บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองในบทที่ 3 ทำให้ทราบว่าผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งที่เตรียมจากตับของหนูขาวและเซลยีสต์ S. *cerevisiae* รวมทั้งผลต่อ intact yeast โดยที่สาร 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นในสภาวะที่ไมโตคอนเดรียนั้นเป็น tightly couple mitochondria และไม่มี ADP+Pi (รูปที่ 16-17) ซึ่งดูเสมือนว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ออกฤทธิ์คล้ายสาร uncouplers แต่เมื่อมีการศึกษาต่อๆมา ทำให้มีข้อมูลที่ชี้ว่าอาจมีกลไกในการทำให้เกิดการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นนั้นต่างจาก classical uncoupler ทั่วไปที่ใช้เช่น DNP หรือ CCCP สิ่งที่จะอภิปรายต่อไป จะกล่าวถึงแนวทางในการออกฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนคล้ายกับสาร classical uncoupler ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone นั้นควรเป็นอย่างไร โดยจะเปรียบเทียบผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone กับคุณสมบัติพื้นฐานของ classical uncoupler ที่ได้ทำการศึกษาและผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนอื่นๆที่มีต่อลูกโซ่การหายใจและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่นที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ประกอบ เพื่อให้การอภิปรายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้สมบูรณ์ขึ้น นอกจากนี้จะกล่าวถึงฤทธิ์ที่ทำให้เกิดอันตับปลิงของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อราที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ รวมทั้งที่ได้ทดสอบซ้ำกับเชื้อ S. *cerevisiae* ในการวิจัยครั้งนี้ และประเด็นสุดท้ายก็คือโอกาสที่จะนำเอา 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มาพัฒนาใช้ในทางการแพทย์ และข้อมูลสนับสนุนหรือประกอบการส่งเสริมการใช้สมุนไพรเทียนบ้านในการใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังว่าจะเป็นไปได้เพียงใด รวมทั้งข้อเสนอแนะสำหรับแนวทางในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่เป็นจริง

กลไกในการเกิดอันตับปลิงโดย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone

จากผลในการทำให้เกิดอันตับปลิงของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone

ดังได้กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น พบว่ามีความแตกต่าง ในด้านกลไกการออกฤทธิ์ต่างจาก classical uncoupler ทราบได้จากผลการศึกษาต่อไปนี้

1. ในกรณีที่ใช้ NAD^+-linked substrate คือ glutamate + malate และมี inhibitor ของลูกโซ่การหายใจที่ site I คือ rotenone และที่ site II คือ antimycin อยู่ในปฏิกิริยา ในกรณีที่เป็น classical uncoupler จะไม่สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น แต่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้(รูปที่ 21)

2. ในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท และมี inhibitor ของลูกโซ่การหายใจที่ site I คือ rotenone จะพบว่า classical uncoupler สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้แต่กลับพบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งโดยปกติสามารถกระตุ้นทำให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้เมื่อมี succinate เป็นสับสเตรท แต่เมื่อใส่ rotenone ลงไปในปฏิกิริยากลับพบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนได้เพิ่มขึ้น (รูปที่ 22)

3. คุณสมบัติอีกประการหนึ่งที่สำคัญของ classical uncoupler คือสามารถกระตุ้น ATPase activity (20) ซึ่งพบว่า DNP สามารถกระตุ้นให้มีการสลายของ Pi เพิ่มขึ้นได้ นั่นคือ มีการกระตุ้น ATPase activity ได้ ในขณะที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 3)

จากเหตุผลทั้ง 3 ประการที่กล่าวมาแล้วล้วนเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่ classical uncoupler ควรจะเป็น แต่กลับพบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวเลย ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการทำให้เกิดอันคับปลิงจึงอาจจะแตกต่างไปจาก classical uncoupler ทั่วไปสามารถจำแนกสารที่มีผลทำให้เกิดอันคับปลิงแต่ด้วยกลไกที่ต่างไปจาก classical uncoupler ว่าเป็น nonclassical uncoupler (54) ซึ่งพบว่ากลไกในการออกฤทธิ์ของ nonclassical uncoupler ในระดับโมเลกุลจะมีลักษณะแตกต่างออกไปในหลายลักษณะเช่น สาร reactive electrophilic และ SH reagent โดยที่สารกลุ่มนี้สามารถไปจับกับ membrane proteins ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ membrane proteins ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการทำให้เกิด

การ couple ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ตามมา(56-57) หรือในกรณีของ ionophore antibiotic เช่น valinomycin โดยที่สารกลุ่มนี้จะทำให้พลังงานที่เกิดในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอน แทนที่จะนำไปสร้าง ATP กลับถูกนำไปใช้ในการนำ cations เข้าและออกผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย วนเวียนกันไปอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ทำให้ต้องมีการเร่งการเกิดออกซิเดชั่น เพื่อ maintain H^+ gradient ทำให้เกิดภาวะอันคับปลิงนั่นเอง(59)

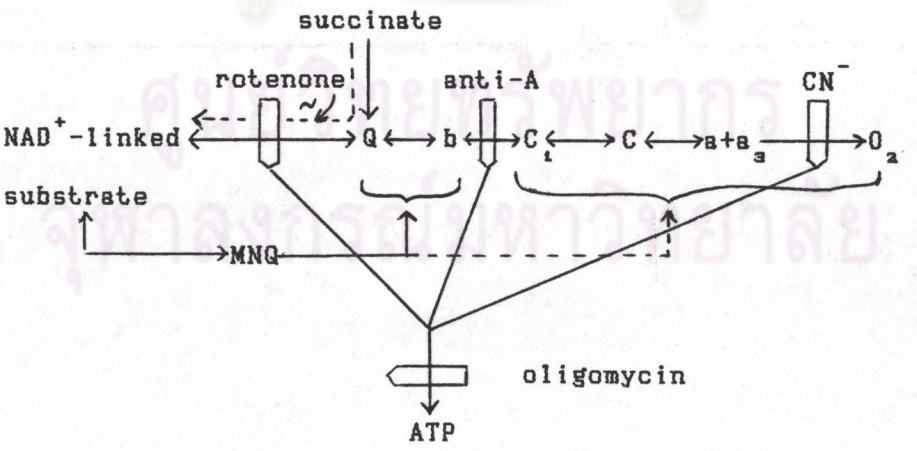
ดังนั้นถ้าพิจารณาความเป็นไปได้ของกลไกในการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการทำให้เกิดอันคับปลิงได้นั้น อาจจะพิจารณาจากประเด็นสูตรโครงสร้างทางเคมี ซึ่งโครงสร้างหลักก็คือ quinone ring อันเป็นโครงสร้างสำคัญของ Coenzyme Q (รูปที่1) สารตัวนี้ทำหน้าที่เป็น electron acceptor ที่สำคัญในลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย(20) ไม่ว่าจะมีการออกซิไดซ์สับสเตรทชนิดใดจะต้องมีการส่งผ่านอิเลคตรอนให้แก่ Coenzyme Q ทั้งสิ้น (รูปที่ 4) ดังนั้นในประเด็นนี้ที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีโครงสร้างทางเคมีสำคัญเหมือนกับ Coenzyme Q อาจจะมีความสัมพันธ์ระหว่างหน้าที่ของ Coenzyme Q ในลูกโซ่การหายใจและกลไกในการออกฤทธิ์ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการเกิดอันคับปลิง

จากผลการศึกษาวิจัยถึงผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนชนิดต่างๆที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 พบว่าอนุพันธ์แนพโทควิโนนนอกจากจะมีผลในการก่อให้เกิดอันคับปลิงแล้วในทางตรงกันข้ามกลับมีผลในการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้เช่นกัน ซึ่งไม่ว่าจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ต่อไมโตคอนเดรียอย่างไรก็ตาม ผลสุดท้ายก็จะทำให้สิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารนั้นถูกยับยั้งการเจริญหรือตายได้เช่นกัน โดยที่มีสมมุติฐานในการทำให้เกิดผลดังกล่าวในระดับโมเลกุลว่าอาจจะเกิดมาจาก 2 ประการคือ(บทที่ 1)

1. อนุพันธ์แนพโทควิโนนไปทำปฏิกิริยาที่ protein thiol group ของ endogenous quinones ในที่นี้อาจจะเป็น Coenzyme Q แล้วมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตที่ทำการทดสอบ(38) เหตุผลที่คิดว่าเป็นกลไกนี้เนื่องมาจาก เมื่อมีการเติมสารที่มี sulphydryl group ลงไปในการทดลอง ทำให้อนุพันธ์แนพโทควิโนนหมดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ซึ่งคาดว่าเนื่องมาจากสาร sulphydryl group ที่เติมลงไปนั้นทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์แนพโทควิโนน แล้วทำให้อนุพันธ์แนพโทควิโนนไม่สามารถออกฤทธิ์ได้(41)

2. โดยพิจารณาจากค่า $E_{1/2}$ ของอนุพันธ์แนพโทควิโนน โดยพบว่าอนุพันธ์ที่มีค่า $-E_{1/2}$ อยู่ระหว่าง 163-307 หรือระหว่าง 314-536 มิลิโวลต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ(41) และพบว่า $E_{1/2}$ ของอนุพันธ์ที่มีค่าน้อยกว่า 0 โวลต์ จะมีฤทธิ์กระตุ้นการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ และอนุพันธ์ที่มีค่า $E_{1/2}$ เป็นบวกจะมีฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนแทน(39) นั่นคือคุณสมบัติของโครงสร้างทางไฟฟ้า(electronic structure) และความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจนจะเป็นผลทำให้อนุพันธ์แนพโทควิโนนก่อให้เกิดผลต่างๆได้(41) ซึ่งได้มีการสรุปถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์แนพโทควิโนนในประเด็นนี้ว่า อนุพันธ์แนพโทควิโนนออกฤทธิ์ที่ตำแหน่ง Coenzyme Q เช่น มีผลยับยั้งการทำงานของ Coenzyme Q เนื่องจากในกรณีที่มีการเติม Coenzyme Q_{10}, Q_7, Q_2 และ vitamin K_1 จะทำให้ผลการยับยั้ง Coenzyme Q โดยอนุพันธ์แนพโทควิโนนถูกขัดขวาง(37) นั่นคือ เป็นไปได้ว่ากลไกในการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์แนพโทควิโนนก็คือ เป็นตัวรับอิเลคตรอนแข่งขันกับ Coenzyme Q (40-41)

จากผลการศึกษาในประการที่ 2 ที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จึงค่อนข้างจะมีความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ทำการวิจัยในครั้งนี้กล่าวคือผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโตคอนเดรีย ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ผลการทดลองต่างๆค่อนข้างสนับสนุนว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีกลไกในการทำให้เกิดอันดับปลิงได้โดยทำหน้าที่รับอิเลคตรอนได้เช่นเดียวกับ Coenzyme Q โดยที่มีวิถีทางในการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทชนิดต่างๆดังนี้คือ (รูปที่ 34)



<u>รูปที่ 34</u> แสดงวิถีทางการส่งผ่านอิเลคตรอนที่คาดว่าจะเป็นโดยสาร 2-methoxy-1,4-naphthoquinone(anti-A = antimycin A , Q = Coenzyme Q, b,C_1C และ $a+a_3$ = Cytochrome system , CN^- = cyanide)

ซึ่งจากการสรุปได้ดังกล่าวนี้(รูปที่ 34) เนื่องมาจากผลการทดลองที่จะกล่าวตามลำดับต่อไปนี้คือ

1. การที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้เพิ่มขึ้น แม้ว่าไมโตคอนเดรียจะอยู่ในสภาพ tightly couple และไม่มี ADP+Pi ในปฏิกิริยา (รูปที่ 16-17) นั่นคือก่อให้เกิดอันดับปลิงได้เช่นเดียวกับ classical uncoupler คือมีการเร่งการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจนได้โดยไม่ต้องมีการสร้าง ATP ไม่ว่าจะมีการใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ NAD^+-linked substrate คือ glutamate + malate และ succinate เป็นสับสเตรทและผลของการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone จนถึงระดับหนึ่งแล้วจะไม่มีการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอีก(รูปที่ 16-17)

2. ผลของ inhibitor ต่อกระบวนการหายใจ ทำให้ทราบว่า การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NAD^+-linked substrate ไปยังออกซิเจนยังคงเกิดได้ตามปกติ แม้จะมี rotenone ซึ่งเป็น site I inhibitor (รูปที่ 21 B) นั่นคือมีการส่งผ่านอิเลคตรอนเกิดขึ้นในวิถีทางที่เป็น rotenone-insensitive แต่ผลดังกล่าวข้างต้นจะพบเฉพาะในการทดลองกับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว แต่ไม่พบผลดังกล่าวเมื่อทำการทดลองกับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์และ การทดลองที่ทำกับ intact yeast โดยตรง ซึ่งเป็นเพราะคุณสมบัติของเอนไซม์ของลูกโซ่การหายใจของเซลยีสต์เป็น rotenone insensitive (33) ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 และในกรณีที่มี antimycin (รูปที่ 21 C) พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเช่นกันแต่ในขนาดที่น้อยกว่ากรณีที่มี rotenone และเมื่อเวลาผ่านไปผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนจะค่อยๆลดลง ปรากฏการณ์นี้อาจแสดงให้เห็นว่า อิเลคตรอนที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone รับมาจากการออกซิไดซ์สับสเตรทแล้วมีการส่งอิเลคตรอนเข้าสู่วิถีทางของลูกโซ่การหายใจปกติในตำแหน่งก่อนหน้าที่จะถูกยับยั้งโดย antimycin(site II) เนื่องจากการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นไม่เท่ากับกรณีที่มี rotenone ซึ่งอาจเป็นผลยับยั้งโดย antimycin แต่พบว่ายังมีฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้อีก แสดงว่า antimycin ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ทั้งหมด ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจากมีการส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่วิถีการหายใจปกติที่ตำแหน่งหลังจากที่จะถูกยับยั้งโดย antimycin หรือ อิเลคตรอนที่ส่ง

ผ่านจากสับสเตรทมายัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone อาจส่งผ่านไปให้ออกซิเจนได้โดยตรง และเมื่อมาพิจารณาว่าสาเหตุที่ทำให้ผลของ2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยจะวิเคราะห์โดยอาศัยผลการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 (42) ที่ว่า menadione สามารถกระตุ้นการหายใจใน state 4 ได้ แม้จะมี cyanide อยู่ (cyanide insensitive) และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า cyanide มีผลยับยั้งการหายใจได้เพิ่มขึ้น (41) ในการวิจัยดังกล่าวพบว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์นั้นเนื่องมาจาก คุณสมบัติในการเป็น tightly couple mitochondria ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป(41) (เนื่องจากจะพบว่าผลการกระตุ้นการหายใจของ menadione จะไม่ sensitive ต่อ cyanide เลยถ้าเป็น tightly couple mitochondria) แต่ในกรณีที่ทำการทดลองกับ intact yeast ไม่พบว่ามีการกระตุ้นการหายใจค่อยๆลดลงเช่นที่ทำกับไมโตคอนเดรีย และอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลการกระตุ้นการหายใจค่อยๆลดลงเนื่องจาก menadione ไปทำปฏิกิริยากับ protein thiol group ที่สำคัญของระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการส่งผ่านอิเลคตรอน(38) ซึ่งผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไปอาจจะเนื่องมาจากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วทั้งสองประการเช่นเดียวกับที่เกิดกับ menadione

3. ในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น succinate และมี inhibitor ของกระบวนการหายใจคือ rotenone (รูปที่ 22 A) กลับพบว่า rotenone สามารถยับยั้งผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนโดย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เส้นทางการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก succinate ไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone นั้น จะต้องเกิดในทิศทางที่สวนทาง(reversal pathway) กับวิถีทางปกติ (ซึ่ง rotenone ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในทิศทางปกติ กรณีที่ succinate เป็นสับสเตรท โดยทราบจากการที่ DNP ยังคงสามารถกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้ ดังรูปที่ 22 B) นอกจากนี้ยังมีผลการทดลองที่สนับสนุนว่ามีการส่งผ่านอิเลคตรอนใน reversal pathway ก็คือกรณีที่มี antimycin (รูปที่ 22 C) พบว่า antimycin สามารถยับยั้งผลการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้เช่นเดียวกับ rotenone แต่ด้วยกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยที่ rotenone ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก succinate ไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ใน reversal pathway ก่อนจะมีการส่งผ่านอิเลคตรอนให้แก่ออกซิเจน ขณะที่ antimycin จะยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในวิถีทางปกติ ซึ่งจะเป็นผลทำให้ไม่สามารถ

สร้าง proton motive force ได้เช่นกัน ในสภาวะที่ไม่มี proton motive force ย่อมจะส่งผลให้การผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาในทิศทางย้อนกลับซึ่งต้องอาศัยพลังงานเกิดขึ้นไม่ได้เช่นกัน (39) สรุปก็คือ rotenone ยับยั้งที่ตำแหน่งที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอน แต่antimycin ยับยั้งการสร้างพลังงานซึ่งจะเป็นตัวผลักดันให้เกิด การส่งผ่านอิเลคตรอนในทิศทางย้อนกลับ

4. ในการทดลองเพื่อศึกษาว่าอิเลคตรอนที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone รับจากการออกซิไดซ์สับสเตรทที่ใช้คือ glutamate + malate มีวิถีทางการส่งผ่านอิเลคตรอนอย่างไร ในประเด็นที่ศึกษานี้พบว่า อิเลคตรอนที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone รับไปจากสับสเตรทและส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจนั้นสามารถ couple กับการสร้าง ATP ได้เช่นกัน ซึ่งทราบจากการทดลองในรูปที่ 23 โดยที่ รูปที่ 23 B จะเป็นการส่งผ่านอิเลคตรอนจากทั้งในวิถีทางของลูกโซ่การหายใจตามปกติจากสับสเตรทไปยังออกซิเจน รวมทั้งอิเลคตรอนที่ส่งผ่านจากสับสเตรทไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone นั่นคือแม้ว่าจะมี 2-methoxy-1,4-naphthoquinone อยู่ในปฏิกิริยาด้วยก็ตาม ก็ยังคงมีการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NAD^+-linked substrate ไปยังออกซิเจนในวิถีทางของลูกโซ่การหายใจปกติด้วย ซึ่งทราบจากค่าอัตราส่วน ADP/O ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ส่วน tracing 23 C จะเป็นผลการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone โดยที่ rotenone จะยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในวิถีทางปกติ ซึ่งยังพบว่าแม้จะมีเฉพาะการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยัง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เพียงอย่างเดียว ก็พบว่าอิเลคตรอนที่ส่งจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไปยังออกซิเจน ผ่านในวิถีทางที่ยัง couple กับการสร้าง ATP เช่นกัน แต่พบว่าอัตราส่วน ADP/O ลดลง และ rate ของstate 3 respiration ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งในการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เข้าสู่ลูกโซ่การหายใจปกติเป็นตำแหน่งที่มีการ couple กับการสร้าง ATP น้อยกว่าการส่งผ่านอิเลคตรอนในวิถีทางปกติ แต่ผลการทดลองของรูปที่ 24 นั้นแสดงให้เห็นว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่มีผลหรือมีผลเพียงเล็กน้อยต่อ state 3 respiration ดังนั้นการที่ state 3 respiration ของรูปที่ 23 C มีอัตราการใช้ออกซิเจนช้ามาก จึงมิใช่เป็นเพราะ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไปยับยั้ง state 3 respiration(กล่าวคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่มี oligomycin-liked effect) แต่การที่ state 3 respiration ในรูปที่ 23 C

มีอัตราการใช้ออกซิเจนช้ามากนั้นอาจเนื่องมาจาก

1. อิเลคตรอนบางส่วนจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เท่านั้นที่เข้าสู่ลูกโซ่การหายใจปกติ(กล่าวคือ ใช้ในการ couple กับการสร้าง ATP ได้)

หรือ 2. อิเลคตรอนจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่เข้าสู่ลูกโซ่การหายใจนั้น ด้วยเหตุผลอย่างไรไม่ทราบได้ ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำในการ couple กับการสร้าง ATP (หรืออีกนัยหนึ่งคือ การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจมีความสามารถในการ pump H^+ ออกเพื่อสร้าง proton motive force ได้ไม่ดี)

ซึ่งผลการทดลองที่สนับสนุนความคิดที่ว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่มี oligomycin-liked effect(คือไม่มีผลต่อ F_1F_o-ATPase) ก็คือการที่ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไม่ยับยั้ง DNP-activated ATPase เช่นเดียวกับ oligomycin

และนอกจากนี้อิเลคตรอนที่ส่งจาก 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เข้าสู่ลูกโซ่การหายใจปกติที่ยังมีการ couple กับการสร้าง ATP นั้นถูกยับยั้งได้โดย oligomycin ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งที่เอนไซม์ ATPsynthase ส่วนการ couple ระหว่าง Ca^{2+} transport กับ electron transport ยังเกิดขึ้นได้ในขณะที่มี oligomycin อยู่ด้วยนั้น แสดงว่า oligomycin ไม่มีผลต่อการส่งอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปสู่ลูกโซ่การหายใจผ่านทาง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone รวมทั้งไม่มีผลต่อ Ca^{2+} uniporter ด้วย

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาทั้ง 4 ข้อแล้วนั้น จะเป็นข้อสนับสนุนถึงกลไกในการออกฤทธิ์ทำให้เกิดอันตับปลิงโดย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนในวิถีทางที่ได้นำเสนอไปแล้วนั้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้กล่าวไปแล้วจะเป็นการศึกษาที่ทำกับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว และเมื่อได้มีการทดลองโดยใช้ intact yeast และไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการทดลองที่ทำกับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว แม้ว่าผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองกับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์ อาจจะไม่ใคร่ชัดเจน เนื่อง

จากคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ไม่ดีนัก แต่ก็สามารถบอกถึงแนวโน้มของผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่สอดคล้องกับผลที่เกิดขึ้นกรณีที่ศึกษากับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

เมื่อวิเคราะห์ผลในเชิงปริมาณ(quantitative analysis) ของผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนสูงสุด กรณีที่ศึกษากับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว พบว่า ถ้าใช้สับสเตรทเป็น glutamate + malate ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดผลสูงสุดเท่ากับ 6 มคก. และกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น succinate เท่ากับ 10 มคก.(รูปที่ 18) และถ้าทำการศึกษากับไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเซลยีสต์โดยใช้ succiante เป็นสับสเตรท ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดผลสูงสุดมีค่าประมาณ 30 มคก.(รูปที่ 31) และกรณีศึกษากับ intact yeast โดยใช้ glucose เป็นสับสเตรท มีค่าประมาณ 30 มคก.(รูปที่27) นั่นคือขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่กระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นสูงสุดมีขนาดประมาณ 6-30 มคก. ซึ่งขนาดดังกล่าวสอดคล้องกับขนาดของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ก่อผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ S. cerevisiae ที่ได้ทดลองในการวิจัยนี้(ตารางที่ 5) ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 10 และ 20 มคก.ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า ผลในการยับยั้งการเจริญหรือผลในการฆ่าเชื้อของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เป็นผลเนื่องจากผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย

ในการศึกษาผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนอีก 2 ชนิดในการวิจัยนี้คือ lawsone และ menadione พบว่า อนุพันธ์ทั้งสองชนิดมีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนได้เช่นกัน แต่ถ้าเปรียบเทียบกับผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone พบว่า อนุพันธ์ทั้งสองชนิดมีผลกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นได้น้อยกว่ามาก (รูปที่ 19,27) ซึ่งจากการทดลองโดยการให้ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ร่วมกับอนุพันธ์ทั้งสองชนิด (ตารางที่ 2) พบว่า lawsone สามารถยับยั้งผลการกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นโดย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้ในลักษณะที่มีการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามขนาดของ lawsone ที่เติมลงไปในปฏิกิริยา และเมื่อให้ lawsone ในขนาด 50 มคก. ร่วมกับ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในขนาด 6 มคก. พบว่า % inhibition (การลดลงของการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนเทียบกับผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone เพียงชนิดเดียว) มีค่าถึง 92.8 % ซึ่งแสดง

ให้เห็นว่ากลไกในการออกฤทธิ์ของ lawsone คล้ายกับ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งทำให้ lawsone สามารถยับยั้งผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้ แต่กรณี menadione ที่เติมลงไปในขนาด 50 มคก. ร่วมกับ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 6 มคก. พบว่า % inhibition เท่ากับ 61.6 แสดงว่ากลไกในการออกฤทธิ์ของ menadine อาจไม่เหมือน 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ทีเดียว เพราะสามารถยับยั้งได้ประมาณ 60 % เท่านั้น หรืออาจจะเป็นไปได้ว่า ขนาดของ menadione ที่ใช้ไม่ได้ก่อผลการยับยั้งการกระตุ้นของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้สูงสุด

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone สามารถทำให้เกิดอันดับปลิงได้โดยการทำหน้าที่รับอิเลคตรอนได้เช่นเดียวกับ endogenous quinone อันได้แก่ Coenzyme Q โดยได้ผลสอดคล้องกันทั้งในกรณีที่ทำการวิจัยในไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว intact yeast รวมทั้งไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากเชลยีสต์ที่ใช้ในการวิจัยคือ *S. cerevisiae* ซึ่งการวิจัยนี้ก็ได้ผลเช่นเดียวกับการวิจัยถึงผลของอนุพันธ์แนพโทควิโนนต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียเท่าที่เคยมีการวิจัยมา (36,39,40)

<u>โอกาสในการนำเอา 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ตลอดจนสมุนไพรเทียนบ้านมาใช้ในทางการแพทย์</u>

ในด้านการแพทย์พื้นบ้านในในไทยและต่างประเทศได้มีการนำสมุนไพรเทียนบ้านมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังหลายชนิด เช่น โรคกลากเกลื้อน(1,5) ซึ่งที่ผ่านมาการใช้จะเป็นการใช้สมุนไพรโดยตรง พิษที่เกิดขึ้นอาจจะน้อยหรือไม่พบพิษเลย แต่เมื่อเริ่มมีการพัฒนานำสารสกัดจากคลอโรฟอร์มของใบเทียนบ้าน ซึ่งนำมาเตรียมเป็นยาขี้ผึ้งและครีมก็ยังพบพิษในการฆ่าเชื้อราได้ดี แต่ผลเสียที่เกิดคือ มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนังบริเวณที่ทา(11-13) แต่เมื่อมีการนำสารสกัดจากคลอโรฟอร์มของใบเทียนบ้านทาผิวหนังโดยตรงกลับไม่พบว่ามีการแพ้(14) นั่นแสดงให้เห็นว่าอาจจะเป็นการแพ้เนื่องจากสารที่เติมลงไปเพื่อเตรียมให้อยู่ในรูปยาเตรียมต่างๆ ดังนั้นจึงอยู่ที่ขั้นตอนการพัฒนาตำรับยาเตรียมที่มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และไม่มีฤทธิ์ระคายเคือง รวมทั้งขั้นตอนในการทดลองใช้ในทางคลินิคเพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยก่อนที่จะนำไปสู่การส่งเสริมให้มีการใช้ต่อไป ในการพัฒนา 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในรูปแบบอื่นๆเช่น

ยารับประทานและยาฉีดนั้น ปัญหาที่สำคัญที่จำเป็นต้องพิจารณาก็คือ พิษที่อาจจะเกิดขึ้นต่อผู้ใช้ยา เนื่องจากกลไกในการฆ่าเชื้อราของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย คือฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียโดยไม่จำเป็นต้องมีการสร้าง ATP อันเป็นแหล่งพลังงานของเซล ผลดังกล่าวอาจทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลลดลง จนกระทั่งทำให้เซลของสิ่งมีชีวิตตายได้ นั่นคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ย่อมจะก่อพิษหรืออาการอันไม่พึงประสงค์ต่อผู้ใช้ได้ไม่มากก็น้อย แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลอง in vivo ก็อาจจะมีผลแตกต่างไปได้ ซึ่งจำเป็นต้องทำการวิจัยต่อไป เพราะว่าสารที่ใช้เป็นยาต้านเชื้อราที่เป็นยาใช้ภายในนั้นส่วนใหญ่ จะเป็นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นยังมีราคาแพงและมีพิษสูง(16) ดังนั้นการพัฒนา 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติจึงน่าจะเป็นสิ่งที่ดีในด้านความเป็นพิษที่น้อยลงและราคาถูกขึ้น

กล่าวโดยสรุปแล้ว จากการวิจัยนี้พบว่า 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลทำให้เกิดภาวะอันคับปลิงของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่นได้ แต่มีกลไกที่ต่างจาก classical uncoupler นั่นคือ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นโดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนได้เช่นเดียวกับ endogenous quinones อันได้แก่ Coenzyme Q ซึ่งขนาดที่ก่อผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียสอดคล้องกับขนาดที่มีผลยับยั้งและฆ่าเชื้อราที่ทำการทดสอบ จึงเป็นไปได้ว่า การยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone นั้นประการหนึ่งนั้นเป็นเพราะสาร 2-methoxy-1,4-naphthoquinone มีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียส่วนกลไกออกฤทธิ์ต้านเชื้อราในแง่อื่นนั้น เช่นการยับยั้งการสังเคราะห์สาร sterol ก็ควรได้มีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามถ้าเนื่องจากฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราโดยอาศัยกลไกนี้เป็นหลักแล้ว การพัฒนา 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ไปใช้ทางการแพทย์ อาจจะมีปัญหาเนื่องจาก ไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและของเชื้อราไม่แตกต่างกัน การเกิดพิษต่อผู้ใช้จึงอาจเกิดขึ้นได้ ประโยชน์ในเบื้องต้นที่เป็นไปได้ก็คือ การสนับสนุนให้ประชาชนใช้สมุนไพรเทียนบ้านโดยตรงในการรักษากลากเกลื้อน และการพัฒนาสูตรตำรับของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่ไม่ระคายเคืองผิวหนังมาใช้ในการรักษาในขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามแม้จะเป็นการใช้ภายนอกก็ควรมีการทดลองใช้ในทางคลินิคจนเป็นที่น่าเชื่อถือแล้วก่อนจะนำมาส่งเสริมการใช้ในประชาชนทั่วไป