บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองในบทที่ 3พบว่าสาร 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่สกัดจากแฮนคอคำใหญ่ มีฤทธิ์สองประการต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ มีการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนในระยะแรกและตามด้วยการยับยั้งการหายใจในระยะหลัง (รูปที่ 16 หน้า 53) และยังสามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 14 หน้า 94) จากการศึกษานี้แสดงว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีฤทธิ์เป็น uncouplerของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน คือมีฤทธิ์ทำให้เกิดการไม่ควบคู่กัน (uncouple) ของการออกซิไดซ์สับสเตรทกับการสังเคราะห์ ATP

ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

1. 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์เป็น 'uncoupler'

เนื่องจากมีสารหลายชนิดที่เป็น uncoupler นักวิจัยได้จำแนกประเภทของ uncoupler โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิดและลักษณะการออกฤทธิ์เป็น 3 ประเภท (Heytler, 1981) คือ

1) classical uncouplers หรือ proton-ionophore uncouplers

คุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ คือ เป็นกรดอ่อน มี pka ระหว่าง 4.5-6.5 ละลายในไขมันได้ดี(lipophilic) จะทำให้โปรตอนจากภายนอกผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระ โดยไม่ต้องผ่านเข้าทาง proton channel ของ F_oF_1 complex เสมือนว่าผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย permeable ต่อโปรตอน ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ DNP, FCCP (carbonyl cyanide 4-fluoromethoxyphenylhydrazone) และ TBI (tribromoimidazole)

2) alkali-metal ionophores สารกลุ่มนี้เป็น antibiotics ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น valinomycin สามารถรบกวนความสมดุลของอิออน เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น K^+-ionophore นำ K^+ ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ซึ่งจำเป็นสำหรับการควบคู่ของปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรียคือสารกลุ่มนี้จะนำพลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์สับสเตรทมาใช้ในการนำ cations เข้าสู่ไมโตคอนเดรียแทนที่จะถูกนำไปสังเคราะห์ ATP (Green and Zande, 1981)

3) indirect uncouplers สารกลุ่มนี้ไม่มีคุณสมบัติจำเพาะ จะประกอบด้วยสารหลายประเภทแตกต่างกันไป สามารถออกฤทธิ์เลียนแบบฤทธิ์ของ classical uncouplers ได้ด้วยกลไกต่าง ๆ กัน เช่น จับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งอาจเป็น binding sites ของ uncouplers (Katre and Wilson, 1978) เช่นอาจจะจับกับ sulfhydryl groups ที่สำคัญแล้วทำให้เกิดภาวะ uncoupling เช่น arsenite cadmium หรือออกฤทธิ์โดยไปจับกับ F_1- ATPase ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ทำให้ไมโตคอนเดรียไม่สามารถสร้าง ATP ได้ สารที่ออกฤทธิ์แบบนี้ ได้แก่ desapidin

ข้อแตกต่างระหว่าง indirect uncouplers และ classical uncouplers คือ indirect uncouplers จะไม่กระตุ้น ATPase activity ในขณะที่ classical uncouplers สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้

ผลการทดลองในบทที่ 3 สาร 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีฤทธิ์อันคัปปลิง โดย

1.) สามารถกระตุ้น state 4 respiration ของไมโตคอนเดรีย ความแรงของการกระตุ้นแปรผันตามขนาดของสาร (รูปที่ 16 หน้า 53) และการออกฤทธิ์การกระตุ้น state 4 respiration นี้ เกิดทั้งกรณีการใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท (รูปที่ 16 หน้า 53, รูปที่ 17 หน้า 55)

2.) 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน โดยลดค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ของไมโตคอนเดรียซึ่งเกิดทั้งกรณีที่ใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรทเช่นกัน (รูปที่ 20 หน้า 61, รูปที่ 21 หน้า 64)

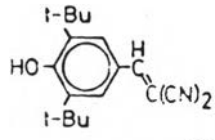
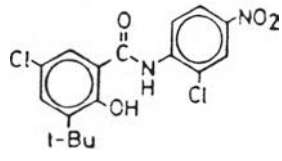
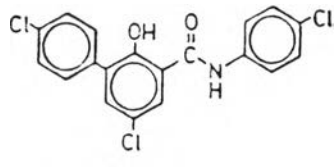
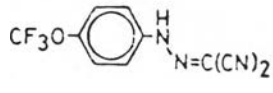
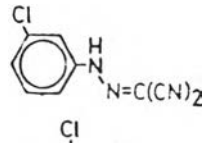
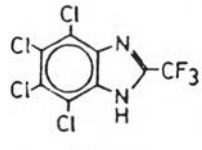
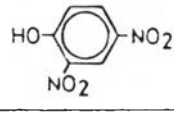
3.) เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน (รูปที่ 1) ซึ่งเป็น pentacyclic nortriterpene quinone methides มีส่วนของ phenolic-hydroxyl อยู่ในโมเลกุล ซึ่งเหมือนกับกลุ่มสารที่เป็น classical uncouplers เช่น DNP (ตารางที่ 19) (Stockdale and Selwyn, 1971; Kessler ,Tyson and Green, 1976; Kessler et al., 1977) Terada (1981) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์อันคัปปลิง ของ uncouplers ที่มีฤทธิ์แรง เท่าที่พบในปัจจุบัน พบว่าสูตรโครงสร้างที่มีความจำเป็น และมีส่วนทำให้ uncouplers มีฤทธิ์แรง ได้แก่

1) acid-dissociable groups เช่น phenolic-hydroxyl, anilino-NH

2) strong electron-withdrawing moiety เช่น -CN, $-NO_2$ และ $-CH=C(CN)_2$

3) bulky hydrophobic groups เช่น tert-butyl, -Cl และ $-CF_3$ ตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์อันคัปปลิง ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์อันคัปปลิง

Uncoupler (mol. wt.)	Structure	Uncoupling activity	
		Respiration	ATPase
SF 6847 (282.39)		10 nM	3 nM
S-13 (383.23)		20 nM	7 nM
S-6 (392.67)		150 nM	100 nM
FCCP (254.17)		70 nM	15 nM
CCCP (204.62)		110 nM	35 nM
TTFB (323.92)		30 nM	
2,4-Dinitrophenol (184.11)		24 μM	8 μM

และเมื่อศึกษาผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อเอนไซม์ ATPase พบว่า สามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้ (ตารางที่ 14 หน้า 94) และมีความแรงของการตอบสนองแปรผันตามขนาดของสารที่ใช้ จากคุณสมบัตินี้แสดงว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์เป็น uncoupler อยู่ในกลุ่ม classical uncouplers อย่างไรก็ตาม 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีฤทธิ์อ่อนกว่า DNP คือ ออกฤทธิ์ในการกระตุ้น state 4 respiration ได้ประมาณ 54.50% ของ DNP เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท(รูปที่ 19 หน้า 59) และกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ได้ประมาณ 72.79% ของ DNP (รูปที่ 32 หน้า 98) เหตุที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีฤทธิ์อ่อนกว่า DNP นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากความแตกต่างของกลไกในการเกิดอันคัปปลิงในระดับโมเลกุล ซึ่งต้องอาศัยผลการศึกษาในรายละเอียดต่อไป นอกจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนจะมีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะแรกแล้ว ในระยะหลังยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจด้วย การศึกษาผลการทดลองในรายละเอียดต่าง ๆ จึงได้กล่าวควบคู่ไปด้วย

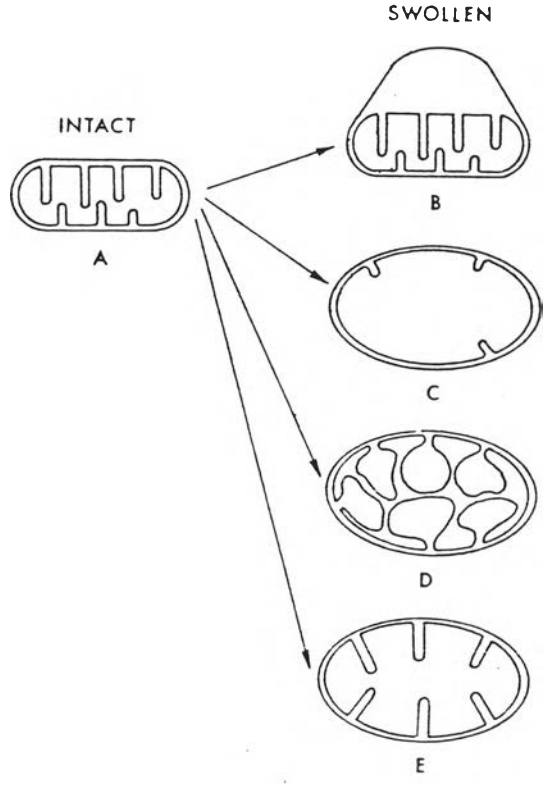
ผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะหลัง

สำหรับกลไกที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนทำให้มีการยับยั้งการหายใจหลังจากออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจแล้วนั้น (รูปที่ 16 หน้า 53, รูปที่ 17 หน้า 55) อาจเกิดเนื่องจากความสามารถในการผ่านเข้าสู่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนจนถึงระดับที่เพียงพอในการทำปฏิกิริยา หรือจับกับโปรตีนและฟอสฟอไลปิดที่สำคัญในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย แล้วส่งผลให้เกิดการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ โดยมีเหตุผลสนับสนุนที่สำคัญ คือ เมื่อให้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแล้ว ต้องใช้ระยะเวลาสักระยะหนึ่งก่อน จึงจะเกิดการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียขึ้น ซึ่ง lag period นี้ อาจใช้ในการนำ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย จนได้ความเข้มข้นที่มากพอในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเมื่อให้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในขนาดที่สูงขึ้น การยับยั้งการหายใจในระยะหลังนี้จะเกิดได้เร็วขึ้น ซึ่งอาจเป็นได้จากมีการผ่านเข้าสู่ผนังชั้นในไมโตคอนเดรียของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนได้มากขึ้น จึงมีการยับยั้งการหายใจที่เร็วขึ้น สำหรับการออกฤทธิ์ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียในลักษณะนี้คล้ายกับการศึกษาผลของเอมิโอดาโรนต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย(ณัฐาศิริ แซ่ยิบ, 2535)

ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ในระยะหลังของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนนี้มีผลต่อ state 3, 4 respiration ทั้งกรณีที่ใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท (รูปที่ 16 หน้า 53, รูปที่ 17 หน้า 55) และมีผลต่อ state 3u respiration ของ intact mitochondria โดยยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ จากผลการศึกษาเมื่อใช้ glutamate+malate และ succinate เป็นสับสเตรท ที่ให้ reducing equivalent เข้าที่ complex I และ II ของลูกโซ่การหายใจ

พบว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3u respiration ทั้ง 2 กรณี แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทเท่านั้น กล่าวได้ว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนสามารถยับยั้ง state 3u respiration เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท (ตารางที่ 5 หน้า 66) ผลดังกล่าวนี้ชี้แนะว่า ฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนในการยับยั้งการหายใจในระยะหลังนี้เกิดขึ้นเนื่องจากมีการยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนที่ complex I ของลูกโซ่การหายใจ มากกว่ายับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนที่ complex อื่นของลูกโซ่การหายใจ และเมื่อทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria ซึ่งไมโตคอนเดรียอยู่ในสภาวะ uncoupling อยู่แล้ว ดูผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย ใช้สับสเตรท 3 ชนิด เช่นเดียวกับใน intact mitochondria ผลคือ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนไม่สามารถยับยั้ง state 3u respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate หรือ ascorbate+TMPD เป็นสับสเตรท สอดคล้องกับข้อมูลที่ทดลองใน intact mitochondria และ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนน ทำให้เกิดการกระตุ้น state 3u respiration เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท (ตารางที่ 6 หน้า 67) NADH นี้ เป็น reducing equivalent จาก NAD^+-linked substrate เช่น glutamate+malate สามารถให้อิเลคตรอนเข้าที่ complex I ของลูกโซ่การหายใจได้โดยตรง (Avers, 1986) จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ผลใน intact mitochondria และใน osmotic-shocked mitochondria เป็นผลที่ตรงข้ามกัน ซึ่งความแตกต่างนี้ อาจจะเกิดเนื่องจากการที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนมีการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงการควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย เป็นผลให้มีการส่งผ่านสับสเตรท NADH เข้าไมโตคอนเดรียได้มากขึ้น การออกฤทธิ์จึงส่งผลในลักษณะที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจมีการออกซิไดซ์ NADH ได้มากขึ้น

ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนสามารถกระตุ้นให้ intact mitochondria มีการออกซิไดซ์ NADH ที่เติมลงไปในปฏิกิริยา(exogenous NADH) (รูปที่ 22 หน้า 69) ซึ่งโดยปกติแล้ว intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ NADH ได้ นอกจากจะมีการทำลายของผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย (Lehninger, 1951) เช่น กรณี osmotic-shocked mitochondria ซึ่งมีการเตรียมไมโตคอนเดรียใน hypotonic solution ทำให้ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียมีการบวม(swelling) (De Robertis and De Robertis, 1987) ยอมให้ NADH ผ่านเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรียได้โดยตรง Lehninger(1962) ได้อธิบายถึงลักษณะการบวม (swell) ของไมโตคอนเดรียเมื่ออยู่ใน hypotonic solution ดังแสดงในรูปที่ 34 ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจ์โนนมีกลไกออกฤทธิ์โดยไปมีผลเปลี่ยนแปลง permeability ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียมีการบวม คล้ายกับกรณี osmotic-shocked mitochondria ส่งผลให้ NADH สามารถผ่านเข้าผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้โดยตรง



รูปที่ 34 แสดงลักษณะโครงสร้างไมโตคอนเดรียปกติ และลักษณะการบวม (swelling) ของไมโตคอนเดรียเป็นผลให้การควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกผนังไมโตคอนเดรียเปลี่ยนแปลง

A. แสดงโครงสร้างปกติของ intact mitochondrion

B. แสดงการบวมของ intermembrane space จากที่มีการขนส่งสารผ่านผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย

C. มีการขนส่งสารผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้มีการเจือจางของ matrix และมีการเปลี่ยนแปลงที่ส่วน cristae

D. มีการขนส่งสารผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียเข้าสู่ intracristal spaces มีการบวมใน intracristal spaces

E. มีการขนส่งสารผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้มีการเจือจางของ matrix แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ส่วน cristae

ผลของ oligomycin และ atractyloside

พบว่า ฤทธิ์อันคัปปลิงที่เกิดจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ไม่ถูกยับยั้งด้วย oligomycin เช่นเดียวกับ DNP (รูปที่ 23) นั่นคือ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนและ DNP สามารถแก้ไขฤทธิ์ในการยับยั้ง state 3 respiration ที่เกิดจาก oligomycin ได้ แสดงว่าฤทธิ์อันคัปปลิงนี้ไม่เกี่ยวข้องกับส่วนของเอนไซม์ ATPsynthase ทั้งนี้เพราะ oligomycin เป็นสารที่ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย โดยมีผลยับยั้งที่ F_o ของเอนไซม์ ATPsynthase (Chappell and Croft, 1965; Senior, 1973) แต่เนื่องจากสาร uncouplers สามารถทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน คือ แยกกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับการสังเคราะห์ ATP ออกจากกัน ดังนั้น ถึงแม้การเกิดฟอสฟอริลเลชันจะถูกยับยั้งโดย oligomycin DNP ซึ่งเป็น classical uncoupler ยังสามารถกระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์สับสเตรทได้ ยังคงทำให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Senior, 1973) ซึ่งการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในกรณีนี้ ก็เป็นไปในทำนองเดียวกับ DNP oligomycin สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับที่ oligomycin สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของ DNP อย่างไรก็ตาม ยังคงมีการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ทดสอบผลต่อ ATPase activity ด้วย DMSO (ตารางที่ 15 หน้า 100) นั่นคือ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนสามารถกระตุ้น ATPase activity ที่ไวต่อฤทธิ์ของ oligomycin ได้

สำหรับผลของ atractyloside ต่อเอนไซม์ ATPase atractyloside เป็นสารที่ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย โดยยับยั้ง adenine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1975) พบว่า atractyloside สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของ DNP ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยับยั้งการกระตุ้น ATPase ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนได้อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15) แสดงว่า 22- ไฮดรอกซีทิงจีโนน อาจจะออกฤทธิ์ขัดขวางฤทธิ์ของ atractyloside ในการยับยั้ง adenine nucleotide translocator

ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8-7.6

ในกรณีนี้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนให้ผลที่แตกต่างจาก DNP คือ เมื่อเพิ่ม pH ของ incubation medium พบว่าจะไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ในการกระตุ้นการหายใจ (รูปที่ 25 หน้า 76, ตารางที่ 8 หน้า 77) ซึ่งต่างจากกรณีของ DNP ที่ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบกัน โดยพบว่า ฤทธิ์ของ DNP มีแนวโน้มลดน้อยลง

เมื่ออยู่ใน incubation medium ที่มี pH สูงขึ้น ทั้งในการกระตุ้นการหายใจ (รูปที่ 24 หน้า 73, ตารางที่ 7 หน้า 74) และในการกระตุ้น ATPase ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 16 หน้า 102) ผลการทดลองผลของ pH ต่อการออกฤทธิ์ของ DNP นี้เป็นไปในทำนองเดียวกับที่เคยมีผู้ศึกษามา (Myer and Slater, 1957)

อย่างไรก็ตาม มีสิ่งที่น่าสังเกตว่าเมื่อพิจารณาฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจในระยะหลัง พบว่า เมื่อ pH ของ incubation medium สูงขึ้น 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีแนวโน้มว่าจะออกฤทธิ์ได้ลดลงเช่นกัน เพราะฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจนี้จะช้าลงเมื่ออยู่ใน pH ที่สูงขึ้น (รูปที่ 25 หน้า 76) ซึ่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจในระยะหลังนี้จะช้าลงเมื่อใช้ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในความเข้มข้นที่ต่ำ (รูปที่ 16 หน้า 53) และผลการเปลี่ยนแปลง pH ต่อเอนไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย(ตารางที่ 16 หน้า 102) พบว่าปริมาณฟอสเฟตที่ปลดปล่อยจากการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase โดยทั้ง 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนและ DNP จะมีปริมาณน้อยลง (ตารางที่ 16) มีการกระตุ้น ATPase activity ลดลง ฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase มีแนวโน้มลดลงเมื่ออยู่ใน incubation medium ที่มี pH สูงขึ้น

จากสูตรโครงสร้างของ DNP (ตารางที่ 19) และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน (รูปที่ 1) สารทั้งสองตัวนี้ มีหมู่ functional group ที่มีโอกาสเป็น acid-dissociable group คือ phenolic-hydroxyl (phenolic-OH) (Terada, 1981) เมื่ออยู่ใน pH ที่เป็นด่างมากขึ้น (pH สูงขึ้น) จะทำให้กลุ่ม phenolic-OH แตกตัวมากขึ้น ทำให้ฤทธิ์ในการกระตุ้น state 4 respiration และการกระตุ้น ATPase activity ลดลง แต่ ในสูตรโครงสร้างของ DNP ยังประกอบด้วยหมู่ NO_2 ซึ่งเป็น strong electron-withdrawing moiety ด้วย จึงมีฤทธิ์อันคัปปลิงแรงกว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน

ผลของ bovine serum albumin

bovine serum albumin เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ plasma albumin ในการศึกษาผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อ plasma albumin เนื่องจาก ยาส่วนใหญ่เมื่อเข้าสู่กระแสโลหิตจะจับกับ plasma proteins ซึ่งประกอบด้วย albumin และ globulin โดยในกระแสโลหิต plasma protein ส่วนใหญ่จะเป็น albumin และยาส่วนใหญ่จะมี affinity ต่อ albumin มากกว่า globulin (Gilman,Rall and Murad, 1985) จากผลการทดลอง พบว่า BSA จะลดฤทธิ์ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในการกระตุ้น state 4 respiration ในระยะแรก และการยับยั้งการหายใจในระยะหลัง(รูปที่ 26 หน้า 79, ตารางที่ 9 หน้า 80) 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนน่าจะมีการจับกับ bovine serum albumin เป็นผลให้มีการออกฤทธิ์ลดลง

ผลของ DTNB และ DTT

การทดลองดูผลของ DTNB และ DTT ต่อการออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนนี้ เนื่องจากผลการทดลอง ในหัวข้อฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้กล่าวถึงความเป็นไปได้ที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลง permeability ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งหน้าที่นี้เกี่ยวข้องกับ sulfhydryl group การทดลองนี้เป็นการทำเพื่อพิสูจน์ว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย โดยจับกับ sulfhydryl groups (-SH) ของไมโตคอนเดรีย หรือไม่ sulfhydryl groups นี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญเพราะมีความสำคัญต่อการควบคุมทำงานของเอนไซม์บางชนิด รวมทั้งการทำงานของโปรตีนที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกจากไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญต่อการควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันด้วย (Godinot et al. , 1981; Le-quoc and Le-quoc, 1982; Robillard and Konings, 1982.)

DTNB เป็นสารประกอบพวก aromatic disulfide ยับยั้งการเกิด state 3 respiration โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย แล้วมีผลยับยั้งการส่งผ่านฟอสเฟต (Pi) จากภายนอก(cytosol) เข้าไปในไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาดฟอสเฟตในการทำปฏิกิริยา แต่ไม่สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์สับสเตรทของ DNP ได้ (Haugaard et al. , 1969) DTNB จะทำให้ฤทธิ์การกระตุ้น state 4 respirationของไมโตคอนเดรียที่เกิดจากฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนลดน้อยลง (รูปที่ 27 หน้า 82, ตารางที่ 10 หน้า 83) ข้อมูลนี้เป็นการชี้แนะว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนอาจออกฤทธิ์ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยไปแย่งกับ DTNB ในการจับกับ sulfhydryl groups สำหรับผลของ DTNB ต่อเอนไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย พบว่า ตัว DTNB เองก็มีฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของไมโตคอนเดรียเล็กน้อยเมื่อให้ DTNB ก่อนการกระตุ้น ATPase ด้วย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน พบว่า มีผลเพิ่มฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 17 หน้า 104)

DTT เป็นสารป้องกันการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (Cleland, 1964) พบว่าเมื่อให้ DTT ก่อน 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน DTT สามารถยับยั้งฤทธิ์อันคัปปลิงและฤทธิ์ในการกระตุ้น state 4 respiration ได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 28 tracing 28D หน้า 85) และยับยั้งฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 17 หน้า 104) แต่เมื่อให้ DTT หลังจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจแล้ว พบว่า DTT ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 (รูปที่ 28 tracing 28E) ซึ่งให้ข้อสังเกตว่าอาจเป็นผลจากการที่ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน เกิดปฏิกิริยาเคมีโดยตรงกับ DTT เมื่อทำการทดสอบให้ DTT ทำปฏิกิริยากับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนโดยตรง พบว่า สีของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเปลี่ยนจากสีส้มแดงใสเป็นสีใสทันที ปฏิกิริยานี้อาจเกิด

เนื่องจาก DTT มีคุณสมบัติเป็น reducing agent มารีดิวซ์โมเลกุลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเดิม อย่างไรก็ตาม ถ้าเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีของ DTT กับ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแล้ว เมื่อเติม DTT ลงในปฏิกิริยาหลังจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจแล้ว DTT น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน เป็นการแสดงให้เห็นว่า การออกฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียนี้มีความเกี่ยวข้องกับ sulfhydryl groups โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนออกฤทธิ์ไปจับกับ sulfhydryl groups ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลง permeability ของไมโตคอนเดรีย ให้ผลต่อเนื่องไปถึงการกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียที่มีสภาพดีออกซิไดซ์ NADH ได้ ซึ่ง DTT สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่กระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์ NADH ได้ ถ้ามี DTT อยู่ในปฏิกิริยาก่อน 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน แต่ถ้าให้ DTT หลังจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจแล้ว จะไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ที่กระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์ NADH ได้ ซึ่งอธิบายได้ จากการที่ ฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจนี้เป็นผลจากการที่มี 22 -ไฮดรอกซีทิงจีโนนเข้าไปสะสมอยู่ในไมโตคอนเดรียมาก เมื่อ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย แสดงว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนได้ออกฤทธิ์โดยจับกับ sulfhydryl group ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียทั้งหมดแล้ว เมื่อให้ DTT จึงไม่สามารถเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ยับยั้งการหายใจและฤทธิ์ที่กระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์ NADH ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนได้

สำหรับผลของ 22 - ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่ทำให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์ NADH นี้ สามารถยับยั้งได้ด้วย rotenone (รูปที่ 30 หน้า 91, ตารางที่ 13 หน้า 92) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่ง site I การออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนนี้จึงน่าจะมีการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับลูกโซ่การหายใจใน complex I

ผลต่อ monoamine oxidase activity

monoamine oxidase เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย (Avers, 1986) ทำหน้าที่ออกซิไดซ์สาร monoamine ในการทดลองนี้ใช้ tyramine เป็นสับสเตรท มี rotenone ในปฏิกิริยา เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrate และมี pargyline ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้ง monoamine oxidase activity เป็นตัวเปรียบเทียบในการประเมินผลของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อเอนไซม์ monoamine oxidase จากผลการทดลองรูปที่ 33 หน้า 106 ตารางที่ 18 หน้า 107 แสดงให้เห็นว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนไม่มีผลยับยั้ง monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต่าง ๆของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย กับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน และโอกาสที่จะนำ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ในปัจจุบัน ยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ มีฤทธิ์อันคัปปลิงต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ เช่น tetracyclin, sodium salicylate, acetylsalicylic acid, thyroid hormone เช่น thyroxine ยานอนหลับ เช่น barbiturates และพวก nitrites, nitrates (Brody, 1955) กลุ่มยาสลบ(amine local anesthetics) เช่น butacaine (Garlid and Nakashima, 1983) halothane (Rottenberg, 1983) ยารักษาโรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ(antiarrythmic drugs) เช่น amiodarone(ณัฐาศิริ แซ่ยิบ, 2535) จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์อันคัปปลิงมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนั้น

22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีฤทธิ์อันคัปปลิง ทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน กล่าวคือ กระตุ้นการออกซิไดซ์สับสเตรท กระตุ้น state 4 respiration มากขึ้น และในขณะเดียวกันก็เพิ่มการสลายของ ATP มากขึ้น โดยการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง ซึ่ง ATP เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเซลล์ เช่น ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อทุกชนิด และจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเพราะมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล(biosynthesis) การขนส่งสารแบบที่ต้องใช้พลังงาน (active transport) (Olson, 1982) ปริมาณ ATP ที่ลดลงนี้ ส่งผลให้กระบวนการทำงานต่าง ๆ นี้ ทำงานได้น้อยลง ปริมาณ ATP ที่ลดลงนี้อาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำให้แฮนคอคำใหญ่ ซึ่งมีสารสำคัญเป็น 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Bavovada et al., 1990)

สำหรับฤทธิ์อันคัปปลิงของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียนี้ มีกลไกเกี่ยวข้องกับ sulfhydryl groups ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย เหตุผลที่สนับสนุน คือ ฤทธิ์อันคัปปลิงของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนสามารถยับยั้งได้ด้วย DTT ซึ่งเป็นสารป้องกันการออกซิเดชัน sulfhydryl groups sulfhydryl groups นี้มีหน้าที่สำคัญในการควบคุม permeability และความสมบูรณ์ของผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การขนส่งอิออนต่าง ๆ การทำงานของเอนไซม์ ATPsynthase และการควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน โดย 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนน่าจะเปลี่ยนแปลง permeability ของผนังเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย ทำให้ผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรียมีการบวม (swelling) ทำให้การควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ intact mitochondria ออกซิไดซ์ NADH ได้

นอกจากฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจแล้ว 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน ยังทำให้มีการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะหลังด้วย ซึ่งเชื่อว่าน่าจะเกิดจากการสะสมของ22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนในไมโตคอนเดรีย ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียตามมา โดยมีการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียออกซิไดซ์ NADH ได้ด้วย ซึ่งฤทธิ์นี้นอกจากจะถูกยับยั้งด้วย DTT แล้วยังถูกยับยั้งได้ด้วย rotenone สารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I เป็นการสนับสนุนว่า นอกจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่เกี่ยวข้อง sulfhydryl groups แล้วยังมีความเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ด้วย

จากผลการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนที่สำคัญในปัจจุบัน คือ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ทั้งเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองและเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิด (Bavovada et al., 1990) และจากการศึกษา พบว่า 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีการรบกวนการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ ฤทธิ์อันคัปปลิง ฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน โดยออกฤทธิ์ที่ sulfhydryl groups ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง permeability ของผนังเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย น่าจะเป็นกลไกหนึ่งของการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตาม ควรให้ความสนใจด้วยว่านอกจาก 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแล้วก็ย่อมมีผลต่อการทำงานของเซลล์ปกติในร่างกายด้วย การจะพัฒนา 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนเพื่อนำมาเป็นยารักษาโรคมะเร็งหรือนำมาใช้ในทางคลินิกนั้น ยังคงต้องการข้อมูลทางเภสัชวิทยาในด้าน *in vivo* และ *in vitro* อีกมาก หากนำมาใช้ต้องมีการปรับขนาดให้เหมาะสมในการใช้เพราะข้อมูลหนึ่งที่สรุปได้จากการทดลองนี้คือ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนมีการจับกับโปรตีนได้ดี อาจมีการสะสมของสารในร่างกายจากการจับกับ plasma albumin ซึ่งจะทำให้เกิดพิษต่อร่างกายได้