บทที่ 1

บทนำ

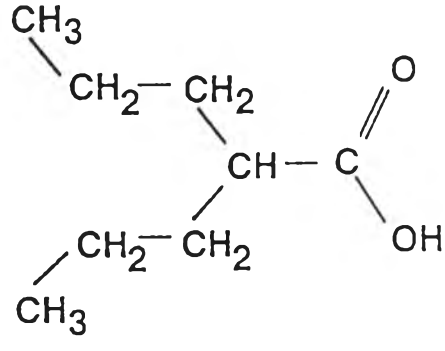
โรคลมชัก (epilepsy) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดภาวะชัก (seizure) ซึ่งอาการของโรคลมชักจะเกิดขึ้นทันทีและอาการนั้นจะหยุดได้เองในเวลาสั้นๆ แต่อาจเกิดซ้ำๆ ได้ โดยจะมีความผิดปกติของระบบประสาทยนต์ ระบบรับความรู้สึก ระบบประสาทออโตนอมิค หรือภาวะทางจิต ทั้งนี้อาการจะขึ้นอยู่กับชนิดของโรคลมชักนั้นๆ และขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเซลล์ประสาทโรคลมชัก (epileptogenic foci) นอกจากนี้ยังขึ้นกับประสาทกายวิภาควาตำแหน่งของเซลล์ประสาทโรคลมชักเชื่อมโยงกับระบบประสาทส่วนใดของสมอง โรคลมชักเป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยที่พบได้ถึง 1-2 ล้านคนในสหรัฐอเมริกา และ 20-40 ล้านคนทั่วโลก โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ โดยเฉพาะเด็กที่มีช่วงอายุต่ำกว่า 10 ปี และผู้ชายมีแนวโน้มในการเกิดโรคลมชักได้มากกว่าผู้หญิง (Rall and Schleifer, 1990; Fukuzuko and Jzumi, 1991) วิธีการรักษาโรคลมชักที่สำคัญคือ การให้ยาควบคุมอาการชัก (antiepileptic drug) ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มด้วยกันคือ

1. Hydantoins เช่น phenytoin (diphenylhydantoin)
2. Anticonvulsant barbiturates เช่น phenobarbital
3. Deoxybarbiturates เช่น primidone
4. Iminostilbenes เช่น carbamazepine
5. Succinimides เช่น ethosuximide
6. Valproic acid
7. Oxazolidindiones เช่น trimethadione
8. Benzodiazepines เช่น diazepam
9. Other antiepileptic agents เช่น phenacemide, acetazolamide

แต่ยาต้านชักส่วนใหญ่ก็ยังไม่สามารถควบคุมอาการชักได้ทุกชนิด รวมทั้งยังมีผลข้างเคียงจากยาอยู่มาก

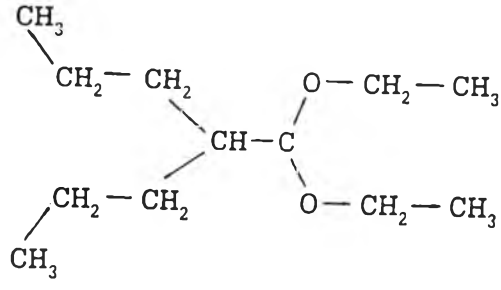
Valproic acid (VPA)

Valproic acid (2-propylpentanoic acid, n-dipropylacetic acid) เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการต้านชักกว้างขวาง ได้นำมาใช้ในการรักษา absence, myoclonic, tonic-clonic และ partial seizures (Johnston, 1984; Rall and Schleifer, 1990; Rogawaki and Porter, 1990; Fukuzako and Zumi, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม VPA เป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง และยังมีผลข้างเคียงอยู่มาก ที่พบบ่อยๆ คืออาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร และที่สำคัญคือ พิษต่อตับ (hepatotoxicity) (Katzung, 1995)



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ valproic acid (VPA)

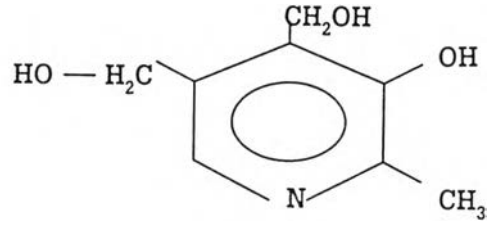
VPA เป็นของเหลว ที่มีความสามารถละลายน้ำต่ำ การเตรียมตำรับจึงนิยมใช้ในรูปของเกลือ sodium valproate (S.V.) ซึ่งจะเป็นของแข็ง และละลายน้ำได้ดีขึ้น แต่ sodium valproate เป็นสารที่สามารถดูดความชื้นได้เร็วมาก ทำให้มีความยุ่งยากในการเตรียมตำรับยา การทำยาให้อยู่ในรูป prodrug เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนา เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของยาให้ดีขึ้น ในกรณีของ VPA การทำ prodrug เป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับผลข้างเคียงของยา และการเตรียมตำรับของสาร ซึ่ง 2-propylpentanal acetals เป็น prodrug ชนิดหนึ่งของ VPA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านชัก



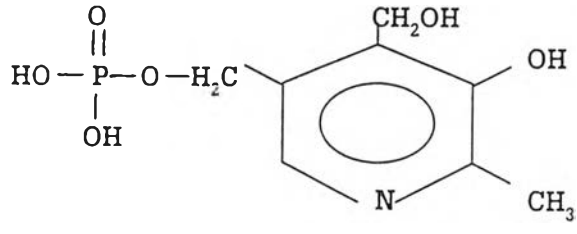
รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของ 2-propylpentanal acetal

Pyridoxine (vitamin B_6)

Pyridoxine หรือ วิตามินบีหก เป็นวิตามินที่ละลายน้ำ (water-soluble vitamin) ดูดซึมได้ดีบริเวณลำไส้เล็กส่วน jejunum ใช้รักษาอาการผิดปกติของระบบประสาทและโรคผิวหนังซึ่งเกิดจากการขาดวิตามินได้ดี การขาดวิตามินบีหก จะทำให้เกิดความผิดปกติหลายประการด้วยกัน ประการหนึ่งคือความผิดปกติของระบบประสาทซึ่งพบว่าจะทำให้มีอาการชักคล้ายลมบ้าหมู (grand mal) ดังนั้นความสำคัญของวิตามินบีหกต่อการป้องกันหรือรักษาอาการชักคือ วิตามินบีหกจะถูกเมตาบอไลท์โดยการถูกเติมหมู่ฟอตเฟต กลายเป็น pyridoxal-5-phosphate (PLP) ซึ่ง PLP เป็น coenzyme ของ enzyme หลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีของกรดอะมิโน ซึ่งรวมทั้งเอนไซม์ glutamic acid decarboxylase โดยในขบวนการ decarboxylation เอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เปลี่ยน glutamic acid ไปเป็น gamma-aminobutyric acid (GABA) (Leklem, 1994) GABA เป็นสารยับยั้งการส่งกระแสสัญญาณทางประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง (inhibitory neurotransmitter) เมื่อขาดวิตามินบีหก จึงมีผลทำให้ระดับของ GABA ลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคลมชักได้ (ราตรี สุดทรวง, 2535)



รูปที่ 3 แสดงสูตรโครงสร้างของ pyridoxine

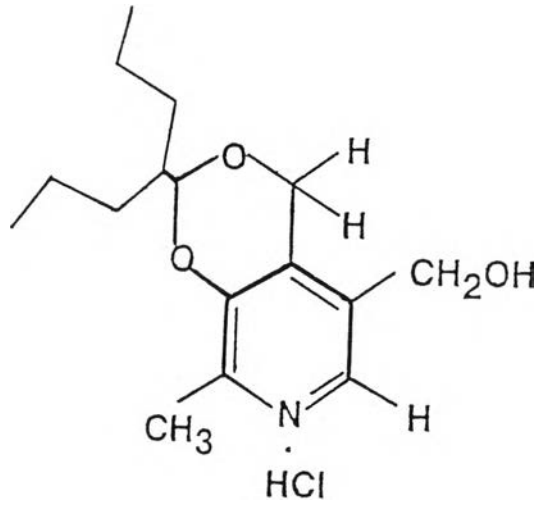


รูปที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างของ pyridoxal-5-phosphate (PLP)

จากข้อมูลคุณสมบัติของ valproic acid และหน้าที่ของ pyridoxal-5-phosphate ที่มีอยู่จึงน่าจะได้มีการที่จะสังเคราะห์สารตัวใหม่ขึ้นที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการต้านชักสูงและเกิดผลข้างเคียงน้อยลง ดังนั้น ชำนาญ ภัตรพานิช และ เฉลิมเกียรติ สงคราม ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้สังเคราะห์สารเคมีโดยรวมสูตรโครงสร้างของ 2-propylpentanal acetals เข้ากับ pyridoxine hydrochloride และได้ให้รหัสว่า **CU-763-10-01**

CU-763-10-01 (5-Hydroxymethyl-8-methyl-2-(1-propylbutyl)-*4H*-dioxino[4,5-*c*]pyridine หรือ α^4,3-O-(2-propylpentanylidene)pyridoxine)

CU-763-10-01 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 315.85 สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4 จุดหลอมเหลว เท่ากับ 172-174 $^{\circ}$C สารนี้ละลายได้ดีใน น้ำ, ethanol, methanol, chloroform, acetone



รูปที่ 5 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU-763-10-01 (มวลโมเลกุล = 315.85)

การศึกษาทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านชักของ CU-763-10-01 โดย มยุรี ตันติสิระ และทิพย์สุชน ชุนงาม (2538) พบว่า CU-763-10-01 สามารถออกฤทธิ์ต้านชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Maximal Electroshock Seizure (MES) และขนาดของยาที่สามารถป้องกันการชักในสัตว์ทดลองเป็นจำนวน 50 เปอร์เซนต์ (median effective dose ; ED_{50}) เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ VPA ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 320 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Loscher and Nolting, 1991) แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 มีประสิทธิภาพในการต้านชักสูงกว่า VPA และจากการทดลองเพื่อศึกษาผลทางด้านพิษวิทยาของสารต่อระบบประสาท (neurotoxic effect) โดยวิธี Rotarod test พบว่า ขนาดที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาททำให้กล้ามเนื้อสัตว์ทดลองเสียไปเป็นจำนวน 50 เปอร์เซนต์ (median neurotoxic dose ; TD_{50}) เท่ากับ 310 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะเห็นว่าขนาดของ CU-763-10-01 ที่ให้ผลในการรักษาอาการชักนั้นไม่มีผลเสียต่อระบบประสาทที่ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อเสียไป และขนาดที่จะเกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทของสารนี้ต่ำกว่า VPA (TD_{50} ของ CU-763-10-01 = 310 มิลลิกรัม/กิโลกรัม TD_{50} ของ VPA = 430 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

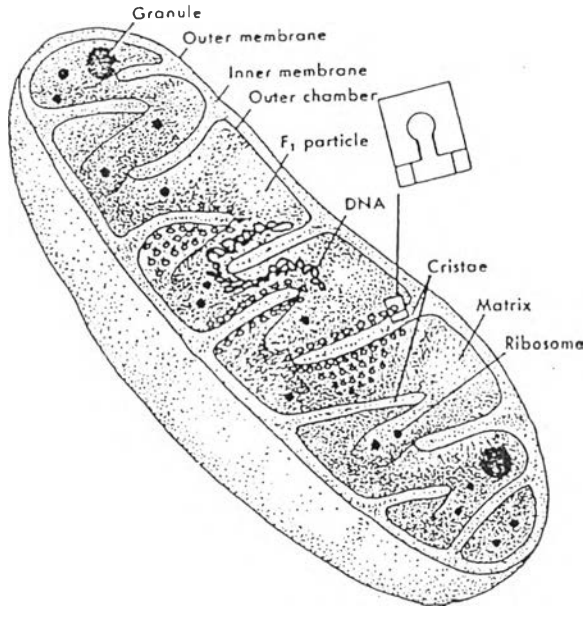
การหายใจของไมโตคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน
(Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญและเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (powerhouse of the cell) เนื่องจากมีปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย อาทิเช่น ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle or citric acid cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) จะให้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) (Avers, 1986)

รูปร่างของไมโตคอนเดรียจะแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ เช่น มีลักษณะกลม (football-shaped) ในเซลล์ตับ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) ในเซลล์ไตและใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างที่ซับซ้อน (complex irregular structure) เช่น ในยีสต์ นอกจากนี้ขนาดและจำนวนที่พบจะแตกต่างกันไป มักพบไมโตคอนเดรีย อยู่ใกล้กับโครงสร้างของเซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับแหล่งของเชื้อเพลิง (fuel) ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่างๆ (Lehninger, 1975) และแม้ว่าขนาด จำนวน รูปร่างจะแตกต่างกัน แต่โดยลักษณะรวมๆ แล้วจะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายใน ผนังชั้นในจะหุ้มล้อมรอบของเหลวที่มีลักษณะคล้ายเจล (gel) เรียกว่า matrix (รูปที่ 6)

ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในแง่ของ สวนประกอบทางเคมี (chemical composition), permeability และ เอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะของผิวที่เรียบ (smooth and unfold) หุ้มล้อมรอบผนังชั้นใน ประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP, ATP, น้ำ, sucrose รวมทั้งอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ เอนไซม์ที่อยู่ที่ผนังชั้นนอกคือ monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ผนังชั้นในจะยืดหยุ่น (elastic) และมีการพับ (fold) เข้าไปใน matrix ซึ่งเรียกว่า cristae เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากขึ้น

ผนังชั้นในจะประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และไขมันเป็นส่วนน้อย รวมทั้งมี cardiolipin (polyglycerophosphatides) อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีความสำคัญในการขนส่งอิเลคตรอน ผนังชั้นในมีคุณสมบัติไม่ยอมให้สาร และอิออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable) ยกเว้น O_2, CO_2 และ H_2O เท่านั้นที่จะสามารถผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ ดังนั้นการผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียจำเป็นต้องอาศัย โปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier or translocators) (Lehninger, 1975; Sartorell, Erecinska and Wilson, 1981; De Robertis and De Robertis, 1987; Voet and Voet, 1990)



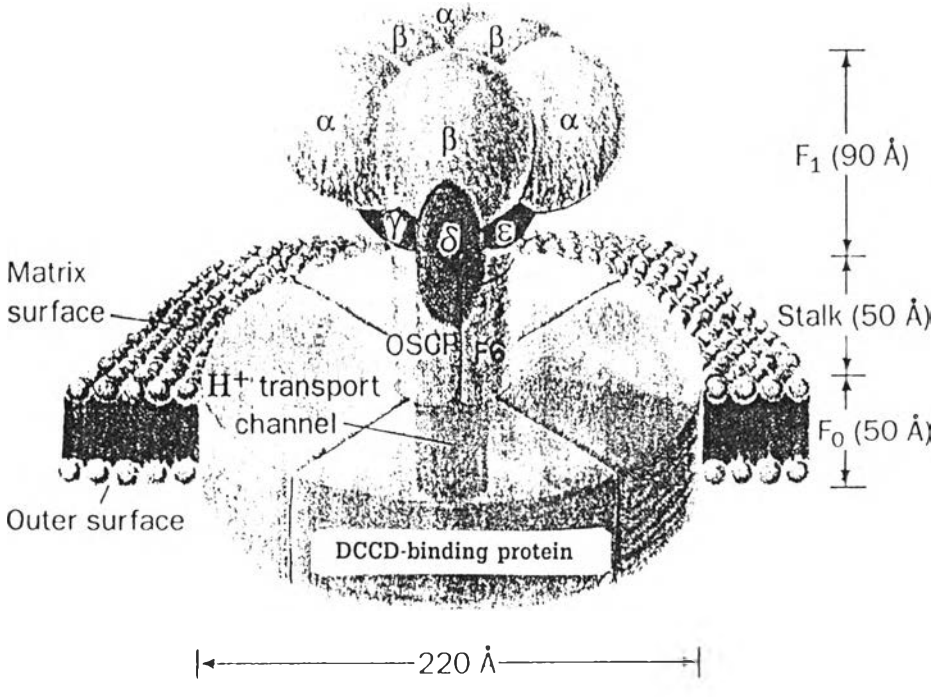
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของไมโตคอนเดรีย
(De Robertis and De Robertis, 1987)

ตารางที่ 1 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย
(De Robertis and De Robertis, 1987)

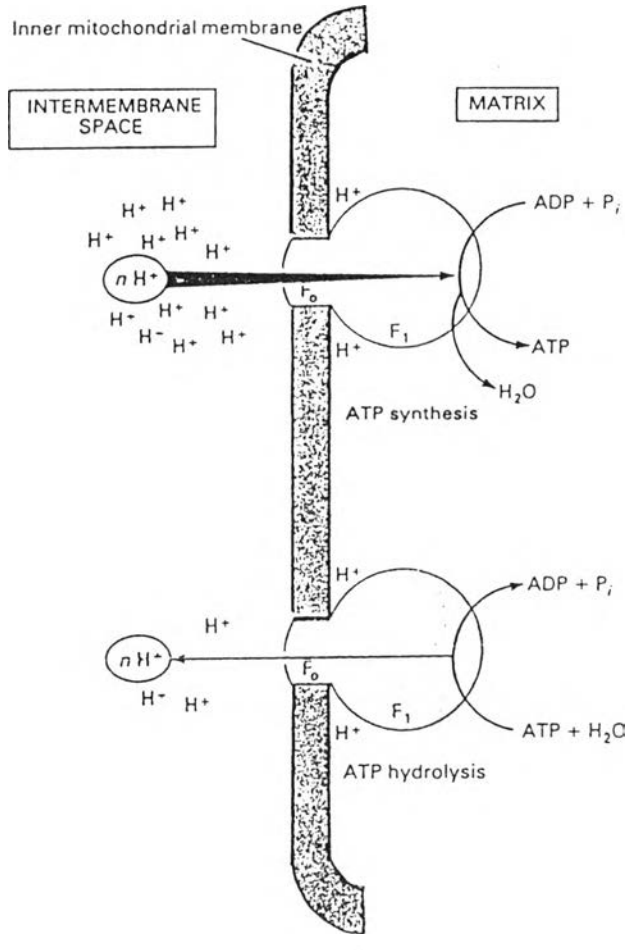
Outer membrane
Monoamine oxidase
Rotenone-insensitive NADH-cytochrome-c reductase
Kynurenine hydroxylase
Fatty acid CoA ligase
Intermembrane space
Adenylate kinase
Nucleoside diphosphokinase
Inner membrane
Respiratory chain enzymes
ATP synthetase
Succinate dehydrogenase
β-Hydroxybutyrate dehydrogenase
Carnitine fatty acid acyl transferase
Matrix
Malate and isocitrate dehydrogenases
Fumarase and aconitase
Citrate synthetase
α-Keto acid dehydrogenases
β-Oxidation enzymes

ส่วนภายในผนังชั้นใน จะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme และ enzyme ATPsynthase อยู่ด้วย ดังรายละเอียด (ตารางที่ 1) ส่วนใน matrix นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ แล้วยังประกอบด้วย DNA, RNA, ribosome, และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน (Avers, 1986)

บริเวณของ cristae ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะเห็นโครงสร้างทรงกลม ที่เรียกว่า spherical knob หรือ headpieces ยื่นออกมาจากผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase (ATP synthase and/or ATP hydrolase) (รูปที่ 7) เรียกว่า F_1 (coupling factor one) มีน้ำหนักโมเลกุล 360,000-380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน (peripheral membrane protein) มีคุณสมบัติละลายน้ำ (water-soluble) มี 5 subunit α_3, β_3, γ, δ และ ε ติดอยู่กับผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติ เมื่อมี Mg^{2+} เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น ADP + Pi อย่างช้าๆ แต่จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi (รูปที่ 8) ส่วนของ F_1 นี้จะไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin หรือ dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase คือ F_0 (membrane sector) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000 daltons เป็นส่วนที่ฝังอยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ประกอบด้วย 3 subunit คือ a, b และ c รวมทั้งส่วนของ DCCD-binding proteolipid F_0 ทำหน้าที่เป็น H^+ conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเป็นส่วนที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin และ dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) stalk sector เป็นส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase เช่นกัน ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ OSCP (oligomycin-sensitivity conferring protein) และ coupling factor 6 (F_6) เป็นส่วนที่ทำให้ F_1 bind กับ F_0 (Avers, 1986; Darnell, Lodish and Baltimore, 1986; Senior, 1988; Stryer, 1988; Futai, Noumi and Maeda, 1989; Voet and Voet, 1990; Parson, 1993)



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase (F_0F_1-ATPase) (Voet and Voet, 1990)



รูปที่ 8 แสดง F_0F_1-ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายและการสังเคราะห์ ATP (De Robertis and De Robertis, 1987)

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรียนั้น เริ่มจากสารอาหารต่างๆ ที่รับประทานเข้าไป ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ถูกย่อยสลายให้ได้สารโมเลกุลเล็กๆ กล่าวคือ โปรตีนจะถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) ไขมันจะถูกย่อยสลายได้เป็นกรดไขมัน (fatty acid) ส่วนคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยได้เป็นน้ำตาล (sugar) และ pyruvate ตามลำดับ สารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิสม เพื่อให้ได้ acetyl CoA (acetyl coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวกลางรวมกันของสารอาหารต่างๆ ดังกล่าว (intermediated) ที่สำคัญ เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่างๆ ในวัฏจักรเครปส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ และ น้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) จะรีดิวซ์ (reduce) NAD^+ และ FAD ไปเป็น NADH + H^+ และ $FADH_2$ (Darnell et al., 1986) ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่หายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด (Lehninger, 1975) คือ

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

2. Flavin-linked dehydrogenases หรือเรียกอย่างหนึ่งว่า flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเลคตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenases จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenases ตรงที่จะ bound กับเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะ bound กับ coenzyme

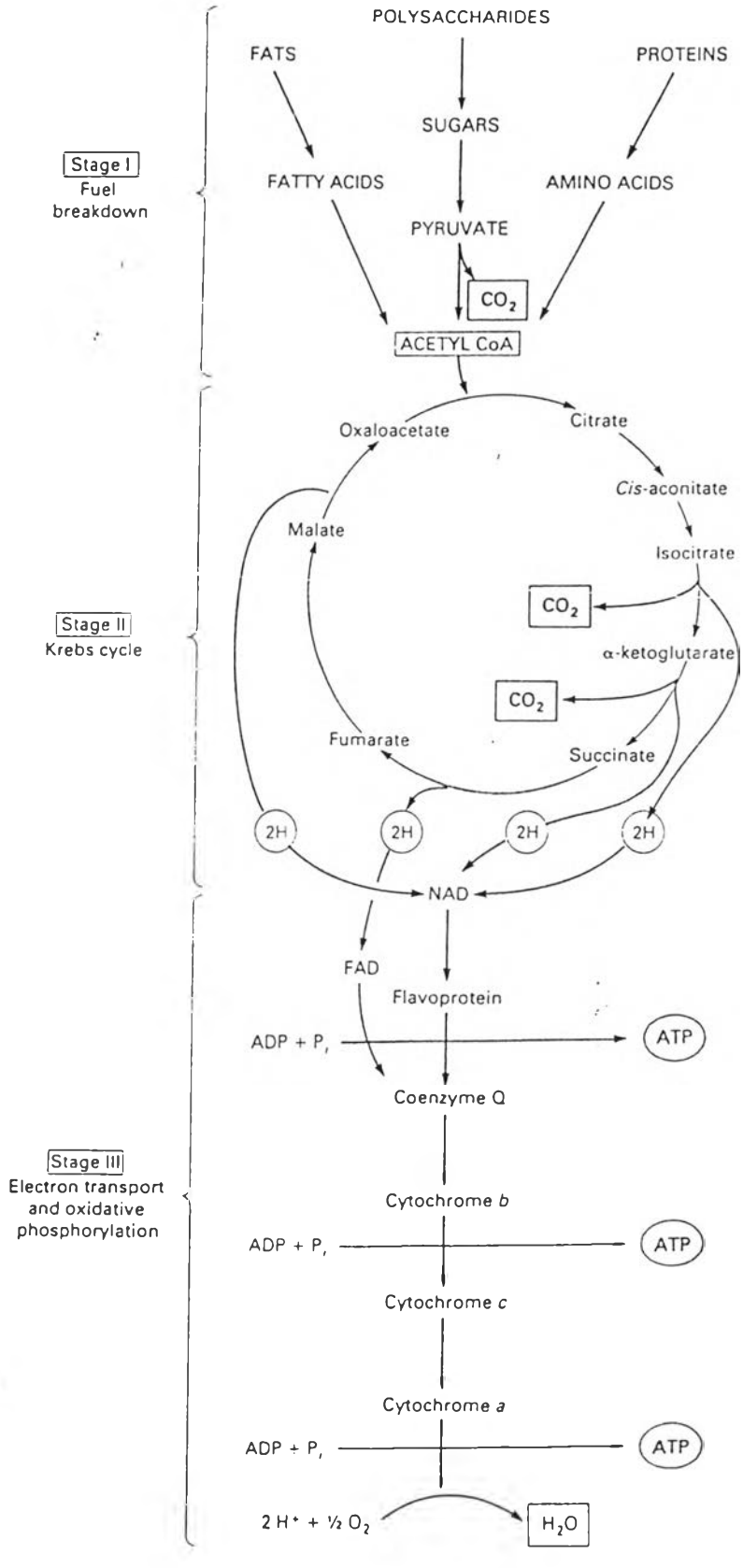
3. Iron-sulfur protein ประกอบด้วยเหล็ก (iron และ acid-labile sulfur) ได้แก่ ferredoxin

4. ระบบ cytochromes ประกอบด้วย irons-porphyrin เป็น prosthetic groups ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dehydrogenase systems ต่างๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b, c_1, c, a, a_3

5. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone

การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจเป็นการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนเป็นตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H^+ กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 9)

สับสเตรทที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ NAD^+-linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate, α-ketoglutarate ซึ่งสับสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น NADH + H^+ จะให้อิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I อีกพวกหนึ่งคือ FAD-linked substrate ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ถูกปลดปล่อยจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนแล้วเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1975)



รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle respiration chain และ ปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (Avers, 1986)

ลูกโซ่การหายใจได้แบ่งออกเป็น 4 complexed (Hatefi, 1985) (ตารางที่ 2) คือ

1. complex I หรือ NADH : Ubiquinone Oxidoreductase ซึ่งจะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง Ubiquinone, ferricyanide และ NAD

2. complex II หรือ succinate : Ubiquinone Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก succinate ไปยัง Ubiquinone (coenzyme Q)

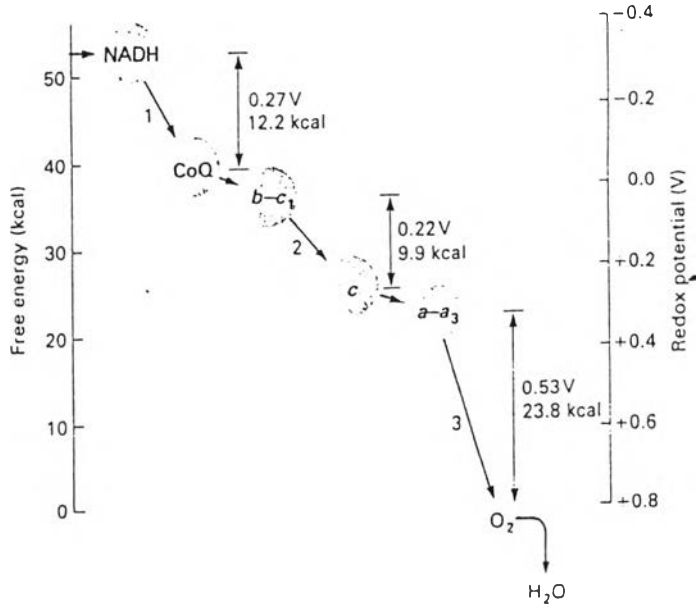
3. complex III หรือ Ubiquinone : Cytochrome *c* Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง cytochrome *c* และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่ละกลไกของการส่งผ่านอิเลคตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

4. complex IV หรือ Ferrocytochrome *c* : Oxygen Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome *c* ไปยังโมเลกุลออกซิเจน โดยมี artificial electron donor คือ ascorbate และN,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD)

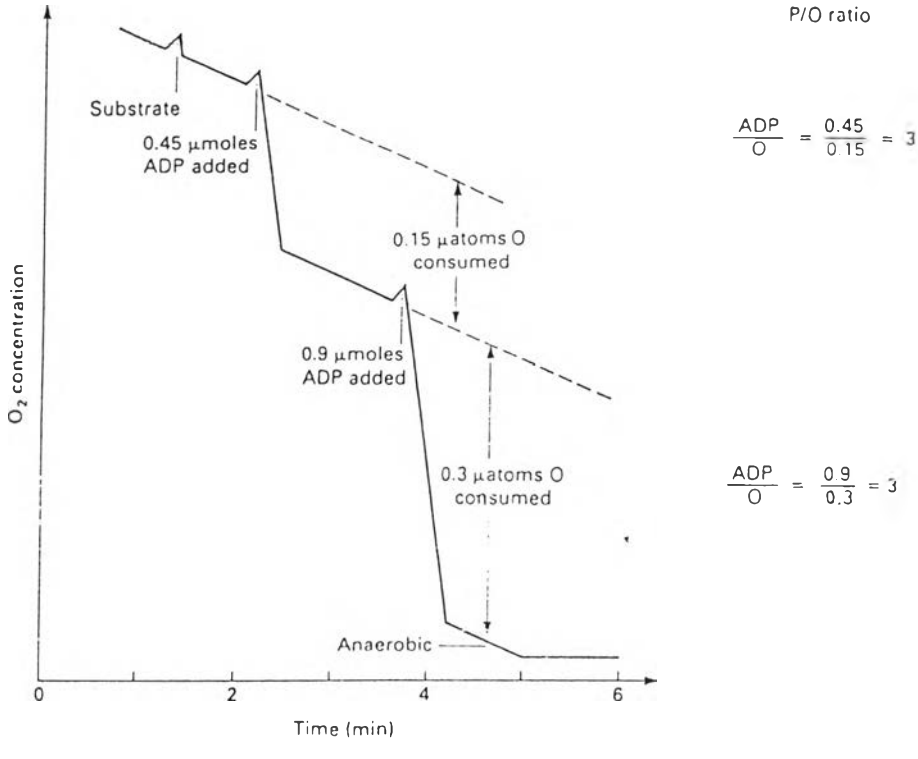
ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจนโดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylated ของ ADP กระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นเรียกว่า กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ในลูกโซ่การหายใจจะมีอยู่ 3 ตำแหน่งที่การปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอในการนำไปใช้ สังเคราะห์ ATP ตำแหน่งต่างๆแสดงไว้ในรูปที่ 10 การส่งผ่านของอิเลคตรอนจาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยัง ออกซิเจน จะสามารถสังเคราะห์ ATP ได้ 3โมเลกุล (หรือใกล้เคียง) และ 2 โมเลกุล ตามลำดับ ซึ่งคำนวณได้จาก ADP/O ratio (รูปที่ 11) ซึ่งการคำนวณ ADP/O จะได้กล่าวอย่างละเอียดใน บทที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่การหายใจทั้ง 4 complexes ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Avers, 1986)

Complex	Components
I. NADH dehydrogenase complex	NAD
	FMN
	Iron sulfur (FeS) centers
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
II. Succinate dehydrogenase complex	FAD
	Iron sulfur (FeS) centers
	Cytochrome b_{558}
	Phospholipids
III. Cytochrome *b*-c_1 complex	Cytochrome *b*
	Cytochrome c_1
	Nonheme iron protein
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
IV. Cytochrome oxidase complex	Cytochrome *a*
	Cytochrome a_3
	Copper
	Phospholipids



รูปที่ 10 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระ ในขณะที่อิเลคตรอนถูกส่งผ่านลูกโซ่การหายใจ (Avers, 1986)



รูปที่ 11 แสดงการสังเคราะห์ ATP ซึ่งคำนวณได้จาก ADP/O หรือ P/O ratio (Avers, 1986)

ในสภาวะปกติของไมโตคอนเดรีย (intact mitochondria) พบว่าการส่งผ่านอิเลคตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดขึ้นควบคู่กัน (tightly coupled) แต่บางกรณี ทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกกันได้ เช่น เมื่อไมโตคอนเดรียเกิดการบวม (mitochondrial swelling) เนื่องจาก ภาวะ osmotic shock หรือจากการที่มีการสะสมของ แคลเซียมฟอสเฟต ก็จะทำให้มี water uptake มากขึ้น, กรณีที่เตรียมไมโตคอนเดรียไม่ได้คุณภาพที่ดี หรือเก็บไว้นานจนเกินไป (aging mitochondria), กรณีที่ได้รับสาร uncouplers ต่างๆ เช่น DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจอย่างรวดเร็วแต่จะไม่เกิดการสังเคราห์ ATP ซึ่งภาวะนี้เรียกว่า uncoupling (Lehninger, 1975; De Robertis and De Robertis, 1987)

พลังงานอิสระ (free energy) ที่เกิดขึ้นขณะมีการส่งผ่านอิเลคตรอนไปตามลูกโซ่การหายใจนั้นเชื่อว่าน่าจะมีการสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดเพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ เช่น chemical coupling hypothesis, conformational coupling hypothesis แต่ในปัจจุบันแนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับคือ " chemiosmotic coupling hypothesis " ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี ค.ศ. 1961 (Boyer et al., 1977; Mitchell, 1977; Avers, 1986)

Mitchell ได้สรุปข้อเท็จจริงเกี่ยวกับกลไกขั้นพื้นฐาน จากโครงสร้างและหน้าที่ของเมมเบรนในไมโตคอนเดรีย รวมทั้งจากผลการทดลองต่างๆ ไว้ 4 ข้อ ดังนี้ (Avers, 1986)

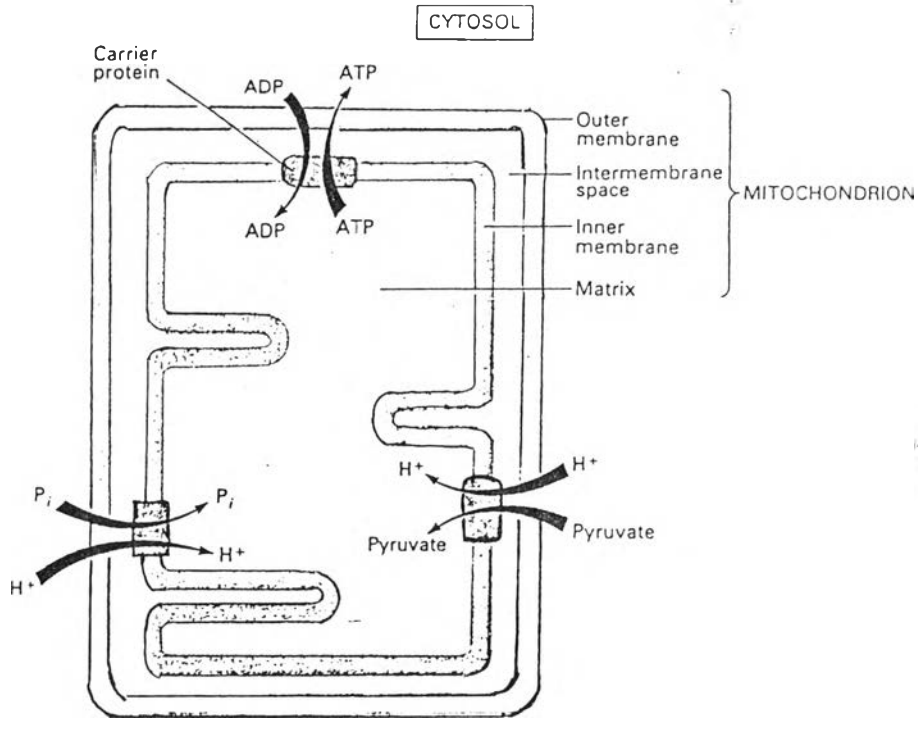
1. ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย มีคุณสมบัติที่จะไม่ยอมให้ H^+, OH^- และอิออนตัวอื่นเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable)

2. ส่วนประกอบต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจจะทำหน้าที่ส่งผ่านอิเลคตรอน โดยตัวรับ-ส่งอิเลคตรอน ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ proton ออกจาก matrix ผ่านผนังชั้นในเข้าสู่ intermembrane space

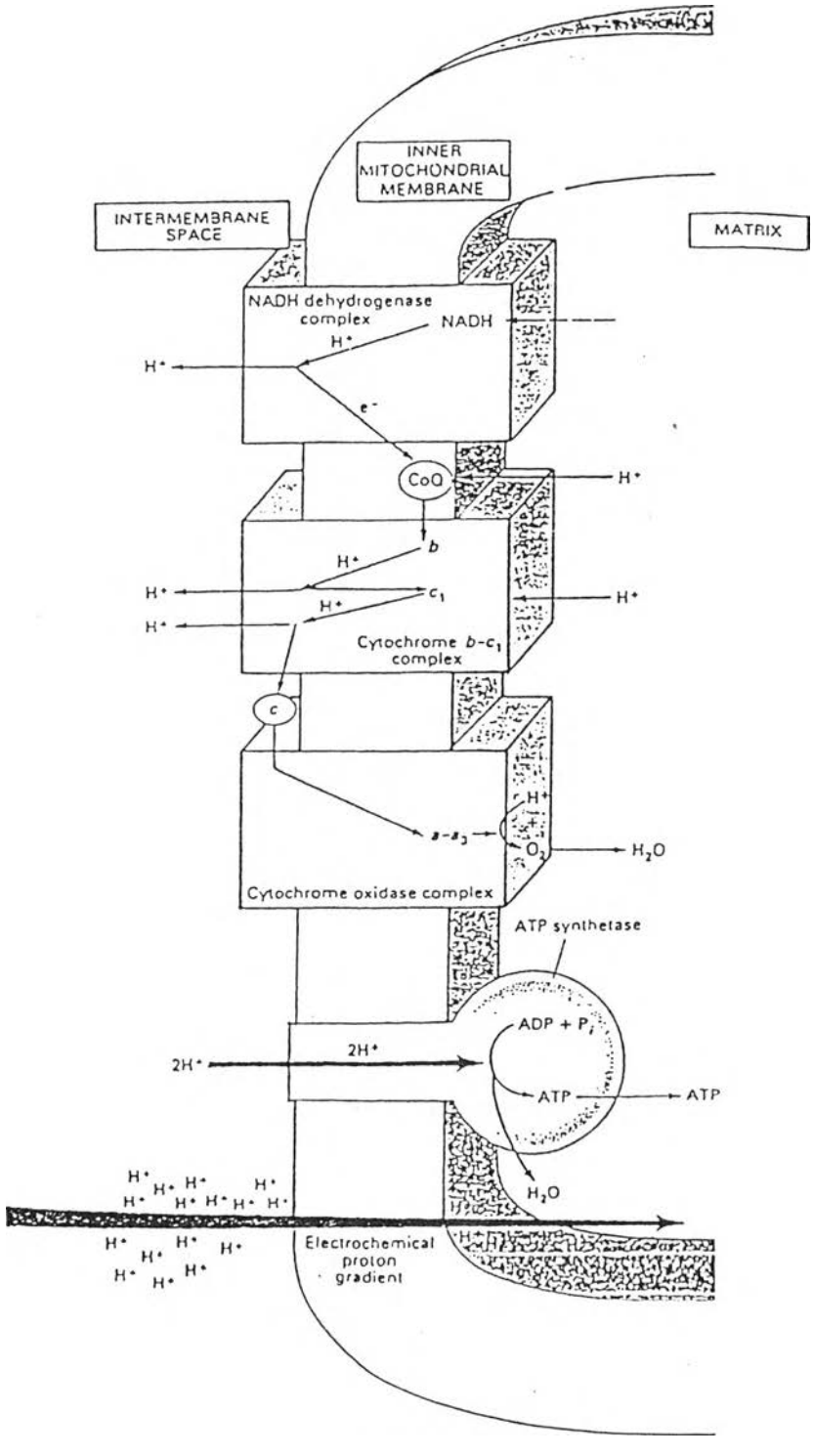
3. ส่วนต่างๆ ของ เอนไซม์ ATPsynthase จะดึงเอาพลังงานที่เกิดจาก electrochemical gradient เพื่อนำไปสังเคราะห์ ATP หรือ เอนไซม์สามารถสลาย ATP (ATP hydrolase) เพื่อใช้

พลังงานจาก ATP hydrolysis ในการนำ proton ออกจาก matrix ในกรณีที่ electrochemical gradient ไม่เพียงพอในการสังเคราะห์ ATP

4. ชั้นเมมเบรนจะมีส่วนประกอบของระบบ protein carrier ที่จะช่วยส่งผ่าน อิออนหรือสารเข้า-ออก matrix เช่นในกรณีของ H^+ หรือ OH^- (H^+-linked or OH^--linked carrier protein) , ATP1 โมเลกุล ที่ผ่านออกจาก matrix จะแลกกับ ADP 1 โมเลกุล ส่วน Pi และ pyruvate จะผ่านเข้าสู่ matrix โดยจะจับกับ H^+ โดยผ่านเข้าทาง protein carrier (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงการเข้า-ออกของสารหรืออิออนผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Avers, 1986)



รูปที่ 13 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับ ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ที่อธิบายโดย chemiosmotic coupling hypothesis (Avers, 1986)

สวนหลักการของ chemiosmotic hypothesis มีดังนี้ ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอน ผ่านตัวกลางรับส่งอิเลคตรอน ในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงาน (free energy) ออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) proton (H^+) จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space (อิเลคตรอนจำนวน 2 อะตอม ($2e^-$) ที่ส่งผ่านตัวกลางต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจ จะผลักดันโปรตอนจำนวน 2 อะตอม (H^+) ออกจาก matrix ซึ่งจะนำไปสร้าง ATP ได้ 1 โมเลกุล) ทำให้เกิด pH gradient และ proton gradient จากการที่มีความแตกต่างของปริมาณ proton (H^+) ระหว่างภายใน matrix กับ intermembrane space และ เนื่องจาก proton มีประจุบวก (positive ion) จึงทำให้ภายนอกมีประจุบวก (positive charge) มากกว่าภายใน matrix จึงเกิด membrane potential และ electrical gradient ซึ่งทั้งหมดรวมเรียกว่า proton electrochemical gradient หรือ proton-motive force และจะเกิดขึ้นได้นั้นต้องเป็น intact mitochondria คือ สามารถควบคุมการผ่านเข้า-ออกของโปรตอนได้ จากนั้นเมื่อ proton electrochemical gradient มีมากเพียงพอ โปรตอนเคลื่อนที่จากภายนอกจะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F_0 เกิดการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) อีกครั้ง ซึ่งไปกระตุ้นให้ F_1 สังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi โดยสรุปแล้วก็คือ พลังงานที่ถูกปลดปล่อยออกมาครั้งแรกจากการที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจะถูกเปลี่ยนไปเป็น protonmotive force โดยเอนไซม์ complex ต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจ และ protonmotive force จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี (chemical energy) ในรูปของ ATP โดยเอนไซม์ ATP synthase complex (รูปที่ 13)

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า proton เป็นตัวที่ทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างปฏิกิริยา ออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชัน ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจนถ้ามีการทำลาย proton - gradient (collapse proton gradient) โดยสารใดๆ ก็ตาม จะทำให้เกิดอันคัปปลิง (uncoupling) ของไมโตคอนเดรีย เช่น กรณี aging mitochondria ที่มีโครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลาย หรือกรณีของสารเคมี DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น proton - ionophore สามารถนำเอา proton จากภายนอกเข้าสู่ภายใน matrix ได้โดยไม่ผ่าน F_0F_1-complex หรือทำให้สูญเสียคุณสมบัติที่ impermeable ของผนังชั้นในนั้นเอง เมื่อ proton-motive force เสียไปไมโตคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่ โดยการออกซิไดซ์สับสเตรทไปเรื่อยๆ นั่นคือยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่ไม่เกิด gradient ขึ้น หรือ เกิดเพียงเล็กน้อยไม่เพียงพอที่จะ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ทำให้ไม่สามารถสร้าง ATP หรือ สร้างได้น้อยมาก

ในสภาวะเช่นนี้ F_1 ซึ่งโดยปกติจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ATP (ATP synthesis) แต่กลับกระตุ้นเกิดการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้เกิด H^+ gradient อีกทางหนึ่ง ผลการกระตุ้นการสลาย ATP อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ATPase activity ดังนั้นสาร uncoupler จึงสามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งในสภาวะปกติ เอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ เนื่องจากเอนไซม์ ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (Danishefsky, 1980)

$$ATP + H_2O \xleftarrow{F_0F_1\text{ - ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

สำหรับบทบาทของไมโตคอนเดรียในการสะสมแคลเซียม (Ca^{2+}) นั้น พบว่าการสะสมของแคลเซียม จำเป็นต้องใช้พลังงานจาก proton-motive force ที่เกิดจาก substrate oxidation เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ ATP และจะเลือกที่จะใช้พลังงานดังกล่าวสะสมแคลเซียมจนเพียงพอก่อนที่จะนำไปใช้ในการสร้าง ATP ดังนั้นสารที่มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจย่อมมีผลในการยับยั้งการสะสมของแคลเซียมด้วย การสะสมแคลเซียมมักจะควบคู่กับฟอสเฟต (phosphate) และจะอยู่ในรูปของ calciumphosphate เมื่อแคลเซียมเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรียจะมีการแลกเปลี่ยนกับโปรตอนที่จะถูกผลักออก ในอัตราส่วน 1:1 แต่ แคลเซียม (Ca^{2+}) มีประจุ +2 ส่วนโปรตอน (H^+) มีประจุ +1 แคลเซียมที่มีจำนวนประจุมากกว่าก็จะทำให้ภายในไมโตคอนเดรียมีความเป็นด่าง (alkaline) มากกว่าภายนอก ถึงแม้ว่าแคลเซียมจะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อเซลล์ต่างๆ แต่การสะสมของแคลเซียมเมื่อมีมากเกินไป จะทำให้ osmotic pressure ใน matrix สูงขึ้น ทำให้ไมโตคอนเดรียบวม (mitochondrial swelling) เนื่องจากน้ำจากภายนอกจะผ่านเข้าสู่ภายใน จึงทำให้เกิด uncoupling ของปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันได้ (Avers, 1986; De Robertis and De Robertis, 1987)

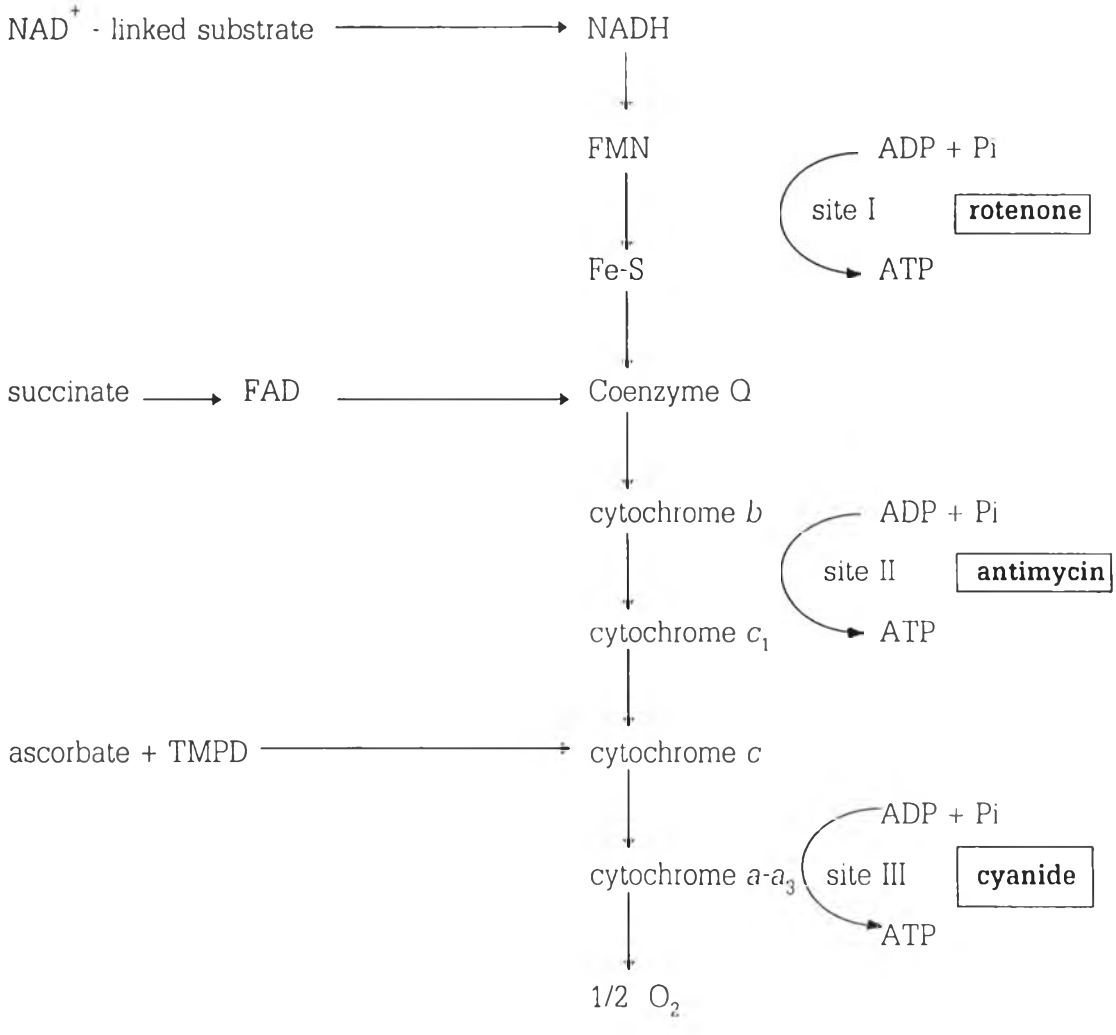
สารที่มีผลต่อการทำงานของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย หรือสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Danishefsky, 1980; Hatefi, 1985; Abeles, Frey and Jencks, 1992) (รูปที่ 14) ได้แก่

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ ใน complex I คือ จาก NADH dehydrogenaseไปยัง coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone ซึ่งเป็นสารพิษที่ได้จากพืช (plant toxin) ชนิดหนึ่งใช้เป็นยาฆ่าแมลง, amytal (ชื่อทางการค้าของ amobarbital) เป็นต้น สารประเภทนี้จะยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท เนื่องจาก succinate สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ ใน complex III คือจาก cytochrome *b* ไปยัง cytochrome *c* (site II) ได้แก่ antimycin A (เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ streptomyces) เป็นต้น แต่จะไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท เนื่องจาก ascorbate + TMPD จะส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome *c* โดยตรง

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนของเอนไซม์ ใน complex IV คือจาก cytochrome *c* ไปยังออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide, carbon monoxide เป็นต้น ซึ่งจะไปยับยั้งที่ cytochrome oxidase (cytochrome a-a_3) นั่นคือ ถ้ามีการยับยั้งที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม



รูปที่ 14 แสดงถึงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจ โดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Hatefi, 1985)

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชัน หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

- Oligomycin และ Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) จะยับยั้งการสังเคราะห์ ATP โดยจะไปยับยั้งที่ F_0 (channel for proton translocation) ของเอนไซม์ ATP synthase ผลก็คือไม่สามารถส่งผ่านโปรตอนจาก F_0 ไปยัง F_1 ได้ (Voet and Voet, 1990)

- Atractyloside จะยับยั้ง adenine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง (transporter) ADP จากภายนอกเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรีย ผลก็คือ ไมโตคอนเดรียจะขาด ADP ในการนำไปสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1975)

- DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน Pi จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาดแคลน Pi ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

- N-ethylmaleimide (NEM) และ Mersalyl จะมีผลยับยั้ง phosphate translocator ซึ่งทำให้ไมโตคอนเดรียขาดตัวนำส่ง (transporter) Pi เข้าสู่ภายใน ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดการสลาย ATP เพื่อให้ได้ Pi ขึ้นมาแทน จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ATP เช่นเดียวกัน (Sartorelli, Erecinska and Wilson, 1981)

3. สารจำพวก uncouplers สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+-carrier หรือ proton-ionophores สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระ และทำลาย high-energy intermediated หรือ electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน ทำให้มีผลยับยั้งการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP แต่ยังทำให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ ยังกระตุ้นการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อเพิ่มจำนวน H^+ (Lehninger, 1975; Heytler, 1981)

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

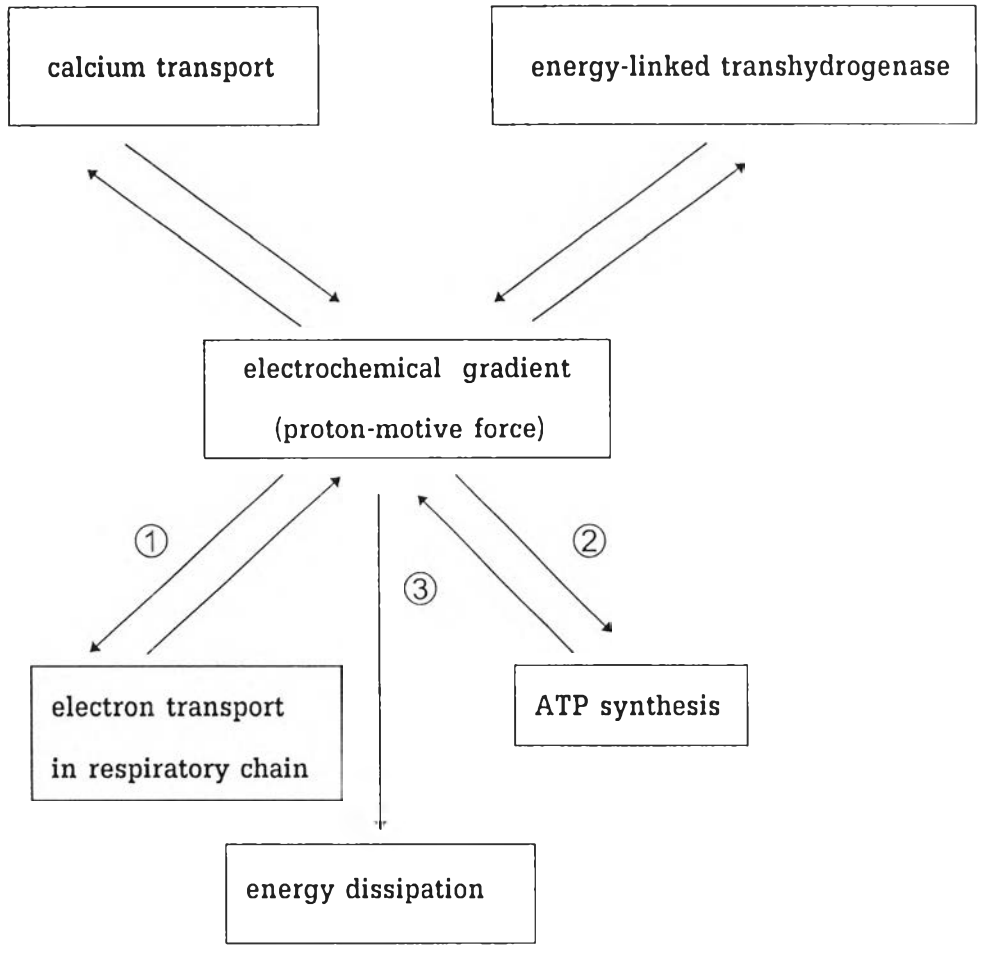
- Classical uncouplers หรืออาจเรียกว่า DNP-like, true, weak-acid, direct และ H^+-ionophores uncouplers เช่น 2,4-dinitrophenol (DNP) , carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weakly acid) ที่มีค่า pKa ระหว่าง 4.5 ถึง 6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxyl , heterocyclic-NH, amide, hydrazone-NH , carboxyl, sulfhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ทำลาย proton-gradient โดยเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (uniononize acid) แต่เมื่ออยู่ใน matrix จะแตกตัว โดยส่วนของ anion จะออกไปจับกับ H^+ ที่อยู่ภายนอกและกลับเข้าใน matrix อีก วงจรนี้จะกลับไปมาอยู่เช่นนี้ ดังนั้น H^+ จึงผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H^+-channel ของ F_0F_1-complex

- The alkali-metal ionophores ได้แก่ พวก antibiotics เช่น gramicidin, tyrothricin, tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ คือ การนำเอา cation เช่น K^+ เข้าสู่ไมโตคอนเดรียในกรณีของ valinomycin ซึ่งผ่านเข้าในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์ของสับสเตรทจะถูกนำไปใช้ในการ transport นำ cation เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย แทนที่จะใช้สังเคราะห์ ATP

- Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิด uncoupling ได้ด้วยกลไกต่างๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 factor) แล้วทำให้เกิด uncoupling โดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งมี phenolic groups อยู่ในโครงสร้างสามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 n mole/mg protein ส่วน arsenite ทำให้เกิด uncoupling โดยจับกับ sulfhydryl groups อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่มนี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

การใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้ ในรูป electrochemical gradient หรือ proton motive force

ไมโตคอนเดรียมิได้นำเอาพลังงานสูงที่สงวนไว้จากการส่งผ่านอิเลคตรอนไปใช้เพื่อการสังเคราะห์ ATP แต่เพียงอย่างเดียว แต่ยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ เช่นการขนส่งอิออน (ions) ต่างๆ เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย, การสะสมแคลเซียมดังที่ได้กล่าวแล้ว และการสังเคราะห์ NADPH โดย energy-linked transhydrogenase ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ เหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 15 (Lehninger, 1975; Hanstein, 1976; Daniskefsky, 1980)



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ (high energy electrochemical gradient) และ ตำแหน่งต่างๆ ที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไปออกฤทธิ์

(1) สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ

(2) สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP + Pi เช่น oligomycin, DNTB เป็นต้น

(3) สารที่มีฤทธิ์ uncoupling เช่น DNP, FCCP เป็นต้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหายใจและกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย ที่แยกจากตับหนูขาว
2. เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทำให้ทราบผลของ CU-763-10-01 ต่อการหายใจและกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย และ อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ ต่อไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้
2. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการทำวิจัยไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หรือ พิษวิทยาของ CU-763-10-01 ที่มีต่อไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว และเป็นแนวทางในการปรับปรุงแก้ไขสารชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพทางการรักษาต่อไป