

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

quercetin และ naringenin

quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) และ naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone) เป็นสารซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม flavonols และ flavanones ตามลำดับ สามารถพบได้ทั้งในพืช และผลิตภัณฑ์จากพืชหลายชนิด ทั้งที่เป็นอาหารและพืชสมุนไพร เช่น น้ำองุ่น ไวน์แดง ชา กาแฟ มันฝรั่ง ผักใบเขียว หัวหอม แอปเปิล ส้ม มะนาว มะเขือเทศ เป็นต้น มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติต่างๆของ flavonoid เช่น ผลการต้านมะเร็ง การต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน กำจัดสารอนุมูลอิสระ ลดระดับไขมันในโลหิต ขยายหลอดเลือด ป้องกันการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ปกป้องหัวใจ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร และการที่ยังไม่พบว่ามีพิษต่อตับ (Erlund, 2004) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาพบว่า มีฤทธิ์ปกป้องตับ (hepatoprotective effect) เช่น ในการศึกษา *in vivo* ของ Lee และ คณะ (2004) พบว่า naringenin มีฤทธิ์ปกป้องตับและมี anti-fibrogenic effect ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายตับด้วย dimethyl-nitrosamine ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pari และ Gnanasoundari (2006) ที่พบว่า naringenin มีฤทธิ์ปกป้องตับ โดยสามารถต้านอนุมูลอิสระ และลดการเกิด lipid peroxidation ในตับของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับด้วย oxytetracycline ส่วน Maiti และคณะ (2005) พบว่า quercetin มีฤทธิ์ปกป้องตับของหนูขาวที่ถูกทำให้เกิดพิษด้วยสาร carbon tetrachloride ด้วยการกำจัดสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione-s-transferase และ glutathione reductase

flavonoids เป็นสารกลุ่ม polyphenol ที่มีโครงสร้างสำคัญเป็น 2-phenyl benzopyran ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ  $C_6-C_3-C_6$  โดยมีวงเบนซีน 2 วง จับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 หรือไม่ก็ได้ และยังจำแนกตามโครงสร้างออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ flavanones, flavones, flavonols, isoflavonoids, anthocyanins และ flavans พบอยู่ในพืชหลายชนิด มักพบอยู่ในรูป glycoside คือมีน้ำตาลมาเกาะที่หมู่ phenolic hydroxyl และ ร่างกายมนุษย์นั้นไม่สามารถสร้างสาร flavonoids ขึ้นเองได้ (Peterson และ Dwyer, 1998) เนื่องจากการที่มีสารประกอบซึ่งมีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มนี้กว่า 8,000 ชนิด ทำให้มีคุณสมบัติทางชีวเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกัน (Moon และคณะ, 2006) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม flavonoids อย่างกว้างขวาง เช่น ผลการต้านมะเร็ง

การต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน กำจัดสารอนุมูลอิสระ ลดระดับไขมันในโลหิต ขยายหลอดเลือด ป้องกันการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ปกป้องหัวใจ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร และ ปกป้องตับ เป็นต้น (Formica และ Regelson, 1995; Narayana และคณะ, 2001) ปริมาณ flavonoids ที่ร่างกายได้รับต่อวันประมาณ 23 – 1,000 มิลลิกรัม โดยมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติตามแหล่งของอาหารหลัก เช่น ชาวญี่ปุ่นได้จากชาเขียว ชาวอิตาลีได้จากไวน์แดง ชาวอเมริกันและฟินแลนด์ได้จากแอปเปิลและหัวหอม flavonoid glycoside ในสารอาหารจะถูกไฮโดรไลสโดยน้ำลาย น้ำย่อย และแบคทีเรียในทางเดินอาหาร แล้วถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กในรูป active aglycone (Wach และคณะ, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการที่ตรวจไม่พบรูป flavonoid glycoside ในโลหิตของมนุษย์ และจะออกฤทธิ์ต่อร่างกายได้เมื่ออยู่ในรูป flavonoid aglycone (Franke และคณะ, 2004)

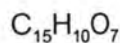
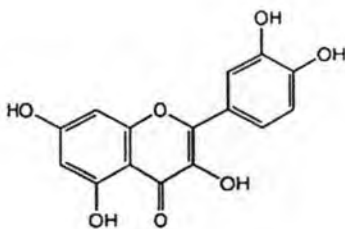
ตารางที่ 1 แสดงการจำแนก flavonoid ตามโครงสร้าง (Peterson และ Dwyer, 1998)

กลุ่มย่อย	สี	ตัวอย่าง	หมายเหตุ
anthocyanins	น้ำเงิน, แดง, ม่วง	cyanidin, peonidin, delphinidin	พบมากในดอกไม้ ผลไม้
flavans	ไม่มีสี	catechin, epicatechin, luteoferol, procyanidin, theaflavin	พบมากในผลไม้ ถั่ว ชา
flavanones	ไม่มีสี – เหลืองอ่อน	hesperidin, neohesperidin, naringin, naringenin	พบมากในพืชตระกูลส้ม
flavones	เหลืองอ่อน	apigenin, diosmetin, luteolin, neodiosmin, nobiletin, sinensetin, tangeretin, tricrin	- พบมากในผัก ผลไม้ พืชสมุนไพร - tricrin พบในปีกผีเสื้อ
flavonols	เหลืองอ่อน	isorhamnetin, kaemferol, myricetin, quercetin	- พบมากในพืช ผัก ผลไม้ - quercetin เป็น flavonoid ที่พบมากที่สุด
isoflavonoids	ไม่มีสี	daidzein, genistein	พบมากในพืชตระกูลถั่ว

มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า flavonoids หลายชนิดมีผลต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยมีผลในการกระตุ้นหรือการยับยั้งกระบวนการหายใจแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจาก flavonoids มีโครงสร้างที่แตกต่างกันมาก เช่น Hodnick และคณะ (1994) พบว่า flavonoids 6 ชนิด (robinetin, rhamnetin, eupatorin, baicalein, 7,8-dihydroxyflavone, และ norwogonin) มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากหัวใจของวัวได้ทั้งที่ complex I และ complex II ซึ่งตรงข้ามกับผลการศึกษาของ Santos และ คณะ (1998) ที่พบว่า flavonoids 8 ชนิด เช่น quercetin และอนุพันธ์, pinobanksin, pinocambrian มีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration (มีฤทธิ์ uncoupling) แต่ยับยั้ง state 3 respiration ได้ทั้งที่ complex I และ complex II นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation, mitochondrial membrane permeability transition และ protein sulfhydrylhydroxylation ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ และการแทนที่ในโครงสร้างด้วยหมู่เมทิลหลายตำแหน่งนั้น มีผลให้เพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น และ ทำให้มีผลต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียลดลง อาจเป็นเพราะว่ามีคุณสมบัติการละลายในไขมันเพิ่มขึ้นจึงสามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dijk และคณะ (2000) ที่พบว่า โครงสร้างโมเลกุลและคุณสมบัติการละลายของ flavonoids มีผลต่อการออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้ม การออกฤทธิ์ uncoupling และมีผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ flavonoids ส่วน Buss และคณะ (2005) ซึ่งพบว่า quercetin ความเข้มข้น 25 – 300  $\mu\text{M}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ นั้น เนื่องจากการที่ เอนไซม์ peroxidase ทำให้ quercetin และสารที่มี catechol ring ในโครงสร้างเปลี่ยนเป็น *O*-semiquinones ซึ่งมีผลออกซิไดส์ NADH แล้วทำให้ NADH/NAD<sup>+</sup> ratio ลดลง ฤทธิ์การหายใจของไมโตคอนเดรียจึงขาด NADH พรทิพา ตระการรังสี (2547) พบว่า epigallocatechin ซึ่งเป็น flavonoid ที่มีปริมาณมากที่สุดในชาเขียวนั้นมีผลต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดยมีฤทธิ์กระตุ้นการหายใจ (มีฤทธิ์ uncoupling) เมื่อมี glutamate + malate เป็นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรียได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A มากกว่า MAO-B ในบางการศึกษาพบว่านอกจาก flavonoids มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) แล้วนั้น ยังมีคุณสมบัติเป็น pro-oxidant ได้อีกด้วย ซึ่งฤทธิ์ป้องกันหรือต้านมะเร็งของ flavonoids นั้น อาจเนื่องจากคุณสมบัติในการเป็น pro-oxidant, มีผลต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย และ การที่มีผลต่อ mitochondrial membrane potential ทำให้มีการเปิดของ mitochondrial permeability transition pore (PTP) แล้วส่งผลกระทบต่อ

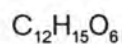
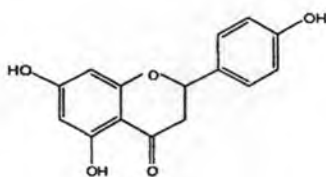
apoptosis ของเซลล์จากการหลั่ง cytochrome c เช่น rotenone และอนุพันธ์ ซึ่งเป็น flavonoids ในกลุ่ม isoflavone ที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็น classical complex I inhibitor ของ mitochondrial respiratory chain ก็มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ (Galati และ O'Brien, 2004) ส่วน Dorta และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของ flavonoids (quercetin, taxifolin, catechin และ galangin) ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว พบว่ามีผลทั้งการกระตุ้นและการยับยั้งกระบวนการหายใจแตกต่างกัน แต่โดยรวมแล้วมีผลให้ระดับ ATP ในไมโทคอนเดรียลดลงซึ่งจะชักนำให้เกิด necrosis ต่อไป ส่วนการที่มีผลเหนี่ยวนำให้เพิ่ม mitochondrial permeability transition (MPT) และการทำให้เกิด permeability transition pore (PTP) นั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis อันเกี่ยวเนื่องกับการที่มีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของ flavones 2 ชนิด คือ hispidulin และ eupafolin ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเกิดมะเร็ง ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย พบว่ามีคุณสมบัติเป็น uncoupler และ ยับยั้งกระบวนการหายใจได้ทั้งที่ complex I และ complex II ของ respiratory chain และมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ใน intact mitochondria ที่แยกจากตับของหนูขาว โดยคาดว่าสารที่มีผลต่อการสร้าง ATP น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Dabaghi-Barbosa และคณะ, 2005)

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ quercetin



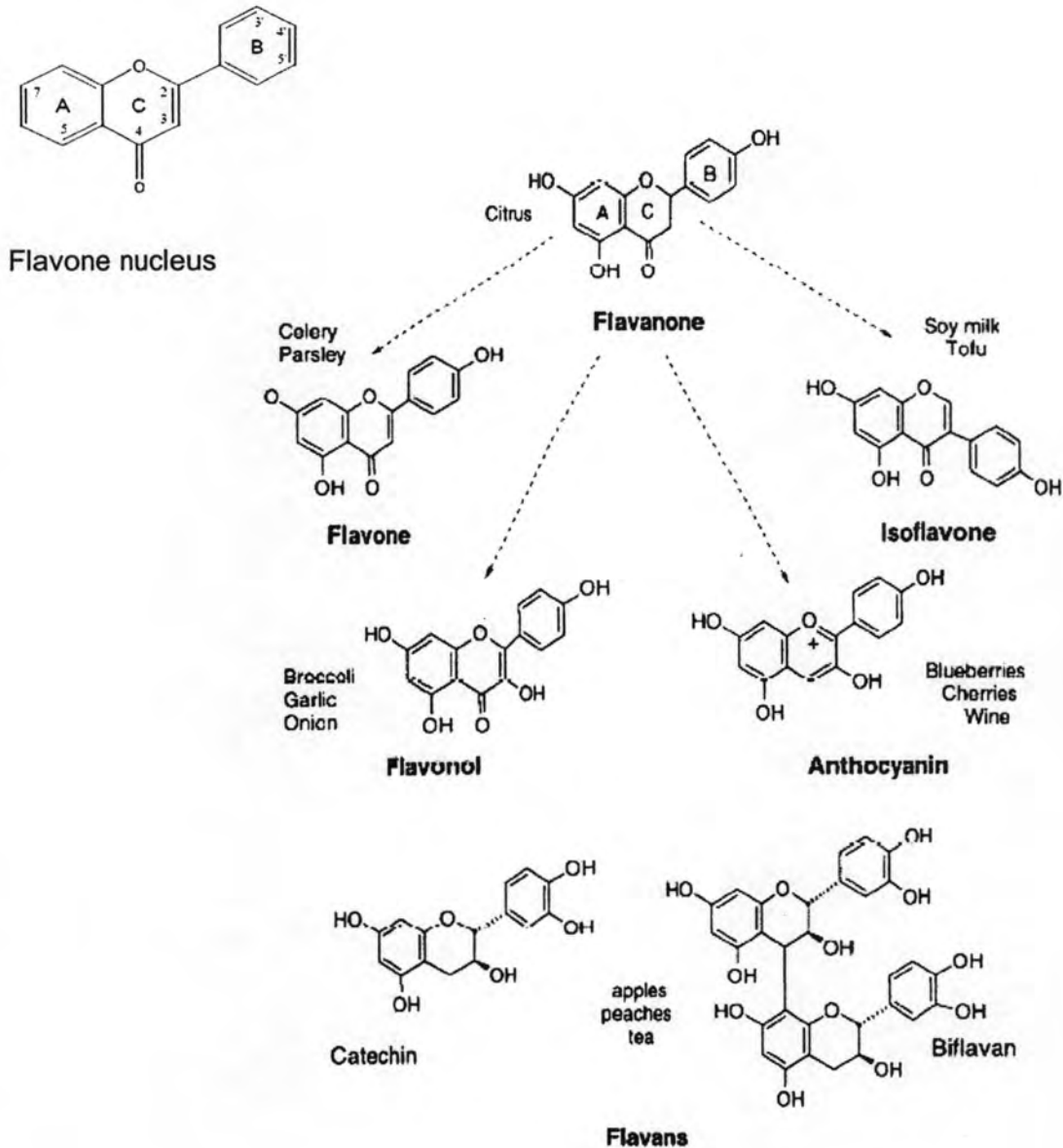
น้ำหนักโมเลกุล = 302.24

รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ naringenin



น้ำหนักโมเลกุล = 272.26

รูปที่ 3 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมี และแหล่งที่พบในอาหารของ flavonoids 6 กลุ่มย่อย (Peterson และ Dwyer, 1998)



### ลักษณะและโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย

ไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ในเซลล์ยูคาริโอต มีขนาด รูปร่างและปริมาณแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เซลล์นั้นอยู่และอัตราการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น ที่ตับนั้น ไมโตคอนเดรียจะมีรูปร่างค่อนข้างกลม (nearly spherical) ส่วนไมโตคอนเดรียที่กล้ามเนื้อหัวใจมีรูปร่างยาวหรือทรงกระบอก (long or cylindrical) รวมทั้งยังมีจำนวนของ cristae ภายในไมโตคอนเดรียมากกว่า ไมโตคอนเดรียที่เซลล์ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีจำนวนอยู่ระหว่าง 800-2,000 ไมโตคอนเดรีย แต่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วจะไม่มีไมโตคอนเดรีย

(Devlin, 2002) หรือใน sperm cell จะมีไมโทคอนเดรียเพียง 50-75 ไมโทคอนเดรีย (Metzler, 2003) โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียมีขนาดกว้างประมาณ 0.5  $\mu\text{m}$  และยาวประมาณ 1  $\mu\text{m}$  (Voet, 1999) มีเยื่อหุ้มล้อมรอบ 2 ชั้น (รูปที่ 4) คือ

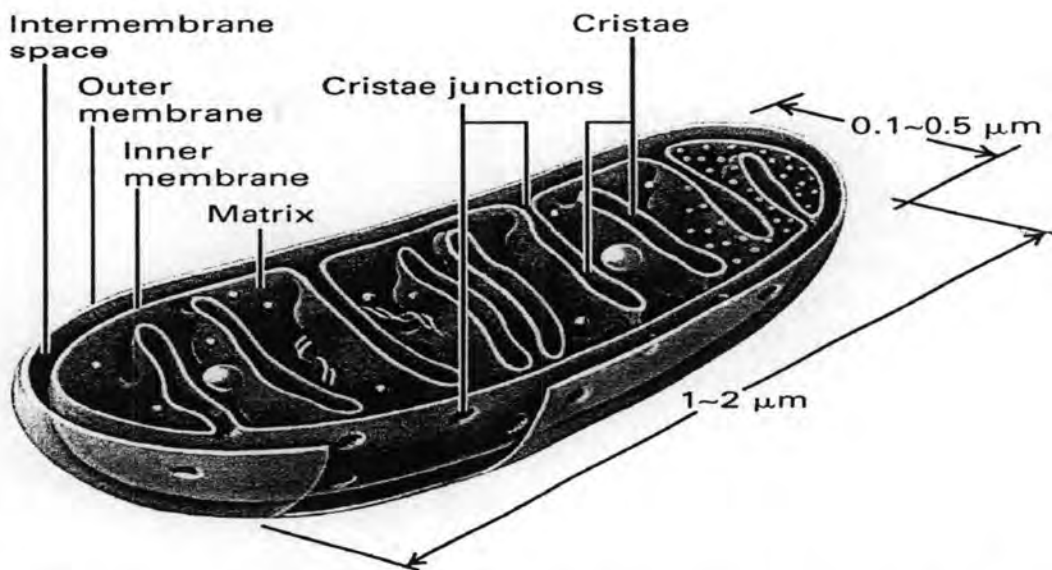
1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) เป็นเยื่อที่มีลักษณะผิวเรียบ ประกอบด้วย ไขมัน 30-40 % , โปรตีน 60-70 % (Devlin, 2002) โดยที่เยื่อหุ้มชั้นนอกนี้จะมีโปรตีนที่วางตัวทำให้เกิดช่องให้สารผ่านได้แบบไม่เฉพาะเจาะจงที่เรียกว่า porin อยู่ ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกมีคุณสมบัติยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 10,000 daltons ผ่านได้อย่างอิสระ (Voet, 1999) นอกจากนี้ในโครงสร้างจะมีส่วนที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในเรียกว่า contact site และที่บริเวณนี้จะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition pore (PTP) (รูปที่ 5 และ 6) ซึ่งในสภาพที่เปิดจะยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจนถึงน้ำหนักโมเลกุล 1,500 daltons สามารถผ่านเข้าออกระหว่าง matrix กับไซโตพลาซึมอย่างอิสระ โดยปัจจัยที่จะทำให้ PTP เปิดได้ เช่น แคลเซียมที่สะสมอยู่ในไมโทคอนเดรีย สภาพที่มี mitochondrial transmembrane potential ต่ำ เอนไซม์สำคัญที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก คือ monoamine oxidase ซึ่งเป็น marker enzyme ของเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Szewczyk และ Wojtczak, 2002) และนอกจากนี้ยังมีช่องว่างที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในเรียกว่า intermembrane space ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง ATP

2. เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) เป็นเยื่อหุ้มที่มีพื้นที่ผิวมากกว่าชั้นนอก เนื่องจากเยื่อหุ้มในชั้นนี้จะพับไปพับมายื่นเข้าไปในส่วนของ matrix ซึ่งจะเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า cristae เยื่อหุ้มชั้นนี้จะประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80% มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สาร และ อีออนต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่จะให้เฉพาะ  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{NH}_3$  ผ่านเข้าออกอย่างอิสระ ส่วนสารจำพวก hydrophilic metabolites และ inorganic ions ที่สำคัญต่อกระบวนการชีวเคมีของเซลล์จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มชั้นในได้โดยอาศัย specific channels และ carrier protein ที่อยู่ในเยื่อชั้นนี้ นอกจากนี้ที่เยื่อหุ้มชั้นในยังมีเอนไซม์ต่างๆที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น respiratory chain enzymes, ATP synthase (Devlin, 2002; Szewczyk และ Wojtczak, 2002) ดังตารางที่ 2

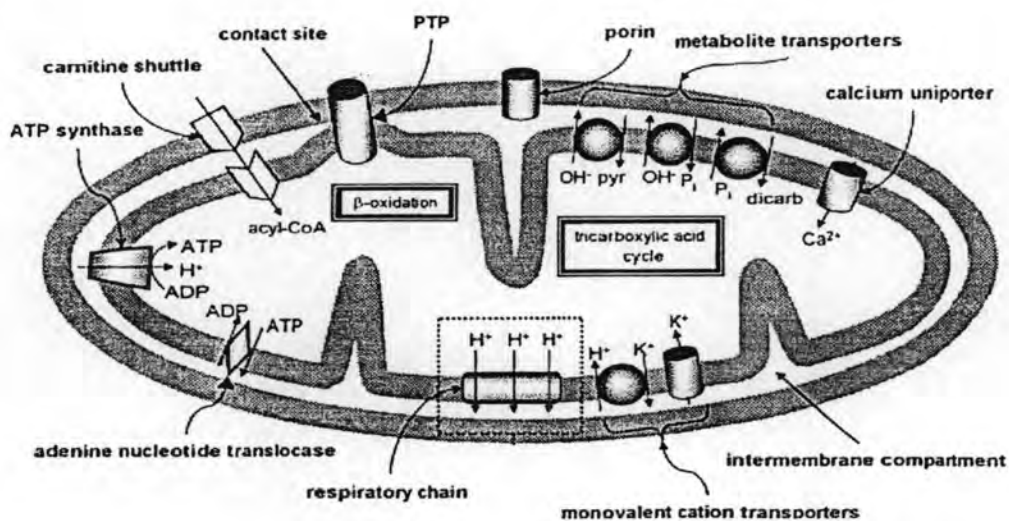
ส่วนภายในไมโทคอนเดรียจะเรียกว่า matrix ภายในจะประกอบไปด้วยเอนไซม์ต่างๆในวัฏจักรเครปส์ ยกเว้นเอนไซม์ succinate dehydrogenase จะอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการ fatty acid oxidation นอกจากนี้ยังมี mitochondrial DNA (mtDNA), ribosome, และโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการ transcription ของ mtDNA และกระบวนการ translation ของ mRNA (Devlin, 2002)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์นอกนิวเคลียสชนิดเดียวที่มี DNA เป็นของตัวเอง มีลักษณะเป็น circular DNA ที่บรรจุคำสั่งของ polypeptide chains ประมาณ 24 polypeptides ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบของ complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจหรือเป็นส่วนสำคัญอื่นๆ ของ energy-coupling machinery แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนส่วนใหญ่ในไมโทคอนเดรียจะสังเคราะห์จาก DNA ในนิวเคลียสแล้วจึงขนส่งเข้าสู่ไมโทคอนเดรียด้วยกลไกที่ซับซ้อน (Szewczyk และ Wojtczak, 2002)

รูปที่ 4 แสดงลักษณะและโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Lodish และคณะ, 2004 )



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย (Szewczyk และ Wojtczak, 2002)



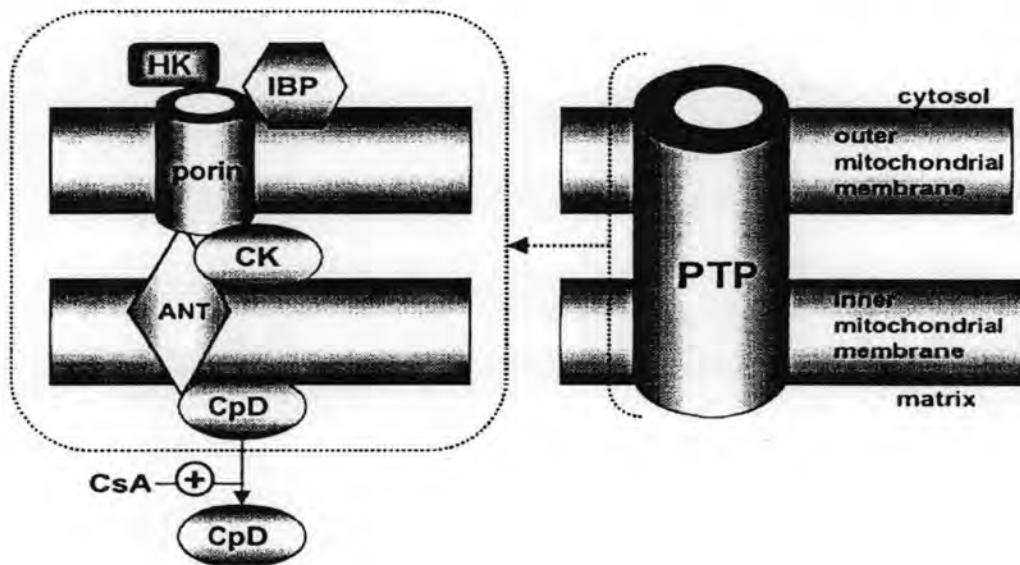
ตารางที่ 2 แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละส่วนของไมโทคอนเดรีย (Devlin, 2002)

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



รูปที่ 6 แสดงลักษณะและส่วนประกอบของ permeability transition pore (PTP)

ภาพด้านขวาแสดงให้เห็นว่า 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)



### ส่วนประกอบของ respiratory chain

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

Electron transport chain ในไมโทคอนเดรียประกอบด้วยตัวขนส่งอิเล็กตรอนชนิดต่างๆ จัดเรียงตัวกันอยู่ในรูปของ complex ต่างๆ จำนวน 4 complex อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก NADH และ  $\text{FADH}_2$  ไปยังออกซิเจน แต่ละ complex ประกอบด้วย เอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอน, ตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่มี prosthetic group, และโปรตีนโครงสร้างที่ทำให้ complex คงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้ยังมีตัวขนส่งอิเล็กตรอนขนาดเล็ก ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex ได้แก่ cytochrome c และ coenzyme Q หรือ ubiquinone (พัชรา วีระกะลัส, 2544)

ตัวขนส่งอิเล็กตรอนใน electron transport chain ได้แก่ (Garrett และ Grisham, 1999; Zubay, 1993)

1. flavoprotein เป็นโปรตีนที่มี prosthetic group เชื่อมอยู่ 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)

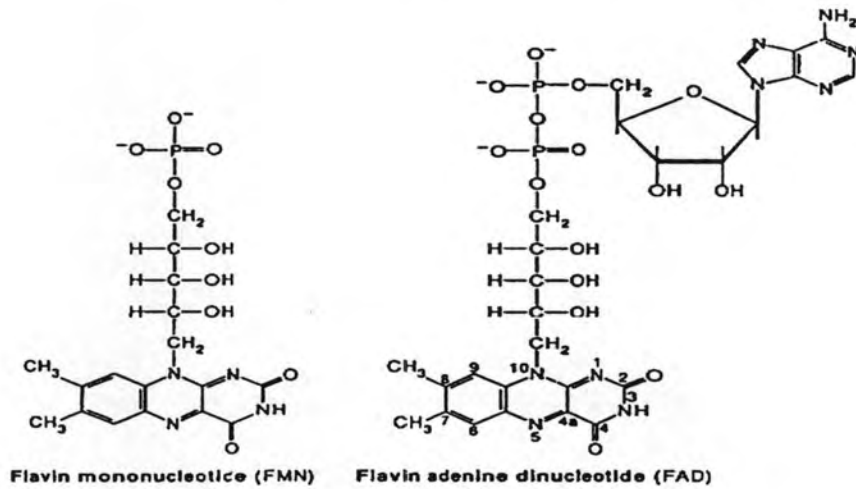
2. coenzyme Q หรือ ubiquinone (CoQ หรือ UQ) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ได้ในชั้นไขมัน ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนระหว่าง complex I, II และ III (รูปที่ 8)

3. cytochrome เป็นโปรตีนที่มี heme เป็น prosthetic group ได้แก่ cytochrome b, c, c<sub>1</sub>, a, และ a<sub>3</sub> ทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนได้ครั้งละ 1 ตัว โดย cytochrome เมื่ออยู่ในสภาพออกซิไดส์ โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์ริก ( $Fe^{3+}$ ) และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนมา 1 ตัวจะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพรีดิวซ์ โมเลกุลของเหล็กจะอยู่ในรูปเฟอร์รัส ( $Fe^{2+}$ ) ซึ่งเมื่อส่งอิเล็กตรอนไป 1 ตัวก็จะกลายเป็น cytochrome ที่อยู่ในสภาพออกซิไดส์ตามเดิม (รูปที่ 9)

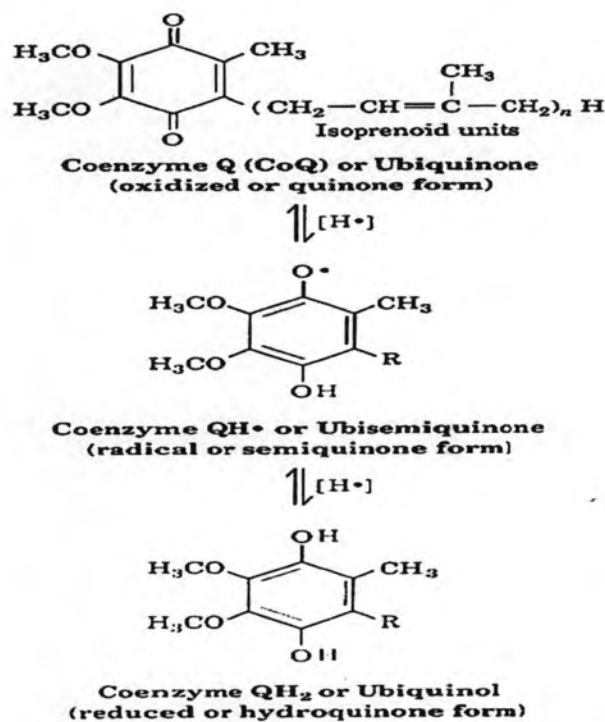
4. Iron-sulfur protein เป็นโปรตีนทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบแต่เหล็กไม่ได้อยู่ในรูป heme เหมือนกับ cytochrome แต่ใน Fe - S โปรตีนนี้อะตอมของเหล็กจะจับอยู่กับอะตอมของซัลเฟอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์แล้วเกิดเป็น Fe - S center การรับส่งอิเล็กตรอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่าง  $Fe^{2+}$  และ  $Fe^{3+}$  (รูปที่ 9)

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

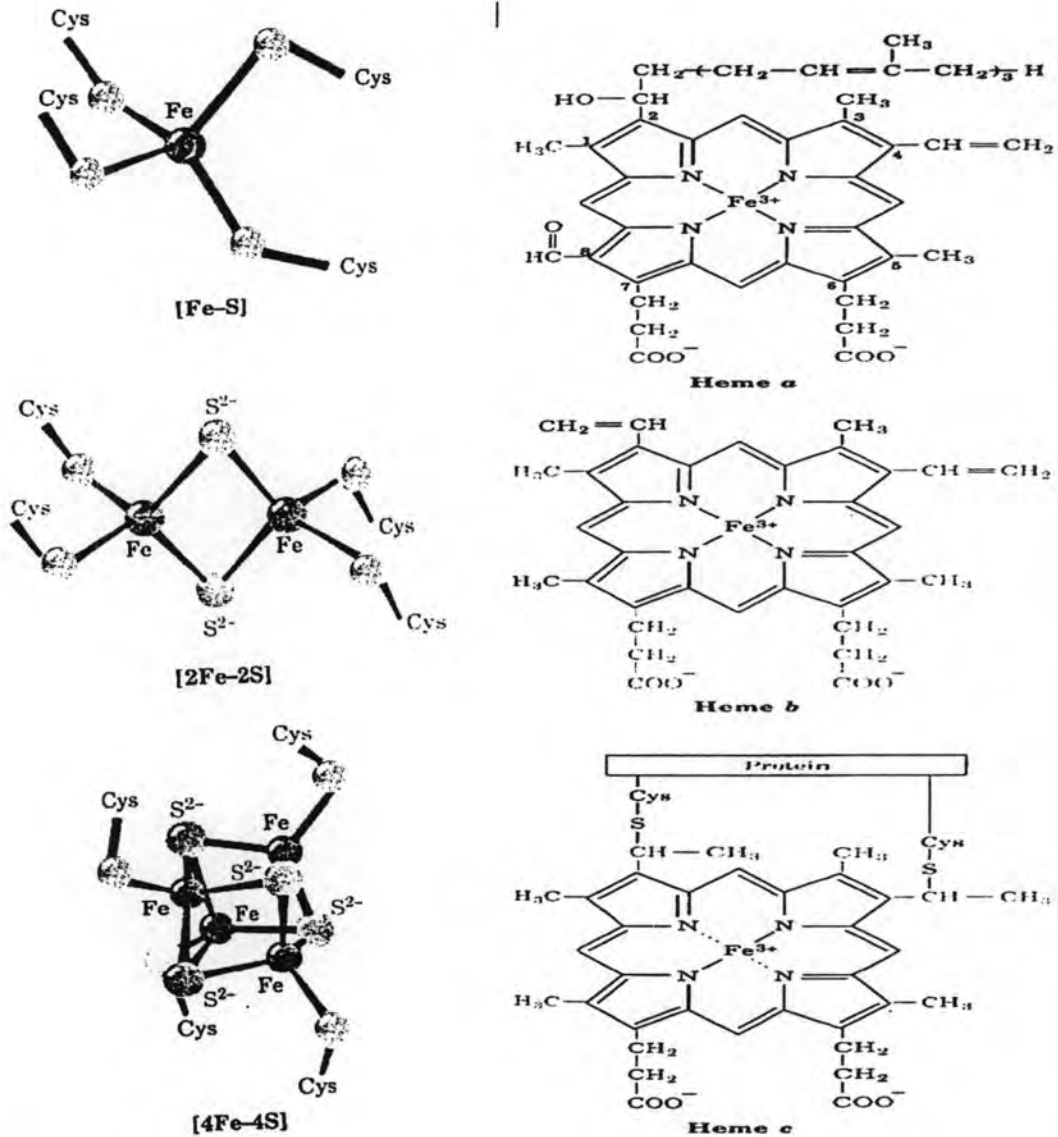
รูปที่ 7 แสดงลักษณะโครงสร้างของ flavin mononucleotide (FMN) ซึ่งเป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex I และ flavin adenine dinucleotides (FAD) ซึ่งเป็น prosthetic group ของ flavoprotein ของ complex II (Zubay, 1993)



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 และ ทำให้มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่างๆ ของลูกโซ่การหายใจแบ่งเป็น 2 พวก คือ

1.  $\text{NAD}^+$ -linked substrates เช่น glutamate, malate, pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นซัพสเตรตที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรียโดยวัฏจักรเครบส์จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม ( $2\text{H}^+$ ) ไปรีดิวซ์  $\text{NAD}^+$  ได้เป็น  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex I

2. FAD-linked substrates ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนอะตอม ( $2H^+$ ) ที่ปลดปล่อยออกมาจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น  $FADH_2$  ให้อิเล็กตรอนเข้าสู่ respiratory chain ที่ complex II หรือเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Mathews และคณะ, 2000; Lehninger และคณะ, 2000)

**การถ่ายทอดอิเล็กตรอนใน respiratory chain (Devlin, 2002; Voet, 1995)**

อิเล็กตรอน หรือ reducing equivalent (ใน NADH หรือ  $FADH_2$ ) ถูกถ่ายทอดไปยังสารที่มีค่า redox potential ( $E_0$ ) เป็นบวกเพิ่มขึ้นตามลำดับ ทำให้ระหว่างถ่ายทอดอิเล็กตรอนมีพลังงานปล่อยออกมา สารสุดท้ายที่มารับอิเล็กตรอน คือ  $O_2$  ซึ่งจะกลายเป็น  $H_2O$  ดังรูปที่ 11

โดยในตอนแรกขั้นสเตรตที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงสารอาหารที่ให้พลังงานต่างๆ จะอยู่ในสภาพออกซิไดซ์ จากนั้นจะถูกออกซิไดส์โดยจะส่งอิเล็กตรอนไปยัง coenzyme  $NAD^+$  และ FAD เกิดเป็น NADH หรือ  $FADH_2$  ซึ่งจะส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้กับ complex ต่างๆ ในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งประกอบด้วย 4 complex ดังนี้ (รูปที่ 10)

1. complex I หรือ NADH dehydrogenase หรือ NADH - ubiquinone oxidoreductase ทำหน้าที่ออกซิไดส์ NADH ที่อยู่ใน matrix ของไมโทคอนเดรีย แล้วส่งอิเล็กตรอนต่อไปให้ coenzyme Q โดยเริ่มแรก FMN จะรับอิเล็กตรอนจาก NADH จากนั้นจะส่งต่อไปให้  $Fe^{3+}$  ใน Fe - S protein ซึ่งอิเล็กตรอน จาก 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  $bc_1$  complex หรือ ubiquinol - cytochrome c oxidoreductase ประกอบด้วย cytochrome b, cytochrome c, และ iron - sulfur protein ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก coenzyme Q ไปยัง cytochrome c

cytochrome c เป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic protein ขนาดเล็ก อยู่บนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน เมื่อ cytochrome c จับกับ complex III จะได้รับอิเล็กตรอนทำให้กลายเป็น reduced cytochrome c จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามผิวของ membrane จับกับ subunit II ของ complex IV หรือ cytochrome c oxidase แล้วส่งต่ออิเล็กตรอนให้  $Cu_A$  site

4. complex IV หรือ cytochrome c oxidase ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังโมเลกุลของออกซิเจนทำให้ออกซิเจนถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ โดยเริ่มจาก  $Cu_A$  รับอิเล็กตรอนจาก cytochrome c ส่งต่อไปยัง cytochrome a และ cytochrome  $a_3 - Cu_B$  แล้วส่งให้ออกซิเจนในที่สุด

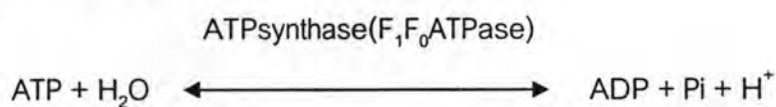
## การสังเคราะห์ ATP

### Chemiosmotic theory

กลไกของการเกิด oxidative phosphorylation เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP มีหลายทฤษฎี โดยทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับมากที่สุด คือ chemiosmotic hypothesis ซึ่งนำเสนอโดย Peter Mitchell ในปี 1961 โดยกล่าวไว้ว่า พลังงานที่ได้จากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจจะถูกนำไปใช้ในการผลักโปรตอนจากใน matrix ของไมโทคอนเดรียออกสู่อินเตอร์เมมเบรนสเปซ ซึ่งทำให้เกิด electrochemical gradient ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และจาก gradient ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกิดเป็น electrochemical potential หรือ proton-motive force เป็นแหล่งพลังงานนำไปใช้สร้าง ATP (Voet, 1995)

### การเกิด proton-motive force

ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADH และ  $FADH_2$  ไปยังออกซิเจน การขนส่งอิเล็กตรอนผ่าน complex I, III และ IV จะเกิดพลังงานนำไปใช้ในการผลักโปรตอนจากใน matrix ออกสู่อินเตอร์เมมเบรนสเปซ การขนส่ง 2 อิเล็กตรอนจาก 1 NADH จนถึงออกซิเจนจะมีการผลักโปรตอนออกไป 10 โปรตอน (complex I ผลักได้ 4 โปรตอน, complex III ผลักได้ 4 โปรตอน และ complex IV ผลักได้ 2 โปรตอน) แต่ถ้าเป็นการขนส่งอิเล็กตรอนจาก  $FADH_2$  ไปยังออกซิเจนโดยไม่ผ่าน complex I ก็จะมีผลผลักโปรตอนออกไปได้เพียง 6 โปรตอน การผลักโปรตอนดังที่กล่าวมาแล้วมีผลทำให้ด้านนอกมีโปรตอนมากกว่าด้านใน matrix (chemical gradient) และทำให้ด้านนอกมีประจุบวกมากกว่าด้านใน (electrical gradient) หรือรวมเรียกว่าเกิด electrochemical gradient ซึ่งเป็นพลังงานเชิงเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า electrochemical potential หรือ proton-motive force นั่นเอง และเมื่อโปรตอนจาก intermembrane space ไหลกลับสู่ matrix ทางเอนไซม์ ATP synthase ( $F_1F_0$ -ATPase) พลังงานดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนรูปนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP จาก  $ADP + P_i$  ดังสมการ



ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ระหว่างการ synthesis และ hydrolysis โดยถ้าสารใดก็ตามที่ทำให้เกิดภาวะ uncoupling ของไมโทคอนเดรีย คือทำให้ oxidation และ phosphorylation แยกออกจากกัน เช่น DNP จะมีผลทำให้ electrochemical gradient เสียไป ในสถานะเช่นนี้จะกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) ซึ่งเป็นผลจาก ATPase activity ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถวัด ATPase activity ได้โดยการวัดปริมาณ  $P_i$  ที่เกิดจากการสลาย ATP (Danishefsky, 1980; Devlin, 2002; Zubay, 1993) และหากโปรตอนกลับเข้าสู่ matrix

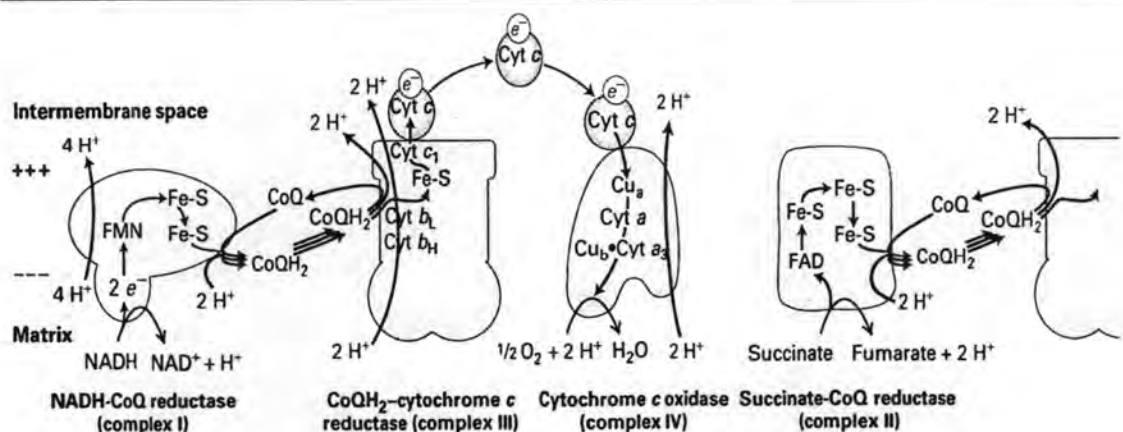
ผ่านทาง uncoupling protein ก็จะไม่มีการสร้าง ATP แต่ยังคงมีการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ดังแสดงในรูปที่ 13

**ATP synthase และการสังเคราะห์ ATP**

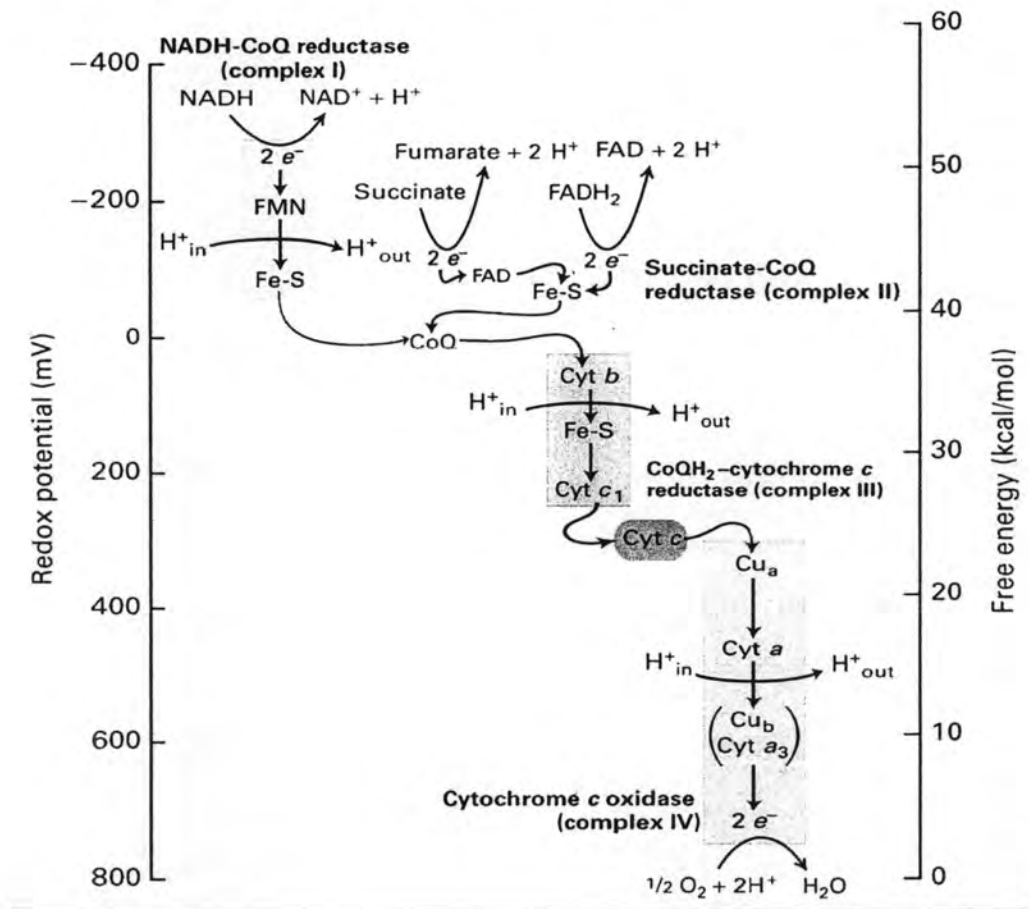
การสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรีย จะต้องอาศัยเอนไซม์ ATP synthase หรือ  $F_1F_0$ -ATPase ซึ่งจัดว่าเป็น complex หนึ่งของลูกโซ่การหายใจ โครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase ประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ  $F_1$  และ  $F_0$  ส่วนของ  $F_0$  จะประกอบไปด้วย integral membrane protein 3 ชนิด ในรูปที่ 12 นั้น  $F_0$  จะเป็นส่วน a, b, และ c โดยส่วน a มี 1 subunit ส่วน b มี 2 subunit และส่วน c มี 12 subunit ในไมโทคอนเดรียของสัตว์ สำหรับส่วน c จะเรียงตัวเป็นวงแหวนรูปโดนัท ในส่วนของ  $F_1$  จะประกอบไปด้วย  $\alpha$  3 subunit,  $\beta$  3 subunit, และส่วนของ  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  อย่างละ 1 subunit โดยส่วนของ  $\gamma$  จะมีลักษณะเป็นวงที่ขนาดพอดีกับส่วนตรงกลางของวงแหวน c-subunit ของ  $F_0$  ส่วนของ  $\epsilon$  จะเชื่อมติดกับ  $\gamma$  และบางส่วนของ c-subunit ของ  $F_0$  สำหรับส่วนของ  $\alpha$  และ  $\beta$  จะเรียงตัวในลักษณะ hexamer ( $\alpha\beta\alpha\beta$ ) อยู่บนส่วนยอดของ  $\gamma$  subunit

เอนไซม์ ATP synthase จะฝังตัวอยู่ในเมมเบรน โดยมีส่วนของ  $F_1$  เรียงตัวในลักษณะของ knob ยื่นเข้าไปในส่วนของ matrix และเมื่อโปรตอนไหลจาก intermembrane space กลับเข้าสู่ matrix ทาง ATP synthase จะทำให้ส่วนวงแหวน c-subunit ของ  $F_0$  และส่วน  $\epsilon$  และ  $\gamma$  ของ  $F_1$  เกิดการหมุน มีผลทำให้ส่วน  $\beta$ -subunit ของ  $F_1$  เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ ADP และ  $P_i$  ที่จับอยู่กับส่วน  $\beta$ -subunit ของ  $F_1$  เกิดการสังเคราะห์เป็น ATP (Devlin, 2002; Lodish และคณะ, 2004)

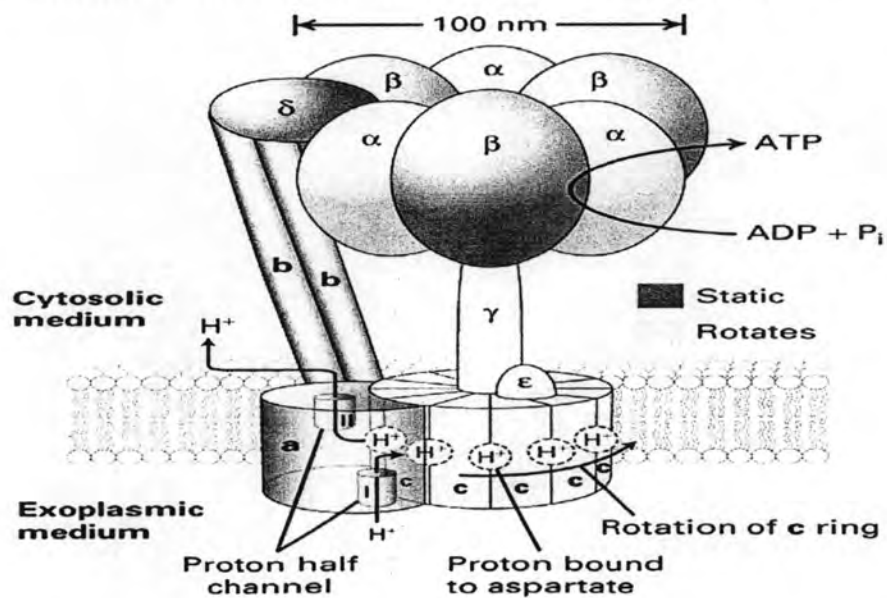
รูปที่ 10 แสดงส่วนประกอบและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย (Lodish และคณะ, 2004)



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลง redox potential และ free energy ระหว่างขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจ (Lodish และคณะ, 2004)

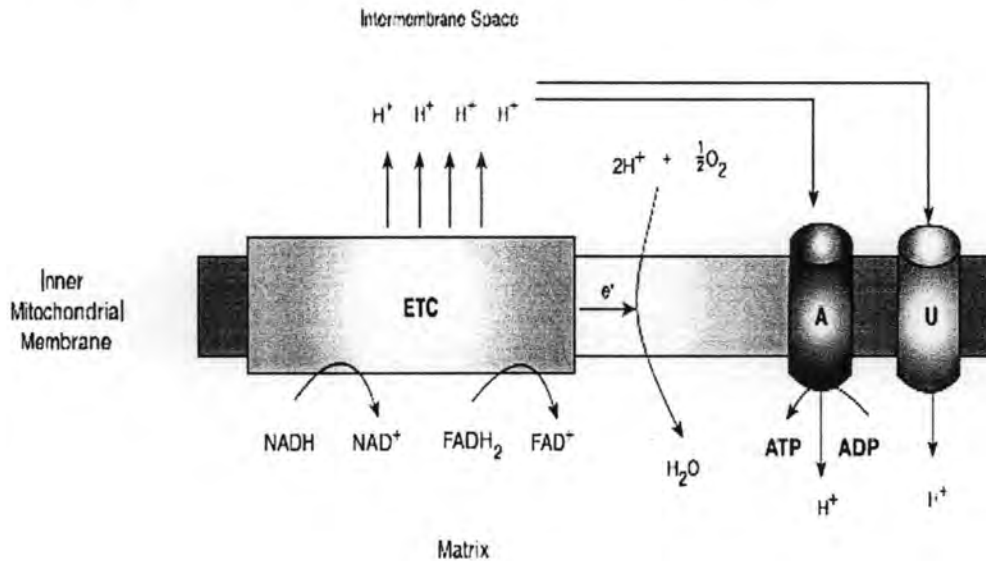


รูปที่ 12 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ ATP synthase (Lodish และคณะ, 2004)





รูปที่ 13 แสดงการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย (ETC) และการเกิด proton - motive force (A = ATPsynthase , U = uncoupling protein)



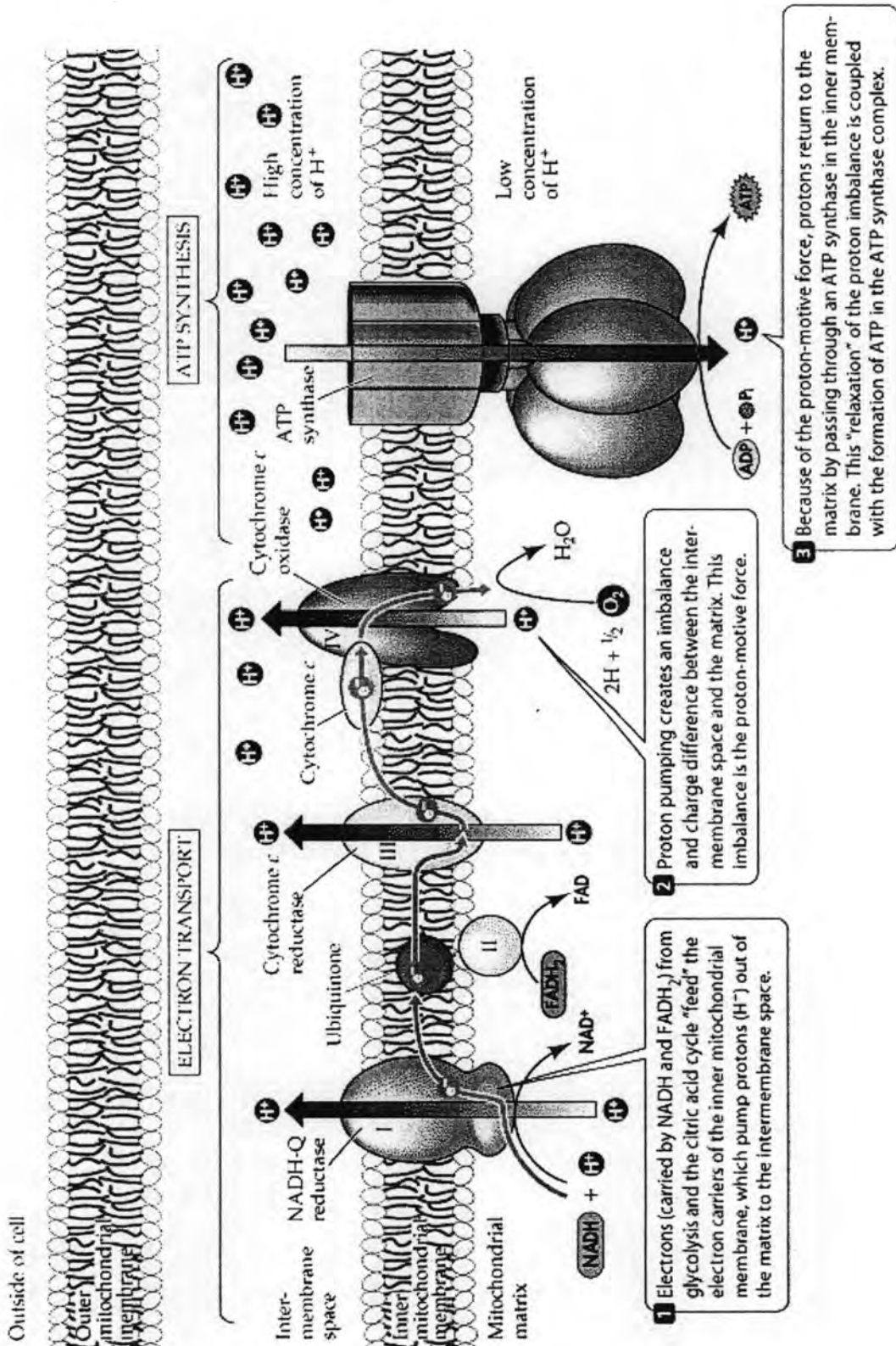
### ความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย

สารพิษที่จะมีผลต่อการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรีย อาจเกิดขึ้นโดยไปรบกวนการเกิด electrochemical gradient หรือไปทำลาย electrochemical gradient พิษเฉียบพลันของสารยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจะทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเกิดอาการต่างๆ เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง, ความดันโลหิตต่ำ, ปวดหัว, เหนื่อยง่าย, สับสน เป็นต้น (Wallace และ Starkov, 2000) นอกจากสารพิษมีผลไปยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจแล้ว ยังมีสารพิษที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียด้วยกลไกอื่นๆอีก โดยสามารถแบ่งสารที่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ดังนี้

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

1.1 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ complex I คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q โดยทั่วไป complex I จะเป็นจุดเกิดความเสียหายได้ง่ายที่สุดในลูกโซ่การหายใจ มีสารเคมีมากกว่า 60 ชนิด ทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่ทราบแล้วว่ามีผลยับยั้ง complex I เช่น rotenone, rhein, ptericidin, amytal, ยาพวก barbiturates, mercurials, demerol เป็นต้น

รูปที่ 14 แสดง chemiosmotic hypothesis and electron transport chain (Doroquez, 2004)



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

1.3 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทออดีเล็กตรอนที่ complex III คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทออดีเล็กตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c เช่น myxothiazol, antimycin A, funiculosin, zinc ion เป็นต้น

1.4 สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทออดีเล็กตรอนที่ complex IV คือ สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทออดีเล็กตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน โดยถ้ามีการยับยั้งที่ complex IV แล้ว นอกจากจะไม่สามารถถ่ายทออดีเล็กตรอนไปยังออกซิเจนแล้วยังทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้ยับยั้งเอนไซม์ใดก็ตาม ตัวอย่างสาร เช่น cyanide, azide, carbon monoxide เป็นต้น

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด phosphorylation หรือการสังเคราะห์ ATP เช่น

- oligomycin ออกฤทธิ์โดยไปจับกับโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในส่วน  $F_0$  ของ ATP synthase แล้วทำให้ไม่เกิดการไหลของโปรตอนผ่าน  $F_0$  มีผลทำให้โปรตอนบริเวณ intermembrane space มาก จนทำให้การถ่ายทออดีเล็กตรอนเกิดขึ้นต่อไปไม่ได้ (Garrett และ Grisham, 1999)

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

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

3. สารที่ออกฤทธิ์ uncoupling

สารในกลุ่มนี้เรียกว่า uncoupler ซึ่งสาร uncoupler จะออกฤทธิ์โดยทำให้โปรตอนที่อยู่ใน intermembrane space ไหลกลับเข้าสู่ matrix โดยไม่ผ่านเอนไซม์ ATP synthase ดังนั้น gradient ของโปรตอนที่เคยมีอยู่นั้นก็จะสลายไป ซึ่งมีผลทำให้การถ่ายทออดีเล็กตรอนและการสังเคราะห์ ATP ถูกแยกออกจากกัน กล่าวคือ การถ่ายทออดีเล็กตรอนยังคงเกิดขึ้นแต่จะไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP และทำให้พลังงานที่ได้รับจากสารอาหารถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนแทน (Garrett และ Grisham, 1999)

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

3.1 สารที่ออกฤทธิ์เป็น structural uncoupling ได้แก่ สารและรวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่มีผลทำให้ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มชั้นในเสียไป ซึ่งมีผลทำให้ respiratory control ลดลง เพิ่ม ATPase activity และประสิทธิภาพในการ phosphorylation ลดลง เช่น detergent, phospholipase, การ sonicate เป็นต้น

3.2 ionophores สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามกลไก ได้แก่

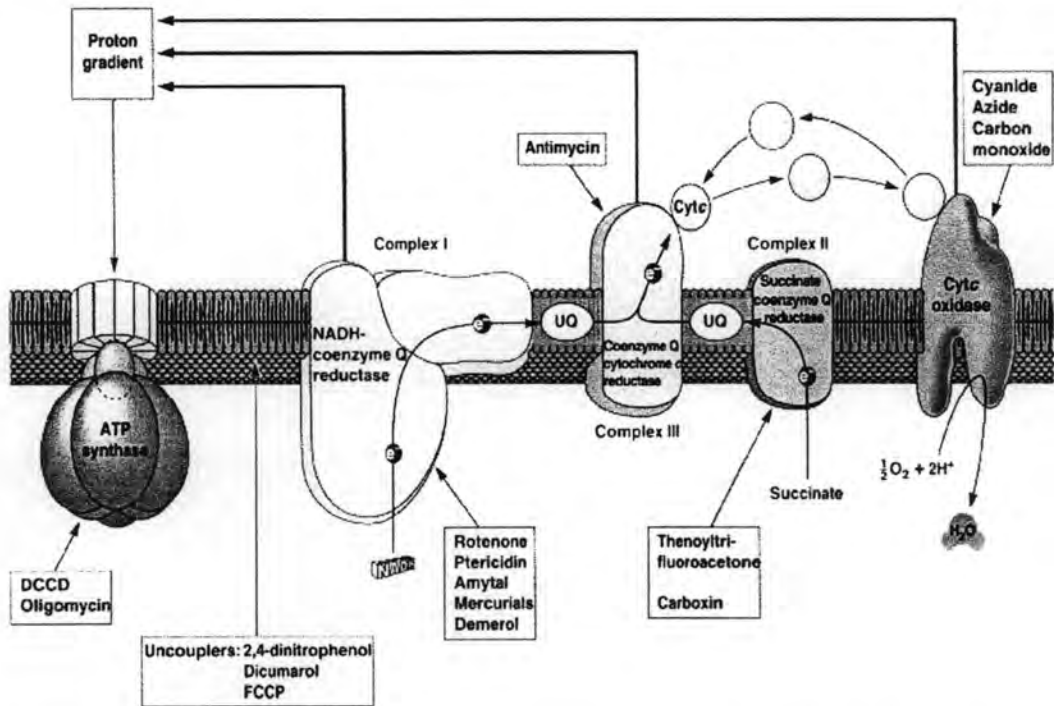
3.2.1 channel type สารในกลุ่มนี้จะเรียงตัวเป็นช่องในชั้นไขมันของไมโทคอนเดรีย เช่น gramicidin เป็นต้น

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

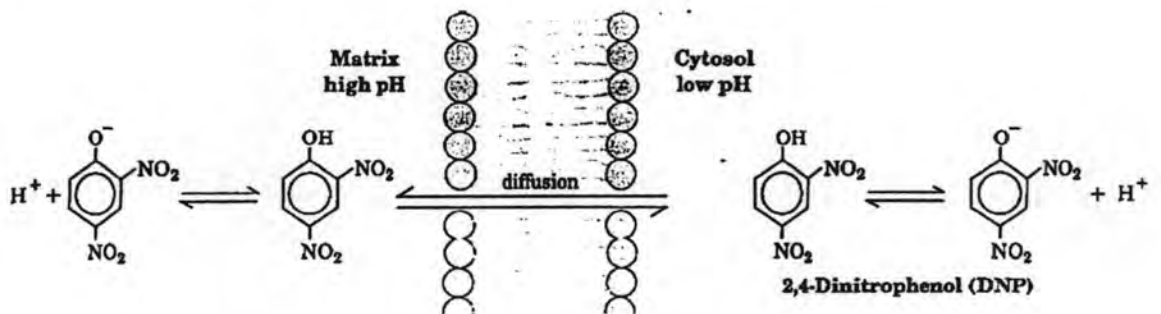
3.3 สารพวก phenols และ anionic aromatic compounds อื่นๆ สารกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid ทำให้สามารถจับกับ  $H^+$  ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน แล้วเคลื่อนที่เข้าไปใน matrix แยกตัวให้  $H^+$  การจับและการแยกตัวเช่นนี้ได้เนื่องจากด้านใน matrix จะมี pH สูงกว่าด้านนอก (รูปที่ 16) เช่น DNP (2,4-dinitrophenol), FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy phenylhydrazone), CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) เป็นต้น

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

รูปที่ 15 แสดงตำแหน่งที่สารสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation (Garrett และ Grisham, 1999)



รูปที่ 16 แสดงกลไกการเกิด uncoupling ของ 2,4-Dinitrophenol (DNP) (Voet, 1995)



**โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase, MAO)**

เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบได้ในหลายอวัยวะ เช่น สมอง ดับ ลำไส้ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เอนไซม์นี้จะฝังตัวแน่นในลักษณะของ integral protein อยู่ที่บริเวณผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Schnaitman, Erwin และ Greenawalt, 1967) มี flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารสื่อประสาทพวกamines ได้แก่ epinephrine, norepinephrine, dopamine, tyramine และ 5-hydroxytryptamine (5-HT) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณของสารพวกนี้ในระบบ

ประสาท คือ เป็นหนึ่งในกระบวนการเมแทบอลิซึมสารกลุ่ม catecholamines ร่วมกับกระบวนการ methylation และ conjugation นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมปริมาณสาร amines อื่นๆ เช่น ยา หรือสารอาหาร ที่ร่างกายได้รับเข้าไปด้วย (Davison, 1958) ดังสมการ



การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้เริ่มขึ้นเมื่อ Hare ค้นพบเอนไซม์ในตับของกระต่าย ในปี 1928 เรียกชื่อว่า tyramine oxidase ซึ่งต่อมามีผู้ค้นพบเอนไซม์อีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation ของสาร amine ได้แก่ adrenaline oxidase และ aliphatic amine oxidase ต่อมา ภายหลังในปี 1951 Zeller ได้ตั้งชื่อเรียกรวมกันว่า monoamine oxidase เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เหมือนกันหลายประการ

#### Multiple forms ของ monoamine oxidase

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า monoamine oxidase 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 (Binda และคณะ, 2004; Houslay และคณะ, 1976) สำหรับความไวต่อ inhibitor MAO-A จะมีความไวในการยับยั้งด้วย clorgyline ส่วน MAO-B จะมีความไวในการยับยั้งด้วย pargyline (Urbanc และคณะ, 1991) อย่างไรก็ตาม ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรตและความไวต่อการยับยั้งของเอนไซม์ monoamine oxidase นี้ ไม่เหมือนกันในสัตว์แต่ละชนิด และแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างบริเวณหรืออวัยวะ ดังตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในแต่ละอวัยวะมีการกระจายของ isozymatic form ของ MAO แต่ละ isozymatic form แตกต่างกัน โดยพบสมรรถนะของ MAO-A สูงที่สุดในส่วนของม้าม (spleen) ส่วนสมรรถนะของ MAO-B พบสูงที่สุดใน denervated pineal gland

#### ประโยชน์ของ monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) ในทางการแพทย์

ประโยชน์ในทางการแพทย์ที่สำคัญของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase คือการใช้เป็นยารักษาโรคซึมเศร้า เนื่องจากเมื่อมีการยับยั้งเอนไซม์ MAO โดยเฉพาะชนิด A ในระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้เกิดการสะสมของระดับ monoamine transmitter ในสมองเพิ่มขึ้น MAOI ตัวแรกที่นำมาใช้บรรเทาอาการซึมเศร้า คือ iproniazid โดยในราวปี 1957 ได้มีการค้นพบยานี้เพื่อนำมาใช้รักษาวัณโรคแต่ปรากฏว่าเมื่อใช้ยากับผู้ป่วยแล้ว ผู้ป่วยมีอาการซึมเศร้า

ลดลง จึงได้มีการนำยานี้มาใช้รักษาผู้ป่วยโรคซึมเศร้าด้วย (Pletscher, 1966) และต่อมาก็มีการพัฒนา MAOI เพิ่มขึ้นอีกหลายตัว ซึ่งสามารถแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมีได้ 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ของ hydrazine เช่น phenelzine, isocarboxazid และอนุพันธ์ของสารอื่น (non-hydrazine) เช่น tranylcypromine

ปัญหาในการใช้ยากลุ่มนี้คือถ้ารับประทานอาหารที่มีสาร amine สูง จะทำให้เกิดความดันโลหิตสูงอย่างเฉียบพลัน หรือ cheese reaction ได้ แต่เนื่องจากในลำไส้ของคนมีสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-B มากกว่า MAO-A ดังนั้นถ้ายามีความจำเพาะต่อ MAO-A มากกว่าก็น่าจะช่วยให้ผลข้างเคียงน้อยกว่ายา MAOI แบบไม่จำเพาะเจาะจง (Houslay และคณะ, 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 ยังสามารถลดการทำลายเซลล์ประสาท อันเนื่องมาจากกระบวนการ oxidation ของ dopamine และสารพิษอื่นๆ โดยการออกฤทธิ์เป็น antioxidant (Aminoff, 1995)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างซับสเตรตของเอนไซม์ monoamine oxidase จากการศึกษาในหนูขาว (Houslay และคณะ, 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 แสดงสัดส่วนสมรรถนะของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในแต่ละอวัยวะของหนูขาว (Houslay และคณะ, 1976)

organs	Species A activity (percent of total)	Species B activity (percent of total)
Liver	40	60
Liver Parenchymal Cells	50	50
Denervated 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 Gland	15	85
Denervated Pineal Gland	5	95
Vas Deferens	50	50
Denervated Vas Deferens	35	65

#### Lipid peroxidation

lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของไขมัน โดยการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งทำให้สูญเสียคุณสมบัติและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ไป (Haraguchi และคณะ, 1995) เป็นลักษณะเฉพาะแบบหนึ่งของการบาดเจ็บของเซลล์ และสามารถทำให้เกิดความผิดปกติ หรือการเกิดโรคตามมา เช่น liver necrosis, atherosclerosis, diabetes mellitus, hypertension, ischemia-reperfusion, inflammation, cystic fibrosis, cancer, Parkinson's disease และ Alzheimer's disease เป็นต้น (Brand และคณะ, 2004)

ซึ่งการเกิด lipid peroxidation นี้เป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยหลายขั้นตอน โดยเริ่มต้นปฏิกิริยาจากการเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) จากเมแทบอลิซึมของสารบางชนิดในเซลล์



เนื้อเยื่อนั้นๆ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้อย่างต่อเนื่องของไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อเป็นวงกว้าง (Buege และ Aust, 1978)

กระบวนการเกิด lipid peroxidation ประกอบด้วย (รูปที่ 18 )

1. initiation : เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเมแทบอลิซึมของสารบางชนิด ซึ่งจะไปแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุล polyunsaturated lipid ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของไขมันที่ไม่คงตัว สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีก จากการเคลื่อนที่ของพันธะคู่ภายในโมเลกุล จนทำให้เกิด lipid radical ที่เป็น conjugated diene

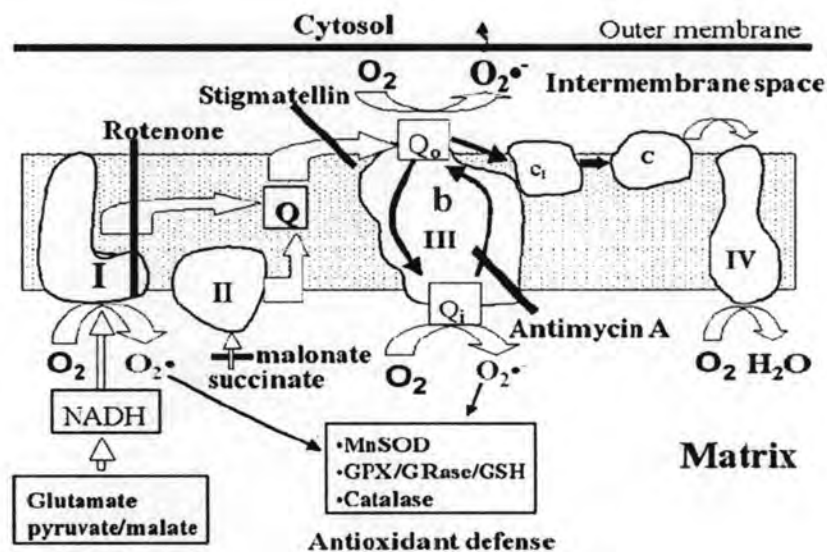
2. propagation : conjugated diene ที่เกิดขึ้นในช่วง initiation จะรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิด lipid peroxy radicals ซึ่งจะสามารถแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุล polyunsaturated lipid ที่อยู่ใกล้เคียงได้ ทำให้เกิด lipid hydroperoxide และ lipid radicals ตัวใหม่ โดยที่กระบวนการเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาได้ด้วยตัวเอง จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อเป็นวงกว้าง

3. termination : เมื่อ lipid peroxidation ขยายวงกว้างไปเรื่อยๆจนกระทั่งไม่มีโมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหลืออยู่อีก อนุมูลอิสระชนิดต่างๆก็จะทำปฏิกิริยากันเองจนกลายเป็น non-radical เป็นการหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดในกระบวนการ lipid peroxidation (Ernest และ Frank, 1982; Ernest และ Patricia, 1994) เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก มักเป็นเป้าหมายในการเกิด lipid peroxidation ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติ ไม่สามารถคงรูปร่างและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เกิดผลเสียต่อเซลล์นั้นๆโดยตรง และผลของการเกิด lipid peroxidation ยังสามารถลุกลามไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่นๆ ก่อให้เกิดอันตรายได้ต่อไป

ไมโตคอนเดรียเป็น model ที่ดีในการศึกษาการเกิด lipid peroxidation เนื่องจากในลูกลีโพรการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียนั้นมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย จึงมีโอกาสเกิด reactive oxygen species (ROS) ต่างๆขึ้นได้มาก เช่น superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) ทำให้มีโอกาสเกิด lipid peroxidation ในไมโตคอนเดรียได้มาก และการทำงานของไมโตคอนเดรียนั้นเป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยการทำงานประสานกันของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้ม จึงมีความไวต่อความผิดปกติที่จะเกิดขึ้น (Wei และคณะ, 2006) ซึ่งการเกิด lipid peroxidation จะทำให้เกิดความ

เสียหายต่อเยื่อหุ้มและทำให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียหน้าที่ และก่อให้เกิดพยาธิสภาพ เช่น aging, apoptosis เป็นต้น อีกทั้งการสร้าง ROS ในไมโทคอนเดรียนั้นจะมีมากขึ้นเมื่ออยู่ในพยาธิสภาพ เช่น hypoxia, ischemia, reperfusion, aging หรือ มีสารซึ่งยับยั้งกระบวนการหายใจ จากรูปที่ 17 แสดงบริเวณที่มีการเกิด ROS ในไมโทคอนเดรีย ทั้งจาก complex I, II และ III ซึ่ง ROS ที่เกิดจาก complex I เมื่อเข้าสู่ matrix จะถูกกำจัดได้ด้วยระบบเอนไซม์ เช่น MnSOD, catalase และ rotenone ซึ่งเป็น complex I inhibitor มีฤทธิ์ลดปริมาณการเกิด ROS จาก complex I ได้ ส่วน antimycin A ซึ่งเป็น complex III inhibitor นั้น มีฤทธิ์ทำให้ปริมาณการเกิด ROS จาก complex III เพิ่มขึ้น และส่วนมากจะไม่กลับเข้าสู่ matrix จึงไม่ถูกกำจัดด้วยระบบเอนไซม์ใน matrix (Chen และคณะ, 2003)

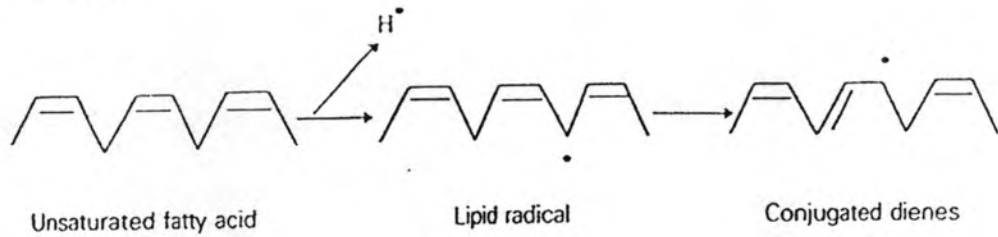
รูปที่ 17 แสดงบริเวณที่มีการเกิดสารอนุมูลอิสระในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย (Chen และคณะ, 2003)



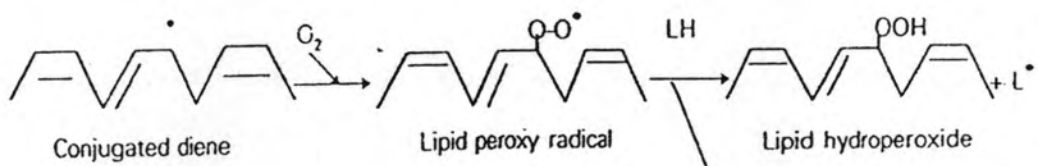
Wei และคณะ (2006) ทำการศึกษาผลของ curcumin และอนุพันธ์ ซึ่งเป็นสารกลุ่ม phenolic compound พบว่า มีฤทธิ์ antioxidant จึงสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และ ยับยั้งการเกิด protein oxidation ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ มีการศึกษาฤทธิ์ของ flavonoids ที่เกี่ยวข้องในการปกป้องเซลล์ได้โดยการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (Moini และคณะ, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Santos และคณะ (1998) ซึ่งพบว่า flavonoid สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในไมโทคอนเดรียได้

รูปที่ 18 แสดงกระบวนการเกิด lipid peroxidation (Buege และ Aust, 1978)

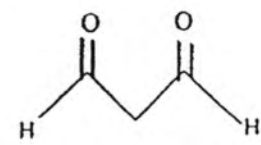
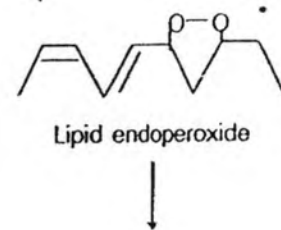
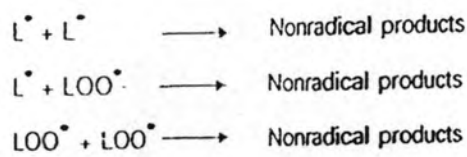
Initiation



Propagation



Termination



Malondialdehyde

หมายเหตุ : LH = unsaturated fatty acid

$L^\bullet$  = lipid radical

$LOO^\bullet$  = lipid peroxy radical