

นิพนธ์ปริทรรศน์

สารอนุมูลอิสระกลุ่มที่ออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์และการทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นสื่อสำคัญที่ทำให้เข้าใจเคมีระดับเซลล์และมีความสำคัญในการรักษามะเร็ง

สำริ มัชชศกรณ์*

บทคัดย่อ

สารอนุมูลอิสระเป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการทางธรรมชาติมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพิษในระดับเซลล์ และเป็นสาเหตุพื้นฐานของการเกิดภาวะเครียดของเซลล์โดยส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสถานะเชิงพลังงานของไมโทคอนเดรียและเซลล์ซึ่งได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย สารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลาง (ROS) ออกฤทธิ์โดยกระตุ้นการเปิดรูของผนังเมมเบรนไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial permeability transition pores) และชักนำสภาวะเครียดจากการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจัดเป็นปรากฏการณ์ในระยะเริ่มต้นของการเกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ผลงานวิจัยที่ทำโดยกลุ่มวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ ได้เสนอข้อมูลพื้นฐานที่ทำให้เข้าใจเป้าหมายใหม่เพื่อที่จะสามารถใช้ประโยชน์ของเคมีระดับเซลล์โดยพบว่าแหล่งกำเนิดเอทีพี เช่นไมโทคอนเดรียสามารถใช้เป็นเป้าหมายจำเพาะสำหรับการออกฤทธิ์ของยาเพื่อการรักษามะเร็งที่มีการดื้อยาแบบหลายขนาน (MDR phenomenon) วารสารเทคนิคการแพทย์ 2550; 40: 11-30.

คำหัต: สารอนุมูลอิสระ สถานะเชิงพลังงานของไมโทคอนเดรีย สถานะเชิงพลังงานของเซลล์ การดื้อยาแบบหลายขนาน

* หน่วยวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล, ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศในการสร้างภาพระดับโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Contribution of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial function to an understanding of cellular chemistry and implication in cancer treatment

Samlee Mankhetkorn*

Abstract

Free radicals are important intermediates in natural processes involved in cytotoxicity and their principle causes of cellular oxidative stress which results in impaired energetic state of mitochondria and cells mediated cytotoxicity is a rapidly evolving field. The intracellular reactive oxygen species (ROS) activated the mitochondrial permeability transition pores (MPT) and mitochondrial oxidative stress is an early event in apoptosis. The origin of ATP generator such as mitochondria can be used as a specific target of drugs for overcoming MDR phenomenon. Current work in this area at the Physical chemistry, Molecular and Cellular Biology Laboratory (PCMCB) is providing fundamental information for our understanding of new targets for exploitation of cellular chemistry. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2007; 40: 11-36.

Key words: Free radical, Mitochondrial energetic state, Cellular energetic state, Multidrug resistance

Laboratory of Physical Chemistry, Molecular and Cellular Biology (PCMCB), Center of Excellence for Molecular Imaging (CEMI), Department of Radiologic technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University 50200 Thailand

บทนำ

สารอนุมูลอิสระเป็นตัวกลางสำคัญที่ถูกสร้างขึ้นโดยธรรมชาติในร่างกายจากขบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ รวมถึงมักจะเป็นตัวกลางสำคัญของขบวนการย่อยสลายยา ซึ่งได้รับการสนใจศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง เมื่อ 10 ปีก่อนได้มีการศึกษาจำนวนมากที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารอนุมูลอิสระได้เข้าไปมีบทบาทอย่างมากในทางชีววิทยา เช่น พบว่าสภาวะแก่ (Aging) ของเซลล์และโรคหลายๆ ชนิดมีความเกี่ยวข้องกับสารอนุมูลอิสระ จะอย่างไรก็ตามแม้ว่าสารอนุมูลอิสระมักจะถูกมองว่าทำให้เกิดโทษต่อร่างกาย แต่สารอนุมูลอิสระบางสภาวะก็เป็นประโยชน์ต่อ

ร่างกาย เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) และซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งมีประโยชน์ในการควบคุมความดันโลหิตและทำลายแบคทีเรีย

สารอนุมูลอิสระและสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลาง

สารอนุมูลอิสระหมายถึงอะตอมหรือกลุ่มอะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวหรือ มีคู่อิเล็กตรอนโดดเดี่ยวที่สามารถอยู่อย่างอิสระได้ เช่น โมเลกุลออกซิเจนที่อยู่สถานะพลังงานพื้นฐาน (Ground state) มีอิเล็กตรอนเดี่ยว 2 คู่ โดยแต่ละคู่อยู่ในระดับพลังงานชั้นแอนติบอนดิง (Antibonding orbital) ที่

ต่างกันทำให้โมเลกุลออกซิเจนทำตัวเป็นสารที่รับอิเล็กตรอนที่มีประสิทธิภาพ หรืออีกนัยหนึ่งโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวดูดกลืนอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่ถูกออกซิไดซ์ได้ดี ส่วนสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลาง (Reactive oxygen species (ROS)) จะหมายถึงทั้งสารที่เป็นอนุมูลอิสระและโมเลกุลที่ไม่เป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น โมเลกุลซิงเกิร์ตออกซิเจน (Singlet oxygen) หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide (H_2O_2)) ซึ่งเกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดที่เกิดจากการใช้ออกซิเจน (Oxidative stress)

นอกจากนี้โมเลกุลออกซิเจนเองยังเป็นตัวออกซิไดซ์ที่พบบ่อยที่สุดและมักเป็นโมเลกุลสุดท้ายที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนในกระบวนการทางชีวเคมี โดยเมื่อออกซิเจนได้รับอิเล็กตรอน 1 หน่วยจากสารตั้งต้นหนึ่งๆ จะทำให้ได้สารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) เกิดขึ้น ซึ่งสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์นี้ถูกสร้างขึ้นในร่างกายของเราตลอดเวลา และจากการประมาณพบว่ามีมากกว่า 2 % ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในกระบวนการหายใจโดยไมโทคอนเดรียจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์คือสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ถึงแม้ว่าอาจดูเหมือนมีปริมาณน้อยในเนื้อเยื่อที่ปกติสมบูรณ์แต่ในบางสภาวะจะมีผลเชิงชีววิทยาที่สำคัญ สารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เองมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าเมื่อเทียบกับสารอนุมูลอิสระอื่นๆ ซึ่งจะเกิดการชนกันเองทันทีที่ถูกสร้างขึ้นเรียกว่า Diffusion-controlled

เคมีของสารอนุมูลอิสระ

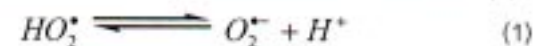
เคมีภายใต้รังสีเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและมีความหลากหลาย มีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์เพื่อศึกษาการได้รับหรือสูญเสียอิเล็กตรอนของสารอนุมูลอิสระที่มีครึ่งอายุสั้น (Short half life) ซึ่งไม่สามารถศึกษาได้จากวิธีการศึกษาด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี

Radiolysis เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงใช้สำหรับผลิตสารอนุมูลอิสระต่างๆ การฉายรังสีน้ำ

บริสุทธิ์สามารถผลิตสารอนุมูลอิสระในอัตราที่สามารถควบคุมได้ โดยการเลือกใช้แหล่งกำเนิดรังสีที่เหมาะสม และที่สำคัญคือสามารถเลือกชนิดของสารอนุมูลอิสระให้ตรงกับสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายได้ โดยการเติมสารซึ่งเป็นตัวถูกละลายที่เหมาะสม โดยสรุปเทคนิค Radiolysis มีความสำคัญโดยจะทำให้เข้าใจปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะในสภาวะแวดล้อมของเซลล์และร่างกาย

จลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารอนุมูลอิสระสามารถควบคุมได้จากปฏิกิริยาแบบแข่งขัน (Competitive reaction pathway) โดยเฉพาะโปรตอนมีอิทธิพลต่อสมดุลของระบบและต่อจลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญในทางชีววิทยา เช่น สารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

สารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์จัดเป็นโมเลกุลที่เกิดจากการแตกตัวของกรดอ่อนไฮโดรเปอร์ออกซิล ($HO_2^{\cdot}$) เช่นเดียวกับการคล้อยทั่วๆ ไป ไฮโดรเปอร์ออกซิลสามารถแตกตัวในน้ำดังสมการที่ (1)



ดังนั้นเมื่อสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นในน้ำโดยการเติมหนึ่งอิเล็กตรอน จะพบว่าสภาวะสมดุลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตามปฏิกิริยา (1) และความเข้มข้นของโปรตอนในสารละลายเพิ่มขึ้นหรือค่าความเป็นกรดของสารละลายเพิ่มขึ้น สัดส่วนของความเข้มข้นของไฮโดรเปอร์ออกซิลต่อซูเปอร์ออกไซด์จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย และค่าคงที่ของปฏิกิริยาที่จุดสมดุล (K) ของปฏิกิริยาที่ (1) แสดงดังสมการ

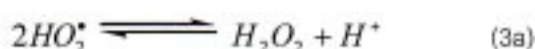
$$K = \frac{[O_2^{\cdot-}][H^+]}{[HO_2^{\cdot}]}$$

ค่าสัดส่วนของความเข้มข้นของ ไฮโดรเปอร์ออกซิลต่อซูเปอร์ออกไซด์มีค่าเท่ากับ $K/[H^+]$ จะเห็นได้ว่าในสารละลายที่มีค่า pH ต่ำมากๆ โอกาสที่จะพบสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์จะต่ำ ความเข้มข้นของ

ไฮโดรเปอร์ออกไซด์จะเท่ากับซูเปอร์ออกไซด์เมื่อ pH มีค่าเท่ากับ pK ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.8 นั่นหมายถึงที่ pH ของสารละลายใกล้เคียงกับ 5 ค่าความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระในรูปไฮโดรเปอร์ออกไซด์มีค่าเท่ากับ ซูเปอร์ออกไซด์และในสภาวะที่ค่า pH ของสารละลายเท่ากับสารละลายในร่างกายคือใกล้เคียงกับ 7 จะพบว่ามีเพียง 1% ของสารอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปไฮโดรเปอร์ออกไซด์ การที่พบว่าสารอนุมูลอิสระอยู่ในรูปไฮโดรเปอร์ออกไซด์หรือซูเปอร์ออกไซด์นั้นส่งผลต่อชีววิทยาแตกต่างกัน ประการแรกคือประจุบนซูเปอร์ออกไซด์จะทำให้สารอนุมูลอิสระนี้ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้และประการที่สอง สมดุลปฏิกิริยาเคมี (1) ทำหน้าที่ควบคุมอายุของสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีสารอื่นๆ หรือเอนไซม์เข้าไปเกี่ยวข้อง สารอนุมูลอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยากันเองได้ (มีโอกาสน้อย) เพื่อที่จะทำให้โมเลกุลหรืออะตอมมีแนวโน้มที่มีอิเล็กตรอนคู่ เช่น ปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เองดังต่อไปนี้



และเนื่องจากซูเปอร์ออกไซด์อยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาดังปฏิกิริยาเคมี (1) ซึ่งปฏิกิริยาเคมี (2) นี้เกิดจากปฏิกิริยาเคมีย่อยหรือมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



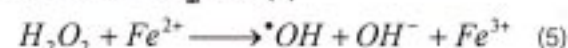
จะเห็นว่าซูเปอร์ออกไซด์มีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน การวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมี หรือ "จอนคาสต์รเคมี" ของปฏิกิริยาที่เป็นคู่แข่ง จะทำให้สามารถทำนายถึงการสลายตัวของซูเปอร์ออกไซด์ได้ เช่น การวัด

ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (3)

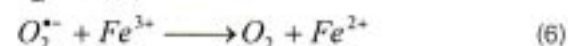
ในปฏิกิริยาชีวเคมีเกือบทั้งหมด ซูเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้น จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างต่อเนื่องโดยมีซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) เป็นตัวเร่งดังปฏิกิริยา (4)



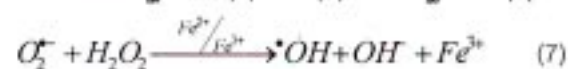
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนที่มีประสิทธิภาพต่ำ แต่สามารถผ่านผนังเมมเบรนและรับอิเล็กตรอนจากธาตุทรานซิชัน เช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^+/Cu^{2+} เป็นต้น และสลายพันธะเคมีเกิดสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($\cdot OH$) ณ จุดต่าง ๆ ภายในเซลล์ดังปฏิกิริยา (5)



ซูเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Fe^{3+} ดังปฏิกิริยา (6)



ผลรวมของปฏิกิริยา (5) และ (6) จะได้ปฏิกิริยา (7)

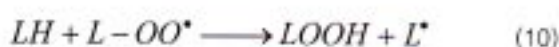
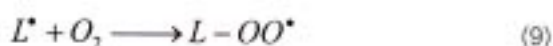
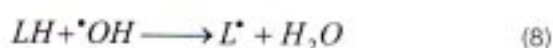


ดังนั้นในสภาวะที่มีธาตุทรานซิชัน จึงปรากฏสารอนุมูลอิสระเพียงชนิดเดียวภายในเซลล์

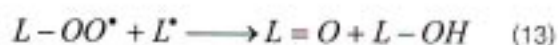
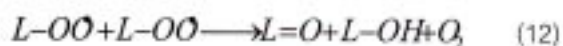
สถานะเครียดของเซลล์ที่มีชีวิต

คุณลักษณะเฉพาะของสารอนุมูลอิสระทั่วไปคือความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในอัตราเร็วสูงมากอันเนื่องมาจากโมเลกุลหรืออะตอมมีแนวโน้มที่ลดพลังงานภายในลงและเสถียรโดยการทำให้เกิดอิเล็กตรอนคู่ ดังนั้นภายใต้บางสภาวะสารอนุมูลอิสระสามารถดึงอิเล็กตรอนมาจากสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิกและไขมัน โดยเฉพาะไขมันเป็นส่วนประกอบสำคัญของเมมเบรนของเซลล์จะถูกดึงอิเล็กตรอนได้ง่ายมาก ผลจากการที่อิเล็กตรอนหายไป

จากโมเลกุลไขมัน ทำให้เกิดจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาสุกไหม้ที่เกี่ยวข้องกับเกิดออกซิเดชันโดยได้สารกลุ่มเปอร์ออกไซด์เป็นสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เรียกว่าไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) โดยเริ่มต้นจากอะตอมไฮโดรเจนถูกดึงออกจากไขมันภายใต้อิทธิพลของสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระอัลคิล (Alkyl radical (L^*)) ดังปฏิกิริยา (8) สารอนุมูลอิสระไลปิดเปอร์ออกไซด์ ($L-OO^*$) ถูกสร้างขึ้นดังแสดงในปฏิกิริยา (9) และสารอนุมูลอิสระนี้สามารถดึงอะตอมไฮโดรเจนจากไขมันโมเลกุลอื่นเกิดเป็นไลปิดเปอร์ออกไซด์ ดังปฏิกิริยา (10) สารอนุมูลอิสระไลปิดเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับไลปิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรนและโปรตีนภายในไซโทพลาสม



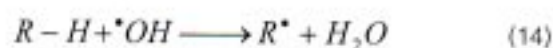
การเกิดปฏิกิริยา (8) และ (9) ข้างๆ หลายนรอบจะสอดคล้องกับระยะ เพิ่มความแรงของปฏิกิริยา (Propagation stage) ซึ่งจบลงด้วยการเกิดปฏิกิริยากันเองระหว่างสารอนุมูลอิสระให้สารผลิตภัณฑ์ที่เสถียร ซึ่งไม่ใช่สารอนุมูลอิสระอีกต่อไป เรียกระยะนี้ว่าระยะสิ้นสุด (Termination stage) ดังแสดงในปฏิกิริยา (11), (12) และ (13):



การเกิดเปอร์ออกซิเดชันของโมเลกุลไขมันของเมมเบรนเพิ่มขึ้น นำมาซึ่งการเกิดเติมหมู่เปอร์ออกซิติก คาร์บอนิล และไฮดรอกซิลในโมเลกุลไขมัน

ทำให้ค่าการละลายในไขมันลดลงหรือละลายในน้ำได้ดีขึ้น นำมาซึ่งการเกิดพิษของสารพวกอัลดีไฮด์ (Aldehydes) และไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbons)

ไม่เพียงแต่ไขมันเท่านั้น โปรตีนและกรดนิวคลีอิกยังสามารถเกิดเปอร์ออกซิเดชันได้ แต่กระบวนการเกิดเปอร์ออกซิเดชันไม่เป็นแบบสุกไหม้โดยทั่วไปโมเลกุลของโปรตีนไม่ได้มีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนได้ง่ายๆ แต่จะเกิดได้ง่ายในสภาวะที่มี Ascorbate หรือ Glutathione ทำให้สารออกซิแดนท์รวมภายในเซลล์ลดลงดังแสดงในปฏิกิริยา (14) และ (15)



สารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางถูกสร้างอย่างต่อเนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจน แต่จากนั้นชั่วคราวก็ถูกทำให้เสถียรโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารต้านอนุมูลอิสระเรียกว่า ROS scavengers ในทางสรีรวิทยาระดับของสารอนุมูลอิสระจะถูกควบคุมให้มีระดับคงที่อย่างเข้มงวด สัญญาณอันตรายเช่นการหักงอที่ผิดปกติหรือการเกิดโรคของเซลล์จะปรากฏขึ้นเมื่อระบบสมดุลระหว่างการสร้างและระบบการต้านสารอนุมูลอิสระเสียไป เซลล์หรือร่างกายมีกลไกในการควบคุมผลเชิงลบที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารอนุมูลอิสระ 2 ทางกลไกแรกคือการใช้เอนไซม์ (สำคัญที่สุด) เช่น Catalase glutathione peroxidase และ superoxide dismutase (SOD) ทำให้มีการป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยา Fenton reaction กลไกที่สองไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์แต่ใช้สารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ เช่น ascorbic acid α -tocopherol β -carotene uric acid และ thiol compounds เช่น glutathione และ lipoic acid

การวัดระดับของสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางในเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิคที่ไม่ทำลายสเปกโตรฟลูออโรมิตรีโดยใช้ 2,7-dichlorofluorescein diacetate

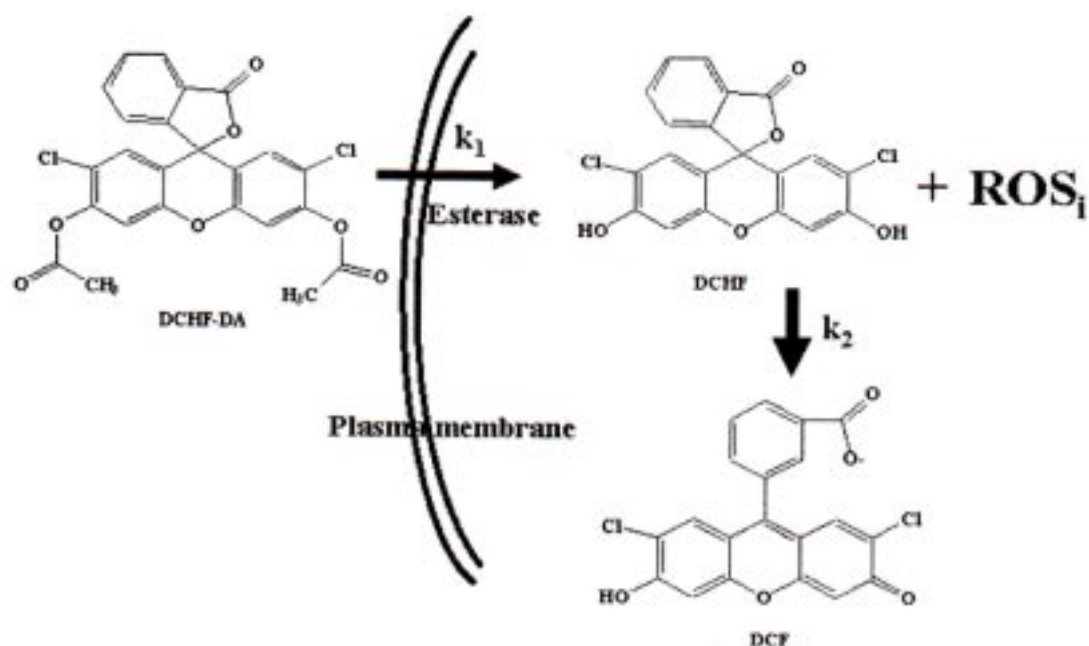
เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทที่หลากหลายของสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลาง ในระบบชีววิทยา กลุ่มวิจัยเคมีฟิสิกส์และชีววิทยา ระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ได้ทำการศึกษาผลของสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมและแหล่งกำเนิดจากภายนอกในเซลล์ชนิดต่างๆ โดยใช้ 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวสามารถแพร่ผ่านเมมเบรนของเซลล์และมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลาง จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นโมเลกุลติดตามเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ โดยใช้เทคนิคสเปกโตรฟลูออโรมิตรีเพื่อวัดระดับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

โมเลกุล DCHF-DA จะออกซิไดซ์และได้สารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็น Dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงได้ จึงทำให้สามารถติดตามการเกิดออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง โดยวัดค่าความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของโมเลกุล DCF ที่เวลาต่างๆ โดยใช้เครื่องวัดแถบการเรืองแสงหรือสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ตำแหน่งของโมเลกุล DCF ที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงภายในและภายนอกเซลล์สามารถแยกได้โดยการเติม 20 mM Co^{2+} ซึ่งเป็นสารที่สามารถวัดความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงเฉพาะภายนอกเซลล์ (Extracellular DCF fluorescence quencher) และทำการวัดข้อมูลความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงที่เป็นฟังก์ชันเวลากับจลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยา ซึ่งสามารถแบ่งเป็นสองปฏิกิริยาคือ (n)

การตัดหมู่อะซิเตต ของ DCHF-DA โดยเอนไซม์เอสเตอเรสซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาแบบ pseudo-first-order rate constant โดยมีค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา k_0 ทำให้ได้โมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ 2',7'-dichlorofluorescein (DCHF) และ (ข) การเกิดออกซิเดชันของ DCHF โดยสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาแบบ second-order rate constant โดยมีค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา k_2 ดังแสดงในรูปที่ 1 สรุปโดยย่อ: โมเลกุล DCHF-DA เกิดออกซิเดชันและได้สารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็น DCF ซึ่งสามารถติดตามได้อย่างต่อเนื่องโดยวัดค่าความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของโมเลกุล DCF ที่เวลาต่างๆ โดยใช้เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ในสภาวะที่มีเซลล์และ 20 mM Co^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 2a ความเข้มของ DCF ที่เป็นฟังก์ชันกับเวลาสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1) และปัจจัยเชิงจลนศาสตร์ k_0 และ $k_2[\text{ROS}]$ สามารถหาได้ด้วยการวัดข้อมูลจากการทดลองด้วยสมการที่ (1)

จากการวัดข้อมูลจากสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ด้วยสมการที่ (1) ปัจจัยเชิงจลนศาสตร์ k_0 และ $k_2[\text{ROS}]$ สามารถหาได้สำหรับเซลล์ที่ไวต่อยา (K562 และ GLC4) และเซลล์ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (K562/adr และ GLC4/adr) ดังข้อมูลที่เป็นแบบจำเพาะแสดงในรูปที่ 2a

จากการศึกษาพบว่า H_2O_2 และเปอร์ออกซิเดสเป็นสารหลักที่ทำให้เกิดการใช้ DCHF ภายในเซลล์ที่มีชีวิตโดยสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์จึงสามารถวัดได้โดยใช้ค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา k_2 (Second-order of reaction) ซึ่งถูกศึกษาโดยกลุ่มวิจัยเองสำหรับปฏิกิริยาระหว่าง DCHF กับ H_2O_2 ในสภาวะที่มี horseradish peroxidase ($k_2 = 790 \pm 62 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ขบวนการเกิดออกซิเดชันของ 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) ภายในเซลล์

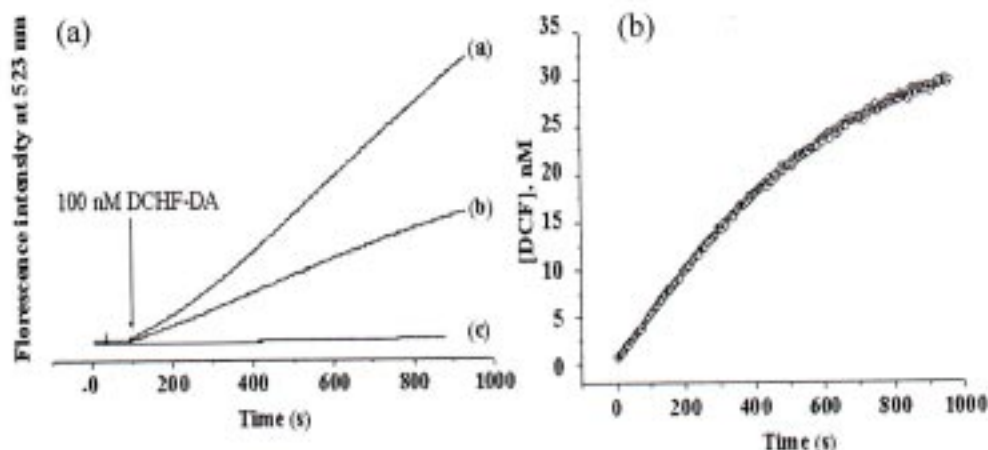
$$[DCF] = \frac{[DCHF - DA]_0}{k_2 [ROS_i] - k_e} \left(k_2 [ROS_i] (1 - e^{-k_e t}) - k_e (1 - e^{-k_2 [ROS_i] t}) \right) \quad (1)$$

ค่าเฉลี่ยของระดับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดที่ทำการศึกษามีค่าเท่ากับ 0.67 ± 0.16 nM ต่อเซลล์ มีข้อสังเกตว่าความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงได้ช่วงกว้างขึ้นอยู่ชนิดของเซลล์ สภาพการเลี้ยงเซลล์ และวิธีการทดลอง ซึ่งค่าความเข้มข้นของ H_2O_2 ภายในเซลล์ที่ได้จากการศึกษาสอดคล้องกับค่าที่วัดได้ที่ steady state (1-100 nM) ซึ่งเคยมีรายงานในเซลล์อื่นๆ เช่น wild-type E.coli และ เซลล์ตับหนู

การตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อสารต้านอนุมูลอิสระ

ดังได้กล่าวในตอนต้น สารอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลาโดยถูกควบคุมอย่างเข้มงวดให้มีระดับคงที่ค่าหนึ่ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ดัง

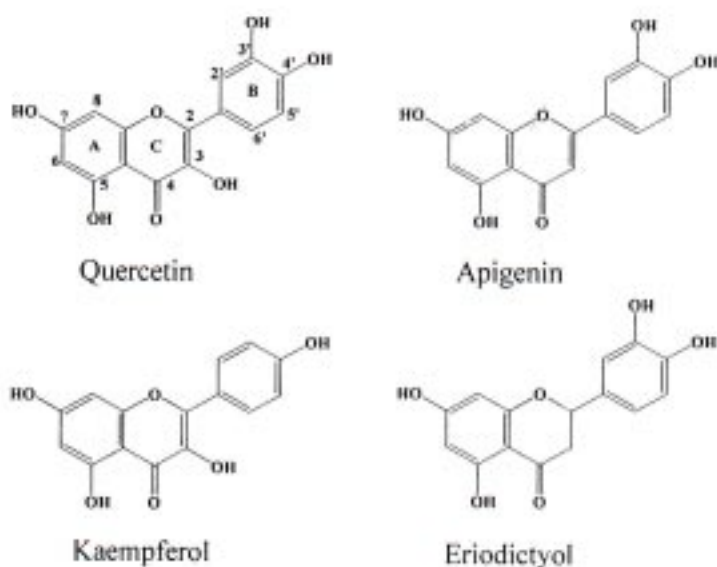
แสดงในตารางที่ 1 และในสภาวะที่ความสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและระบบต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เสีย ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เช่น การได้รับการกระตุ้นหรือได้รับสารออกซิแดนท์จากภายนอกจะส่งผลให้ระดับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์สูงขึ้น หรือในกรณีที่เซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจะมีผลทำให้ระดับสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ลดลง ในทั้งสองกรณีมีอิทธิพลโดยตรงต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ต้องชดเชยระบบต้านสารอนุมูลอิสระซึ่งในกระบวนการเหล่านี้เซลล์ต้องการสารพลังงานสูง เช่นเอทีพีเพิ่มขึ้นทำให้ไมโทคอนเดรียของเซลล์มีสถานะเชิงพลังงานสูงขึ้นและลดลงในเวลาต่อมา เนื่องจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในไมโทคอนเดรียดังตัวอย่างผลการวิจัยต่อไปนี้



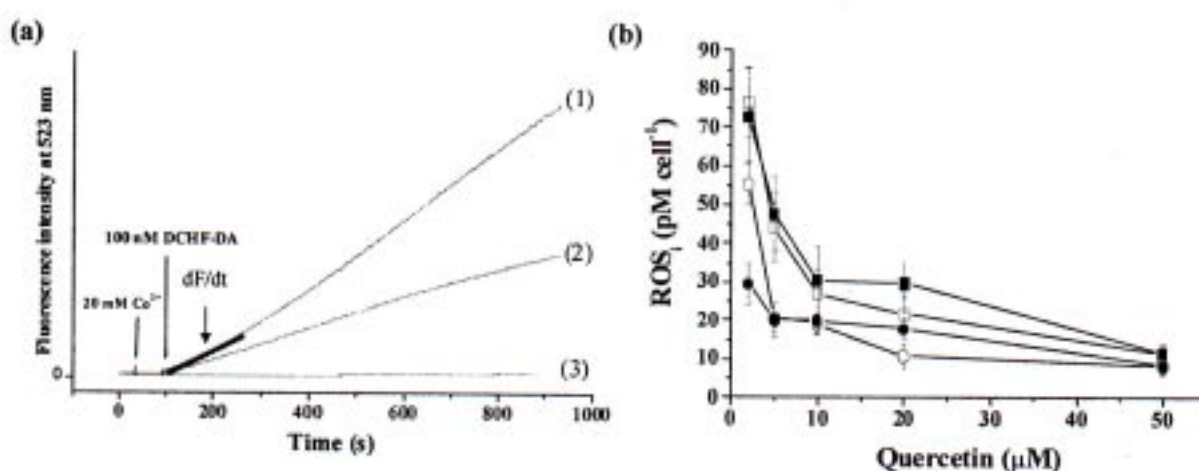
รูปที่ 2 (a) จลนศาสตร์การเกิดออกซิเดชันของ DCHF-DA: เซลล์ K562 (2×10^5) ถูกแขวนลอยใน 2 mL HEPES- Na^+ buffer ในตัววัดชนิดควอตซ์และความเข้มข้นของสัญญาณการเรืองแสงถูกวัดที่ 523 nm (โดยทำการกระตุ้นที่ 502 nm) ถูกวัดเป็นฟังก์ชันกับเวลาเป็นเวลา 10 นาทีก่อนเติม 100 nM DCHF-DA (a); 20 mM CoCl_2 ตามด้วย 100 nM DCHF-DA (b) เส้น (c) ได้จากการเติม 20 mM CoCl_2 และ 100 nM DCHF-DA แต่ไม่มีเซลล์ (b) แสดงการฟิตข้อมูล จากสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ด้วยสมการที่ (1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าคงที่เฉลี่ย (k_e) ของการตัดหมู่เอซิดเททที่ถูกกระตุ้นเอ็นไซม์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ (pseudo-first-order reaction), $k_2[\text{ROS}]$ และความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ต่อเซลล์ของเซลล์ 4 ชนิดได้แก่ K562, K562/adr, GLC4, และ GLC4/adr cell lines โดยใช้ค่า $k_2 = 790 \pm 62 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับปฏิกิริยาเป็นแบบ second-order rate constant สำหรับปฏิกิริยาระหว่าง DCHF และ H_2O_2 ในสภาวะที่มี horseradish peroxidase

Cell line	$k_e = k_1[E]_0 \text{ (cell}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_2[\text{ROS}] \text{ (cell}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$[\text{ROS}] \text{ (nM cell}^{-1})$
K562	$(6.1 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	$(5.2 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	0.66 ± 0.09
K562/adr	$(7.3 \pm 3.1) \times 10^{-9}$	$(4.7 \pm 1.1) \times 10^{-7}$	0.59 ± 0.19
GLC4	$(6.0 \pm 0.2) \times 10^{-9}$	$(5.1 \pm 1.3) \times 10^{-7}$	0.65 ± 0.22
GLC4/adr	$(31 \pm 13) \times 10^{-9}$	$(6.3 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	0.80 ± 0.16



รูปที่ 3 โครงสร้างเคมีของ quercetin apigenin kaempferol และ eriodictyol



รูปที่ 4 (a) จลนศาสตร์การเกิดออกซิเดชันของ DCFH-DA: เซลล์ (2×10^5) ถูกแขวนลอยใน 2 mL ของ HEPES- Na^+ buffer เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติม (1) 20 mM CoCl_2 และ 100 nM DCFH-DA หรือ (2) 20 mM CoCl_2 ตามด้วย 100 nM DCFH-DA และ 10 μM quercetin และ (3) 20 mM CoCl_2 ตามด้วย 100 nM DCFH-DA และ 10 μM quercetin โดยไม่มีเซลล์ บันทึกความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงที่ 523 nm (โดยการกระตุ้นที่ 502 nm) ที่สัมพันธ์กับเวลา ความเร็วเริ่มต้นของการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการเรืองแสงของ DCF (V_i) หาได้จากความชันของกราฟ $F = f(t)$ ในช่วงระยะเวลา 50 วินาทีแรกหลังจากเติม DCFH-DA ความเข้มข้นของ ROS_i ในหน่วย $\text{M}\cdot\text{cell}^{-1}$ คำนวณจากสมการ $[\text{ROS}] = a \cdot V_i$ โดยที่ "a" คือสัดส่วนของ ROS/V_i และ (b) ปริมาณ ROS_i ที่วัดได้จากชุดการทดลอง (a) สัมพันธ์กับความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ในเซลล์ (○) K562 (●) K562/adr (□) GLC4 และ (■) GLC4/adr ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ชุดที่เป็นอิสระต่อกัน

Quercetin apigenin kaempferol และ eriodictyol (รูปที่ 3) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลได้ดีกว่าวิตามินอีซึ่งโดยทั่วไปมักพบในรายงานว่าสารที่มีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระที่ดีทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายเนื่องจากสภาวะเครียด จากการศึกษาพบว่าสารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดที่ทำการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 2 และพบว่าพื้นที่ที่เติมสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 โมเลกุลในเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ระดับปริมาณสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ลดลงอย่างเห็นที่ดังแสดงในรูปที่ 4

ปริมาณสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ซึ่งค่าประสิทธิภาพของโมเลกุลที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ลง 50% หรือ $\rho_{0.5}$ นิยามได้จาก
$$\rho = \frac{(ROS)_{control} - (ROS)_{compound}}{(ROS)_{control} - (ROS)_{quercetin}}$$
 และค่า $\rho_{0.5}$ แสดงในตารางที่ 3 จะเห็นว่าในโมเลกุลที่ศึกษา quercetin มีประสิทธิภาพสูงสุดในทุกเซลล์และที่เหลือนี้อาจมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

การทำลายที่เกิดขึ้นจากสภาวะเครียดที่ใช้ออกซิเจนและสถานะเชิงพลังงานของเซลล์มะเร็งที่ไวและดื้อต่อยาแบบหลายขนาน

การดื้อยาแบบหลายขนาน (Multidrug resistance) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษามะเร็งด้วยเคมีมีประสิทธิภาพต่ำหรือล้มเหลว การดื้อยาแบบหลายขนาน มีความสัมพันธ์กับการลดการสะสมของยาภายในเซลล์ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากยาถูกปั๊มออกนอกเซลล์โดยโปรตีนขนส่งที่พบที่พลาสมาเมมเบรน เช่น P-glycoprotein และ MRP1-protein ซึ่งใช้พลังงานจากการสลายตัวของเอทีพี จากการศึกษาของกลุ่มวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาในระดับเซลล์และโมเลกุลฯ ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ดื้อยาดังกล่าว

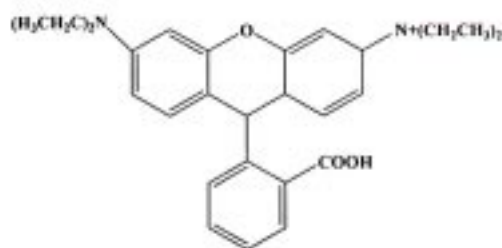
เอทีพีมากกว่าเซลล์ที่ไวต่อยาทั้งนี้เนื่องจากมีปั๊มเช่น P-glycoprotein และ MRP1 protein สามารถทำหน้าที่กระตุ้นการสลายตัวของเอทีพี (ATPase activity) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งชนิดเดียวกันที่ไวต่อยา และจากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีหลักฐานที่สำคัญที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อทำให้เซลล์ดื้อยาขาดเอทีพีจนหมดหรือเพียงบางส่วนมีผลทำให้การทำงานของ P-glycoprotein และ MRP1 ถูกยับยั้งทำให้มีการสะสมของยาภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

เป็นที่ทราบดีว่าพลังงานหลักของเซลล์อยู่ในรูปพลังงานเคมีซึ่งได้มาจากเอทีพี และในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมใช้ออกซิเจนมากกว่า 90 % ของที่ได้รับในกระบวนการหายใจโดยไม่โตคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งผลิตพลังงานและเป็นแหล่งผลิตสารอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ที่เกิดระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึม และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียมีโอกาสถูกทำลายได้ด้วยกระบวนการคล้ายกับดีเอ็นเอในนิวเคลียส แต่ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียมีความเสถียรน้อยกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสจึงเกิดการถูกทำลายแบบที่ไม่สามารถซ่อมแซมได้ตลอดเวลา สภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการสลายตัวของไมโทคอนเดรียดูเหมือนจะเป็นปัจจัยหลักของสภาวะการแก่และการตายของเซลล์

เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เซลล์ epithelial ปกติสร้างพลังงานจากกระบวนการไกลโคไลซิส ประมาณ 20 % และอีกประมาณ 70 % ได้จากวัฏจักร Krebs หรือ Citric acid cycle ภายในไมโทคอนเดรีย ในกระบวนการไกลโคไลซิส กลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจากวัฏจักร Krebs กรดไขมันและผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมจะถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานโดยเอนไซม์จากวัฏจักร Krebs และจากการศึกษาของ Warburg และคณะ (Science 123, 309-314, 1956) พบว่าเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่องและมีการสร้างกรดแลคติกในระดับสูงมากเพราะเซลล์ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ และถึงยุคปัจจุบันกลุ่มนักวิจัยมะเร็งก็ยังเชื่อว่าเซลล์มะเร็งไม่

สามารถใช้วัฏจักร Krebs ได้เท่ากับเซลล์ปกติ ทั้งนี้มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชี้ว่าเมื่อไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งได้รับบาดเจ็บทำให้เซลล์มะเร็งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกและใช้กระบวนการไกลโคไลซิสเป็นแหล่งพลังงานหลัก

เพื่อให้เข้าใจสถานะเชิงพลังงาน (Energetic state) ของเซลล์ จึงได้มีการศึกษาค่าความแตกต่างของพลังงานไฟฟ้าของเมมเบรน (Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)) โดยใช้สารกลุ่มที่ชอบละลายในไขมันที่มีประจุบวก (Lipophilic cation probes) เช่น DiOC₆, ^{99m}Tc-MIBI, JC-1, TPP+ และ rhodamine dyes.



รูปที่ 5 โครงสร้างเคมีของ Rhodamine B

จากผลการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า $\Delta\Psi_m$ เป็นตัวบ่งชี้ถึงสถานะเชิงพลังงานของไมโทคอนเดรียและเซลล์ และสามารถใช้องค์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของไมโทคอนเดรียในเซลล์ซึ่งสามารถติดตามได้โดยวิธีการวัดแบบไม่ทำลายด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนส์ร่วมกับ Rhodamine B (โมเลกุลติดตามที่จำเพาะกับไมโทคอนเดรีย) (รูปที่ 5) Rhodamine B แพร่ผ่านเมมเบรนเข้าไปภายในเซลล์ได้เนื่องจากอิทธิพลของความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมีที่เกิดจากการกั้นของเมมเบรน หลังจากนั้นระบบ เซลล์-Rhodamine B จะเข้าสู่สภาวะคงที่ (Steady state) โดย Rhodamine B จะมีการกระจายแบบสมดุลระหว่างภายนอกเซลล์ (C_e^0) โซโดพลาสมา (C_i^0) และไมโทคอนเดรีย (C_m^0)

ความเข้มข้นของ Rhodamine B ที่สะสมในไมโทคอนเดรียสามารถวัดได้โดยการเติม 200 μ M MTT ซึ่งจะถูกรีดิวส์เปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานภายในมาร์ทริกของไมโทคอนเดรียและทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้สัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B ที่สะสมในไมโทคอนเดรีย การลดลงอย่างต่อเนื่องของความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B เกิดจาก Rhodamine B ภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในและไปสะสมที่ไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 6) ในความเป็นจริงแล้วปฏิกิริยารีดักชันของ MTT ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดการโฟโพรไรซ์ซึ่งทำให้ $\Delta\Psi_m$ เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเอทีพีในเซลล์ (รูปที่ 7) ในการศึกษาขั้นจำกัดปฏิกิริยา (Limiting step) คือการแพร่ของ Rhodamine B ผ่านเมมเบรนไมโทคอนเดรียทั้งนี้เพราะว่าเมมเบรนไมโทคอนเดรียรวมกันแน่นและมีความสามารถในการเลือกผ่านมากกว่าพลาสมา-เมมเบรน ภายใต้สภาวะการทดลองนี้จลนศาสตร์ของการเข้าสู่มาร์ทริกไมโทคอนเดรียของ Rhodamine B สามารถเขียนได้ดังนี้

$$V_{rhob} = PC_i^0 \quad (2)$$

P หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์การเลือกผ่าน (Permeability coefficient) ซึ่งขึ้นอยู่กับ rhodamine B และธรรมชาติของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย เมื่อ 1 โมล จากนอกเซลล์แพร่เข้าไปสู่ไซโตพลาสมาและเข้าสู่ไมโทคอนเดรียที่มีความต่างศักย์เมมเบรน $\Delta\Psi_m$ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงต่อโมล คือ

$$\delta F = F_e - F_m \quad (3)$$

เมื่อ F_e และ F_m หมายถึงความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B ที่ภายนอกเซลล์และภายในไมโทคอนเดรียตามลำดับ เมื่อ MTT ถูกเติมลงไปในสารละลายเซลล์ F_m จะกลายเป็น F_{mv} และในช่วงเวลา Δt มี n โมลของ Rhodamine B ที่เคลื่อนที่จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ไมโทคอนเดรียมี

ผลให้มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสัญญาณการ
เรืองแสง ΔF :

$$n = V_{\text{chamber}} \times \Delta t \quad (4)$$

$$\text{หรือ} \quad = PC_i \times \Delta t$$

$$\Delta F = n \delta F \quad (5)$$

$$= PC_i \times \Delta t \times \delta F$$

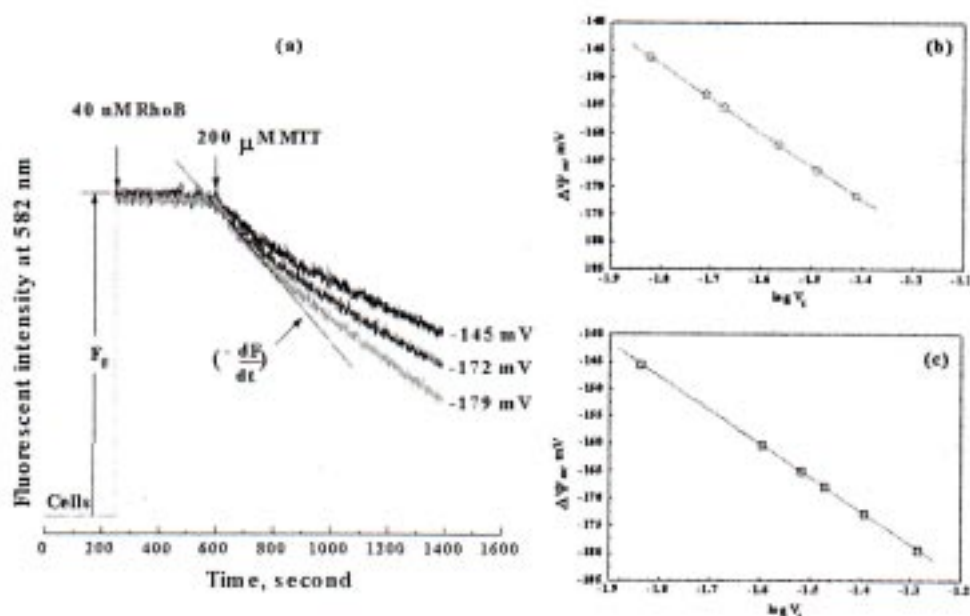
$$\frac{\Delta F}{\Delta t} = PC_i (F_c - F_{\text{rest}}) \quad (6)$$

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) ที่ทำการศึกษาในเซลล์ K562 และ GLC4 ค่าระดับการดื้อยา (Resistance factor (RF)) คำนวณได้จากค่า IC_{50} ของเซลล์ที่ดื้อยาหารด้วยค่า IC_{50} ของเซลล์ชนิดเดียวกันที่ไวต่อยา

Compounds	IC_{50} (K562), μM	RF	IC_{50} (GLC4), μM	RF
Apigenin	11.88 ± 0.87	0.5	10.33 ± 1.51	0.8
Eriodictyol	24.82 ± 0.50	0.4	21.88 ± 1.52	1
Kaempferol	13.24 ± 0.88	0.8	20.58 ± 1.64	0.7
Quercetin	10.55 ± 2.00	0.5	21.88 ± 2.21	0.5
Doxorubicin	0.014 ± 0.005	110	0.020 ± 0.001	17
Daunorubicin	0.020 ± 0.007	32	0.018 ± 0.008	8

ตารางที่ 3 $\rho_{0.5}$, ค่าประสิทธิภาพของโมเลกุลที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์ลดลง 50 %

Compound	$\rho_{0.5}$, μM			
	K562	K562/adr	GLC4	GLC4/adr
Quercetin	8.2 ± 3.2	7.9 ± 2.1	9.4 ± 2.3	8.2 ± 3.2
Apigenin	35.8 ± 6.3	19.5 ± 4.9	33.6 ± 5.0	19.5 ± 4.9
Kaempferol	19.3 ± 4.8	20.0 ± 5.0	34.4 ± 5.1	25.5 ± 5.8
Eriodictyol	32.4 ± 9.8	8.2 ± 3.2	17.0 ± 2.5	8.5 ± 2.2



รูปที่ 6 (a) แบบเฉพาะของจอผลาสตการณ์การเข้าเซลล์ของ Rhodamine B และ (b, c) การเปลี่ยนแปลงของ $\log V_i$ ที่สัมพันธ์กับค่า $\Delta\Psi_m$ ในเซลล์ K562 cell และ GLC4 ตามลำดับ

ทำการบันทึกความเข้มของสัญญาณการเรืองแสง F ที่ความยาวคลื่น 582 nm ($\lambda_{ex} = 553$ nm) ที่สัมพันธ์กับเวลา เซลล์ (2×10^5) ถูกแขวนลอยใน 2 ml of HEPES- Na^+ buffer กวนให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอและบ่มที่ 37 °C เติมนสารละลาย Rhodamine B 40 nM ลงไปในสารละลายเซลล์ทำให้ความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงเป็น F_0 บันทึกสัญญาณต่ออีก 20 นาทีแล้วเติม 200 μM MTT ความชันของกราฟ $F = f(t)$ หลังจากเติม MTT คือ $-\left(\frac{\partial F}{\partial t}\right)$ และความเร็วเริ่มต้น (V_i) ของการลดลงของความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B เท่ากับ $V_i = \left(\frac{\partial F}{\partial t}\right) \left(\frac{C_T}{F_0}\right)$ ค่า $\Delta\Psi_m$ ตั้งได้โดยแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย HEPES- Na^+ /HEPES- K^+ buffer ที่มีสัดส่วนต่าง ๆ และเติม 20 nM valinomycin.

โดย P ไม่ขึ้นอยู่กับ $\Delta\Psi_m$ และเครื่องหมายของ $\frac{\Delta F}{\Delta t}$ ไม่ขึ้นอยู่กับ C_i การสะสมของ Rhodamine B ในมาทริกซ์ไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นจากเนื่องจาก $\Delta\Psi_m$ -driven ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก Nernst equation ในช่วงเวลาน้อย ๆ (50 sec) หลังจากเติม MTT ค่า

$\frac{\Delta F}{\Delta t}$ ประมาณโดย $\left(\frac{\partial F}{\partial t}\right)_{mtt}$ ความชันของกราฟความสัมพันธ์ $F=f(t)$ แสดงได้ดังรูปที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับความเร็วเริ่มต้น (V_i) ของการลดลงของความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B:

$$V_i = PC_i^*(F_0 - F_{mtt}) \quad (7)$$

ในช่วงเวลา 50 วินาที ความเข้มข้นของ Rhodamine B ภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเทียบกับก่อนเติม MTT แต่ $\frac{\Delta F}{\Delta t}$ สามารถวัดได้ง่าย และเนื่องจากความต่างศักย์ของพลาสมาเมมเบรนไม่มีอิทธิพลต่อการสะสมของ Rhodamine B ภายในเซลล์จึงทำให้สามารถอนุมานได้ว่าที่สภาวะคงที่ C_{int}^* มีค่าเท่ากับ C_i^* การกระจายของ Rhodamine B อีกระหว่างเมมเบรนไมโทคอนเดรียสามารถวัดได้อย่างแม่นยำโดยอาศัย ฟอโรมาซานซึ่งมีการสะสมแบบจำเพาะที่ไมโทคอนเดรีย วิธีการนี้อาศัยหลักการพื้นฐานจาก Nernst ซึ่งอธิบายว่าการสะสมและการกระจายของสารที่มีค่าการละลายในไขมันสูงและมีประจุบวกที่สามารถเคลื่อนที่ไบนโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างเมมเบรนความเร็วเริ่มต้น (V_i) ของการลดลงของความเข้มข้นของสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B แสดงถึงความเข้มข้นของ Rhodamine B สะสมที่ไมโทคอนเดรีย ทำให้สามารถคำนวณ $\Delta\Psi_m$ ได้ดังนี้

$$\frac{C_m^*}{C_i^*} = 10^{-\left(\frac{|\Delta\Psi_m|}{2.303RT}\right)} \quad (8)$$

$$\Delta\Psi_m = -61.51 \log V_i - 258.46 \quad (9)$$

เมื่อ $\Delta\Psi_m$ หมายถึงค่าความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรีย ในหน่วย mV และ FT/R มีค่าเท่ากับ 26 mV ที่ 37°C และ C_i^0 มีค่าเท่ากับ 40 nM และความเร็วเริ่มต้น (V_i) มีหน่วยเป็น nM.s^{-1} ซึ่งค่า V_i จะมีความสอดคล้องกับค่า $(\Delta\Psi_m)_{\text{me}}$ ที่ใกล้เคียงกับ $\Delta\Psi_m$ ในสภาวะไม่ถูกกระตุ้น

การวัดปริมาณเอทีพีภายในเซลล์

การตอบสนองของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลง $\Delta\Psi_m$ (การเพิ่มขึ้นหรือลดลง) สามารถประเมินได้โดยการวัดปริมาณเอทีพีภายในเซลล์ โดยในสภาวะปกติพบว่าเอทีพีภายในเซลล์มีระดับที่ต่ำของเซลล์ K562/adr และ GLC4/adr มีมากกว่าในเซลล์มะเร็งชนิดเดียวกัน

แต่ไวต่อยา และพบว่าเมื่อเพิ่มเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ร่วมกับ 5 μM oligomycin (สารยับยั้งกระบวนการ Oxidative phosphorylation) เป็นเวลา 30 นาที พบการลดลงของความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรีย และเมื่อทำการวัดระดับเอทีพีภายในเซลล์พบว่าลดลง 25 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

รูปที่ 7 แสดงการเพิ่มขึ้นของเอทีพีภายในเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน เมื่อเพิ่มเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา ในสารละลาย 1 μM MTT โดยพบว่าปริมาณเอทีพีภายในเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 150 % ใน K562/adr และ 175 % ใน GLC4/adr และจะกลับมามีค่าเท่ากับตอนเริ่มต้นอีกครั้งเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30 นาที สำหรับ K562/adr และ 60 นาทีสำหรับ GLC4/adr พบผลในทิศทางเดียวกันเมื่อเพิ่มเซลล์ร่วมกับ 100 μM MTT

แบบการตอบสนองของเซลล์ต่อยาต้านมะเร็งเมื่อมีการสร้างเอทีพีเพิ่มขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยารีดักชันของ MTT แสดงในรูปที่ 8 เป็นที่น่าสนใจว่าการเพิ่มขึ้นของเอทีพีภายในเซลล์ ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของยาฟิรารูบิซินในเซลล์ที่ไวต่อยา แต่พบว่าทำให้เซลล์ทนต่อพิษของยาต้านมะเร็งอย่างชัดเจนในเซลล์ที่ไวต่อยาแบบหลายขนาน โดยความเข้มข้นของฟิรารูบิซินที่ใช้เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง 50% (IC_{50}) ในชุดการทดลองที่ใช้ฟิรารูบิซินร่วมกับ 1 μM MTT สูงกว่าการใช้ฟิรารูบิซินอย่างเดียวเป็น 2 เท่า ซึ่งเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเอทีพีภายในเซลล์ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ P-glycoprotein และ MRP1 protein เพิ่มขึ้นและช่วยป้องกันการพิษจากฟิรารูบิซินกับเซลล์ในระยะยาว

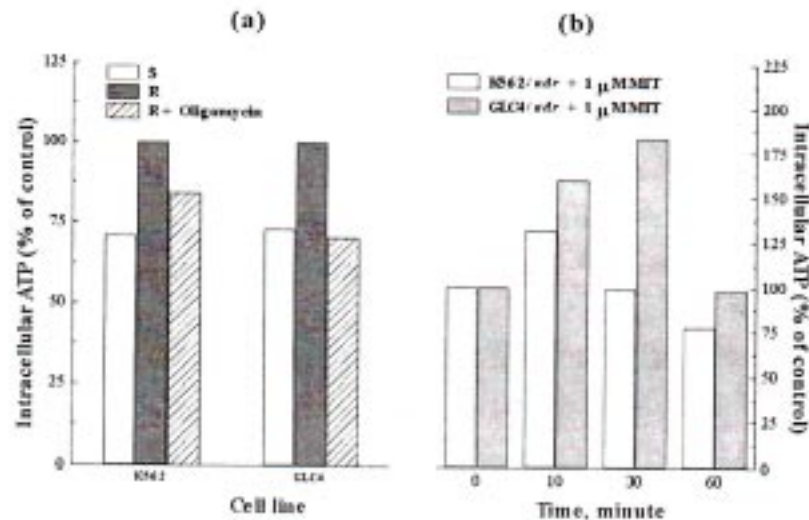
กลยุทธ์ใหม่เพื่อการรักษามะเร็งและปรากฏการณ์คือยาแบบหลายขนาน

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรียมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเอทีพีภายในเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของเอทีพีในเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยาจากกระบวนการ Oxidative phosphorylation

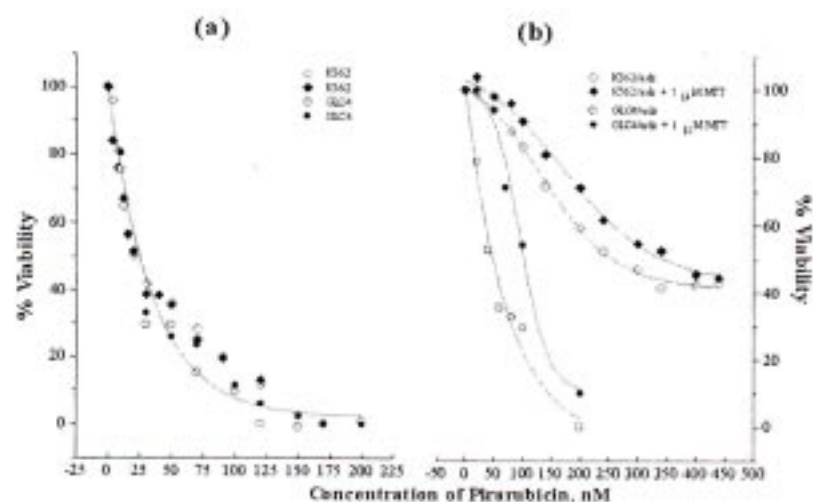
สามารถป้องกันเซลล์จากพิษของพิวาลูบิซินโดยทำให้ประสิทธิภาพการปั๊มยาของ P-glycoprotein และ MRP1 protein เพิ่มขึ้น

เป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอลมีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงและเนื่องจากความสามารถในการต้านออกซิเดชันนี้เองที่สารกลุ่มโพลีฟีนอลนี้มักจะถูกมองว่ามีความสามารถในการป้องกันเซลล์จากสารออกซิแดนท์ต่างๆ ในครั้งนี้หน่วยวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลได้มีความสนใจถึงศักยภาพของสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่ได้จากพืชไทยโดยเฉพาะพลาไวโนอยด์โดยได้ทำการศึกษาดังฤทธิ์การยับยั้งการก่อและต้านมะเร็งต้านสารอนุมูลอิสระ ประสิทธิภาพในการชักนำเซลล์มะเร็งให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสและยับยั้งการดีอะพลาซันนาโดยพบว่า quercetin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562 ($IC_{50} = 10.55 \pm 2.00 \mu M$) K562/adr ($IC_{50} = 5.10 \pm 2.00 \mu M$) GLC4 ($IC_{50} = 21.88 \pm 2.21 \mu M$) และ GLC4/adr ($IC_{50} = 10.55 \pm 2.00 \mu M$) และสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสซึ่งสามารถวัดโดยการย้อมเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิสด้วย Annexin V-FITC และเซลล์ที่ตายแบบเนโครซิสด้วย Propidium iodide และอ่านด้วย Flow cytometer (รูปที่ 9) โดยพบว่า quercetin สามารถชักนำ K562 และ K562/adr ให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสได้ใกล้เคียงกัน ($42 \pm 2 \%$) และสามารถชักนำ GLC4 ($20 \pm 1 \%$) และ GLC4/adr ($32 \pm 3 \%$) หลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับ $10 \mu M$ quercetin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และยังพบอีกว่า quercetin มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโตซิสสูงกว่า etoposide และ quercetin ไม่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein

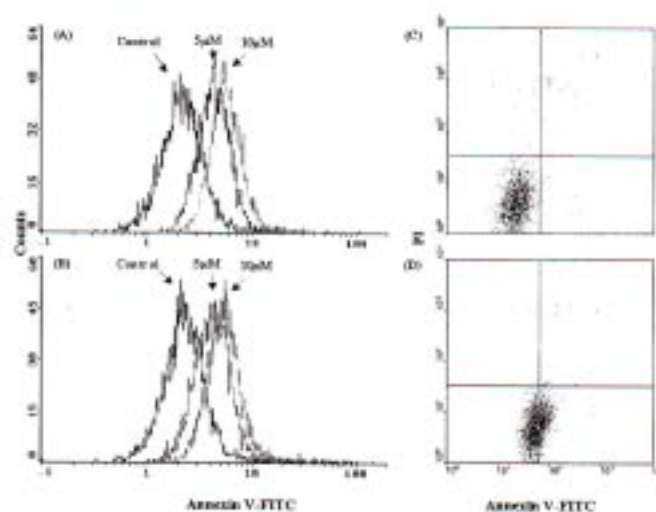
การค้นพบของหน่วยวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาที่รายงานโดย Wang และคณะ⁴ ซึ่งพบว่า quercetin ($60 \mu M$) สามารถเหนี่ยวนำการเกิดอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิด HL-60 โดยพบร่วมกับการลดลงของความต่างศักย์ไมโทคอนเดรียโดยเกี่ยวข้องกับการหลุดของ Cytochrome c ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลเล็กมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล $12 kD$ มีประจุบวกที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่ทาหน้าที่ยกส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจที่อยู่บนเมมเบรนชั้นในของไมโทคอนเดรีย โดยทำให้เกิดความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมีของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย โดยทำให้ด้านนอกของมาทริกซ์มีประจุเป็นบวก นอกจากนี้แล้วยังพบอีกว่า quercetin ที่ความเข้มข้นต่ำๆ เช่น $10 \mu M$ ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรียในลักษณะต่อเนื่องโดยทำให้มีค่าความต่างศักย์ไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น ติดตามด้วยการลดลงซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับการเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้น ซึ่งสามารถวัดได้หลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับ quercetin เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษานี้แสดงว่า quercetin ออกฤทธิ์ชักนำการเกิดพิษที่ไมโทคอนเดรียโดยทำให้ระดับสถานะเชิงพลังงานของไมโทคอนเดรียถูกเสียไปตามด้วยการเกิดอะพอพโตซิสและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จะเห็นได้ว่า quercetin น่าจะสามารถเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้โดยเฉพาะเพื่อการรักษาปรากฏการณ์ดีอะพลาซันนา ความสัมพันธ์ระหว่างการเสียสมดุลของสถานะเชิงพลังงานของไมโทคอนเดรีย (การลดลงของค่า $|\Delta\Psi_m|$) และประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดอะพอพโตซิสโดย



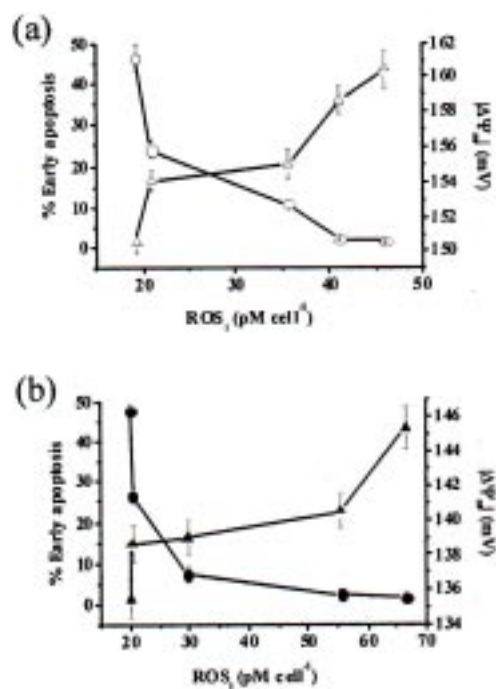
รูปที่ 7 (a) แสดงระดับเอทีพีภายในเซลล์มะเร็งที่ไวและดื้อต่อยาหลายขนานและผลของ 5 μ M oligomycin ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอทีพีในเซลล์ที่ดื้อต่อยาแบบหลายขนานและ (b) ความเข้มข้นของเอทีพีภายในเซลล์ที่ดื้อต่อยาแบบหลายขนาน ที่เวลาต่างๆ เมื่อบ่มร่วมกับ 1 μ M MTT ซึ่งผลการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง



รูปที่ 8 (a) เปรียบเทียบความเป็นพิษของพิรารูบิซินในเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยาชนิด ($\diamond$ $\blacklozenge$) K562 และ ($\circ$ $\bullet$) GLC4 และ (b) เซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยา ($\diamond$ $\blacklozenge$) K562/adr cell และ ($\circ$ $\bullet$) GLC4/adr เปรียบเทียบการมีชีวิตรอดของเซลล์นับที่ 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาพิรารูบิซินเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม สัญลักษณ์ที่บ่งชี้ถึงการผลการทดลองในชุดที่บ่มเซลล์ร่วมกับ 1 μ M MTT



รูปที่ 9 (A, B) ฮิสโตแกรมแสดงจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี Annexin V-FITC: ผลของ 5 และ 10 μM quercetin เทียบกับชุดควบคุมใน K562 และ K562/adr ตามลำดับ (C, D) ฮิสโตแกรมแบบสองตัวแปรที่พลอตระหว่างความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Annexin V-FITC และ PI ของชุดควบคุมและชุดการทดลองที่บ่มเซลล์ K562 ร่วมกับ 10 μM quercetin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



รูปที่ 10 ค่าสัมบูรณ์ของความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรีย $|\Delta\Psi_m|$ (○, ●) และเปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้น (Δ , $\blacktriangle$) ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนภายในเซลล์ K562 (สัญลักษณ์โพรง) และ K562/adr (สัญลักษณ์ทึบ) เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับ quercetin เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ เบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ชุด

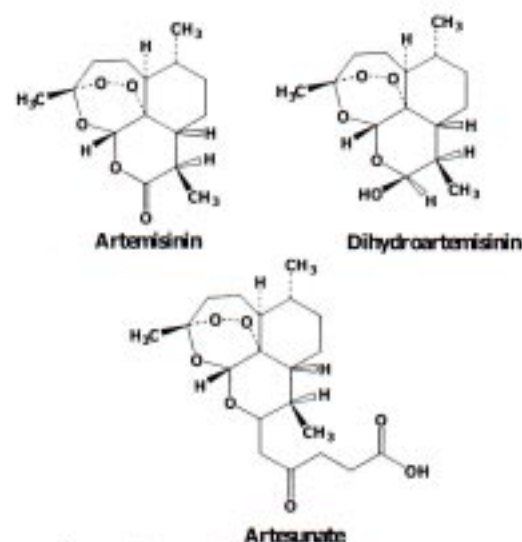
quercetin แสดงในรูปที่ 10 มีข้อสังเกตว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ quercetin ปริมาณของสารอนุมูลอิสระกลุ่มที่ออกซิเจนเป็นอะตอมกลางภายในเซลล์มีค่าลดลงและทำให้ค่า $|\Delta\Psi_m|$ ลดลงในช่วงที่แคบมาก (จาก 160 ± 1.0 mV เป็น 150 ± 0.6 mV สำหรับเซลล์ K562 และจาก 145 ± 1.2 mV เป็น 135 ± 1.1 mV สำหรับเซลล์ K562/adr) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้นเพิ่มขึ้นในช่วงกว้าง (จาก $1.5 \pm 0.4\%$ เป็น $45 \pm 3.2\%$) ดังแสดงในรูปความสัมพันธ์ในรูปที่ 10

ดังได้กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า Quercetin เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำการให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้น quercetin จึงสามารถใช้ศึกษาเพื่อเป็นสารต้านมะเร็งโดยเฉพาะเพื่อใช้แก้ปัญหาการดื้อยาแบบหลายขนาน

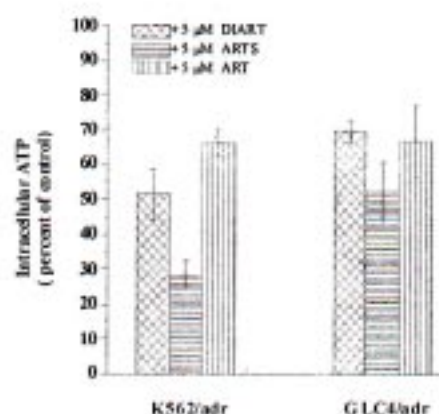
Astemisinin artesunate และ dihydroartemisinin สามารถแก้ปรากฏการณ์การดื้อยาแบบหลายขนานในเซลล์ K562/adr และ GLC4/adr

Qinghoasu เป็นยาต้านมาเลเรียซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งดื้อยาแบบหลายขนานซึ่งพบว่าสารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่ไม่ไดคองเดรีย ผู้เขียนและคณะวิจัย 4 พบว่า Artemisinin และสารอนุพันธ์ (รูปที่ 11) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในช่วงความเข้มข้นในระดับไมโครโมลาร์ และสามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ได้แต่มีประสิทธิภาพต่ำและไม่ยับยั้งการทำงานของ MRP1 ความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ได้ 50 % คือ 110 ± 5 μ M และยังพบอีกว่า artemisinin artesunate และ dihydroartemisinin มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้ความต่างศักย์เมมเบรนไมโตคอนเดรียของเซลล์มะเร็งลดลง ส่งผลให้มีการลดลงของเอทีพีภายในเซลล์ เช่นปริมาณเอทีพีลดลง 30-50 % เมื่อป้อนเซลล์ทั้ง 4

ชนิดร่วมกับยา 5 μ M (รูปที่ 12) และทุกโมเลกุลทำให้ประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของยาฟิรารูบิซินและด็อกโซรูบิซินเพิ่มขึ้นทั้งในเซลล์ที่ดื้อยา K562/adr ที่มีการแสดงออกของ P-glycoprotein และเซลล์ GLC4/adr ที่มีการแสดงออกของ MRP1



รูปที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ artemisinin dihydroartemisinin และ artesunate



รูปที่ 12 ระดับ ATP ภายในเซลล์ ที่เป็นผลจาก 5 μ M artemisinin artesunate และ dihydroartemisinin ใน K562/adr และ GLC4/adr

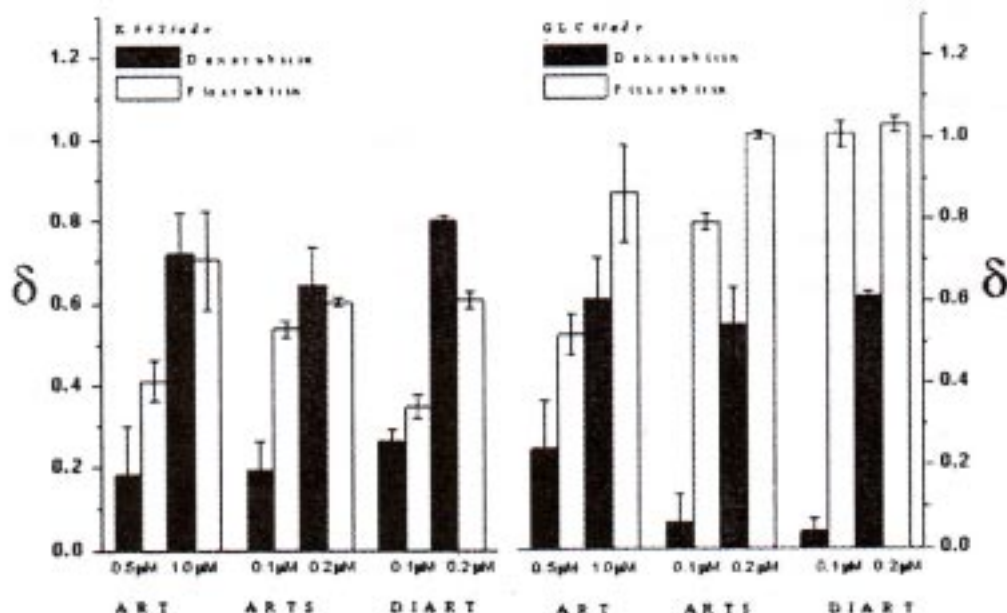
ประสิทธิภาพของ artemisinin artesunate และ dihydroartemisinin ในการยับยั้งการคื้อยาแบบหลายขนานหรือหรือทำให้เซลล์ที่คื้อยากลับมาตอบสนองต่อยาฟิรารูบิซินและดอกโซรูบิซินแสดงในรูปที่ 13

ความเข้มข้นของ Qinghaosu ที่เพิ่มประสิทธิภาพของยาฟิรารูบิซินหรือดอกโซรูบิซิน 50 % แสดงโดยค่า $\delta_{0.5}$ ในการศึกษาพบว่า artesunate และ dihydroartemisinin มีประสิทธิภาพยับยั้งการคื้อยามากกว่า artemisinin ผู้เขียนขอเน้นย้ำว่า artemisinin artesunate และ hydroartemisinin มีประสิทธิภาพในการเพิ่มพิษของยาฟิรารูบิซินมากกว่าดอกโซรูบิซินในเซลล์ GLC4/adr และพบอีกว่า artesunate และ dihydroartemisinin เพียง 200 nM สามารถเพิ่มพิษของฟิรารูบิซินได้ 100% ในเซลล์ GLC4/adr และ 80 % ในเซลล์ K562/adr ซึ่งในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein แสดงถึงกลไกการยับยั้งการคื้อยาของ

สารกลุ่มนี้ไม่มีเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มยาโดยตรง แต่ออกฤทธิ์รบกวนแหล่งสร้างพลังงานของเซลล์เช่นไมโทคอนเดรีย

สรุป

สารอนุมูลอิสระมีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของเซลล์ และในทางตรงข้ามเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เป็นเหตุให้เซลล์ต้องพยายามปรับแก้เพื่อความอยู่รอดซึ่งต้องใช้พลังงานมาก ทำให้ไมโทคอนเดรียของเซลล์ทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ระดับสารอนุมูลอิสระภายในไมโทคอนเดรียสูงตามมา ทำให้สถานะเชิงพลังงานและการทำงานของไมโทคอนเดรียเสียซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดพิษที่สำคัญกระบวนการหนึ่งต่อเซลล์ ดังนั้นหน่วยสร้างเอทีพีอย่างไมโทคอนเดรียจึงสามารถใช้ตำแหน่งกระตุ้นให้เกิดพิษในเซลล์มะเร็งที่จำเพาะโดยเฉพาะในการรักษามะเร็งที่คื้อต่อยาหลายขนาน



รูปที่ 13 ประสิทธิภาพของโมเลกุลที่ทำให้การเกิดพิษของยาฟิรารูบิซินและดอกโซรูบิซินเพิ่มขึ้นในเซลล์ K562/adr และ GLC4/adr

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ดร. ไพบุลย์ เรืองพัฒน์พงศ์ ดร. สมาน เดชสุภา ดร. ชัยนภ เลิศชูตินาท ดร. สุชาติ โกหันธ์ และ น.ส. จินตนา มีสูงเนิน ที่ได้มีส่วนสำคัญในผลิตข้อมูลวิจัย และขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานสนับสนุนการวิจัย โครงการบัณฑิตศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์และภาคภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

เอกสารอ่านเพิ่มเติม

1. Bensasson RV, Land EJ, Truscott TG, (1993) Excited states and free radicals in biology and medicine. Contribution from flash photolysis and pulse radiolysis Oxford University Press, Oxford.
2. Davis KJA Eds. (1991) Oxidative Damage & repair. Chemical, Biological and Medical aspects Pergamon, Oxford.
3. Reungpatthanaphong P, Dechsupa S, Meesungneon J, Loetchutinat C, Mankhetkorn S. (2003) Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells. J. Biochemical and Biophysical methods, 57, 1-16.
4. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrom c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. Eur J Cancer, 35, 1517-25.
5. Reungpatthanaphong P, Mankhetkorn S. (2002) Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/adr and GLC4/adr resistance cell lines. Biological Pharmaceutical Bulletin, 25, 1555-61.
6. Kothan S., Dechsupa S., Moretti JL., Vergote J. and Mankhetkorn S. (2004) Spontaneous mitochondrial membrane potential change during apoptotic induction by quercetin in K562 and K562/R cells. Can. J. Physiol. Pharmacol. 82, 1084-90.
7. Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupha S, Meesungneon J, Jay-Cerin JP, Mankhetkorn S (2005) Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. Radiation Physics and Chemistry. 72, 323-31.