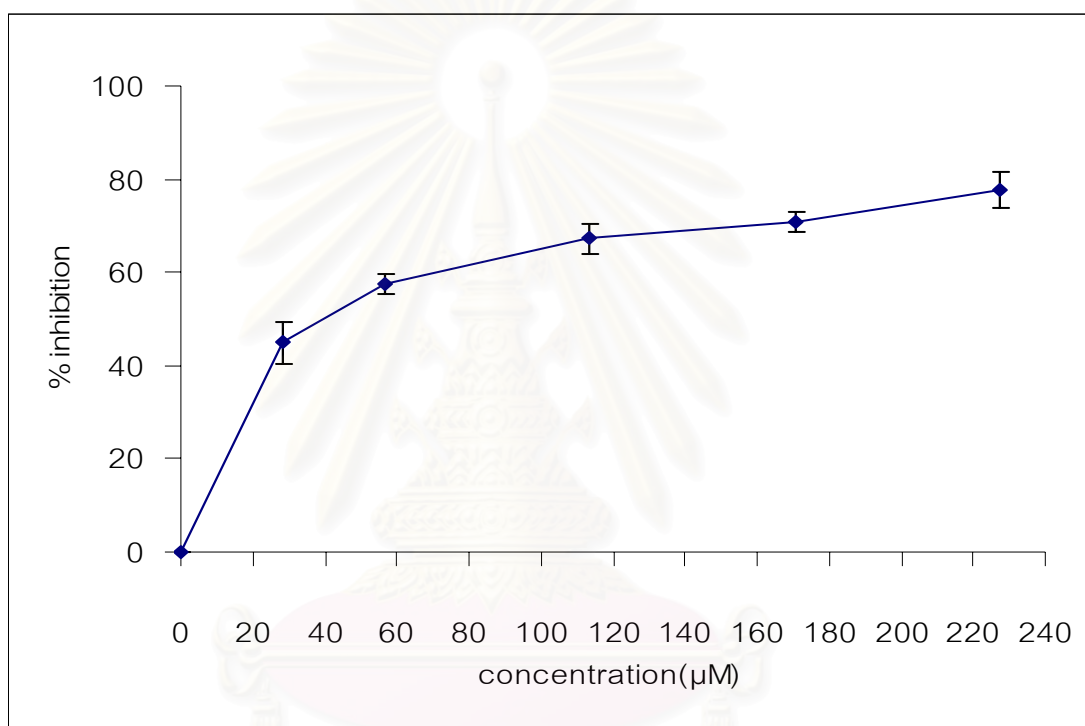
Experiments	Pi liberate (μmoles/mg protein/10 min)
none	1.14 ± 0.02
DMSO 10 μl	1.14 ± 0.08
0.73 μM EGCG	0.86 ± 0.06
4.57 μM EGCG	0.98 ± 0.09
18.30 μM EGCG	1.09 ± 0.03
36.59 μM EGCG	1.15 ± 0.07
73.18 μM EGCG	1.45 ± 0.02
146.36 μM EGCG	1.72 ± 0.22
219.54 μM EGCG	2.29 ± 0.22*
292.72 μM EGCG	2.83 ± 0.26*
439.08 μM EGCG	3.09 ± 0.06*
585.44 μM EGCG	3.19 ± 0.12*
0.05 M DNP 2 μl	6.20 ± 0.30*
0.03 μM DNP+5 mg/ml oligomycin 2 μl	1.46 ± 0.04
292.72 μM EGCG +5 mg/ml oligomycin 2 μl	1.09 ± 0.07

* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMS

ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

รูปที่ 40 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : phosphate buffer pH 7.4, 5 mg/ml rotenone 2 μ l, 13.02 mM sucrose, 0.1 M 5-HT 10 μ l การทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 5.87 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C



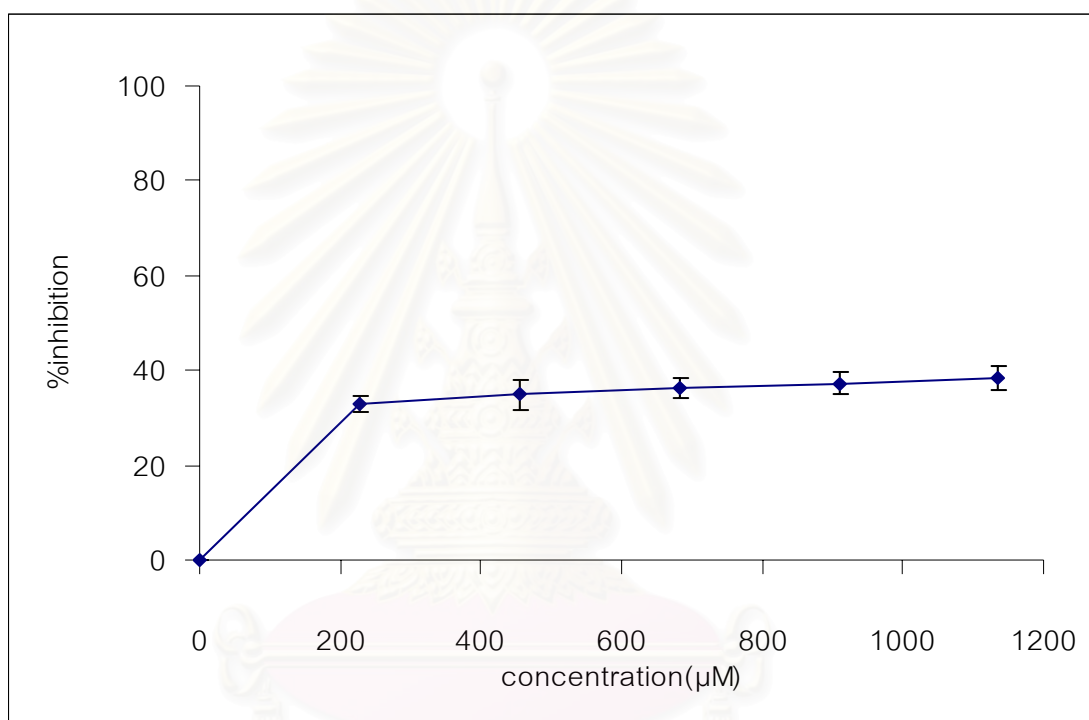
ตารางที่ 11 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A

Concentration of EGCG (μ M)	% Inhibition of MAO-A activity
DMSO	0.00 \pm 0.00
28.40	44.87 \pm 4.37
56.81	57.43 \pm 2.23
113.62	67.24 \pm 3.09
170.43	70.86 \pm 2.01
227.24	77.73 \pm 3.83

ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

รูปที่ 41 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-B

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : phosphate buffer pH 7.4, 5 mg/ml rotenone 2 μ l, 13.02 mM sucrose, 0.1 M benzylamine 10 μ l การทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 5.40 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C



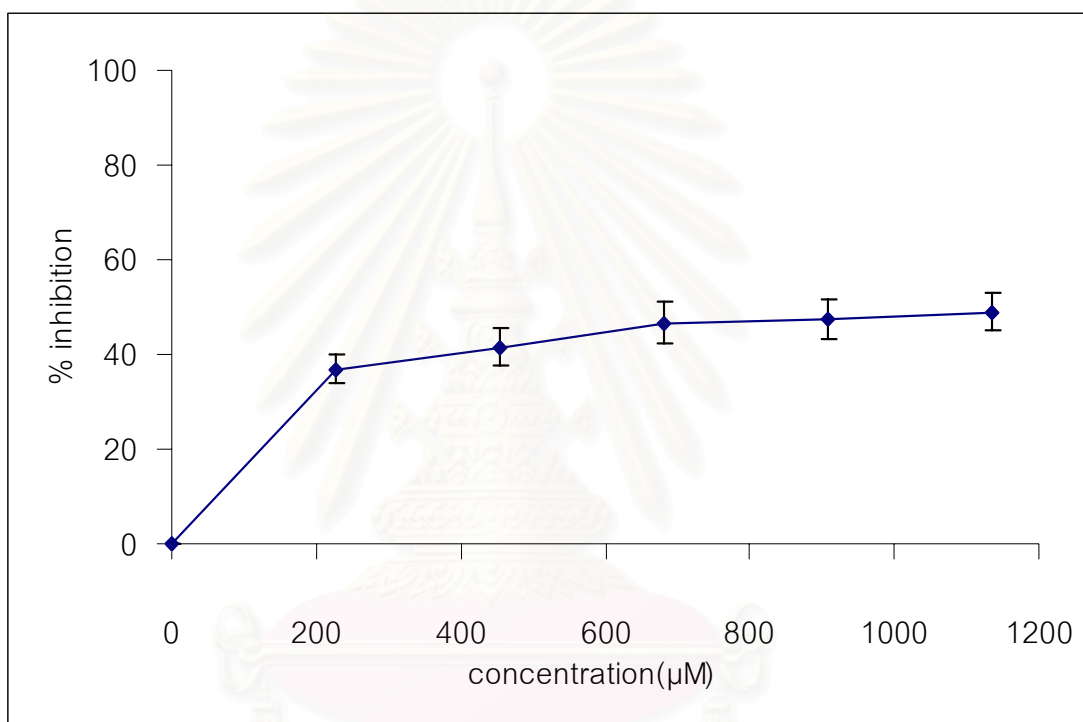
ตารางที่ 12 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-B

Concentration of EGCG (μ M)	% Inhibition of MAO-B activity
DMSO	0.00 \pm 0.00
227.24	32.87 \pm 1.74
454.48	34.97 \pm 3.17
681.72	36.46 \pm 2.12
908.96	37.30 \pm 2.45
1136.20	38.44 \pm 2.50

ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

รูปที่ 42 กราฟแสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : phosphate buffer pH 7.4, 5 mg/ml rotenone 2 μ l, 13.02 mM sucrose, 0.1 M tyramine 10 μ l การทดลองควบคุมจะเติม DMSO ปริมาณ 10 μ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม EGCG ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 μ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 5.43 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.92 ml อุณหภูมิ 37 °C



ตารางที่ 13 แสดงผลของ EGCG ต่อการทำงานของ MAO-A และ MAO-B

Concentration of EGCG (μ M)	% Inhibition of MAO-A และ MAO-B activity
DMSO	0.00 ± 0.00
227.24	36.96 ± 2.93
454.48	41.55 ± 3.87
681.72	46.69 ± 4.34
908.96	47.46 ± 4.34
1136.20	48.98 ± 3.84

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาผลของ epigallocatechin gallate ซึ่งเป็นสาร catechins ชนิดที่มีปริมาณมากที่สุดและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเด่นชัดเกินกว่าตัวอื่นๆ ในชาเขียวต่อกระบวนการหายใจและสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่า EGCG มีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย และสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้หลายประการดังนี้

1. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

EGCG มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทได้ดังนี้ คือ

state 4 respiration EGCG มีผลกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้ โดยที่ความเข้มข้นต่ำ EGCG จะกระตุ้นได้น้อย แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 454.48, 681.72, 908.96 μM EGCG สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียของ EGCG ยังไม่มากนัก โดยเมื่อนำค่าเฉลี่ยของอัตราการหายใจมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกระตุ้นที่เพิ่มขึ้นจาก control พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 908.96 μM สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนได้เพียง 64.58%

state 3 respiration EGCG มีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state นี้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ซึ่งแสดงให้เห็นว่า EGCG ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลลด phosphorylation ของ ADP+Pi ไปเป็น ATP

เมื่อนำอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration หารด้วยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ได้ค่า RCI หรือดัชนีควบคุมการหายใจ ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phosphorylation พบว่า EGCG มีผลทำให้ค่า RCI ลดลง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72, 908.96 μM ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้ค่า RCI ลดลงมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า EGCG ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีผลทำให้ประสิทธิภาพของการควบคู่ระหว่างกระบวนการ oxidation ที่เกิดขึ้นโดยลูกโซ่การหายใจและกระบวนการ phosphorylation ซึ่งเป็นกระบวนการ

สำคัญในการสร้าง ATP ลดลงเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทหรืออาจกล่าวได้ว่า EGCG ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ uncoupling

2. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท

เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท พบว่า EGCG ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4 respiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรืออาจกล่าวได้ว่าในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา EGCG ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งทำหน้าที่ในการออกซิไดส์ succinate ให้เป็น fumarate และอิเล็กตรอนส่งเข้าสู่ complex II แต่อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่า EGCG ความเข้มข้นสูงๆ มีแนวโน้มในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ได้ เช่น EGCG ที่ความเข้มข้น 908.96 μM เมื่อนำค่าเฉลี่ยของอัตราการหายใจมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ลดลงจาก control พบว่าสามารถยับยั้งได้ 21.92 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่า EGCG ที่ความเข้มข้นสูงๆ ($\geq 908.96 \mu\text{M}$) มีแนวโน้มในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ได้ สำหรับ state 3 respiration EGCG มีผลลดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state นี้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 454.48, 681.72 และ 908.96 μM ซึ่งจากการศึกษาโดยใช้สับสเตรทของ complex I คือ glutamate + malate พบว่า EGCG ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ uncoupling ดังนั้นแม้ว่าจะไม่เกิดการกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เหมือนการใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แต่ด้วยฤทธิ์ uncoupling คือสามารถทำให้โปรตอนที่อยู่บริเวณ intermembrane space กลับเข้ามาใน matrix โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATP synthase มีผลทำให้ประสิทธิภาพของไมโทคอนเดรียในการเปลี่ยน $\text{ADP} + \text{P}_i$ ให้เป็น ATP ลดลง ดังนั้นจึงทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลง

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ไม่เปลี่ยนแปลง แต่อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว จึงยังมีผลทำให้ค่า RCI ของไมโทคอนเดรียลดลงมากเหมือนกับเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท โดย RCI มีค่าต่ำกว่า 3 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท EGCG ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวก็มีผลทำให้ประสิทธิภาพการควบคู่ระหว่างกระบวนการ oxidation และกระบวนการ phosphorylation ลดลงเช่นเดียวกัน

3. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

DNP เป็นสาร uncoupler ที่รู้จักกันมานาน สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียโดยไม่เกิดการสร้าง ATP (Lehninger et al., 2000) จากการศึกษาพบว่า EGCG มีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP ได้ และฤทธิ์ในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการยับยั้งนี้ไม่มากนัก โดยมีค่า $IC_{50} = 398.11 \mu M$ และที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ $908.96 \mu M$ ก็สามารถยับยั้งได้เพียง $61.20 \pm 4.28 \%$

แม้ว่า EGCG น่าจะออกฤทธิ์ uncoupling ได้เช่นเดียวกับ DNP แต่เมื่อให้ร่วมกันกลับพบว่า EGCG ยับยั้งฤทธิ์ uncoupling ของ DNP ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก EGCG เป็นสารที่สามารถแตกตัวให้ proton ได้ (Inoue et al., 2002) เช่นเดียวกับ DNP ดังนั้นอาจไปมีผลรบกวนการแตกตัวและการรวมตัวของโปรตอนกับ DNP ได้ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับรายละเอียดของกลไกการยับยั้งนี้ควรมีการศึกษาต่อไป

4. ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

bovine serum albumin เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ plasma albumin จากการศึกษาพบว่า BSA ขนาด 10 และ 15 mg มีผลยับยั้งการกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ EGCG ความเข้มข้น $400 \text{ g}/10 \mu\text{l}$ ($454.48 \mu M$) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งที่ผ่านมาเป็นที่ทราบกันดีว่าสาร catechins มีความสามารถในการจับกับโปรตีนได้ดี ดังนั้นในร่างกาย EGCG ก็อาจจะจับกับโปรตีนใน plasma และ tissue ได้ (Chen et al., 1997) สำหรับในการศึกษานี้ก็แสดงให้เห็นว่า EGCG อาจจะไปจับกับโปรตีนแล้วมีผลทำให้ EGCG ผ่านเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้ลดลง ผลการกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจึงลดลงด้วย

5. ผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรียที่ได้รับการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ด้วย oligomycin และ atractyloside เปรียบเทียบกับผลของ DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

เนื่องจาก oligomycin และ atractyloside มีผลยับยั้งกระบวนการ phosphorylation โดย oligomycin ออกฤทธิ์ไปจับกับส่วน F_0 ของเอนไซม์ ATP synthase แล้วทำให้ไม่เกิดการไหลกลับของโปรตอนผ่าน F_0 (Garrett and Grisham, 1999) ส่วน atractyloside ออกฤทธิ์ยับยั้ง adenosine nucleotide translocater ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่

ไมโทคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger et al., 2000) ดังนั้น การเติม ADP + Pi ลงในไมโทคอนเดรียที่ได้รับ oligomycin หรือ atractyloside จึงไม่สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนได้ แต่เมื่อเติมสาร uncoupler เช่น DNP ซึ่งมีความสามารถในการทำให้โปรตอนจาก intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix โดยไม่ต้องผ่านเอนไซม์ ATP synthase มีผลทำให้กระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนไปสู่ออกซิเจนเกิดขึ้นได้ต่อไป แม้ไม่มีการสร้าง ATP ทำให้เห็นอัตราการใช้ออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นได้ สำหรับผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรีย ในสภาวะดังกล่าวก็ให้ผลเช่นเดียวกับ DNP คือ เพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนได้ แม้ว่าไมโทคอนเดรีย จะได้รับสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase ดังนั้นการศึกษานี้ก็เป็นอีกการศึกษาหนึ่งที่สนับสนุนว่า EGCG น่าจะออกฤทธิ์ uncoupling ต่อไมโทคอนเดรีย

สำหรับกลไกการเกิด uncoupling ของ EGCG น่าจะเกิดจาก EGCG เป็นสาร polyphenol มี -OH group ที่สามารถแตกตัวให้โปรตอนได้หลายตำแหน่ง (Inoue et al., 2002) และเนื่องจากพลังงานจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนผ่าน complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจ นำมาใช้ในการผลักโปรตอนจาก matrix ไปสู่ intermembrane space มีผลทำให้ด้านนอก matrix มี pH ต่ำกว่าด้านใน ดังนั้น EGCG ก่อนเข้าสู่ matrix ก็จะมาพร้อมกับโปรตอน แต่เมื่อเข้าสู่ matrix ซึ่งมี pH สูงกว่าก็จะแตกตัวให้โปรตอน หรืออาจกล่าวได้ว่า EGCG มี protonophoric activity เช่นเดียวกับ DNP ซึ่งเป็น lipophilic weak acid แต่ฤทธิ์ uncoupling ของ EGCG น้อยกว่า DNP มาก น่าจะเกิดจากการที่ EGCG มีความเป็น lipophilic น้อยกว่า ทำให้พาโปรตอนผ่าน membrane เข้าสู่ matrix ได้น้อยกว่า

6. ผลของ EGCG ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย แคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

การทำงานของไมโทคอนเดรียนอกจากการสร้าง ATP โดยกระบวนการ oxidative phosphorylation แล้ว ยังสามารถขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียได้ ซึ่งต้องอาศัย membrane potential ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy and Smith, 2000) จากการศึกษาพบว่า EGCG สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ $908.96 \mu\text{M}$ ทั้งนี้เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าว EGCG มีฤทธิ์ uncoupling ซึ่งมีผลเปลี่ยนแปลง membrane potential ของไมโทคอนเดรียในปริมาณที่มากพอที่จะไปรบกวนกระบวนการขนส่งแคลเซียมเข้าสู่ไมโทคอนเดรียได้ ซึ่งโดยทั่วไปถ้าแคลเซียมเข้าไปสะสมในอวกานเซลล์ได้น้อยลงก็จะทำให้

แคลเซียมใน cytoplasm ของเซลล์เพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ต่อไปได้

7. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ในการศึกษานี้พบว่า EGCG ที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.73, 4.57, 18.30 μM มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้เล็กน้อยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ EGCG ความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 219.54, 292.72, 439.08 และ 585.44 μM มีผลทำให้ปริมาณ P_i ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลาย ATP เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Zheng และ Ramirez (2000) พบว่า EGCG สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ / ATP synthase ของไมโตคอนเดรียจากสมองหนูได้ โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{M}$ ซึ่งในการศึกษานี้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 18.30 μM พบผลการยับยั้งเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาจเนื่องมาจากแหล่งของไมโตคอนเดรียที่ต่างกัน คือ การศึกษา Zheng และ Ramirez ใช้ไมโตคอนเดรียจากสมอง แต่การศึกษานี้ใช้ไมโตคอนเดรียจากตับ และวิธีการศึกษาที่ต่างกัน โดยการศึกษาของ Zheng และ Ramirez จะแยกเอนไซม์จากไมโตคอนเดรียมาศึกษา แต่ในศึกษานี้เป็นการศึกษา activity ของเอนไซม์ที่ยังอยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งทำให้ความไวและความจำเพาะต่อการศึกษาผลของสารต่อเอนไซม์นี้น้อยกว่าการศึกษาของ Zheng และ Ramirez รวมทั้งช่วงความเข้มข้นที่สนใจศึกษาต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วถ้าสารใดก็ตามที่ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ของไมโตคอนเดรีย คือทำให้ oxidation และ phosphorylation แยกออกจากกัน จะมีผลทำให้ electrochemical gradient เสียไป ในสภาวะเช่นนี้จะกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ให้มีการสลาย ATP เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษานี้ก็สอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว คือ EGCG มีฤทธิ์ uncoupling และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้คล้ายกับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler ที่รู้จักกันดี และนอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การกระตุ้น ATPase ของ EGCG และ DNP สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย oligomycin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ / ATP synthase ได้เหมือนกัน

8. ผลของ EGCG ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

EGCG ในการศึกษานี้พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีกว่า MAO-B โดยมีค่า IC_{50} สำหรับการยับยั้ง MAO-A = 38.02 μM ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B จะน้อยกว่ามาก โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ 1136.20 μM สามารถยับยั้ง MAO-B ได้เพียง 38.44 % เท่านั้น และสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO ในการออกซิไดซ์ tyramine ซึ่งเป็นสับสเตรทชนิดไม่จำเพาะเจาะจงได้น้อยเช่นกัน โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษา คือ 1136.20 μM สามารถ

ยับยั้ง MAO ในการออกซิไดซ์ tyramine ได้ 48.98 % ลักษณะของ dose-response curve ของการยับยั้งสำหรับ MAO-A จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อขนาดเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นค่าหนึ่งการยับยั้งจะค่อนข้างคงที่ ส่วน dose-response curve ของการยับยั้งสำหรับ MAO-B และ MAO เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรทในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคงจะแสดงฤทธิ์การยับยั้งต่ำๆ ตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 41 และ 42

จากการศึกษาข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปผลของ EGCG ต่อกระบวนการหายใจและสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ดังนี้

1. EGCG ที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ uncoupling สามารถกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และมีผลทำให้ค่า RCI ของไมโตคอนเดรียลดลง การเติม bovine serum albumin มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์กระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของ EGCG เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทได้ ส่วนในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท EGCG ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 แต่อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ ค่า RCI ลดลงเช่นเดียวกับเมื่อ glutamate + malate เป็นสับสเตรท
2. EGCG สามารถยับยั้งฤทธิ์กระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler ได้
3. EGCG ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 908.96 μM สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้
4. EGCG มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้
5. EGCG มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้มากกว่า MAO-B

จากการศึกษาด้านเภสัชจลศาสตร์ของ EGCG ทั้งที่เป็นสารเดี่ยวๆ และสารผสมกับ catechins อื่นๆ ในชาเขียว รวมทั้งจากการดื่มชาเขียวที่ชงจากใบชาพบว่าระดับ EGCG ในเลือดมีค่าไม่เกิน 1 μM เช่น การรับประทาน EGCG ขนาด 800 mg แบบ single dose ทำให้มีระดับ EGCG ในเลือดสูงสุด 438.5 ng/ml หรือ 0.956 μM (Chow et al., 2001) ทั้งนี้เนื่องจาก EGCG มีการดูดซึมต่ำ และมี first-pass metabolism สูง ส่วนใหญ่ถูกขจัดออกทางน้ำดี (Zaveri, 2003) โดยจากการศึกษาในหนูพบว่า metabolite ในน้ำดีส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ 4''-di-O-methyl-EGCG (Lambert and Yang, 2003) ส่วน EGCG ที่พบในเลือดจะอยู่ในรูป unchanged form โดยมีค่า bioavailability น้อยกว่า 1 % จากการศึกษานี้ในอาสาสมัคร (Zaveri, 2003) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ EGCG ในร่างกายหลังจากการรับประทานมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นที่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโตคอนเดรียในการศึกษานี้มาก ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่า

ว่าการรับประทานชาเขียวหรือ EGCG ไม่น่าจะมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียทั้งต่อกระบวนการหายใจและสมรรถนะของเอนไซม์ monoamine oxidase

แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้เริ่มมีการพัฒนาเพื่อให้ระดับ EGCG ในเลือดเพิ่มมากขึ้น เช่น การพัฒนาปรับปรุงสูตรโครงสร้างของ EGCG ให้มีความเป็น lyophilic มากขึ้นและ/หรือลดการเกิด first-pass metabolism แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้เหมือนเดิมหรือมากกว่าเดิมในการศึกษาของ Zaveri และคณะ (2003) เพื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม หรือการศึกษาพัฒนา EGCG ให้สามารถนำมาเตรียมในรูปแบบ injection ได้ ดังนั้นถ้าระดับ EGCG ในเลือดสูงขึ้นมากผลของ EGCG ต่อไมโทคอนเดรียก็ควรนำมาพิจารณาพร้อมด้วยทั้งในด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการเกิดพิษ เพื่อให้เกิดประโยชน์และความปลอดภัยต่อผู้ใช้มากที่สุด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ดาเวศ บวรเทิงจิตร. 2547. ชาเขียว. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 164: 10-14.
- ศุภนารถ เกตุเจริญ และ อัญชลี พัดมีเทศ. 2541. ชา: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ [online].
กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์(ผู้เผยแพร่).
แหล่งที่มา: <http://web.ku.ac.th/agri/char/cha31.htm>[2548, กุมภาพันธ์ 26]
- พัชรา วีระกะลัส. 2544. พลังงานและเมแทบอลิซึม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Arjuna, T. 2000. Monograph: Green tea. Alt. Med. Rev. 5(4): 372-375.
- Aminoff, M. J. 1995. Pharmacologic management of parkinsonism & other movement disorders. In B. G. Katzung (ed), Basic & clinical pharmacology, 6th ed. pp. 419-431. USA: Appleton & Lange.
- Bernardi P. 1999. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. Physiol. Rev. 79: 1127-1146.
- Bertina, R. M., and Slater, E. C. 1975. The effect of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide m – chlorophenylhydrazone-induced ATPase of rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 376: 492-504.
- Binda, C., Hubalek, F., Li, M., Edmondson, D. E., and Mattevi, A. 2004. Minireview: Crystal structure of human monoamine oxidase B, a drug target enzyme monotonically inserted into the mitochondrial outer membrane. FEBS Lett. 564: 225-228.
- Carafoli, E. 2003. Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. Trends Biochem. Sci. 28(4): 175-180.
- Chance, E., and Williams, G. R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymology 17: 65-134.
- Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu R., Owuor, E. D., and Kong, A. N. 2003. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Carcinogenesis 24: 1369-1378.

- Chen, L., Lee, M. J., Li, H., and Yang, C. S. 1997. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. Drug Metab. Dispos. 25(9): 1045-1050.
- Chow H. H. S., et al. 2001. Phase I pharmacokinetic Study of Tea Polyphenols following Single-dose Administration of Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent. 10: 53-58.
- Chow H. H. S., et al. 2003. Pharmacokinetics and Safety of Green Tea Polyphenols after Multiple-Dose Administration of Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E in Healthy Individuals. Clin. Cancer Res. 9: 3312-3319.
- Danishefsky, I. 1980. Biochemistry for medical sciences. 1st ed. Boston: Little Brown and Company.
- Davison, A. N. 1958. Physiological Role of Monoamine Oxidase. Physiol. Rev. 38: 729-747.
- Devlin, T. M. 2002. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 5th ed. pp. 561-589. New York: Wiley-Liss.
- Doroquez, D. 2004. Chemiosmotic Hypothesis and Electron Transport Chain (in Respiration) [online]. Available from: <http://web.mit.edu/doroquez/www/7.014/archive.html>[2005, february 21]
- Dulloo, A. G., et al. 1999. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. Am. J. Clin. Nutr. 70: 1040-1045.
- Fiske, O. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- Garrett, R. H., and Grisham, C. M. 1999. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 2nd ed. pp. 673-707. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Hanstein W. G. 1976. Uncoupling of Oxidative Phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 456: 129-148.
- Haugaard, N., Lee, N. H., Kostrzewa, R., Horm, R. S., and Haugard, E. S. 1969. The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 172: 198-204.

- Hogeboom, G. H. 1955. Fractionation of cell components of animal tissue. In Coloxick S. P., and Kaplan N. O.(eds.), Method in enzymology, Vol 1, pp. 16-19. New York: Academic Press.
- Houslay, M. D., and Tipton, K. F. 1976. Minireview: Multiple forms of monoamine oxidase: fact and artifact. Life Sci, 19: 467-478.
- Inoue, M. B., Inoue, M., Fernando, Q., Valcic, S., and Timermann, B. N. 2002. Potentiometric and ¹H NMR studies of complexation of Al³⁺ with (-)-epigallocatechin gallate, a major active constituent of green tea. J. Inorg. Biochem. 88: 7-13.
- Ito, Y., Ohnishi, S., and Fujie, K. 1989. Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat Bone marrow cells in vivo and their suppression by green tea. Mutat. Res. 222(3): 253-261.
- Kao, Y. H., Hiipakka, R. A., and Liao, S. 2000. Modulation of endocrine systems and food Intake by green tea epigallocatechin gallate. Endocrinology 141(3): 980-987.
- Koo, M. W. L., and Cho, C. H. 2004. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. Eur. J. Pharmacol. 500: 177-185.
- Kuroda, Y. 1996. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. Mutat. Res. 361: 179-186.
- Kuroda, Y., and Hara, Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea Polyphenols. Mutat. Res. 436: 69-97.
- Lambert, J. D., and Yang, C. S. 2003. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. Mutat Res. 523-524: 201-208.
- Lee, M. J., et al. 2002. Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent. 11: 1025-1032.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2000. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Principles of Biochemistry, 2nd ed. pp. 659-721. New York: Worth Publishers.

- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, B. H. M., and Mandel, S. 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. J. Neurochem. 78: 1073-1082.
- Liu, J. C., et al. 2003. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. Life Sci. 73:1543-1555.
- Lodish, H., et al. 2004. Cellular energetics. Molecular cell biology, 5th ed. pp. 301-330. New York: W.H. Freeman and Company.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Matsunaga, K., Klein, T. W., Friedman, H., and Yamamoto, Y. 2002. Epigallocatechin Gallate, a potential Immunomodulatory Agent of Tea Components, Diminishes Cigarette Smoke Condensate-Induced Suppression of Anti-*Legionella pneumophila* Activity and Cytokine Responses of Alveolar Macrophages. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 864-871.
- McMurry and Castellion. 1995. The generation of biochemistry, Foundamentals of general, organic and biological chemistry [online]. Prentice-Hall (Producer). Available from: http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/medialib/media_portfolio/text_images/FG2105.JPG[2005, february 21]
- Metzler, D. E. 2003. Electron Transport, Oxidative Phosphorylation, and Hydroxylation. Biochemistry The Chemical Reactions of Living Cells, 2nd ed. pp. 1013-1047. California: Elsevier Science.
- Miura, Y., et al. 2001. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in Apoprotein E-Deficient Mice. J. Nutr. 131: 27-32.
- Moini, H., Arroyo, A., Vaya, J., and Packer, L. 1999. Bioflavonoid on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state. Redox Res. 4: 35-41.

- Murakami, C., Hirakawa, Y., Inui, H., Nakano, Y. 2002. Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(7): 1559-1562.
- Murphy, M. P., and Smith, R. A. J. 2000. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 41: 235-250.
- Muto, S., Fujita, K. I., Yamazaki, Y., and Kamataki, T. 2001. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. Mutat Res. 479: 197-206.
- Myers, D. K., and Slater, E. C. 1957. The enzyme hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria I. activities at difference pH value. Biochem. J. 957: 558-572.
- National Library of Medicine. 2004. Epigallocatechin gallate [online]. Available from: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/chemidheavy/Toxicity.jsp>[2005, february 21]
- Pletscher A. 1966. I. Monoamine Oxidase Inhibitors. Pharmacol. Rev. 18: 115-127.
- Rietveld, A., Wiseman, S. 2003. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. J. Nutr. 133(10): 3285S-3292S.
- Shirai, T., et al. 1997. Epigallocatechin gallate-induced histamine release in patients with green tea-induced asthma. Ann. Allergy Asthma Immunol. 76: 65-69.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. 2002. Mitochondria as a Pharmacological Target. Pharmacol. Rev. 54: 101-127.
- Taraphdar, A. K., Roy, M., and Battacharya, R. K. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. Curr. Sci. 80(11): 1387-1396.
- Urban, P., Andersen, J. K., Hsu, H. P. P., and Pompon D. 1991. Comparative membrane locations and activities of human monoamine oxidase expressed in yeast. FEBS Lett. 286: 142-146.
- Voet, D., and Voet, J. G. 1990. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 2nd ed. pp. 563-596. New York: John Wiley & Sons.

- Wallace, K. B., and Starkov, A. A. 2000. Mitochondria Targets of Drug Toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 353-388.
- Wang, X., Song, K. S., Guo, Q. X., and Tian, W. X. 2003. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. Biochem. pharmacol. 66: 2039-2047.
- Weinbach, E. C. 1956. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosinetriphosphatase. J. Biol. Chem. 221: 609-618.
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., and Shimamura, T. 2002. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Antiviral Res. 53(1): 19-34.
- Yang, C. S. and Wang, Z. Y. 1993. Tea and cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 85(13): 1038-1049.
- Zaveri, N. 2004. Breast Cancer Prevention by Analogs of EGCG from Green Tea [online]. Brest Cancer Research Program (Producer). Available from: http://www.cbcrp.org/research/PageGrant.asp?grant_id=1820[2005, february 21]
- Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Okubo, S., Hara, Y., and Shimamura, T. 2001. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1737-1742.
- Zheng, J., Ramirez, V. D. 2000. Inhibition of mitochondrial proton FoF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. Br. J. Pharmacol. 130(5): 1115-1123.
- Zubay, G. 1993. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. Biochemistry, 3rd ed. pp. 379-411. USA: Wm. C. Brown Communications.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรทิพา ตระการรังสี เกิดเมื่อวันที่ 2 สิงหาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิตจากมหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยาบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่งเภสัชกรระดับ 5 กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลสมเด็จพระพุทธเลิศหล้า จังหวัดสมุทรสงคราม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย