บทที่ 1

บทนำ

2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็นสารประกอบที่พบในสมุนไพรเทียนบ้าน (*Impatiens balsamina*) ชาวบ้านทั่วไปนิยมใช้ใบสดมาตำให้ละเอียด ใช้ทารักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา(1)

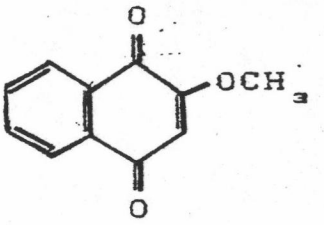
ในบทนี้มีเนื้อหาที่สำคัญแบ่งเป็น 4 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นข้อมูลในการค้นพบและผลการออกฤทธิ์ทางจุลชีววิทยาที่น่าสนใจของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เท่าที่มีอยู่ในปัจจุบัน ส่วนที่สองจะกล่าวถึง กลไกการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา ส่วนที่สามกล่าวถึงทฤษฎีหรือสมมุติฐานที่เกี่ยวกับการทำงานของไมโตคอนเดรียที่จำเป็นต้องใช้อ้างอิงและอธิบายผลการวิจัย รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการหายใจเฉพาะกรณีของเซลยีสต์ ซึ่งจะมีลักษณะบางประการที่แตกต่างออกไป และส่วนสุดท้าย จะกล่าวถึงผลของอนุพันธ์ของ naphthoquinone บางตัวที่เคยมีการศึกษาถึงผลที่มีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย

2-methoxy-1,4-naphthoquinone

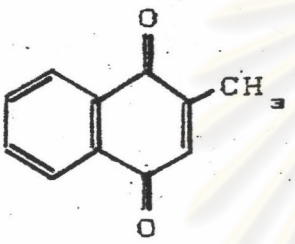
2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็นสารประกอบจำพวกแนพโทควิโนนที่สกัดได้จากใบของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Impatiens balsamina* โดย John.E.Little และคณะ(2) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1 พร้อมทั้งสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ที่นำมาศึกษา เปรียบเทียบกับสูตรโครงสร้างของ Coenzyme Q

Impatiens balsamina L.สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีปลูกไว้ตามบ้านและสวนยาจีนทั่วๆไป มีชื่อพื้นเมืองอยู่หลายชื่อได้แก่ เทียนบ้าน,เทียนไทย, เทียนสวน(ภาคกลาง),จิงกะอวย,ใจกะอวย,ห่งเซียง,เซียวถ่ออั้ง,โจ้ยกะเช่า(จีน)(3,4)

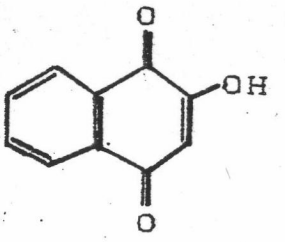
พืชชนิดนี้เป็นพืชดั้งเดิมของประเทศอินเดีย ปัจจุบันพบว่ามีปลูกกันทั่วไป(5) ในประเทศไทยนิยมปลูกเป็นไม้ประดับตามบ้าน (รูปที่ 2) โดยเฉพาะชนิดที่ดอกมีลักษณะเป็น



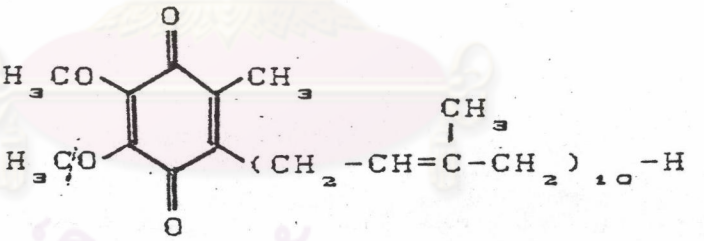
(1)



(2.1)



(2.2)



(3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ

(1) 2-methoxy-1,4-naphthoquinone(น้ำหนักโมเลกุล = 188.2)

(2) อนุพันธ์ของแนพโทควิโนนอื่นๆได้แก่

(2.1) 2-methyl-1,4-naphthoquinone(menadione)

(2.2) 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone(lawsone)

(3) Coenzyme Q (ubiquinone)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะทั่วไปของต้นเทียนบ้าน(*Impatiens balsamina*)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลีบซ้อน เป็นพืชล้มลุกสูงประมาณ 20-60 เซนติเมตร ลำต้นมีสีเขียวอ่อน อวบน้ำ ค่อนข้างโปร่งแสง ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับเวียนรอบลำต้น รูปใบหอก ยาวเรียว โคนใบและปลายเรียวแหลม ขอบใบหยักลึกแบบฟันเรื่อย กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตร ก้านใบสั้น มีตุ่มเรียงเป็นแนวยาวสองข้าง ลักษณะดอก ออกเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือออกหลายดอกอยู่รวมกัน กลีบรองกลีบดอกสามกลีบ รูปไข่ป้อม ขนาดเล็ก สีเขียว กลีบดอก 5 กลีบ กลีบบนรูปกลม ปลายเว้าเล็กน้อย กลีบข้างสองกลีบกว้าง กลีบล่างงอเป็นกระเปาะ ก้นกระเปาะมีจงอยยื่นออกมาเป็นหลอดเล็กๆยาวๆ ปลายโค้งงอขึ้นเล็กน้อย กลีบดอกมีหลายสีเช่น ขาว ชมพู แดง หรือหลายสีผสมกัน เกสรตัวผู้ 5 อัน ติดอยู่รอบเกสรตัวเมีย เกสรตัวเมียมีรังไข่ 5 ห้อง ปลายก้านชูเกสรตัวเมียมี 5 แฉก ผลรูปไข่หรือรูปรีมีขนสีขาว แก่จัดจะแตกเป็นริ้วๆตามยาวของผลและม้วนขมวด แต่ละช่องมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดกลม สีน้ำตาล เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร การขยายพันธุ์ จะใช้เมล็ดหยอดลงในดินลึก 2-3 เซนติเมตร กลบดินให้เรียบ รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน ไม่ช้าก็จะงอก (4,6)

ต้นเทียนบ้านนี้มีประวัติในการใช้เป็นยาในจีน โดยนำผงของเมล็ดเทียนบ้านใช้ในการรักษากรณีคลอดบุตรยาก ลดอาการปวดหลังคลอด ใช้เป็นยาขับระดู และใช้แก้พิษปลาบางชนิด นอกจากนี้ถ้าใช้เมล็ดต้มกับปลาจะทำให้กระดูกปลาอ่อนนิ่ม และใช้ในการทำให้หยุดอาการสะอึก และถ้าใช้ผสมกับกรดอาซีเนียส(arsenious acid) ใช้ทาบริเวณที่ฟันผุจะทำให้ถอนฟันได้ง่ายขึ้น น้ำจากลำต้นเมื่อนำมาผสมกับเหล้าจะใช้รักษาอาการฟกช้ำ ลำต้นที่แก่จัดเมื่อนำมาต้มใช้ชะล้างฝีได้ดีและช่วยลดอาการบวมอีกด้วย ส่วนลำต้นยังมีการนำมาใช้ในการเพิ่มการไหลเวียนของเลือดและบรรเทาอาการปวด จึงใช้ในตำรับสำหรับหญิงที่คลอดบุตรยาก, เป็นตะคริวที่ขา และอาการปวดตามข้อ (Rheumatism) ส่วนของดอกซึ่งมีลักษณะเป็นเมือกและยาเย็น ใช้ในการรักษาพิษงูกัด, ปวดเอว และปวดเส้นประสาทบริเวณซี่โครง ส่วนชาวจีนในประเทศอินโดนีเซียใช้น้ำต้มของใบในการสระผมและทำให้ผมดกขึ้น ส่วนที่มาเลเซีย,อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ จะใช้ใบเป็นยาพอกฝีที่ข้อปลายนิ้วและมีฤทธิ์สมานแผลด้วย นอกจากนี้สารสกัดแอลกอฮอล์จากส่วนของดอกจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้หลายชนิด(5)

พืชในสกุล(genus) นี้ที่ได้มีการนำมาใช้เช่นกัน เช่น ที่อินโดนีเซียจะใช้ใบของ *Impatiens platypetala* Lindl. ในตำรับที่รักษาผื่นที่ผิวหนัง และใช้เป็นยาขับปัสสาวะในเด็ก ที่ประเทศนิวกินี ใช้ใบเลี้ยงและใบอ่อนของ *I. mooreana* Schltr.

ทาบริเวณแผลไฟไหม้ และอีก 2 ชนิดไม่ทราบชื่อ จะใช้ส่วนของน้ำคั้นดื่มเพื่อรักษาอาการปวดฟัน ปวดหัว และปวดหน้าอก (5)

ส่วนประโยชน์ของเทียนบ้านในไทยนั้น ก็มีการใช้ในหลายด้านเช่น ใช้เป็นยาขับประจำเดือน โดยใช้เมล็ดแห้งของต้นเทียนบ้านชนิดดอกสีขาว 60 กรัม นำมาบดเป็นผงรวมกับตังกุย 10 กรัม ผสมน้ำผึ้งทำเป็นยาเม็ด รับประทานครั้งละ 3 กรัม 3 เวลา (7) ใช้เป็นยาพอกฝี โดยใช้ใบสด 5-10 ใบ นำมาล้างให้สะอาด ตำให้ละเอียด แล้วพอกที่แผล (8) ใช้เป็นยากันเล็บถอด โดยใช้ส่วนของใบและยอดสดขนาดหนึ่งกำมือล้างให้สะอาดตำให้ละเอียด เติมน้ำตาลทรายแดงครึ่งช้อนชา พอกตรงเล็บ เปลี่ยนยาเช้า-เย็น (9) และใช้ในการรักษากลากเกลื้อน โดยใช้ใบสดขนาดหนึ่งกำมือตำให้ละเอียด ทาทั้งน้ำทั้งเนื้อบริเวณที่เป็นบ่อยๆจนกว่าจะหาย (1)

ประโยชน์ของเทียนบ้านที่นำมาใช้ในด้านต่างๆนั้น จนถึงปัจจุบันยังไม่พบว่ามีรายงานการวิจัยใดสนับสนุนถึงผลทางเภสัชวิทยาในด้านต่างๆ ที่กล่าวมา การศึกษาส่วนใหญ่ที่มีจะเป็นการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบเทียนบ้านหรือผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในด้านฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเริ่มมีการศึกษาโดยการสกัดแยกได้สารบริสุทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone จากใบของต้นเทียนบ้าน (*Impatiens balsamina*)และมีการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราที่ก่อโรคบางชนิดในพืชของสิ่งสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบเทียนบ้าน พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้หลายชนิดเช่น *Trichophyton mentagrophytes* 9533 , *Ustilago avenae* เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำการทดสอบพิษของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ต่อพืชได้แก่ ต้นมะเขือเทศและต้นถั่วอายุ 3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าสารประกอบดังกล่าวไม่มีพิษต่อพืชที่ใช้ทดสอบ (2) ส่วนสิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์มของใบเทียนบ้าน สามารถฆ่าเชื้อราได้หลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังในคนโดยทำการทดลองในหลอดทดลอง (in vitro) เช่น *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลาก (ring worm) โรคกลากบริเวณง่ามเท้า (tinea pedis) และฮ่องกงฟุต (10) และเมื่อนำสารสกัดใบเทียนบ้านด้วยคลอโรฟอร์มมาเตรียมเป็นยาขี้ผึ้งและครีมในขนาดความเข้มข้น 1% พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราได้ดีเช่นกัน (11) แต่เมื่อนำยาเตรียมในรูปแบบครีมไปทดสอบฤทธิ์ความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย พบว่าครีมดังกล่าวมีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังกระต่ายเกิดความระคายเคืองอย่างมาก (12) และเมื่อทดสอบซ้ำกับผิวหนังหนูตะเภา พบว่าจะทำให้บริเวณที่ทาเกิดการอักเสบ และการอัก

เสบจะเพิ่มมากขึ้นถ้าบริเวณที่ทาได้รับแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (13)

การวิจัยที่ผ่านมานั้นจะเป็นการศึกษาถึง ผลของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จากใบเทียนบ้านเป็นส่วนใหญ่ ต่อมาจึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารบริสุทธิ์ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone โดยตรงในด้านฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา โดยทำการทดสอบหาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา 2 วิธี คือ วิธี disc diffusion test และวิธี broth dilution พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้ดีและพบว่าค่า MIC (minimum inhibitory concentration) มีค่าต่ำ โดยที่ค่า MIC ของเชื้อ *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* มีค่าเท่ากันคือ 2.50 มคก./มล. ส่วนเชื้อ *Epidermophyton floccosum* และ *Candida albicans* มีค่าเท่ากับ 1.25 มคก./มล. นอกจากนี้ยังได้นำสารประกอบดังกล่าวไปทดสอบการระคายเคืองของผิวหนังกระต่าย ด้วยการทาสารละลายความเข้มข้น 0.5 และ 2% ใน DMSO ที่ผิวหนังกระต่ายซ้ำที่เดิม 3 ครั้ง โดยเว้นระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง สังเกตผลหลังจากการทา 24,48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลไม่พบว่าเกิดผื่นแดงหรืออาการบวม แต่พบว่าผิวหนังที่ทาแห้งกว่าปกติ และทดสอบถึงผลทางด้านพิษต่อเซล (cytotoxic) ต่อเซลเคบี (human nasopharynx carcinoma)ในขนาดความเข้มข้น 5 มคก./ มล. พบว่าสารประกอบดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อเซล จากรายงานการวิจัยดังกล่าวยังได้สรุปถึงผลของความระคายเคืองผิวหนังของครีมที่เตรียมจากสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากใบเทียนบ้าน น่าจะเกิดจากสารประกอบอื่นๆในสิ่งสกัด เพราะสารประกอบ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone บริสุทธิ์ไม่มีฤทธิ์ระคายเคืองดังกล่าว (14)

<u>กลไกในการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (Mechanism of action of antifungal agents)</u>

สารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราในปัจจุบัน มีกลไกในการออกฤทธิ์ที่สำคัญแบ่งได้เป็น 3 ประการคือ

1) มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลของเชื้อรา (alteration of cell membrane permeability) โดยสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราดังกล่าว ไปจับกับส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลอันได้แก่ สเตอรอล (sterol)

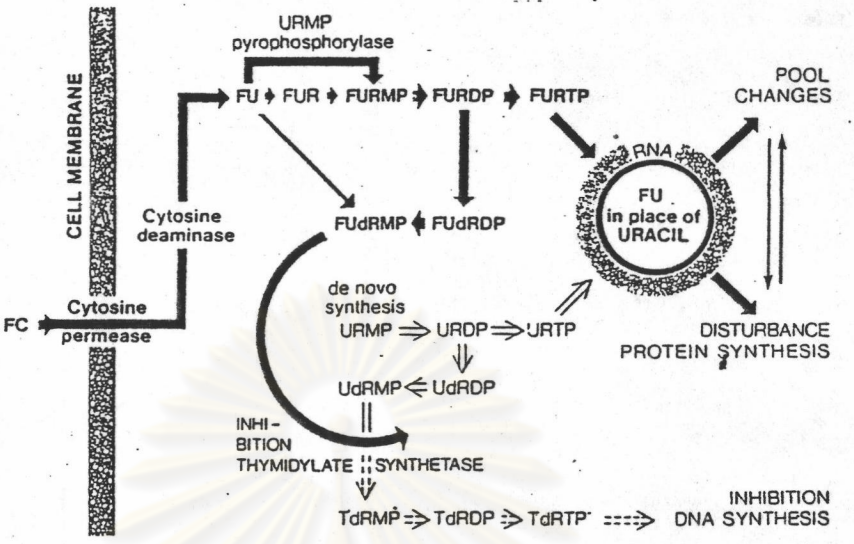
หรือส่วนของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) แล้วทำให้ผนังเซลเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยอาจเกิดการแตกออกของผนังเซล หรือมีการเรียงตัวใหม่ของไขมันที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซล ทำให้ความสามารถในการรักษาความดันออสโมติคในเซลเสียไป ส่งผลให้มีการสูญเสียสารสำคัญต่างๆภายในเซล ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการมีชีวิตของเซล สุดท้ายจะทำให้เซลตายได้ สารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในลักษณะนี้ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มโพลีอีน (polyene antibiotic) ซึ่งจะจับได้ดีกับส่วนของสเตรอลของผนังเซล เช่น amphotericin B และ nystatin เป็นต้น และสารในกลุ่มอิมมิดาโซล (imidazoles) ซึ่งจับได้ดีกับส่วนของฟอสโฟลิปิด แล้วทำให้เกิดการแตกของผนังเซลดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เช่น miconazole และ clotrimazole เป็นต้น (15,16)

2) มีผลต่อการสังเคราะห์สารสำคัญในเซลได้แก่ ขัดขวางการสังเคราะห์ DNA และ/หรือ กรดอะมิโน และ/หรือ การสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ สารประกอบจำพวก fluorinated pyrimidines เช่น 5-fluorocytosine(5-FC) ซึ่งถูกนำเข้าเซลของเชื้อราโดยเอนไซม์cytosinepermease หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา deaminated เปลี่ยนเป็น 5-fluorouracil(5-FU) ในเซลของเชื้อรา ซึ่งคาดว่า 5-FU อาจจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราเป็นกลไกใด กลไกหนึ่ง หรือทั้งสองกลไกต่อไปนี้คือ

2.1) รบกวนการสังเคราะห์โปรตีน และ/หรือ การสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งเป็นผลมาจากการแทนที่ของ uracil โดย 5-FU ใน RNA ของเชื้อรา

2.2) ทำให้การสังเคราะห์ DNA ของเชื้อราเสียไป โดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ thymidylate synthetase โดย 5-fluorodeoxy-uridine monophosphate (FU dRMP) ดังแสดงในแผนภาพต่อไปนี้ (รูปที่ 3) (16)

3) มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของลูกโซ่การหายใจ (inhibitors of the respiratory chain) ได้แก่ antimycin A ซึ่งพบว่าเป็นพิษต่อเชื้อราที่ก่อโรคหลายชนิด antimycin A มีผลต่อกระบวนการหายใจ โดยจะไปจับอย่างเฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ Complex III ของกระบวนการหายใจ มีผลทำให้ไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนได้ ไม่มีการสร้าง ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลสิ่งมีชีวิต ดังนั้น



URMP = uridine monophosphate
URDP = uridine diphosphate
URTP = uridine triphosphate
UdRMP = deoxyuridine monophosphate
UdRDP = deoxyuridine diphosphate
TdRMP = thymidine monophosphate
TdRDP = thymidine diphosphate
TdRTP = thymidine triphosphate
RNA = ribonucleic acids
DNA = deoxyribonucleic acids
FC = flucytosine (5-fluorocytosine)
FU = 5-fluorouracil
FUR = 5-fluorouridine
FURMP = 5-fluorouridine monophosphate
FURDP = 5-fluorouridine diphosphate
FURTP = 5-fluorouridine triphosphate
FUdRMP = 5-fluorodeoxyuridine monophosphate
FUdRDP = 5-fluorodeoxyuridine diphosphate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงวิถีทางที่เกิดภายในเซลเชื้อราและกลไกการออกฤทธิ์ของ flucytosine

antimycin A จึงเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ต้องอาศัยพลังงานจากกระบวนการหายใจ ไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อราหรือยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่ในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย จะพบพิษของ antimycin ที่ขนาดความเข้มข้นที่สูงมาก (>80 มคก./มล.) ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นนี้ควรจะเป็นกลไกอื่นๆนอกเหนือจากการจับของ antimycin A กับ Complex III ที่จะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หรืออาจเนื่องมาจาก antimycin A ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซล(cell wall) เข้าไปในเซลของแบคทีเรียได้ หรือเนื่องมาจากความแตกต่างของเอนไซม์ในกระบวนการหายใจจึงทำให้ไม่ตอบสนองต่อ antimycin (17)

<u>การหายใจและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่นของไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial Respiration and Oxidative Phosphorylation)</u>

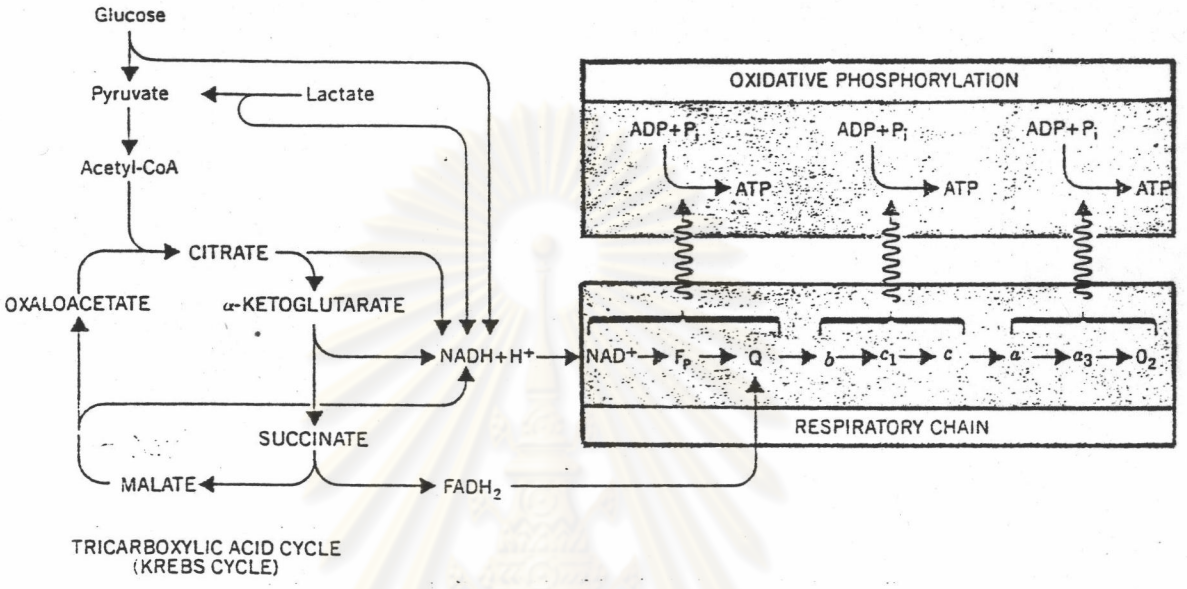
ไมโตคอนเดรียซึ่งถือว่าเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซล(cell powerhouse) และเป็นบริเวณแรกที่เกิดการออกซิเดชั่นของเซลในไมโตคอนเดรีย สารสำคัญต่างๆที่เกิดจากการสลายของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารประกอบจำพวกไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในที่ต่างๆภายในเซล จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งพลังงานที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเหล่านี้ จะถูกนำไปใช้ต่อไปในการผลักดันให้เกิดการฟอสฟอริลเลชั่น ADP ไปเป็น ATP (20)

ไมโตคอนเดรียจะพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลเกือบทุกชนิด ที่อาศัยออกซิเจน ซึ่งอาจจะมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป แต่โครงสร้างที่สำคัญจะคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น ผนังชั้นนอกและผนังชั้นใน(outer and inner membrane) และระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นจะเป็นช่องว่างที่มีของเหลวอยู่ (intermembrane space) ภายในผนังชั้นในจะมีสารคล้ายวุ้น เรียก matrix บางส่วนของผนังชั้นในที่ยื่นเข้าไปใน matrix เรียกว่า cristae คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะ permeable ต่อสารโมเลกุลเล็กส่วนใหญ่รวมทั้งอิออนต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลชั้นนี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูขนาดใหญ่เรียกว่า porin protein ในทางตรงกันข้ามผนังชั้นในจะไม่ permeable ต่ออิออนต่างๆรวมทั้งสารที่มีโมเลกุลโพลาร์ การผ่านของสารต่างๆจากภายนอกผ่านผนังชั้นในนี้ จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) (19)

การเกิดออกซิเดชั่นในระยะแรกจากปฏิกิริยาวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle reaction) สารอาหารจำพวกกลูโคสจะถูกสลายได้กาซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ H^+ (proton) และ อิเลคตรอนที่ปลดปล่อยมาจากสารตัวกลาง(intermediates) ในปฏิกิริยาดังกล่าวจะรีดิวซ์ NAD^+ และ FAD ไปเป็น $NADH+H^+$ และ $FADH_2$ ซึ่งถือเป็น reducing equivalents ที่สำคัญที่จะถูกส่งผ่านเข้าลูกโซ่การหายใจ การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจนั้น จะเป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่นหลายขั้นตอนด้วยกัน มีการส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังสารตัวกลางที่รับอิเลคตรอนหลายชนิดที่อยู่บริเวณผนังชั้นใน ซึ่งจะมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย สารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนได้แก่ pyridine หรือ pyrimidine-linked dehydrogenase,flavin-linked dehydrogenase, iron-sulfur proteins และ ระบบ cytochromes ดังแสดงในรูปที่ 4 จากรูป สับสเตรทที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์แบ่งได้เป็น 2 พวกคือ NAD^+-linked substrate เช่น malate+glutamate(ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น α-ketoglutarate ใน Krebs cycle) และอีกพวกหนึ่งคือ succinate ซึ่งจะส่งผ่านอิเลคตรอนไปยัง FAD และส่งให้ Coenzyme Q โดยตรง (20,22-24)

ออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น คือกระบวนการสร้าง ATP ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ จาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจนโดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด (20) และพบว่าการสังเคราะห์ ATP และการส่งผ่านอิเลคตรอนจะต้องเกิดควบคู่กันไป (tighly coupled) แต่ทั้ง 2 กระบวนการอาจเกิดแยกกันได้ในกรณีต่อไปนี้คือ ไมโตคอนเดรียเกิดความเสียหายในขณะเตรียมหรือเตรียมแล้วเก็บเป็นเวลานาน(aging mitochondria) หรือได้รับสารบางอย่างที่เรียกว่า uncouplers เช่น DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) โดยที่สารเหล่านี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจได้อย่างอิสระ นั่นคือมีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วโดยไม่เกิดการสร้าง ATP เหมือนในภาวะปกติ เรียกว่าเกิดอันค้ปปลิง (uncoupling)

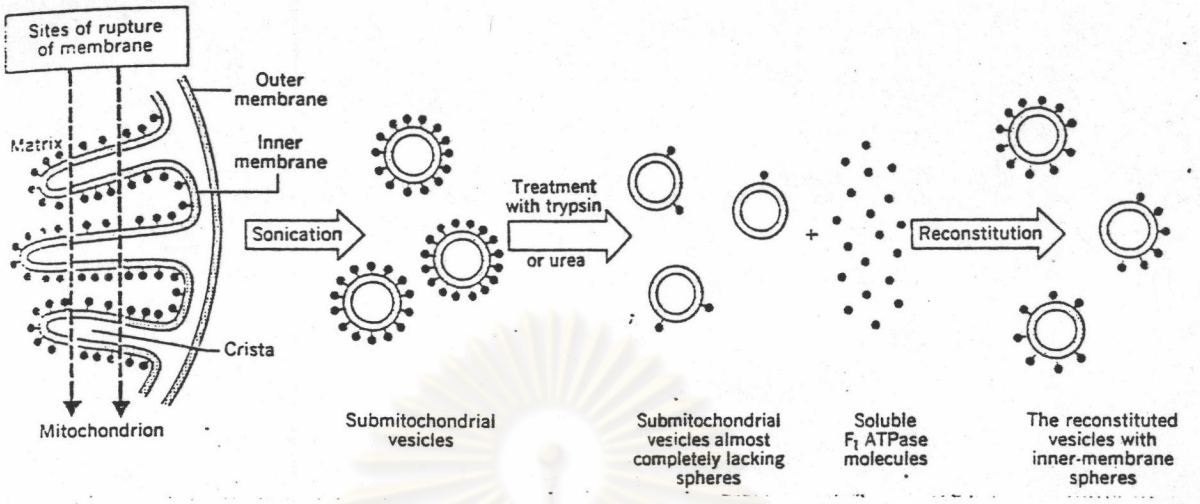
ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าการสร้าง ATP ในไมโตคอนเดรียนั้น จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากการส่งผ่านอิเลคตรอนไปตามลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้สร้าง ATP อย่างไรนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จนกว่าจะได้พบ coupling factor หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดังกล่าว แต่ผล



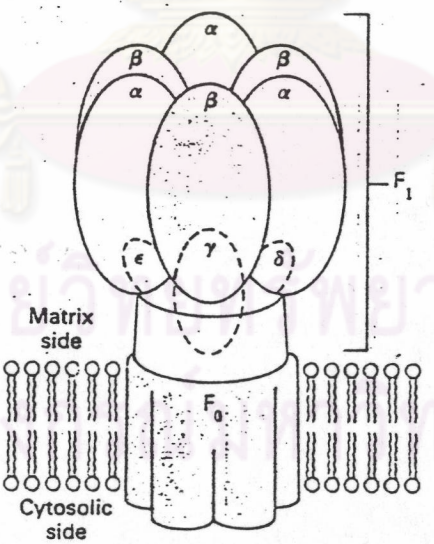
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle, respiratory chain oxidation reduction, และปฏิกิริยา oxidative-phosphorylation

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาในหลายประเด็นที่จะกล่าวต่อไปนี้ ก็จะนำไปสู่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ดังกล่าว (20) ประการแรกคือ กลไกในการควบคุมอัตราการส่งผ่านอิเลคตรอนและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ซึ่งพบว่าการขนส่งอิเลคตรอนสูงสุดจะเกิดขึ้นได้ในไมโตครอนเดรีย ถ้ามี ADP และ phosphate(Pi) แต่ถ้าไม่มี ADP หรือมี ATP ในปริมาณมาก อัตราการหายใจจะต่ำ เรียกระยะนี้ว่า state 4 respiration แต่เมื่อมีการเติม ADP อัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้น คือมีการเกิดฟอสฟอริลเลชั่นของ ADP ซึ่งจะเรียกระยะนี้ว่า state 3 respiration เมื่อ ADP ถูกใช้ไปหมด การหายใจจะช้าลงเข้าสู่ state 4 respiration อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งการที่ ADP มีอิทธิพลต่อการควบคุมการหายใจ จึงเรียก ADP ว่าเป็นตัวควบคุมการหายใจ (respiratory control) (20) ประการที่ 2 พบว่ามีสารประกอบทางเคมีหลายชนิดที่มีผลทำให้เกิดภาวะอันคัปปลิง ระหว่างออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น และการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ เช่นที่กล่าวมาแล้วคือ DNP ซึ่งจากการเติมสารเหล่านี้ลงไปจะทำให้เกิดผลที่น่าสนใจ 2 อย่างคืออย่างแรก สารเหล่านี้สามารถกระตุ้นการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจและ มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น แม้ว่าจะไม่มี ADP และไม่มีการสังเคราะห์ ATP กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ฟอสฟอริลเลชั่นและการส่งผ่านอิเลคตรอนไม่เกิดควบคู่กันไป นั่นคือเกิดภาวะอันคัปปลิง อย่างที่สองก็คือ มีการกระตุ้นให้มีการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ATP โดยเอนไซม์ ATPase ซึ่งเป็นผลตรงข้ามกับหน้าที่ของไมโตคอนเดรียโดยปกติ ซึ่งพบว่าคุณสมบัติของสารเหล่านี้ในการทำให้เกิดภาวะอันคัปปลิงนั้น เนื่องจากสารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็น proton ionophore คือสามารถนำพาเอา H^+ ผ่านเข้าออก impermeable membrane ทั่วไปได้ ในที่นี้ก็คือ สามารถนำ H^+ จากภายนอกไมโตคอนเดรียผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้ ประการที่ 3 พบว่า oligomycin สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟฟอสโฟริลเลชั่น รวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ถ้าไมโตคอนเดรียอยู่ในสภาวะ อันคัปปลิง ประการที่ 4 ซึ่งเป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของไมโตคอนเดรีย โดยใช้ submitochondrial vesicles ซึ่งจะมีวิธีเตรียมดังในรูปที่ 5 โดยการแยกไมโตคอนเดรียออกมาและผ่านขั้นตอนต่างๆดังในรูป ในส่วนของ submitochondrial vesicles ที่สมบูรณ์จะยังคงประสิทธิภาพในการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น และการขนส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่เมื่อใส่ trypsin หรือ urea ซึ่งจะทำให้ submitochondrial vesicles สูญเสียโครงสร้างที่เป็นเม็ดกลมๆไป ซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเกิดฟอสฟอริลเลชั่นหมดไป แต่การส่งผ่านอิเลคตรอนยังเป็นไปได้ แต่ถ้าใส่โครงสร้างที่เป็นเม็ดกลมๆกลับเข้าไปอย่างเดิม จะทำให้ความสามารถต่างๆกลับคืนมา โครงสร้างทรงกลม



รูปที่ 5 แสดงการเตรียม submitochondrial vesicles เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของไมโตคอนเดรีย



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATPase

ดังกล่าว พบว่าเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase มีชื่อว่า coupling factor one (F_1) ซึ่งในไมโตคอนเดรียปกติจะติดอยู่กับผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียและทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ P_i มากกว่าจะมีผลในทางตรงกันข้าม ในส่วน F_1 ไม่พบว่าถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin อีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase ได้แก่ส่วนของ F_0 ซึ่งประกอบด้วย 3 subunit คือ a, b และ c ซึ่งส่วนของ F_0 นี้จะเป็นส่วนที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin คาดว่า F_0 จะเป็นส่วนก้านที่ติดต่อระหว่างโครงสร้างทรงกลม(F_1) กับผนังชั้นใน รูปที่ 6

จากผลการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาทั้ง 4 ประการทำให้มีการเสนอแนวความคิดไว้หลายด้านในเรื่องของความสัมพันธ์ของการส่งผ่านอิเลคตรอน และออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น แต่ในปัจจุบันความคิดที่เป็นที่ยอมรับก็คือ Chemiosmotic-coupling Hypothesis ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ซึ่งได้รับรางวัลโนเบลในปี 1978 จากการเสนอความคิดดังกล่าว

ความเชื่อมโยงระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจและ การเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่นตาม Chemiosmotic-coupling (20) มีสาระสำคัญดังนี้ คือ การเกิดความแตกต่างของระดับ H^+ ระหว่าง matrix และ intermembrane space อันเนื่องมาจากในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนนั้น จะมีการผลักดันให้ H^+ จาก matrix ผ่านผนังเซลชั้นในไปสะสมที่ intermembrane space ซึ่งจะทำให้เกิด electrochemical gradient ขึ้นระหว่าง ผนังชั้นใน คือมีประจุลบที่ด้านในของผนังชั้นใน และบวกทางด้านนอก ซึ่ง electrochemical gradient ดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือสามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าและออกของ H^+ ได้ซึ่งผลของ electrochemical gradient จะเป็นส่วนที่จะให้พลังงานในการผลักดันให้เกิดการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ Pi โดย H^+ จากด้านนอกจะผ่านกลับเข้าไปอยู่ในส่วนของ matrix โดยผ่านทาง F_0 และทำให้ F_1 กระตุ้นการสร้าง ATP นั่นคือ H^+ จะเป็นตัวจักรสำคัญในการเชื่อมโยงการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่นในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจน นั่นคือสารที่มีผลเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ H^+ ระหว่างด้านนอกและด้านในของผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้ H^+-gradient เสียไป (H^+-gradient collapsed) จะมีผลต่อภาวะดัปปลิงของไมโตคอนเดรีย เช่น ในภาวะที่โครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลายในกรณีของ aging mitochondria หรือกรณีของ DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น H^+-ionophore

ที่สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปใน matrix ได้โดยไม่ผ่านทาง F_1-F_o complex ทำให้ H^+ gradient เสียไป ซึ่งมีผลทำให้ไมโตคอนเดรียพยายามออกซิไดซ์สับสเตรทเรื่อยๆไป นั่นคือยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจแต่ H^+-gradient ไม่เกิดหรือเกิดเพียงเล็กน้อย และยังพบว่าในภาวะดังกล่าว F_1 ซึ่งปกติจะกระตุ้นการสร้าง ATP กลับมีผลในทางตรงข้ามคือกระตุ้นให้มีการสลายตัวของ ATP (ATP hydrolysis) เพิ่มมากขึ้น เพื่อผลักดันให้เกิด H^+-gradient อีกทางหนึ่ง ผลการกระตุ้นการสลายตัวของ ATP นี้เรียกว่า ATPase activity ในภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำมาก (23) ซึ่งสามารถวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้โดยวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ซึ่งจะกล่าวต่อไป

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{F_1F_o\text{-ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

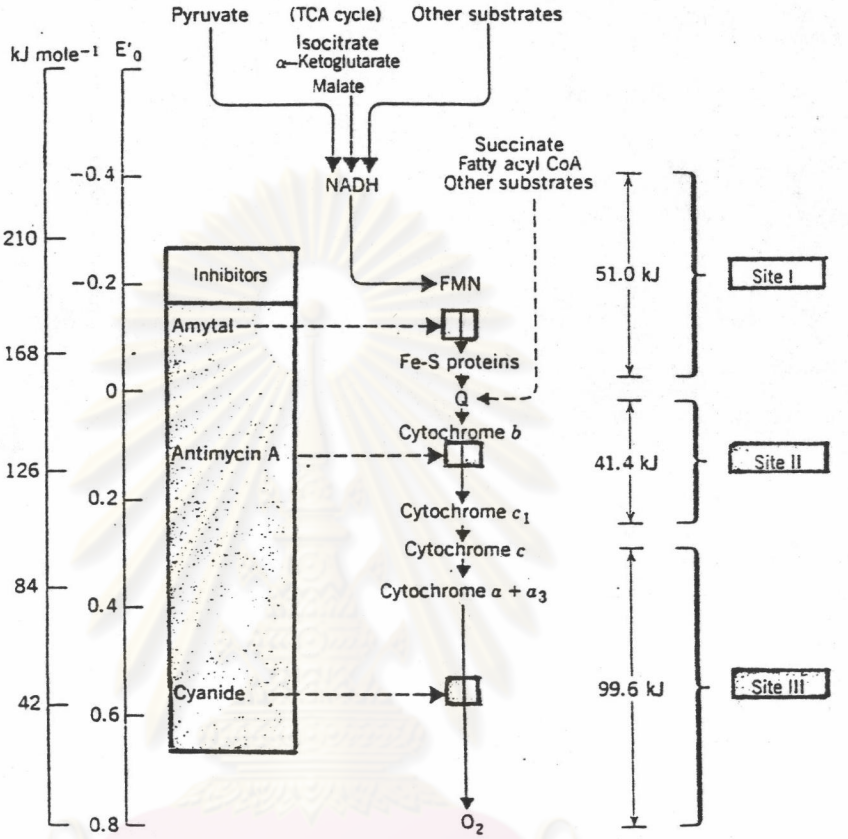
นอกจากสารที่มีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น ยังพบว่ามีสารอื่นๆที่มีผลในแง่ยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ (20) คือ

ประเภทที่ 1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชั่น หรือการสร้าง ATP ที่ได้กล่าวมาแล้วก็คือ oligomycin ซึ่งมีผลยับยั้งที่ F_o ของเอนไซม์ ATPase (20) ตัวอื่นๆได้แก่ atractyloside ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งที่ carrier ที่ใช้ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าไปในไมโตคอนเดรีย คือยับยั้งที่ adenine-nucleotide translocator (21) ทำให้ขาด ADP ในการใช้สร้าง ATP

ประเภทที่ 2 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ โดยที่สารดังกล่าวสามารถมีฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในตำแหน่ง(site) ต่างๆได้อย่างเฉพาะเจาะจง เช่น rotenone ,antimycin และ cyanide ดังรูปที่ 7

ซึ่งจากผลของการยับยั้งที่ตำแหน่งต่างๆที่ต่างกัน จะมีผลต่อลูกโซ่การหายใจต่างกัน เช่น rotenone ที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก FMN ไปยัง Fe-S protein (Iron-sulfur protein) ซึ่งเป็น ส่วนหนึ่งของเอนไซม์ NADH-Q reductase ดังนั้นกรณีที่สับสเตรทชนิด NAD^+-linked substrate

017440



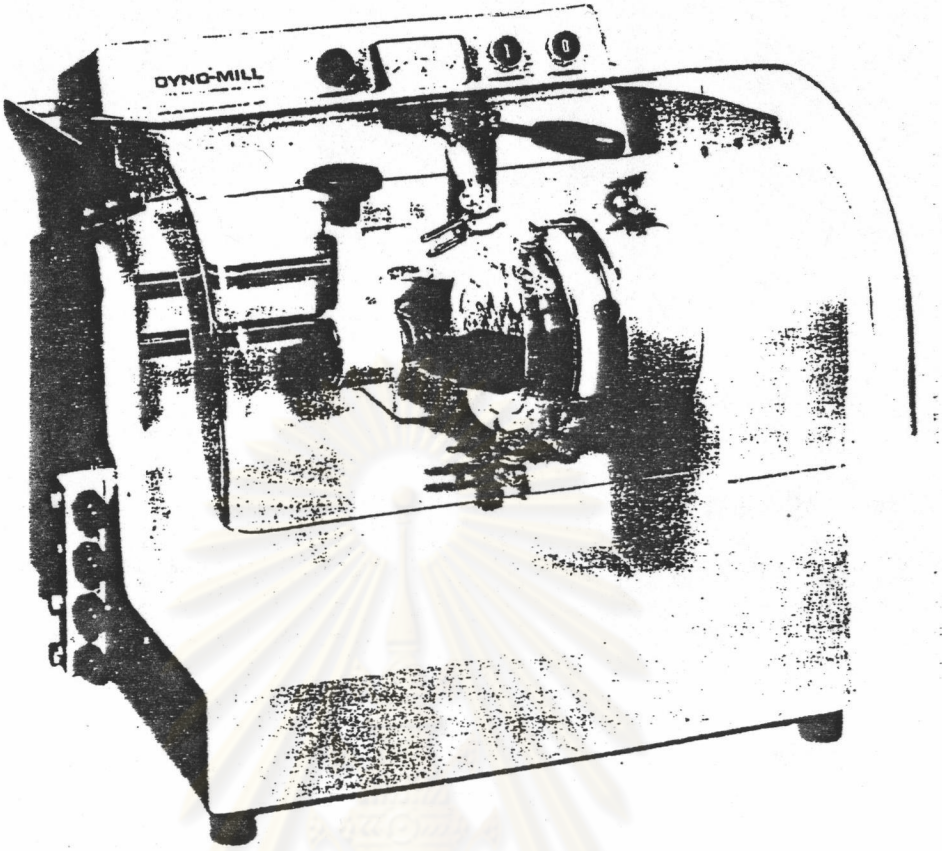
รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rotenone สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ การสร้าง ATP ที่ site I ก็จะไม่เกิดเช่นเดียวกัน (เนื่องจากทั้ง 2 ปฏิกิริยาเป็น couple reaction) แต่ rotenone ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนกรณีที่สับสเตรทเป็น succinate แต่ถ้าใช้ antimycin ซึ่งยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก Cytochrome b ไปยัง Cytochrome c_1 ก็จะได้ผลเช่นเดียวกับ rotenone แต่ต่างจาก rotenone ตรงกรณีที่แม้จะใช้สารตั้งต้นเป็น succinate ก็มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ และในทำนองเดียวกันถ้าใช้สารตั้งต้นเป็น TMPD และ ascorbate antimycin ก็ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ แต่ cyanide สามารถยับยั้งได้ นั่นคือไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม รวมทั้งไม่มีการสร้าง ATP ด้วย (22-24)

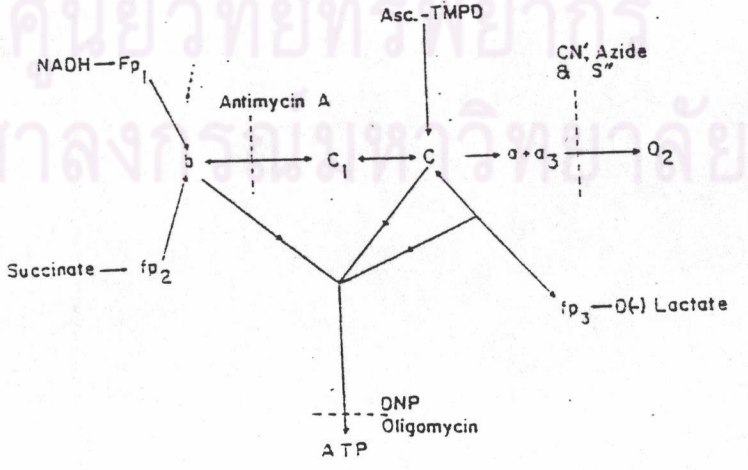
จากฤทธิ์ของสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย ไม่ว่าจะเป็นผลยับยั้งต่อฟอสฟอริลเลชั่นหรือต่อการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจก็ตาม ผลสุดท้ายก็คือไมโตคอนเดรียจะทำงานไม่ได้เช่นเดียวกัน เพราะปฏิกิริยาทั้งสองจะต้องเกิดควบคู่กันไป เมื่อปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งเกิดไม่ได้ ย่อมส่งผลให้อีกปฏิกิริยาหนึ่งเกิดไม่ได้เช่นกัน

ส่วนคุณสมบัติของกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจาก *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ โดยขึ้นกับวิธีการเตรียม (26-27) ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การเตรียมโดยใช้การเขย่าใน Nossal shaker(26) การผ่านสารแขวนตะกอนของเชื้อยีสต์ดังกล่าวในเครื่องมือ French Pressure cell (27) หรือการใช้เอนไซม์ที่เตรียมจาก snail gut(28) หรือเอนไซม์ Lyticase@ (29)หรือเอนไซม์ Zymolase-5000(30) ในการย่อยผนังเซล หรือการเขย่าสารแขวนตะกอนของเชื้อยีสต์ในขวดแก้วธรรมดาร่วมกับ glass bead ขนาดเล็กมากๆ (31) และการเตรียมโดยใช้ Grinding mill โดยมี glass bead อยู่ด้วย ซึ่งจะเป็นเครื่องมือที่ใช้เตรียมได้คราวละมากๆ แต่มีข้อเสียคือมีราคาแพงมาก (รูปที่ 8) (32-33)



รูปที่ 8 Grinding Mill สำหรับทำลายผนังเซลยีสต์ โดยที่เซลจะผสมกับ glass bead ขนาดเล็ก ใน chamber ที่มีน้ำเย็นหล่อเลี้ยงตลอดเวลา

วิถีทางของกระบวนการหายใจของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นพอจะสรุปได้ดังนี้ (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงวิถีทางของลูกโซ่การหายใจของเซลยีสต์

สับสเตรทที่ยีสต์สามารถออกซิไดซ์ได้นั้น จะต่างจากไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น ยีสต์สามารถใช้ NADH (34),α-ketoglutarate,isocitrate, Dและ L -lactate และเอทานอล(28)เป็นสับสเตรทได้ สับสเตรทที่เหมือนกับไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น succinate และ ascorbate+TMPD สารที่มีผลยับยั้งกระบวนการหายใจที่ต่างไปจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก็คือ rotenone และ amytal ไม่มีผลยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นได้ ส่วน antimycin A สามารถยับยั้งการออกซิเดชั่นของ succinate และ NADH ได้ แต่ไม่มีผลยับยั้งต่อ D(-)lactate และ ascorbate + TMPD, สาร KCN,Na_2S และ Na-azide มีผลยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นไม่ว่าจะใช้สับสเตรทใดก็ตาม และการเกิดฟอสฟอริลเลชั่นจำเป็นต้องใช้ ADP เป็นตัวรับ Pi เท่านั้น (33) และการฟอสฟอริลเลชั่นที่ site ต่างๆพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันออกไป คือที่ site 3 75% , site 2 45% แต่ไม่พบว่ามีการฟอสฟอริลเลชั่นที่ site I แต่พบว่ามีการฟอสฟอริลเลชั่นที่ site ที่ใช้สับสเตรทเป็น lactate โดยเกิดระหว่าง flavoprotein และ Cytochrome C (27,33) ส่วนหน้าที่ของเอนไซม์ ATPase (ATPase activity) พบว่ายังคงมีอยู่ โดยที่ Mg^{2+} สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ 3.5 เท่า, DNP(0.1 mM.) และ oligomycin สามารถยับยั้งการสร้าง ATP ได้อย่างสมบูรณ์ (27) แต่พบว่า oligomycin มีผลยับยั้งได้น้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(33) ในด้านคุณภาพของไมโตคอนเดรียซึ่งพิจารณาจากค่า RCI นั้น พบว่าค่า RCI ที่ได้จากการออกซิไดซ์สับสเตรทต่างๆได้แก่ succinate RCIมีค่าประมาณ 2.9(28) หรือ >3 (33) หรือกรณี α-ketoglutarate เท่ากับ 16.7 (28) หรือ 4-6 (33)

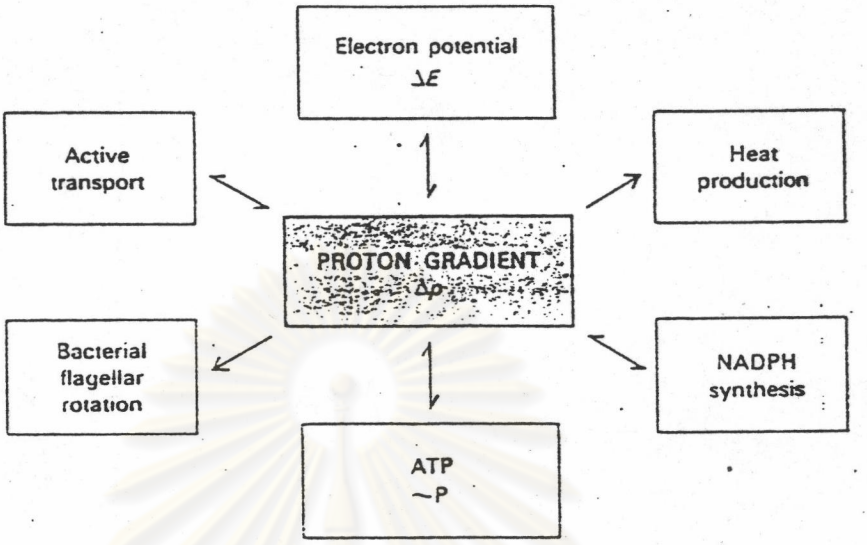
โครงสร้างของเซลยีสต์ที่สำคัญที่มีผลต่อการเตรียมไมโตคอนเดรีย จากเซลยีสต์ก็คือ ส่วนของผนังเซล(cell wall) ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide 2 ชนิดคือ glucan(30-34%) และ mannan(30%) โดยที่ glucan จะมีหน่วยย่อยประกอบด้วย D-glucose ส่วน mannan ประกอบด้วย D-mannose ส่วนประกอบอื่นๆเช่น โปรตีน 6-8%,ไขมัน 8.5-13.5%,chitin 1-2% ซึ่งส่งผลทำให้ผนังเซลมีความแข็งแรงมาก ไม่สามารถทำลายได้ง่ายเช่นเดียวกับเซลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่มี cell wall เช่น เซลตับของหนูขาว นอกจากนี้ยังพบว่าผนังเซลของยีสต์จะเพิ่มความหนาขึ้นได้ตามอายุของเซล ดังนั้นเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลยีสต์ที่มีผนังบางควรใช้เวลาที่น้อยในการเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลยีสต์เพื่อใช้ในการเตรียมไมโตคอนเดรียจะใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง(27-28)

หลักการสำคัญที่ได้เสนอไปแล้วก็คือ การส่งผ่านอิเลคตรอนและการสร้าง ATP เชื่อมโยงโดยมี H^+ gradient การสร้าง ATP ในแบคทีเรียตลอดจนในคลอโรพลาสต์ของพืช ก็เกิดขึ้นได้เนื่องจาก H^+ gradient เช่นกัน(20) นั่นคือ H^+ gradient สามารถทำให้เกิดกระบวนการต่างๆที่อาศัยพลังงานได้เช่นการเกิด active transport ของ Ca^{2+} โดยไมโตคอนเดีย การนำเอากรดอะมิโนบางชนิดและน้ำตาลเข้าสู่เซลแบคทีเรีย การเคลื่อนไหวของ flagella ของแบคทีเรีย การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง NADPH (เรียกปฏิกิริยาดังกล่าวว่า transhydrogenase) (20,22-24) ซึ่งสามารถสรุปความสัมพันธ์ต่างๆได้ดังในรูปที่ 10

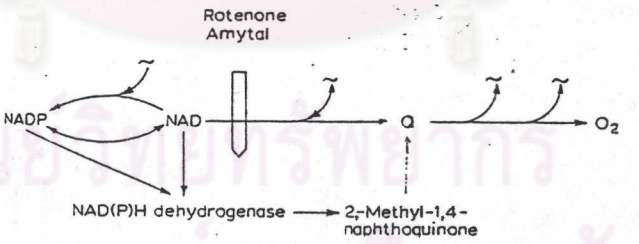
<u>บทบาทบางประการของอนุพันธ์แนพโทควิโนนที่มีต่อออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น</u>

เริ่มมีการศึกษาถึงผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนซึ่งใช้เป็นยาต้านมาลาเรีย (35) ซึ่งพบว่ามีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจโดยยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจากกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น succinate พบว่า จากการเตรียม succinic dehydrogenase-Coenzyme Q ที่บริสุทธิ์ออกมา ถูกยับยั้งโดย 3-alkyl-2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone หลายชนิด โดยที่ alkyl chain ที่มี lipophilicity สูง จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้เพิ่มขึ้นและยังพบว่าอนุพันธ์ของแนพโทควิโนนเหล่านี้จะมีผลยับยั้งที่ Coenzyme Q ซึ่งจากการเติม Coenzyme Q_{10}, Q_7 และ Q_2 และวิตามิน K_1 มีฤทธิ์ขัดขวางการยับยั้งของอนุพันธ์แนพโทควิโนนเหล่านั้น แต่ก็ยังไม่เป็นที่ชี้ชัดแน่นอนว่ามีการออกฤทธิ์ที่ Coenzyme Q เพราะฤทธิ์ในการแข่งขันของ Coenzyme Q_7, Q_2 และวิตามิน K_1 ไม่ได้เป็นการแข่งขันที่เฉพาะเจาะจง นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังได้กล่าวถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์แนพโทควิโนนว่า สามารถจับกับอิออนของโลหะและเกิดเป็น chelates กับส่วนที่เป็นไขมันของเอนไซม์ในกระบวนการหายใจ จึงมีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอน(36)

นอกจากผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนในการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจแล้ว ฤทธิ์ในด้านตรงข้ามคือ ฤทธิ์ในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ เช่น กรณี Coenzyme Q_7 และ Coenzyme Q_{10} มีฤทธิ์กระตุ้นเล็กน้อยในกรณีไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับหนูขาวและหัวใจหมู(37)



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้



รูปที่ 11 แสดงกลไกในการออกฤทธิ์เป็น uncoupler ของ menadione

ส่วนการศึกษาผลของอนุพันธ์ 1,4-naphthoquinones ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยวัดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดโดยวิธี Turbidimetric method พบว่าอนุพันธ์ดังกล่าวมีผลทำให้ lag phase ของเชื้อทั้งสองชนิดยาวขึ้น และยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่วง log phase และจากการวัดความขุ่นของเชื้อในช่วง lag phase พบว่าไม่มีการแตกทำลายของเซลและขนาดของเซลไม่เปลี่ยนแปลง แต่พบว่าขนาดของสารที่ใช้ก่อผลในเชื้อทั้งสองชนิดต่างกัน แม้ว่าจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกันแต่สายพันธุ์ต่างกัน ก็จะตอบสนองต่อสารที่ขนาดต่างกัน ส่วนกรณีชนิดของอนุพันธ์ที่ต่างกันก็จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ต่างกัน โดยได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา(36) คือ ถ้าอนุพันธ์นั้นมี long alkyl chain จะเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และมีหลักฐานยืนยันว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาที่ protein-thiol group ที่บริเวณ endogenous quinones และเมื่อพิจารณาถึงค่า $E_{1/2}$ (half-wave potential) ของอนุพันธ์แนพโทควิโนนที่ใช้ในการศึกษา พบว่า อนุพันธ์ที่มีค่า $E_{1/2}$ เป็นลบ (น้อยกว่า 0 โวลต์) มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ ในทางตรงกันข้ามอนุพันธ์ที่มีค่า $E_{1/2}$ เป็นบวก มีฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งอาจจะเป็นอีกแง่มุมหนึ่งที่จะใช้พิจารณากลไกของอนุพันธ์แนพโทควิโนนที่มีต่อออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น นอกจากผลที่มีต่อการรีดักชั่นของ thiol และ amino group ที่ endogenous quinones ดังได้กล่าวมาแล้ว (38) นอกจากนี้ยังมีการศึกษายืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยทำการศึกษาถึงผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนที่เคยพบมาแล้ว และอนุพันธ์ 1-halogenated-1,4- naphthoquinone ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นใหม่ ถึงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งกลไกในการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นของสารอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ พบว่าระดับของอนุพันธ์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้ออยู่ระหว่าง 20-30 มคก./มล. ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบกับ menadione พบว่ามีทั้งอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์มากกว่าและน้อยกว่า menadione โดยทำการศึกษาในเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *S.aureus*,*E.coli*และ *Shigella sonnei* ซึ่งประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราจะต่างกันไปขึ้นกับทั้งชนิดของแบคทีเรียและชนิดของอนุพันธ์ นอกจากนี้ยังทดสอบถึงผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่ใส่ glutathione หรือ cyteine ซึ่งเป็นสารประกอบที่มี sulphydryl group ซึ่งคาดว่าจะไปทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์แนพโทควิโนนแล้วได้สารที่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราจะทดสอบโดย Diffusion method ใน agar plate ได้ผลในทำนองเดียวกัน และเมื่อพิจารณาค่า $E_{1/2}$ พบว่า อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวมาแล้วมีค่า - $E_{1/2}$ อยู่ระหว่าง 163-307 หรือ 314-536 มิลลิโวลต์ ซึ่งคาดว่ากลไกในการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับที่เคยทราบกันมาแล้วคือ เป็นตัวรับอิเลคตรอนแข่งกับ Coenzyme Q หรือ menadione (40)

ที่สำคัญอย่างยิ่งในด้านกลไกการออกฤทธิ์เป็นอันดับปลิงของ menadione ในกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น เมื่อใส่ menadione ลงในไมโตครอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว จะมีการออกซิไดซ์ NAD(P)H ในกระบวนการหายใจอีกเส้นทางหนึ่งซึ่ง amytal และ rotenone ไม่สามารถขัดขวางการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ อิเลคตรอนดังกล่าวจะส่งต่อให้ menadione ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอน(electron acceptor) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อได้โดย Coenzyme Q และส่งต่อไปให้ออกซิเจนในที่สุด และยังพบว่าฤทธิ์ในการเป็นอันดับปลิงของ menadione อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity เล็กน้อย ซึ่งฤทธิ์นี้ถูกยับยั้งโดย amytal และ dicoumarol ที่ความเข้มข้นต่ำๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ในขณะที่มี menadione อยู่จะมีการส่งผ่านอิเลคตรอนเป็นวัฏจักรคือมีการส่งผ่านอิเลคตรอนย้อนกลับจาก Coenzyme Q ไปยัง NAD^+ ซึ่งจะส่งผลให้มีการออกซิไดซ์ NADH โดยเอนไซม์ NAD(P)H dehydrogenase และ menadione โดย Coenzyme Q ตามลำดับ (ดังรูปที่ 11) ซึ่งการส่งอิเลคตรอนย้อนกลับดังกล่าวต้องอาศัยพลังงานแทนที่จะสร้างพลังงาน เมื่อมีการส่งผ่านอิเลคตรอน นั่นคือสุดท้ายจะก่อผลให้เกิดอันดับปลิงของออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น (39)

ในการศึกษานี้ยังศึกษาผลของ menadione ที่มีต่อการออกซิเดชั่นของ succinate ในกรณีที่มี oligomycin โดยศึกษาในไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากหนูขาว พบว่า menadione มีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนแม้ว่าจะมี oligomycin อยู่ นั่นคือมีฤทธิ์อันดับปลิงและพบว่า rotenone จะยับยั้งฤทธิ์ดังกล่าวได้ (39)

การศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ menadione และ 2,3-dimethylnaphthoquinone ต่อปฏิกิริยา energy-coupling ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากหัวใจวัว พบว่า เมื่อ incubate menadione ขนาด 80 มค.โมล่าร์ กับไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ พบว่า DNP ซึ่งเป็น uncoupler ไม่สามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้ แต่ถ้า incubate กับ 2,3-dimethylnaphthoquinone ในขนาด

เดียวกัน ไม่เกิดผลดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า การหายใจใน state 4 ที่เป็น rotenone-sensitve จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงคือมีค่าประมาณ 20-30% เมื่อมี menadione อยู่ แต่จะเพิ่มขึ้นจาก 40 เป็น 65% เมื่อมี 2,3-dimethylnaphthoquinone อยู่ เมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที แต่ถ้าเติม menadione ลงในไมโตคอนเดรียทันทีที่อยู่ใน state 4 จะพบว่าการหายใจนั้นไม่ sensitive ต่อ cyanide แต่พบว่าส่วนของ cyanide-sensitiveจะเพิ่มเป็น 35% เมื่อ incubate ต่อไปนาน 40 นาที ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดเฉพาะในกรณีที่ทำกับไมโตคอนเดรียที่เป็น tightly-couple ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ไม่sensitive ต่อ cyanide รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของส่วนที่เป็น cyanide-sensitive เนื่องมาจากการลดลงของผลของ menadione เอง ส่วนกรณีที่ใช้ 2,3-dimethylnaphthoquinone พบว่าการหายใจที่เป็น cyanide-sensitive จะคงที่ที่ประมาณ 35% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์เหล่านี้สามารถรับอิเลคตรอนและส่งผ่านอิเลคตรอนไปให้ออกซิเจนได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านระบบ Cytochrome และปัจจัยบางอย่างที่ส่งเสริมให้ฤทธิ์ของอนุพันธ์เหล่านี้ค่อยๆหมดไปเนื่องมาจากอนุพันธ์เหล่านี้ไปทำปฏิกิริยากับ thiol group ที่สำคัญของระบบที่เกี่ยวกับการเกิด energy-coupling ซึ่งอยู่ระหว่างลูกโซ่การหายใจและตัวกลางชนิด non-phosphorylated high energy ซึ่งผลักดันให้เกิดปฏิกิริยา energy-coupling (41)

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของอนุพันธ์เบนโซควิโนน (benzoquinone derivatives) และอนุพันธ์แนพโทควิโนน ต่อการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์ 2 ชนิด ในกระบวนการหายใจคือ NADH-oxidase และ succinoxidase และผลต่อเซลมะเร็ง(neoplastic cell) พบว่าระบบเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ตอบสนองต่ออนุพันธ์ของเบนโซควิโนนมากกว่าอนุพันธ์แนพโทควิโนน ชนิดของอนุพันธ์ที่มี side chain เป็น pentadecyl จะยับยั้งได้น้อยกว่าอนุพันธ์ที่ไม่มี alkyl side chain ส่วนผลต่อการทำงานของเซลมะเร็ง ไม่พบว่ามีอนุพันธ์ใดเลยที่มีผลต่อเซลมะเร็งดังกล่าว(42)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของ อนุพันธ์ hydroxynaphthoquinone ในการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเชื้อโปรโตซัว *Eimeria tenella* พบว่าอนุพันธ์ดังกล่าวมีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเชื้อดังกล่าวได้อย่างมาก และอย่างเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ คือความเข้มข้นของสารที่ใช้อยู่ในระดับ 10^{-10} - 10^{-11} M. ตำแหน่งที่มีการยับยั้งโดยอนุพันธ์ดังกล่าวมี 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งแรกอยู่บริเวณ

Ubiquinol-Cytochrome C reductase และตำแหน่งที่ 2 อยู่ที่ NADH และ succinate-Ubiquinone reductase โดยที่การยับยั้งที่ตำแหน่งที่หนึ่ง จะเฉพาะเจาะจงเฉพาะกับเชื้อ *E. tenella* ส่วนตำแหน่งที่สองมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียหลายชนิด คือมีผลต่อทั้งไมโตคอนเดรียที่เตรียมจาก *E. tenella* และตับไก่ชนิด *Gallus gallus* โดยลักษณะของการยับยั้งที่ตำแหน่งที่สองต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับไก่ชนิดหลังนี้ สามารถกลับเป็นปกติได้โดยการเติม Ubiquinone-2-analogue คือ 6-decyl-2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone แต่กรณีของเชื้อ *E. tenella* ไม่สามารถกลับเป็นปกติได้ (43)

ผลการวิจัยที่ผ่านมายืนยันได้ชัดเจนว่า ทั้งกรณีสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์หรือคลอโรฟอร์มตลอดจนสารบริสุทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลในการฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด ซึ่งกลไกที่อาจเป็นไปได้ทางหนึ่งในการเป็นสารฆ่าเชื้อราก็คือ ผลต่อกระบวนการหายใจ อันเป็นแหล่งที่ให้พลังงานในการดำเนินกิจกรรมของเซล ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone และอนุพันธ์บางตัวของแนพโทควิโนนที่มีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ในด้านความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการฆ่าเชื้อราในหลอดทดลอง(in vitro) และฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวเทียบกับ Coenzyme Q ซึ่งเป็นตัวรับอิเลคตรอนที่สำคัญในกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย อันเป็นแหล่งสร้างพลังงานของเซล พบว่ามีส่วนสำคัญคือ Quinone group ที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 1) ประกอบกับมีการค้นพบว่า สารที่มีสูตรโครงสร้างในกลุ่มของอนุพันธ์ naphthoquinone หลายชนิดทำหน้าที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกระบวนการหายใจด้วย โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนแทน Coenzyme Q ทำให้การสร้างพลังงานเป็นไปไม่ได้ สุดท้ายจะทำให้เซลของสิ่งมีชีวิตขาดพลังงานและตายในที่สุดจึงมีการนำมาใช้เป็นยาต้านมาลาเรียในระยะแรก (17) ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquine จะสามารถมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราโดมีกลไกการออกฤทธิ์ที่การทำงานของไมโตคอนเดรียหรือไม่ โดยเน้นศึกษาเฉพาะผลต่อลูกโซ่การหายใจหรือ การส่งผ่านอิเลคตรอนในกระบวนการหายใจ (respiratory or electron transport chain) และออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น รวมทั้งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ที่เกิดขึ้นที่บริเวณผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะใช้ไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาวเป็นหลัก รวมทั้งไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลของ *Saccharomyces cerevisiae*

อันเป็นตัวแทนในการศึกษาผลต่อเชื้อราและเป็นการศึกษาเพื่อสนับสนุนผลที่มีต่อไมโตคอนเดรีย ที่เตรียมจากตับของหนูขาว ตลอดจนผลโดยตรงต่อการใช้ออกซิเจนของเซลยีสต์ดังกล่าว โดยตรง (intact cell) แต่ผลการวิจัยที่ได้ครั้งนี้อาจจะไม่ใช่คำตอบที่ครบถ้วนสมบูรณ์ ถึงกลไกในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งอาจจะออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าเชื้อราโดยกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆที่จะกล่าวไปแล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย