

ผลของ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล จากเหง้าว่านชักมดลูก  
ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว



นางสาวพจณีย์ พวงไพโรจน์

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา      ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์      จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF 1,7-DIPHENYL-4,6-HEPTADIENE-3-OL FROM *CURCUMA COMOSA*  
RHIZOME ON FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER

Miss Potjanee Puangpairoj



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Science Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University



พจนีย์ พวงไพโรจน์ : ผลของ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล จากเหง้าว่านชักมดลูกต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. (EFFECTS OF 1,7-DIPHENYL-4,6-HEPTADIENE-3-OL FROM *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. วิทยา จันทสูตร, 129 หน้า.

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีสรรพคุณในตำรายาไทย เช่น แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยให้มีมดลูกเข้าอู่ ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ซึ่งเป็นสารสำคัญที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซน ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่า 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ขนาดตั้งแต่ 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ) ออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor ที่ complex I และ complex II โดยยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ใช้กลูตามาตร่วมกับมาเลต และซักซิเนตเป็นซับสเตรต ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration และค่า RCI ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (126.69  $\mu\text{M}$ ) สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้ ซึ่งถูกยับยั้งโดย oligomycin สาร 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ขนาดตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP และการหายใจที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้ ซึ่ง dithiothreitol ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย แสดงว่าการออกฤทธิ์ของ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ไม่เกี่ยวข้องกับ sulfhydryl groups ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย แต่ bovine serum albumin สามารถลดฤทธิ์การยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียได้ และ 1,7-ไดฟีนิล-4,6-เฮปตาไดอิน-3-อล ขนาดตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A มากกว่า MAO-B

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต..... พจนีย์ พวงไพโรจน์  
สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ. วิทยา จันทสูตร  
ปีการศึกษา.....2549.....

## 4876587533 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: 1,7-DIPHENYL-4,6-HEPTADIENE-3-OL / CURCUMA COMOSA / FUNCTIONS / MITOCHONDRIA

POTJANEE PUANGPAIROJ : EFFECTS OF 1,7-DIPHENYL-4,6-HEPTADIENE-3-OL FROM CURCUMA COMOSA RHIZOME ON FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT, 129 pp.

*Curcuma comosa* Roxb. is Thai medicinal plant belongs to the family Zingiberaceae. The rhizome has been used widely by traditional practitioners for treatment of postpartum uterine inflammation and also as an aromatic stomachic. In this study was designed to investigate the effect of 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol, a principle substance in the hexane extracted from *Curcuma comosa* rhizome on the functions of mitochondria isolated from rat liver. The results showed that 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol at dose  $\geq 10 \mu\text{g}$  ( $19.72 \mu\text{M}$ ) act as mitochondrial respiratory chain inhibitor both complex I and complex II. Because of inhibition of intact mitochondrial oxygen consumption with both glutamate plus malate and succinate as substrates. Significantly decreased state 3 respiration and respiratory control index (RCI). 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol at dose  $100 \mu\text{g}$  ( $126.69 \mu\text{M}$ ) significant stimulated the mitochondrial ATPase activity which was inhibited by oligomycin. In addition, 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol at dose  $\geq 25 \mu\text{g}$  ( $49.27 \mu\text{M}$ ) inhibited both DNP and  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated mitochondrial respiration. Dithiothreitol had no influence on the respiratory inhibition of 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol so that the effect of this compound did not involve on the sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane but the inhibitory effect on respiration was reduced by bovine serum albumin. The dose of 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol  $\geq 25 \mu\text{g}$  ( $49.27 \mu\text{M}$ ) inhibited both MAO-A and MAO-B activities, but inhibitory effect on MAO-A more potent than MAO-B.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....PHARMACOLOGY..... Student's signature...Potjanee Puangpairoj  
Field of study....PHARMACOLOGY..... Advisor's signature...Withaya Janthasoot  
Academic year.....2006.....



## กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และให้คำปรึกษาที่ดีเยี่ยม ตลอดจนคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัลย์ประเสริฐ หัวหน้าภาค วิชาเภสัชวิทยา ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวช ที่กรุณาให้สารทดสอบในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ และคำปรึกษา ตลอดจนการศึกษาระดับปริญญาโทมาบัณฑิต ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

และท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษา และให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆร่วมห้องวิจัย รวมทั้งบุคคลอื่นๆที่เกี่ยวข้องที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

หน้า

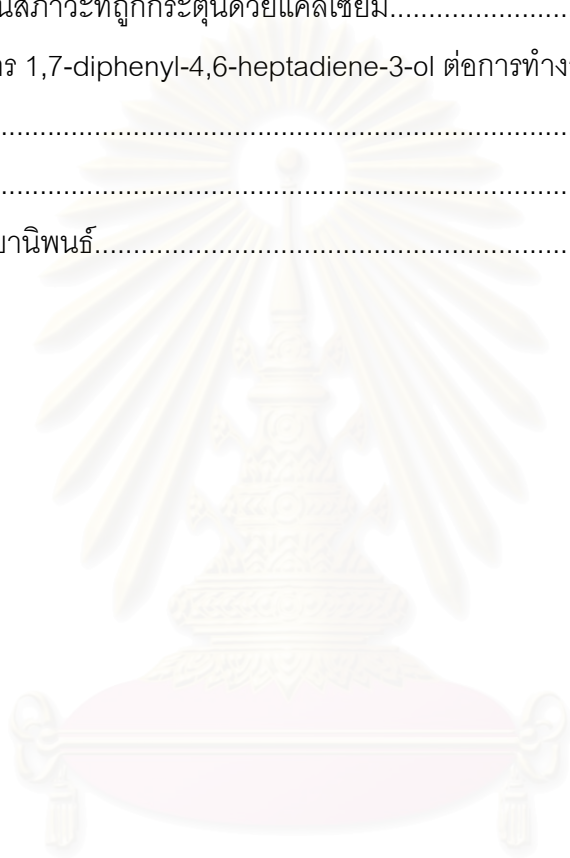
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ว่านชักมดลูก.....	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	5
องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหง้าว่านชักมดลูกสายพันธุ์ <i>Curcuma comosa</i> .....	6
สรรพคุณพื้นบ้านในตำรายาไทยของว่านชักมดลูก.....	6
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชักมดลูกสายพันธุ์ <i>Curcuma comosa</i> .....	7
การศึกษาทางพิษวิทยาของว่านชักมดลูกสายพันธุ์ <i>Curcumacomosa</i> .....	8
การหายใจของไมโตคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	9
ลักษณะและโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย.....	9
กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรีย.....	13
ส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ.....	15
การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ.....	18
Chemiosmotic theory.....	21
ATP synthase และการสังเคราะห์ ATP โดยไมโตคอนเดรีย.....	23

ความเป็นพิษต่อไมโตคอนเดรีย.....	24
การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโตคอนเดรีย.....	27
โมโนเอมีนออกซิเดส.....	29
multiple forms ของโมโนเอมีนออกซิเดส.....	29
ประโยชน์ในทางการแพทย์ของ monoamine oxidase inhibitors.....	31
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	32
วัสดุและอุปกรณ์.....	32
สัตว์ทดลอง.....	32
สารเคมี.....	32
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	33
วิธีการวิจัย.....	34
การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง.....	34
การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง.....	34
การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว.....	35
การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย.....	38
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	39
การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol	
ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	45
การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol	
ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	49
การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม.....	51
การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase.....	52
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	53
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	54
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	54



ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจออกซิเจน ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	55
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	56
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	56
ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	57
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	57
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase....	57
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	58
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	58
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A....	58
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B....	59
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง.....	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	101
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	101

ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	104
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม.....	105
ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO.....	105
รายการอ้างอิง.....	109
ภาคผนวก.....	116
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	129



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย.....	11
2. แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complex ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นใน ของไมโตคอนเดรีย.....	21
3. แสดงตัวอย่างข้อผิดพลาดของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส จากการศึกษาในหนูขาว.....	30
4. แสดงสัดส่วนสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอและชนิดบี ในแต่ละอวัยวะของหนูขาว.....	30
5. แสดงการแบ่งภาวะต่างๆของการหายใจของไมโตคอนเดรีย.....	41
6. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration, state 4 respiration และ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	117
7. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	118
8. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration, state 4 respiration และ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	119
9. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	120
10. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	121
11. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	122
12. แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	123

ตารางที่	หน้า
13. แสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	124
14. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase.....	125
15. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	126
16. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	127
17. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ MAO.....	128

## สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol.....	4
2. แสดงลักษณะของลำต้นเหนือดิน เหง้าและดอกของว่านชักมดลูก สายพันธุ์ <i>Curcuma comosa</i> .....	6
3. แสดงลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย.....	12
4. แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย.....	12
5. แสดงลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP).....	13
6. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Kreb's cycle, electron transport chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation.....	14
7. แสดงลักษณะโครงสร้างของ flavin mononucleotide (FMN) และ flavin adenine dinucleotides (FAD).....	16
8. แสดงการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Coenzyme Q.....	16
9. แสดงลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบ ของลูกโซ่การหายใจ และลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b และ c.....	17
10. แสดงการเปลี่ยนแปลง redox potential และ free energy ระหว่างขั้นตอน การขนส่งอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจ.....	20
11. แสดง chemiosmotic hypothesis และ electron transport chain.....	22
12. แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATPsynthase.....	24
13. แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation.....	27
14. แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย.....	28
15. แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation.....	37
16. แสดง Gilson Oxygen chamber.....	40
17. แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode.....	41
18. แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI.....	42
19. แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	44

รูปที่	หน้า
20. แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	60
21. แสดง oxygraph tracing ผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	61
22. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 4 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	64
23. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	65
24. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	66
25. แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	67
26. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	68
27. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 4 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	71
28. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	72
29. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	73
30. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต	



รูปที่	หน้า
(เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ก่อนเติม DNP).....	74
31. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังเติม DNP).....	77
32. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	80
33. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ก่อนเติม DNP).....	81
34. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังเติม DNP).....	84
35. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	87
36. แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	88
37. แสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	89
38. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase.....	90

39. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	92
40. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต.....	95
41. แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	96
42. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต.....	99
43. แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ MAO.....	100

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	=	adenosinetriphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	=	calcium ion
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
°C	=	degree celcius
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH <sub>2</sub>	=	reduced flavin adenine dinucleotide
g	=	gram
g	=	centrifugal force unit (gravity)
H <sup>+</sup>	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid
5-HT	=	5-hydroxytryptamine
IC <sub>50</sub>	=	median inhibitory concentration
kg	=	kilogram
LD <sub>50</sub>	=	mean lethal dose
M	=	molar
MAO	=	monoamine oxidase
MAO-A	=	monoamine oxidase A
MAO-B	=	monoamine oxidase B
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter

mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
mOsm	=	milliosmole
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
µM	=	micromolar
N	=	normality
NAD <sup>+</sup>	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
n atoms	=	nanoatoms
nm	=	nanometer
O	=	oxygen
Pi	=	inorganic phosphate
pmol	=	picromole
RCI	=	respiratory control index
rpm	=	revolution per minute
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent
<	=	less than

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ว่านชักมดลูกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma comosa* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ในประเทศไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยมีสรรพคุณพื้นบ้านในตำรายาไทย คือ ราก แก่ท้องอืดท้องเฟ้อ หัว แก่มดลูกพิการ ทำให้มดลูกเข้าอู่เร็วขึ้น ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ ช่วยย่อยอาหาร แก่ริดสีดวงทวารหนัก แก่เจ็บปวดเนื่องจากไส้เลื่อน (นราภรณ์ ฐานะโชติพันธ์, 2545) ในส่วนของเหง้าซึ่งเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ พบว่าประกอบด้วยสารที่สำคัญ 2 กลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่ม diarylheptanoids และ phloracetophenone glucoside (Jurgens และคณะ, 1994; Suksamrarn และคณะ, 1997)

สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ *Curcuma comosa* ที่น่าสนใจมีหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ฆ่าพยาธิตัวกลม (Jurgens และคณะ, 1994) ฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก (อนุกุล สวัสดิ์พานิชย์, 2537) ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat และคณะ, 1996) ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด (Piyachaturawat และคณะ, 2002) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Jantaratnotai และคณะ, 2006) เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเอาว่านชักมดลูกผสมเข้าไปในสูตรยาสตรีหลายสูตรด้วยกัน เนื่องจากมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Piyachaturawat และคณะ, 1995) และจากข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชักมดลูก ทำให้ทราบว่าว่านชักมดลูกมีศักยภาพน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น ใช้ลดคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เป็นต้น จากการศึกษาเพื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) และศึกษาหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยชนิดา โสมชันเงิน และวันสิริ ชื่นจิตกุลถาวร พบว่าสารสกัดจากเฮกเซนมีสารสำคัญ คือ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ซึ่งสามารถพบได้ในสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลอีกด้วย ซึ่งการนำว่านชักมดลูกมาใช้ประโยชน์นิยมสกัดด้วยเอทานอล จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้วย (ชนิดา โสมชันเงิน และวันสิริ ชื่นจิตกุลถาวร, 2548)

แต่ก่อนที่จะนำเอาสารเคมีต่างๆมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ ควรต้องมีการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารเคมีนั้นๆต่อการทำงานของระบบต่างๆของร่างกาย เพื่อให้มีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยามากที่สุดเท่าที่จะทำได้ และจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงผล

ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่สกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกสายพันธุ์ *Curcuma comosa* ที่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยในระดับออร์แกนิกส์ เช่น ไมโตคอนเดรีย ซึ่งไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกนิกส์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในการสร้าง ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็น high energy compound ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) ที่จะนำพลังงานไปใช้ในกระบวนการต่างๆของเซลล์ พลังงานดังกล่าวจะสังเคราะห์จากกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ซึ่งเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย (inner membrane) (Voetและคณะ, 1999) นอกจากนี้การทำหน้าที่ของไมโตคอนเดรียยังมีความเกี่ยวข้องกันในวิถีต่างๆระหว่าง mitochondrial metabolic routes กับกระบวนการอื่นของเซลล์โดยรวม ดังนั้นยาหรือสารเคมีต่างๆที่มีผลต่อ intramitochondria metabolic process หรือ transport pathways ที่เป็นจุดเชื่อมไมโตคอนเดรียกับไซโตซอลก็อาจมีผลต่อ cell metabolism ได้ด้วย ไมโตคอนเดรียจึงสามารถใช้เป็น ต้นแบบ (model) ในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารได้ และเนื่อง จากในตำราสมุนไพรไทย ได้มีการกล่าวถึงสรรพคุณทางยาของว่านชักมดลูกไว้ว่าสามารถนำมาใช้ชักมดลูกให้เข้าอุ้งหลังคลอด และมีการศึกษาว่าสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกได้ (อนุกุล สวัสดิ์พาณิชย์, 2537) ซึ่งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้นมีความเกี่ยวข้องกับแคลเซียมภายในเซลล์ ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เนื่องจากปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่าไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกนิกส์หนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการสะสมแคลเซียมและควบคุมการเปลี่ยนแปลง intracellular  $Ca^{2+}$  signaling ของเซลล์ (Carafoli, 2003; Devlin, 2002) ดังนั้นการศึกษาผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จึงอาจจะเป็นข้อมูลในการอธิบายกลไกการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ATP ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่สามารถอธิบายฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ/หรือพิษวิทยาของสารสกัดนี้ และอาจใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการอธิบายฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกได้



### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูก

ต่อกระบวนการหายใจ (ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน) การทำงานของเอนไซม์ ATPase และเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

### สมมติฐานของงานวิจัย

สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

### ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย
2. ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase
3. ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม
4. ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

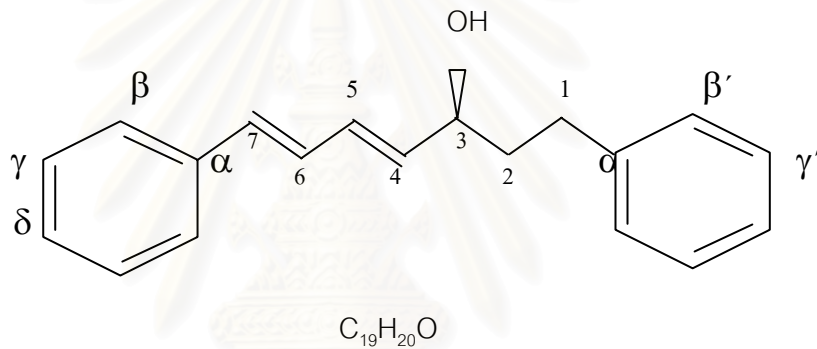
### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อกระบวนการหายใจ (ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน) การทำงานของเอนไซม์ ATPase และเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม รวมทั้งกลไกเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของสารต่อไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่นำมาศึกษาได้จากการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ด้วยเฮกเซน และศึกษาหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยชนิดา โสมขันทันเงิน และวันสิริ ขึ้นจิตกุลถาวร พบว่าสารสกัดจากเฮกเซนมีสารสำคัญ คือ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลว 80-82°C และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol (น้ำหนักโมเลกุล 264 )

เมื่อทำการวิเคราะห์สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าประกอบด้วยสารประกอบหลัก 4 ชนิด โดย 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol นี้ก็เป็นส่วนประกอบของสารสกัดว่านชักมดลูกในเอทานอลด้วย ซึ่งการนำว่านชักมดลูกมาใช้ประโยชน์สกัดด้วยเอทานอล จึงเป็นที่น่าสนใจว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้วย (ชนิดา โสมขันทันเงิน และ วันสิริ ขึ้นจิตกุลถาวร, 2548) ซึ่งการศึกษาวินิจฉัยนี้ เป็นการศึกษาถึงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูกต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ดังนั้นในบทนี้จะกล่าวถึงเรื่องของว่านชักมดลูก และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ และกล่าวถึงเรื่องของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ ทั้งในด้านลักษณะโครงสร้าง ส่วนประกอบและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ กระบวนการสร้าง ATP สารต่างๆที่มีผลรบกวนหรือเปลี่ยนแปลงการทำงานของ

ไมโตคอนเดรีย การขนส่งและการสะสมแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งหน้าที่และการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

### ว่านชักมดลูก

ว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ในประเทศไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ ว่านชักมดลูกเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่พบในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. และ *Curcuma comosa* Roxb. แต่สารบริสุทธิ์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้สกัดมาจากเหง้าของสายพันธุ์ *Curcuma comosa*

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ว่านชักมดลูกเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 1-2 เมตร มีเหง้าใต้ดินขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม เนื้อภายในสีเหลือง โดยว่านชักมดลูกที่ได้จาก *Curcuma comosa* จะเป็นสีเหลืองอ่อนออกม่วงเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นชนิด *Curcuma xanthorrhiza* จะเป็นสีเหลืองส้ม ทั้ง 2 ชนิดมีกลิ่นฉุนร้อน ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวเป็นกระจุกใกล้ราก ใบรูปขอบขนานแกมวงรี ถ้าเป็นชนิด *C. xanthorrhiza* ด้านล่างใบมีเส้นกลางใบสีม่วง และมีขนที่ท้องใบ ก้านใบสั้น แต่ถ้าเป็นชนิด *C. comosa* ด้านล่างใบมีเส้นกลางใบสีเขียวตลอด ไม่มีขน และมีก้านใบยาวกว่า ดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดินสีชมพู เกสรตัวผู้เป็นหมันสีขาว ใบประดับที่ไม่ได้รองรับดอกย่อยมีสีม่วง ส่วนใบประดับที่รองรับดอกย่อยมีสีเขียวอ่อน (ชนิดา โสมขันเงิน และ วันศิริ ขึ้นจิตกุลถาวร, 2548) (รูปที่ 2) สามารถจำแนกหมวดหมู่ตามพฤกษอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Liliopsida

Subclass: Commelinidae

Order: Zingiberales

Family: Zingiberaceae

Subfamily: Zingiberoideae

Tribe: Zingibereae

Genus: *Curcuma*

Species: *Curcuma comosa*

([http://www.en.Wikipedia.org/wiki/Curcuma\[2550](http://www.en.Wikipedia.org/wiki/Curcuma[2550), มีนาคม 20])



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของลำต้นเหนือดิน เหง้าและดอกของว่านชักมดลูกสายพันธุ์ *Curcuma comosa* ([http://www.ics.trieste.it/MedicinalPlant/-MedicinalPlant.aspx?id=18\[2550](http://www.ics.trieste.it/MedicinalPlant/-MedicinalPlant.aspx?id=18[2550), มีนาคม 20])

#### องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหง้าว่านชักมดลูกสายพันธุ์ *Curcuma comosa*

ส่วนเหง้าของ *Curcuma comosa* ประกอบด้วยสารที่สำคัญ 2 กลุ่ม ได้แก่ (1) สารกลุ่ม diarylheptanoids เช่น *trans*-1,7-diphenyl-5-hydroxy-1-heptene, *trans*-1,7-diphenyl-6-heptene-3-one-5-ol, *trans*-1,7-diphenyl-3-acetoxy-6-heptene, *trans*-1,7-diphenyl-6-heptene-3-one, *trans,trans*-1,7-diphenyl-1,3-heptadien-5-ol, 1,7-diphenyl-5-hydroxy-(1*E*)-1-heptene, 5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene, 7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene เป็นต้น (Jurgens และคณะ, 1994) (2) สารกลุ่ม acetophenones เช่น phloracetophenone glucoside (4,6-dihydroxy-2-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) acetophenone) เป็นต้น (Suksamrarn และคณะ, 1997)

#### สรรพคุณพื้นบ้านในตำรายาไทยของว่านชักมดลูก

ว่านชักมดลูกมีสรรพคุณพื้นบ้านในตำรายาไทย คือ ราก แก้ก้องอืดท้องเฟ้อ หัว แก้มดลูกพิการ ทำให้มดลูกเข้าอู่เร็วขึ้น ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ ช่วยย่อยอาหาร แก้กิดสีดวงทวารหนัก แก่เจ็บปวดเนื่องจากไส้เลื่อน วิธีการใช้ในตำรายาพื้นบ้าน คือ สำหรับคนคลอดบุตรใหม่ๆ แก่เจ็บปวดมดลูก ทำให้มดลูกเข้าอู่ ให้นำหัวมาตำ ดองด้วยสุรา รับประทานครั้งละไม่เกิน 2 ช้อนโต๊ะ และในผู้ชายที่เป็นไส้เลื่อน ใช้น้ำฝนกับสุราทาบริเวณที่เจ็บปวด (นราภรณ์ สุวานะโชติพันธ์, 2545)

## การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชักมดลูกสายพันธุ์ *Curcuma comosa*

### 1. ฤทธิ์ต่อพยาธิตัวกลม

สารประกอบในกลุ่ม diphenylheptanoids เช่น *trans*-1,7-diphenyl-5-hydroxy-1-heptene, *trans*-1,7-diphenyl-6-heptene-3-one-5-ol, *trans*-1,7-diphenyl-3-acetoxy-6-heptene, *trans*-1,7-diphenyl-6-heptene-3-one, *trans,trans*-1,7-diphenyl-1,3-heptadien-5-ol ที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนไหวนของพยาธิตัวกลม (Jurgens และคณะ, 1994)

### 2. ฤทธิ์ต่อมดลูก

สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกหนูขาวได้โดยไม่เจาะจงตัวรับสัมผัสใดๆที่กระตุ้นด้วยสารละลายชนิดต่างๆ เช่น oxytocin, acetylcholine, serotonin เป็นต้น (อนุกุล สวัสดิ์พาณิชย์, 2537) นอกจากนี้สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่ามีผลในการเพิ่มน้ำหนักมดลูก เหนี่ยวนำให้เกิดการหนาตัวของเยื่อบุผิวช่องคลอด และเพิ่มปริมาณไกลโคเจนในหนูขาว ซึ่งมีผลคล้ายกับการให้เอสตราไดออล (Piyachaturawat และคณะ, 1995)

### 3. ฤทธิ์ต่อการหลั่งน้ำดี

สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ตามขนาดสารสกัดที่ได้รับ หากได้รับสารสกัดในขนาดสูง (1,000 mg/kg) จะทำให้อัตราการไหลของน้ำดีเพิ่มขึ้น และพบปริมาณคอเลสเตอรอลในน้ำดีเพิ่มขึ้นด้วย (Piyachaturawat และคณะ, 1996) ซึ่งสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีคือ สารกลุ่ม phloracetophenone glucoside (Suksamrarn และคณะ, 1997) ต่อมามีการศึกษาผลของสารสังเคราะห์ phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone; THA) ต่อการไหลของน้ำดีและการหลั่งของไขมันในท่อน้ำดีในหนูขาวเพศผู้ พบว่าการฉีด THA ขนาด 10-150 mg/kg ทางลำไส้เล็ก มีผลเพิ่มอัตราการไหลของน้ำดีโดยขึ้นกับขนาดสารที่ได้รับ ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มการหลั่งน้ำดี และยังพบการลดลงของคอเลสเตอรอลในพลาสมาอีกด้วย (Piyachaturawat และคณะ, 1998) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ phloracetophenone analogues พบว่า THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้มากที่สุด (Piyachaturawat และคณะ, 2000)



#### 4. ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้

สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซน ขนาด 500 mg/kg เมื่อให้ทางกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 7 วัน ทำให้น้ำหนักของ testis, ventral prostate และ seminal vesicle ในหนูขาวเพศผู้ที่ยังโตไม่เต็มวัยลดลง นอกจากนี้ผลการตรวจพยาธิสภาพเนื้อเยื่อยังพบว่าเซลล์ที่ให้งำเนิดตัวอสุจิ (spermatogonium) ในหลอดที่ผลิตน้ำอสุจิ (seminiferous tubules) มีจำนวนลดลง และพบการตายของเซลล์เยื่อหุ้มในหลอดน้ำเลี้ยงอสุจิ (epididymis) (Piyachaturawat และคณะ, 1998) ในขณะที่การให้สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนในหนูขาวเพศผู้ที่ยังโตเต็มวัย ทำให้น้ำหนักของ testis, ventral prostate และ seminal vesicle ลดลง และทำให้ปริมาณความเข้มข้นและการเคลื่อนไหวของอสุจิใน cauda epididymis ลดลงด้วย (Piyachaturawat และคณะ, 1999)

#### 5. ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด

สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเอธิลอะซีเตต เมื่อให้ในหนูตะเภาเพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง มีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดได้ตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับ โดยสารสกัดขนาด 500 mg/kg เมื่อให้ทางกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเพิ่มระดับ high density lipoprotein (HDL) cholesterol และลดระดับ low density lipoprotein (LDL) cholesterol ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ (Piyachaturawat และคณะ, 1999) และการศึกษาโดยให้สาร THA ขนาด 300-600  $\mu\text{M}/\text{kg}$  ทางกระเพาะอาหาร วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน แก่หนูตะเภาเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง พบว่า THA สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้ตามขนาดและระยะเวลาที่ได้รับสาร (Piyachaturawat และคณะ, 2002)

#### 6. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซน สามารถลดการหลั่งไนตริกออกไซด์ใน rat microglial cell line ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ได้ (Jantaranotai และคณะ, 2006)

#### การศึกษาทางพิษวิทยาของว่านชักมดลูกสายพันธุ์ *Curcuma comosa*

การศึกษาผลพิษเฉียบพลันของสารกลุ่ม phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone; THA) ในหนูถีบจักร หนูขาว และหนูตะเภา พบว่าพิษเฉียบพลันของ THA ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง และวิธีการบริหารยา แต่ไม่ขึ้นอยู่กับเพศและอายุของสัตว์ทดลอง



โดยเมื่อฉีด THA ในขนาด 0.1-6 g/kg เข้าช่องท้องของหนูตะเภา หนูถีบจักร และหนูขาว ครั้งเดียว พบว่ามีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 338 mg/kg, 365 mg/kg และ 489 mg/kg ตามลำดับ และพบว่าการให้ทางกระเพาะอาหารจะมีค่า LD<sub>50</sub> สูงกว่าการให้ทางช่องท้อง ส่วนการศึกษาผลพิษกึ่งเฉียบพลันของ THA ในหนูถีบจักรเพศผู้ โดยให้ทางกระเพาะอาหารในขนาด 37-300 mg/kg นานติดต่อกัน 30 วัน พบว่า THA ในขนาดสูง (150 และ 300 mg/kg) เหนียวทำให้เกิด periportal hepatocyte degeneration แต่ความเข้มข้นของ alanine, aspartate aminotransferases, bilirubin, blood urea nitrogen และ hepatic triglyceride ในเลือดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Piyachaturawat และคณะ, 2002)

### **การหายใจของไมโทคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน**

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ (organelle) ที่พบได้ในเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด มีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในการสร้าง ATP (adenosine triphosphate) เนื่องจากมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่สำคัญต่างๆซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาการออกซิไดส์กรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิไดส์กรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle หรือ citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะให้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) (Avers,1986) โดยพลังงานดังกล่าว จะสังเคราะห์จากกระบวนการที่เรียกว่า ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ซึ่งเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (inner membrane)

### **ลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย**

ไมโทคอนเดรียจะมีขนาด รูปร่างและจำนวนแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เซลล์นั้นอยู่และขึ้นอยู่กับการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรียที่ตับจะมีลักษณะค่อนข้างกลม (nearly spherical) ส่วนไมโทคอนเดรียที่กล้ามเนื้อหัวใจมีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) และใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) ไมโทคอนเดรียที่เซลล์ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีจำนวนอยู่ระหว่าง 800-2,000 ไมโทคอนเดรีย แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วจะไม่มีไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2002) ส่วนขนาดของไมโทคอนเดรียโดยทั่วไป จะมีขนาดกว้างประมาณ 0.5  $\mu\text{m}$  และยาวประมาณ 1  $\mu\text{m}$  (Voet, 1995) และแม้ขนาด รูปร่างและจำนวนอาจแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ แต่จะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือ

ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น (รูปที่ 3) คือ

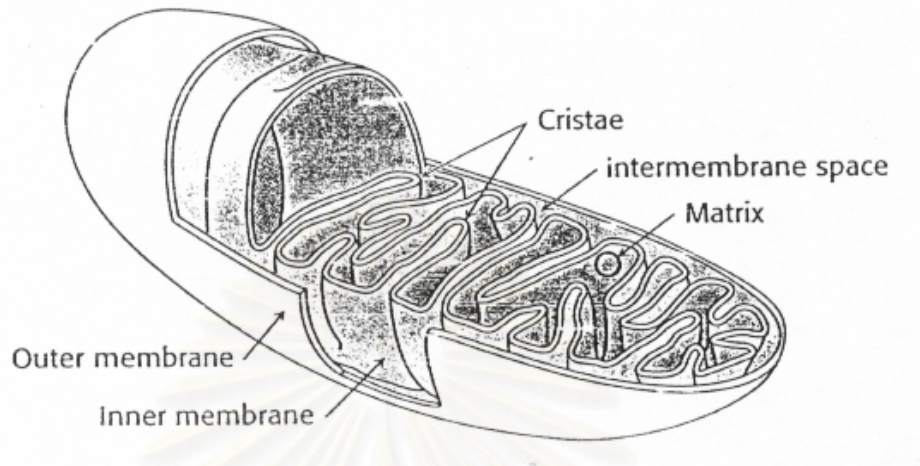
1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) มีลักษณะของผิวเรียบ (smooth และ unfold) ประกอบด้วยไขมัน 30-40%, โปรตีน 60-70% (Devlin, 2002) ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกนี้จะมีโปรตีนที่วางตัวทำให้เกิดช่องให้สารผ่านได้แบบไม่เฉพาะเจาะจงที่เรียกว่า porin อยู่ ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกมีคุณสมบัติยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 10,000 daltons ผ่านได้อย่างอิสระ (Voet, 1995) เช่น ADP, ATP, sucrose รวมทั้งอิออนต่างๆ นอกจากนี้ในโครงสร้างจะมีส่วนที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นใน เรียกว่า contact site และที่บริเวณนี้จะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition pore (PTP) (รูปที่ 4,5) ซึ่งในสภาพที่เปิดจะยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจนถึงน้ำหนักโมเลกุล 1,500 daltons สามารถผ่านเข้าออกระหว่าง matrix กับไซโตพลาสซึมอย่างอิสระ โดยปัจจัยที่จะทำให้ PTP เปิดได้ เช่น แคลเซียมที่สะสมอยู่ในไมโทคอนเดรีย สภาวะที่มี mitochondrial transmembrane potential ต่ำ เอนไซม์สำคัญที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก คือ monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Szewczyk และ Wojtczak, 2002) ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นในเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายใน

2. เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) จะมีความยืดหยุ่น (elastic) และมีพื้นที่ผิวมากกว่าเยื่อหุ้มชั้นนอก เนื่องจากเยื่อหุ้มชั้นในนี้จะพับไปพับมา (fold) ยื่นเข้าไปในส่วนของ matrix ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เยื่อหุ้มชั้นในจะประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80% มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอิออนต่างๆผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่จะยอมให้เฉพาะ  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$  และ  $NH_3$  ผ่านเข้าออกอย่างอิสระ ส่วนสารจำพวก hydrophilic metabolites และ inorganic ions ที่สำคัญต่อกระบวนการชีวเคมีของเซลล์จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มชั้นในได้โดยอาศัย specific channels และ carrier proteins ที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นใน นอกจากนี้ที่เยื่อหุ้มชั้นในยังมีเอนไซม์ต่างๆที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น respiratory chain enzymes และ ATP synthase

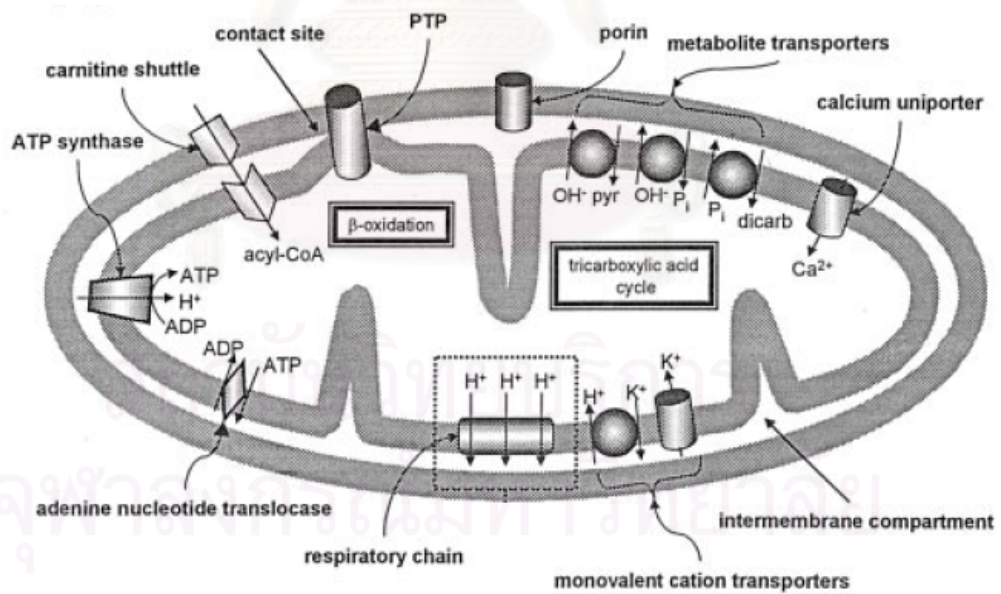
ส่วนภายในไมโทคอนเดรียจะเรียกว่า matrix มีลักษณะเป็นของเหลวข้นคล้ายวุ้น (gel) ภายในจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ ยกเว้นเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งจะอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เอนไซม์ต่างๆในกระบวนการ fatty acid oxidation นอกจากนี้ยังมี mitochondrial DNA (mtDNA), ribosome และโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการ transcription ของ mtDNA และกระบวนการ translation ของ mRNA (Devlin, 2002; Szewczyk และ Wojtczak, 2002) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2006)

Outer Membrane	Intermembrane Space	Inner Membrane	Matrix
Monoamine oxidase	Adenylate kinase	Succinate dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase complex
Kynurenine hydroxylase	Nucleoside diphosphate kinase	F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP synthase	Citrate synthase
Phospholipase A	Creatine kinase	$\beta$ -Hydroxybutyrate dehydrogenase	Isocitrate dehydrogenase
Fatty acyl-Co A Synthetases		Cytochromes <i>b</i> , <i>c</i> <sub>1</sub> , <i>c</i> , <i>a</i> , <i>a</i> <sub>3</sub>	$\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase complex
NADH: cytochrome- <i>c</i> reductase (rotenone-insensitive)		Carnitine: acyl-CoA transferase	Aconitase
Choline phosphotransferase		Adenine nucleotide Translocase	Fumarase
		Mono-, di-, และ tricarboxylate transporters	Succinyl-CoA synthetase
		Glutamate-aspartate transporters	Malate dehydrogenase
		Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	Fatty acid $\beta$ -oxidation system
			Glutamate dehydrogenase
			Glutamate-oxaloacetate transaminase
			Ornithine transcarbamoylase
			Carbamoyl phosphate synthetase I
			Heme synthesis enzymes



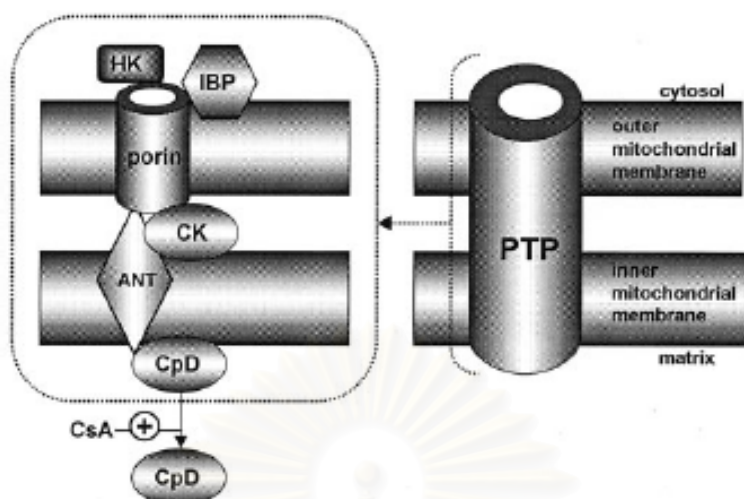
รูปที่ 3 แสดงลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Berg และคณะ, 2001)



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย

(Szewczyk และ Wojtczak, 2002)



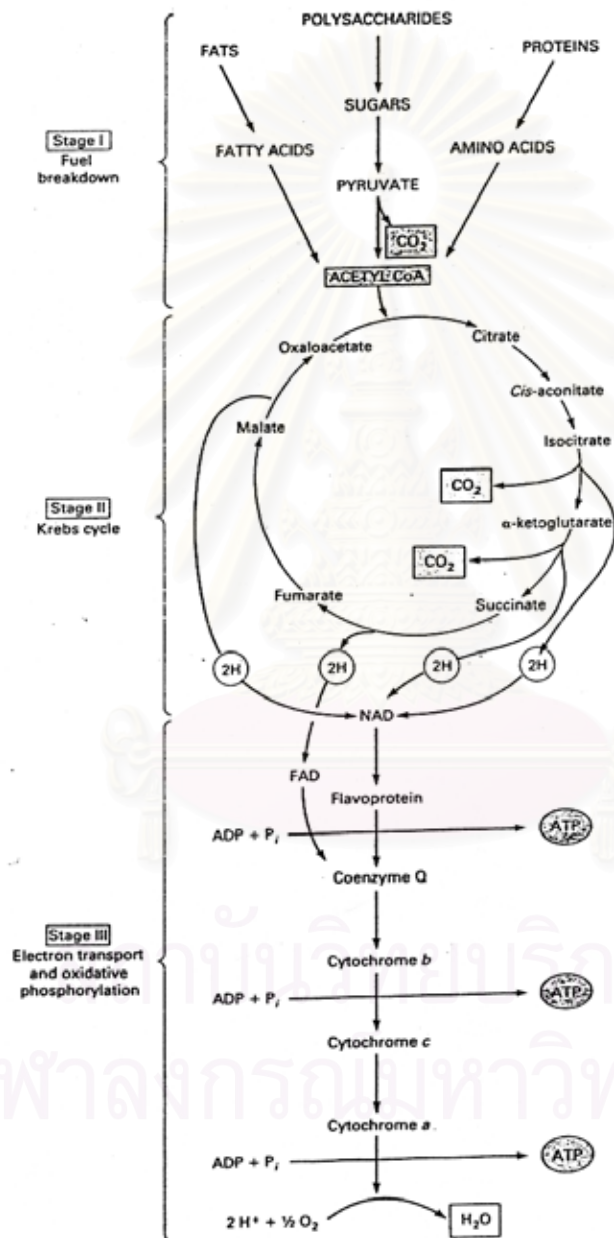


รูปที่ 5 แสดงลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP) ภาพด้านขวา แสดงให้เห็นว่า PTP จะอยู่บริเวณ contact site ซึ่งเชื่อมระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอกของ ไมโทคอนเดรีย ส่วนภาพด้านซ้ายแสดงให้เห็นส่วนประกอบบริเวณ contact site ได้แก่ peripheral benzodiazepine receptor, HK : hexokinase, ANT : adenine nucleotide translocase, CK : creatine kinase (พบในไมโทคอนเดรียของเซลล์กล้ามเนื้อ), CpD : cyclophilin D (เป็นบริเวณที่ cyclosporine A มาจับได้) (Szewczyk และ Wojtczak, 2002)

### กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรีย

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรียนั้น เริ่มจากเมื่อร่างกายได้รับสารอาหารที่ให้พลังงานจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน สารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยได้เป็น monosaccharide ที่สำคัญคือ กลูโคส โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการ glycolysis ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทำให้ได้เป็น pyruvate จากนั้น pyruvate จะผ่านเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ภายในไมโทคอนเดรีย pyruvate จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปได้เป็น Acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ส่วนไขมันจะถูกย่อยได้เป็นกรดไขมัน จากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการต่างๆได้เป็น Acetyl CoA เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ และสำหรับโปรตีนเมื่อถูกย่อยแล้วจะได้กรดอะมิโน ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกนำไปสร้างเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของร่างกาย ส่วนที่เกินความต้องการจะถูกนำไปสร้างเป็นกลูโคสหรือกรดไขมันเก็บสะสมในร่างกาย หรืออาจถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น Acetyl CoA แล้วส่งเข้าสู่วัฏจักรเครปส์เช่นเดียวกัน (รูปที่ 6) หลังจากการเปลี่ยนแปลงโดยวัฏจักรเครปส์จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมีไฮโดรเจน ( $H^+$ ) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ไปรีดิวซ์ (reduce)  $NAD^+$  และ FAD กลายเป็น  $NADH$  และ  $FADH_2$  ตามลำดับ ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญ

จากนั้น NADH และ FADH<sub>2</sub> จะถ่ายทอด reducing equivalent ไปให้ O<sub>2</sub> โดยอาศัย respiratory chain หรือ electron transport chain ที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย พลังงานที่เกิดขึ้นจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะถูก ATP synthase นำไปสร้าง ATP จาก ADP และ P<sub>i</sub> วิธีการสร้าง ATP นี้เรียกว่า ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (Garrett และ Grisham, 1999; Lodish และคณะ, 2004)



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs cycle, electron transport chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (Avers, 1986)



## ส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain)

Electron transport chain หรือ respiratory chain ในไมโทคอนเดรียประกอบด้วยตัวขนส่งอิเล็กตรอนชนิดต่างๆ จัดเรียงตัวกันอยู่ในรูปของ complex ต่างๆ 4 complex อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH และ  $\text{FADH}_2$  ไปยังออกซิเจน แต่ละ complex ประกอบด้วยเอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอน ตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่มี prosthetic group และโปรตีนโครงสร้างที่ทำให้ complex คงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้ยังมีตัวขนส่งอิเล็กตรอนขนาดเล็กทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex ได้แก่ cytochrome c และ coenzyme Q หรือ ubiquinone (พัชรา วีระกะลัส, 2544) ซึ่งตัวขนส่งอิเล็กตรอนใน electron transport chain ได้แก่ (Garrett และ Grisham, 1999; Zubay, 1993)

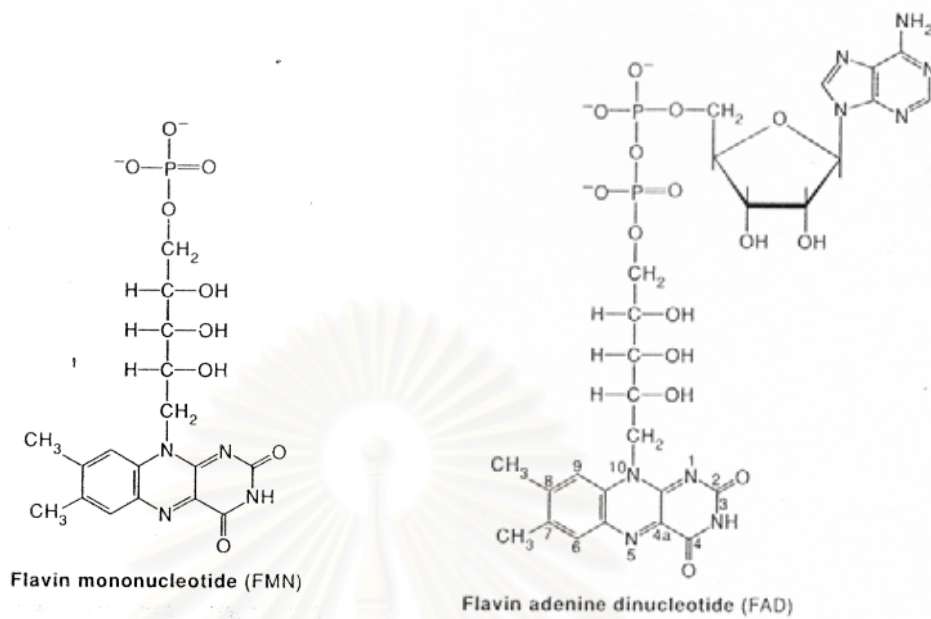
1. Flavoprotein เป็นโปรตีนที่มี prosthetic group เชื่อมอยู่ ซึ่ง prosthetic group ได้แก่ Flavin mononucleotide (FMN) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex I และ flavin adenine dinucleotides (FAD) เป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex II (รูปที่ 7)

2. Coenzyme Q หรือ ubiquinone (CoQ หรือ UQ) เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถเคลื่อนที่ได้ในชั้นไขมัน ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex I, II และ III (รูปที่ 8)

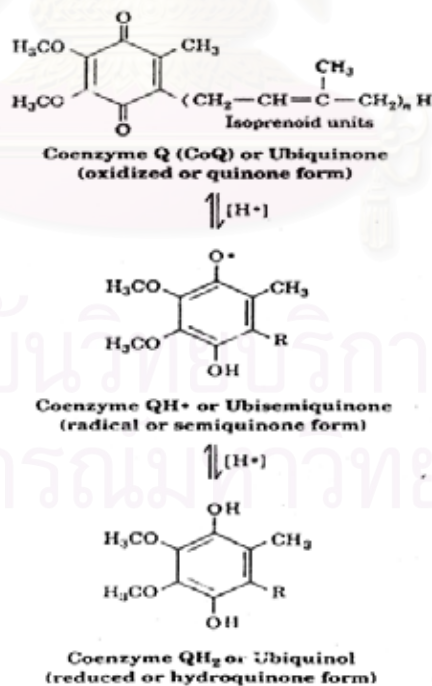
3. Cytochrome เป็นโปรตีนที่มี heme เป็น prosthetic group ได้แก่ cytochrome b, c,  $c_1$ , a และ  $a_3$  ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนได้ครั้งละ 1 ตัว โดย cytochrome เมื่ออยู่ในสภาพออกซิไดส์ โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์ริก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนมา 1 ตัวจะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพเฟอร์ริส โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์รัส ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ซึ่งเมื่อส่งอิเล็กตรอนไป 1 ตัว ก็จะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพออกซิไดส์ตามเดิม (รูปที่ 9)

4. Iron-sulfur protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบ แต่เหล็กไม่ได้อยู่ในรูป heme เหมือนกับ cytochrome แต่ใน Fe-S อะตอมของเหล็กจะจับอยู่กับอะตอมของซัลเฟอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์แล้วเกิดเป็น Fe-S center การส่งรับอิเล็กตรอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{3+}$  (รูปที่ 9)

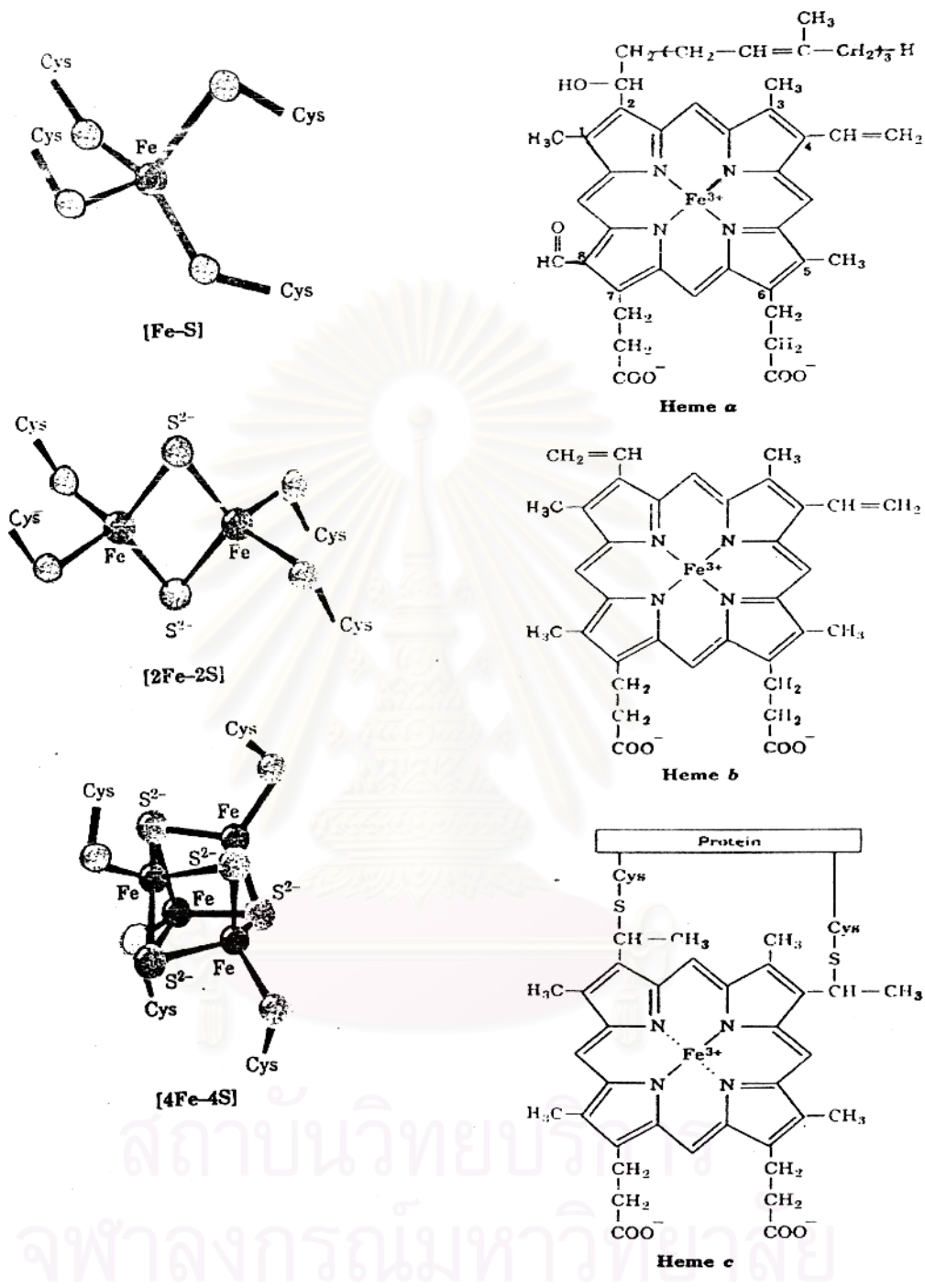
5. Protein-bound copper จะขนส่งอิเล็กตรอนครั้งละ 1 อิเล็กตรอน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง  $\text{Cu}^+$  และ  $\text{Cu}^{2+}$



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



รูปที่ 8 แสดงการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Coenzyme Q (Voet, 1995)



รูปที่ 9 ด้านซ้ายแสดงลักษณะโครงสร้างของ iron-sulfur protein แต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ ส่วนด้านขวาแสดงลักษณะโครงสร้างของ Heme a, b และ c ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ cytochrome a, b และ c ตามลำดับ (Voet, 1995)

ซัพสเตรตที่ไม่โตคอนเดรียสามารถออกซิไดส์ และทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆของลูกโซ่การหายใจแบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. NAD<sup>+</sup>-linked substrates เช่น glutamate, malate, pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นซัพสเตรตที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรียโดยวัฏจักรเครปส์จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H<sup>+</sup>) ไปรีดิวซ์ NAD<sup>+</sup> ได้เป็น NADH + H<sup>+</sup> ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex I

2. FAD-linked substrates ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนอะตอม (2H<sup>+</sup>) ที่ปลดปล่อยออกมาจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น FADH<sub>2</sub> ให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Mathews และคณะ, 1990; Lehninger และคณะ, 2000)

### การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Devlin, 2002; Voet, 1995)

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ เป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชัน (oxidation-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับ ตามค่า redox potential (E<sub>0</sub>) ของสารตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H<sup>+</sup> กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 10) โดยในตอนแรกซัพสเตรตที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงสารอาหารที่ให้พลังงานต่างๆจะอยู่ในสภาพถูกรีดิวซ์ จากนั้นจะถูกออกซิไดส์โดยจะส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD<sup>+</sup> และ FAD กลายเป็น NADH และ FADH<sub>2</sub> ซึ่งจะส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้กับ complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งประกอบด้วย 4 complex (ตารางที่ 2) ดังนี้

1. complex I หรือ NADH dehydrogenase หรือ NADH-ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดส์ NADH ที่อยู่ใน matrix ของไมโทคอนเดรีย แล้วส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ coenzyme Q โดยเริ่มแรก FMN จะรับอิเล็กตรอนจาก NADH จากนั้นจะส่งต่อไปให้ Fe<sup>3+</sup> ใน Fe-S protein ซึ่งอิเล็กตรอนจาก Fe-S protein ก็จะถูกส่งต่อไปยัง coenzyme Q

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

3. complex III หรือ cytochrome bc<sub>1</sub> complex หรือ ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase ประกอบด้วย cytochrome b, cytochrome c<sub>1</sub> และ iron-sulfur protein ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก coenzyme Q ไปยัง cytochrome c ซึ่ง cytochrome c เป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic protein ขนาดเล็ก อยู่บนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน เมื่อ cytochrome c จับกับ complex III จะได้รับอิเล็กตรอนทำ

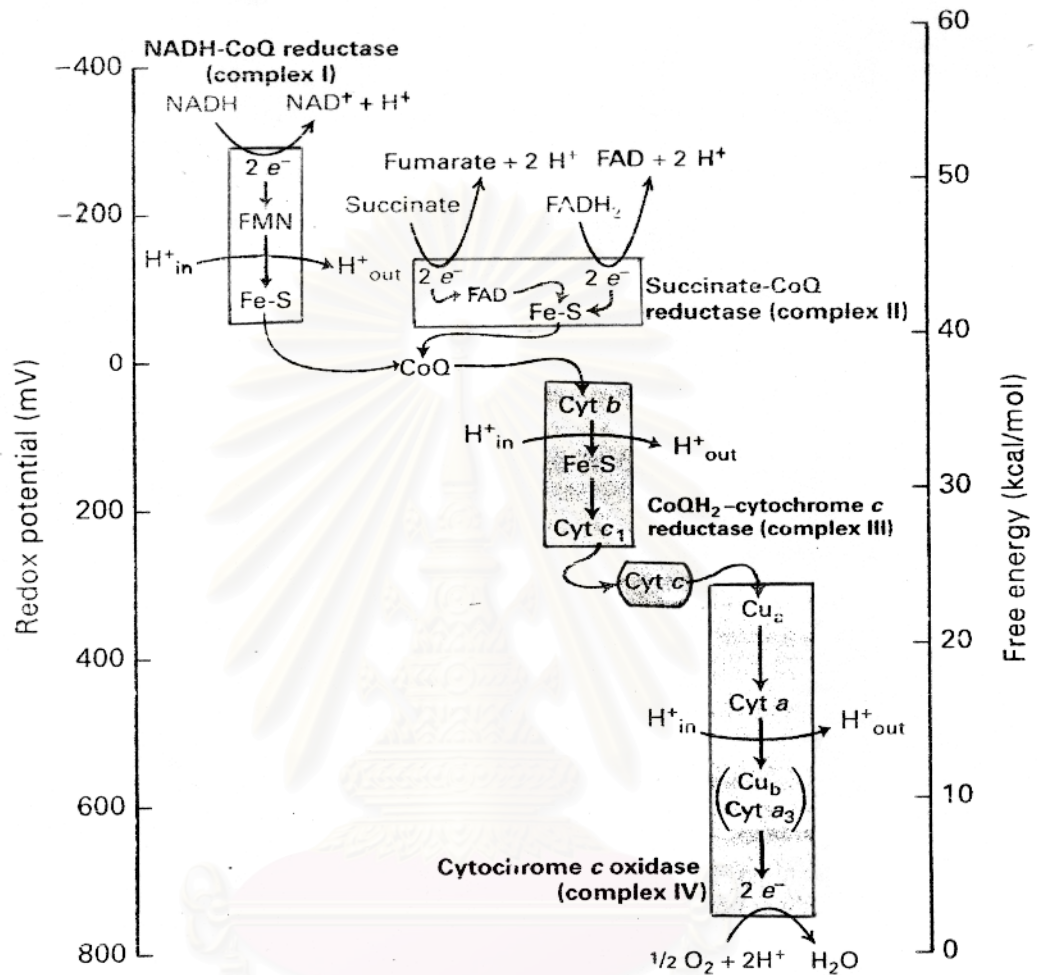
ให้กลายเป็น reduced cytochrome c จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามผิวของเยื่อหุ้ม จับกับ subunit II ของ complex IV หรือ cytochrome c oxidase แล้วส่งต่ออิเล็กตรอนให้  $\text{Cu}_A$  site

4. complex IV หรือ cytochrome c oxidase ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ โดยเริ่มจาก  $\text{Cu}_A$  รับอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ส่งต่อไปยัง cytochrome a และ cytochrome  $a_3$ - $\text{Cu}_B$  แล้วส่งให้ออกซิเจนในที่สุด

ในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ  $\text{FADH}_2$  ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเล็กตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylate ของ ADP กระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นนี้ เรียกว่า กระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ในลูกโซ่การหายใจจะมีอยู่ 3 ตำแหน่งที่การปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP คือ complex I, III และ IV ซึ่งตรงกับ site I, site II และ site III ตามลำดับ ในสภาวะปกติพบว่าการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณี ทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไม่โตคอนเดรียที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่ดีหรือเก็บนานเกินไป (aging mitochondria) หรือกรณีที่ไม่โตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ตัวอย่างเช่น DNP (2,4 dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดส์ซัพสเตรตในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็วโดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger และคณะ, 2000)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลง redox potential และ free energy ระหว่างขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจ (Lodish และคณะ, 2004)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



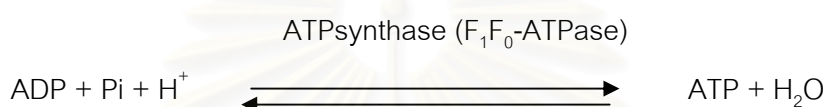
ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจ 4 complexes ที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Avers, 1986)

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

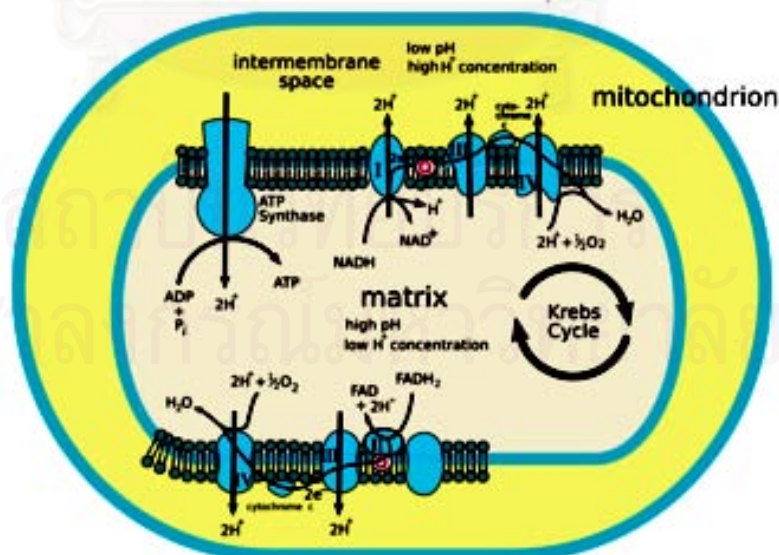
### Chemiosmotic theory

การสังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรีย จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีหลายทฤษฎีที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์นี้ แต่ทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับมากที่สุด คือ chemiosmotic hypothesis ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี 1961 ซึ่งได้เสนอไว้ว่า ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) โปรตอน (H<sup>+</sup>) จาก matrix ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างของประจุ

หรือเกิด proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ  $H^+$  ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเนื่องจาก  $H^+$  มีประจุบวก จึงทำให้มีความแตกต่างระหว่างประจุขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นใน ทำให้เกิด electrical gradient ซึ่งรวมเรียกว่า electrochemical proton gradient หรือ proton-motive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact ไมโตคอนเดรีย คือ สามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตอนได้ ซึ่ง electrochemical proton gradient จะเป็นส่วนที่ทำให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์ ATP จาก ADP และ  $P_i$  (รูปที่ 11) โดยโปรตอนจาก intermembrane space จะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทางเอนไซม์ ATPsynthase ( $F_1F_0$ -ATPase) เกิดการ phosphorylate ADP ทำให้ได้ ATP ดังสมการ



ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ระหว่างการ synthesis และ hydrolysis ซึ่งพบว่าสารใดก็ตามที่ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ของไมโตคอนเดรีย คือทำให้ oxidation และ phosphorylation แยกออกจากกัน เช่น uncoupler (DNP) จะมีผลทำให้ electrochemical proton gradient เสียไป ในสถานะเช่นนี้จะกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ซึ่งเป็นผลจาก ATPase activity ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถวัด ATPase activity ได้โดยการวัดปริมาณ  $P_i$  ที่เกิดจากการสลาย ATP (Danishefsky, 1980; Devlin, 2006; Lehninger และคณะ, 2000; Voet, 1995)



2

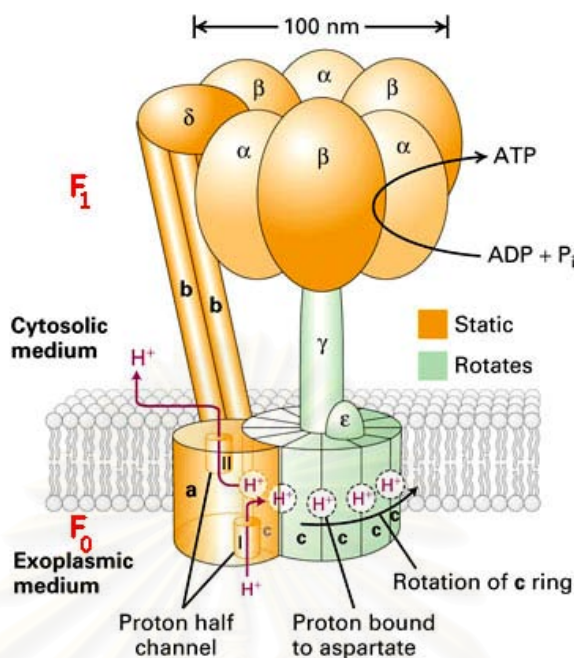
รูปที่ 11 แสดง chemiosmotic hypothesis และ electron transport chain (Lehninger และคณะ, 2000)

## ATP synthase และการสังเคราะห์ ATP โดยไมโทคอนเดรีย

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

เอนไซม์ ATP synthase หรือ  $F_1F_0$ -ATPase ซึ่งจัดว่าเป็น complex V ของลูกโซ่การหายใจ โครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าวจะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดย่อยรวมกัน (multisubunit protein) มีน้ำหนักโดยรวมมากกว่า 500,000 daltons โดยประกอบด้วย head protein ซึ่งเป็น ส่วนหัวของเอนไซม์ เรียกว่า  $F_1$  domain ( $F_1$  ATPase) ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนจำนวน 6 subunits ประกอบด้วย  $3\alpha$ ,  $3\beta$  และยังมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบย่อยอีก 3 ชนิดคือ  $\gamma$ ,  $\delta$  และ  $\epsilon$  ยื่นจาก ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียไปยัง matrix และส่วน  $F_0$  domain ซึ่งเป็น transmembrane  $H^+$  carrier ประกอบด้วยวงแหวนโปรตีน 10-14 subunits ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถหมุนได้ (rotor) จึง เรียกได้อีกอย่างว่า rotor ring ที่  $F_1$  domain จะมีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแขนยื่นยาวออกมา (elongated arm) ไปสัมผัสกับส่วน  $F_0$  domain ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า stator ขณะที่  $H^+$  เคลื่อนที่ผ่าน ช่องที่เกิดขึ้นระหว่างรอยสัมผัสของ rotor และ stator ทำให้เกิดการหมุนของ rotor ring ซึ่งการ หมุนนี้จะทำให้เกิดการหมุนของ rotating stalk อย่างรวดเร็ว ผลที่เกิดขึ้น คือ เกิดการเปลี่ยนรูป ของพลังงานที่เกิดจาก proton motive force เปลี่ยนไปเป็นพลังงานกล (mechanical energy) แล้วเปลี่ยนรูปอีกครั้งไปเป็นพลังงานเคมีโดยอาศัย head protein ซึ่งจะมี binding site สำหรับ ADP และ  $P_i$  เป็นตัวช่วยผลักดันให้เกิดการสร้าง ATP ซึ่งกระบวนการดังกล่าว เอนไซม์ ATP synthase สามารถสร้าง ATP ได้มากกว่า 100 โมเลกุลต่อวินาทีโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของ  $H^+$  ผ่านประมาณ 3-4 โปรตอนต่อการสร้าง ATP 1 โมเลกุล (รูปที่ 12) (Lehninger และคณะ, 2000; Alberts และคณะ, 2002; Garrett และ Grisham, 2002)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATPsynthase (Lodish และคณะ, 2004)

### ความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียมีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ ดังนั้นสารใดก็ตามที่รบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ก็จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ได้ ซึ่งสารพิษที่จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรีย อาจเกิดได้จากการไปยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ การไปรบกวนหรือไปทำลายการเกิด electrochemical proton gradient (รูปที่ 13) นอกจากนี้สารพิษที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียด้วยกลไกอื่น ๆ อีก ซึ่งสามารถแบ่งสารที่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ดังนี้

#### 1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Wallace และ Starkov, 2000; Devlin, 2002)

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

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

1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ complex III คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c เช่น myxothiazol (จากเชื้อ myxobacterium *Myxococcus fulvus*), antimycin A, funiculosin, zinc ion เป็นต้น

1.4 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ complex IV คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน โดยถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนได้แล้ว ยังทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้ซับสเตรตชนิดใดก็ตาม ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้ เช่น cyanide, azide, carbon monoxide เป็นต้น

## 2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP เช่น

- oligomycin และ dicyclohexycarbodiimide (DCDD) ออกฤทธิ์โดยไปจับกับโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในส่วน  $F_0$  ของเอนไซม์ ATPsynthase แล้วทำให้ไม่เกิดการไหลของโปรตอนผ่าน  $F_0$  มีผลทำให้โปรตอนบริเวณ intermembrane space มากจนทำให้การถ่ายทอดอิเล็กตรอนเกิดขึ้นต่อไปไม่ได้ (Garrett และ Grisham, 1999)

- atractyloside ออกฤทธิ์ยับยั้ง adenosine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP สำหรับการสังเคราะห์ ATP (Lenninger และคณะ, 2000)

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

- N-ethylmaleimide (NEM) หรือ mersalyl จะมีผลยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งทำให้ไมโทคอนเดรียขาด  $P_i$  เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้  $P_i$  ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Erecinska และ Wilson, 1981)

## 3. สารที่ออกฤทธิ์ uncoupling

สารในกลุ่มนี้เรียกว่า uncoupler สาร uncoupler จะออกฤทธิ์โดยทำให้โปรตอนที่อยู่ใน intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATPsynthase ดังนั้น gradient ของโปรตอนที่เคยมีอยู่นั้นก็จะสลายไป ซึ่งมีผลทำให้การถ่ายทอดอิเล็กตรอนและการสังเคราะห์



ATP ถูกแยกออกจากกัน กล่าวคือการถ่ายทอดอิเล็กตรอนยังคงเกิดขึ้นแต่จะไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP และทำให้พลังงานที่ได้รับจากสารอาหารถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนแทน (Garrett และ Grisham, 1999)

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

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

3.2 ionophores คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการผ่านเข้าออกของ  $H^+$  และ cation เช่น  $K^+$  ดังนั้นพลังงานที่ได้จาก electrochemical gradient จึงถูกนำมาใช้ ในการผลักดัน cation เข้าสู่ matrix แทน สามารถแบ่งสารในกลุ่มนี้ตามกลไกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

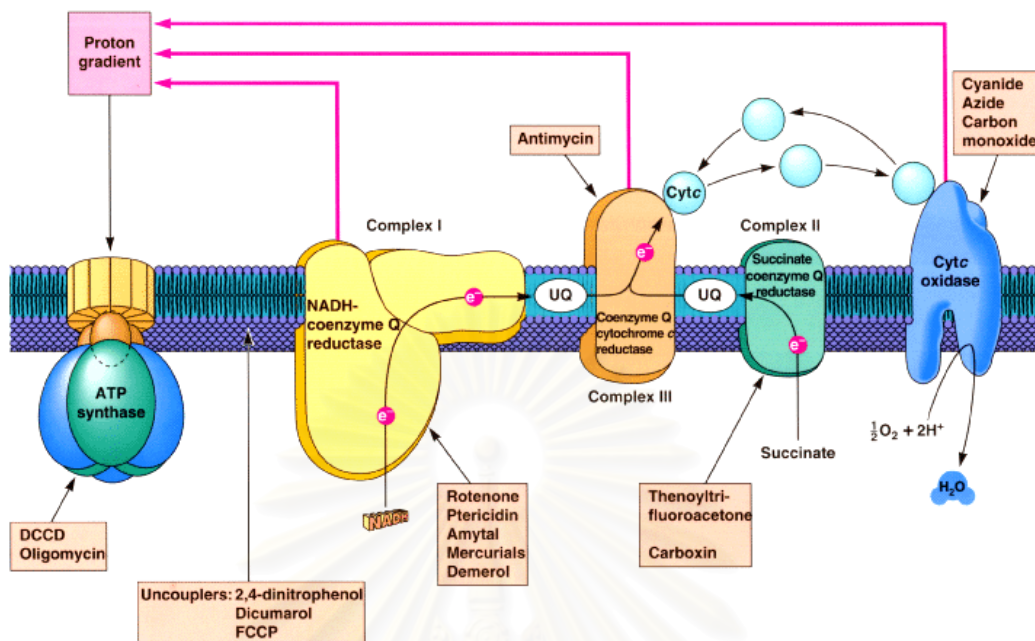
3.2.1 channel type สารในกลุ่มนี้จะเรียงตัวเป็นช่องในชั้นไขมันของไมโทคอนเดรีย เช่น gramicidin เป็นต้น

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

3.3 สารพวก phenols และ anionic aromatic compounds อื่นๆ สารกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid ทำให้สามารถจับกับ  $H^+$  ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน แล้วเคลื่อนที่เข้าไปใน matrix แยกตัวให้  $H^+$  ซึ่งการจับและการแยกตัวนี้เกิดจากการที่ด้านใน matrix จะมี pH สูงกว่าด้านนอก เช่น DNP (2,4-dinitrophenol), FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) เป็นต้น

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





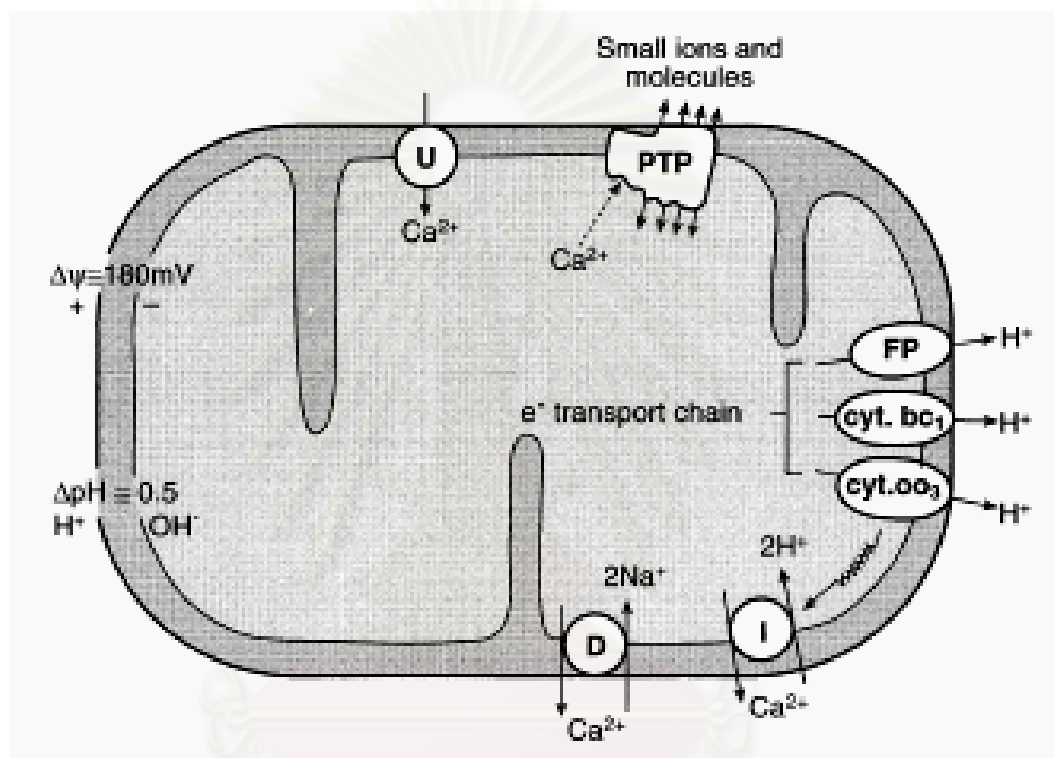
รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation (Garrett และ Grisham, 1999)

### การขนส่งและการสะสมแคลเซียมในไมโทคอนเดรีย

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

การขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง Ca uniporter ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และต้องอาศัย membrane potential ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ดังนั้นถ้าสารใดก็ตามไปมีผลทำลาย electrochemical potential ของไมโทคอนเดรีย เช่น uncoupler, respiratory chain inhibitor ก็จะทำให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียได้ สำหรับการขนส่งแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นได้หลายทาง (Bernardi, 1999; Carafoli, 2003) ดังนี้ (รูปที่ 14)

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



รูปที่ 14 แสดงการขนส่งแคลเซียมของไมโทคอนเดรีย

การขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นผ่านทาง Ca uniporter (U) ส่วนการขนส่งแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียจะเกิดขึ้นโดย  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  antiport system (I),  $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$  antiport system (D) และโดยอาศัย permeability transition pore (PTP) (Chakraborti และคณะ, 1999)

### โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase; MAO)

เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase; MAO) พบได้ทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง ตับ ลำไส้ และอวัยวะอื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เอนไซม์นี้จะอยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย โดยฝังตัวแน่นในลักษณะของ integral protein (Schnaitman และคณะ, 1967) เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารสื่อประสาทเอมีนต่างๆ เช่น epinephrine, norepinephrine, dopamine, tyramine และ 5-hydroxytryptamine (5-HT) เป็นต้น (Davison, 1958) ดังสมการ



เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณของสารเหล่านี้ในระบบประสาท นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมปริมาณสารเอมีนอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นยาหรืออาหารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกอีกด้วย

### **Multiple forms ของโมโนเอมีนออกซิเดส**

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่าเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส มี 2 isozymatic forms คือ MAO-A และ MAO-B ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรตและความไวต่อ inhibitor โดย MAO-A จะเด่นในการออกซิไดส์ serotonin ซึ่งเป็น neurotransmitters และสามารถออกซิไดส์ซับสเตรตบางชนิดได้เช่นเดียวกับ MAO-B ได้แก่ tyramine, adrenaline และ dopamine ส่วน MAO-B จะเด่นในการออกซิไดส์สารพวก arylalkylamines เช่น benzylamine และมีส่วนร่วมในการเมแทบอลิซึม exogenous amines (ตารางที่ 3) (Binda และคณะ, 2004; Houslay และ Tipton, 1976) สำหรับความไวต่อ inhibitor พบว่า MAO-A จะมีความไวในการยับยั้งด้วย clorgyline ส่วน MAO-B จะมีความไวในการยับยั้งด้วย pargyline (Urban และคณะ, 1991) อย่างไรก็ตาม ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรตและความไวต่อการยับยั้งของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสนี้ไม่เหมือนกันในสัตว์แต่ละชนิด และแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างบริเวณหรือต่างอวัยวะก็จะมีการกระจายของ isozymatic form ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสแต่ละ isozymatic form แตกต่างกัน ดังตัวอย่างในตารางที่ 4 ซึ่งแสดงสัดส่วนของสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสทั้งสองชนิดของหนูขาวในแต่ละอวัยวะ พบว่ามีสัดส่วนของ MAO-A และ MAO-B แตกต่างกัน โดยพบสมรรถนะของ MAO-A สูงที่สุดในส่วนของม้าม (spleen) ส่วนสมรรถนะของ MAO-B พบสูงที่สุดในส่วนของ denervated pineal gland

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างซับสเตรตของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส จากการศึกษาในหนูขาว (Houslay และ Tipton, 1976)

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

ตารางที่ 4 แสดงสัดส่วนสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอและชนิดบี ในแต่ละอวัยวะของหนูขาว (Houslay และ Tipton, 1976)

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

### ประโยชน์ในทางการแพทย์ของ monoamine oxidase inhibitors (MAOIs)

ประโยชน์ในทางการแพทย์ที่สำคัญของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส คือ การใช้เป็นยารักษาโรคซึมเศร้า เนื่องจากเมื่อมีการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส โดยเฉพาะชนิดเอ ในระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้เกิดการสะสมของระดับ monoamine transmitter ในสมองเพิ่มขึ้น MAOIs ตัวแรกที่นำมาใช้บรรเทาอาการซึมเศร้า คือ iproniazid โดยในราวปี 1957 ได้มีการค้นพบยานี้เพื่อนำมาใช้รักษาวัณโรค แต่ปรากฏว่าเมื่อใช้ยากับผู้ป่วยแล้วผู้ป่วยมีอาการซึมเศร้ามลดลง จึงได้มีการนำยานี้มาใช้รักษาผู้ป่วยโรคซึมเศร้าด้วย (Pletscher, 1966) และต่อมาก็มีการพัฒนา MAOI เพิ่มขึ้นอีกหลายตัว ซึ่งสามารถแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมีได้ 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ของ hydrazine เช่น phenelzine, isocarboxazid และอนุพันธ์ของสารอื่น (non-hydrazine) เช่น tranylcypromine

ปัญหาในการใช้ยากลุ่มนี้ คือ ถ้ารับประทานอาหารที่มีสารเอมีนสูง จะทำให้เกิดความดันโลหิตสูงอย่างเฉียบพลัน หรือ cheese reaction ได้ แต่เนื่องจากในลำไส้ของคนสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-B มากกว่า MAO-A ดังนั้นถ้ายามีความจำเพาะต่อ MAO-A มากกว่าก็น่าจะช่วยให้ผลข้างเคียงน้อยกว่ายา MAOI แบบไม่เฉพาะเจาะจง (Houslay และ Tipton, 1976) ดังนั้นจึงมีการพัฒนายาที่เป็น reversible inhibitor ของ MAO-A เช่น moclobemide และ brofaromine

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



## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### 1. วัสดุและอุปกรณ์

##### 1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200 – 250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม สัตว์ทดลองดังกล่าวจะถูกนำมาพักเพื่อปรับสภาพร่างกายก่อนนำมาทำการทดลอง อย่างน้อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  มีแสงสว่างพอเหมาะ จัดให้มีช่วงมืดและช่วงสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมงสลับกันในวัน มีระบบระบายอากาศ และเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด โดยเลี้ยงคู่สัตว์ทดลองด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และมีน้ำสะอาดให้กินอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง (*ad libitum*)

หมายเหตุ: จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละสภาวะการทดลองจะมีจำนวน 4 ตัว ต่อ 1 สภาวะการทดลอง ( $n=4$ ) โดยหนู 1 ตัว เมื่อเตรียมได้ไม่โตคอนเดรียแล้ว จะนำมาทดสอบกับสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ การเติม absolute ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน

##### 1.2 สารเคมี

###### แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

###### สารทดสอบ

สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จากแห่งร้านซั๊กมดลูก ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุท ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

###### สารเคมีอื่นๆ

สารเคมีจากบริษัท Sigma ได้แก่ adenosine 5' diphosphate (ADP), adenosine 5' triphosphate (ATP), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, ammonium molybdate, benzylamine hydrochloride, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), cupric sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ), 2,4-dinitrophenol (DNP), dithiothreitol (DTT), Folin&Ciocalteu's



phenol reagent, HEPES, 5-hydroxytryptamine (5-HT), L-glutamic acid, magnes<sup>33</sup> chloride ( $MgCl_2$ ), malic acid, oligomycin, potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic anhydrous ( $KH_2PO_4$ ), rotenone, sodium bisulfate, sodium hydroxide (NaOH), sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate monobasic, sodium potassium tartrate, sodium sulfite, succinic acid, sucrose, trichloroacetic acid (TCA), tyramine hydrochloride

สารเคมีจากบริษัท E. Merck ได้แก่ absolute ethanol, sodium carbonate anhydrous ( $Na_2CO_3$ ), sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ), hydrochloric acid (HCl), potassium hydroxide (KOH)

### 1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Heidolph motor drive tissue homogenizer (Type 50203 RZR 2)
2. Thomas glass homogenizer tube with teflon pestle
3. pH-meter
4. Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge, Himac model CR20B3, Rotor model RPR 18-3
5. Oxygraph
  - Biological Oxygen Monitor (YSI Model 53)
  - Clark Oxygen Electrode
  - Gilson Oxygen chamber
  - Strip chart recorder (Gilson recorder model N2)
  - Oxygen Probe Service Kit (YSI 5775) ประกอบด้วย
    - Clark-type membrane booklets (Std.)
    - $O_2$  Probe Solution: half saturated KCl solution
    - O-rings
6. Temperature controlled circulator water bath
7. UV / Visible spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)
8. Autometric pipette ขนาด 200, 1,000 และ 5,000  $\mu$ l (Gilson, France)
9. Hamilton microsyringe 10 และ 25  $\mu$ l
10. Vortex mixer (Velp. Scientifica, Europe)

## 2. วิธีการวิจัย

### 2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้อย่างน้อยของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ได้แก่ 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 2  $\mu$ l, 0.1 M ATP 150  $\mu$ l, 0.05-0.30 mg/ml BSA, 0.4 M CaCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l, 1.05 M DTT 2  $\mu$ l, 0.05 M DNP 2  $\mu$ l, 1 mM EGTA, 40 mM HEPES buffer (pH 7.2), 0.1 M 5-HT 10  $\mu$ l, 2.5% ammonium molybdate, 0.1 M benzylamine hydrochloride 10  $\mu$ l, 1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) 10  $\mu$ l, 0.5 M NaOH, 1 M succinate (pH 7.2) 10  $\mu$ l, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 92 mM KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 M sucrose, 20% w/v trichloroacetic acid และ 0.1 M tyramine hydrochloride 10  $\mu$ l

สารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่ สารทดสอบ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณที่ใช้ครั้งละ 10  $\mu$ l, 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l และ 5 mg/ml rotenone 2  $\mu$ l

ในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลาย 1 N KOH และ 1 N HCl

### 2.2 การเตรียม incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ และศึกษาผลของสารต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40 mM ( 60 mOsm)
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM (6 mOsm)
	KCl	92 mM (184 mOsm)
	(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm )	

ซึ่งเตรียมได้จาก HEPES buffer, pH 7.2	1 M ปริมาณ 2 ml
MgCl <sub>2</sub>	0.05 M ปริมาณ 2 ml
KCl	2.3 M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml จะได้เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 mOsm ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

2.2.2 incubation medium สำหรับการศึกษาค่าผลของสารต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

ประกอบด้วย :	HEPES buffer, pH 7.2	40 mM ( 60 mOsm)
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM (6 mOsm)
	KCl	92 mM (184 mOsm)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
ซึ่งเตรียมได้จาก	HEPES buffer, pH 7.2	1 M ปริมาณ 2 ml
	MgCl <sub>2</sub>	0.05 M ปริมาณ 2 ml
	KCl	2.3 M ปริมาณ 2 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.025 M ปริมาณ 2 ml

นำมาผสมรวมกัน และปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 50 ml ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

2.2.3 incubation medium สำหรับการศึกษากลไกของสารต่อการทำงานของ เอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรีย คือ 0.025 M inorganic phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.2

### 2.3 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธี Differential centrifugation ตามวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myer และ Slater (1957) เป็นผู้ดัดแปลงวิธีเล็กน้อย ทำการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate ของหนูขาวโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C โดยขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

#### ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

นำสลับหนูขาวด้วยอีเธอร์ แล้วทำ cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เทราดสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 100 ml ลงบนตับและช่องท้อง แล้วรีบตัดตับออกมาอย่างรวดเร็ว ล้างทันทีด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็นจัด ประมาณ 50 ml และล้างต่อด้วย homogenizing medium (ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2)) ที่เย็นจัด ล้างหลายๆครั้งจนหมดเลือด แช่ตับใน homogenizing medium ปริมาตรประมาณ 60-70 ml จากนั้นใช้กรรไกรตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างคราบเลือดและลิมเลือดอีกครั้งโดยใช้สารละลาย homogenizing medium หลังจากนั้นนำชิ้นตับเล็กๆแช่ใน homogenizing medium เทแบ่งใส่หลอด Thomas glass homogenizer ที่แช่เย็นจัด แล้วทำการ homogenize ด้วยเครื่อง Heidolph motor drive tissue homogenizer Type 50203 RZR 2 ประมาณ 6-7 ครั้ง จนกระทั่งได้ liver

homogenate ปริมาตรประมาณ 60-80 ml นำมาเทใส่หลอด centrifuge เพื่อนำไปปั่นแยกต่อไป  
ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่บรรจุอยู่ในหลอด centrifuge มาปั่นแยก (centrifuge) เพื่อให้ได้  
 ไมโทคอนเดรียโดยใช้ Hitachi Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model  
 CR 20B3 และใช้ rotor model RPR 18-3 ทำการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ (รูปที่ 15)

ครั้งที่ 1: นำ liver homogenate มาปั่นแยกที่  $600 \times g$  (2,500 rpm) เป็นเวลา 5 นาที  
 จากนั้นนำส่วนที่เป็น supernatant ใส่ในหลอด centrifuge หลอดใหม่ สำหรับส่วนที่เป็น pellets  
 ให้ทิ้งไป

หมายเหตุ : ส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้คือ mitochondria, microsome

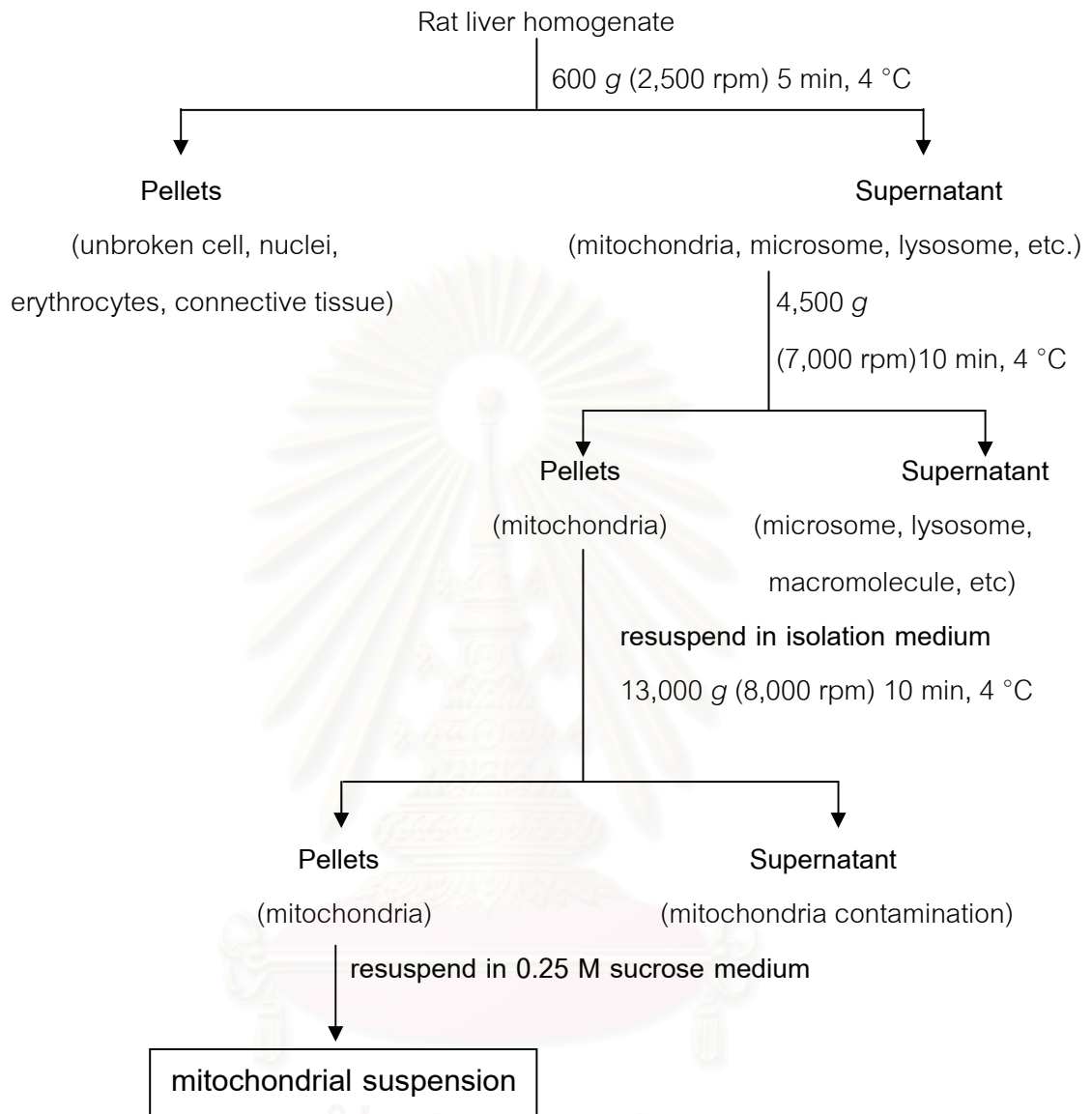
ส่วนที่เป็น pellets จะประกอบด้วย nuclei, red blood cells, cell wall, unruptured  
 cells

ครั้งที่ 2: นำส่วนที่เป็น supernatant มาปั่นแยกต่อที่  $4,500 \times g$  (7,000 rpm) เป็นเวลา  
 10 นาที เมื่อครบเวลาให้รินแยก supernatant fluid ทิ้งไป เอาเฉพาะส่วน pellets มา resuspend  
 ด้วย 0.25 M sucrose ที่แช่เย็น ทำการ homogenize ด้วยมือโดยใช้ glass homogenizer เพื่อให้  
 ตะกอนของไมโทคอนเดรียกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่ 3: นำมาปั่นแยกต่อที่  $13,000 \times g$  (8,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้  
 รินส่วน supernatant fluid ทิ้งไป ส่วนของ pellets นั้นจะมีชั้นของไมโครโซมสีชมพูเกาะกันอย่าง  
 หลวมๆ อยู่ชั้นบนของตะกอน ให้กำจัดออกโดยใช้ 0.25 M sucrose ที่แช่เย็นใส่ลงไปเล็กน้อย แล้ว  
 ค่อยๆ เทออกด้วยความระมัดระวัง ทำซ้ำจนกระทั่งชั้นของไมโครโซมเหลือน้อยที่สุด ส่วนชั้นล่างที่มี  
 สีน้ำตาลเกาะกันแน่นคือชั้นของไมโทคอนเดรีย จากนั้นทำการ resuspend ตะกอนไมโทคอนเดรีย  
 ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml แล้ว homogenize เบาๆ ด้วยมือ จะได้ mitochondrial  
 suspension โดยเก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (ice-bath) ตลอดการทดลอง

หมายเหตุ: ไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการวิจัยจะต้องมีค่า respiratory control index (RCI) มากกว่า 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้วิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955; Myers และ Slater, 1957)



## 2.4 การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

ปริมาณไมโทคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับหนูขาว สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณหรือความเข้มข้นของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียในการทดลองนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายต่างๆจะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

ขั้นตอนการปฏิบัติการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

1. เจือจาง mitochondrial suspension ปริมาณ 10  $\mu$ l ด้วยน้ำกลั่น 3 ml ( 1:300 ) จะได้สารละลาย A

2. ดูดสารละลาย A ปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reducing agent 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำกลั่น 1 ml ส่วนในกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A)

3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลานาน 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย มีหน่วยเป็น mg/ml

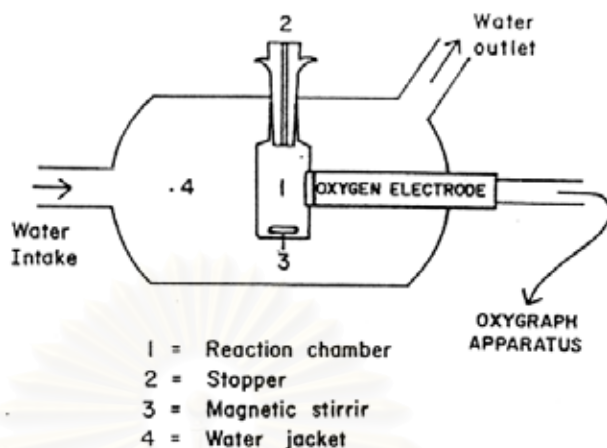
หมายเหตุ: การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วน ของ 0.5%  $\text{CuSO}_4$  ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วน ของ 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

- Folin - Phenol reagent ( 1:10 ) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin & Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 (v/v) และเตรียมใช้ทันที

## 2.5 การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

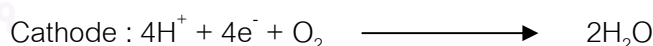
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson reaction chamber ซึ่งมีความจุประมาณ 2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีช่องสำหรับเติมสารต่างๆลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber สามารถติดตามดูอัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนด้วย Clark oxygen electrode ซึ่งต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับ reaction mixture ใน chamber และสัญญาณการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนใน reaction mixture ที่วัดโดย oxygen electrode จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor ซึ่งมีหน้าปัดบอกรายละเอียดปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ สามารถบันทึกอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนด้วย Gilson recorder (model N2) สามารถบันทึกผลที่ได้ออกมาบนกระดาษบันทึก ในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนในสภาวะต่างๆ เรียกว่า polarographic tracing หรือ oxygraph tracing โดยในระหว่างการวิจัยนั้น การ incubate ไมโตคอนเดรียกับสารต่างๆใน reaction chamber จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิใน reaction chamber ให้คงที่ที่  $37^\circ\text{C}$  โดยใช้ น้ำจากเครื่อง water bath ที่กำหนดอุณหภูมิไว้ ไหลผ่านเข้าและออกส่วน chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้ตลอดเวลา (รูปที่ 16 )



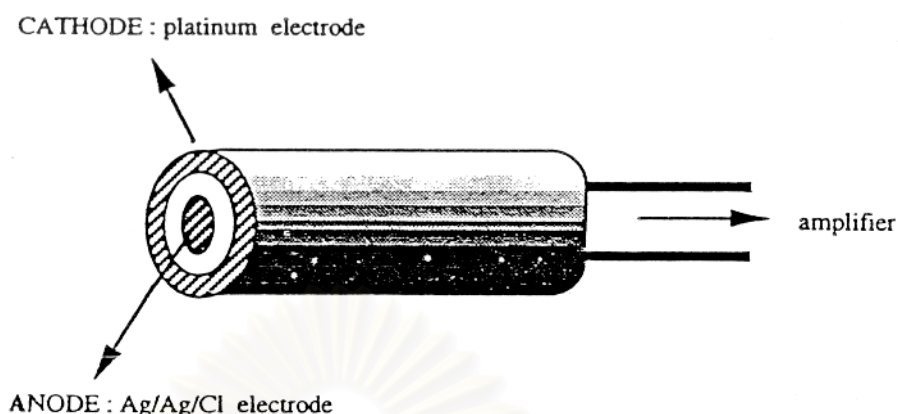
รูปที่ 16 แสดง Gilson Oxygen chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor และ recorder)

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะมีค่าที่ระดับ 100 % saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆ ลดลง วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode (รูปที่ 17) ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode เมื่อต้องการใช้งานจะใช้ half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ



ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 volts เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้นจะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้วเกิดขึ้น และกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว Cathode

#### การแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโทคอนเดรียมีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน ซับสเตรต ADP + Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance และ William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยาออกเป็น 6 ภาวะ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการแบ่งภาวะ (states) ต่างๆของการหายใจของไมโทคอนเดรีย

State	Condition
1	มีเพียง O <sub>2</sub>
2	มี O <sub>2</sub> และ ADP
3 (active state)	มี O <sub>2</sub> , ADP และ Substrate
3u	มี Uncoupler
4 (resting state)	มี O <sub>2</sub> และ Substrate
5	มีเพียง Substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess calcium

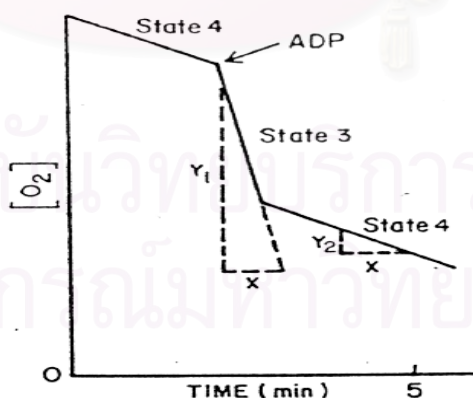
### การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index, RCI)

นอกจาก Chance และ William จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโทคอนเดรียเป็น ภาวะต่างๆดังกล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ซึ่ง ค่า RCI นี้แสดงถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือ เป็น intact mitochondria หรือไม่ ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีค่า RCI = 4-8 การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้ (รูปที่ 18)

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

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 19 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้งสอง states ยาวเท่ากัน ดังนั้น

$$\text{RCI} = \frac{Y_1/X}{Y_2/X} = \frac{Y_1}{Y_2}$$



รูปที่ 18 แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



### การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 19 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture

ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ในการทำปฏิกิริยา

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

การคำนวณค่า S จะหาได้จากค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวใน incubation mixture 1 ml หาได้จากสมการ

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

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 ml

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

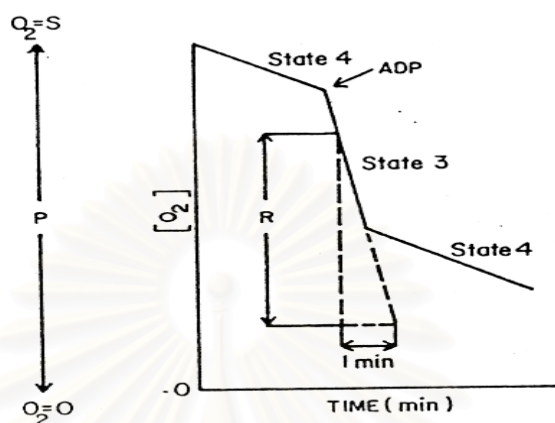
p = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

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

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

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย แล้วนำอาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีหน่วยเป็น  $n$  atoms O/min/mg protein



รูปที่ 19 แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน  $n$  atoms O/ml/min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 20 เช่นกัน

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน  $n$  atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมิตัวอยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ ที่  $37^{\circ}\text{C}$  ซึ่งค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ  $444.9 n$  atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆของoxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

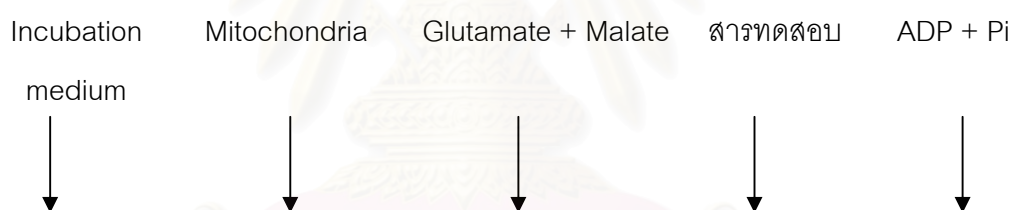
## 2.6 การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

2.6.1 การศึกษาผลของสารทดสอบ ( 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (NAD<sup>+</sup>-linked substrates)

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l

3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l



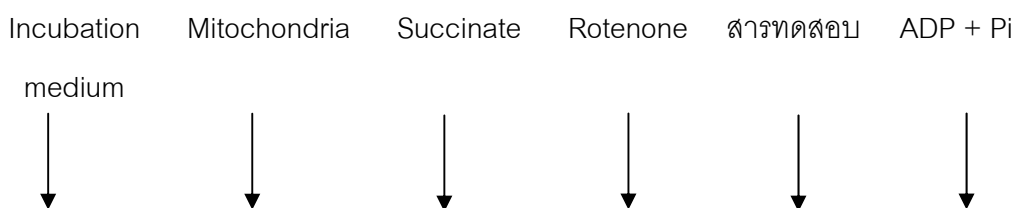
2.6.2 การศึกษาผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (FAD-linked substrate)

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

2) เติม complex I inhibitor คือ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l

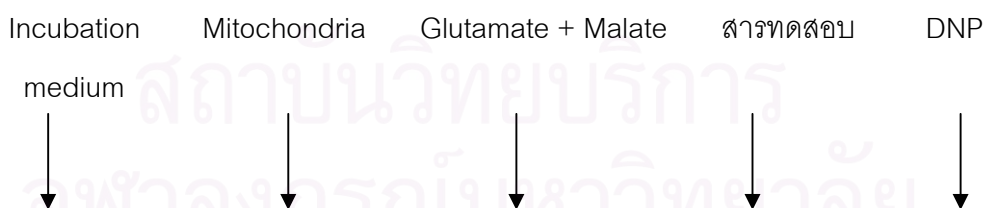
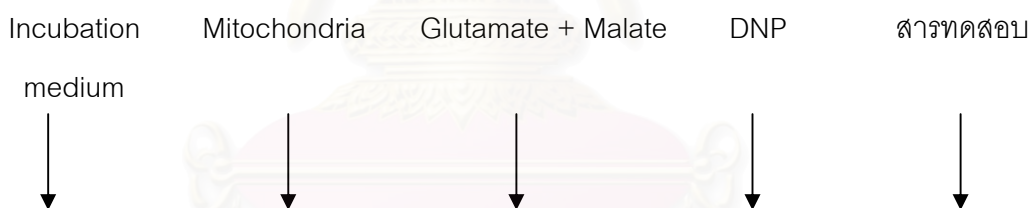


2.6.3 การศึกษาผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (NAD<sup>+</sup>-linked substrates)

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

2) เติมสาร uncoupler คือ 0.05M DNP ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l



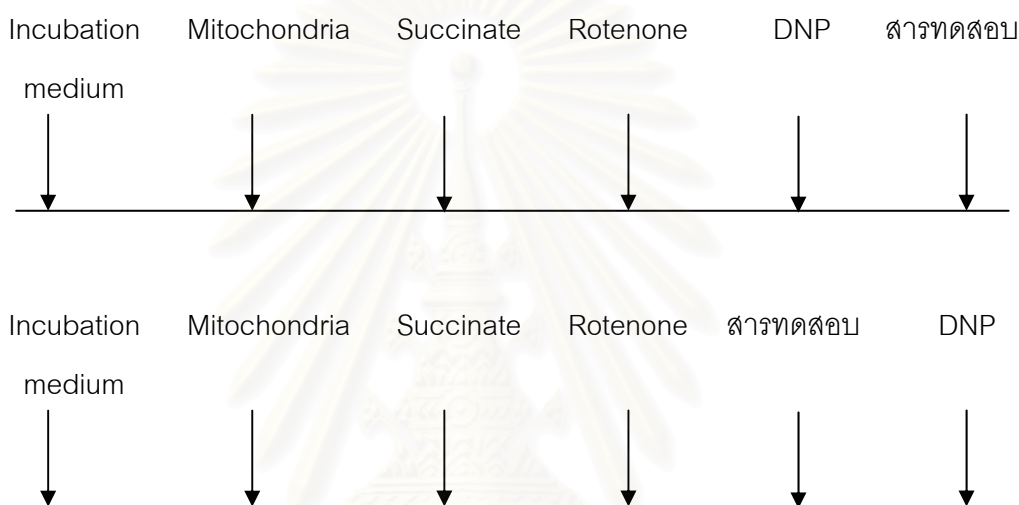
2.6.4 การศึกษาผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (FAD-linked substrate)

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

2) เติม complex I inhibitor คือ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l

3) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu$ l เพื่อทำให้เกิด state 3u respiration

4) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l



2.6.5 การศึกษาปัจจัยอื่นๆที่อาจเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย ได้แก่

2.6.5.1 การศึกษาผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

1) เติมซับสเตรต คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

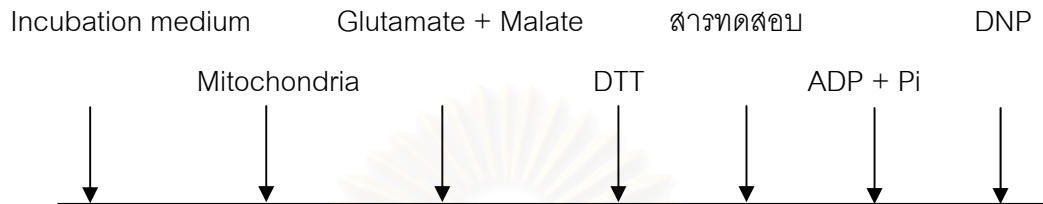
2) เติม 1.05 M DTT ปริมาณ 2  $\mu$ l

3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นที่ทำการศึกษามีปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มสารทดสอบที่ไม่เติม DTT

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มสารทดสอบที่ไม่เติม DTT



5) เติมสาร uncoupler คือ 0.05 M DNP ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มสารทดสอบที่ไม่เติม DTT



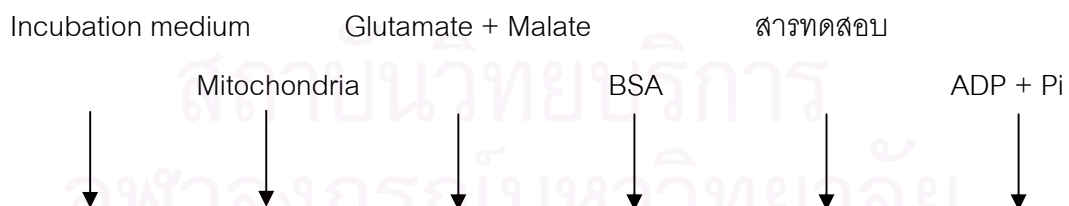
2.6.5.2 การศึกษาผลของ bovine serum albumin ( BSA ) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

1) เติมซับสเตรต คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

2) เติม BSA ขนาดต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

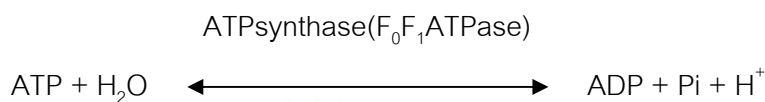
3) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มสารทดสอบที่ไม่เติม BSA

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 2  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มสารทดสอบที่ไม่เติม BSA



## 2.7 การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

เอนไซม์ ATPase สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ ATP ได้เป็น ADP, Pi และ H<sup>+</sup> ดังสมการ



ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. โดยการวัดจำนวน H<sup>+</sup> ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina และ Slater, 1975)
2. โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

สำหรับในการศึกษาผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียจะใช้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโทคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลง centrifuge tube ที่มี 20 % w/v ของ trichloroacetic acid ปริมาณ 1 ml อยู่ก่อน แล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske และ Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าตัวอย่าง

วิธีการวัดเพื่อหา ATPase activity ของไมโทคอนเดรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะควบคุมอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37°C
2. เติม mitochondrial suspension 200 μl

3. เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วรอเวลา 1 นาที (ในกลุ่มควบคุม จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l)

4. เติม 0.1 M ATP 150  $\mu$ l แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที

5. เมื่อครบกำหนดเวลา 10 นาทีแล้ว ทำการหยุดปฏิกิริยาทันที โดยดูด reaction mixture มาปริมาณ 1 ml แล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ที่มี 20% w/v trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งทันที

6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

7. ดูดส่วน supernatant ปริมาณ 1 ml (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml แทน ถ้าทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml ของ  $K_2HPO_4$  ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M  $H_2SO_4$  5 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน

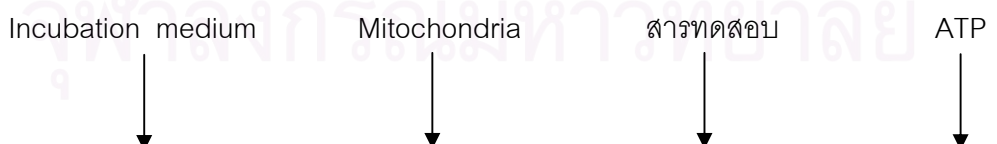
8. เติม 2.5% w/v ammonium molybdate 0.8 ml

9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample จะนำมาคำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ  $3 \times 2 = 6$ ) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น

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

- ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน



2.8 การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม (Calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นซับสเตรต

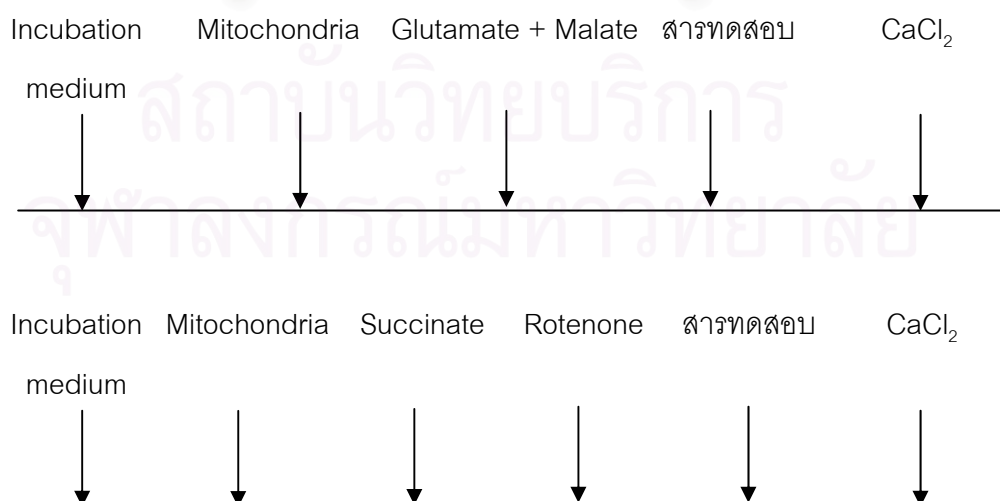
เนื่องจากการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียต้องอาศัยความต่างศักย์ ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (membrane potential) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical potential ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทออิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ดังนั้นเมื่อมีการเติม  $\text{CaCl}_2$  ลงไปในปฏิกิริยาที่มีซับสเตรตมากพอ และมี Pi อยู่ด้วย จะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อแคลเซียมหยุดการเข้าไปสะสมภายใน matrix อัตราการใช้ออกซิเจนก็จะลดลง

การศึกษามผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม สามารถทำได้โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะการทดลอง ดังนี้

1) เติมซับสเตรตสำหรับ complex I คือ 1 M glutamate + 1 M malate หรือซับสเตรตสำหรับ complex II คือ 1 M succinate ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียอยู่

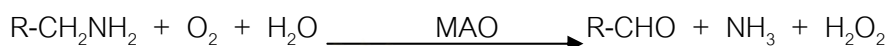
2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$

3) เติม 0.4 M  $\text{CaCl}_2$  ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  เพื่อกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย แล้วเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$



## 2.9 การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

monoamine oxidase (MAO) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีหน้าที่ในการออกซิไดส์สารพวก amine โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



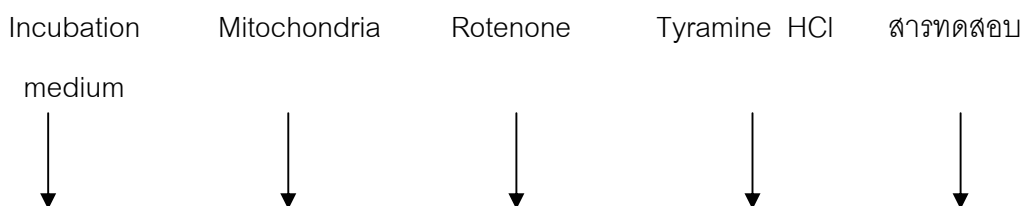
เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษาการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้ซับสเตรตและ incubation medium ที่เหมาะสม โดยในการทดลองใช้ sodium phosphate buffer pH 7.2 เป็น incubation medium ส่วนซับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ 0.1 M tyramine HCl เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO-A และ MAO-B, 0.1 M 5-HT เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO-A และ 0.1 M benzylamine HCl เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO-B นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโทคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดส์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบถึงการทำงานของ monoamine oxidase ได้

รูปแบบการทดลองศึกษาผลของสารทดสอบ (1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol) ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ของไมโทคอนเดรีย

### 2.9.1 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

1) เติมซับสเตรตสำหรับ MAO-A และ MAO-B คือ 0.1 M tyramine HCl ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  อยู่

2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$

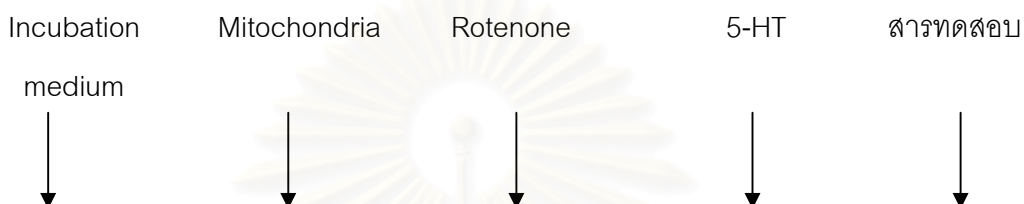




### 2.9.2 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

1) เติมซับสเตรตสำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l อยู่

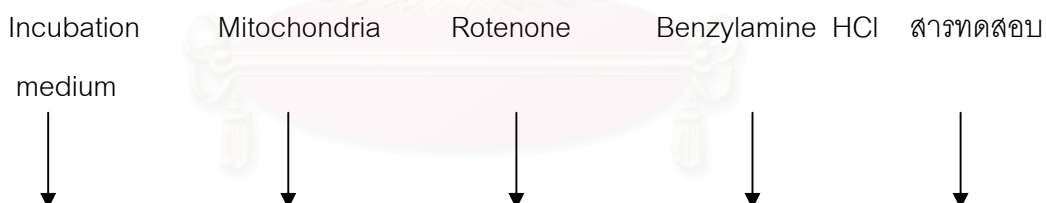
2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l



### 2.9.3 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

1) เติมซับสเตรตสำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine HCl ปริมาณ 10  $\mu$ l ลงใน incubation medium ที่มีไมโทคอนเดรียและ 5 mg/ml rotenone ปริมาณ 2  $\mu$ l อยู่

2) เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l



### 3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of mean) และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละคู่โดยใช้ Scheffe ในกรณีที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติเฉพาะคู่ของกลุ่มการทดลองจะใช้ the two-tailed paired Student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 1. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 20 แสดง control respiratory response ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state ต่างๆ มีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/min/ml อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะแรกมีค่า 22.24 n atoms O/min/ml ระยะนี้เรียกว่า state 4 respiration เมื่อเติม ADP + Pi ลงไปในปฏิกิริยา พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 120.12 n atoms O/min/ml เรียกกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเติม ADP + Pi นี้ว่า state 3 respiration ซึ่งเมื่อ ADP ถูกใช้หมดไป อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียจะลดลงเป็น 22.24 n atoms O/min/ml กลับสู่ state 4 respiration ตามเดิม การที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP เรียกว่าไมโทคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไมโทคอนเดรีย ค่า respiratory control index (RCI) เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองว่ามีคุณสมบัติเป็น tightly couple mitochondria หรือไม่ คำนวณได้จาก อัตราการหายใจใน state 3 / อัตราการหายใจใน state 4 ดังนั้นค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 20 จึงมีค่าเท่ากับ  $120.12 / 22.24 = 5.40$  และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น 124.57 n atoms O/min/ml เนื่องจาก DNP สามารถกระตุ้นการหายใจทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction medium ระยะนี้เรียกว่า state 3u respiration

จากรูปที่ 21 แสดงถึงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต โดยเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 5  $\mu\text{g}$  (9.85  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi จากรูปที่ 22 พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษามีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4

respiration แต่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration กล่าวคือสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้ตามขนาดของสารทดสอบ โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้ง state 3 respiration ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่าขนาดของสารทดสอบสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) ยับยั้ง state 3 respiration ได้ร้อยละ  $85.51 \pm 2.38$  และเมื่อคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  ต่อ state 3 respiration ได้เท่ากับ 29.57  $\mu\text{g}$  (58.28  $\mu\text{M}$ ) นอกจากนี้สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) ทำให้ไมโตคอนเดรียมีค่า RCI ลดลงเท่ากับ  $4.11 \pm 0.18$ ,  $2.91 \pm 0.16$ ,  $0.90 \pm 0.08$  และ  $0.79 \pm 0.12$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24

## 2. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 25 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆ มีหน่วยเป็นจำนวน n atoms O/min/ml อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เท่ากับ 142.37 n atoms O/min/ml และ 33.37 n atoms O/min/ml ตามลำดับ ดังนั้นค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองตามรูปที่ 25 จึงมีค่าเท่ากับ  $142.37 / 33.37 = 4.27$

ผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต แสดงในรูปที่ 26 พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาดต่างๆที่ทำการศึกษามีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration และพบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 5  $\mu\text{g}$  (9.85  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 27 พบว่าที่ความเข้มข้น 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้ง state 3 respiration ดังนี้ คือ  $56.25 \pm 3.15$ ,  $84.65 \pm 0.72$  และ  $87.10 \pm 0.89$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 29 และมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 21.53  $\mu\text{g}$  (42.44  $\mu\text{M}$ ) เมื่อคำนวณหาค่า RCI พบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ทำให้ค่า RCI ลดลงตามขนาดของสารทดสอบที่เพิ่มขึ้น โดย 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$

(98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) คำนวณค่า RCI ได้เท่ากับ  $1.44 \pm 0.25$ ,  $0.77 \pm 0.06$  และ  $0.76 \pm 0.04$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28

### 3. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 30 และ 31 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษ สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration ได้ ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งต่อ state 3u respiration สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 5  $\mu\text{g}$  (9.85  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) ยับยั้งได้ร้อยละ  $4.34 \pm 2.17$ ,  $18.74 \pm 6.16$ ,  $50.71 \pm 5.90$ ,  $84.13 \pm 2.29$  และ  $86.73 \pm 1.73$  ตามลำดับ ส่วนในกรณีที่เติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังจากใส่ DNP เป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีค่าร้อยละของการยับยั้งต่อ state 3u respiration ใกล้เคียงกับการเติมสารทดสอบก่อนเติม DNP โดยที่สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้ร้อยละ  $92.70 \pm 0.51$  ดังแสดงในรูปที่ 32

### 4. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 33 และ 34 ทำการศึกษาโดยการเติม succinate เป็นซับสเตรต ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ จากนั้นเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติม DNP พบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษสามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration ได้ ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งมีดังนี้ ขนาดสาร 5  $\mu\text{g}$  (9.85  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) ยับยั้งได้ร้อยละ  $1.23 \pm 1.23$ ,  $6.54 \pm 0.54$ ,  $16.56 \pm 2.72$ ,  $81.06 \pm 3.28$  และ  $86.30 \pm 0.57$  ตามลำดับ ส่วนการเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังจากเติม DNP เป็นเวลา 1 นาที พบว่ามีค่าร้อยละของการยับยั้งต่อ state 3u respiration ได้ใกล้เคียงกัน ยกเว้นขนาดของสาร 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) พบว่ากรณีที่เติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังจากเติม DNP สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่เติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ก่อนเติม DNP ดังแสดงในรูปที่ 35

### 5. ผลของ dithiothreitol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 36 ทำการศึกษาโดยการเติม glutamate + malate เป็นซับสเตรตลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 3u respiration ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเติม 1.05 mM DTT เป็นเวลา 1 นาที ก่อนเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ลงไป DTT ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 และ state 3u respiration ดังนั้น DTT ในขนาดที่ทำการศึกษาไม่สามารถลดฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 3u respiration ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ได้

### 6. ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 37 ทำการศึกษาผลของ BSA ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene -3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ในการทำให้เกิด state 3 respiration พบว่า BSA ขนาด 5, 10 และ 15 mg ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ที่ลดลงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติม BSA

### 7. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase แสดงในรูปที่ 38 พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษามีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase กล่าวคือสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ทำให้ปริมาณ Pi ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลาย ATP จากผลของเอนไซม์ ATPase เพิ่มสูงขึ้นตามขนาดของสารทดสอบ โดยที่ขนาด 100  $\mu\text{g}$  (126.69  $\mu\text{M}$ ) ทำให้ปริมาณ Pi เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler พบว่ามีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่เกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน และ oligomycin ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase พบว่าทำให้ผลการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของทั้ง DNP และสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ลดลง



### 8. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 39 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต พบว่าสารทดสอบในขนาดที่ทำการศึกษา สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้ตามขนาดที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้ง ได้ค่าดังนี้ คือ  $16.12 \pm 1.91$ ,  $70.74 \pm 5.39$  และ  $88.50 \pm 0.65$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 40

### 9. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต แสดงในรูปที่ 41 ทำการศึกษาโดยการเติม succinate เป็นซับสเตรต ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ เติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาดต่างๆลงไป จากนั้นจึงกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยการเติม  $\text{CaCl}_2$  พบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษา สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมได้ตามขนาดของสารทดสอบที่เพิ่มขึ้น โดย 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{g}$  (98.54  $\mu\text{M}$ ) และ 100  $\mu\text{g}$  (197.09  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้ง ได้ค่าดังนี้ คือ  $28.42 \pm 4.91$ ,  $70.77 \pm 5.45$  และ  $88.66 \pm 1.59$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 42

### 10. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

รูปที่ 43 ทำการศึกษาโดยการเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดส์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มี

ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้เฉพาะที่ขนาดตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ขึ้นไป โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งเทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ  $17.14 \pm 6.06$  และเมื่อเพิ่มขนาดของสารทดสอบจนถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (394.17  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ  $37.14 \pm 2.86$

#### 11. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

ผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B แสดงในรูปที่ 43 ทำการศึกษาโดยการเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้เฉพาะที่ขนาดตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ขึ้นไป โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งเทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ  $10.83 \pm 3.94$  และเมื่อขนาดของสารทดสอบเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B จะเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย โดยที่ขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (394.17  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้เพียงร้อยละ  $19.59 \pm 1.97$

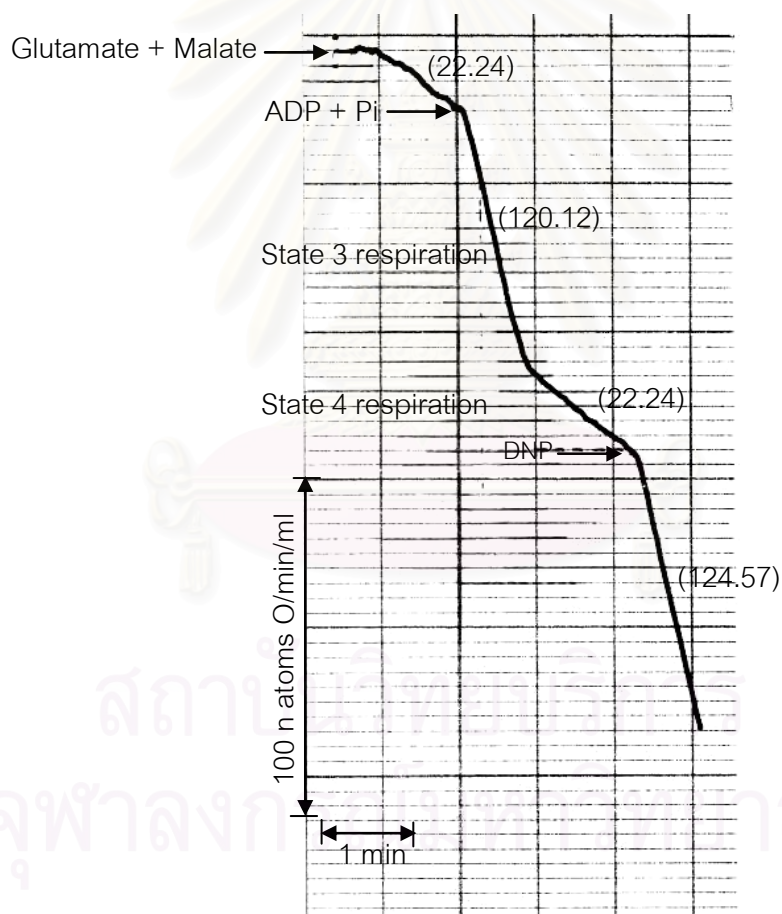
#### 12. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง แสดงในรูปที่ 43 ทำการศึกษาโดยการเติมซับสเตรตสำหรับ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง คือ 0.1 M tyramine ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจงได้เฉพาะที่ขนาดตั้งแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ขึ้นไป โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งเทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ  $9.07 \pm 1.18$  และเมื่อขนาดของสารทดสอบเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจงเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย โดยที่ขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (394.17  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจงได้เพียงร้อยละ  $23.81 \pm 2.53$

รูปที่ 20 แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.914 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



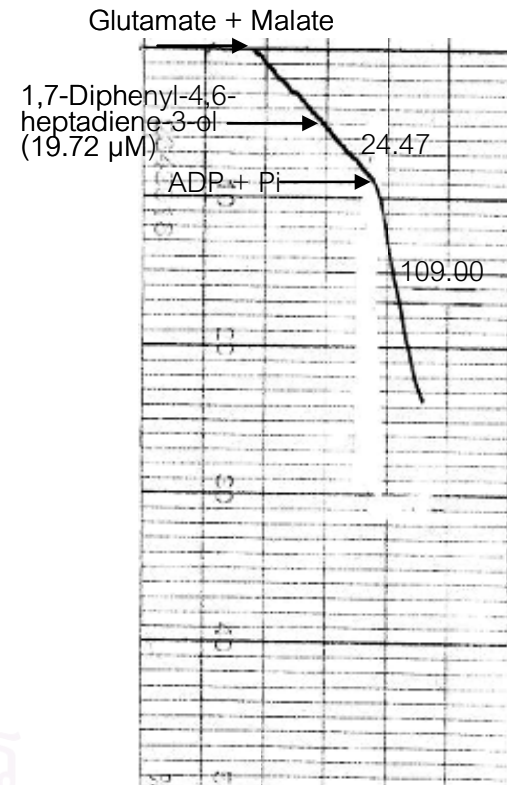
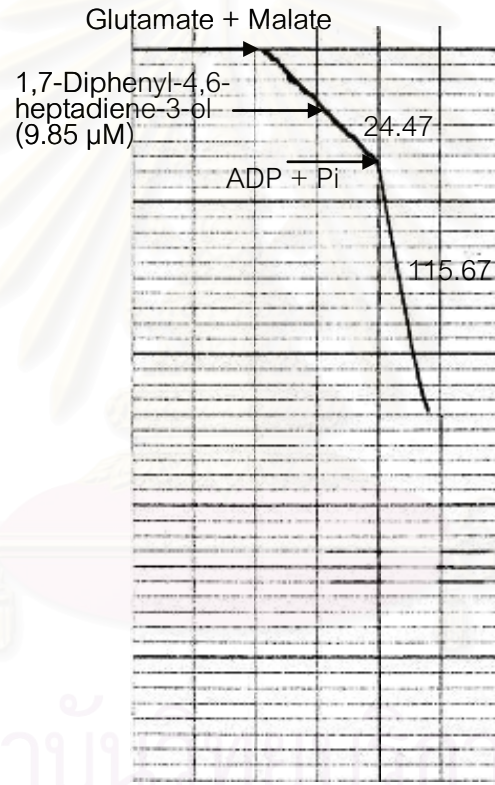
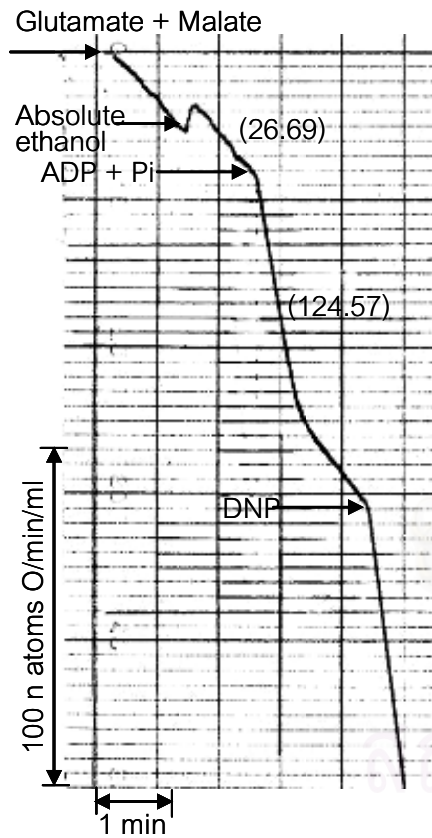
รูปที่ 21 แสดง oxygraph tracing ผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml

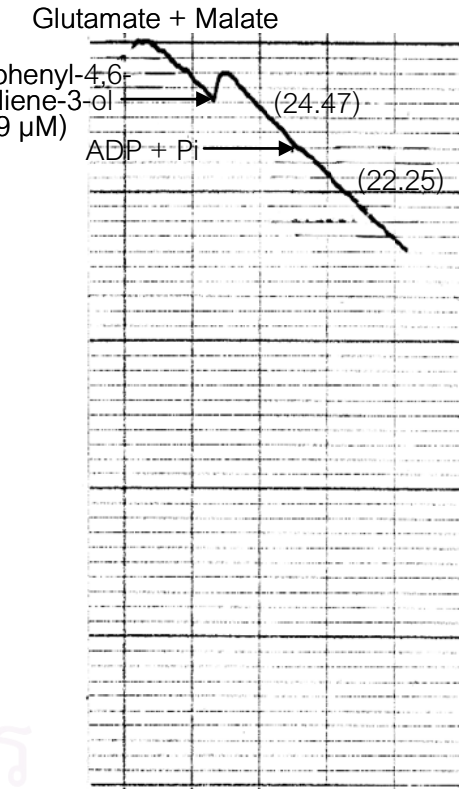
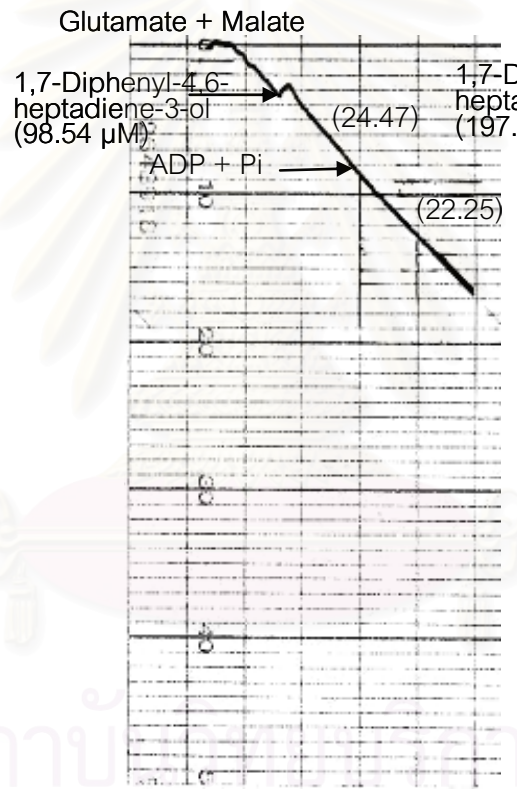
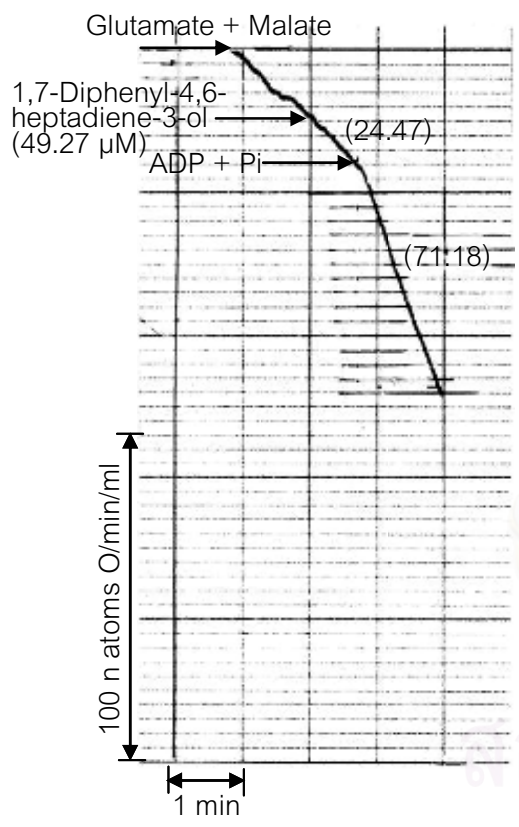


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิจัยและพัฒนา  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

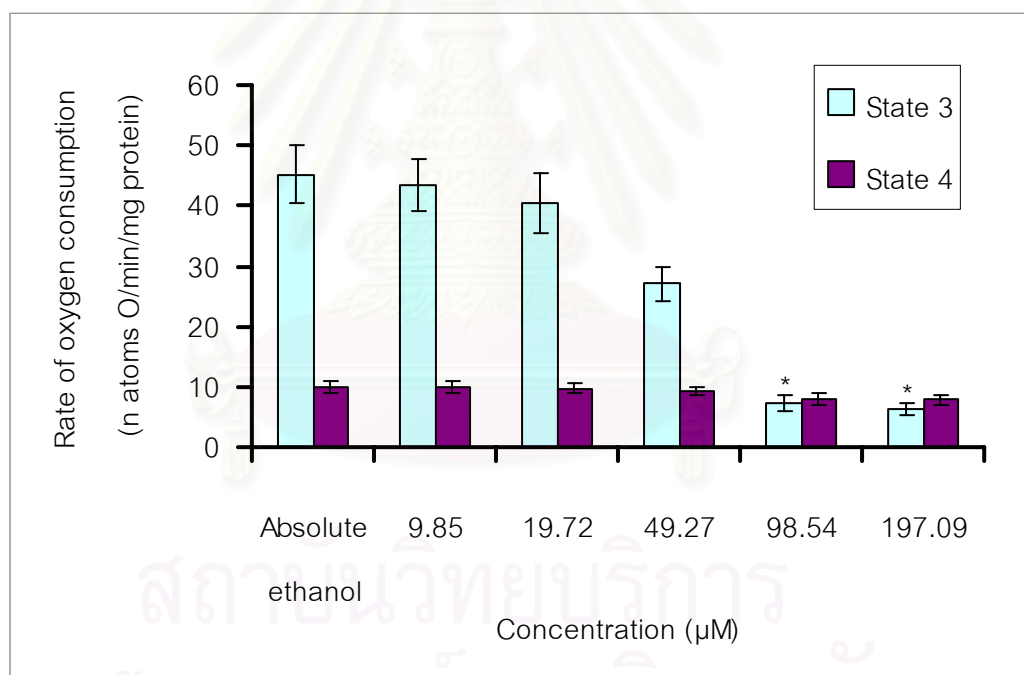


รูปที่ 22 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 4 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

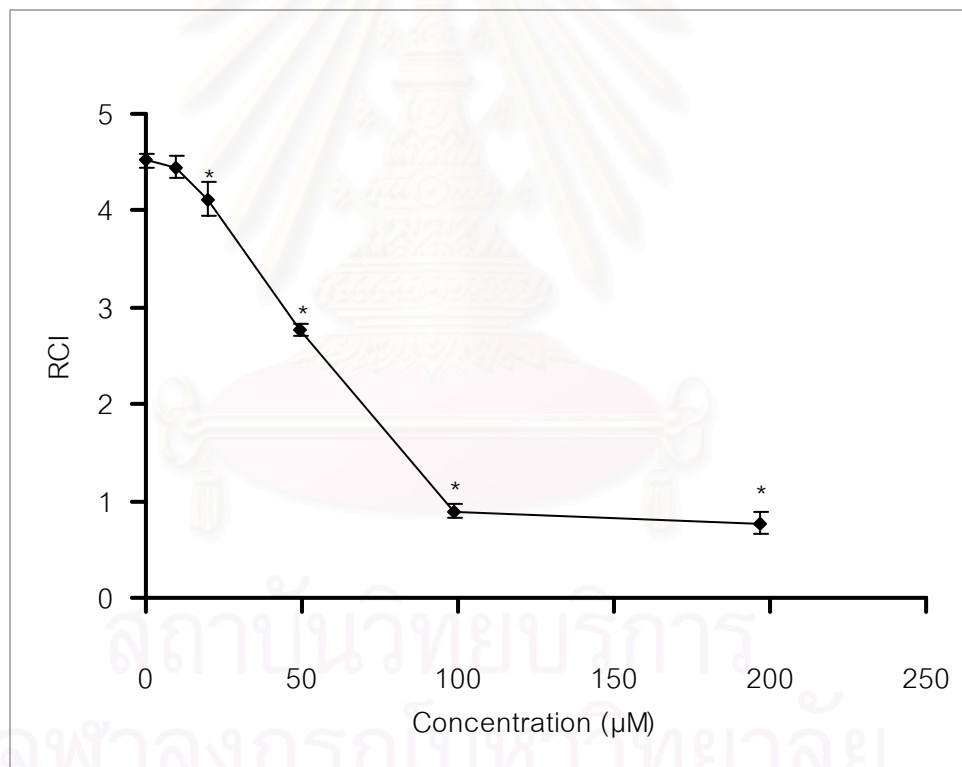


\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 23 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



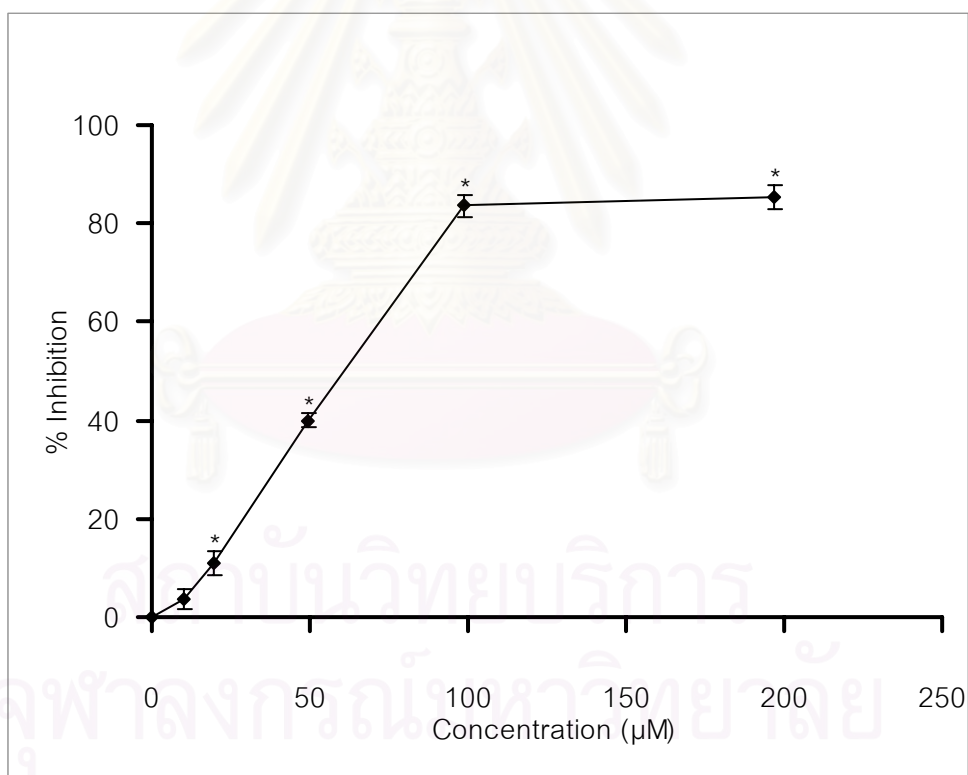
\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 24 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

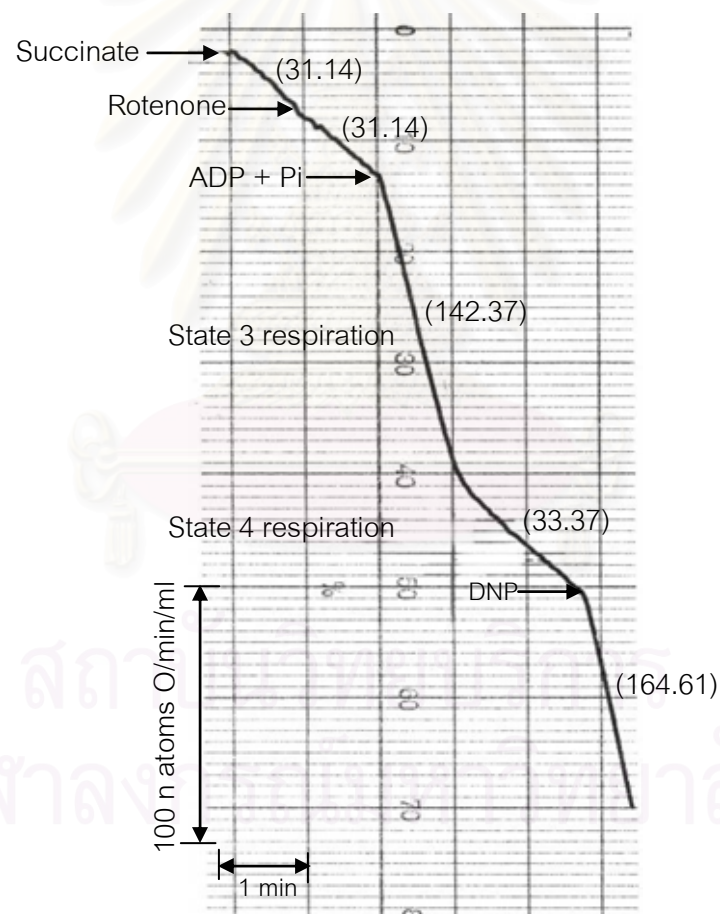


\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 25 แสดง oxygraph tracing มาตรฐานการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.916 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



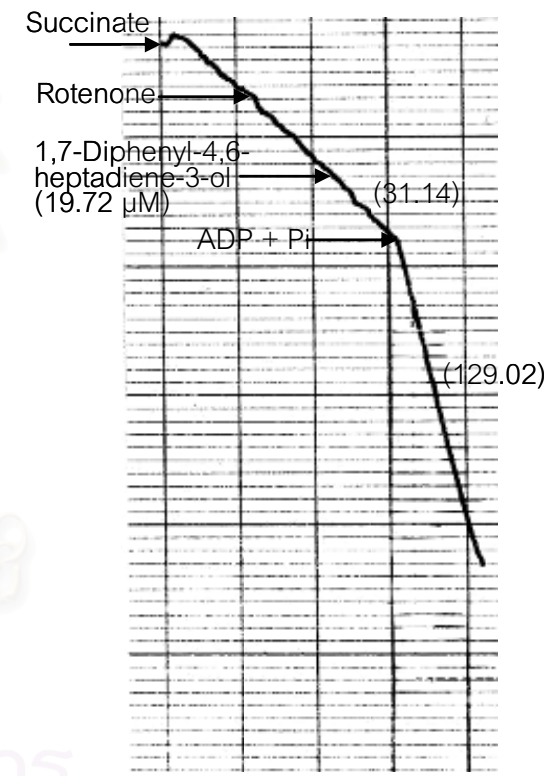
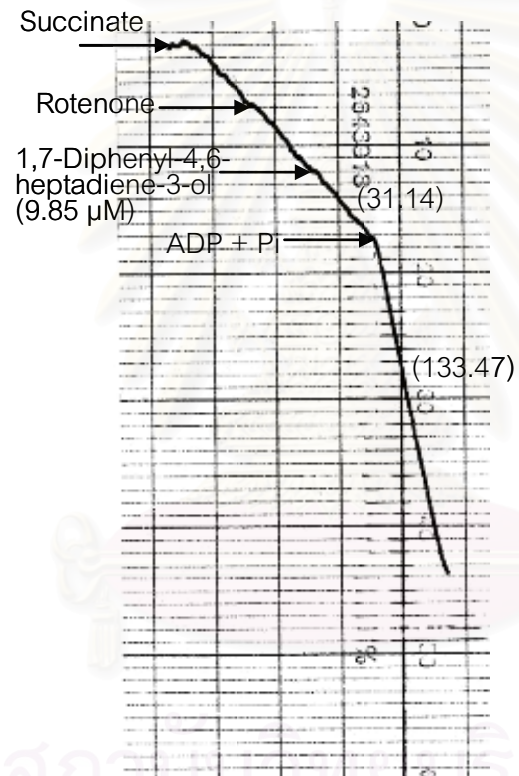
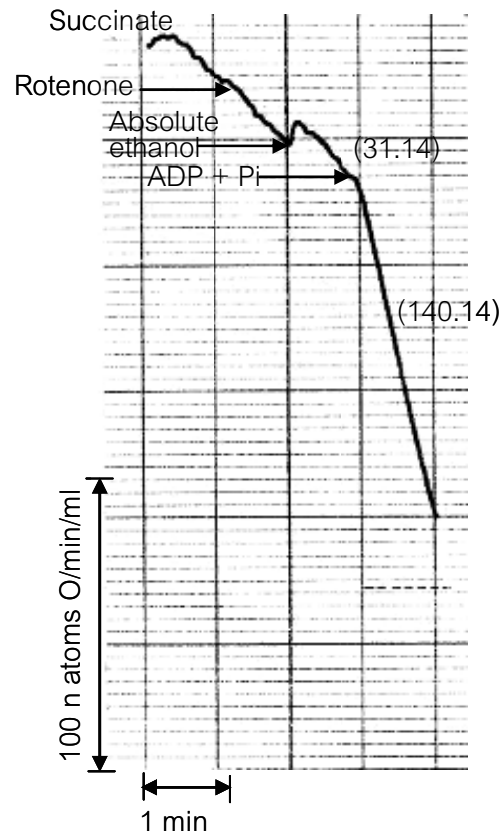
รูปที่ 26 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสารสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

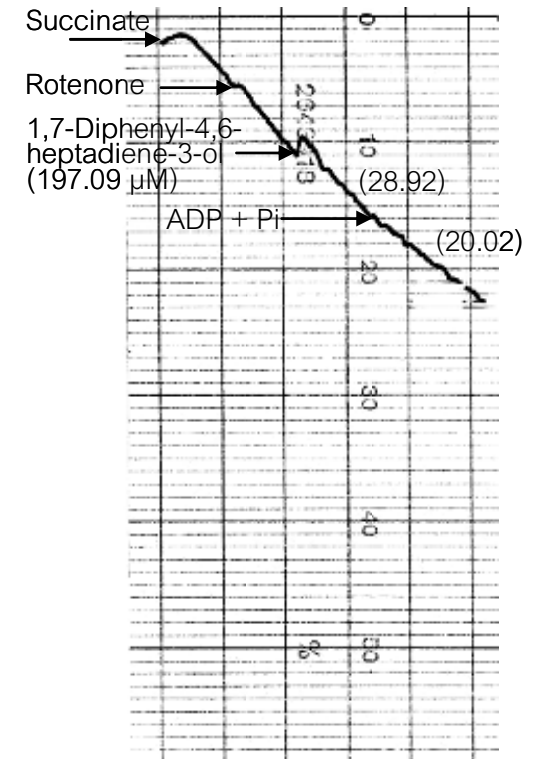
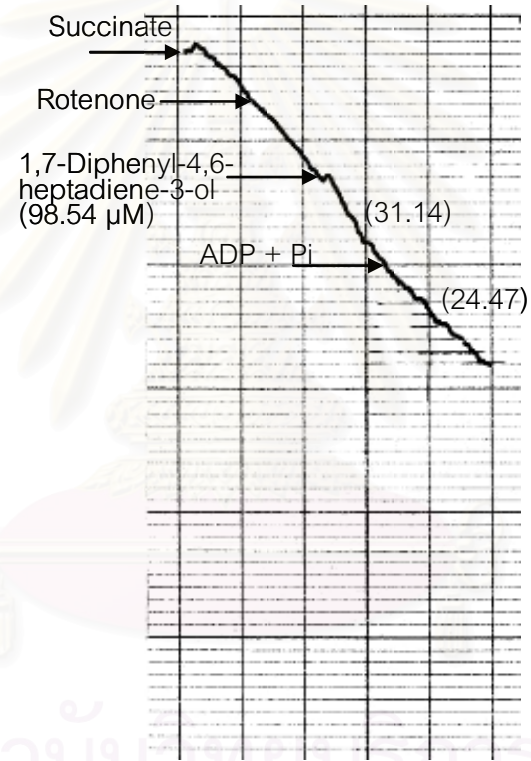
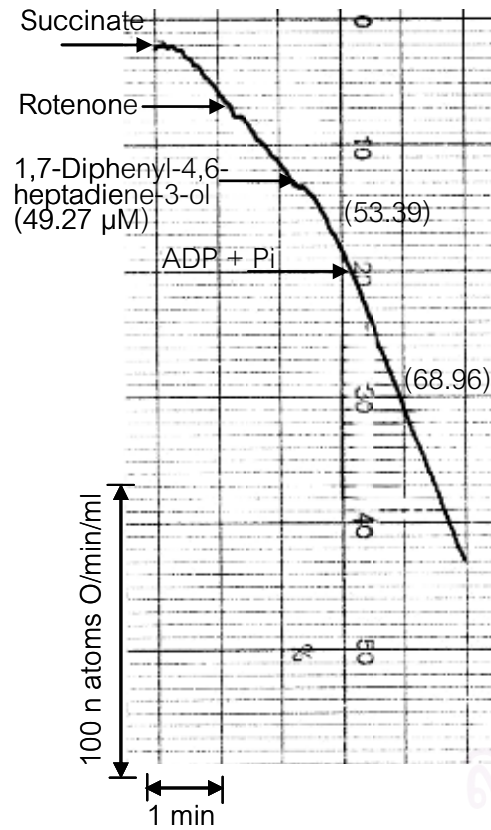
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





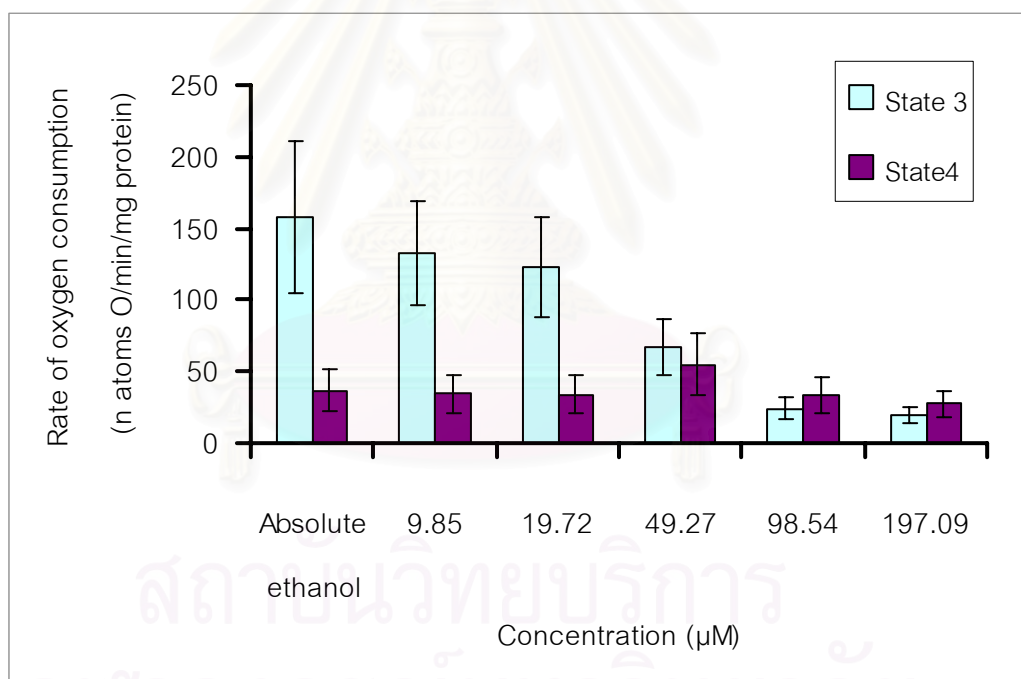


รูปที่ 27 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration และ state 4 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l

ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

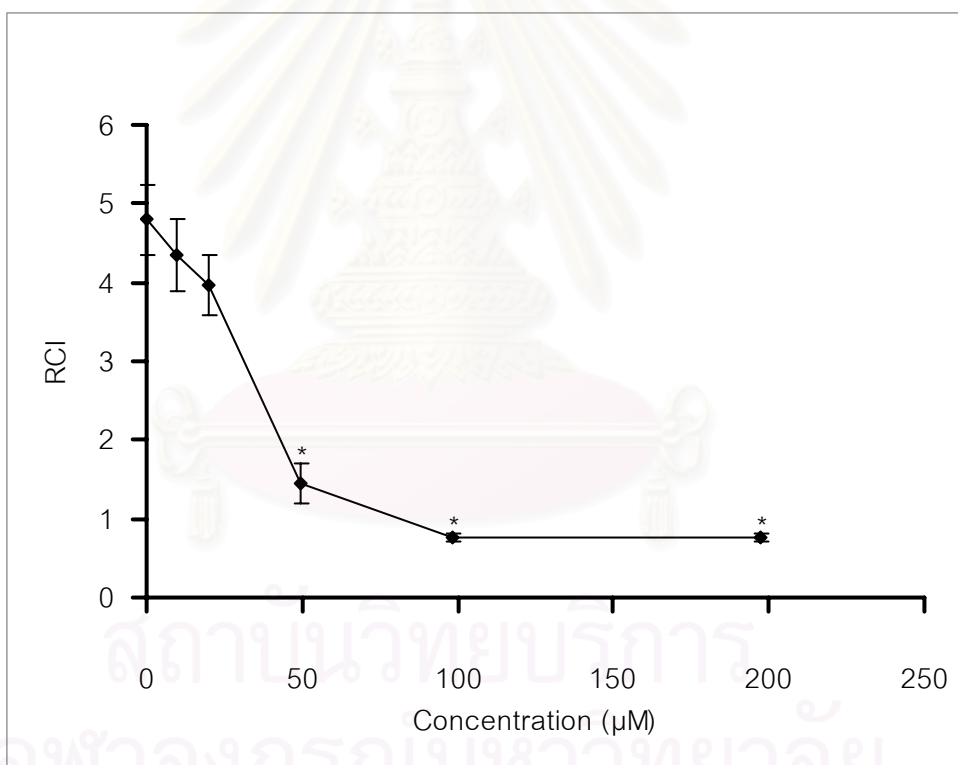
แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



รูปที่ 28 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อ respiratory control index (RCI) ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสารสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

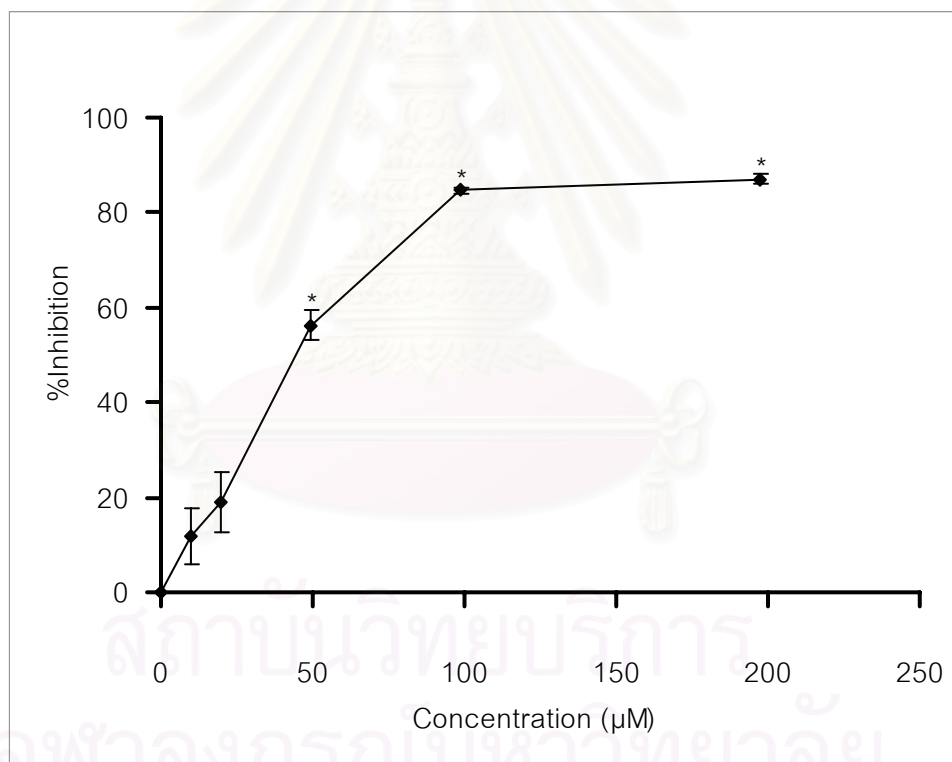


\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 29 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

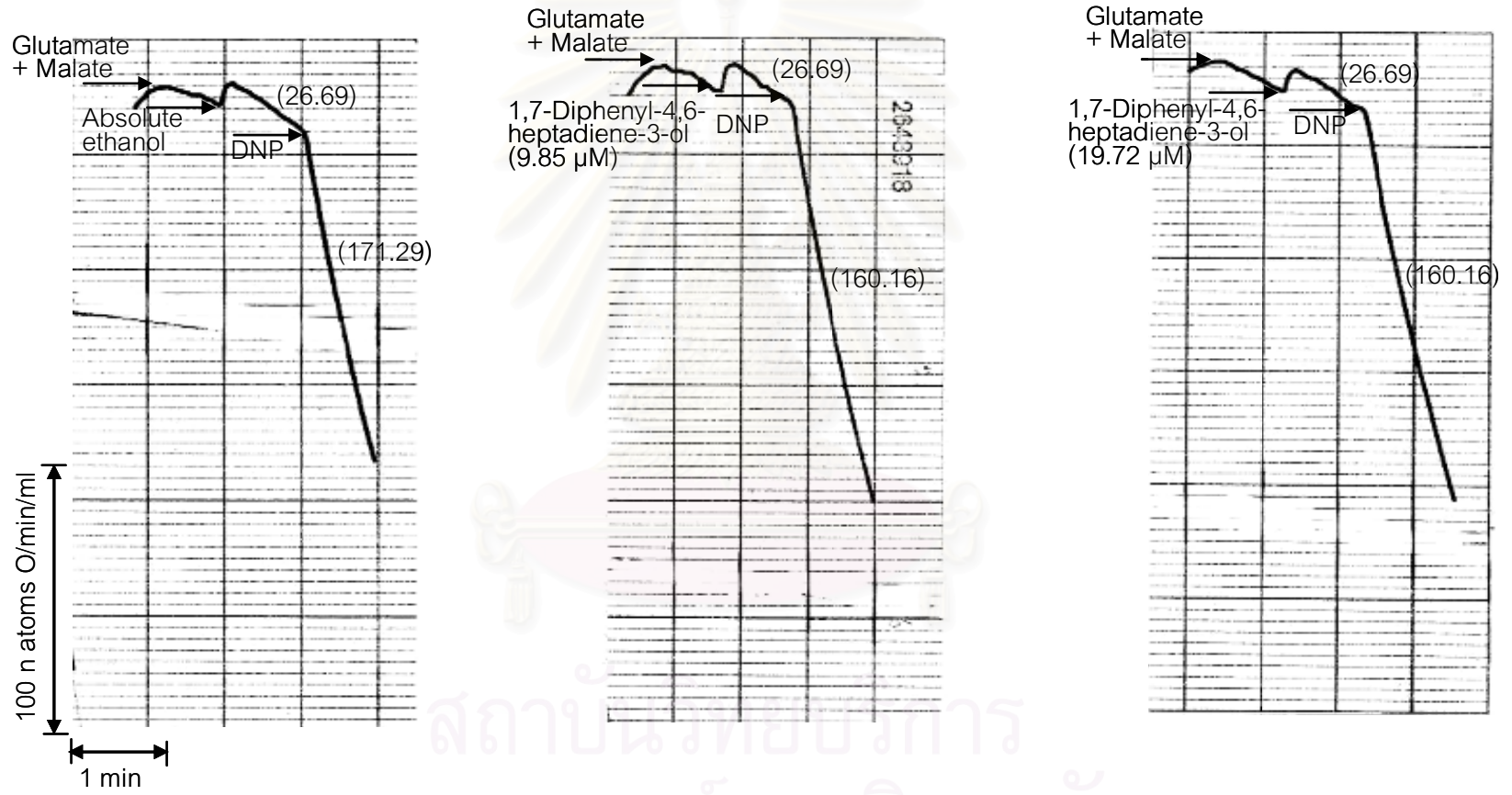
รูปที่ 30 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ก่อนเติม DNP)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate , 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.35 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

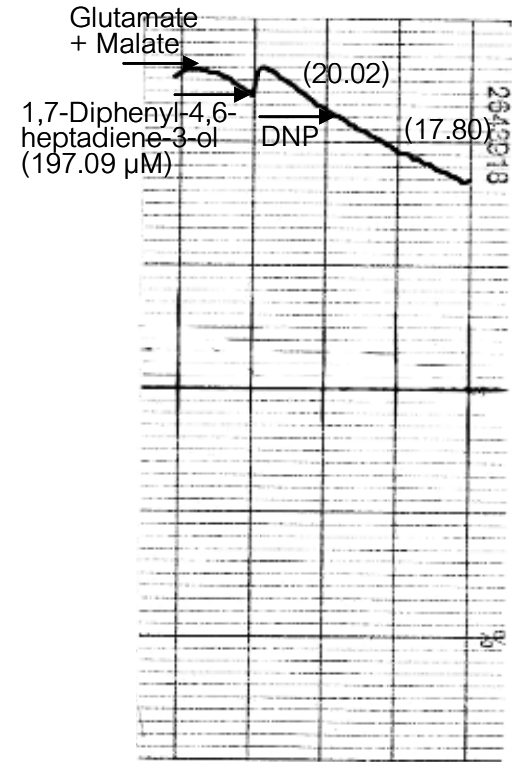
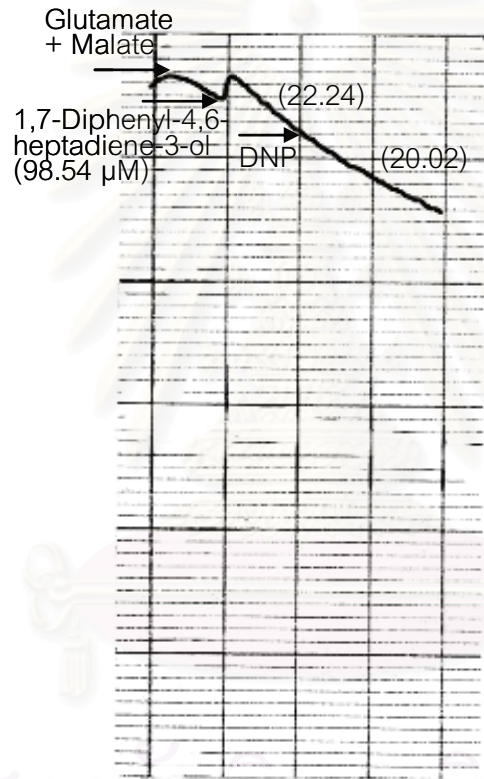
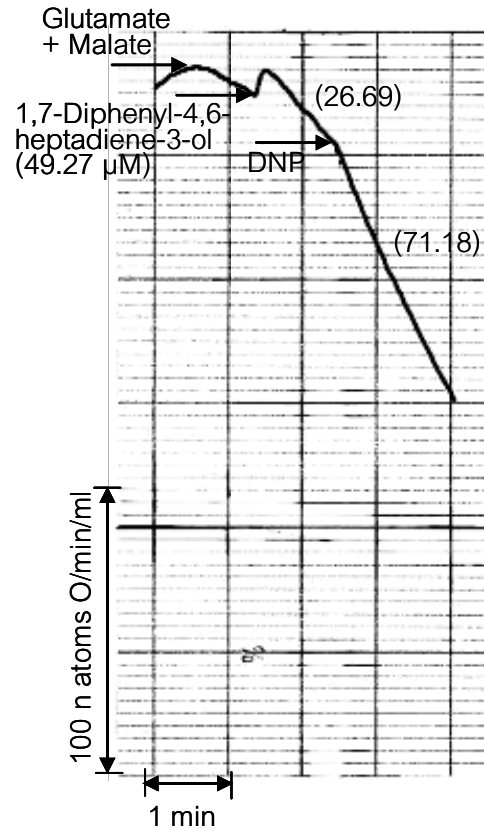
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







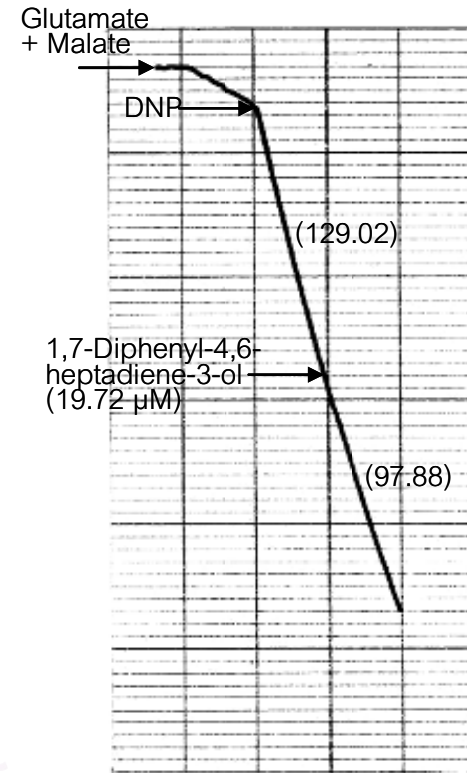
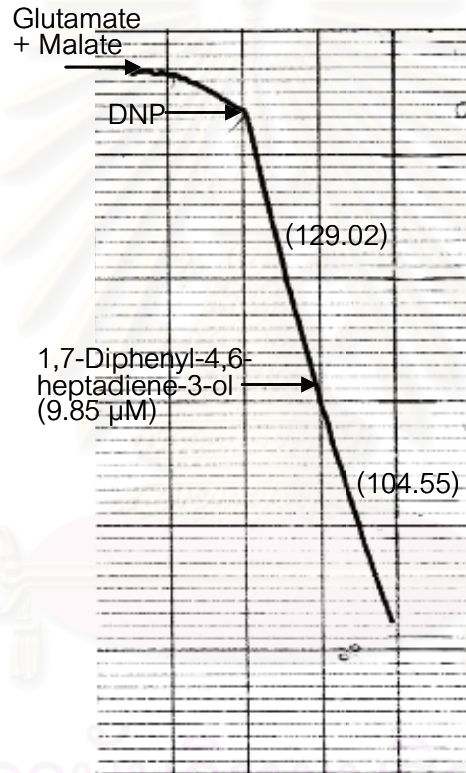
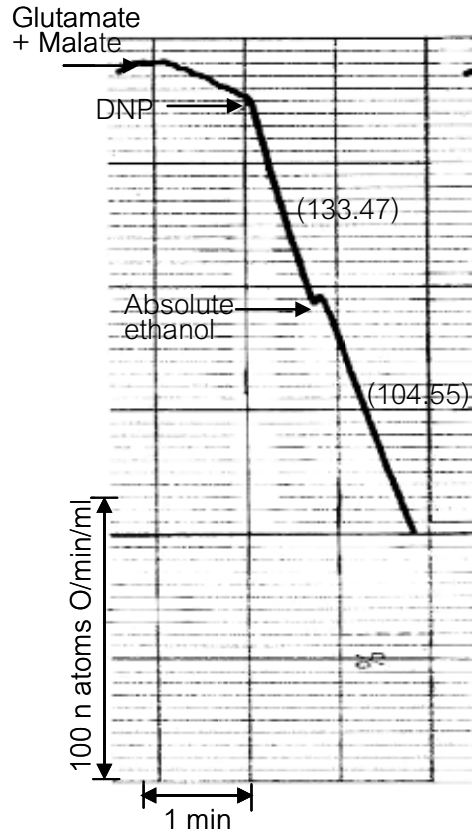
รูปที่ 31 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังเติม DNP)

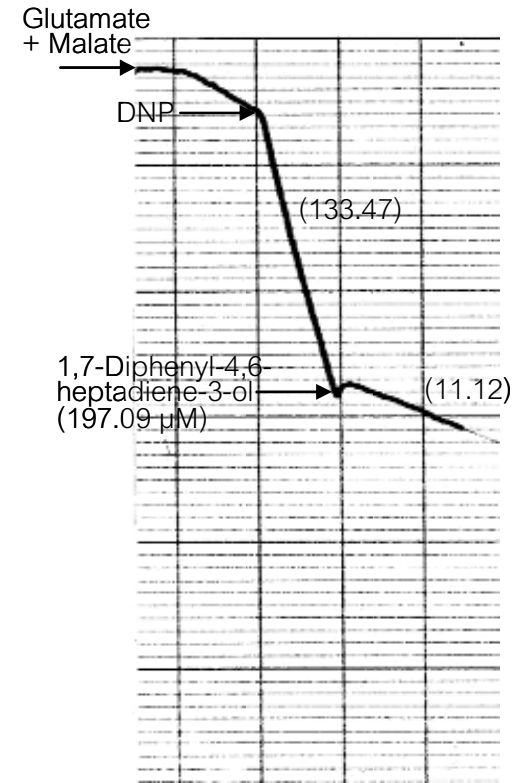
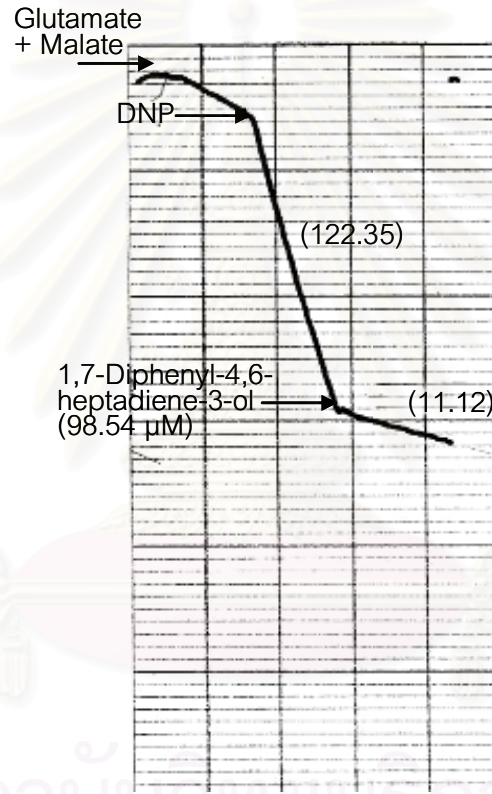
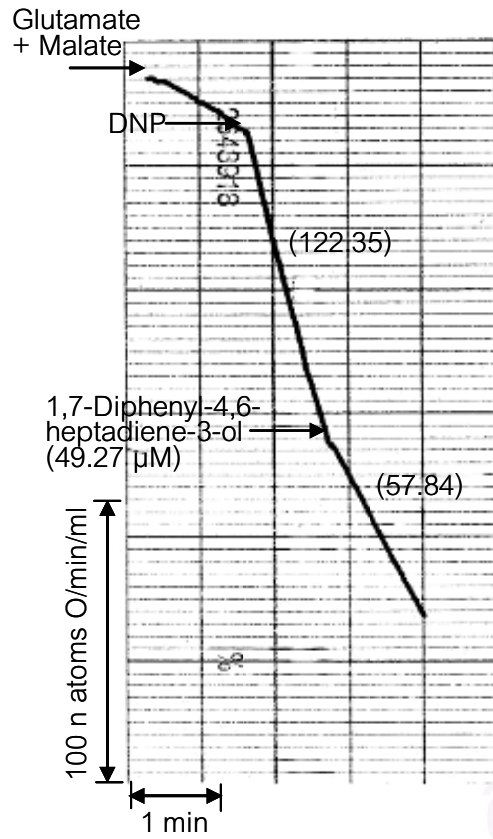
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate , 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.35 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



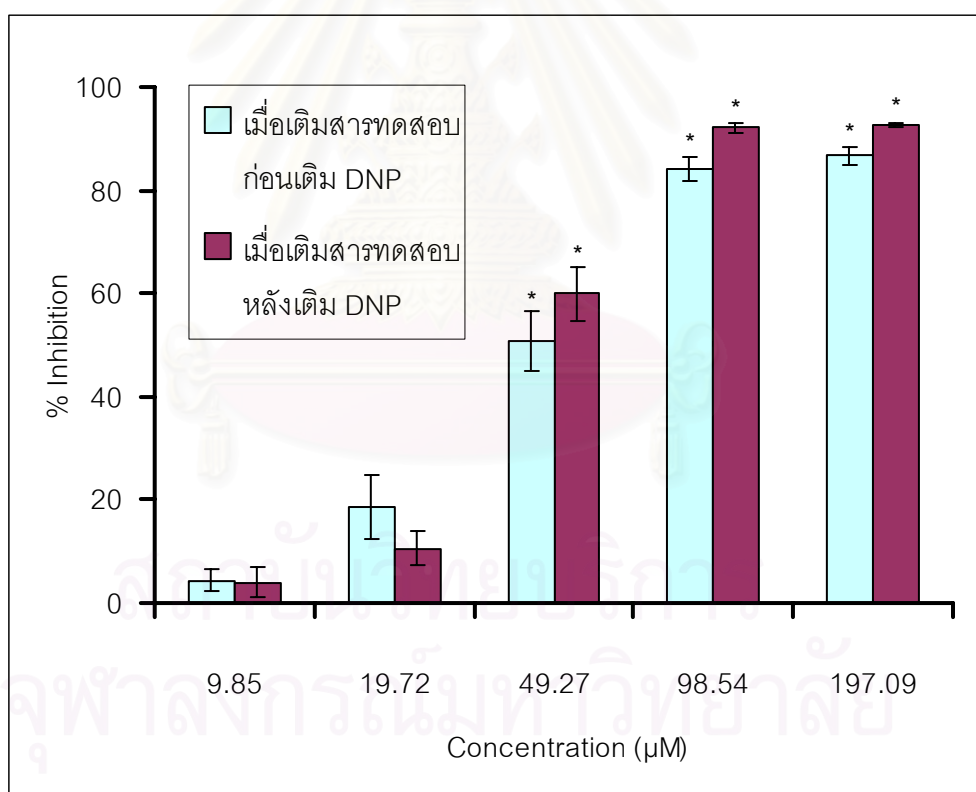


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate , 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.35 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol



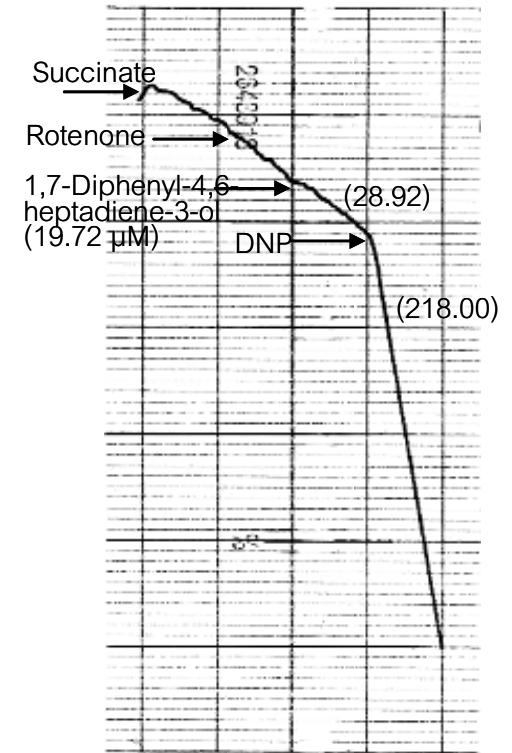
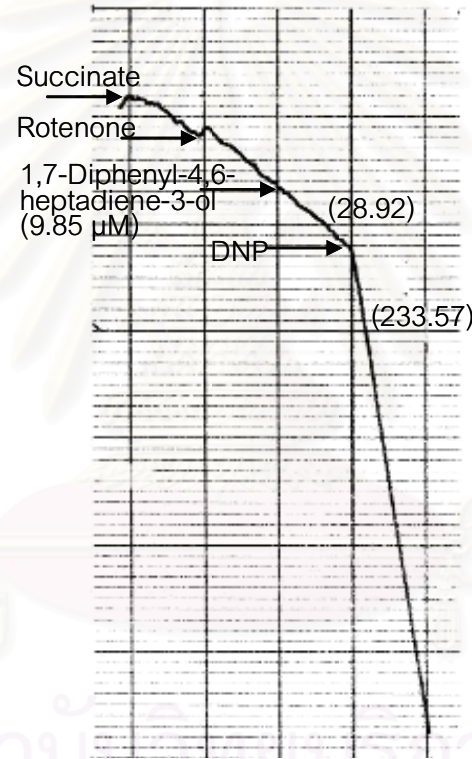
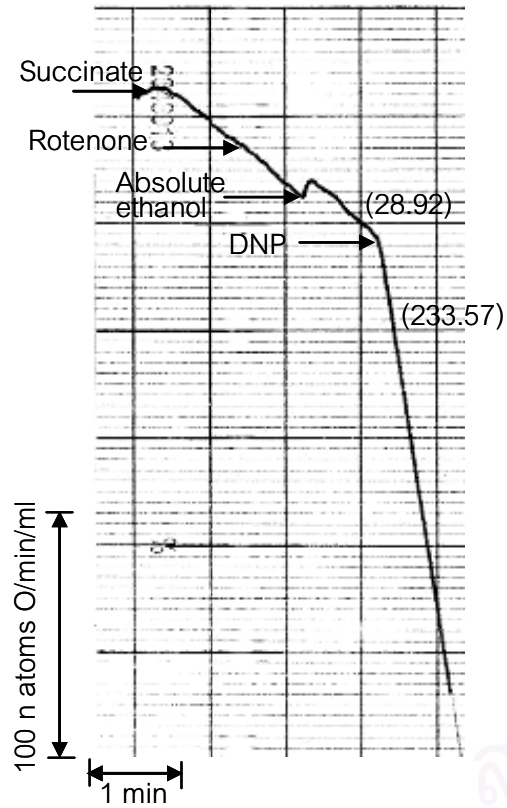
รูปที่ 33 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ก่อนเติม DNP)

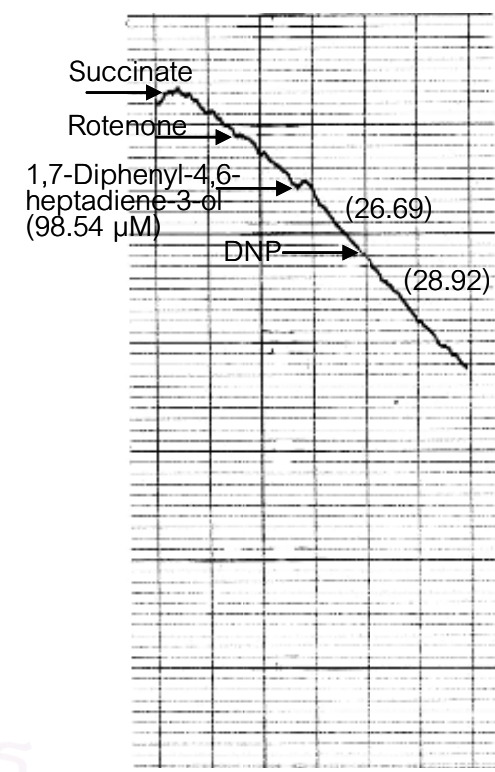
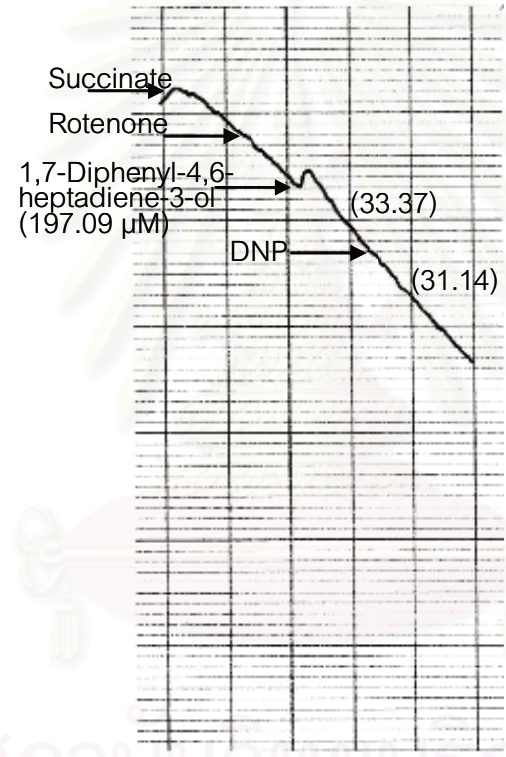
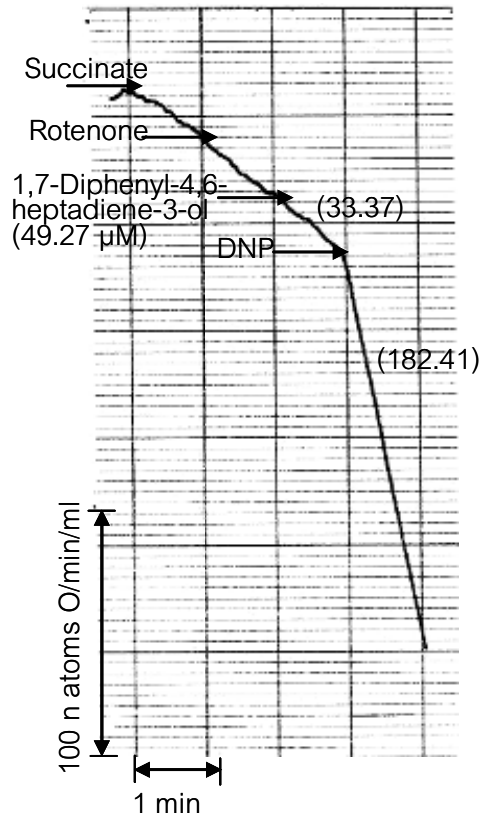
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate , 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.17 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

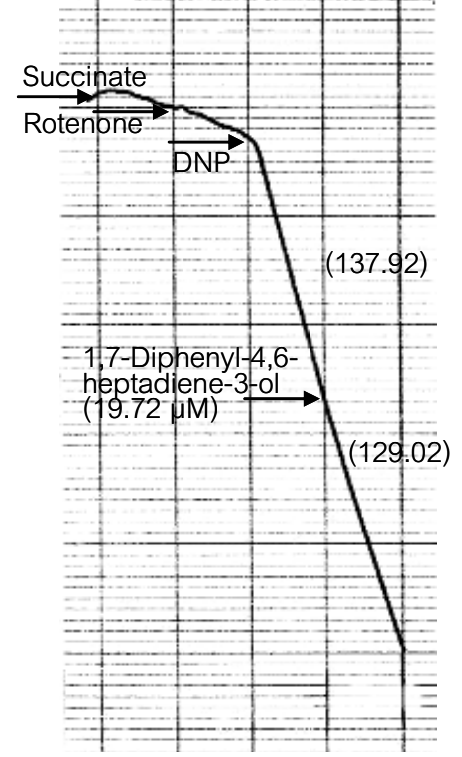
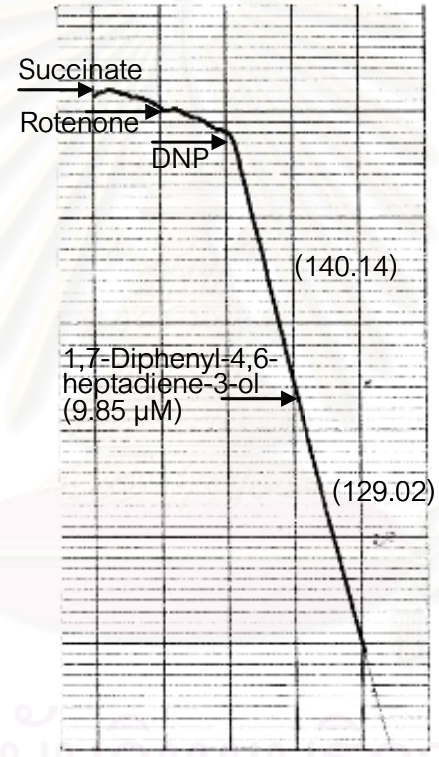
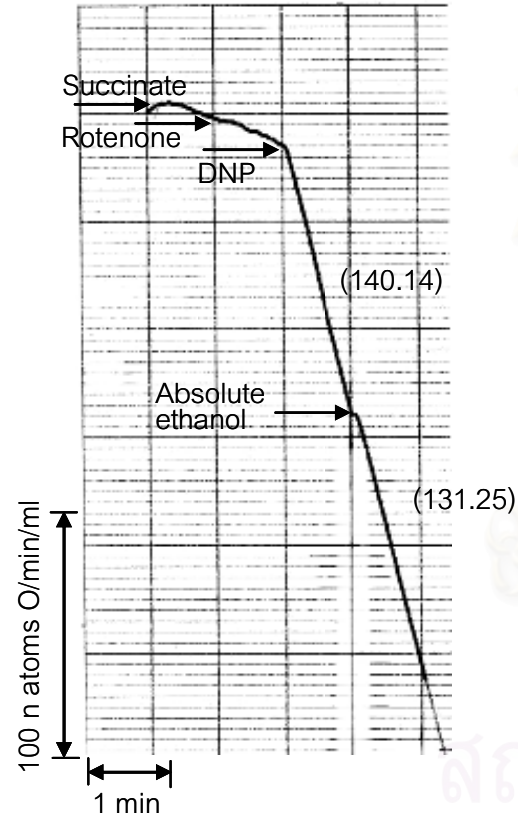
รูปที่ 34 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต (เมื่อเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หลังเติม DNP)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.17 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บคำนวณออกมา มีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml

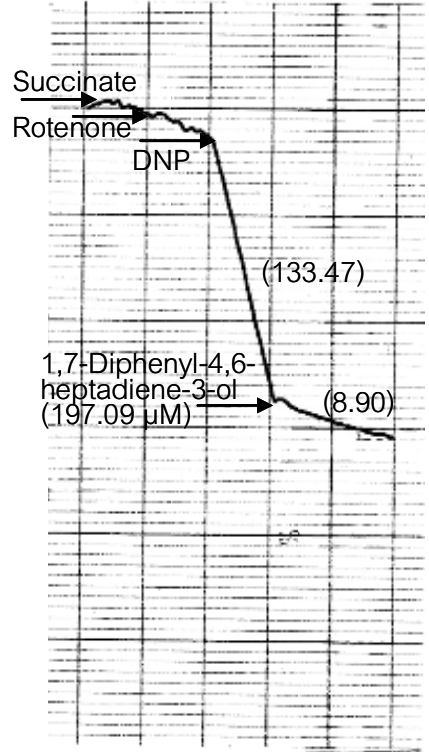
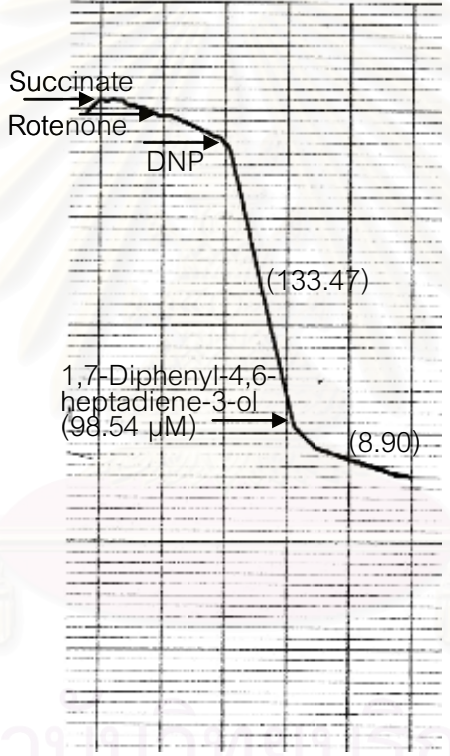
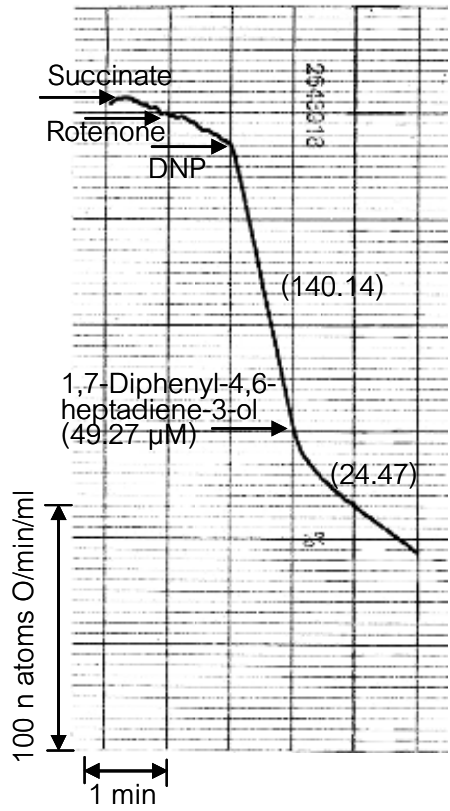


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



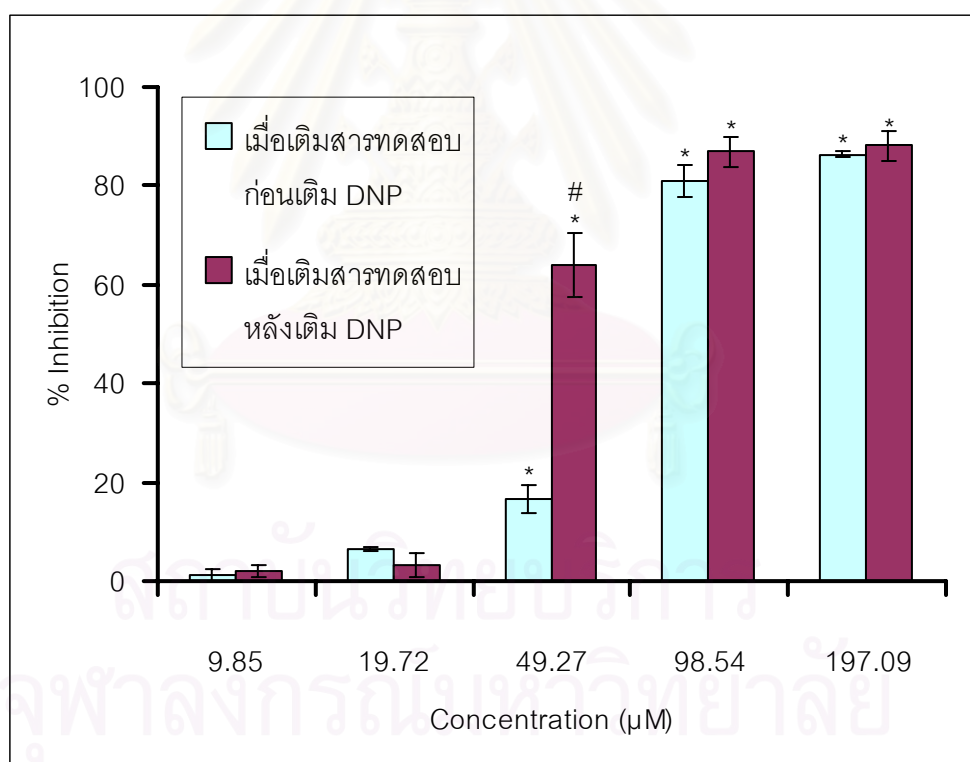


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการไหลออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นตัวสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.17 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



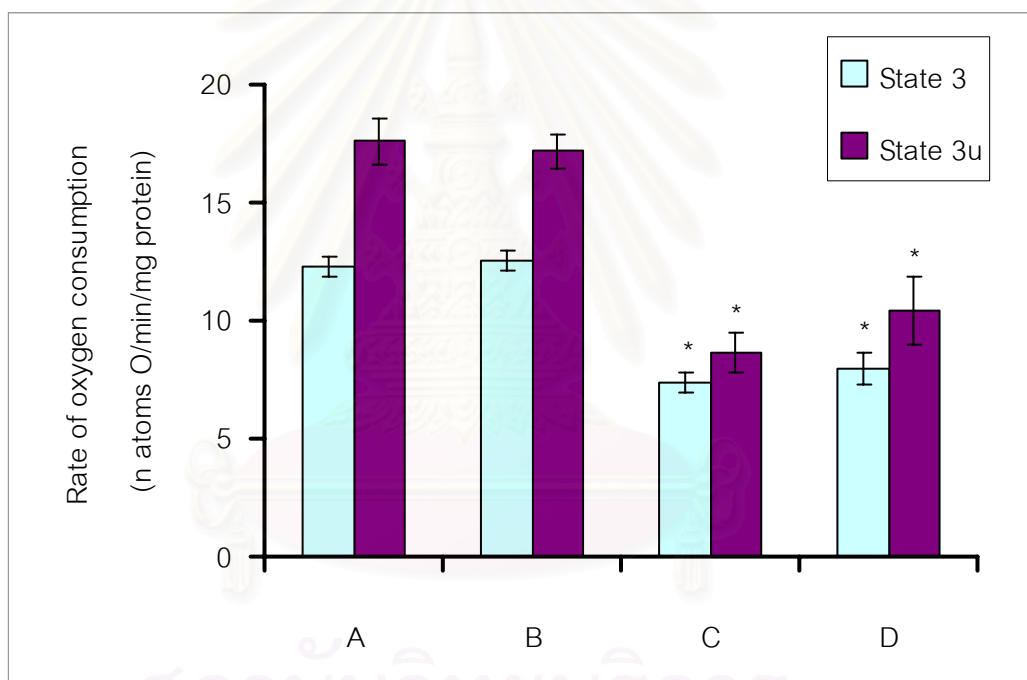
\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

# p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเติมสารทดสอบก่อนเติม DNP

รูปที่ 36 แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 1.05 mM DTT 2  $\mu$ l, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะไม่เติม DTT ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม DTT ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.21 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.926 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

A = absolute ethanol

B = absolute ethanol + 1.05 mM DTT

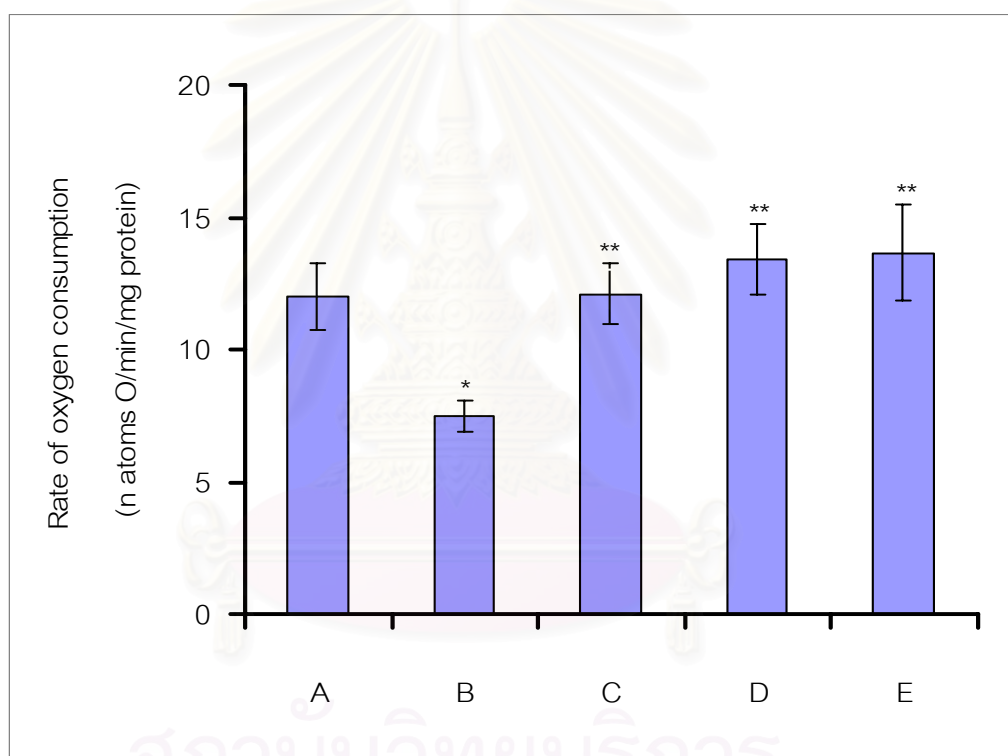
C = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

D = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + 1.05 mM DTT

รูปที่ 37 แสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl - 4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะไม่เติม BSA ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม BSA 5, 10 และ 15 mg ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.72 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.932 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 49.27  $\mu$ M 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

A = absolute ethanol

B = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

C = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + 5 mg BSA

D = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + 10 mg BSA

E = 25  $\mu$ g (49.27  $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + 15 mg BSA

รูปที่ 38 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบกับ DNP ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase

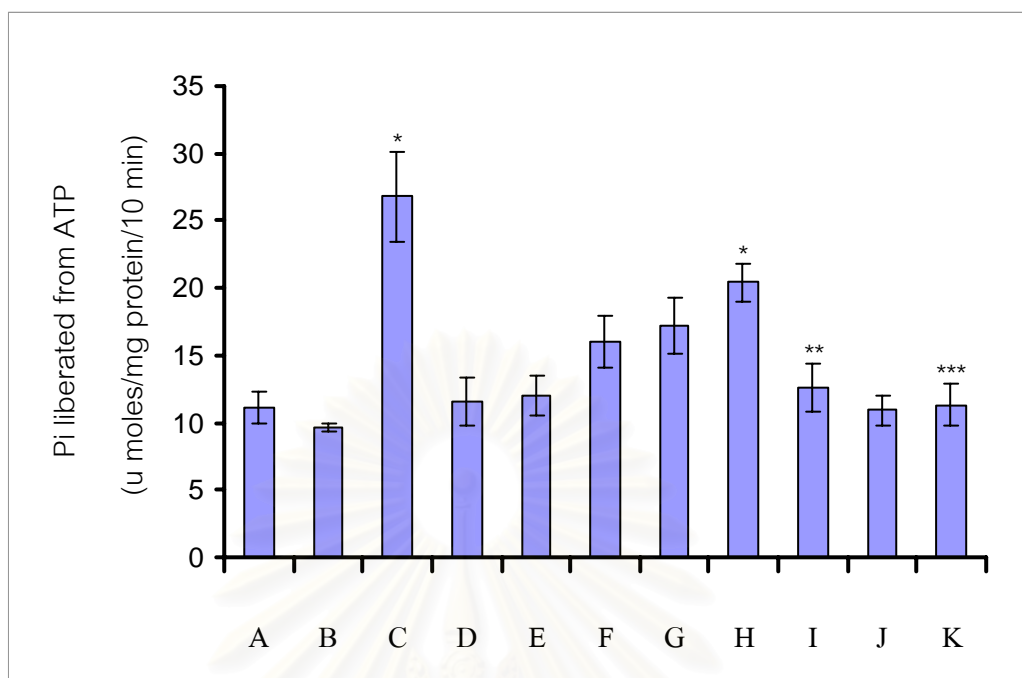
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM  $MgCl_2$ , 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.03 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP

\*\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 100  $\mu\text{g}$  1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

A = non absolute ethanol

B = absolute ethanol

C = 0.17 mM DNP

D = 5  $\mu\text{g}$  (6.32  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

E = 10  $\mu\text{g}$  (12.68  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

F = 25  $\mu\text{g}$  (31.67  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

G = 50  $\mu\text{g}$  (63.34  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

H = 100  $\mu\text{g}$  (126.69  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

I = 0.17 mM DNP + 5mg/ml oligomycin 2  $\mu\text{l}$

J = 25  $\mu\text{g}$  (31.67  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol +  
5 mg/ml oligomycin 2  $\mu\text{l}$  oligomycin

K = 100  $\mu\text{g}$  (126.69  $\mu\text{M}$ ) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol +  
5 mg/ml oligomycin 2  $\mu\text{l}$

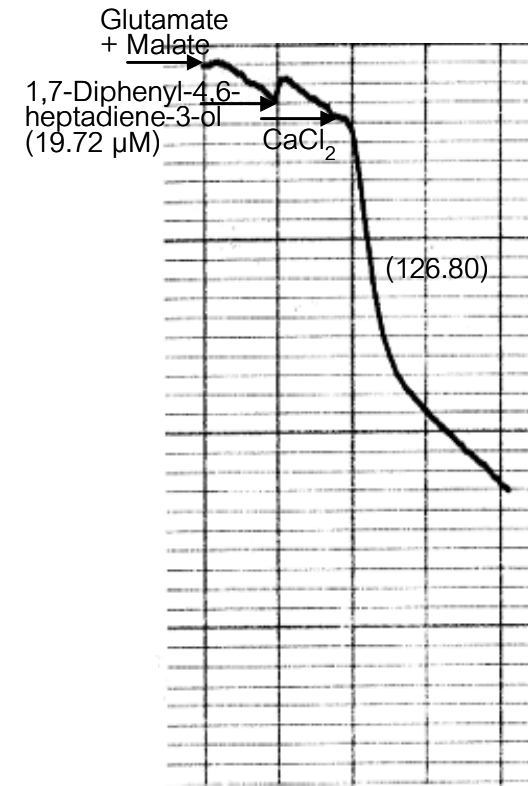
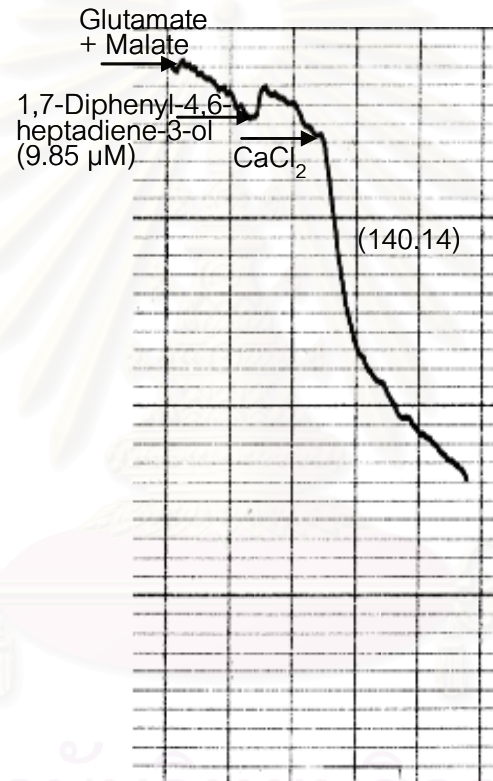
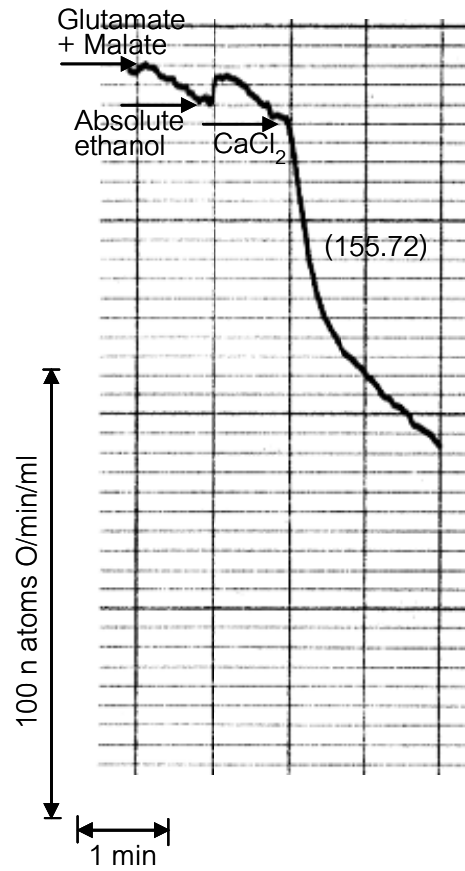
รูปที่ 39 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM  $CaCl_2$ , 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

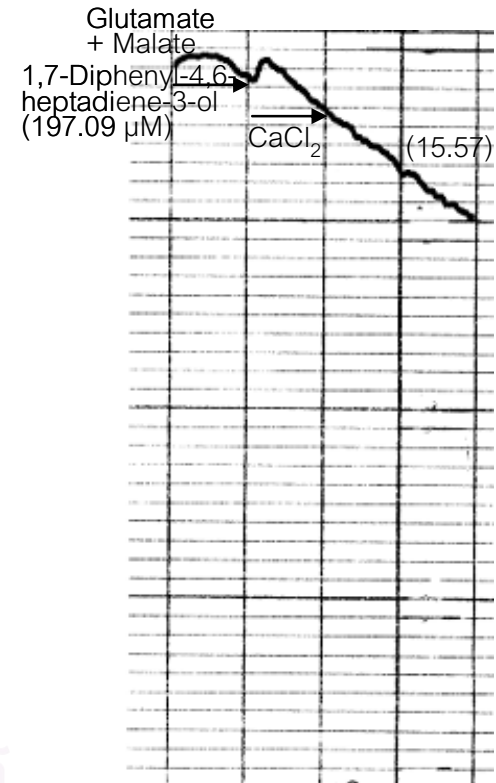
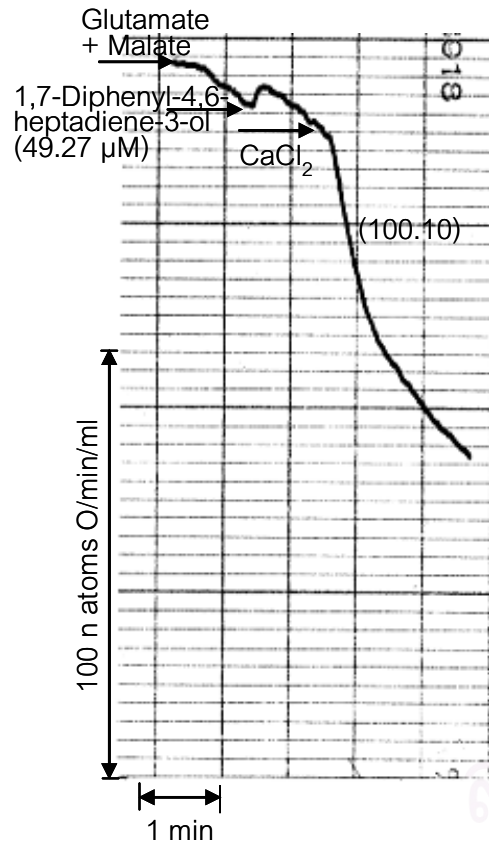
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



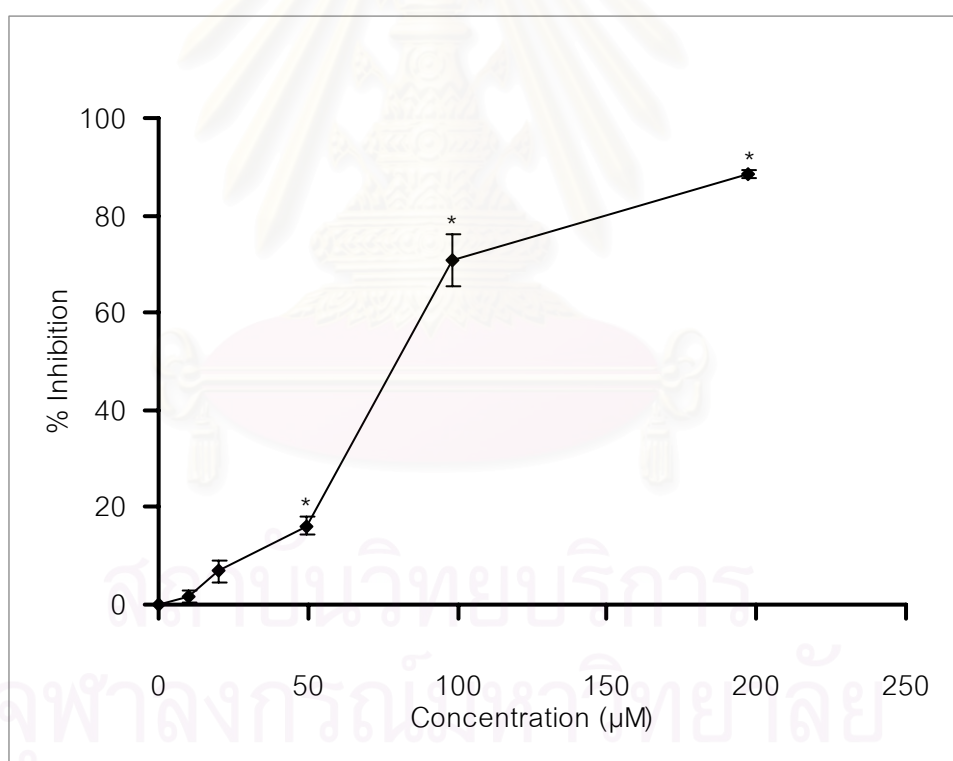
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 40 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM  $CaCl_2$ , 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 41 แสดง oxygraph tracing ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

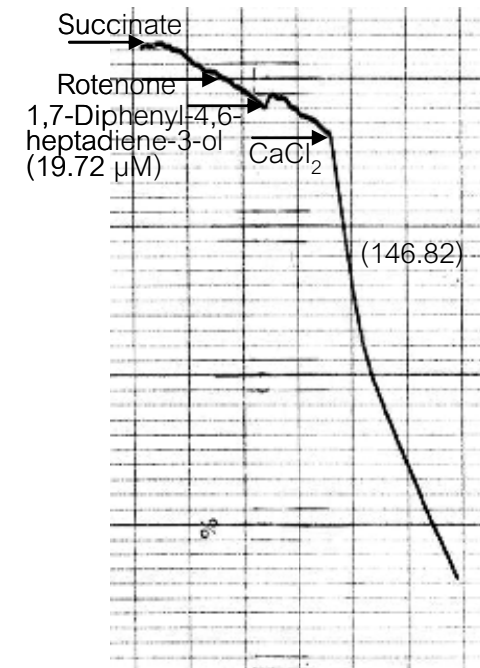
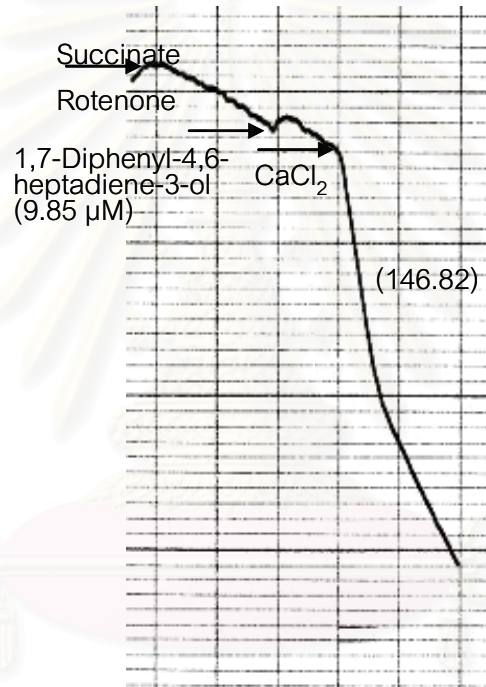
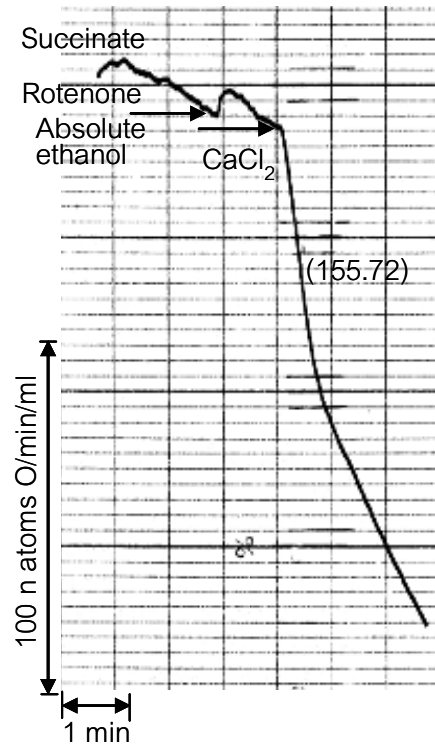
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.42 mM  $CaCl_2$ , 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/ml

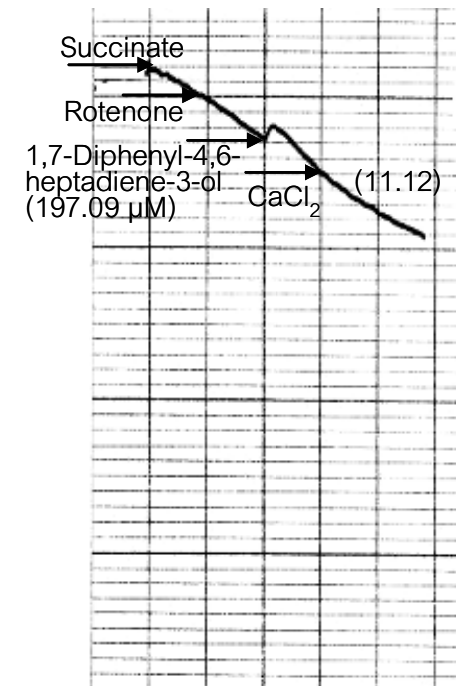
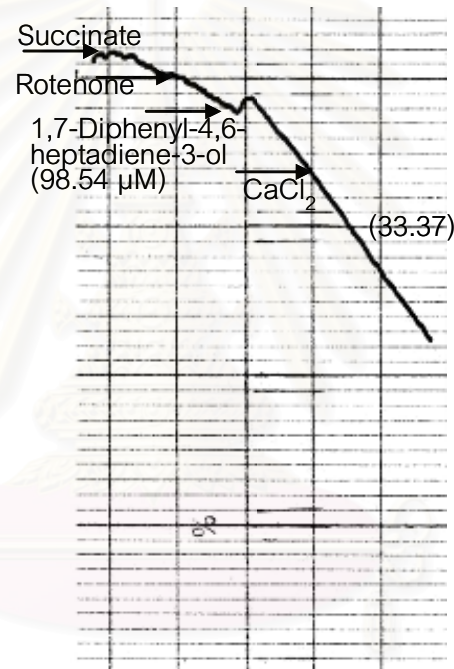
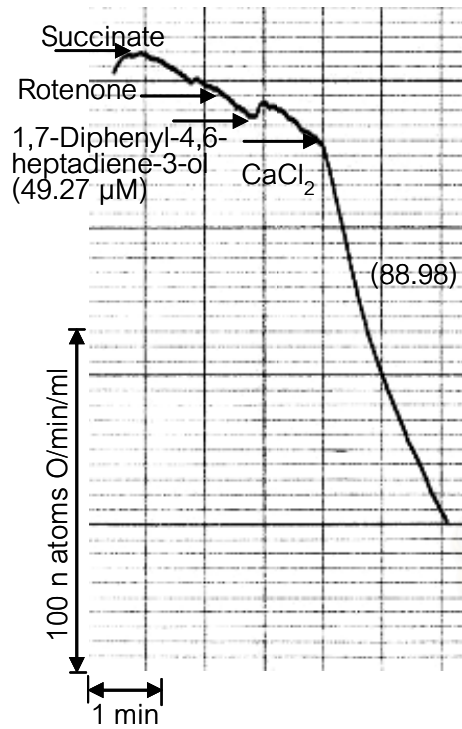


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

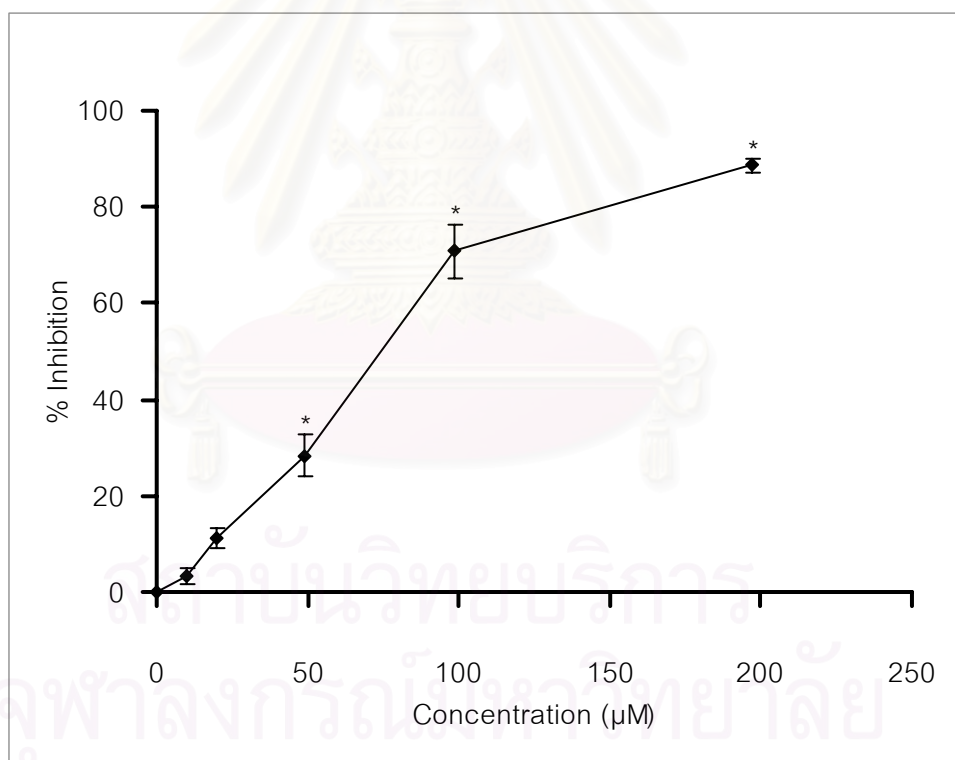


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.42 mM  $CaCl_2$ , 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

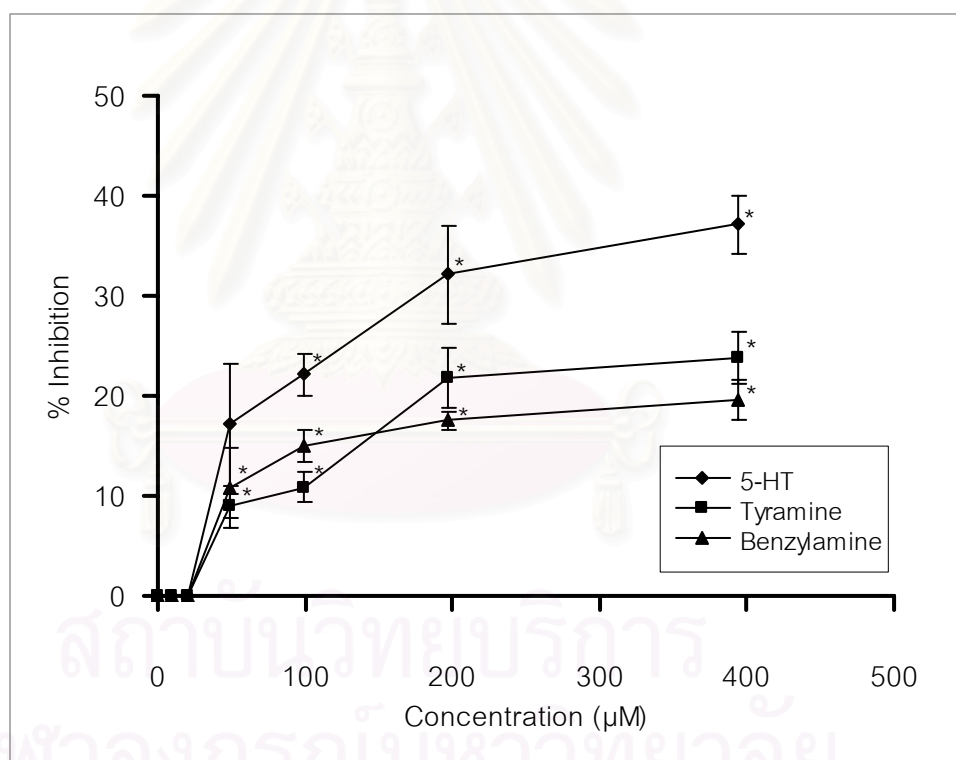


\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

รูปที่ 43 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M 5-HT, 0.1 M tyramine และ 0.1 M benzylamine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 0.99 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)



\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เมื่อนำมาศึกษาทาง *in vitro* โดยใช้ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่าสารทดสอบในขนาดที่ทำการศึกษามีความสามารถเปลี่ยนแปลงหน้าที่สำคัญของไมโตคอนเดรียได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจได้ทั้ง complex I และ complex II สำหรับสมุนไพรในประเทศไทยตัวอื่นที่มีรายงานว่ามีการหายใจของไมโตคอนเดรีย เช่น rotenone ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในรากของต้นโล่ตีนหรือหางไหล (*Derris elliptica* (Roxb.) Benth.) จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ที่นำมาใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลง (สมสุข ศรีจักรวาล, 2534) ออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor โดยยับยั้งที่ complex I ในห่วงโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย (Wallace และ Starkov, 2000) สาร 22-hydroxytingenone ที่สกัดจากเปลือกของลำต้นแสนคอกำใหญ่ (*Glyptopetalum sclerocarpum* M. A. Lawson) ที่มีรายงานว่าทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) (Bavovada และคณะ, 1990) พบว่ามีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 3u respiration โดยยับยั้งการหายใจที่ complex I ของห่วงโซ่การหายใจมากกว่า complex II (นุตติยา วีระวัชรชัย, 2538) สาร 6-deoxyclitoriacetal ที่สกัดจากรากของต้นหนอนตายหยาก (*Clitoria macrophylla* Wall.) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม rotenoid ที่มีรายงานว่าสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกและหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว และกล้ามเนื้อลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภาได้ (การะเกด สายบรรดาศักดิ์, 2540) พบว่ามีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 3u โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจที่ complex I ของห่วงโซ่การหายใจ (มรกต อมรรัตนายุทธ์, 2540) เป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่เป็นสารสกัดจากสมุนไพรในประเทศไทยอีกตัวหนึ่งคือว่านชักมดลูก ที่ทำการศึกษาดังกล่าวถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเบื้องต้นต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### 1. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน

จากผลการวิจัยในบทที่ 4 พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ) ออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย แต่



มีผลน้อยมากต่อ state 4 respiration ทั้งในกรณีที่ใช้ NADH-linked substrate และ succinate เป็นซับสเตรต แสดงว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ตำแหน่ง complex I ของลูกโซ่การหายใจเช่นเดียวกับ rotenone (Wallace และ Starkov, 2000) และยังสามารถยับยั้ง complex II ของลูกโซ่การหายใจได้อีกด้วย เนื่องจากยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันที่ใช้ succinate เป็นซับสเตรต ซึ่งอาจเกิดจากการที่สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่ทำหน้าที่ออกซิไดส์ succinate ให้เป็น fumarate และส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ complex II ในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย เช่นเดียวกับการออกฤทธิ์ของ cadmium (Miccadei และ Floridi, 1993) ดังนั้นสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จึงแสดงฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง complex I และ complex II โดยขนาดความแรงในการเป็น respiratory chain inhibitor นั้น พบว่าค่า  $IC_{50}$  ต่อ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นซับสเตรต มีค่าเท่ากับ 29.57  $\mu\text{g}$  (58.27  $\mu\text{M}$ ) และ 21.53  $\mu\text{g}$  (42.44  $\mu\text{M}$ ) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความแรงของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในการยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I เปรียบเทียบกับ rotenone ซึ่งจากงานวิจัยของ Ernster และคณะ (1963) ได้ทำการศึกษาค่าผลของ rotenone ต่อการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรีย พบว่า rotenone ที่ความเข้มข้น 30 pmol/mg protein สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้อย่างสมบูรณ์ และจากงานวิจัยครั้งนี้ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ  $2.05 \times 10^5$  pmol/mg protein (197.09  $\mu\text{M}$ /1.85 mg protein) สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ร้อยละ 88.50 แสดงให้เห็นว่า rotenone สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ของไมโทคอนเดรียได้มากกว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ประมาณ 7,711 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ทำให้ค่า RCI ของไมโทคอนเดรียลดลง ซึ่งค่า RCI เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของไมโทคอนเดรียในการสร้าง ATP ดังนั้นผลโดยรวมจะทำให้ไมโทคอนเดรียสร้างพลังงาน ATP ให้กับเซลล์ได้น้อยลง โดยรบกวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของ respiratory chain และลดความสามารถของไมโทคอนเดรียในการเกิดการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชันอีกด้วย (รูปที่ 22-24 และรูปที่ 27-29)

ฤทธิ์ในการยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย จากผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol นั้น ไม่สามารถปกป้องด้วย DTT ในขนาดที่ทำการศึกษา



คือ 1.05 mM ได้ ซึ่ง DTT เป็นสารป้องกันการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (Cleland, 1964) เนื่องจากกลุ่ม sulfhydryl groups มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์บางชนิด รวมทั้งการทำงานของโปรตีนที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกจากไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันด้วย (Le-quoc และ Le-quoc, 1982; Robillard และ Konings, 1982) การทดลองนี้ต้องการศึกษาว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยจับกับ sulfhydryl groups ของไมโทคอนเดรียหรือไม่ จากการทดลองเมื่อให้ 1.05 mM DTT ก่อนที่จะเติม 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) พบว่า 1.05 mM DTT ไม่สามารถลดผลการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 3u respiration ได้ จากผลการทดลองอาจเป็นไปได้ว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยผ่านกลไกการจับกับ sulfhydryl groups ของไมโทคอนเดรีย ดังแสดงผลในรูปที่ 36

แต่พบว่าการเติม BSA สามารถลดฤทธิ์ของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในการยับยั้ง state 3 respiration ของไมโทคอนเดรียได้ (รูปที่ 37) โดย BSA เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ albumin ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญตัวหนึ่งในเลือด เนื่องจากยาหรือสารเมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะจับกับ plasma protein ซึ่งส่วนมากจะเป็น albumin ส่วนที่ไม่จับจะเป็นส่วน free drug ซึ่งเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ (Gilman และคณะ, 1985; Katzung, 1998) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) อาจจับกับ BSA ในขนาดที่ทำการศึกษาก็ได้ ทำให้ผลการออกฤทธิ์ของสารทดสอบลดลง แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาที่ใช้ BSA ขนาด 5, 10 และ 15 mg ซึ่งอาจเป็นขนาดที่สูงเกินไป เนื่องจากพบว่า BSA ขนาด 5 mg ก็ สามารถลดฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของไมโทคอนเดรีย จากผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ได้อย่างสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อไปในกรณีที่ลดขนาดของ BSA ลง เพื่อจะได้ทราบว่าขนาดของ BSA เท่าใด ที่เริ่มมีผลในการลดฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของไมโทคอนเดรีย

การศึกษาผลของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP ซึ่ง DNP เป็นสาร uncoupler มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weak acid) และละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic) ออกฤทธิ์ทำลาย proton gradient ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น proton ionophore คือสามารถจับกับ proton ( $\text{H}^+$ ) ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน แล้วเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มชั้นในเข้าไปใน matrix จากนั้นจึงแตกตัวให้  $\text{H}^+$  ได้โดยไม่ผ่าน

$F_0F_1$ -ATP synthase ส่งผลให้มีการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยไม่ทำให้เกิดการสร้าง ATP (Lehninger และคณะ, 2000) จากผลการศึกษาเมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นซับสเตรต พบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษามีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP (state 3u respiration) ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ใกล้เคียงกัน โดยฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP จากผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) ทั้งในกรณีที่ไม่ใส่สารทดสอบก่อนเติม DNP และในกรณีที่ใส่สารทดสอบหลังจากเติม DNP ดังแสดงในรูปที่ 32 และ 35 แต่กลไกของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในการออกฤทธิ์ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ไปทำปฏิกิริยากับ DNP โดยตรง เนื่องจากโครงสร้างของสารทดสอบมีความไวในการเกิดปฏิกิริยากับ DNP ได้น้อย ดังนั้นอาจต้องทำการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารทดสอบในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP ที่อาจเป็นไปได้ต่อไป

## 2. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

จากผลการวิจัยในบทที่ 4 รูปที่ 38 แสดงให้เห็นว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษามีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้ โดยสารทดสอบในทุกขนาดที่ทำการศึกษามีผลให้ปริมาณ  $P_i$  ที่เกิดจากการสลาย ATP เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase ที่เพิ่มขึ้น พบว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 100  $\mu$ g (126.69  $\mu$ M) มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP พบว่ามีฤทธิ์อ่อนกว่า ซึ่ง DNP เป็น classical uncoupler สามารถกระตุ้นให้เกิดการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้มี  $H^+$  gradient มากขึ้น จึงทำให้มีปริมาณ  $P_i$  เพิ่มขึ้นด้วย (Danishefsky, 1980) และจากผลการทดลองพบว่า oligomycin สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของ DNP และของ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ได้ ซึ่ง oligomycin เป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $F_0F_1$ -ATPase /ATP synthase (Garrett และ Grisham, 1999) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษามีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย oligomycin เช่นเดียวกับ DNP

### 3. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม

การทำงานของไมโทคอนเดรียนอกจากการสร้าง ATP โดยกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันแล้ว ยังสามารถขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียได้ ซึ่งต้องอาศัย membrane potential ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Murphy และ Smith, 2000) ดังนั้นการขนส่งแคลเซียมและการสร้าง ATP จึงเป็นคุณสมบัติพื้นฐานที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย

จากผลการทดลองในรูปที่ 40 และ 42 พบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษามีฤทธิ์ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว และฤทธิ์ในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารทดสอบที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) ทั้งในกรณีที่ใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นซับสเตรต ผลที่ได้จึงน่าจะสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol สามารถยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ตำแหน่ง complex I และ complex II ของลูกโซ่การหายใจได้ แสดงว่าเมื่อไม่มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนทำให้ขาด proton gradient หรือพลังงานในการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมภายในไมโทคอนเดรีย

### 4. ผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO

monoamine oxidase เป็น marker enzyme ที่ผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรียและทำหน้าที่ออกซิโดสสารพวก monoamine ในการทดลองใช้ 5-HT เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO-A, benzylamine เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO-B และ tyramine เป็นซับสเตรตสำหรับ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ขึ้นไป มีฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A ได้ดีกว่า MAO-B ลักษณะของ dose-response curve ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อขนาดของสารทดสอบเพิ่มขึ้นแต่ฤทธิ์การยับยั้งเพิ่มขึ้นไม่มากนัก โดยขนาดของสารสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (394.14  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ร้อยละ  $37.14 \pm 2.86$  ส่วน dose-response curve ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B และ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง ในช่วงขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) จะแสดงฤทธิ์การยับยั้งต่ำๆ ตลอดช่วงที่ทำการศึกษา โดยที่ขนาดของสารสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (394.14  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B และ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง ได้เพียงร้อยละ  $19.59 \pm 1.97$  และ  $23.81 \pm 2.53$  ตามลำดับ ดังนั้นสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จึง

ออกฤทธิ์เป็น non-selective MAO inhibitor โดยยับยั้ง MAO-A ได้มากกว่า MAO-B ดังแสดงในรูปที่ 43

**จากการศึกษาข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ได้ดังนี้**

1. สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 10  $\mu\text{g}$  (19.72  $\mu\text{M}$ ) ออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งตำแหน่ง complex I และ complex II ในลูกลูโซการหายใจ

2. DTT ในขนาดที่ทำการศึกษาคือ 1.05 mM ไม่สามารถลดผลการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียในช่วง state 3 และ state 3u respiration ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ได้ ดังนั้นการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol จึงไม่เกี่ยวข้องกับการที่สารไปจับกับหมู่ sulfhydryl groups (-SH) ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย

3. BSA ในขนาด 5, 10 และ 15 mg สามารถลดฤทธิ์การยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของไมโทคอนเดรีย จากผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ขนาด 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) ได้

4. สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษามีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้ แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้นอ่อนกว่า DNP ซึ่งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol สามารถยับยั้งได้ด้วย oligomycin เช่นเดียวกับ DNP

5. สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมของไมโทคอนเดรียได้ เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็นซับสเตรต เนื่องจากสารทดสอบมีคุณสมบัติเป็น respiratory chain inhibitor ทำให้ขาด proton gradient หรือพลังงานในการขนส่งแคลเซียมไปสะสมภายในไมโทคอนเดรีย

6. สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ในขนาดที่ทำการศึกษาดังแต่ 25  $\mu\text{g}$  (49.27  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้แบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A ได้มากกว่า MAO-B แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างต่ำ

จากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ซึ่งเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งจากเหง้าของว่านชักมดลูก ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียหลายประการ ฤทธิ์ที่สำคัญคือเป็น respiratory chain inhibitor โดยสามารถยับยั้งการส่งผ่าน



อิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรียที่ตำแหน่ง complex I และ complex II ทั้งยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ส่งผลให้การสร้าง ATP ลดลง จึงทำให้เซลล์ขาดแคลน ATP ได้ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ATP มีความสำคัญและจำเป็นต่อเซลล์ทุกชนิดในร่างกาย เช่น การหดตัวของกล้ามเนื้อทุกชนิด และจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biosynthesis) และกระบวนการขนส่งแบบ active transport (Olson, 1982) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมภายในไมโทคอนเดรีย ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่สะสมแคลเซียมได้เหมือนในภาวะปกติ และยังพบว่าสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้อีกด้วย

จากการที่ 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีฤทธิ์หลายประการ จึงควรมีการศึกษาต่อไปถึงความสำคัญในฤทธิ์อื่นที่มี เช่น การศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการเกิด lipid peroxidation ซึ่งไมโทคอนเดรียเป็นต้นแบบที่ดีในการศึกษาการเกิด lipid peroxidation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของไขมัน โดยการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียคุณสมบัติและหน้าที่ของเยื่อหุ้มไป (Haraguchi และคณะ, 1995) และเนื่องจากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรียนั้นมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย จึงมีโอกาสเกิด reactive oxygen species (ROS) ต่างๆ ขึ้นได้มาก เช่น superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) ทำให้มีโอกาสเกิด lipid peroxidation ในไมโทคอนเดรียได้มาก และหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรียนั้นเป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของลูกโซ่การหายใจที่อยู่ในเยื่อหุ้ม ซึ่งการเกิด lipid peroxidation จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้ม ทำให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียหน้าที่และก่อให้เกิดพยาธิสภาพตามมาได้ เช่น aging, apoptosis เป็นต้น

เมื่อพิจารณาในเชิงพิษวิทยา การที่สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ซึ่งเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งในเหง้าว่านชักมดลูก ออกฤทธิ์ลดการสร้าง ATP ในเซลล์ตับนี้ อาจมีผลข้างเคียงในการลดการทำงานของกระบวนการอื่นๆ ที่สำคัญในเซลล์ตับด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างเอนไซม์ การสร้างโปรตีนต่างๆซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของออร์แกเนลล์ต่างๆในเซลล์ ดังนั้นสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol อาจก่อพิษต่อเซลล์ตับได้ในกรณีที่ใช้สารนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับพิษวิทยาของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ใน *in vivo* ต่อไป เช่น ศึกษาผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ต่างๆที่ตับ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ตับจากผลของ

การได้รับสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และการได้รับสารแบบเรื้อรังในระยะยาว เป็นต้น เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีสารหรือยาหลายตัวที่แสดงฤทธิ์ต่อไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเป็น respiratory chain inhibitor และมีพิษต่อดับ เช่น gemfibrozil ซึ่งเป็นยาลดไขมันในเลือด ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ complex I ของลูกโซ่การหายใจ ส่งผลให้ความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ลดลง พบว่ายาคตัวนี้ก่อให้เกิดภาวะตับโต พบการรวมของ peroxisomes ในเซลล์ตับ และพบว่ามีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ใน peroxisomes ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลาย เช่น เอนไซม์ catalase เป็นต้น (กมลวรรณ ประภัสศิริพันธ์, 2536) นอกจากนี้อาจทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารประกอบหลักอื่นๆที่สกัดแยกได้จากเหง้าว่านชักมดลูกต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทั้งการศึกษาค้นคว้าผลของสารสกัดแต่ละตัวแบบเดี่ยวๆหรือการให้สารสกัดหลายตัวพร้อมๆกัน เนื่องจากการนำว่านชักมดลูกมาใช้ประโยชน์มักมีสารหลายตัวอยู่ร่วมกัน ไม่ค่อยนำสารสกัดเดี่ยวๆมาใช้เพียงตัวเดียว จึงควรทำการศึกษาเพื่อดูผลที่เกิดจากการให้สารแต่ละตัวร่วมกัน ว่ามีผลรบกวนการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียมากขึ้นหรือลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกรให้สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol หรือสารบริสุทธิ์อื่นที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูกเดี่ยวๆเพียงอย่างเดียว

จากงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าว่านชักมดลูก พบว่ามีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจได้ โดยฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกิดจากการไปรบกวนระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ (อนุกุล สวัสดิ์พาณิชย์, 2537) ซึ่งสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากจะพบในสารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนแล้วยังพบในสารสกัดจากเอทานอลด้วย ดังนั้นจากผลการวิจัยในครั้งนี้จึงสนับสนุนผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าว่านชักมดลูกที่มีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการที่เซลล์ขาด ATP

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเบื้องต้นถึงผลของสาร 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ที่สกัดแยกจากเหง้าว่านชักมดลูกต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย และจากการที่ 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol มีฤทธิ์หลายประการ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารสกัด 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อไป รวมทั้งสารประกอบหลักอื่นๆในเหง้าว่านชักมดลูกด้วย เพื่อจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของสมุนไพรตัวนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษา *in vivo*



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กมลวรรณ ประภัสศิริพันธ์. 2536. ผลของเจมไฟโบรซิลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- การะเกด สายบรรดาศักดิ์. 2540. ฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อก้ามเนื้อเรียบ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชนิดา โสมขันเงิน และวันสิริ ชื่นจิตสกุลถาวร. 2548. สารเคมีจากเหง้าว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.). รวมบทความวิจัยปริญญาบัณฑิตปี 2548.
- นราภรณ์ สุานะโชติพันธ์. 2545. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: หน่วยข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 19(3): 5-15.
- นุตติยา วีระวัชรชัย. 2538. ฤทธิ์อันค้ำปลิงของ 22-ไฮดรอกซีทีงจินอน ที่สกัดจากแสนคอกำใหญ่ ต่อกระบวนการหายใจ และออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโทคอนเดรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พัชรา วีระกะลัส. 2544. พลังงานและเมแทบอลิซึม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มรกต อมรรัตน์นาค. 2540. ผลของ 6-ดีออกซีคลิโทเรียซีทอล จากต้นหนอนตายหยากต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมสุข ศรีจักรวาท. 2534. โล่ดิน – ยาฆ่าแมลงพื้นบ้าน. กลุ่มพฤกษศาสตร์วิทยา. กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อนุกุล สวัสดิ์พานิชย์. 2537. ผลของสารสกัดด้วยเอธานอลจากว่านชักมดลูกต่อการหดตัวของก้ามเนื้อมดลูกหนูขาวทั้งภายในและที่แยกออกจากร่างกาย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. Energy

- conversion: Mitochondria and chloroplast. Molecular biology of The Cell, 4<sup>th</sup> ed. pp. 767-829. New York: Garland Science.
- Aminoff, M. J. 1995. Pharmacologic management of parkinsonism & other movement disorders. In B. G. Katzung (ed), Basic & clinical pharmacology, 6<sup>th</sup> ed. pp. 419-431. USA : Appleton & Lange.
- Avers, C. J. 1986. Molecular Cell Biology. California: Benjamin/Cummings Publishing: 305-362.
- Bavovada, R., Blasko, G., Shieh, H. L., Pezzuto, J. M., and Cordell, G. A. 1990. Spectral assignment and cytotoxicity of 22-hydroxytingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. Planta. Med. 56: 380-382.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. 2001. Oxidative Phosphorylation. Biochemistry, 5<sup>th</sup> ed. pp. 492. New York: W.H. Freeman and Company.
- Bernardi, P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. Physiol. Rev. 79: 1127-1146.
- Bertina, R. M., and Slater, E. C. 1975. The effect of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone-induced ATPase of rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 376: 492-504.
- Binda, C., Hubalek, F., Li, M., Edmondson, D. E., and Mattevi, A. 2004. Minireview: Crystal structure of human monoamine oxidase B, a drug target enzyme monotonically inserted into the mitochondrial outer membrane. FEBS Lett. 564: 225-228.
- Carafoli, E. 2003. Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. Trends Biochem. Sci. 28(4): 175-180.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., and Chakraborti, S. 1999. Oxidant, mitochondria and calcium: An overview. Cell. Signal. 11(2): 77-85.
- Chance, E., and Williams, G. R. 1956. The respiratory chain an oxidative phosphorylation. Adv. Enzymology. 17: 65-134.
- Cleland, W. W. 1964. Dithiothreitol, A new protective reagent for SH group. Biochemistry. 3: 480-482.
- Danishefsky, I. 1980. Biochemistry for medical sciences, 1<sup>st</sup> ed. Boston: Little Brown

and Company.

- Davison, A. N. 1958. Physiological role of monoamine oxidase. Physiol. Rev. 38: 729-747.
- Devlin, T. M. 2002. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 5<sup>th</sup> ed. pp. 561-589. New York: Wiley-Liss.
- Devlin, T. M. 2006. Bioenergetics and oxidative metabolism. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6<sup>th</sup> ed. pp. 550-573. New York: Wiley-Liss.
- Erecinska, M., and Wilson, D. F. 1981. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitors of mitochondrial functions. Oxford: Pergamon Press: 199-210.
- Ernster, L., Dallner, G., and Azzone, G. F. 1963. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. J. Biol. Chem. 238: 1124-1131.
- Fiske, O. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375-400.
- Garrett, R. H., and Grisham, C. M. 1999. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. pp. 673-707. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Garrett, R. H., and Grisham, C. M. 2002. Electron transport and oxidative phosphorylation. Principles of Biochemistry with a Human Focus. Philadelphia: Saunders College Publishing: 519-551.
- Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W., and Murad, F. 1985. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7<sup>th</sup> ed. New York: Macmillian.
- Hanstein, W. G. 1976. Uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta. 456: 129-148.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., and Yagi, A. 1995. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpinoids from *Rosmarinus officinalis*. Planta Med. 61: 333-336.
- Haugaard, N., Lee, N. H., Kostrzewa, R., Horm, R. S., and Haugard, E. S. 1969. The

- role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 172: 198-204.
- Heytler, P. G. 1981. Uncouplers of oxidative phosphorylation. Inhibitor of mitochondrial functions. Oxford: Pergamon Press: 199-208.
- Hogeboom, G. H. 1955. Fractionation of cell components of animal tissues. In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Methods in enzymology. Vol.1, pp. 16-19. New York: Academic Press:
- Houslay, M. D., and Tipton, K. F. 1976. Minireview: Multiple forms of monoamine oxidase: fact and artifact. Life Sci. 19: 467-478.
- Important Medicinal and Aromatic Plants. 2007. Curcuma comosa [online]. Available from: <http://www.ics.trieste.it/MedicinalPlant/medicinalPlant.aspx?id=81>[2007, march 20]
- Jantaratnotai, N., Utaisincharoen, P., Piyachaturawat, P., Chongthammakun, S., and Sanvarinda, Y. 2006. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. Life Sciences. 78: 571-577.
- Jurgens, T. M., et al. 1994. Novel nematocidal agents from *Curcuma comosa*. J Nat Prod. 57(2): 230-235.
- Katzung, B. G. 1998. Basic & Clinical Pharmacology, 7<sup>th</sup> ed. pp.1-62. USA: Appleton & Lange.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2000. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Principles of Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. pp. 659-721. New York: Worth Publishers.
- Le-quoc, K., and Le-quoc, D. 1982. Control of the mitochondrial inner membrane permeability by sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 216: 639-651.
- Lodish, H., et al. 2004. Cellular energetic. Molecular cell biology, 5<sup>th</sup> ed. pp. 301-330. New York: W.H. Freeman and Company.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mathews, C. K., Holde, K. E. and Ahern, K. G. 2000. Electron transport, oxidative phosphorylation, and oxygen metabolism. Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed. pp. 522-557.

An imprint of Addison Wesley Longman.

- Miccadei, S., and Floridi, A. 1993. Site of inhibition mitochondrial electron transport by cadmium. Chemico Biological Interactions. 89: 159-167.
- Miller, G. L. 1959. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem. 31: 964-965.
- Murphy, M. P., and Smith, R. A. J. 2000. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 41: 235-250.
- Myers, D. K., and Slater, E. C. 1957. The enzyme hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondrial. Activities at difference pH value. Biochem. J. 67: 558-572.
- Olson, M. S. 1982. Bioenergetics and oxidative metabolism. In T. M. Devlin (ed.), Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York: A Wiley medical publication: 255-324.
- Piyachaturawat, P., Ercharuporn, S., and Suksamran, A. 1995. Uterotrophic effect of *Curcuma comosa* in rats. Int J Phamacog. 33 (4): 334-338.
- Piyachaturawat, P., Gansar, R., and Suksamran, A. 1996. Choleric effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. Int J Pharmacog. 34(3):174-178.
- Piyachaturawat, P., Suwanampai, P., Komaratat, P., Chuncharunee, A., and Suksamran, A. 1998. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. Hepatology Research. 12: 198-206.
- Piyachaturawat, P., Timinkul, A., Chuncharunee, A., and Suksamran, A. 1998. Growth suppressing effect of *Curcuma comosa* extract on male reproductive organs in immature rats. Pharmaceutical Biol. 36 (1): 44-49.
- Piyachaturawat, P., Charoenpiboonsin, J., Toskulkao, C., and Suksamran, A. 1999. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. J. Ethnopharmacology. 66(2): 199-204.
- Piyachaturawat, P., Timinkul, A., Chuncharunee, A., and Suksamran, A. 1999. Effect of *Curcuma comosa* extract on male fertility in rats. Pharmaceutical Biol. 37 (1): 22-27.
- Piyachaturawat, P., Chai-ngam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., and Suksamran,



- A. 2000. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. European Journal of Pharmacology. 387: 221-227.
- Piyachaturawat, P., Srivoraphan, P., Chuncharunee, A., Komararat, P., and Suksamran, A. 2002. Cholesterol lowering effects of a choleric phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. European J. Pharmacology. 439: 141-147.
- Piyachaturawat, P., Tubtin, C., Chuncharunee, A., Komararat, P., and Suksamran, A. 2002. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. Toxicology Letters. 129: 123-132.
- Pletscher, A. 1966. I. Monoamine oxidase inhibitors. Pharmacol. Rev. 18: 115-127.
- Robillard, G. T., Konings, W. N. 1982. A hypothesis for the role of dithiol-disulfide interchange in solute transport and energy-transducing process. Eur. J. Biochem. 127: 597-604.
- Schnaitman, C., Erwin, V. G., and Greenawalt, J. W. 1967. Submitochondrial localization of monoamine oxidase. J. Cell. Biol. 32: 719-735.
- Suksamran, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P., and Byrnes, L. T. 1997. A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. Phytochemistry. 45(1): 103-104.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol. Rev. 54: 101-127.
- Urban, P., Andersen, J. K., Hsu, H. P. P., and Pompon, D. 1991. Comparative membrane locations and activities of human monoamine oxidase expressed in yeast. FEBS Lett. 286: 142-146.
- Voet, D., and Voet, J. G. 1995. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. pp. 563-596. New York: John Wiley & Sons.
- Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. W. 1999. Electron transport and oxidative phosphorylation. Fundamentals of Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed. pp. 492-528. New York: John Wiley & Sons.
- Wallace, K. B., and Starkov, A. A. 2000. Mitochondria targets of drug toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 353-388.

Weinbach, E. C. 1956. Pentachlorophenol and mitochondrial adenosinetriphosphatase. J. Biol. Chem. 221: 609-618.

Wikipedia, the free encyclopedia. 2007. *Curcuma comosa* [online]. Available from: <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Curcuma> [2007, march 20]

Zubay, G. 1993. Electron transport and oxidative phosphorylation. Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed. pp. 379-411. USA: Wm. C. Brown Communications.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration, state 4 respiration และ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol (µg)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ในปฏิกิริยา (µM)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)		RCI
		State 3 respiration	State 4 respiration	
Absolute ethanol	-	45.11 $\pm$ 4.78	9.96 $\pm$ 0.95	4.52 $\pm$ 0.07
5	9.85	43.32 $\pm$ 4.34	9.97 $\pm$ 1.05	4.36 $\pm$ 0.13
10	19.72	40.40 $\pm$ 4.95	9.73 $\pm$ 0.90	4.11 $\pm$ 0.18*
25	49.27	27.02 $\pm$ 2.79	9.26 $\pm$ 0.73	2.91 $\pm$ 0.16*
50	98.54	7.28 $\pm$ 1.18*	8.09 $\pm$ 0.97	0.90 $\pm$ 0.08*
100	197.09	6.34 $\pm$ 0.97*	7.86 $\pm$ 0.84	0.79 $\pm$ 0.12*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 7 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.85 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene-3-ol  (µg)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene-3-ol ในปฏิกิริยา  (µM)	ร้อยละของการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	3.61 $\pm$ 2.09
10	19.72	10.95 $\pm$ 2.52*
25	49.27	39.96 $\pm$ 1.34*
50	98.54	83.66 $\pm$ 2.21*
100	197.09	85.51 $\pm$ 2.38*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol



ตารางที่ 8 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration, state 4 respiration และ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl

ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6- heptadiene -3-ol (µg)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ในปฏิกิริยา (µM)	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)		RCI
		State 3 respiration	State 4 respiration	
Absolute ethanol	-	158.06 $\pm$ 52.95	36.58 $\pm$ 14.73	4.80 $\pm$ 0.44
5	9.85	132.40 $\pm$ 36.14	34.45 $\pm$ 12.82	4.35 $\pm$ 0.45
10	19.72	123.05 $\pm$ 34.52	34.10 $\pm$ 12.79	4.01 $\pm$ 0.38
25	49.27	67.38 $\pm$ 19.56	54.97 $\pm$ 22.08	1.44 $\pm$ 0.25*
50	98.54	24.21 $\pm$ 7.72	33.76 $\pm$ 12.76	0.77 $\pm$ 0.06*
100	197.09	19.72 $\pm$ 6.03	27.33 $\pm$ 9.45	0.76 $\pm$ 0.04*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 9 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.29 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol  ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene-3-ol ในปฏิกิริยา  ( $\mu$ M)	ร้อยละของการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3 respiration
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	11.93 $\pm$ 5.98
10	19.72	19.17 $\pm$ 6.35
25	49.27	56.25 $\pm$ 3.15*
50	98.54	84.65 $\pm$ 0.72*
100	197.09	87.10 $\pm$ 0.89*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 10 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.35 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ในปฏิกิริยา ( $\mu$ M)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจน ในช่วง state 3u respiration	
		เติมสารทดสอบ ก่อนเติม DNP	เติมสารทดสอบ หลังเติม DNP
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	4.34 $\pm$ 2.17	4.02 $\pm$ 2.95
10	19.72	18.74 $\pm$ 6.16	10.65 $\pm$ 3.17
25	49.27	50.71 $\pm$ 5.90*	59.89 $\pm$ 5.29*
50	98.54	84.13 $\pm$ 2.29*	92.17 $\pm$ 0.98*
100	197.09	86.73 $\pm$ 1.73*	92.70 $\pm$ 0.51*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 11 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.17 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ในปฏิกิริยา ( $\mu$ M)	ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจน ในช่วง state 3u respiration	
		เติมสารทดสอบ ก่อนเติม DNP	เติมสารทดสอบ หลังเติม DNP
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	1.23 $\pm$ 1.23	1.95 $\pm$ 1.12
10	19.72	6.54 $\pm$ 0.54	3.23 $\pm$ 2.37
25	49.27	16.56 $\pm$ 2.72*	63.95 $\pm$ 6.32*
50	98.54	81.06 $\pm$ 3.28*	86.85 $\pm$ 3.09*
100	197.09	86.30 $\pm$ 0.57*	88.16 $\pm$ 3.00*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 12 แสดงผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 1.05 mM DTT 2  $\mu$ l, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะไม่เติม DTT ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม DTT ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.21 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.926 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

การทดลอง	อัตราการใช้ออกซิเจน (n atoms O/min/mg protein)	
	State 3 respiration	State 3u respiration
Absolute ethanol	12.31 $\pm$ 0.44	17.61 $\pm$ 0.98
Absolute ethanol + 1.05 mM DTT	12.56 $\pm$ 0.42	17.17 $\pm$ 0.73
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol	7.37 $\pm$ 0.45*	8.64 $\pm$ 0.85*
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + 1.05 mM DTT	7.96 $\pm$ 0.65*	10.40 $\pm$ 1.43*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 13 แสดงผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะไม่เติม BSA ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม BSA 5, 10 และ 15 mg ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.72 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.932 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

การทดลอง	อัตราการใช้ออกซิเจน ในช่วง state 3 respiration (n atoms O/min/mg protein)
Absolute ethanol	11.98 $\pm$ 1.25
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol	7.48 $\pm$ 0.58*
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + BSA 5 mg	12.11 $\pm$ 1.18**
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + BSA 10 mg	13.41 $\pm$ 1.32**
25 $\mu$ g (49.27 $\mu$ M) 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol + BSA 15 mg	13.64 $\pm$ 1.81**

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 25  $\mu$ g 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol



ตารางที่ 14 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการทำงานของ เอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติม สาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl และไมโตคอนเดรีย เฉลี่ย 1.03 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

การทดลอง	Pi liberated (µmoles/mg protein/10 min)
Non absolute ethanol	11.12 ± 1.14
Absolute ethanol	9.68 ± 0.28
0.17 mM DNP	26.81 ± 3.36*
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 5 µg (6.32 µM)	11.54 ± 1.78
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 10 µg (12.68 µM)	11.99 ± 1.45
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 25 µg (31.67 µM)	15.96 ± 1.94
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 50 µg (63.34 µM)	17.21 ± 2.10
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 100 µg (126.69 µM)	20.41 ± 1.36*
0.17 mM DNP + 5 mg/ml oligomycin 2 µl	12.66 ± 1.77**
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 25 µg (31.67 µM) + 5 mg/ml oligomycin 2 µl	10.90 ± 1.17
1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol 100 µg (126.69 µM) + 5 mg/ml oligomycin 2 µl	11.30 ± 1.58***

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP

\*\*\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 126.69 µM 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol

ตารางที่ 15 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10 µl ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol (µg)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene-3-ol ในปฏิกิริยา (µM)	ร้อยละของการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจน ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม
Absolute ethanol	-	0.00 ± 0.00
5	9.85	1.80 ± 1.24
10	19.72	6.81 ± 2.34
25	49.27	16.12 ± 1.91*
50	98.54	70.74 ± 5.39*
100	197.09	88.50 ± 0.65*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 16 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.42 mM CaCl<sub>2</sub>, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมจะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene-3-ol ในปฏิกิริยา ( $\mu$ M)	ร้อยละของการยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจน ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	3.18 $\pm$ 1.69
10	19.72	11.12 $\pm$ 1.95
25	49.27	28.42 $\pm$ 4.19*
50	98.54	70.77 $\pm$ 5.45*
100	197.09	88.66 $\pm$ 1.59*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

ตารางที่ 17 แสดงผลของสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M 5-HT, 0.1 M tyramine และ 0.1 M benzylamine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุม จะเติม absolute ethanol ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาจะเติมสาร 1,7-diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10  $\mu$ l ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 0.99 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n=4)

ขนาดของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ( $\mu$ g)	ความเข้มข้นของ 1,7-diphenyl- 4,6-heptadiene -3-ol ในปฏิกิริยา ( $\mu$ M)	ร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO		
		MAO ชนิดไม่จำเพาะ เจาะจง	MAO-A	MAO-B
Absolute ethanol	-	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
5	9.85	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
10	19.72	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
25	49.27	9.07 $\pm$ 1.18*	17.14 $\pm$ 6.06	10.83 $\pm$ 3.94*
50	98.54	10.86 $\pm$ 1.51*	22.14 $\pm$ 2.14*	15.00 $\pm$ 1.68*
100	197.09	21.73 $\pm$ 3.01*	32.14 $\pm$ 4.86*	17.50 $\pm$ 0.83*
200	394.17	23.81 $\pm$ 2.53*	37.14 $\pm$ 2.86*	19.59 $\pm$ 1.97*

\* p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ absolute ethanol

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพจณีย์ พวงไพโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเกศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาเกศาสตรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548 ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำ คณะเกศาสตร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย