บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

CU-763-10-01 เป็นอนุพันธ์ของ valproic acid ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ โดย ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช และ นาย เฉลิมเกียรติ สงคราม การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยายังมีอยู่น้อยมาก เช่น ฤทธิ์ต้านชักในหนูถีบจักร (มยุรี ตันติสิระ และ ทิพย์สุชน ชุนงาม, 2538) (บทที่ 1) ในการวิจัยครั้งนี้ จึงมีความสนใจในการศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว จากผลการทดลองพบว่า สาร CU-763-10-01 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3u เมื่อใช้ NAD^+-linked substrate ในการทดลองนี้คือ glutamate + malate, α-ketoglutarate และ β-hydroxybutyrate แต่ในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท ผลในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3u มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งเป็นผลจากการที่ใช้สารในขนาดที่สูงๆ จากการศึกษานี้แสดงว่า CU-763-10-01 เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I ของลูกโซ่การหายใจ โดยขนาดของสารที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย (dose-dependent) CU-763-10-01 ไม่มีผลต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ในขณะที่มีผลยับยั้ง monoamine oxidase (MAO) activity จากการศึกษาครั้งนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือพิษวิทยาของสาร ซึ่งจะได้อภิปรายดังต่อไปนี้

1. ผลของ CU-763-10-01 ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ของไมโตคอนเดรีย

จากการศึกษาใน intact mitochondria พบว่า CU-763-10-01 เป็นสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) หรือ มีผลยับยั้งที่เอนไซม์ complex I ซึ่งมีข้อสนับสนุนดังต่อไปนี้

1.1 CU-763-10-01 สามารถยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate รวมทั้ง NAD^+-linked substrate อื่นๆ (รูปที่ 22, 23, 26, 27, 28, 29) ในที่นี้คือ α-ketoglutarate และ β-hydroxybutyrate เป็นสับสเตรท สับสเตรทดังกล่าวเมื่อผ่าน Kreb's cycle จะปลดปล่อย ไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น NADH + H^+ ซึ่งเป็น reducing equivalent จะให้อิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I (Lehninger, 1975) โดยพบว่าการยับยั้งเป็นแบบ dose-dependent ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4 μg (6.60 μM)

1.2 เมื่อใช้ succinate ซึ่งเป็น FAD-linked substrate จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (2H) ไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนแล้วเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1975) จากนั้นอิเลคตรอนส่งผ่านไปยัง cytochrome *b* และ cytochrome *c* (site II) พบว่า CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3u น้อยมาก (รูปที่ 24, 25)

1.3 เมื่อเตรียมไมโตคอนเดรียใน hypotonic solution จะทำให้ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียมีการบวม (swelling) (De Robertis and De Robertis, 1987) นั่นหมายถึงไมโตคอนเดรียจะยอมให้ NADH ผ่านเข้าสู่ภายในได้โดยตรง ซึ่งปกติแล้ว intact mitochondria จะไม่สามารถออกซิไดซ์ NADH ได้ นอกจากจะมีการทำลายของผนังเยื่อหุ้มของไมโตคอนเดรีย (Lehninger, 1951)

จากการทดลอง เมื่อใช้สับสเตรทเป็น NADH จากภายนอก (exogenous NADH) osmotic-shocked mitochondria จะออกซิไดซ์ NADH ได้ ซึ่งทำให้มีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่ง CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการออกซิไดซ์ ของ NADH (รูปที่ 30 และ ตารางที่ 3) เนื่องจาก NADH จะส่งผ่านอิเลคตรอนไปสู่ coenzyme Q โดยตรง ผลการทดลองดังกล่าวก็เป็นการสนับสนุนว่า CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการถ่ายทอดอิเลคตรอนบนลูกโซ่การหายใจโดยตรง

2. ผลของ CU-763-10-01 ต่อ ATPase activity

จากการศึกษาพบว่า CU-763-10-01 ไม่มีผลต่อ ATPase activity ทั้งในสภาวะที่ไม่เติม DNP และ ในสภาวะที่เติม DNP ในปฏิกิริยา ซึ่ง DNP เป็น uncoupler ทำให้สูญเสีย proton gradient

จึงเกิดการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้เกิด H^+ gradient และทำให้มีปริมาณ Pi เพิ่มขึ้นด้วย (Danishefsky, 1980) แต่เมื่อเติม oligomycin ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้ง F_0 ของเอนไซม์ ATP synthase จึงมีผลยับยั้ง ATPase activity ด้วย (Senior, 1973) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า CU-763-10-01 ไม่ออกฤทธิ์กระตุ้น ATPase activity และ ไม่มีคุณสมบัติยับยั้ง ATPase activity ที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP (ตารางที่ 6)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

3.1 ผลของ rotenone

rotenone เป็นสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) (Danishefsky, 1980, Hatefi, 1985) จากการทดลองพบว่า rotenone และ CU-763-10-01 ออกฤทธิ์ร่วมกันทำให้การยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนทั้งใน state 3 และ state 3u respiration เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นไปได้ว่า CU-763-10-01 มีตำแหน่งการออกฤทธิ์ตำแหน่งเดียวกับ rotenone (ตารางที่ 4)

3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ใน incubation medium ที่ pH 6.8, 7.2 และ 7.6

จากตารางที่ 5 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ใน incubation medium ให้มีความเป็นกรดหรือด่างมากขึ้น คือมีค่า pH เท่ากับ 6.8 และ 7.6 ตามลำดับ พบว่า CU-763-10-01 จะมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u มากกว่าในสภาวะที่ pH ของ incubation medium มีค่าเท่ากับ 7.2 หรือในสภาวะที่เป็นกลาง แต่อย่างไรก็ตาม สาร CU-763-10-01 เมื่ออยู่ใน incubation medium ที่มีสภาวะเป็นกรด คือ มีค่า pH เท่ากับ 6.8 นั้น จะออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียได้มากที่สุดทั้งใน state 3 และ state 3u

3.3 ผลของ bovine serum albumin (BSA)

bovine serum albumin เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ใช้เป็นตัวแทนของ plasma albumin เมื่อยาเข้าสู่กระแสโลหิต ส่วนหนึ่งจะจับกับ plasma proteins ซึ่งประกอบด้วย albumin และ globulin โดยในกระแสโลหิต plasma protein ส่วนใหญ่จะเป็น albumin และยาส่วนใหญ่จะมี affinity ต่อ albumin มากกว่า globulin ส่วนที่เหลือจะเป็น free drug ซึ่งเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ (Gilman, Rall and Murad, 1985) จากการทดลองพบว่า BSA ขนาด 5 mg ก็สามารถลดฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 respiration ได้ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งเมื่อเพิ่มขนาดของ BSA เป็น 10 และ 20 mg ก็จะสามารถลดฤทธิ์ของสารได้เพิ่มขึ้นเป็น 18 และ 26 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตามรูปที่ 31) จึงเป็นไปได้ว่า CU-763-10-01 มีการจับกับ bovine serum albumin ทำให้ free form ของสารลดลง จึงทำให้สารผ่านเข้าสู่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้น้อยลงด้วย

3.4 ผลของ dithiothreitol (DTT)

sulfhydryl groups (-SH) เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญ ต่อการควบคุมการทำงานของ เอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น ATP synthase , ระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการขนส่งอิเลคตรอน รวมทั้งการทำงานของโปรตีนที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้าออกจากไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการควบคู่กันของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสโฟริเลชั่นด้วย (Godinot et al., 1981; Le-quoc and Le-quoc, 1982; Robillard and Konings, 1982) DTT เป็นสารที่ป้องกันการออกซิเดชันของ sulfhydryl groups (Cleland, 1964) จากผลการทดลอง (รูปที่ 32, 33) พบว่า เมื่อให้ 1.04 mM DTT ก่อน CU-763-10-01 ขนาด 5, 25 และ 50 μg DTT ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้ง state 3 และ state 3u ดังนั้นการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียของ CU-763-10-01 ไม่ได้เป็นผลจากการที่สารไปจับกับ sulfhydryl group ของไมโตคอนเดรีย

4. ผลของ CU-763-10-01 ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

แคลเซียมจำนวนมากสามารถผ่านผนังชั้นนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย โดยเมื่อแคลเซียมที่อยู่ภายนอกไมโตคอนเดรีย มีปริมาณมากขึ้น จะเกิด electrochemical gradient นั่นคือจะเกิดการแพรของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ซึ่งการแพรของแคลเซียมเป็นแบบ facilitated diffusion หรือ facilitated transport คือ ขบวนการขนส่งผ่านเข้าออกผนังเยื่อหุ้มโดยต้องอาศัย specific protein carrier (Gunter and Pfeiffer, 1990) ส่วนการที่แคลเซียมอิออนจะผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้นั้นต้องอาศัย negative membrane potential คือ ในสภาวะที่เกิดความต่างศักย์ภายใน matrix ซึ่งจะมีค่าเป็นลบเมื่อเทียบกับภายนอก (intermembrane space) ซึ่ง membrane potential เกิดจากการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (electron transport chain) หรือจากการสลายตัวของ ATP (Carafoli, 1987) ดังนั้นสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain inhibitor) เช่น rotenone, antimycin หรือ cyanide และสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase หรือ ATPase เช่น oligomycin ก็จะมีผลยับยั้งการสร้าง membrane potential ได้เช่นกัน จึงไม่สามารถเกิดการขนส่งแคลเซียมผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้ จากผลการทดลอง (รูปที่ 34) CU-763-10-01 ในขนาด 5, 25และ 50 μg จะยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วยแคลเซียม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ากลไกที่ไปยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจที่ site I หรือ complex I และจึงมีผลทำให้ยับยั้งการขนส่งแคลเซียมเข้าไปสะสมในไมโตคอนเดรียด้วย

5. ผลของ CU-763-10-01 ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

monoamine oxidase เป็น maker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย (Avers, 1986) และเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ เมตาบอลิสมของ sympathomimetic amines เช่น norepinephrine และ epinephrine (Katzung, 1995) รวมทั้ง transmitter amines อื่นๆ เช่น serotonin, dopamine เป็นต้น เอนไซม์ monoamine oxidase มี 2 ชนิด คือ MAO A และ MAO-B แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงในการออกซิไดซ์สาร monoamine แตกต่างกันไป ในการทดลองนี้ใช้ tyramine เป็นสับสเตรท ซึ่งเป็น non-specific substrate pargyline ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้ง monoamine activity โดยเป็น non-specific inhibitor (Rang, Dale and Ritter, 1995)

เป็นตัวเปรียบเทียบการประเมินผลของ CU-763-10-01 ต่อเอนไซม์ MAO ตามผลการทดลอง (รูปที่ 35 และ ตารางที่ 7) พบว่า CU-763-10-01 ในขนาด 50 μg (8.24 μM) และ pargyline ที่ความเข้มข้น 0.05 mM จะสามารถยับยั้ง MAO ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ tyramine เป็นสับสเตรทได้อย่างสมบูรณ์ และเนื่องจากยาในกลุ่ม monoamine oxidase inhibitors นำมาใช้รักษา โรคจิตซึมเศร้า (antidepressant) , โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เป็นต้น (Rang et al., 1995) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้ง MAO ของ CU-763-10-01

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า

1. CU-763-10-01 ที่มีผลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กล่าวคือ CU-763-10-01 มีผลทำให้ไมโตคอนเดรียไม่สามารถสังเคราะห์พลังงานในรูป ATP (ATP synthesis) ได้ เนื่องจากจะไปยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้ง state 3 และ state 3u โดยการยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ complex I ในลูกโซ่การหายใจ แต่ไม่มีผลอย่างใดต่อการทำงานของ เอนไซม์ ATPase

2. CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วยแคลเซียม เนื่องจาก CU-763-10-01 มีคุณสมบัติเป็น respiratory chain inhibitor จึงทำให้ขาด membrane potential ภายในไมโตคอนเดรียจึงมีผลยับยั้งการสะสมของแคลเซียมภายในไมโตคอนเดรีย

3. CU-763-10-01 สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียทั้งใน state 3 และ state 3u ได้มากที่สุด เมื่ออยู่ใน incubation medium ที่มีสภาวะเป็นกรด

4. albumin ทำให้การออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ลดลง ในขณะที่ DTT ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของCU-763-10-01 ซึ่งหมายความว่าการออกฤทธิ์ของสารไม่เกี่ยวข้องกับการที่สารไปจับกับ sulfhydryl group

5. CU-763-10-01 มีความสามารถยับยั้ง monoamine oxidase activty (MAOI) เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท (non-specific substrate) จึงไม่สามารถบอกได้ว่า CU-763-10-01 เป็น specific หรือ non-specific inhibitor

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้นซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และ/หรือ พิษวิทยาของสารก็เป็นได้ ดังนั้นการที่จะพัฒนา CU-763-10-01 ให้เป็นยาต่อไปในอนาคตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการยับยั้ง MAO นั้นจำเป็นต้องศึกษาวิจัยในรายละเอียดอื่นๆ ต่อไป