บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผล การทดลอง

จากผลการทดลองในบทที่ 3 แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ที่สกัดจากรากของต้นหนอนตายหยาก มีฤทธิ์ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ 6-deoxyclitoriacetal มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวทั้ง state 3 และ state 3U เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate ได้แก่ glutamate + malate, α-ketoglutarate, β-hydroxybutyrate (รูปที่ 22, 26, 28) แต่ในกรณีที่มี succinate เป็นสับสเตรทไม่มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3U แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I ของลูกโซ่การหายใจได้ ส่วนผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการทำงานอื่น ๆ ของไมโตคอนเดรียที่แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 7) ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม (รูปที่ 36) และไม่มีผลยับยั้ง monoamine oxidase (MAO) activity เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท (รูปที่ 38) ซึ่งสามารถนำผลการทดลองมาอภิปรายฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาของสาร ดังที่จะกล่าวต่อไปนี้

ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

1. 6-deoxyclitoriacetal ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ

จากผลการศึกษา เมื่อใช้ glutamate + malate รวมทั้ง NAD^+-linked substrate ตัวอื่น ๆ เช่น α-ketoglutarate, β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท พบว่า 6-deoxyclitoriacetal มีผลยับยั้งต่อ state 3 และ state 3U respiration ใน intact mitochondria และฤทธิ์ของสารจะเพิ่มตามขนาดสารที่เพิ่มขึ้น (Dose - dependent) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.8 μg (1.11 μM) และ 0.3 μg (0.42 μM) ตามลำดับ 6-deoxyclitoriacetal จะเริ่มออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันต่อ state 3 respiration ในขนาด 0.6 μg (0.84 μM) ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้ เมื่อสับสเตรท (NAD^+-linked substrate) ผ่าน Krebs' cycle จะมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) จากสารตัวกลางไปรีดิวซ์ NAD^+ ไปเป็น $NADH + H^+$ ถ้าใช้ saccinate เป็นสับสเตรท ไฮโดรเจนอะตอม (2H) จะรีดิวซ์

FAD ไปเป็น $FADH_2$ (Darnell, Lodish and Baltimore, 1986) ซึ่งเป็น reducing equivalent ที่สำคัญจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ ในกรณีที่ได้ NADH + H^+ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I ส่วน $FADH_2$ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex II จึงสอดคล้องกับการทดลองที่ว่า 6-deoxyclitoriacetal มีผลยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate แต่ไม่มีผลเมื่อใช้ saccinate เป็นสับสเตรท ไม่ว่าจะเพิ่มขนาดของ 6-deoxyclitoriacetal ให้มากขึ้นก็ตาม (รูปที่ 24) จึงกล่าวได้ว่า 6-deoxyclitoriacetal มีตำแหน่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนที่ complex I มากกว่า complex II หรือ complex อื่น ๆ ในลูกโซ่การหายใจ

เมื่อทดสอบใน osmotic-shocked mitochondria ซึ่งเป็นสภาวะที่ไมโตคอนเดรียอยู่ในสภาวะ uncoupling อยู่แล้ว โดยไม่ต้องเติม DNP แต่สามารถกระตุ้นให้เกิด state 3U respiration โดยใช้ NADH เป็นสับสเตรท ในสภาวะนี้ไมโตคอนเดรียจะสามารถออกซิไดซ์ NADH ที่เติมลงไปได้ (exogenous NADH) ซึ่งตามปกติแล้ว intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ NADH ที่เติมลงไปได้ นอกจากมีการทำลายผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย (Lehninger, 1951) การเตรียมไมโตคอนเดรียใน hypotonic solution ทำให้ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียมีการบวม (swelling) (De Robertis and De Robertis, 1987) จึงยอมให้ NADH ผ่านเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรียได้โดยตรง (Lehninger, 1962) และ NADH จะส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรงในลูกโซ่การหายใจ

จากผลการทดลองพบว่า 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 μg (2.79 μM) และ 5.0 μg (6.96 μM) สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์ของ NADH ได้โดยยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไป coenzyme Q โดยตรง เมื่อใช้ความเข้มข้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับการยับยั้ง NAD^+-linked substrate จึงกล่าวได้ว่า มีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนบนลูกโซ่การหายใจโดยตรงที่ complex I และจากการที่ 6-deoxyclitoriacetal สามารถยับยั้ง state 3 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ทำให้ค่า RCI และอัตราส่วน P/O ของไมโตคอนเดรียลดลง หรือแสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ลดการควบคู่ของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริเลชัน เป็นผลให้มีการสร้าง ATP ลดลง

จากการศึกษาในขั้นตอนนี้แสดงว่า 6-deoxyclitoriacetal มีคุณสมบัติเป็น antimitochondrial effect จัดอยู่ในกลุ่ม site I inhibitors

2. ผลต่อ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ ATPase activity

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถกระตุ้น ATPase activity ได้และความแรงของฤทธิ์แปรผันตามขนาดสารที่ใช้คือตั้งแต่ 0.5-20 μg (0.7-27.85 μM) รูปที่ 35 แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ 6-deoxyclitoriacetal เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP ซึ่งพบว่าอ่อนกว่า DNP มาก ซึ่ง DNP เป็น classical uncoupler สามารถกระตุ้นให้มีการออกซิไดซ์สับสเตรทได้ ทำให้มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการสูญเสีย proton gradient ทำให้เกิดการสลาย ATP(ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันทำให้มี H^+ gradient มีมากขึ้นจึงมีปริมาณ Pi เพิ่มขึ้นด้วย (Danishesky, 1980)

oligomycin ซึ่งเป็น ATPase inhibitorสามารถยับยั้งการทำงานของ F_o บริเวณ F_oF_1- ATPase ของเอนไซม์ ATP synthase ได้ โดยส่วนของ oligomycin จะไปจับกับส่วน subunit ของ F_o โดยขัดขวางการขนส่งโปรตอนของ F_o ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยา ATP synthase ได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า oligomycin สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase ของ DNP ได้ และไม่ว่าขนาดของ 6-deoxyclitoriacetal จะสูงมากเท่าใด เมื่อใช้ oligomycin ก็สามารถยับยั้งฤทธิ์การกระตุ้น ATPase activity ของ 6-deoxyclitoriacetal ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากข้อมูลดังกล่าว 6-deoxyclitoriacetal จึงมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ได้เช่นเดียวกับ DNP แต่ฤทธิ์ในการเป็น uncoupler นั้นอ่อนมากเมื่อเปรียบเทียบกับ DNP กล่าวคือ เมื่อขณะที่ 6-deoxyclitoriacetal กระตุ้น ATPase activity ทำให้มี Pi ปลดปล่อยออกมามีค่าเท่ากับ 0.3747 ± 0.012 - 0.4120 ± 0.018 μ moles/mg protein/10 min แต่อย่างไรก็ตาม ATPase activity ที่ถูกกระตุ้นแล้วก็สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย oligomycin ได้เช่นเดียวกัน

เมื่อเติม atractyloside ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรียโดยยับยั้ง adenine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด ADP ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1975) จากผลการทดลองพบว่า atractyloside สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ DNP ได้ สำหรับ 6-deoxyclitoriacetal ที่ขนาด 5 μg. (6.96 μM) atractyloside สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ได้แต่เมื่อให้ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดสูงมากที่ 20 μg. (27.85 μM) พบว่า atractyloside ไม่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติแสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ในขนาดสูงอาจจะออกฤทธิ์ขัดขวาง atractyloside ในการยับยั้ง adenine nucleotide translocator (ตารางที่ 7)

3. ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal

3.1 ผลของ rotenone

rotenone เป็นสารในกลุ่ม rotenoids สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจากเอนไซม์ใน complex I คือจาก NADH dehydrogenase ไปยัง Coenzyme Q(site I) (Danishefsky, 1980; Hatefi, 1985) ซึ่งจากการทดลองพบว่า 6-deoxyclitoriacetal และ rotenone สามารถออกฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนใน state 3 และ state 3U respiration ทำให้เพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้ง 6-deoxyclitoriacetal และ rotenone ออกฤทธิ์ที่ complex I แต่ออกฤทธิ์ตำแหน่งเดียวกัน ทำให้ไม่เกิดการแย่งกันทำปฏิกิริยาทำให้ออกฤทธิ์ร่วมกันได้มากขึ้น (ตารางที่ 5)

3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2, 7.6

ในตารางที่ 6 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลง pH ต่าง ๆ ใน incubation medium ว่าจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ซึ่งพบว่าไม่ว่าจะที่ pH ใด ๆ ก็ไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อการเพิ่มการออกฤทธิ์ หรือลดการออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3U เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate จึงกล่าวได้ว่า pH ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal

3.3 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

bovine serum albumin เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ plasma albumin เนื่องจากยาเมื่อเข้าสู่กระแสโลหิตจะจับกับ plasma proteins ซึ่งประกอบด้วย albumin และ globulin โดยส่วนใหญ่ในกระแสโลหิต plasma proteins จะเป็น albumin และยาส่วนใหญ่จะมี affinity ต่อ albumin มากกว่า globulin ส่วนที่ไม่จับจะเป็นส่วน free drug ซึ่งเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ (Gilman, Rall and Murad, 1985) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ผลของ BSA ที่ 10, 20 และ 30 mg สามารถลดฤทธิ์การยับยั้ง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรียได้ จากรูปที่ 32 จะเห็นได้ว่า BSA

ขนาด 10, 20 และ 30 mg ทำให้ฤทธิ์ยับยั้ง state 3 respiration โดย 6-deoxyclitoriacetal ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) มีค่าเป็น 24.33 ± 2.48, 38.74 ± 6.97 และ 45.84 ± 2.96 n atoms O/min/mg protein โดยฤทธิ์จะลดลงตามขนาด BSA ที่ให้เพิ่มเข้าไป จึงกล่าวได้ว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถจับกับ BSA ได้ทำให้ผลในการออกฤทธิ์ลดลง

3.4 ผลของ dithiothreitol (DTT)

กลุ่ม sulfhydryl groups มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์บางชนิด รวมทั้งการทำงานของโปรตีนที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกจากไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชันด้วย (Godinot et al.,1981; Le-quoc and Le-quoc, 1982; Robillard and Konings, 1982) ซึ่ง DTT เป็นสารที่ป้องกันการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (Cleland, 1964) การทดลองนี้เป็นการดูว่า 6-deoxyclitoriacetal ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย โดยจับกับ sulfhydryl groups (-SH) ของไมโตคอนเดรียหรือไม่ การทดลองเมื่อให้ DTT ก่อนที่จะเติม 6-deoxyclitoriacetal ขนาด 2.0 μg (2.79 μM) พบว่า 1 M DTT ไม่สามารถลดผลการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3U ได้ แสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียโดยจับกับ sulfhydryl groups (-SH) ของไมโตคอนเดรียเลย (รูปที่ 34)

4. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียม

จากการศึกษาการทำงานของไมโตคอนเดรียพบว่า นอกจากการสร้าง ATP จากกระบวนการ oxidative phosphorylation แล้วยังมีความสามารถในการสะสมแคลเซียม (Ca^{2+}) จาก medium เข้าไปเก็บสะสมไว้ในตัวเองได้เป็นจำนวนมาก และยังพบว่าไมโตคอนเดรียจะใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเลคตรอนไปในการสะสม Ca^{2+} ก่อน จนกระทั่ง Ca^{2+} เกือบทั้งหมดถูกสะสม ไมโตคอนเดรียจึงจะเริ่มใช้พลังงานในการสร้าง ATP จึงแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียมี affinity ต่อ Ca^{2+} มากกว่า ADP และแสดงให้เห็นว่าการสะสม Ca^{2+} โดยไมโตคอนเดรียเป็นขบวนการที่สำคัญมากต่อการทำงานของ cell ข้อมูลเหล่านี้จึงกล่าวได้ว่า การขนส่ง Ca^{2+} และการสร้าง ATP เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของไมโตคอนเดรียทั่วไป

ในการขนส่ง Ca^{2+} โดยไมโตคอนเดรียนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในไซโตซอล (cytosol) เป็นตัวที่ถูกควบคุม ซึ่งภายใน cell จะมีการสะสม Ca^{2+} บริเวณ endoplasmic reticulum (ER), extracellular spaces และไมโตคอนเดรีย การไหลเข้าของแคลเซียมใช้แรงขับของความต่างศักย์ระหว่างผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นประจุลบ (negative inside) ทำให้จับกับประจุบวก อัตราการไหลเข้าจะแปรผันตามความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ภายนอก ส่วนการไหลออกของ Ca^{2+} จะมีแรงขับอิสระโดยอาศัยการขนส่งอิเลคตรอนหรือเกิด proton gradient ระหว่างผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ขบวนการแลกเปลี่ยนนี้จะเกิดขึ้นด้วยความเร็วสูงสุด จากผลการทดลองในรูปที่ 37 แสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะใช้ขนาดของ 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 0.5 - 2.0 μg (0.7 - 2.79 μM) สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย Ca^{2+} โดยสามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3U respiration ได้ จึงน่าจะสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจใน complex I ได้ แสดงว่าเมื่อไม่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนทำให้ขาด proton gradient หรือพลังงานในการขนส่ง Ca^{2+} เข้าไปสะสมภายในไมโตคอนเดรียได้ (รูปที่ 37)

5. ผลของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

monoamine oxidase เป็น marker enzyme ที่ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียและทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารพวก monoamine ในการทดลองใช้ tyramine เป็น monoamine substrate และใช้ pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 6-deoxyclitoriacetal ในขนาด 2.0 - 5.0 μg (2.79 - 6.96 μM) ไม่มีผลยับยั้ง monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งทราบได้จากอัตราการใช้ออกซิเจน (รูปที่ 39)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า

1. 6-deoxyclitoriacetal มีผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนใน state 3 และ state 3U respiration เมื่อใช้ NAD^+ - linked substrate ตำแหน่งที่ถูกยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจคือ complex I หรืออยู่ในกลุ่ม site I inhibitors

2. 6-deoxyclitoriacetal สามารถกระตุ้นการทำงานของ ATPase activity ได้แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP แล้วพบว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นอ่อนกว่า DNP มาก เมื่อใช้ oligomycin สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ 6-deoxyclitoriacetal ได้ แต่เมื่อใช้ atractyloside พบว่าไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ในขนาด 20 μg (27.85 μM)

3. เมื่อกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียม (Ca^{2+}) 6-deoxyclitoriacetal สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจด้วย Ca^{2+} ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น respiratory chain inhibitor ทำให้ขาด proton gradient หรือพลังงานในการขนส่ง Ca^{2+} ไปสะสมภายในไมโตคอนเดรีย

4. การออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ state 3 และ state 3U respiration ในไมโตคอนเดรียจะลดลง เมื่อใช้ bovine serum albumin (BSA)

5. เนื่องจาก DTT ไม่มีผลยับยั้งต่อการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ฉะนั้นการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal จึงไม่เกี่ยวข้องกับการที่สารไปจับกับหมู่ sulfhydryl groups ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย

6. 6-deoxyclitoriacetal ไม่มีผลต่อการยับยั้ง monoamine oxidase (MAO) activity เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท แสดงให้เห็นว่าไม่มีผลต่อ maker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย

ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียกับคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา และ/หรือพิษวิทยาของ 6-deoxyclitoriacetal

จากข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยเกี่ยวกับ 6-deoxyclitoriacetal ที่ได้มีการทดลองเกี่ยวกับ cell จากหลอดทดลอง พบว่ามี strong cytotoxic activity ต่อ culture P-388 lymphocytic leukemia cells ซึ่งแสดงว่ามี cytotoxic effect ต่อ cell มะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด (Lin et al., 1992) แล้วยังสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากกาย อันได้แก่ กล้ามเนื้อเรียบมดลูก หลอดเลือดแดงใหญ่ และลำไส้เล็กส่วน ileum ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมภายใน cell (การะเกด สายบรรดาศักดิ์, 2540)

ส่วนข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งทำให้สามารถสนับสนุนฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้นว่า 6-deoxyclitoriacetal สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรียที่ complex I ส่งผลให้มีการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียตามมา ทั้งยังสามารถกระตุ้น ATPase activity ได้ทำให้มีการสลาย ATP มากขึ้น ทำให้ปริมาณ ATP ลดลง เกิดการขาดแคลนใน cell ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ATP มีความสำคัญและจำเป็นต่อ cell ทุกชนิดในร่างกาย เช่น การหดตัวของกล้ามเนื้อทุกชนิด และจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเพราะมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biosynthesis) การขนส่งแบบ active transport (Olson, 1982) หากขาด ATP ไปก็น่าจะเกิดผลกระทบต่อการทำงานของระบบใดระบบหนึ่งในร่างกาย จากฤทธิ์ดังกล่าวทำให้สันนิษฐานได้ว่าผลของ 6-deoxyclitoriacetal ที่ก่อให้เกิดพิษต่อ cell อาจจะเกิดจากการทำให้ cell ขาดแคลน ATP และที่สำคัญก็คือฤทธิ์ในการยับยั้งการขนส่ง Ca^{2+} เข้าสะสมภายในไมโตคอนเดรีย ทำให้ภายใน cell ไม่มีพลังงานในการทำงานตามปกติและไม่สามารถทำหน้าที่สะสม Ca^{2+} เหมือนในภาวะปกติ เนื่องจากภายใน cell มี endoplasmic reticulum (ER) และ ไมโตคอนเดรียเป็นส่วนที่สะสม Ca^{2+} ได้ หากการทำงานของไมโตคอนเดรียเสียไป จึงอาจทำให้การสะสม Ca^{2+} ภายใน cell ลดน้อยลงส่งผลให้ กระบวนการต่าง ๆ ที่ต้องการ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยาเกิดผลกระทบ จากผลการวิจัยครั้งนี้สนับสนุนผลของ 6-deoxyclitoriacetal ที่มีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากกาย เพราะฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวน่าจะมาจากการเปลี่ยนแปลงของระดับ Ca^{2+} ภายใน cell

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมบางประการเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานภายใน cell พบว่า 6-deoxyclitoriacetal ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย

แต่การออกฤทธิ์ไม่ผ่านทาง sulfhydryl groups ไม่รบกวน monoamine oxidase (MAO) activity ซึ่งเป็นข้อดีข้อหนึ่งของสารตัวนี้ เพราะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เพื่อให้มีการปรับขนาดให้เหมาะสมน่าจะมีการทดลองใน *in vivo* เพราะจากข้อมูลของการวิจัยพบว่าการเปลี่ยนแปลง pH ไม่ได้ทำให้การเปลี่ยนแปลงการออกฤทธิ์ของ 6-deoxyclitoriacetal เลย การออกฤทธิ์แต่ละส่วนของอวัยวะภายในร่างกายก็ไม่น่าแตกต่างกัน และสารสามารถจับกับโปรตีนได้ดี อาจจะมีผลต่อการจับกับ plasma albumin ทำให้มีการสะสมของสารภายในร่างกาย อาจจะเกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ ความเป็นพิษต่อ cell มะเร็งในหลอดทดลองของสารตัวนี้ จึงน่าจะนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของ 6-deoxyclitoriacetal ต่อ cell มะเร็งแล้วย่อมเป็นพิษต่อ cell ตามปกติด้วย และขนาดที่มีพิษต่อไมโตคอนเดรียนั้นใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงกล่าวได้ว่าสารตัวนี้อาจมีฤทธิ์ต่อ cell ร่างกายที่ค่อนข้างจะแรง การพัฒนา 6-deoxyclitoriacetal ไปเป็นยาหรือนำมาใช้ในทางคลินิก ย่อมต้องการข้อมูลอีกมากมายโดยเฉพาะการทดลอง *in vivo* เพื่อดูผลต่อกลไกของส่วนอื่น ๆ ของ cell ภายในร่างกาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย