

บทที่ 1



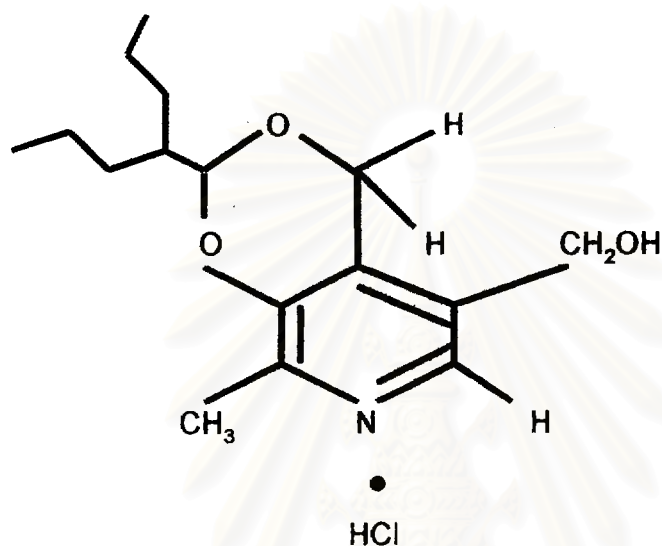
บทนำ

CU-763-10-01 (รูปที่ 1) ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และนาย เฉลิม เกียรติ สงคราม ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยอาศัยรากฐานจากสูตร โครงสร้างของ 2-propylpentanal acetals ซึ่งเป็น prodrug ของ valproic acid กับ pyridoxime วัตถุประสงค์ เพื่อเป็นยาด้านชักและลดปัญหาการเตรียมตำรับยาเพราะ valproic acid ไม่ละลายน้ำ ส่วนสาเหตุที่ใช้ pyridoxime หรือ vitamin B₆ รวมเข้าไปในสูตรโครงสร้าง เนื่องจากว่า pyridoxime ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ของ glutamic acid decarboxylase (GAD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้าง GABA (inhibitory neurotransmitter) การขาด vitamin B₆ อาจทำให้เกิดการชักได้ (ชนิกาน, 2540)

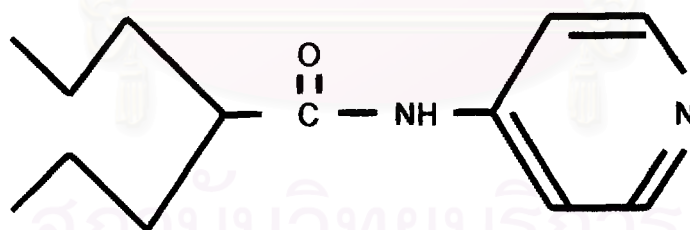
CU-763-10-01 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 315.85 จุดหลอมเหลวเท่ากับ 172-174 °C สารนี้ละลายได้ดีในน้ำ, ethanol, methanol, chloroform, acetone จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นในหนูถีบจักรพบว่า สารนี้ สามารถออกฤทธิ์ต้านชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Maximal Electroshock Seizure (MES) และเมื่อเปรียบเทียบกับ valproic acid (VPA) พบว่ามีประสิทธิภาพทางการต้านชักดีกว่า ส่วนทางด้านพิษวิทยาของสารต่อระบบ ประสาทพบว่า ในขนาดการรักษาอาการชักนั้น ไม่มีผลเสียต่อระบบประสาทที่ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อ เสียไป โดยสาร CU-763-10-01 มีพิษต่ำกว่า VPA (มยุรี, ทิพย์สุชน, 2538; สุราทิพ, 2539) นอกจากนี้ได้มีการ ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อกล้ามเนื้อเรียบของกระด้างและหนูขาวพบว่า สาร CU-763-10-01 ออกฤทธิ์เป็น nonspecific antagonist เพราะว่าสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อดำได้ของกระด้าง, ลดการหดตัว ของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงของกระด้างและลดการหดตัวของกล้ามเนื้อท่อสุจิของหนูขาว โดยไปยับยั้งการ เคลื่อนที่ของ Ca²⁺ จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง ROC (receptor operated calcium channel) หรือ POC (potential operated calcium channel) เป็นหลัก (อุรารัตน์ สักคีสิทธิ์วิวัฒน์, 2539) ส่วนในการศึกษา ผลของ CU-763-10-01 ต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวพบว่า สามารถออก ฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ Complex I มากกว่า Complex II เป็นผลให้กระบวนการ ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน และความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรียลดลง แต่ไม่มี ผลต่อ ATPase activity ขณะที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้ (สุราทิพ, 2539)

จากการที่ CU-763-10-01 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการดังกล่าวทำให้มีการสังเคราะห์สารใหม่ ขึ้นมาจำนวนหนึ่ง โดย ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และ นางสาวดิถีลักษณ์ ถ้อยภูมิ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะ เภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีการคิดแปลงสูตรโครงสร้างบางส่วนของ CU-763-10-01 จนได้ สารใหม่ขึ้นมา 2 ตัวคือ CU-763-15-13 และ CU-763-15-14 (รูปที่ 2) เมื่อนำสารทั้ง 2 มาทดสอบฤทธิ์ทาง

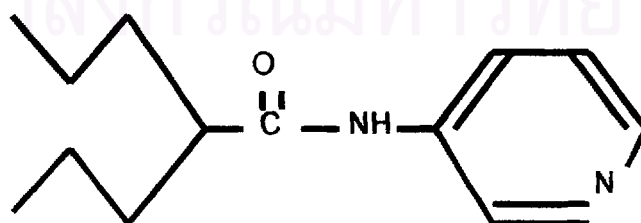
เกศวิทย์ชานบึงตันพบว่า สาร CU-763-15-13 มีผลยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยขึ้นกับขนาดของสาร (dose-dependent) CU-763-15-13 จะออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นตัวสเตรท และเมื่อทดสอบกับ CU-763-15-14 พบว่าไม่มีผลดังกล่าว ดังนั้น จึงมีความสนใจ CU-763-15-13 ที่จะนำมาศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของสารนี้ต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆรวมทั้ง organelles ต่างๆเช่น ไมโทคอนเดรีย



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU-763-10-01



CU-763-15-13 (เป็นของแข็งสีขาว, ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีใน DMSO, มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 220)



CU-763-15-14 (เป็นของแข็งสีขาว, ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีใน DMSO, มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 220)

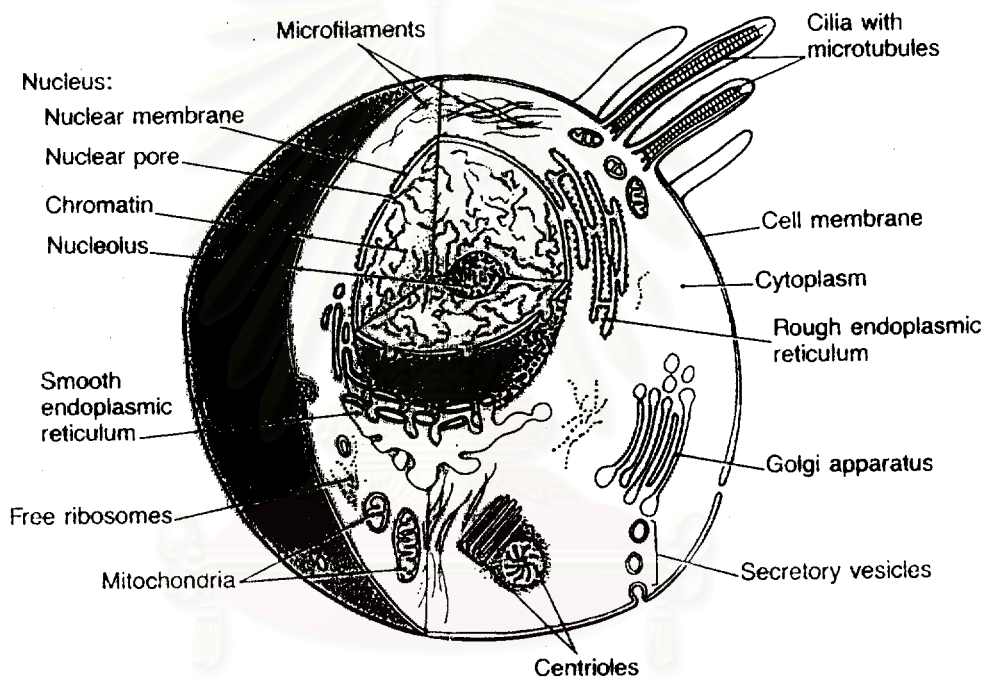
รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU-763-15-13 และ CU-763-15-14

การหายใจของไมโทคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโทคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญภายในเซลล์ (รูปที่ 3) และเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (powerhouse of cell) เนื่องจากมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของกรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของกรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle or citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้ได้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) (Avers, 1986; Voet, D. and Voet, J.G., 1990; Abeles et al, 1992; Campbell, 1995; Garrett et al, 1995)

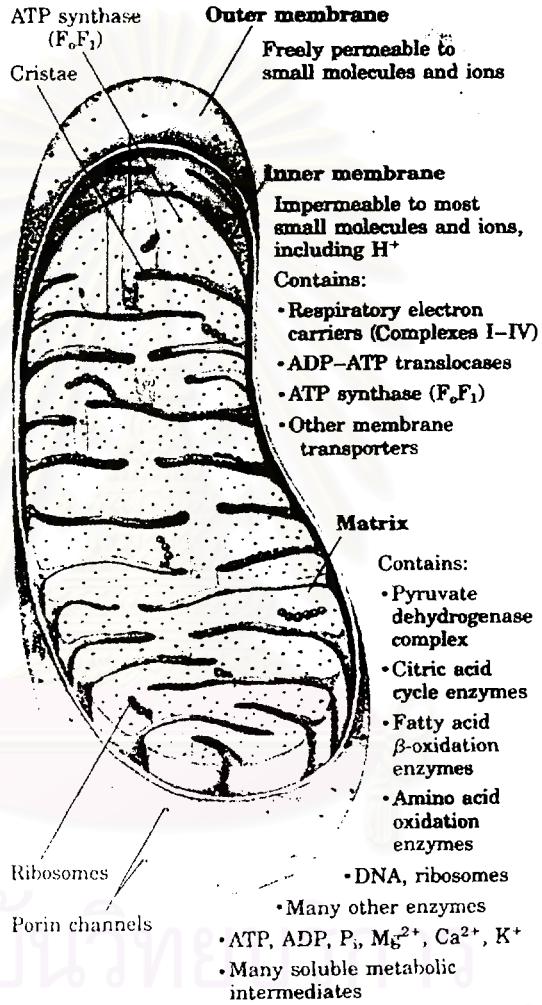
ไมโทคอนเดรียจะมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ เช่น มีลักษณะกลม (football-shaped) ในเซลล์ตับ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) ในเซลล์ไต และใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างซับซ้อน (complex irregular structure) ในยีสต์ นอกจากนี้ขนาดและจำนวนที่พบจะแตกต่างกันไป มักพบไมโทคอนเดรียอยู่ใกล้กับโครงสร้างของเซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับแหล่งของเชื้อเพลิง (fuel) ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่างๆ (Lehninger, 1993; Campbell, 1995; Garrett et al, 1995) และแม้ขนาด จำนวน รูปร่างจะแตกต่างกัน แต่โดยลักษณะรวมๆแล้วจะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายในผนังชั้นในจะห่อหุ้มของเหลวมีลักษณะคล้ายเจล (gel) เรียกว่า matrix (รูปที่ 4, 5)

ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition), permeability และเอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะของผิวที่เรียบ (smooth and unfold) หุ้มล้อมรอบผนังชั้นใน ประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งอออนต่างๆผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ เอนไซม์ที่อยู่ผนังชั้นนอกคือ monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ผนังชั้นในจะยืดหยุ่น (elastic) และมีพื้นที่ผิวมากกว่า เนื่องจากมีการพับ (fold) เข้าไปใน matrix ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากขึ้น ส่วนภายในผนังชั้นในประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และไขมันเป็นส่วนน้อย มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอออนต่างๆผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable) แต่จะยอมให้เฉพาะ O_2 , CO_2 , และ H_2O รวมทั้ง respiratory chain

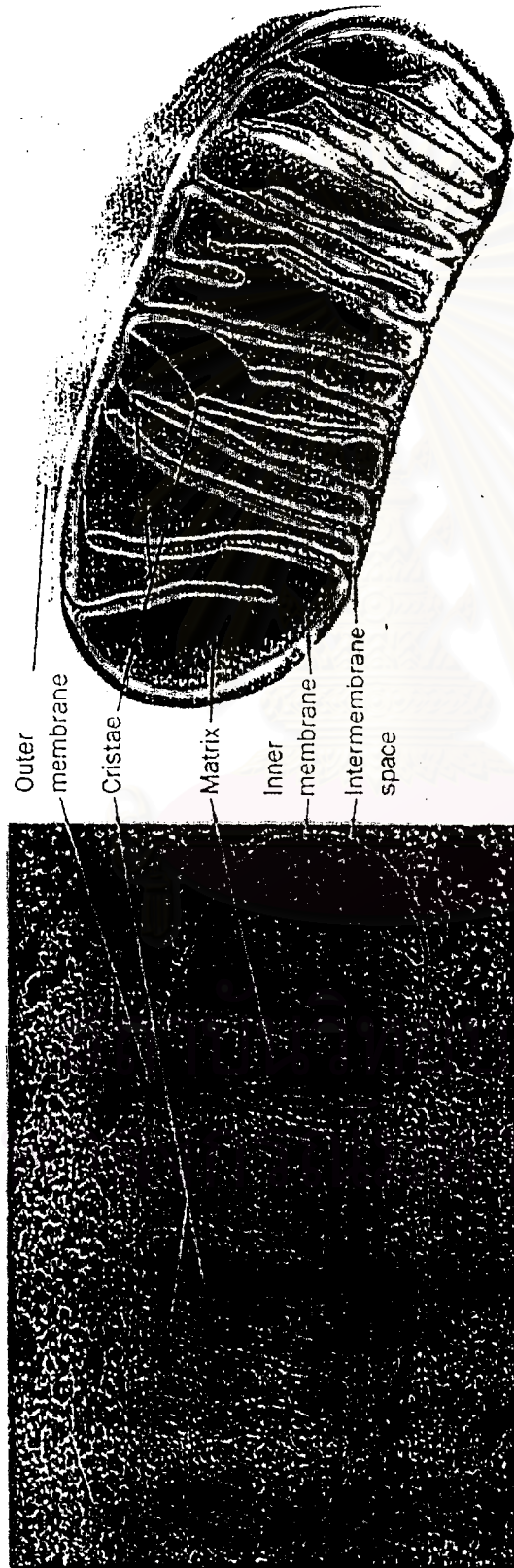


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดง organelles ใน cytoplasm และ cell nucleus (Forhlich, 1997)



รูปที่ 4 ภาพแสดง Biochemical anatomy of mitochondrion (Lehninger et al., 1995)



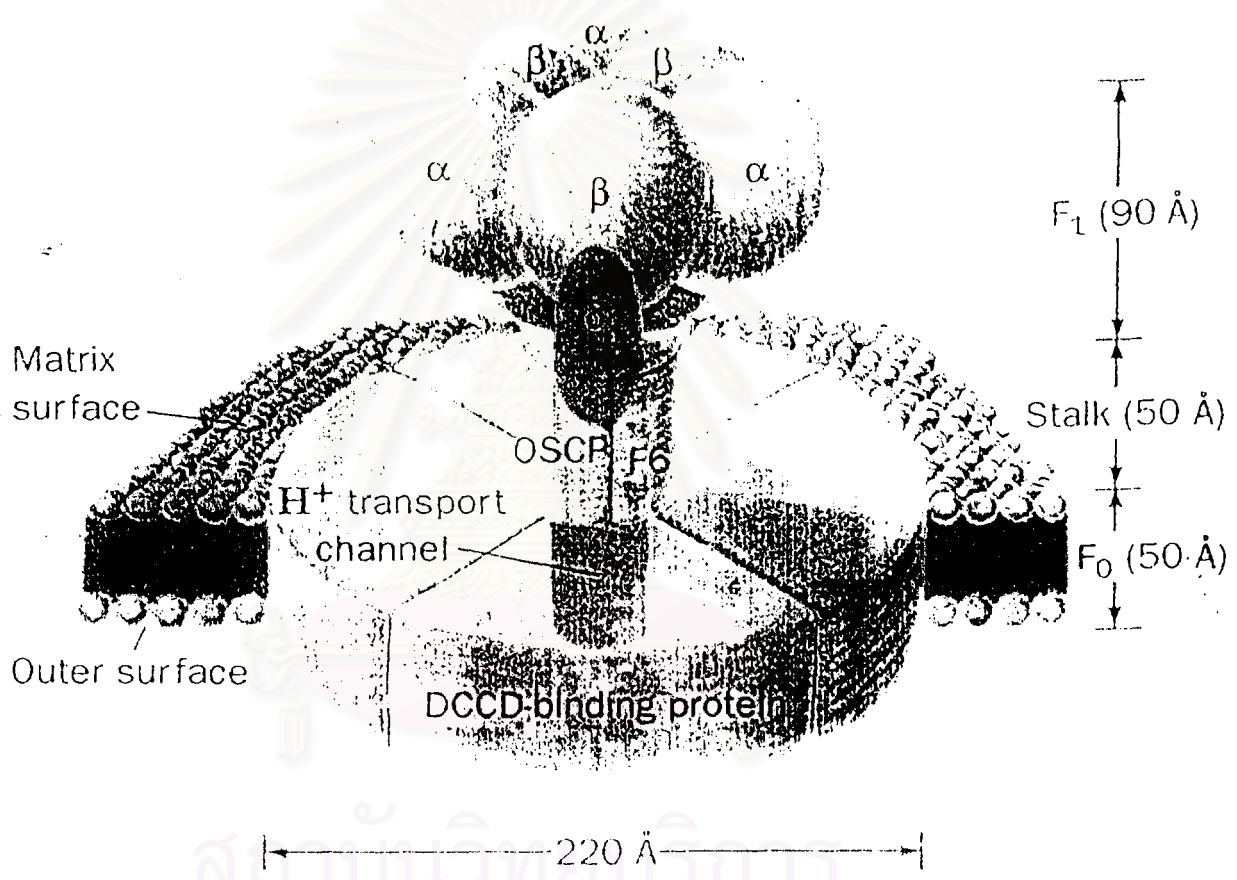
(a)



(b)

รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของไมโทคอนเดรีย (Voet and Voet, 1990)

(a) ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (b) ภาพจำลองการตัดขวาง



รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase (F₀F₁-ATPase) (Voet and Voet, 1990)

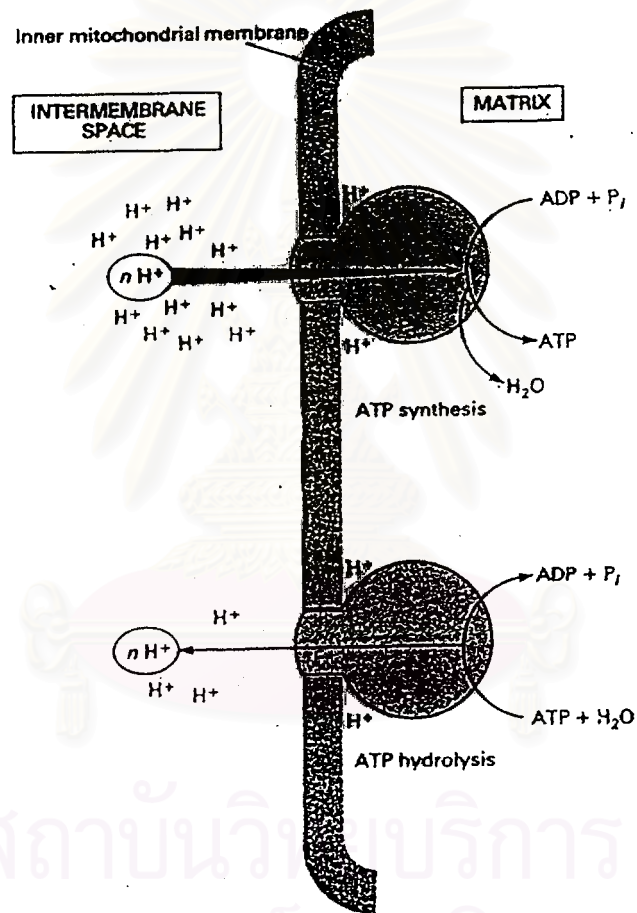
protein, transport protein, ATP, ADP, pyruvate, Ca^{2+} และ phosphate ดังนั้นการผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) (Sartorelli, Erecinska and Wilson, 1981; Voet and Voet, 1990; Lehninger, 1993) ผนังชั้นในจะมีเอนไซม์ต่างๆที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme และ enzyme ATPsynthase ส่วนใน matrix นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์แล้วยังประกอบด้วย DNA, ribosome และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 และรูปที่ 4

บริเวณ cristae เมื่อคู่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะเห็นโครงสร้างทรงกลมที่เรียกว่า spherical knob หรือ headpieces ขึ้นออกมาจากผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATP synthase and/or ATP hydrolase เรียกว่า F_1 (coupling factor one) ประกอบด้วยโปรตีน (peripheral membrane protein) มีคุณสมบัติละลายน้ำ (water-soluble) 5 subunits ได้แก่ α , β , γ , δ , และ ϵ น้ำหนักโมเลกุล 360,000-380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ซึ่งส่วนของ F_1 subunit จะยื่นเข้าไปใน matrix โดยติดอยู่กับผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 6) ในสภาวะปกติ เมื่อมี Mg^{2+} เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น $\text{ADP} + \text{P}_i$ อย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันจะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก $\text{ADP} + \text{P}_i$ (รูปที่ 7) ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase คือ F_0 (membrane sector) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000 daltons เป็นส่วนที่ฝังอยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย คุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ประกอบด้วย 3 subunit คือ a, b และ c รวมทั้งส่วนของ DCCD-binding protein F_0 ทำหน้าที่เป็น H^+ conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space โดยทำหน้าที่เป็นช่องที่ส่งผ่านโปรตอนเข้าออก membrane ได้ เมื่อนำ 2 subunit มารวมกัน จะเรียกว่า F_1 - F_0 ATPase มีรูปร่างเป็นแบบคัมเบล (dumbbells-shaped) เป็นส่วนที่สังเคราะห์ ATP ได้ ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง F_1 และ F_0 เรียก stalk sector เป็นส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase เช่นกัน ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ OSCP (oligomycin-sensitivity-conferring protein) และ coupling factor 6 (F_6) F_0 ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) โดยขัดขวางการขนส่งโปรตอนของ F_0 ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยา ATP synthase ในส่วนของ oligomycin จะไปจับกับส่วน subunit ของ F_0 (แต่ไม่จับกับ OSCP) และ DCCD ทำปฏิกิริยากับ single Glu residue ซึ่งเป็นหนึ่งใน subunit ของ F_0 ใน mammalian (Avers, 1986; Senior, 1988; Stryer, 1988; Futai, Noumi and Maeda, 1989; Voet and Voet, 1990; Abeles, Frey and Jencks, 1992; Devlin, 1992)

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรียนั้น เริ่มจากสารอาหารต่างๆที่รับประทานเข้าไปได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ถูกย่อยสลายจนได้โมเลกุลเล็กๆ เช่น โปรตีนถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส และไขมันถูกย่อยจนได้กรดไขมัน (fatty acid) สารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อให้ได้ acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่ง

ตารางที่ 1 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 1992)

Outer membrane	Intermembrane space	Inner membrane	Matrix
Monoamine oxidase	Adenylate kinase	F_1 -ATPase	Citrate synthase
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside diphosphate kinase	Succinate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase
Nucleoside diphosphate kinase		Cytochromes <i>b, c, c, a, a₃</i>	Succinyl CoA synthetase
Phospholipase A		NADH dehydrogenase	Malate dehydrogenase
Fatty acyl CoA synthetases		Carnitine : acyl CoA transferase	Isocitrate dehydrogenase
NADH : cytochrome <i>c</i> reductase (rotenone-insensitive)		β -Hydroxybutyrate dehydrogenase	Fatty acid β -oxidation system
Choline phosphotransferase		Adenine nucleotide translocase	α -Ketoglutarate dehydrogenase
		Mono-, di-, tricarboxylate translocase	Aconitase
		Glutamate-aspartate translocase	Fumarase
			Glutamate dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate transaminase
			Ornithine transcarbamoylase



รูปที่ 7

แสดง F₀-F₁ ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP
(De Robertis and De Robertis, 1987)

เป็นตัวกลาง (intermediates) ที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Kerbs' cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไป โดยผ่านปฏิกิริยาดังกล่าวในวัฏจักรเครปส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ไพริวซ์ (reduce) NAD^+ และ FAD ไปเป็น $\text{NADH}+\text{H}^+$ และ FADH_2 (Darnell, Lodish and Baltimore, 1986; Devlin, 1992; Campbell, 1995; Garrett et al, 1995) ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ห่วงโซ่การหายใจ (respiratory chain or electron transport chain) ซึ่งอยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย โดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิด (Lehninger, 1993) คือ

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

2. **Flavin-linked dehydrogenases** หรือ flavoproteins ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเล็กตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenase จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenase ตรงที่จะจับกับเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะจับกับ coenzyme

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

4. **ระบบ cytochromes** ประกอบด้วย iron-porphyrin เป็น prosthetic groups ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก dehydrogenase systems ต่างๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b, c₁, c, a, a₃

5. **Coenzyme Q** หรือ Ubiquinone

การส่งผ่านอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจ เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidative-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับ ตามค่า E_0' (พลังงานอิสระ) ของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนและมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H^+ กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 8)

ตัวสเตรทที่ไมโทคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆของห่วงโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ NAD^+ -linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate, α -ketoglutarate ซึ่งตัวสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไพริวซ์ NAD^+ ได้เป็น $\text{NADH}+\text{H}^+$ จะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ห่วงโซ่การหายใจที่ complex I อีกพวกหนึ่งคือ FAD-linked substrate ได้

แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยจะปรีดิวิซ์ FAD เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนแล้วเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1993) ดังรายละเอียดในรูปที่ 9

ลูกโซ่การหายใจแบ่งออกเป็น 4 complexes (ตารางที่ 2, 3) (Hatefi, 1985; Voet, D. and Voet, J.G., 1990; Zubay, G., 1993) คือ

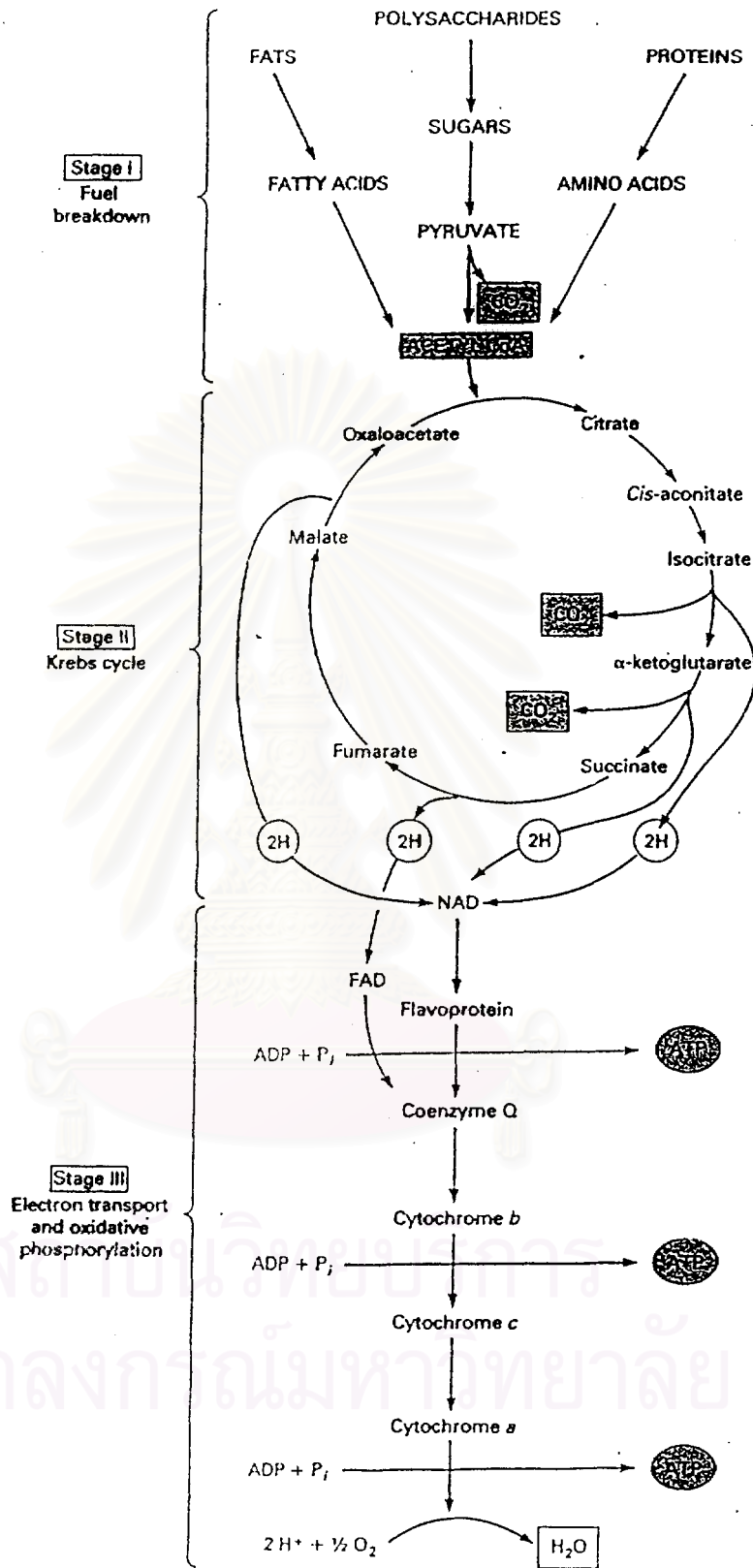
-Complex I หรือ NADH dehydrogenase complex : Ubiquinone Oxidoreductase ซึ่งจะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง Ubiquinone , ferricyanide และ NAD

-Complex II หรือ Succinate dehydrogenase complex : Ubiquinone Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก Succinate ไปยัง Ubiquinone (coenzyme Q)

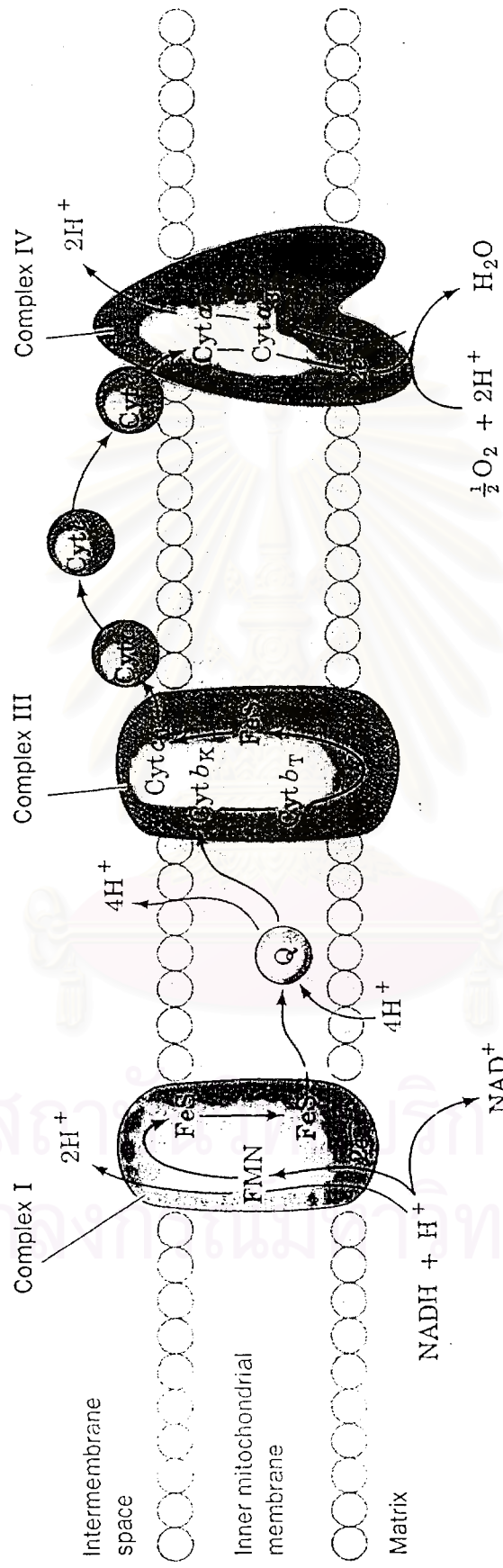
-Complex III หรือ Cytochrome b - c₁ complex : Cytochrome c Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dihydroubiquinone(QH₂) ไปยัง Cytochrome c และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่กลไกของการส่งผ่านอิเลคตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

-Complex IV หรือ Cytochrome oxidase complex หรือ Ferrocyclochrome C : Oxygen Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลของออกซิเจน

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจนโดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด จะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมามากพอในการสังเคราะห์ ATP โดยการเกิด phosphorylation ของ ADP เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่า กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) จะพบ 3 ตำแหน่งในลูกโซ่การหายใจที่ปลดปล่อยพลังงานอิสระที่มีมากเพียงพอในการนำไปใช้สังเคราะห์ ATP ตำแหน่งต่างๆและพลังงานอิสระที่ปลดปล่อย ดังแสดงในรูปที่ 10 การคำนวณจาก P/O ratio (ADP/O) ทำให้รู้ว่าการสังเคราะห์โมเลกุลของ ATP นั้น ในแต่ละช่วงของลูกโซ่การหายใจเท่ากับ 3, 2 และ 1 โมเลกุลตามลำดับ (รูปที่ 11) ส่วนการคำนวณ ADP/O ratio จะกล่าวรายละเอียดในบทที่ 2



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle , respiration chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (Avers, 1986)



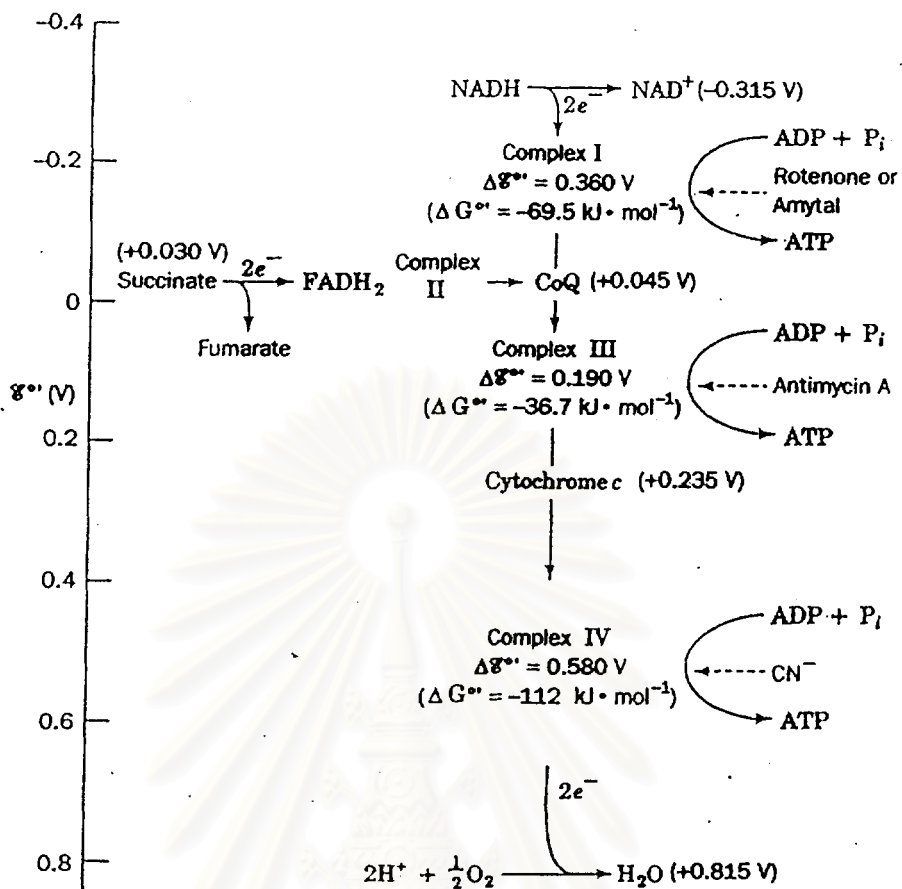
รูปที่ 9 แสดงลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนใน respiratory chain (Voet and Voet, 1990)

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่หายใจ 4 complex ที่อยู่ภายในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย
(Aver, 1986)

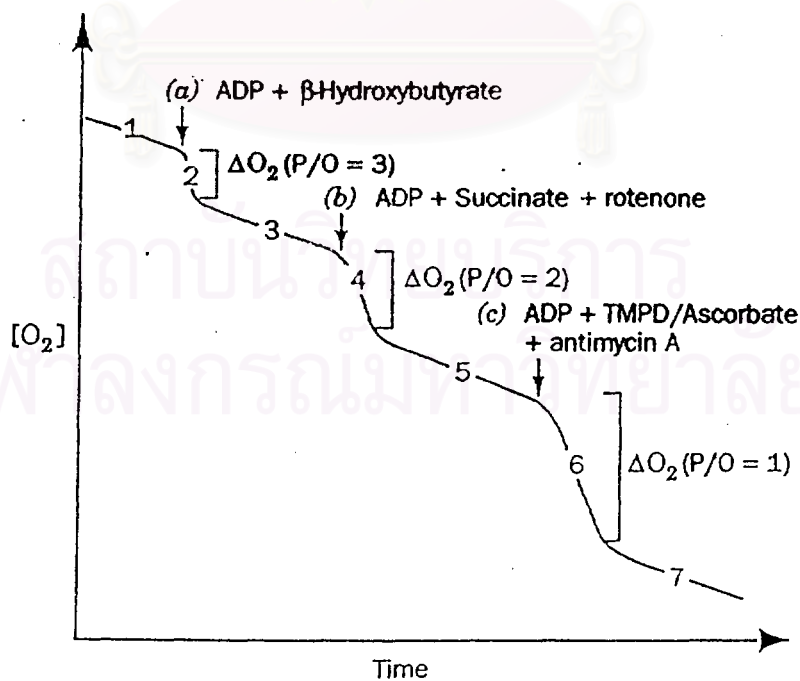
Complexes	Components
I, NADH dehydrogenase complex	NAD FMN Iron sulfur (FeS) centers Coenzyme Q ₁₀ Phospholipids
II, Succinate dehydrogenase complex	FAD Iron sulfur (FeS) centers Cytochrome b ₅₅₈
III, Cytochrome b-c ₁ complex	Cytochrome b Cytochrome c ₁ Nonheme iron protein Coenzyme Q ₁₀ Phospholipids
IV, Cytochrome oxidase complex	Cytochrome a Cytochrome a ₃ Copper Phospholipids

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

Proteins	Molecular weight	Cofactors	Number of proteins
Complex I	1×10^6	Fe ₄ S ₄ , Fe ₂ S ₂ , FMN	26
Complex II	> 100,000	Fe ₄ S ₄ , Fe ₂ S ₂ , FAD	4
Complex III	450,000	2 Cyt b, Cyt c ₁	> 6
Complex IV	200,000	Cyt a, Cyt a ₃ , Cu	> 7



รูปที่ 10 แสดงถึงค่าพลังงานอิสระของอิเล็กตรอนที่ไหลผ่านในช่วงต่างๆของลูกโซ่การหายใจ (Voet and Voet, 1990)



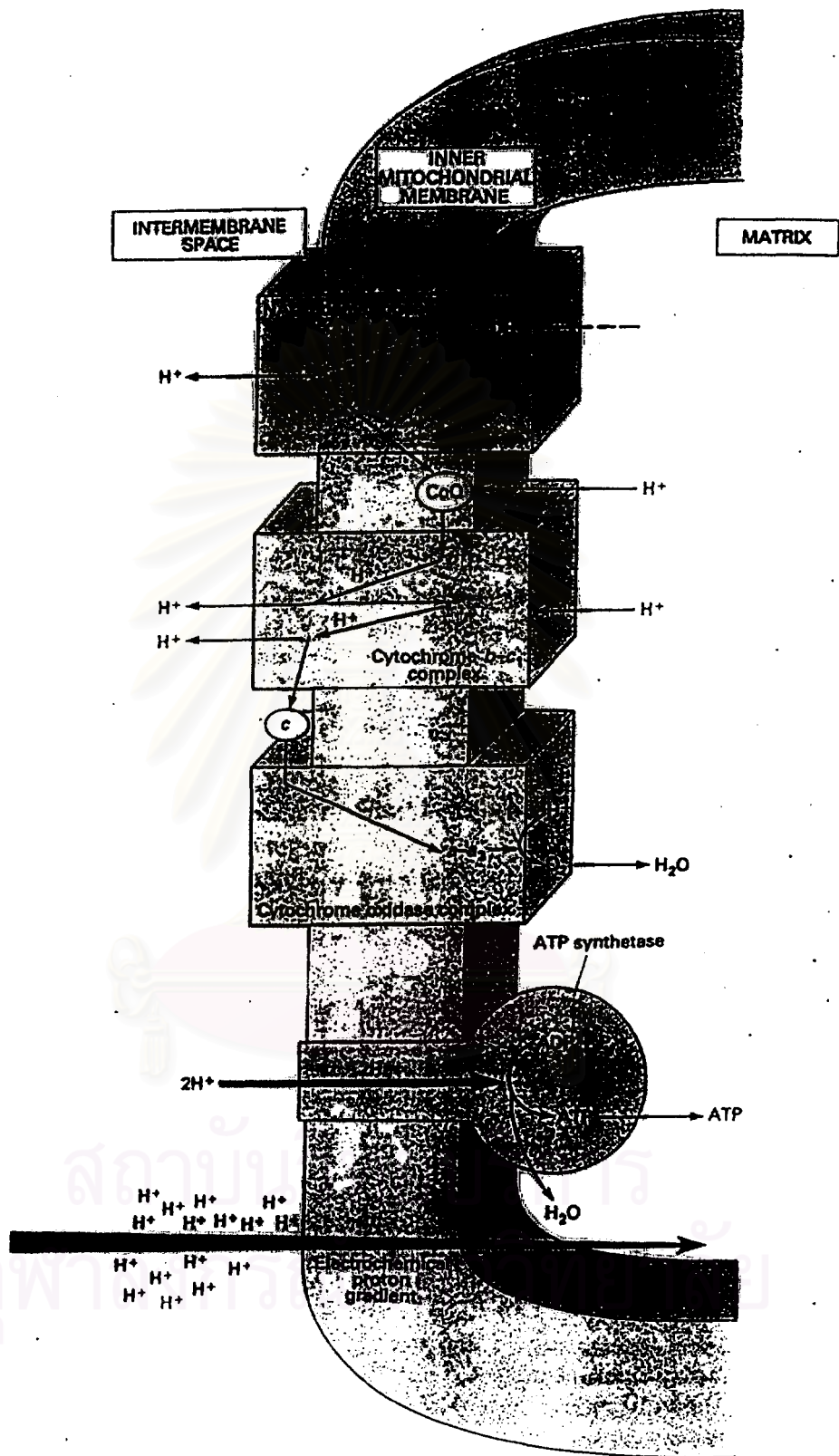
รูปที่ 11 แสดงการสังเคราะห์ ATP จากการคำนวณได้จาก P/O ratio ในลูกโซ่การหายใจ (Voet and Voet, 1990)

ในสภาวะปกติการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณีทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้คุณภาพไม่ดี, เก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไมโทคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ได้แก่ DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็ว โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger, 1993)

การสังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรียนั้น จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามลูกโซ่การหายใจนั้นจะมีการสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดมากมายเพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ เช่น chemical coupling, conformational coupling และ chemiosmotic coupling hypothesis แต่ในปัจจุบันแนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับ คือ “chemiosmotic coupling hypothesis” ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี ค.ศ.1961 (Boyer et al., 1977; Mitchell, 1977; Avers, 1986; Campbell, 1995)

หลักสำคัญของ chemiosmotic coupling hypothesis คือ ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ จะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) proton (H^+) จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ทำให้เกิด pH gradient และ proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ proton (H^+) ระหว่าง matrix กับ intermembrane space ทั้งนี้เนื่องจาก proton (H^+) มีประจุบวก (positive charge) จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประจุชั้นที่ผนังชั้นในทำให้เกิด membrane potential และ electrical gradient ซึ่งทั้งหมดรวมเรียกว่า electrochemical gradient หรือ proton motive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือไมโทคอนเดรียที่สามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตอนได้ จากนั้นเมื่อ electrochemical gradient จะเป็นส่วนที่ให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์ ATP จาก $ADP+P_i$ โดย proton (H^+) จากภายนอกจะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F_0 และไปกระตุ้น F_1 ให้สร้าง ATP (รูปที่ 12)

จึงกล่าวได้ว่า proton (H^+) เป็นตัวสำคัญในการเชื่อมโยงระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันและ ฟอสฟอริเลชัน ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจนหากมีการทำลาย proton gradient (collapse proton gradient) โดยสารใดๆก็ตามจะทำให้เกิด อันคัปปลิง (uncoupling) ของไมโทคอนเดรียขึ้น นั่นคือปฏิกิริยา oxidation-reduction และ phosphorylation จะถูกแยกออกจากกัน เช่น กรณี aging mitochondria ที่มีโครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลายหรือกรณีของสารเคมี DNP ซึ่งมีคุณสมบัติ



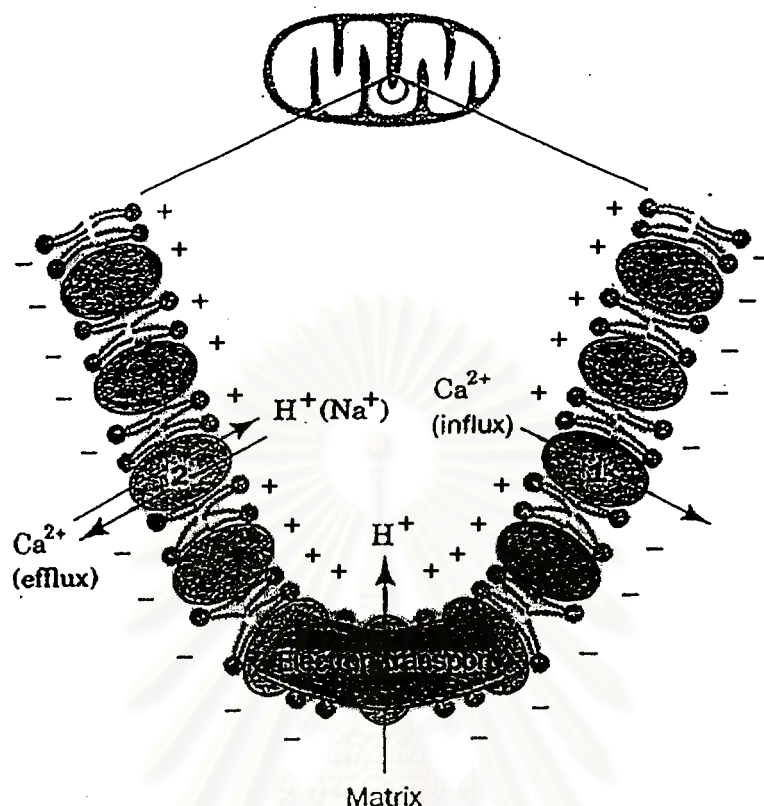
รูปที่ 12 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Avers, 1986)

สมบัติเป็น proton-ionophore สามารถนำพา proton (H^+) จาก ภายนอกเข้าไปใน matrix ได้โดยไม่ผ่าน F_1-F_0 -complex สารเหล่านี้จะทำให้ proton gradient เสียไปเป็นการทำลาย electrochemical gradient หรือ proton motive force ดังนั้นไมโทคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่ โดยการออกซิโคไซด์สเตรทไปเรื่อยๆ นั่นคือ ยังมีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจแต่ไม่เกิด gradient หรือเกิดเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่เพียงพอในการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ทำให้มีการสร้าง ATP ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย แม้ว่าไมโทคอนเดรียยังสามารถออกซิโคไซด์สเตรทและใช้ออกซิเจนในอัตราที่สูงกว่าปกติ พบว่าในสภาวะเช่นนี้ F_1 ซึ่งปกติจะกระตุ้นการสร้าง ATP กลับกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้เกิด proton gradient อีกทางหนึ่ง ซึ่งผลในการกระตุ้นการสลาย ATP นั่นคือการเพิ่ม ATPase activity เพราะฉะนั้นสาร uncoupler จะกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งในสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ เนื่องจาก ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (Danishefsky, 1980)



ในส่วนการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยไมโทคอนเดรีย นั้น พบว่าบทบาทของแคลเซียมคล้าย cAMP ทำหน้าที่เหมือน second messenger โดยความเข้มข้นในไซโตซอล (cytosol) เป็นตัวถูกควบคุมได้อย่างแม่นยำ ภายในเชลล์พบ endoplasmic reticulum (ER), extracellular space และไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เก็บสะสมแคลเซียม ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียเป็นตัวทำให้เกิดระบบการไหลเข้า (influx) และการไหลออก (efflux) ของแคลเซียม การไหลเข้าของแคลเซียมใช้แรงขับของความต่างศักย์ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นประจุลบ (negative inside) ทำให้จับกับประจุบวก อัตราการไหลเข้าจะแปรผันตามความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอก เพราะการขนส่งแคลเซียมจะมีแรงขับอิสระโดยอาศัยการขนส่งอิเล็กตรอนหรือเกิด proton gradient ระหว่างผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย หรือในไมโทคอนเดรียของหัวใจจะใช้ Na^+ gradient แทน แคลเซียมออกจาก matrix เฉพาะในการแลกเปลี่ยนกับ proton (H^+) หรือ Na^+

ขบวนการแลกเปลี่ยนนี้จะเกิดขึ้นด้วยความเร็วสูงสุด ไมโทคอนเดรียจะทำหน้าที่ควบคุมความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอล ถ้าความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลเพิ่ม อัตราการไหลเข้าของแคลเซียมในไมโทคอนเดรียจะเพิ่มขณะที่การไหลออกของแคลเซียมจะคงที่ เพราะว่าความเข้มข้นของแคลเซียมในไมโทคอนเดรียจะเพิ่มขึ้น ขณะที่ความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลลดลงเท่ากับจุดเริ่มต้นในทางตรงกัน ข้ามการลดลงของความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอล ทำให้อัตราการไหลเข้าลดลงเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลออกของแคลเซียม และความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตซอลกลับมายังจุดเริ่มต้นเหมือนเดิม (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงการขนส่งแคลเซียม (Ca^{2+}) ในไมโทคอนเดรีย (Voet and Voet, 1990)

สารที่มีผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันหรือสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย แบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ๆคือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Electron transport inhibitors) (Danishefsky, 1980; Hateli, 1985; Voet and Voet, 1990; Abeles, Frey and Jencks, 1992) (รูปที่ 14) ได้แก่

1.1 สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I คือจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone (เป็นสารพิษจากพืช ทำให้เกิดพิษในปลาและใช้เป็น insecticide) , amytal , pipericin A , barbiturates , dimerol และ mercurials สารประเภทนี้ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกรณีที่ succinate เป็นสับสเตรทเนื่องจาก succinate จะส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

1.2 สารที่ขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex II คือจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (site II) ได้แก่ antimycin A (antibiotic) แต่จะไม่สามารถขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น Ascorbate + TMPD ซึ่งสามารถส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง

1.3 สารที่ขัดขวางการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex IV คือจาก cytochrome c ไปยัง ออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide, azide และ carbon monoxide ซึ่งจะไปขัดขวางที่ cytochrome oxidase (cytochrome aa₃) นั่นคือ ถ้ามีการขัดขวางที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทใดก็ตาม

2. สารจำพวก uncoupler สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H⁺-carrier หรือ proton-ionophores สามารถนำเอา H⁺ จากภายนอกเข้าไปในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้อย่างอิสระและทำลาย electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเล็กตรอน ทำให้มีผลการขัดขวาง phosphorylation ของ ADP ไปเป็น ATP แต่ยังคงทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้นการสลาย ATP ด้วย (Heytler, 1981; Lehninger, 1993)

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

2.1 Classical uncouplers หรือเรียกว่า DNP-like, weak - acid, direct และ H⁺-ionophores uncoupler เช่น 2,4-dinitrophenol (DNP), carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weak acid) ที่มี pKa ระหว่าง 4.5-6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxy, heterocyclic - NH, amide, hydrazone - NH, carboxyl, sulfhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ทำลาย proton gradient โดยจะเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (unionize acid) ทำให้ proton (H⁺) สามารถผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H⁺-channel ของ F₁-F₀ complex

2.2 The alkali - metal ionophores ได้แก่พวก antibiotics เช่น gramicidin, tyrothricin, tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ คือ นำเอา cation เช่น K⁺ เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ในกรณีของ valinomycin ซึ่งผ่านเข้าทางผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันของไมโทคอน

เดรีช กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์ตัวสเตรทจะถูกนำไปใช้ในการ transport Na^+ cation เข้าสู่ ไมโทคอนเดรีช แทนที่จะใช้ในการสังเคราะห์ ATP

2.3 Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้ด้วยกลไกต่าง ๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีชที่เกี่ยวกับการสร้าง ATP (F_1 factor) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งเป็นสารจากพืชที่มี phenolic groups อยู่ในโครงสร้าง สามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 nmole/mg protein ส่วน arsenic ทำให้เกิด uncoupling โดยจับกับ sulhydryl groups อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่ม indirect uncouplers นี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

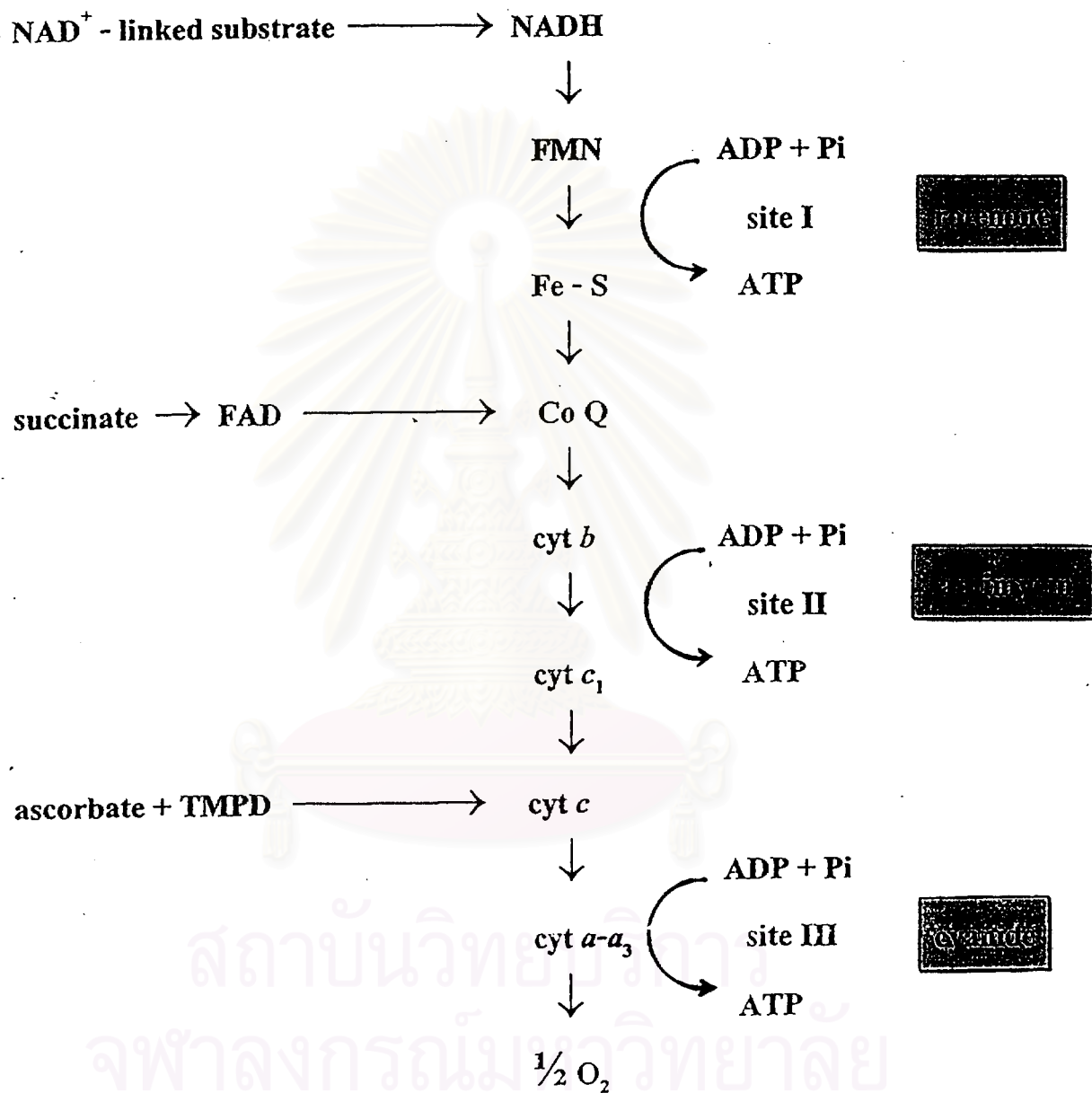
3. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

3.1 oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) ซึ่งจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยไปยับยั้งที่ F_0 ของเอนไซม์ ATP synthase ทำให้ไม่สามารถส่งผ่านโปรตอนจาก F_0 ไปยัง F_1 ได้ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ฟอสฟอริเลชันรวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้เมื่อไมโทคอนเดรีชอยู่ในภาวะ uncoupling (Senior, 1973; Voet and Voet, 1990)

3.2 atractyloside จะยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีชทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1993)

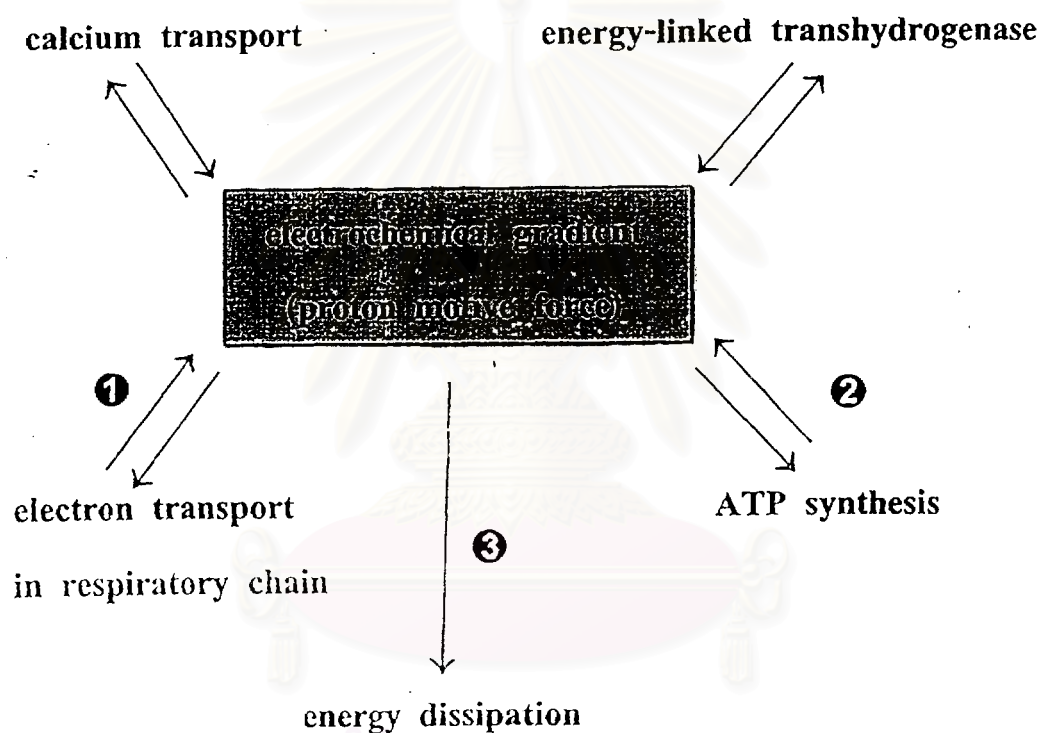
3.3 DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน P_i จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีช โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีช ทำให้ขาด P_i ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

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



รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ
(Hatefi, 1985)

การใช้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้อยู่ในรูป electrochemical gradient หรือ proton motive force ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้จากการส่งผ่านอิเล็กตรอน นอกจากจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ เช่น ใช้ในการขนส่งไอออน (ions) ต่างๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย การสะสมแคลเซียมและการสังเคราะห์ NADPH โดย energy-linked transhydrogenase ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆเหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 15 (Hanstein, 1976; Danishefky, 1980; Lehninger, 1993)



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโทคอนเดรียสามารถสงวนไว้ (high energy electrochemical gradient) และตำแหน่งต่างๆที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียไปออกฤทธิ์

- ① สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ
- ② สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก $\text{ADP} + \text{P}_i$ เช่น oligomycin, DTNB เป็นต้น
- ③ สารที่มีฤทธิ์ uncoupling เช่น DNP, FCCP เป็นต้น

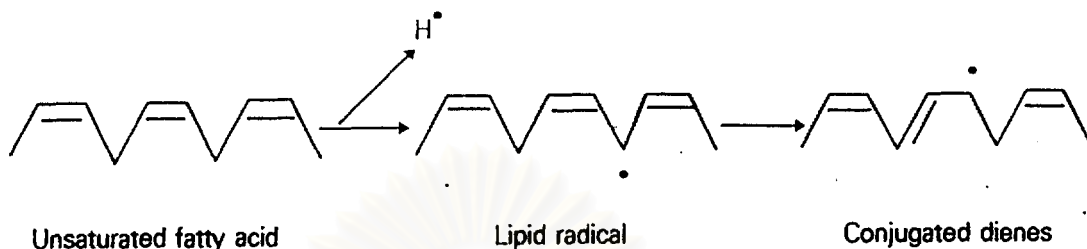
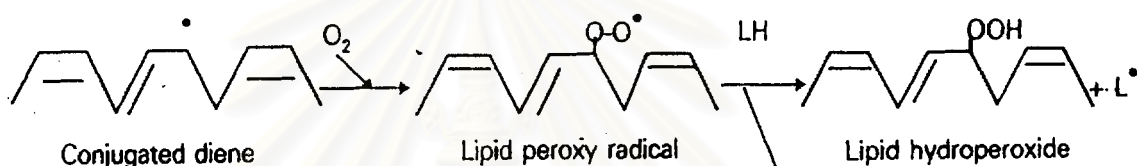
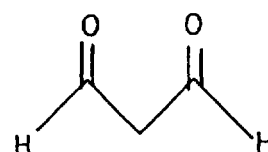
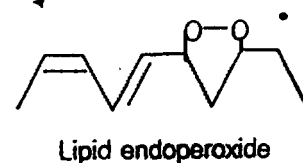
(Hanstein, 1976)

Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ lipid โดยการออกซิเดชันของ unsaturated fatty acids ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์สูญเสียรูปทรง ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ (Haraguchi et al, 1995) เป็นการบาดเจ็บของเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะและสามารถทำให้เกิด liver necrosis, ischemia-reperfusion injury, coronary arteriosclerosis, และ diabetes mellitus เป็นต้น ซึ่งการเกิดขึ้นนี้จะนำไปตามการสร้าง free radical ในเซลล์เนื้อเยื่อนั้นๆ และ lipid peroxidation นั้นมีกระบวนการที่ประกอบด้วยกันหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Buege and Aust, 1978) (รูปที่ 16)

1.) initiation : เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเมตาบอลิซึมของสารพิษบางชนิดซึ่งจะไปแย่งที่ของ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid (ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของ lipid ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้ไม่คงตัว สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเคลื่อนที่ของพันธะคู่ภายในโมเลกุลจนทำให้เกิด lipid radical ที่เป็น conjugated diene

2.) propagation : conjugated diene ที่เกิดขึ้นในช่วง initiation จะเกิดการรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิด lipid peroxy radicals ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้จะสามารถแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid ที่อยู่ใกล้เคียงได้ ทำให้เกิด lipid hydroperoxide และ lipid radicals ตัวใหม่ กระบวนการเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาได้ด้วยตัวเอง จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์เป็นวงกว้าง

3.) termination : เมื่อ lipid peroxidation ขยายวงกว้างไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีโมเลกุลของ unsaturated fatty acid เหลืออยู่ อนุมูลอิสระชนิดต่างๆก็จะทำปฏิกิริยากันเองจนกลายเป็น nonradical เป็นการหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดในกระบวนการ lipid peroxidation (Ernest and Frank, 1982; Ernest and Patricia, 1994) ผนังเซลล์ที่มีปริมาณ unsaturated fatty acid มาก มักเป็นเป้าหมายในการเกิด lipid peroxidation และการเกิด lipid peroxidation นี้มักทำให้ผนังเซลล์สูญเสียรูปทรงและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เกิดอันตรายต่อเซลล์นั้นๆ โดยตรง นอกจากนั้นผลของ lipid peroxidation ยังสามารถถูกตามไปยังอวัยวะอื่นๆซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน

Initiation**Propagation****Termination**

หมายเหตุ: LH = unsaturated fatty acid

L• = lipid radical

LOO• = lipid peroxy radical

รูปที่ 16 แสดงกระบวนการเกิด Lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978)

เนื่องจาก CU-763-15-13 เป็นสารสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสาร CU-763-10-01 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย (สุชาติพิท, 2539) และในการศึกษาเบื้องต้นพบว่า CU-763-15-13 มีผลยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ในกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท โดยฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่เพิ่มมากขึ้น (dose-dependent) ดังนั้นการศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของสารนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของสารตัวนี้ซึ่งยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยามาก่อนจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ CU-763-15-13 ต่อกระบวนการหายใจและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทำให้ทราบผลของ CU-763-15-13 ต่อกระบวนการหายใจและออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชันของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้
2. สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ CU-763-15-13 ต่อไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ และอาจนำข้อมูลที่ได้จากการทำวิจัยมาเป็นแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขตัวสารสังเคราะห์ต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย