บทที่ 1

บทนำ

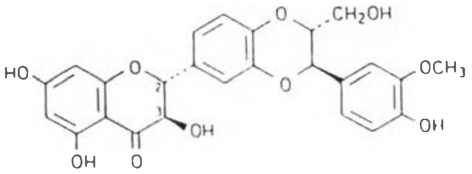
Flavonoids เป็น สารที่สกัดได้จากพืชต่างๆ ปัจจุบันได้มีการค้นพบสารประเภทนี้กันมากและได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีต่อระบบต่างๆ พบว่า ผลของสารพวกนี้ต่อเอนไซม์ต่างๆที่ได้ทำการศึกษามีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของโมเลกุลของสารพวก flavonoids ดังแสดงในตารางที่ 1 (1)

Silymarin เป็นสาร flavonoid ที่สกัดได้จากต้น Silybum marianum (L.) Gaertn. (ชื่อพ้อง คือ Carduus marianus) ซึ่งเป็นพืชจำพวก milk thistle (2,3) อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีต้นกำเนิดอยู่ในยุโรปตอนใต้ , รัสเซียตอนใต้ , แถบเอเชียไมเนอร์ , และแอฟริกาเหนือ พบได้ใน อเมริกาเหนือ , อเมริกาใต้ , ออสเตรเลียตอนใต้ , และยุโรปตอนกลาง ส่วนที่นำมาผลิตเป็นยานั้นมาจากเยอรมัน และมีส่วนที่นำเข้าจาก อาร์เจนตินา , จีน , โรมาเนีย และ ฮังการี พืชชนิดนี้ได้ถูกนำใช้ในทางการแพทย์มาเป็นเวลานานแล้วโดยใช้ในรูปของสมุนไพร นำส่วนผลมาใช้ บดเป็นผง ชงกับน้ำร้อนหรือน้ำเย็น รับประทานวันละ 12-15 กรัม (เทียบเท่ากับ silymarin 200-400 mg) (3)

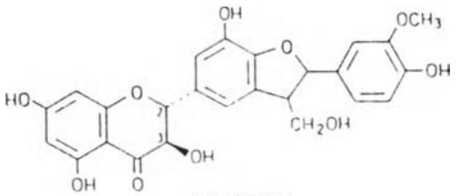
ต่อมาในปี 1968 จึงได้มีการสกัดพบสารกลุ่ม flavonoid compounds ที่มีฤทธิ์ ในการป้องกันตับ (hepatotropic effect) (2) ซึ่งต่อมาให้ชื่อว่า Silymarin ซึ่งเป็นสารผสม (mixture) ของ isomers 3 ชนิด คือ Silybin (หรือ Silibinin หรือ Silybinin) เป็นส่วนประกอบหลัก, Silychristin และ Silydianin (2,3) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 (molecular formular : $C_{25}H_{22}O_{10}$ MW. 482.45) isomers ทั้ง 3 มี phenylchromanon (หรือ phenylchromon) skeleton ต่อกับ 1 molecule ของ coniferyl alcohol (ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของ lignan หรือ lignin) ต่อเข้าที่ตำแหน่งต่างกันโดย oxidative coupling อาจเรียกรูปแบบโครงสร้าง molecules แบบนี้ว่า flavonolignans (3,4)

ตารางที่ 1 แสดงส่วนของโครงสร้างโมเลกุลของสารพวก flavonoids ที่มีผลต่อเอนไซม์ต่างๆ

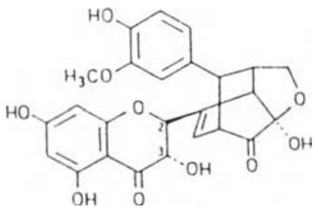
Enzyme	Part of flavonoid molecule likely to interact with enzyme
β-Glucuronidase	Carbohydrate
β-Galacturonidase	Carbohydrate
Hyaluronidase	Carbohydrate
Alkaline phosphatase	Phenyl ring
Arylsulphatase	Phenyl ring or benzopyrone ring
DOPA decarboxylase	Phenyl ring
Lipases	Phenol (Me^{2+} chelator)
ATPase	Benzopyrone ring
c-AMP phosphodiesterase	Benzopyrone ring
Catechol-O-methyltransferase	Phenyl ring
Aryl hydroxylase	Benzopyrone ring
Aldose reductase	Benzopyrone ring
Proline hydroxylase	Benzopyrone ring



Silybin



Silychristin



Silydianin

รูปที่ 1 โครงสร้างของ Silybin , Silychristin และ Silydianin

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

(Pharmacological action)

Membrane effect

Silibinin มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับเซลล์เมมเบรน และปิดกั้น binding sites หรือ transport systems ในเซลล์ตับ โดยการปิดกั้น binding sites นี้มันจะป้องกันการ uptake ของสารแปลกปลอม (xenobiotics) เช่น fungal toxins (5) โดยจะไม่รบกวนกระบวนการขนส่งที่ต้องควบคุมด้วย physiological gradients หรือ active transport เข้าหรือออกจากเซลล์ ปฏิกิริยาโดยตรงของ silibinin กับเมมเบรน พบได้ใน rat liver microsomes และใน synthetic monomolecular lipid layers (6,7)

การศึกษาอื่นๆได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่ม ความต้านทานของผนังเซลล์ (membrane resistance) อย่างหนึ่งก็คือ ลดการสูญเสียส่วนประกอบภายในเซลล์ (cell constituents) ทั้งจากการศึกษานอกร่าง (in vitro) คือ ใน isolated perfused rat liver , ใน isolated hepetocytes หรือ isolated liver cell membranes และทั้งจากการศึกษาในร่าง (in vivo) (8-11)

ในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารที่เป็นพิษต่อตับ (CCL_4 ,praseodymium nitrate , galactosamine , microcystin-LR หรือ paracetamol) silymarin จะลดการหลั่งของเอนไซม์จากตับเข้าสู่ซีรั่ม (13-17) นอกจากนี้มีหลักฐานว่า silibinin มีฤทธิ์ยับยั้ง phosphodiesterase ซึ่งจะทำให้ การสลายของ cAMP ช้าลง ดังนั้นจึงมีส่วนช่วยทำให้เกิดฤทธิ์ membrane stabilization (18)

antiperoxidaive และ metabolic properties ของ silibinin ยังเกี่ยวข้องกับการเกิด membrane stabilizing effect (19,20) เพราะว่าฤทธิ์ในการจับกับ radical ทำให้ silibinin สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reactions) ของ lipid peroxidation ที่ทำให้เกิดขึ้นโดย toxic radicals และถ้าให้ในเวลาที่เหมาะสมก็จะสามารถป้องกัน membrane lesions ได้มาก (21) และยังมีอิทธิพลบางอย่างต่อ phospholipid turnover ดังนั้นจึงมีส่วนช่วยในการรักษาความสมบูรณ์ของเมมเบรน (membrane integrity)

Antiperoxidative action

มีสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับจำนวนมากที่ทำให้เกิด lipid peroxidation ในตับซึ่งจะทำลาย cell membrane และมีผลกระทบต่อ metabolic processes เนื่องจากในโครงสร้างมีกลุ่ม phenolic ทำให้ silibinin มีคุณสมบัติในการจับ radicals และออกฤทธิ์เป็น antioxidative agents (22) ตัวอย่างเช่น silbinin ยับยั้งการหลั่งของ malonyldialdehyde (23-25) และเพิ่มการ uptake ของ oxygen ที่ถูกทำให้เกิดโดย peroxiadtive agents (19) และเพราะมีฤทธิ์ในการจับ radical ของ silibinin มันจึงลดปริมาณการใช้ glutathione ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นในการกำจัดสารพิษในเซลล์ตับ (24 -26)

จากการศึกษานอกร่าง (in vitro)พบว่า silibinin ยับยั้ง peroxidizing enzymes เช่น lipoxygenase ด้วย (27,28) ดังนั้นจึงยับยั้ง peroxidation ของ fatty acids เช่น linoleic acid และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพใน membrane lipids

Metabolic effects

การกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน (Stimulation of protein biosynthesis)

Silibinin เพิ่มการทำงาน ของ RNA polymerase I (polymerase A) ในนิวเคลียส กระตุ้น transcription rate โดยเฉพาะ จึงเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ของ rRNA ในเซลล์ตับ ผลจากการเร่งสังเคราะห์ rRNA เป็นการเพิ่มจำนวนของ ribosomes ในเซลล์ดังนั้นจึงเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน (29,30)

การส่งเสริมให้เกิดการทดแทนเซลล์หลังจากเซลล์ตับถูกทำลาย

(Promotion of cell regeneration)

การเพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ของ hepatocytes คือสิ่งสำคัญในการแบ่งตัวของเซลล์ตับเพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลาย (liver cell regeneration) การเพิ่มการสังเคราะห์ rRNA และโปรตีน เท่ากับเป็นการเร่งให้เซลล์ regenerate ได้เร็วเมื่อได้รับสิ่ง

กระตุ้นที่จะทำให้เกิด liver damage โดยอาจจะได้รับสารที่เป็นพิษต่อตับ (30) หรือจากการตัดตับ (partial hepatectomy) (31,32) ส่วน ใน malignant cells (hepatoma , Hela และ Burkitt lymphoma cell cultures) silibinin ไม่มีผลต่อ replication หรือ transcription rates ดังนั้น จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเนื้องอก (33)

ผลรวมของกลไกการออกฤทธิ์ของ silymarin ซึ่งได้แก่ - ปฏิกิริยา (ทั้งภายในและภายนอก) กับผนังเซลล์ , antiperoxidative action และการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน เป็นที่มาของฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาที่ได้มีการนำ silymarin มาใช้ยารักษาโรคเกี่ยวกับตับ

คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics)

<u>การศึกษาในสัตว์ทดลอง (Animal pharmacokinetics)</u>

การศึกษาในหนูขาว (rats) และสุนัข พบว่าการดูดซึมของยามีมากกว่า 50% ของขนาดยาที่ให้ทางปาก ทราบจากการวัดปริมาณที่ขับออกทางน้ำดี และเพราะว่ายามี first-pass effect และมีการขจัดทางน้ำดี จึงมีระดับยาในเลือดที่ต่ำ (สูงที่สุดเท่ากับ 0.8% ของขนาดที่ให้) และการขจัดยาทางไตต่ำ (สูงสุดเท่ากับ 5-12% ของยาที่ถูกดูดซึม) เวลาที่ใช้เพื่อให้ถึงระดับยาในเลือดสูงสุดเท่ากับ 0.5-1 ชั่วโมง ภายใน 24 ชม. 10% ของขนาดยาที่ให้ หรือ 20-30% ของ silibinin ถูกขับออกทางน้ำดีและถูกดูดซึมกลับผ่าน enterohepatic circulation ไปยังตับ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด prolonged retention ของ silibinin ภายในร่างกายและความเข้มข้นสูงสุด (high activity concentrations) ของยาอยู่ที่ตับ การขับถ่ายทางน้ำดี (biliary excretion) ถึงระดับสูงสุดภายใน 1 ชม. หลังจากให้ยาทางปากและถูกขจัดอย่างสมบูรณ์หลังจากนั้น 30 ชม.

Silibinin ถูกขจัดทางน้ำดีเกือบทั้งหมดในรูปของ pure glucoronide conjugate และ double conjugate กับ sulphuric acid และ glucoronic acids และสามารถตรวจพบ unconjugated silibinin ปริมาณน้อยในปัสสาวะ (34)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในคน (Human pharmacokinetics)

Silibinin ถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วหลังจากให้ยาทางปากหลังจากให้ 560 mg. silymarin (240 mg silibinin) ความเข้มข้นของระดับยาในเลือดสูงสุดเท่ากับ 340 µg /l และถึงระดับสูงสุดที่ 1.3 ชม. ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 6.32 ชม. (35) และจากการศึกษานอกกาง (in vitro) พบว่า silibinin จับกับ plasma protein 90-95% (34)

การขจัดยาทางไตของ silibinin ต่ำ ใน 24 ชม. แรก ระหว่าง 1 และ 2.1% ของขนาด silibinin ถูกขับออกทางปัสสาวะ ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดทางน้ำดีเท่ากับ 4-5 ชม. เป็นเวลาที่เทียบกับค่าครึ่งชีวิตในเลือด ความเข้มข้นสูงสุดในน้ำดีเฉลี่ยเท่ากับ 70 µg /ml ภายใน 24 ชม. 7-15% ของขนาดยาที่ให้สามารถตรวจพบได้จากน้ำดี อย่างไรก็ตาม เนื่องจากปัญหาที่ยุ่งยากในการเก็บ น้ำดีเพียงประมาณ 1/3 ของน้ำดีที่ถูกขับออกเท่านั้นที่เก็บได้ จึงเป็นเหตุผลที่สันนิษฐานได้ว่าปริมาณของ silibinin ที่ถูกขับออกทางน้ำดีความจริงมีค่ามากกว่าที่วัดได้ 2-3 เท่า การขจัดออกทางน้ำดีของ silibinin สามารถประมาณได้เท่ากับ 20-40% ของขนาดยาที่ให้ (34)

การศึกษาทางพิษวิทยา (Toxicology)

ความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity)

silymarin ได้รับการพิสูจน์ว่าไม่มีพิษ (practically nontoxic) ในหนู rats และ mice ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ที่สามารถทนต่อขนาดยาที่ให้ทางปากในขนาด 2,500 หรือ 5,000 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่จะสามารถรับได้โดยไม่แสดงอาการ (34)

ความเป็นพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity)

การศึกษาในหนู พบว่าหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียได้รับ silymarin ในขนาด 50, 500 และ 2,500 mg/kg ในอาหาร เป็นเวลานาน 12 เดือน การตรวจเลือดและตรวจทางชีวเคมีพร้อมด้วยการวิเคราะห์ปัสสาวะ และการตรวจหลังจากทำให้ตายแล้ว พบว่าไม่มีพิษโดยเฉพาะ (specific toxic effects) (34)

การศึกษาในสุนัข พบว่าเมื่อให้ silymarin ในขนาด 60, 600 และ 1,200 mg/kg ทางปากแก่สุนัขทั้งเพศผู้และเพศเมีย การตรวจทางห้องปฏิบัติการและการตรวจสอบหลังตายแสดงให้เห็นว่าไม่มีอาการข้างเคียงเนื่องมาจากยา (34)

<u>ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นก่อนเกิด (Antenatal toxicity)</u>

การศึกษาในหนูขาว โดยการให้ silymarin ในขนาด 50, 500 และ 2500 mg/kg ผ่านทางกระเพาะอาหาร (intragastric)แก่หนูขาวเพศเมียที่ตั้งครรภ์และอยู่ในช่วง critical phase ของการสร้างอวัยวะ (organogenesis) พบว่าไม่มีฤทธิ์ทำให้ตัวอ่อนตาย (embryolethal effects) และไม่เกิดลูกวิรูป (teratogenic effects)

การศึกษาในกระต่ายโดยให้ silymarin ในขนาด 20, 200 และ 1000 mg/kg ผ่านทางหลอดอาหาร (oesophageal tube) แก่กระต่ายเพศเมียที่ตั้งครรภ์ได้ 6-18 วัน พบว่าไม่มีพิษในแม่ และใน fetuses ไม่มีการเกิดหรือสร้างที่บกพร่อง (malformations) (34)

<u>ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นก่อนเกิดหรือหลังคลอด (Perinatal and postnatal toxicity)</u>

ให้ silymarin ในขนาด 50, 500 และ 2,500 mg/kg ทุกวันทางหลอดอาหารแก่หนูขาวเพศเมียในช่วงการตั้งครรภ์ระยะที่สามและให้ตลอดจนกระทั่งสิ้นสุดการให้นม (lactation) พบว่าไม่มีอาการที่ไม่พึงประสงค์ต่อการคลอดลูก (parturition), และต่อประสิทธิภาพในการเลี้ยงลูกของตัวเมีย หรือต่อการพัฒนาการหลังเกิดของหนูขาว (34)

<u>การทดสอบการผสมพันธ์ (Fertility testing)</u>

ให้ silymarin ในขนาด 50, 500 และ 2,500 mg/kg ทางหลอดอาหารแก่หนูขาวเพศผู้และเพศเมีย (F_0 generation) การให้ยานี้แก่หนูตัวผู้เป็นเวลา 63 วัน และให้แก่เพศเมียเป็นเวลา 14 วัน ก่อนการจับคู่เพื่อผสมพันธ์ (mating) การให้ยาแก่เพศเมียจะให้ต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการให้นม ต่อมาภายหลังการจับคู่เพื่อผสมพันธ์ของ F_1 generation ซึ่งไม่ได้รับยา พบว่ายาไม่มีผลต่อระบบสืบพันธ์ (reproduction) (34)

การทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ (Mutagenicity testing)

การศึกษาโดยตรงถึง genotoxic action พบว่าให้ผลลบ (negative results) (34)

การศึกษาทางคลีนิก

1. การใช้ silymarin ในผู้ป่วยที่มีภาวะ toxic liver damage จาก alcohol

โดยการให้ยา silymarin ในขนาด 210-420 mg ต่อวันแก่ผู้ป่วยที่มี toxic liver damage จาก alcohol ซึ่งได้รับการตรวจพบว่าเอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) , glutamate pyruvate transaminase (GPT) และ γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) สูงมากผิดปกติ ตรวจเนื้อเยื่อ (biopsy) พบความผิดปกติทางพยาธิสภาพชัดเจน แต่หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับ silymarin ติดต่อกันเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป พบว่า parameters ต่างๆที่ใช้ในการประเมินหน้าที่ของตับ เช่น GOT , GPT และ γ-GT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (34,37) ความผิดปกติทางพยาธิสภาพที่เคยตรวจพบมีสภาพดีขึ้น พร้อมๆกับอาการทางคลีนิกของผู้ป่วย เช่น เบื่ออาหาร (anorexia), ปวดท้อง (upper abdominal pain) , และ อ่อนเพลีย (lassitude) ก็บรรเทาลงด้วย

2. การใช้ silymarin ในผู้ป่วยที่มีภาวะ liver damage ที่เกิดจากยา

ในผู้ป่วยที่เป็นโรคจิต หรือ โรคที่เกี่ยวกับระบบประสาท ซึ่งต้องได้รับ psychoactive drugs หรือ anticonvulsants (ส่วนใหญ่เป็น phenothiazine derivatives , diphenyl hydantoin , pirimidines และ barbiturates) ซึ่งเป็นยาที่ทำอันตรายต่อตับ และเมื่อตรวจหน้าที่ของตับพบว่าค่าดัชนีต่างๆจากซีรั่มที่บอกถึงสภาพของตับ เช่น GOT , GPT, bilirubin , bromsulphalein test (เป็นการทดสอบการทำงานของตับ โดยฉีด bromsulphalein เข้าเส้นเลือด แล้วดูการขจัดสารนี้ออกจากเลือด) มีค่าสูงผิดปกติ และเมื่อให้ยา silymarin ขนาด 105-315 mg ต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าค่าต่างๆที่ผิดปกตินั้นกลับเข้าสู่ระดับปกติอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าจะยังคงได้รับ psychoactive drugs อย่างต่อเนื่อง (34)

ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาวัณโรคด้วย isoniazid (INH) รวมกับ ethambutol มีค่าเอนไซม์ transaminases และ alkaline phosphatase สูงกว่าระดับปกติ เมื่อให้ silymarin ในขนาด 210 mg ต่อวัน เสริมให้แก่ผู้ป่วยเป็นเวลา 3 เดือน ตรวจพบว่า ค่าเอนไซม์ transaminases และ alkaline phosphatase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (34)

3. การให้ silymarin เพื่อเป็นการรักษาพยุงอาการ (supportive treatment) ในโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis)

การรักษาด้วย silymarin ขนาด 420 mg ต่อวัน แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ทั้งแบบ chronic persistent hepatitis และ chronic aggressive hepatitis โดยให้การรักษาตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไป พบว่า serum albumin เพิ่มขึ้นพร้อมกับค่า biochemical parameters ที่บ่งบอกถึงการทำงานของตับ และ การตรวจเนื้อเยื่อซึ่งตัดสินโดยอาศัยลักษณะของ parenchymatous lesions , การตายของเซลล์ตับ และ fibrosis แตกต่างๆจากผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาอย่างมีนัยสำคัญ (34)

4. การให้ silymarin เพื่อเป็นการรักษาพยุงอาการ (supportive treatment) ในโรคตับแข็ง (hepatic cirrhosis)

ได้มีการทำการทดสอบผลของ silymarin ที่ให้แก่ผู้ป่วยที่เป็นตับแข็ง โดยให้ผู้ป่วยได้รับยา silymarin ครั้งละ 140 mg วันละ 3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 2 ปี พบว่าอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา silymarin มีมากกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ได้รับยาอย่างมีนัยสำคัญ และในผู้ป่วยที่รอดชีวิต ผู้ป่วยที่ได้รับยา silymarin มีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา โดยพิจารณาจาก biochemical parameters ต่างๆที่ใช้ในการประเมินหน้าที่ของตับ ซึ่งได้ทำการตรวจทุก 3 เดือนตั้งแต่เริ่มทำการทดสอบ (38,39)

ขนาดและการบริหารยา (Dosage and administration)

Silymarin มีข้อบ่งใช้ สำหรับ acute hepatitis ทุกชนิด และ toxic metabolic liver damage (fatty liver hepatitis , cirrhosis) โดยขนาดเริ่มต้นและในกรณีมีอาการรุนแรงรับประทานครั้งละ 140 mg. วันละ 3 ครั้ง ในขนาดประคับประคอง (maintenance dose) รับประทานครั้งละ 70 mg. วันละ 3 ครั้ง

อาการข้างเคียง (Side effect)

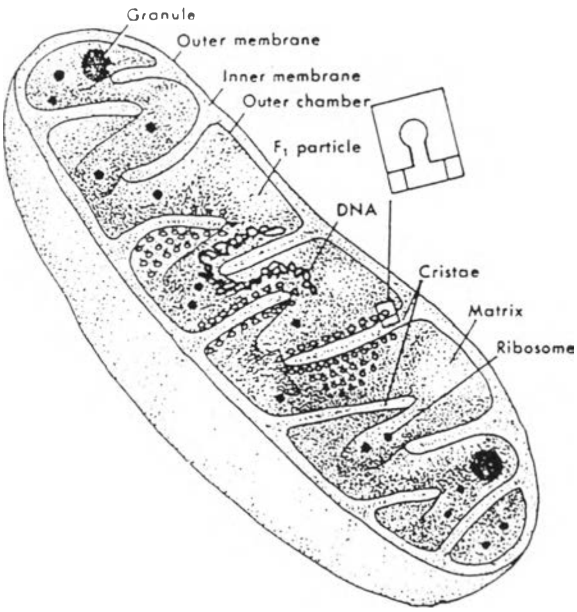
เท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันพบเพียงอาการท้องร่วงอย่างอ่อน (mild laxative effect) (34)

การหายใจและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชั่น ของไมโตคอนเดรีย

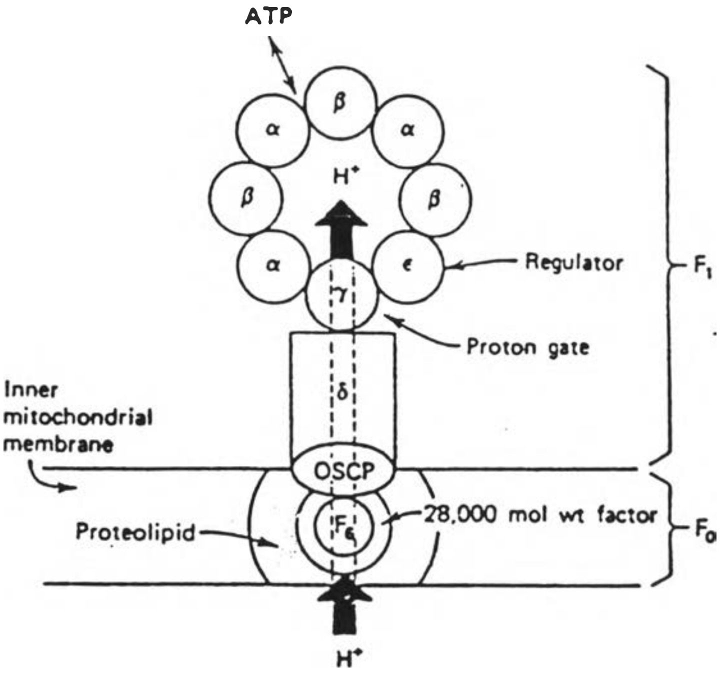
(Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญภายในเซลล์ จัดเป็นแหล่งสร้างพลังงาน (cellular powerhouse) เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิสม และปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียจะให้พลังงานออกมา เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) (40)

จำนวนและรูปร่างของไมโตคอนเดรียในหนึ่งเซลล์จะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเซลล์ อาจจะมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical) จนถึงแท่งยาว (elongated rod or filament) ในเซลล์ตับ ตับอ่อน และไต ซึ่งไมโตคอนเดรียลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) อย่างค่อนข้างอิสระ รูปร่างไมโตคอนเดรียจะมีลักษณะคล้ายไส้กรอก โดยมีความยาวประมาณ 3 ไมครอน และความกว้างประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน ผนังไมโตคอนเดรียประกอบด้วยเมมเบรน 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (outer membrane) และชั้นใน (inner membrane) ส่วนผนังเมมเบรนชั้นในที่มีการพับ (fold) และยื่นเข้าไปในช่องภายในไมโตคอนเดรียเรียกว่า cristae ช่องภายในไมโตคอนเดรียประกอบด้วยสารที่มีลักษณะเป็น semi-fluid ซึ่งเรียกว่า matrix (รูปที่ 2) คุณสมบัติของผนังชั้นนอกและผนังชั้นในแตกต่างกัน โดยที่ผนังชั้นนอกจะ permeable ต่อสารโมเลกุลเล็กและอิออนต่างๆเป็นส่วนใหญ่ ในทางตรงกันข้าม ผนังชั้นในซึ่งมีพื้นที่มากกว่า จะไม่ permeable ต่อสารต่างๆ ดังนั้นการผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ไมโตคอนเดรียจำเป็นต้องอาศัย โปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (41) ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2 หรืออาจเกิดโดยอาศัย shuttle system (42) เมมเบรนชั้นในยังเป็นที่ตั้งของลูกโซ่การหายใจ (electron transport chain หรือ respiratory chain) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง ATP นอกจากนี้แต่ละส่วน (compartments) ของไมโตคอนเดรียจะประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่แสดงถึงหน้าที่เฉพาะของแต่ละส่วนดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนใน matrix นอกจากประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆของวัฏจักรเครบส์แล้วยังมี DNA , ribosomes และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของ ยีน (40)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของไมโตคอนเดรีย
(De Robertis and De Robertis, 1987)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase
(F_oF_1-ATPase)

ตารางที่ 2 แสดงถึง mitochondrial membrane transport systems

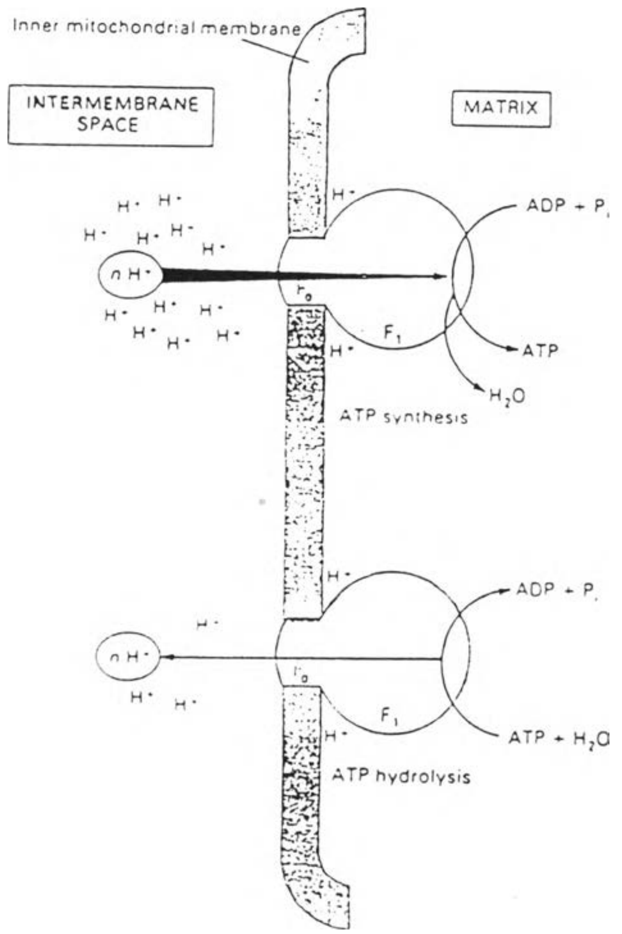
System	Exchange
Dicarboxylate carrier	Exchange on mole-for-mole , succinate , fumarate ,and phosphate between matrix and cytosol
Tricarboxylate carrier	Exchange on mole-for-mole basis , citrate and isocitrate between matrix and cytosol Exchange citrate or isocitrate for dicarboxylate
Aspartate -glutamate carrier	Exchange aspartate for glutamate across membrane
α-ketoglutarate-malate carrier	Specifically exchange α-ketoglutarate for malate across membrane
ADP-ATP carrier	Exchange of ADP for ATP

ตารางที่ 3 แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย

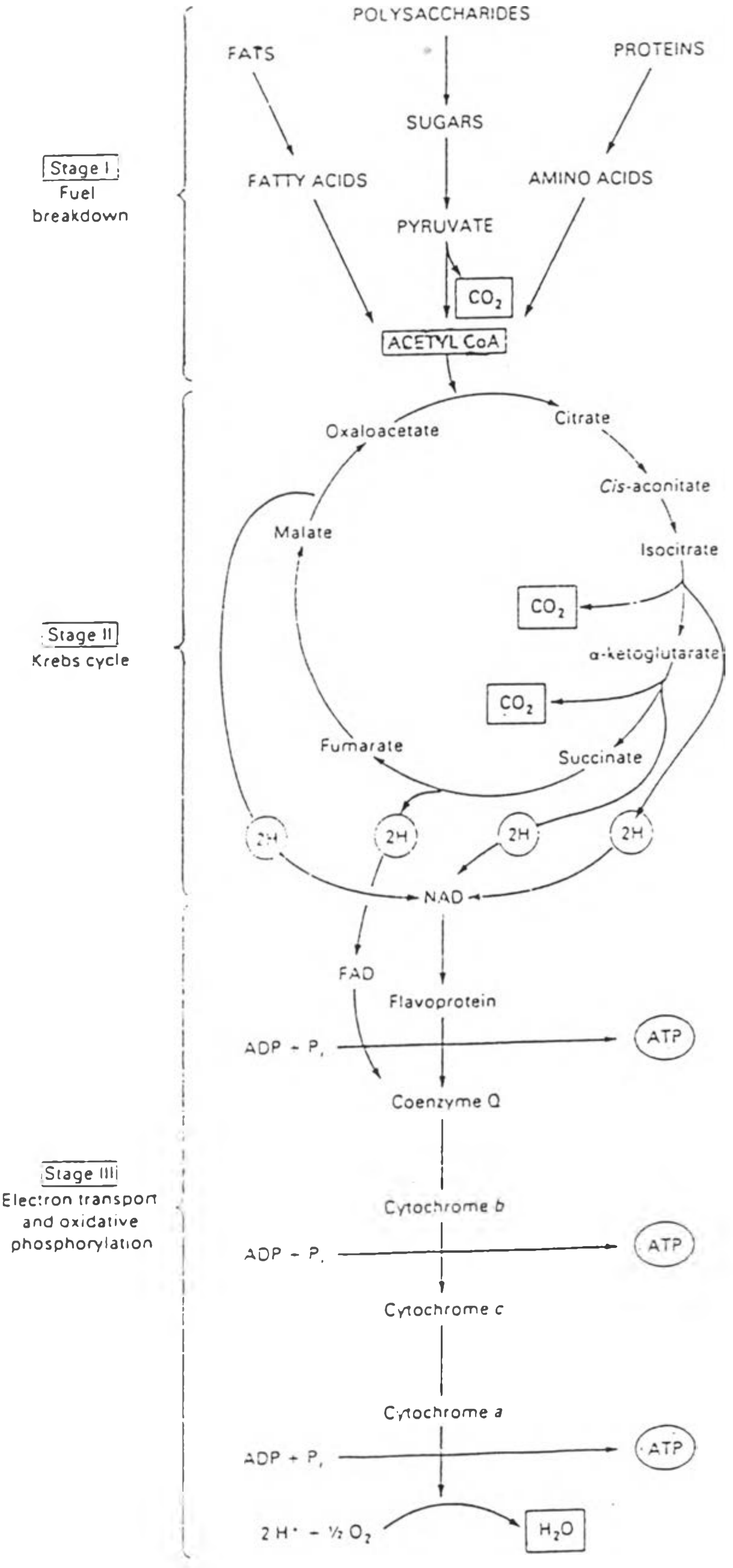
ส่วนต่างๆของไมโตคอนเดรีย	เอนไซม์
Outer membrane	Monoamine oxidase Fatty acid thiokinase Kynuremine hydroxylase Rotenone-insensitive cytochrome c reductase
Space between the membranes	Adenylate kinase Nucleoside diphosphokinase
Inner membrane	Respiratory chain enzymes α-ketoacid dehydrogenase Succinate dehydrogenase Carnitine fatty acyl transferase
Matrix	Pyruvate dehydrogenase complex Citrate synthase Isocitrate dehydrogenase Fumarase Malate dehydrogenase Aconitase Glutamate dehydrogenase Fatty acid oxidation enzymes

บริเวณของ cristae ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโครงสร้างทรงกลมส่วนหนึ่งของ spherical knob หรือ headpieces ยื่นออกมาจากผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งพบว่าเป็นเอนไซม์ ATPase (รูปที่ 3) เรียกว่า F_1 (coupling factor one) มีน้ำหนักโมเลกุล 360,000 - 380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน 5 subunit α, β, γ, δ และ ε ติดกับผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติเมื่อมี Mg^{2+} เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น ADP+Pi อย่างช้าๆ แต่จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP+Pi จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ATP synthase (รูปที่ 4) ส่วนของ F_1 นี้พบว่าไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin หรือ dicyclohexyl-carbodiimide ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase คือ F_0 (membrane sector) และ OSCP (oligomycin-sensitivity-confering protein) ซึ่งเป็น stalk sector ที่ทำให้ F_1 bind กับ F_0 ได้ F_0 ประกอบด้วย 3 subunit คือ a , b และ c ทำหน้าที่เป็น H^+ conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเป็นส่วนที่ยับยั้งการทำงานโดย oligomycin (43,44)

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรียนั้น เริ่มจากสารอาหารต่าง ๆที่รับประทานเข้าไปได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ถูกย่อยสลายให้ได้โมเลกุลเล็ก เช่น โปรตีนถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส และไขมันถูกย่อยได้เป็น กรดไขมัน (fatty acid) และสารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิสม (รูปที่ 5) เพื่อให้ได้ acetyl Co A ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediates) ที่สำคัญ เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่างๆในวัฏจักรเครปส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) จะ reduce NAD^+ และ FAD ไปเป็น $NADH + H^+$ และ $FADH_2$ ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ซึ่งอยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียโดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด (45) ได้แก่



รูปที่ 4 แสดง F_0F_1 ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP (De Robertis and De Robertis, 1987)



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle respiratory chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (De Robertis and De Robertis, 1987)

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

2. Flavin-linked dehydrogenase หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเลคตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenase จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenase ตรงที่จะส่งผ่านอิเลคตรอนจาก FAD ซึ่งเป็น coenzyme ของ succinate dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q โดยตรง

3. Iron-sulfur protein ประกอบด้วยเหล็ก และ acid-labile sulfur ได้แก่ ferredoxin

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

5. Coenzyme Q หรือ ubiquinone

การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจเป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น (oxidation-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูก reduce พร้อมกับรับ H^+ กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 6)

สับสเตรทที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆของลูกโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. NAD^+ - linked substrates เช่น glutamate, malate, β-hydroxybutyrate , α-ketoglutarate ซึ่งสับสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น NADH + H^+ จะให้อิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I

2. FAD-linked substrate ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ถูกปลดปล่อยจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (45)

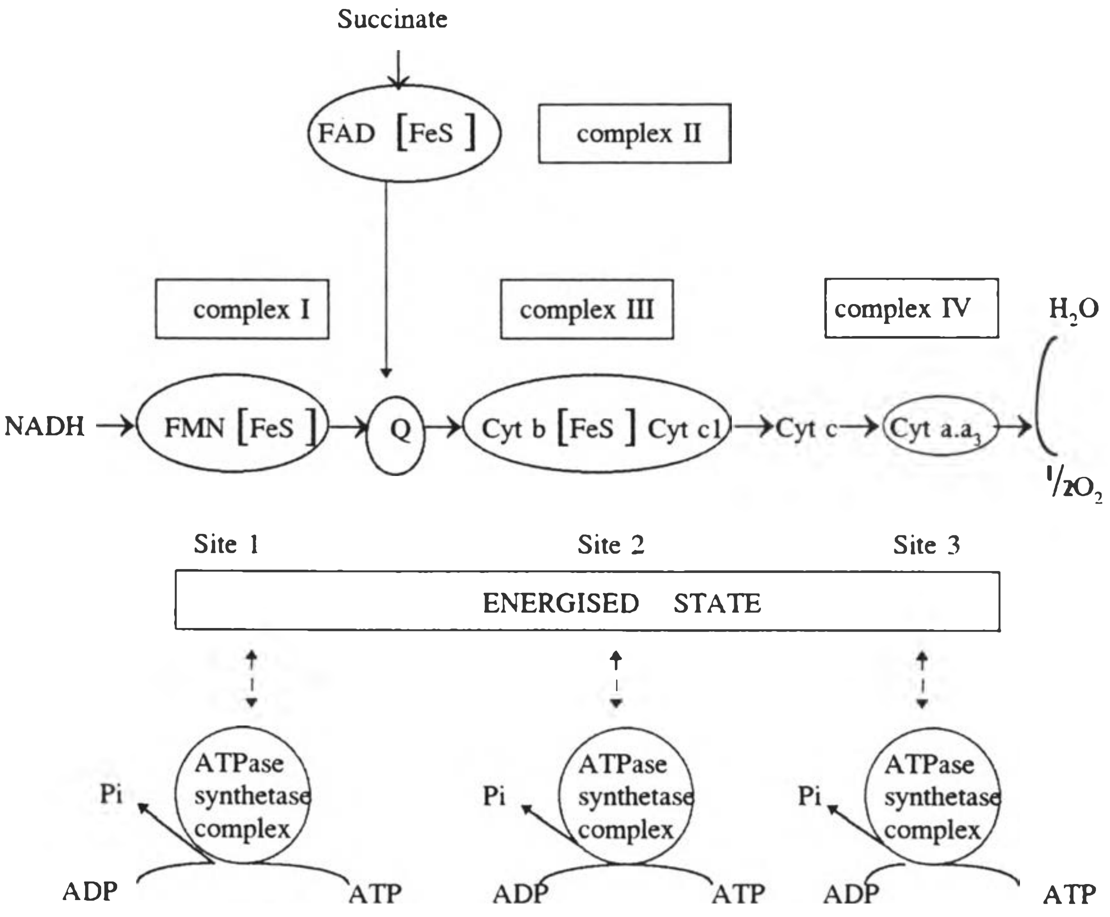
ได้มีการแยกลูกโซ่การหายใจเป็น 4 complexs (ตารางที่ 4) และรูปที่ 6 (46) คือ

- complex I หรือ NADH : Ubiquinone oxidoreductase ซึ่งจะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง ubiquinone , ferricyanide และ NAD

- complex II หรือ succinate : Ubiquinone oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก succinate ไปยัง ubiquinone (coenzyme Q)

- complex III หรือ ubiquinol : Cytochrome C oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง cytochrome C และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่ละกลไกของการส่งผ่านอิเลคตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

- complex IV หรือ ferrocytochrome C : Oxygen oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome C ไปยังโมเลกุลออกซิเจน

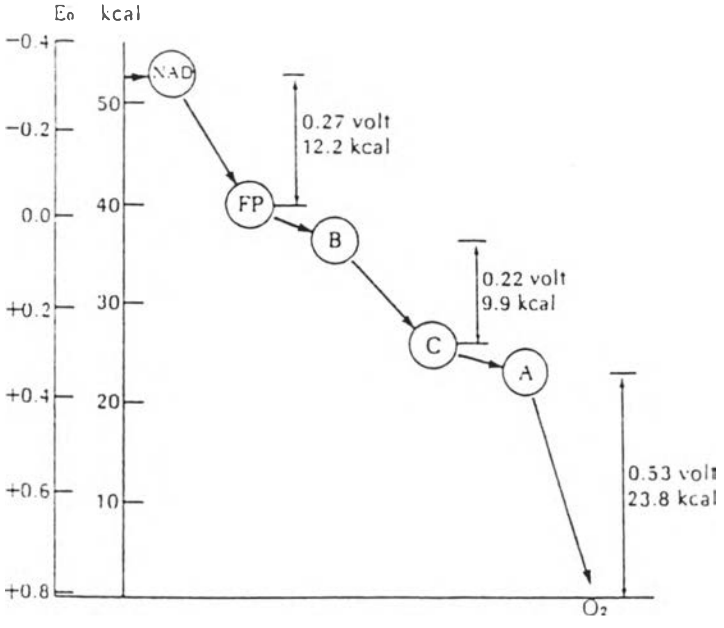


รูปที่ 6 แสดงกระบวนการ oxidative phosphorylation และการแบ่งส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของ Respiratory chain 4 complexs ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (47)

Complexes	Subunits	Molecular weight	Components
I. NADH dehydrogenase complex (NADH-ubiquinone reductase)	≥ 41	~ 800,000	NAD FMN Iron sulfur (FeS)centers Coenzyme Q_{10} Phospholipids
II. Succinate dehydrogenase complex (Succinate-ubiquinone reductase)	4	125,000	FAD Iron sulfur (FeS)centers Cytochrome b_{558}
III. Cytochrome b-c_1 complex (Ubiquinol-cytochrome c reductase)	9-10	~ 250,000	Cytochrome b Cytochrome c_1 Nonheme iron protien Coenzyme Q_{10} Phospholipids
IV. Cytochrome oxidase complex (Cytochrome c oxidase)	13	400,000 (dimer)	Cytochrome a Cytochrome a_3 Copper Phospholipids

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ จาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อย พลังงานอิสระ (free energy) (รูปที่ 7) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylated ของ ADP กระบวนการทั้งหมดนี้เรียกว่า ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชั่น (Oxidative phosphorylation) ในสภาวะปกติพบว่าการส่งผ่านอิเลคตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tighly coupled) แต่ในบางกรณีทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้คุณภาพไม่ดี หรือเก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือ กรณีที่ไมโตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ตัวอย่าง เช่น DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (Carbonyl cyanide m-chlor-phenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรีย



รูปที่ 7 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระ ในขณะที่อิเลคตรอนถูกส่งผ่านลูกโซ่การหายใจ (Avers, 1986)

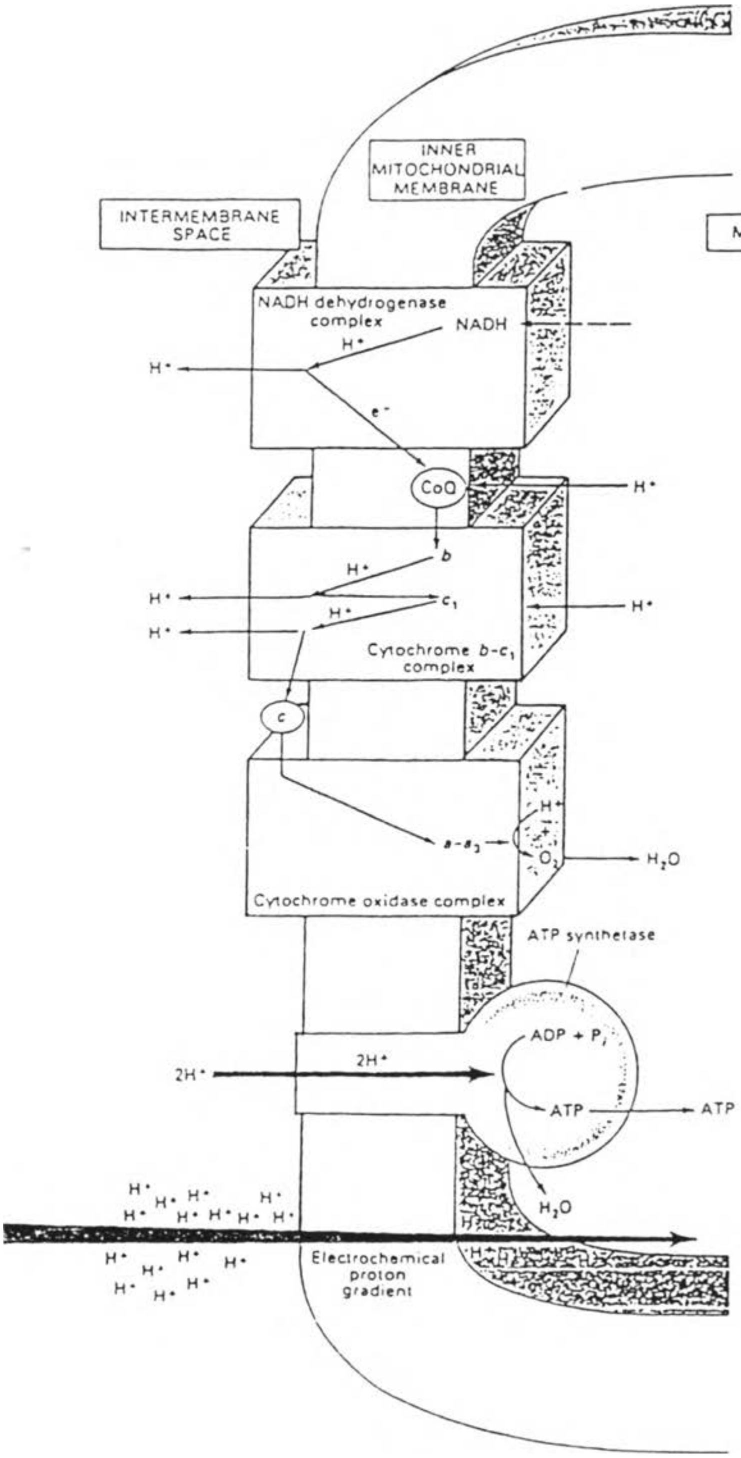
ใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็ว โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (45)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการสังเคราะห์ ATP ในไมโตคอนเดรียนั้นจำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอนไปตามลูกโซ่การหายใจนั้น น่าจะมีการสงวนไว้ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาในการสังเคราะห์ ATP

สาระสำคัญ Chemiosmotic coupling hypothesis โดย Peter Mitchell (48,49) ในปี ค.ศ.1961.

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการ pump proton (H^+) จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ทำให้เกิด proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ proton ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเนื่องจาก H^+ มีประจุบวกจึงทำให้มีความแตกต่างระหว่างประจุขึ้นที่ผนังชั้นในทำให้เกิด electrical gradient ซึ่งรวมเรียกว่า electrochemical gradient ของโปรตอน หรือ protonmotive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือ สามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตอนได้ซึ่ง electrochemical gradient จะเป็นส่วนที่ให้พลังงานและผลักดันให้มีการการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ Pi โดยโปรตอนจากภายนอกจะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F_0 และจะไปกระตุ้น F_1 ให้สร้าง ATP (รูปที่ 8)

โปรตอนเป็นตัวสำคัญในการเชื่อมโยงการเกิด ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชั่น ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจน หากมีการทำลาย proton gradient โดยสารใด ๆก็ตาม จะทำให้เกิด uncoupling ของไมโตคอนเดรีย เช่น กรณีของ aging mitochondria ที่มีโครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลาย หรือกรณีของ DNP ซึ่งมีคุณสมบัติของ H^+ ionophore สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปใน matrix ได้โดยไม่ผ่าน F_1-F_0 complex สารเหล่านี้จะทำให้ proton gradient เสียไป เป็นการทำลาย electrochemical gradient หรือ protonmotive force ดังนั้นไมโตคอนเดรีย



รูปที่ 8 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Avers, 1986)

จะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นใหม่ โดยการออกซิไดซ์สับสเตรทไปเรื่อย ๆ นั่นคือ ยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่ไม่เกิด gradient หรือเกิดเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่เพียงพอในการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ทำให้มีการสร้าง ATP ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย แม้ว่าไมโตคอนเดรียยังสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทและใช้ออกซิเจนในอัตราที่สูงกว่าปกติ พบว่าในสภาวะเช่นนี้ F_1 ซึ่งปกติจะกระตุ้นการสร้าง ATP กลับกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักให้เกิด proton gradient อีกทางหนึ่ง ซึ่งผลในการกระตุ้นให้สลาย ATP นี้เรียกว่า ATPase activity ดังนั้นจึงพบว่าสาร uncouplers จะกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ เนื่องจาก ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (40)

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{F_1\text{-}F_0\text{-ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

ซึ่งเราสามารถวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้ โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลาย ATP

สารที่มีผลในแง่การยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียเป็นประเด็นสำคัญที่นักวิจัยต่าง ๆให้ความสนใจกันมากเนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่มีความสำคัญ ในแง่ที่เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ หากมีสารใดก็ตามที่มีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ก็จะส่งผลถึงการทำงานของสิ่งมีชีวิตด้วย ซึ่งสามารถแบ่งสารที่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ของไมโตคอนเดรีย ได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. สารจำพวก uncouplers สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+ -carrier หรือ H^+ ionophore สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระและทำลาย electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน ทำให้มีผลยับยั้งการฟอสฟอริลเลชั่นของ ADP ไปเป็น ATP แต่ยังทำให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้นการสลาย ATP ด้วย (45,51)

สาร uncouplers ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารที่ละลายในไขมัน เป็นกรดอ่อน และในสูตรโครงสร้างมักมี aromatic ring อยู่ด้วย นักวิจัยสามารถแบ่งสาร uncouplers ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะทางเคมีและการออกฤทธิ์ (51) ดังนี้

1.1 Classical uncouplers หรือที่เรียกว่า DNP-like , true , weak acid , direct และ H^+ ionophore uncoupler สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนที่มี pKa ระหว่าง 4.5-6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxy heterocyclic--NH , amide , hydrazone-NH carboxyl , sulhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ทำลาย proton gradient โดยจะเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (unionized acid) ทำให้ H^+ สามารถผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H^+ -channel ของ F_1-F_0 complex

1.2 The alkali - metal ionophores ได้แก่พวก antibiotics เช่น gramicidin , tyrothricin , tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้คือ นำเอา cation เช่น K^+ ในกรณีของ valinomycin ผ่านเข้าทางผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคู่ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชั่น ของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์สับสเตรทจะถูกนำไปใช้ในการ transport cation เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย แทนที่จะใช้ในการสังเคราะห์ ATP

1.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้ด้วยกลไก ต่าง ๆกัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 Factor) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งเป็นสารจากพืชที่มี phenolic groups อยู่ในโครงสร้าง สามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 นาโนโมลต่อ มก. โปรตีน ส่วน arsenite ทำให้เกิด uncoupling โดยจับกับ sulhydryl groups อย่างไรก็ตามสารกลุ่มนี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

- Oligomycin ซึ่งจะมีผลยับยั้งที่ F_0 ของ ATP synthase ทำให้ยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชั่น รวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้เมื่อไมโตคอนเดรียอยู่ในภาวะ uncoupling (43)

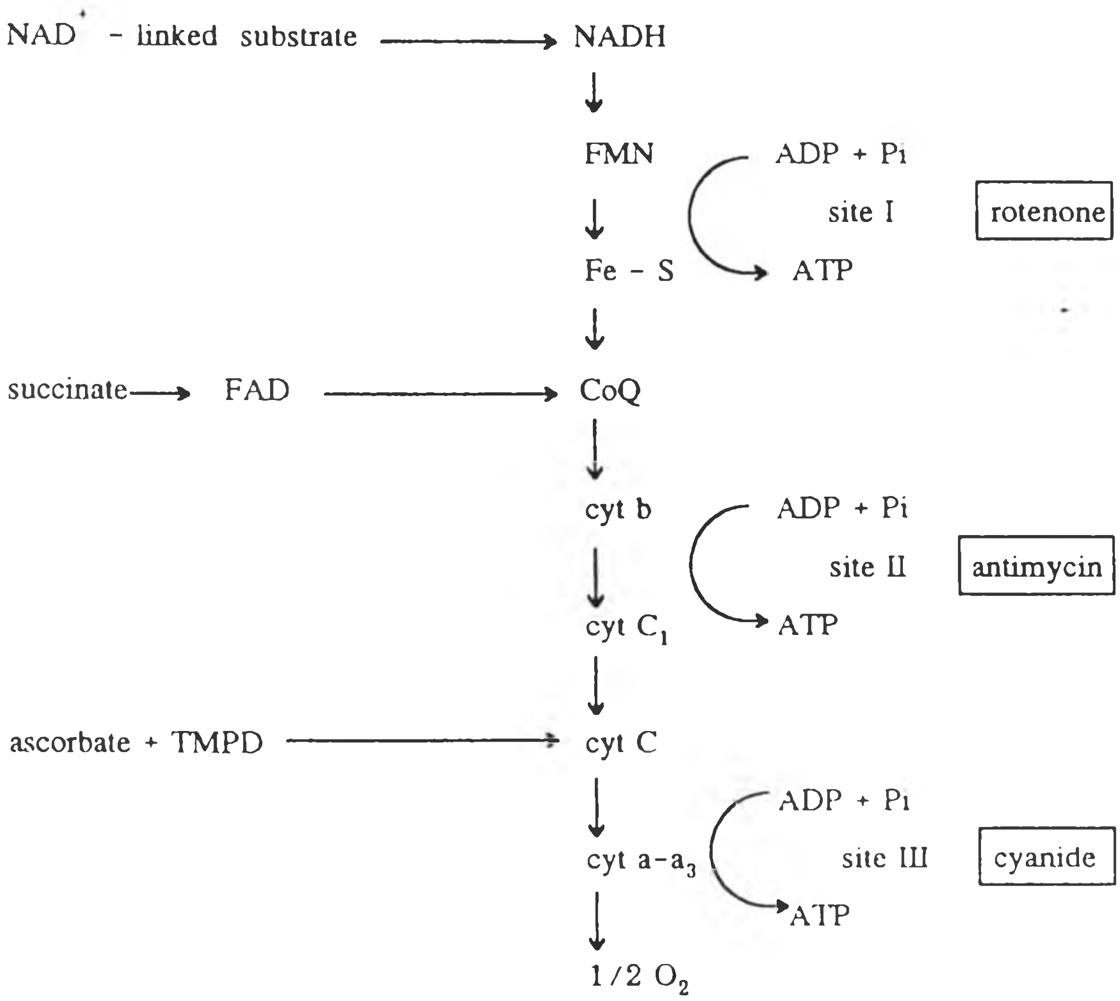
- Atractyloside จะยับยั้ง adenine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (45)

3. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (46,50) (รูปที่ 9) ได้แก่

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง Coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone , amytal , piericin A , barbiturates , dimerol และ mercurials สารประเภทนี้ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ succinate เป็นสับสเตรท เนื่องจาก succinate จะส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

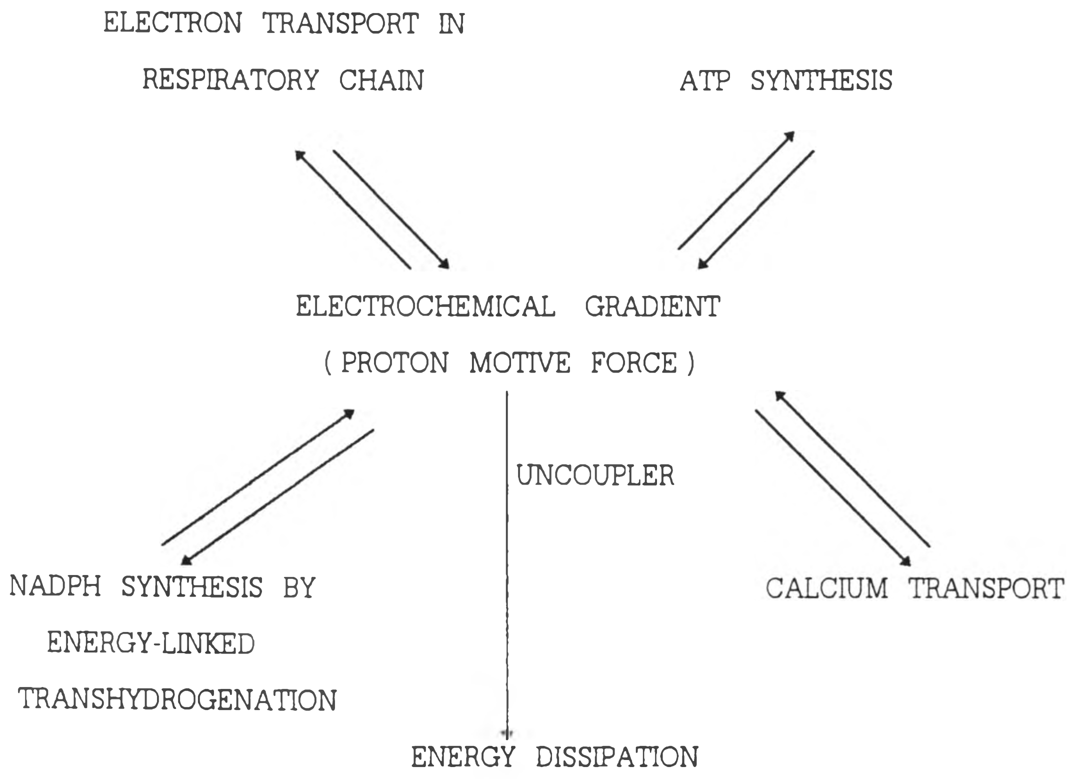
- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (site II) ได้แก่ antimycin แต่จะไม่สามารถยับยั้งสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น ascorbate + TMPD ซึ่งส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide, azide , และ carbon monoxide ซึ่งจะไปยับยั้งที่ cytochrome oxidase (cytochrome a+a3) นั่นคือ ถ้ามีการยับยั้งที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใด



รูปที่ 9 แสดงถึงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจ โดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Hatefi, 1985)

พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ในรูป electrochemical gradient หรือ proton motive force ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงที่ได้จากการส่งผ่านอิเลคตรอน นอกจากนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP แล้ว ยังสามารถใช้ในกระบวนการอื่นๆได้ เช่น ในการขนส่งอิออน (ions) ต่างๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การสะสมแคลเซียม และปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ของ $NADP^{+}$ โดย NADH ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ เหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 10 (50,51)



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้

แนวเหตุผลที่นำไปสู่การวิจัย

1. Silymarin จัดเป็นสารพวก flavonoids ซึ่งปัจจุบันมีผู้ค้นพบ biochemical และ pharmacological actions มากมาย flavonoids บางตัวมีผลกระทบต่อหน้าที่ของ mammalian cellular systems หลายระบบ

2. ข้อบ่งใช้ของ silymarin ที่นำมาทำเป็นยาแล้วนั้น คือ acute hepatitis ทุกชนิด และ toxic metabolic liver damage (fatty liver hepatitis , cirrhosis) ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังการใช้ยาต้องให้เป็นเวลานาน (long term therapy) ดังนั้นโอกาสที่เซลล์ตับจะเกิดพิษจาก silymarin อาจเกิดขึ้นได้

3. ต้องการศึกษาผลของ silymarin ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียจากเซลล์ตับ ซึ่งผลดังกล่าวอาจจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ / หรือพิษวิทยาของยาตัวนี้