บทที่ 1

บทนำ

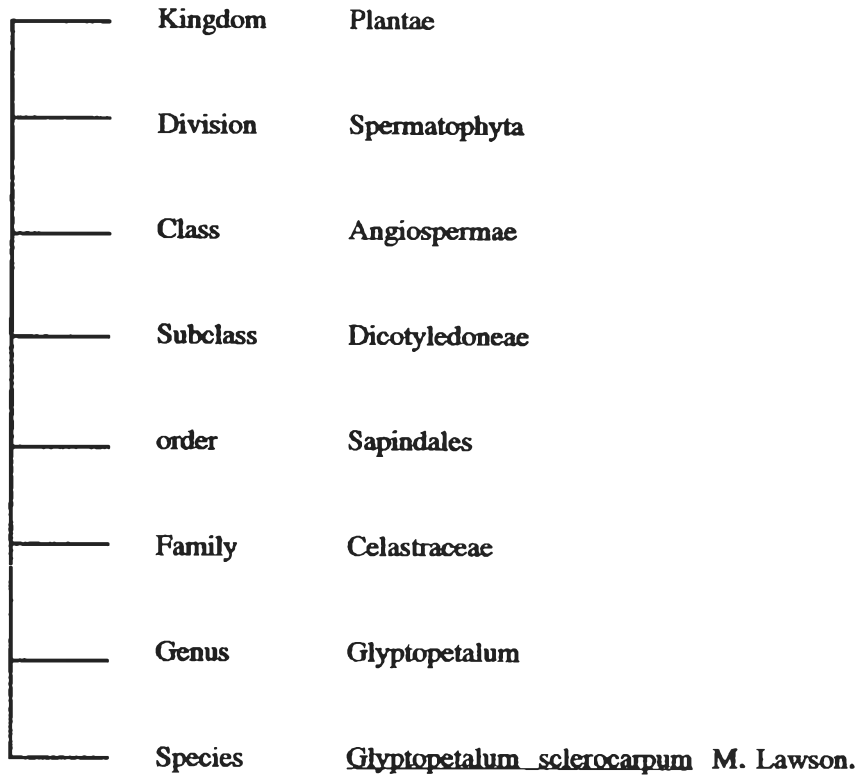
สมุนไพรนับเป็นสิ่งที่มีคุณค่ามาแต่โบราณกาล มนุษย์รู้จักนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรค โดยอาศัยการสังเกตและจดจำว่าพืชชนิดใดมีผลต่อร่างกายอย่างไร จากนั้นสรรพคุณตลอดจนวิธีการรักษาโรคก็ได้ถูกถ่ายทอดมาสู่รุ่นลูกหลาน โดยวิธีการบอกเล่าและบันทึกสืบทอดต่อ ๆ กันมา จะเห็นได้ว่า ในปัจจุบันนี้มียาแผนปัจจุบันหลายชนิดที่ได้ตัวยามาจากการสกัดพืชสมุนไพร ดังนั้น การนำพืชสมุนไพรมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงถือได้ว่าเป็นการศึกษาที่มีความสำคัญ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อทั้งทางด้านสาธารณสุขมูลฐานและด้านเศรษฐกิจของประเทศ ตลอดจนมวลมนุษย์ในแง่การต่อต้านโรคภัยต่าง ๆ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2528)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีพันธุ์ไม้ต่าง ๆ มากมาย ในจำนวนพันธุ์ไม้เหล่านี้ มีพันธุ์ไม้อยู่เป็นจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ แต่ก็มีบางชนิดที่ก่อให้เกิดอันตรายเป็นพิษต่อร่างกาย สมุนไพรที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปธรรมชาติ จึงมีสารหลายชนิดปะปนกันอยู่ มีสมุนไพรเพียงบางชนิดเท่านั้น ที่มีผู้ศึกษาจนทราบว่ามีสารสำคัญใดเป็นตัวออกฤทธิ์ให้ผลในการบำบัดรักษาโรค ในปัจจุบันการศึกษาสมุนไพรได้รับความสนใจมากขึ้น มีการศึกษาวิจัยสมุนไพรกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งการศึกษาวิจัยสมุนไพรนั้น แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ รูปแบบแรกเป็นการศึกษาวิจัยเบื้องต้น เพื่อให้ทราบว่าสมุนไพรที่ใช้กันมาแต่โบราณกาลนั้นไม่มีพิษมีภัย และนำไปเผยแพร่ให้ประชาชนใช้ ส่วนรูปแบบที่สอง เป็นการศึกษาวิจัยสมุนไพรที่ยังไม่เคยใช้ เพื่อค้นหายาใหม่ ๆ มารักษาโรค (พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2529)

ในบทนี้เนื้อหาที่สำคัญแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นข้อมูลเกี่ยวกับพืชแฮนคอคำใหญ่ (Glyptopetalum sclerocarpum M. Lawson.)และ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนนซึ่งเป็นสารสำคัญที่สกัดจากแฮนคอคำใหญ่ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเท่าที่มีการศึกษา และส่วนที่สองจะเป็นเรื่องเกี่ยวกับทฤษฎี หรือสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไมโคคอนเดรียที่ใช้เป็นโมเดลของการศึกษาฤทธิ์บางประการของ 22-ไฮดรอกซีทิงจีโนน และเหตุผลที่นำไปสู่การวิจัยในครั้งนี้

Glyptopetalum sclerocarpum M . Lawson

จัดอยู่ในกลุ่มพืชมีดอก มีใบเลี้ยงคู่ อยู่ในวงศ์(Family) Celastraceae สามารถจำแนกหมวดหมู่ตามพฤกษอนุกรมวิธานได้ดังนี้



(Suvatti, 1978)

Celastraceae เป็นวงศ์พืชที่พบกระจายทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีลักษณะเป็นไม้ต้นหรือไม้พุ่ม ช่อดอกบานจากตรงกลางก่อน ดอกมีขนาดเล็กรูปทรงสมมาตร มี 2 เพศ (polygamous) ในดอกเดียวกัน มีกลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ ไม่ติดกันแต่เรียงซ้อนเหลื่อมกัน (imbricate) มีน้อยที่กลีบในจะชนกัน (valvate) เกสรตัวผู้ 2-5 อันติดอยู่บนฐานรองดอก(disc) ขนาดใหญ่ รังไข่มี 2-5 พู มี 2 ovule ต่อ 1 ห้อง ผลเป็นแบบแคปซูล เนื้อนิ่ม มีเมล็ดมาก เมล็ดมักมี เนื้อเยื่อ (aril) ที่มีสีสรรสวยงาม (Willis, 1960 ; Keng, 1969)

พืชในสกุล Glyptopetalum นี้ พบได้ทั่วไปในประเทศศรีลังกา ทางใต้ของประเทศอินเดีย(Hooker, 1875) แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแหลมมลายู ประเทศพม่า มาเลเซีย และไทย(Burkill, 1966) พืชชนิดที่มีรายงานการพบในประเทศไทยมี 2 สปีชีส์ได้แก่ Glyptopetalum sclerocarpum M. Lawson. มีรายงานว่าใช้เป็นยารักษาเชื้อราในยาพื้นบ้านและใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่นในการลดไข้รักษามาลาเรีย (Bavovada et al., 1990) และ Glyptopetalum quadrangulare หรือ "ต้นตับหลาม" ซึ่งชาวพื้นเมืองใช้เป็นยารักษาแผลในจมูก (Burkill, 1966) นอกจาก 2 สปีชีส์นี้แล้ว ยังพบ Glyptopetalum สปีชีส์อื่นในประเทศต่างๆ ดังนี้

Glyptopetalum euonymoides , Glytopetalum euphlebium , Glyptopetalum grandulosum, Glyptopetalum loheri , Glyptopetalum marivelense , Glyptopetalum remotinervium , Glyptopetalum reticulatum , Glyptopetalum scortechinii , Glyptopetalum zeylanicum (Merrill, 1923; Ridley, 1967; Whitmore, 1972)

Glyptopetalum sclerocarpum M. Lawson. พบได้มากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ ดังนี้ แฮนคอคำใหญ่ ตูมกาแดง(จังหวัดเลย) ช้องนาง ป้องนก(จังหวัดลำปาง) คู่ต้อง(จังหวัดเชียงใหม่) มะคะมะเดาะ(จังหวัดแพร่) แกค่าง แคค่าง(จังหวัดเพชรบูรณ์) (เต็ม สมิตินันท์, 2523)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ Glyptopetalum sclerocarpum M. Lawson. เป็นไม้ยืนต้น ทุกส่วนของพืชจะมียางเหนียว เปลือกลำต้นมีสีแดง ใบเป็นรูปไข่ ก้านใบหนา ส่วนปลายแหลมเรียว ยาวประมาณ 6-8 นิ้ว ช่อดอกจะออกที่ซอกใบ เวลาบานจะบานจากตรงกลางก่อน(cymes) มีกลีบเลี้ยง(sepal) สีขาว กลีบดอก(petal) เป็นรูปโค้ง ด้านนอกมีสีเขียวด้านในมีสีม่วงอมเขียว มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน มีเกสรตัวผู้ (stamens) 4 อันติดอยู่บนฐานรองดอก ไม่มีก้านชูอับละอองเรณู ผลมีลักษณะเป็นแคปซูลรูปไข่ เมล็ดมีเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ด(aril) สีแดง (Craib, 1931; Hooker, 1875; Kurz, 1877; Whitmore, 1972) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีซึ่งดำเนินงานโดย ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้สารสกัดที่สำคัญจากพืชนี้คือ tingenone , 20-hydroxy-20-epi-tingenone และ 22β -hydroxytingenone

เมื่อมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่ได้จากพืชวงศ์ Celastraceae พบว่าส่วนมากจะแสดงฤทธิ์เป็น cytotoxic agents ฤทธิ์อื่น ๆ ที่พบบ้าง เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ฆ่าแมลง (Cassady, Baird and Chang, 1990) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจสารที่ออกฤทธิ์ cytotoxicity เพราะจะเป็นแนวทางเริ่มต้นไปสู่การค้นพบสารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพต่อไป (Hamburger and Hostettmann, 1991) โดยองค์กรสำคัญองค์กรหนึ่งที่มีบทบาทในการแสวงหาสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ คือ สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institution : NCI) ได้พัฒนาวิธีแสวงหาสารต้านมะเร็งอย่างเป็นระบบขึ้น และได้ให้ความหมายของ cytotoxic agents ไว้ว่า หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ซึ่งเมื่อนำสารนี้ไปทดสอบกับสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นเนื้องอก และให้ผลบวก จะเรียกสารนั้นว่าเป็น antitumour agents และจะเรียกว่าเป็น anticancer agents หรือ สารต้านมะเร็ง เมื่อทดสอบได้ผลในขั้นคลีนิก (Suffness and Douros, 1982; Pezzuto et al. , 1990)

สารจากพืชวงศ์ Celastraceae ที่มีรายงานถึงฤทธิ์ cytotoxicity ได้แก่

- maytansine จาก Maytenus serrata และสปีชีส์อื่น มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกหลายชนิดแม้ใช้ในปริมาณเพียงไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลอง และออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ แม้สารนี้จะประสบความล้มเหลวในการเป็นสารต้านมะเร็ง เนื่องจากมีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ แต่คาดว่ามีอนุพันธ์อีกหลายชนิดที่คาดว่าจะใช้ได้ผลดี

- maysemine maytanpine และ maytanbutine จาก Maytenus buchananii

- maytansinol และ maytanacine จาก Putterlickia verrucosa (เอมอร โสมนะพันธุ์, 2536; Southon and Buckingham, 1989)

- emarginatine จากลำต้นของ Maytenus emarginata มีค่า ED_{50} เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับ human KB cell (Kuo et al., 1990)

- elabunin จากเปลือกราก Elaeodendron buchananii มีค่า ED_{50} เท่ากับ 1 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับ L-1210 leukemia cell (Kubo and Fukuhara, 1990)

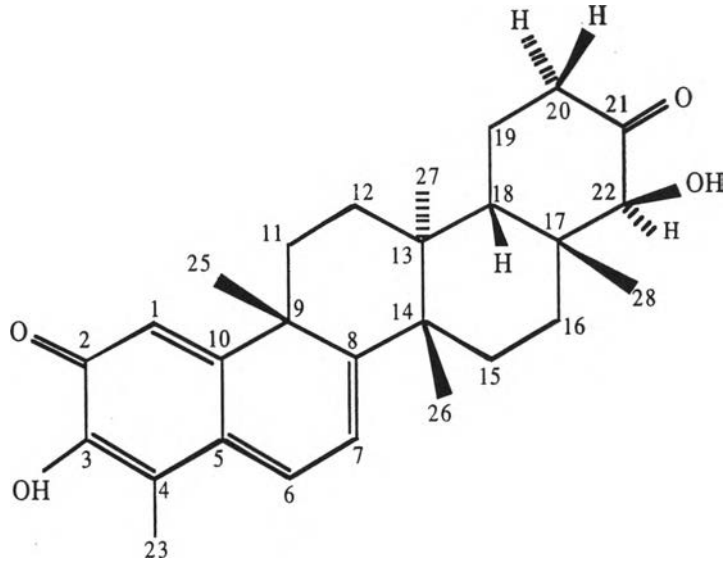
- triptolide และ tripdiolide (triptilide) จากรากของ Tripterygium wilfordii และ Tripterygium hypoglaucum tripdiolide ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทดสอบได้ผลกับหนู mouse ที่ถูกชักนำให้เป็นมะเร็งชนิด L-1210 และ P-388 ส่น triptolide ใช้ได้ผลกับ leukemia L625 ในสัตว์ทดลอง (Kutney, et al. , 1992)

- siphonoside จาก Siphonodon australis และ Euonymous europaeus (Wagner, Flitsch and Jurcic, 1981)

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของเปลือกลำต้นของ Glyptopetalum sclerocarpum M. Lawson. พบ 22 - hydroxytingenone หรือ tingenin B (Bavovada et al., 1990) มีสูตรโครงสร้างเป็น pentacyclic nortriterpene quinone methides ดังแสดงในรูปที่ 1 มีรายงานพบเฉพาะในพืชวงศ์ Celastraceae เท่านั้น สารอื่นที่สกัดได้ที่มีสูตรโครงสร้างแบบนี้และมีการรายงานว่าเป็น antitumour agents ได้แก่ celastrol pristimerine tingenin A (tingenone) 20-hydroxytingenone dispermoquinone iguesterin และ salacia quinone methide และมีการใช้ tingenin A ทางคลีนิกในประเทศบราซิล เพื่อรักษา skin cancer (Han and Whiting, 1972 ; Monache et al., 1979)

สำหรับ 22-hydroxytingenone นี้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ cytotoxicity พบว่า ให้ผลบวกเมื่อทดสอบกับ cell line หลายชนิด P-388 lymphocytic leukemia KB carcinoma of nasopharynx รวมทั้งเซลล์มะเร็งของมนุษย์ HT-1080 fibrosarcoma LU-1 lung cancer COL-2 colon cancer MEL-2 melanoma และ BC-1 breast cancer (Bavovada et al., 1990)

และมีรายงานการศึกษาถึงผลของ 22-hydroxytingenone ต่อเอนไซม์ HIV-1 และ HIV- 2 reverse transcriptase เพื่อพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อรักษาโรคเอดส์ พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้ (Tan et al. , 1991 ; Tan et al. , 1992)



$C_{28}H_{36}O_4$

รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 22-hydroxytingenone (น้ำหนักโมเลกุล 436.590)

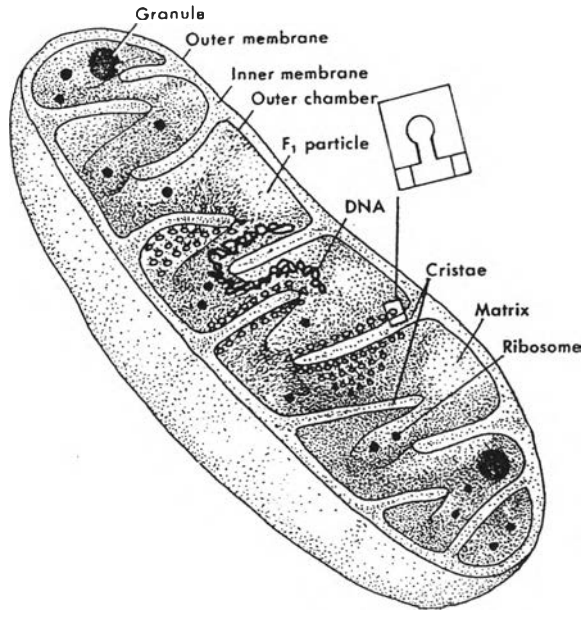
(Likhitwittayawuid et al., 1993)

การหายใจของไมโตคอนเดรียและกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน
(Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation)

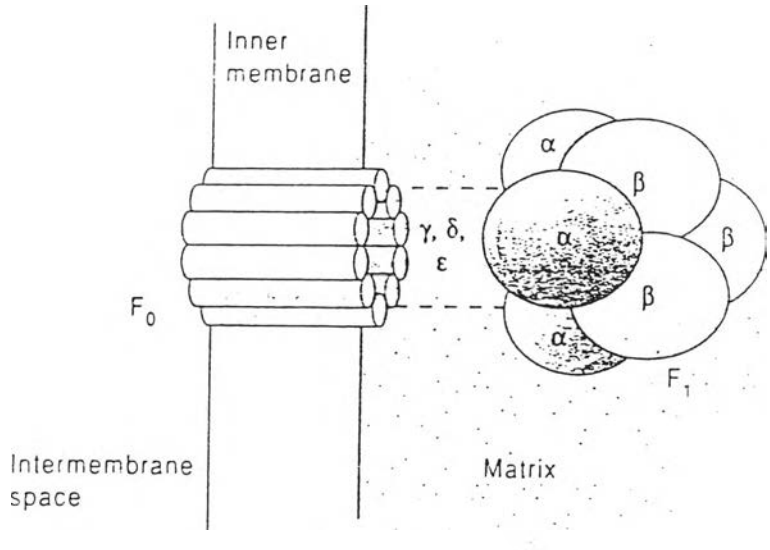
ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ที่สำคัญภายในเซลล์ เรียกได้ว่าเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (powerhouse of the cell) เพราะปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย เช่น ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดไขมัน (fatty acid oxidation) ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดอะมิโน (amino acid oxidation) ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) จะให้พลังงานออกมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic eukaryotic) (Avers, 1986)

รูปร่างของไมโตคอนเดรียจะแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ เช่น มีลักษณะกลม (football-shaped) ในเซลล์ตับ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) ในเซลล์ไตและใน fibroblasts มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (threadlike) บางครั้งอาจมีโครงสร้างที่ซับซ้อน (complex irregular structure) ในยีสต์ นอกจากนี้ขนาดและจำนวนที่พบจะแตกต่างกันไป มักพบไมโตคอนเดรียอยู่ใกล้กับโครงสร้างของเซลล์ที่ต้องการ ATP หรือใกล้กับแหล่งของเชื้อเพลิง(fuel) สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่าง ๆ (Lehninger, 1975) และแม้ว่าขนาด จำนวนรูปร่างจะแตกต่างกัน แต่โดยลักษณะรวม ๆ แล้วจะมีโครงสร้างที่สำคัญคล้ายคลึงกัน คือประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายใน ผนังชั้นในจะหุ้มล้อมรอบของเหลวที่มีลักษณะคล้ายเจล (gel) เรียกว่า matrix (รูปที่ 2)

ผนังชั้นนอกและผนังชั้นในมีความแตกต่างกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมี (chemical composition) permeability และเอนไซม์ (enzyme content) ผนังชั้นนอกจะมีลักษณะเป็นผิวเรียบ (smooth) หุ้มล้อมรอบผนังชั้นใน ประกอบด้วยสารจำพวกไขมันเป็นส่วนใหญ่ คุณสมบัติของผนังชั้นนอกจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 daltons เช่น ADP ATP sucrose รวมทั้งอิออนต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ เอนไซม์ที่อยู่ที่ผนังชั้นนอกคือ monoamine oxidase ซึ่งมักใช้เป็น marker enzyme ของผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย ผนังชั้นในจะยืดหยุ่น (elastic) และมีพื้นที่ผิวมากกว่า เนื่องจากมีการพับ (fold) เข้าไปใน matrix ซึ่งเรียกว่า cristae ผนังชั้นในจะประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และไขมันเป็นส่วนน้อย มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารและอิออนต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (impermeable) ดังนั้น การผ่านของสารจากไซโตซอล (cytosol) เข้าสู่ไมโตคอนเดรียจำเป็นต้องอาศัย โปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific protein carrier) (Lehninger, 1975; Sartorell, Erecinska and Wilson, 1981) ภายในผนังชั้นใน จะมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะ ได้แก่ respiratory chain enzyme



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของไมโตคอนเดรีย
(De Robertis and De Robertis, 1987)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase
(F_oF_1-ATPase) (Parson, 1993)

และ enzyme ATPsynthase อยู่ด้วยดังรายละเอียด (ตารางที่ 1) ส่วนใน matrix นอกจากจะประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์แล้วยังประกอบด้วย DNA, ribosome และเอนไซม์ที่ catalyze transcription และ translation ของยีน (Avers, 1986)

บริเวณของ cristae ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะเห็นโครงสร้างทรงกลมส่วนหนึ่งของ spherical knob หรือ headpieces ยื่นออกมาจากผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งพบว่าเป็นเอนไซม์ ATPase (รูปที่ 3) เรียกว่า F_1 (coupling factor one) มีน้ำหนักโมเลกุล 360,000-380,000 daltons มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน 5 subnit $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ และ ε ติดอยู่กับผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติเมื่อมี Mg^{2+} เอนไซม์นี้จะสลาย ATP ไปเป็น ADP+Pi อย่างช้า ๆ แต่จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP+Pi จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ATP synthase (รูปที่ 4) ส่วนของ F_1 นี้พบว่าไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin หรือ dicyclohexyl-carbodiimi ส่วนประกอบอีกส่วนหนึ่งของเอนไซม์ ATPase คือ F_0 (membrane sector) และ OSCP (oligomycin-sensitivity-confering protein) ซึ่งเป็น stalk sector ที่ทำให้ F_1 bind กับ F_0 ได้ F_0 ประกอบด้วย 3 subunit คือ a, b และ c ทำหน้าที่เป็น H^+ conducting channel ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเป็นส่วนที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย oligomycin (Senior, 1988; Futai, Noumi and Maeda, 1989; Parson, 1993)

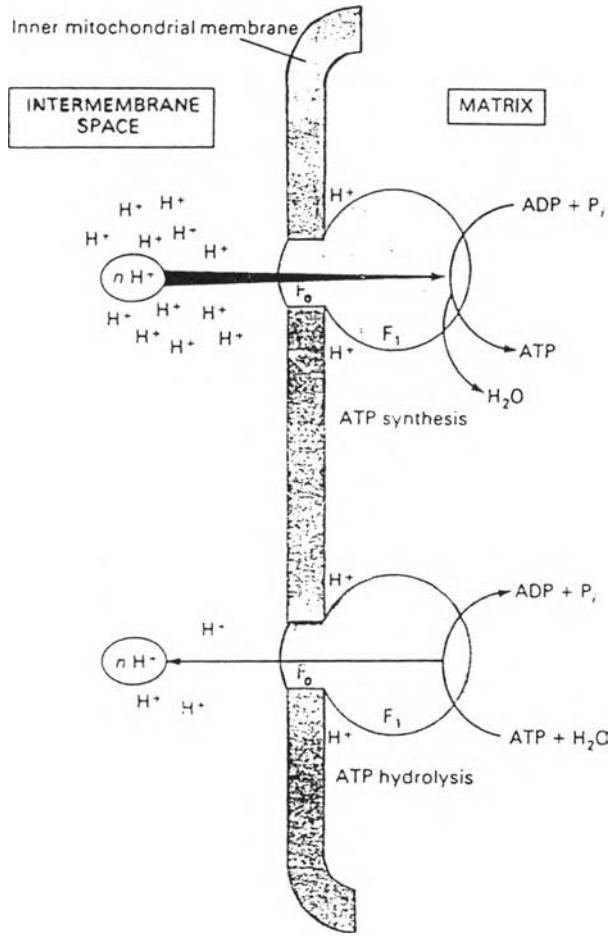
ภาพรวมของกระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโตคอนเดรียนั้น เริ่มจากสารอาหารต่าง ๆ ที่รับประทานเข้าไปได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ถูกย่อยสลายให้ได้สารโมเลกุลเล็ก เช่น โปรตีนถูกย่อยได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้เป็นกลูโคส และไขมันถูกย่อยจนได้กรดไขมัน (fatty acid) และสารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิสมเพื่อให้ได้ acetyl CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลาง(intermediate) ที่สำคัญ เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวัฏจักรเครปส์ สุดท้ายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และมีไฮโดรเจน (H) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) จะรีดิวซ์ (reduce) NAD^+ และ FAD ไปเป็น $NADH + H^+$ และ $FADH_2$ (Darnell, Lodish and Baltimore, 1986) ซึ่งเป็น reducing equivalents ที่สำคัญและจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยผ่านสารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิด (Lehninger, 1975) คือ

ตารางที่ 1 แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละส่วนของไมโตคอนเดรีย (Sheeler and Bianchi, 1987)

Outer membrance :
Monoamine oxidase
Fatty acid thiokinases
Kynurenine hydroxylase
Rotenone-insensitive cytochrome c reductase
Space between the membranes :
Adenylate kinase
Nucleoside diphosphokinase
Inner membrane :
Respiratory chain enzymes
∝-Ketoacid dehydrogenases
Succinate dehydrogenase
Carnitine fatty acyl transferase
Matrix :
Pyruvate dehydrogenase complex
Citrate synthase
Isocitrate dehydrogenase
Fumarase
Malate dehydrogenase
Aconitase
Glutamate dehydrogenase
Fatty acid oxidation enzymes

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของลูกโซ่หายใจ 4 complexes ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Avers, 1986)

complexes	components
I. NADH dehydrogenase complex	NAD
	FMN
	Iron sulfur(FeS) centers
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
II. Succinate dehydrogenase complex	FAD
	Iron sulfur (FeS) centers
	Cytochrome b_{558}
III.Cytochrome b-c_1 complex	Cytochrome b
	Cytochrome c_1
	Nonheme iron protien
	Coenzyme Q_{10}
	Phospholipids
IV.Cytochrome oxidase complex	Cytochrome a
	Cytochrome a_3
	Copper
	Phospholipids



รูปที่ 4 แสดง F_OF_1 ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP (De Robertis and De Robertis, 1987)

1. Pyridine- linked dehydrogenases ได้แก่ β-hydroxybutyrate dehydrogenase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase เป็นต้น ซึ่งต้องการ NAD^+ หรือ $NADP^+$ ตัวใดตัวหนึ่งเป็น coenzyme ยกเว้นglutamate dehydrogenaseที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง NAD^+ และ $NADP^+$

2. Flavin-linked dehydrogenases หรือเรียกอย่างหนึ่งว่า flavoprotein ประกอบด้วย FMN (flavin mononucleotide) หรือ FAD (flavin adenine dineucleotide) เป็น prosthetic groups ในการรับส่งอิเลคตรอน ได้แก่ NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenases, dihydrolipoyl dehydrogenase ซึ่ง Flavin-linked dehydrogenases จะแตกต่างจาก Pyridine-linked dehydrogenases ตรงที่จะ bound กับเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น prosthetic groups มากกว่าที่จะ bound กับ coenzyme

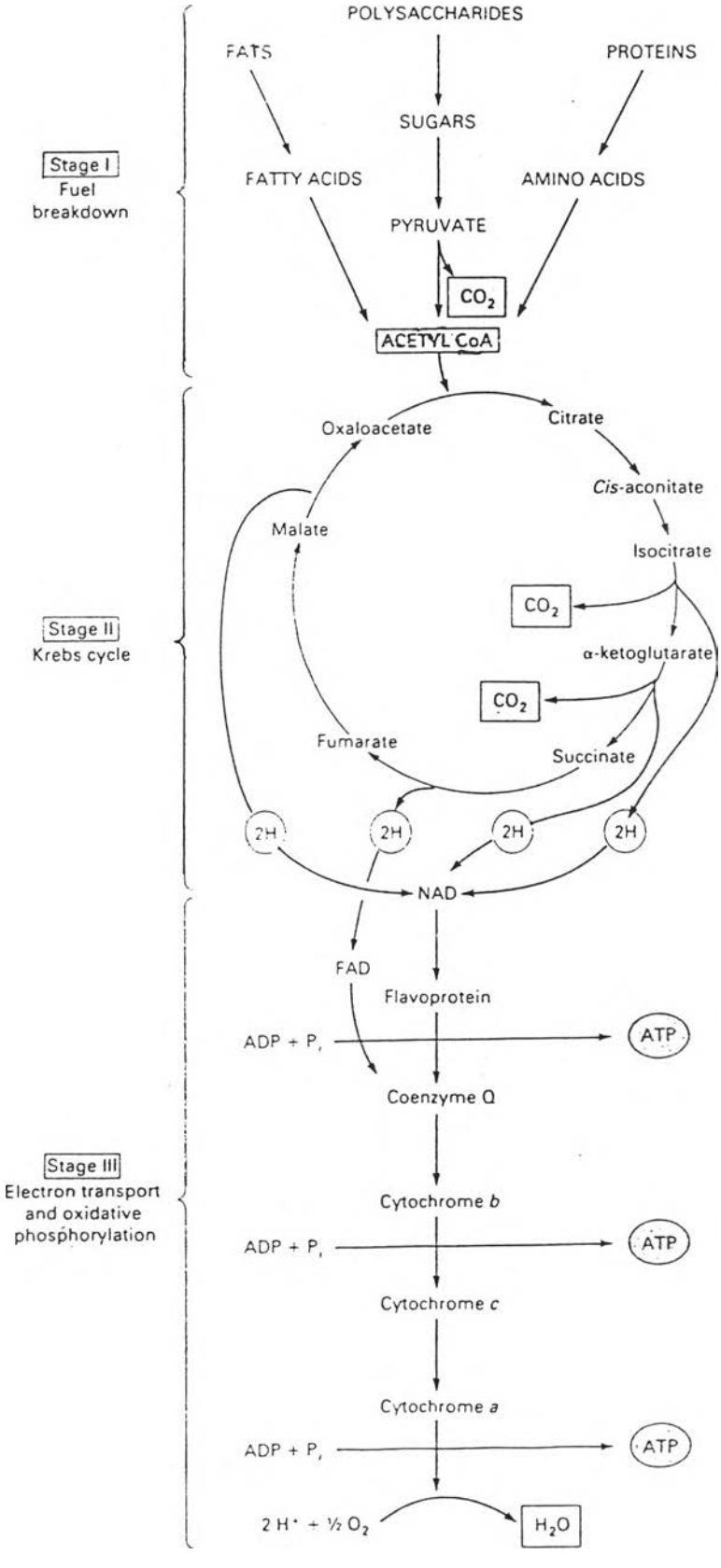
3. Iron-sulfur protein ประกอบด้วยเหล็ก (iron และ acid-labile sulfur)ได้แก่ ferredoxin

4. ระบบ cytochromes ประกอบด้วย iron-porphyrin เป็น prosthetic groups ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dehydrogenase systems ต่าง ๆ ไปยังโมเลกุลออกซิเจน ได้แก่ cytochromes b, c_1, c, a, a_3

5. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone

การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจเป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์พร้อมกับรับ H^+ กลายเป็นโมเลกุลของน้ำในที่สุด (รูปที่ 5)

สับสเตรทที่ไมโตคอนเดรียสามารถออกซิไดซ์และให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนเข้าสู่ตำแหน่งต่าง ๆ ของลูกโซ่การหายใจได้ แบ่งเป็น 2 พวก คือ NAD^+ - linked substrate เช่น glutamate, malate, pyruvate, α-ketoglutarate ซึ่งสับสเตรทเหล่านี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม(2H) ไปรีดิวซ์ NAD^+ ได้เป็น NADH + H^+ จะให้อิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจที่ complex I อีกพวกหนึ่งคือ FAD -linked substrate ได้แก่ succinate ไฮโดรเจนที่ถูกปลดปล่อยจะไปรีดิวซ์ FAD ได้เป็น $FADH_2$ ให้อิเลคตรอนแล้วเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง (Lehninger, 1975)



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle, respiratory chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (De Robertis and De Robertis, 1987)

นอกจากนี้ยังมีการแยกลูกโซ่การหายใจได้เป็น 4 complexes คือ (ตารางที่ 2) (Hatefi, 1985)

- complex I หรือ NADH : Ubiquinone Oxidoreductase ซึ่งจะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ไปยัง Ubiquinone, ferricyanide และ NAD

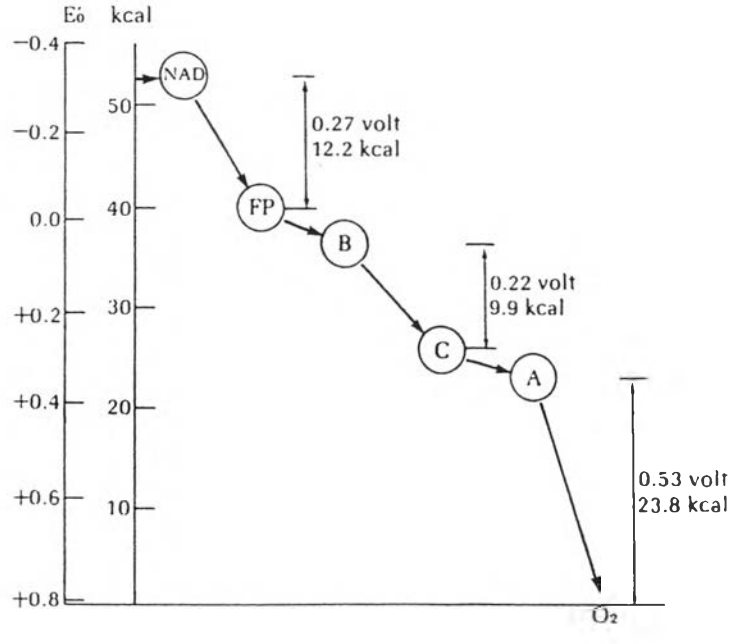
- complex II หรือ Succinate : Ubiquinone Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก Succinate ไปยัง Ubiquinone (coenzyme Q)

- complex III หรือ Ubiquinol : Cytochrome C Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก dihydroubiquinone (QH_2) ไปยัง cytochrome C และจะเกิดขึ้นควบคู่กับ transmembrane proton translocation แต่ละกลไกของการส่งผ่านอิเลคตรอนและ proton translocation ของ complex III นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

- complex IV หรือ Ferrocytochrome C : Oxygen Oxidoreductase จะ catalyzes การส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome C ไปยังโมเลกุลออกซิเจน

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจาก NADH หรือ $FADH_2$ ไปยังออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอนหลายชนิดจะมีการปลดปล่อยพลังงานอิสระ (free energy) ออกมาจำนวนหนึ่งซึ่งมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylated ของ ADP กระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นเรียกกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ในลูกโซ่การหายใจจะมีอยู่ 3 ตำแหน่งที่การปลดปล่อยพลังงานอิสระมีมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ตำแหน่งเหล่านี้แสดงไว้ในรูปที่ 6 ในสภาวะปกติพบว่าการส่งผ่านอิเลคตรอนและการสังเคราะห์ ATP จะต้องเกิดควบคู่กัน (tightly coupled) แต่ในบางกรณี ทั้งสองกระบวนการอาจเกิดแยกจากกันได้ เช่น กรณีที่ไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่ดี หรือเก็บไว้นานเกินไป(aging mitochondria) หรือกรณีที่ไมโตคอนเดรียได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers ตัวอย่างเช่น DNP (2,4-dinitrophenol) หรือ CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) ซึ่งสารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจน ในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจอย่างอิสระและรวดเร็วโดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า uncoupling (Lehninger, 1975)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการสังเคราะห์ ATP ในไมโตคอนเดรียนั้น จำเป็นต้องใช้พลังงานจากการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่กลไกที่แท้จริงในการนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าพลังงานที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน

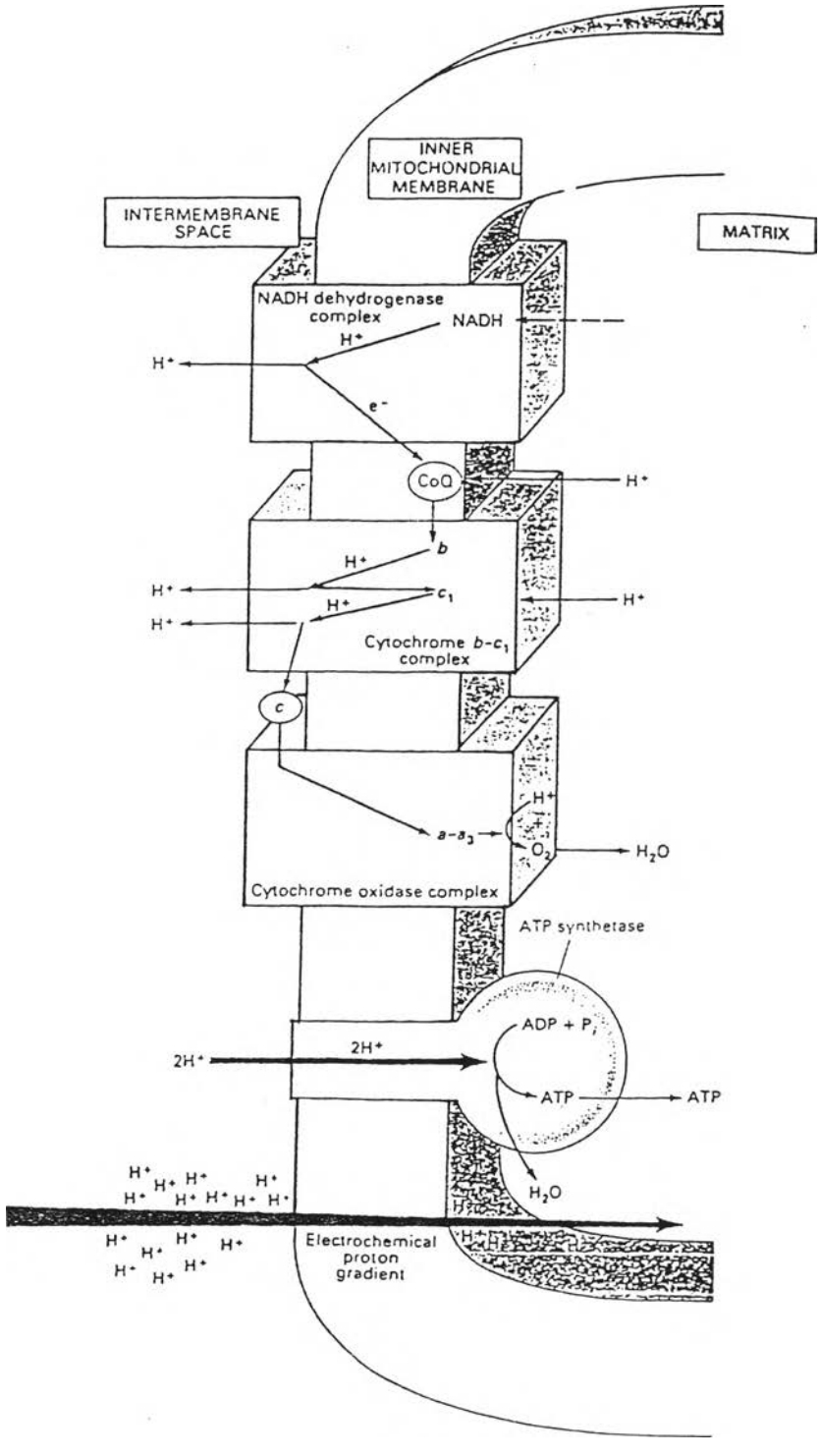


รูปที่ 6 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระ ในขณะที่อิเลคตรอนถูกส่งผ่านลูกโซ่การหายใจ (Avers, 1986)

ไปตามลูกโซ่การหายใจนั้น น่าจะมีการสงวนไว้ (conserved) ในรูปใดรูปหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ ATP ได้มีการเสนอแนวความคิดมากมาย เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์นี้ เช่น chemical coupling , conformational coupling และ chemiosmotic coupling hypothesis แต่ในปัจจุบันแนวความคิดที่เป็นที่ยอมรับ คือ " chemiosmotic coupling hypothesis " ซึ่งเสนอโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Peter Mitchell ในปี ค.ศ. 1961 (Boyer et al., 1977; Mitchell, 1977; Avers, 1986)

สาระสำคัญของ chemiosmotic coupling hypothesis มีดังนี้ ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) proton (H^+) จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียออกไปยัง intermembrane space ทำให้เกิด proton gradient ขึ้น จากการที่มีความแตกต่างของระดับ proton ระหว่าง matrix กับ intermembrane space และเนื่องจาก H^+ มีประจุบวกจึงทำให้มีความแตกต่างระหว่างประจุขึ้นที่ผนังชั้นในทำให้เกิด electrical gradient ซึ่งรวมเรียกว่า electrochemical gradient หรือ proton motive force และจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือสามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของโปรตอนได้ ซึ่ง electrochemical gradient จะเป็นส่วนที่ให้พลังงานและผลักดันให้มีการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi โดยโปรตอนจากภายนอกจะผ่านกลับเข้าสู่ matrix ทาง F_O และจะไปกระตุ้น F_1 ให้สร้าง ATP (รูปที่ 7)

จะเห็นว่า proton เป็นตัวสำคัญในการเชื่อมโยงการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจนหากมีการทำลาย proton - gradient (collapase proton gradient) โดยสารใด ๆ ก็ตาม จะทำให้เกิดอันคัปปลิง (uncoupling) ของไมโตคอนเดรีย เช่นกรณีของ aging mitochondria ที่มีโครงสร้างของผนังชั้นในบางส่วนถูกทำลาย หรือกรณีของ DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น proton - ionophore สามารถนำเอา proton (H^+) จากภายนอกเข้าไปใน matrix ได้โดยไม่ผ่าน F_OF_1 complex สารเหล่านี้จะทำให้ proton gradient เสียไปเป็นการทำลาย electrochemical gradient หรือ proton motive force ดังนั้นไมโตคอนเดรียจะพยายามสร้าง proton gradient ขึ้นมาใหม่ โดยการออกซิไดซ์สับสเตรทไปเรื่อย ๆ นั่นคือ ยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจแต่ไม่เกิด gradient หรือเกิดเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่เพียงพอในการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP ทำให้มีการสร้าง ATP ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย แม้ว่าไมโตคอนเดรียยังสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทและใช้ออกซิเจนในอัตราที่สูงกว่าปกติ พบว่าในสภาวะเช่นนี้ F_1 ซึ่งปกติจะกระตุ้นการสร้าง ATP กลับกระตุ้นให้มีการสลาย ATP (ATP hydrolysis) เพื่อผลักดันให้เกิด H^+ gradient อีกทางหนึ่ง ซึ่งผลในการกระตุ้นการสลาย ATP นี้เรียกว่า ATPase activity ดังนั้นจึงพบว่าสาร uncuoplers จะกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งในสภาวะปกติเอนไซม์นี้จะมี activity ต่ำ



รูปที่ 7 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Avers, 1986)

เนื่องจาก ATPsynthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (Danishefsky, 1980)

$$ATP + H_2O \xleftarrow{F_o\,F_1\text{- ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

ประเด็นต่อไปที่จะกล่าวถึง คือ เรื่องเกี่ยวกับสารที่มีผลต่อการทำงานของกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชันของไมโตคอนเดรีย หรือ สารที่มีผลในแง่ยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. สารจำพวก uncouplers ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น H^+-carrier หรือ proton-ionophores สามารถนำเอา H^+ จากภายนอกเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้อย่างอิสระ และทำลาย high-energy intermediated หรือ electrochemical gradient ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน ทำให้มีผลยับยั้งการ phosphorylated ของ ADP ไปเป็น ATP แต่ยังทำให้มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจได้ จึงพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน intact mitochondria จะเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มี ADP นอกจากนี้ ยังกระตุ้นการสลาย ATP ด้วย (Lehninger, 1975; Heytler, 1981)

สาร uncouplers ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน เป็นกรดอ่อน และในสูตรโครงสร้างมักมี aromatic ring อยู่ด้วย นักวิจัยสามารถแบ่งสาร uncouplers ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะทางเคมี และการออกฤทธิ์ (Heytler, 1981) ดังนี้

- Classical uncouplers หรือเรียกว่า DNP-like, true, weak-acid, direct และ H^+-ionophores uncoupler สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (weakly acid) ที่มี pKa ระหว่าง 4.5 ถึง 6.5 โดยที่กลุ่มที่เป็น acidic groups อาจจะเป็น phenolic hydroxyl heterocyclic-NH, amide, hydrazone-NH carboxyl, sulfhydryl group ก็ได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติละลายในไขมัน (lipophilic) สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ทำลาย proton- gradient โดยจะเป็นโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเป็นประจุ (unionize acid) ทำให้โปรตอนสามารถผ่านเข้าไปในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียได้โดยไม่ผ่าน H^+ - channel ของ F_0F_1 complex

- The alkali-metal ionophores ได้แก่พวก antibiotics เช่น gramicidin, tyrothricin, tyrocidin และ valinomycin การออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ คือ นำเอา cation เช่น K^+ ในกรณีของ valinomycin ผ่านเข้าในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียทำให้เกิดการสลายของ transmembrane electrochemical gradients ที่จำเป็นสำหรับการควบคู่ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย กล่าวคือ พลังงานที่ได้จากการออกซิไดซ์ของสับสเตรทจะถูกนำไปใช้ในการ transport นำ cation เข้าสู่ไมโตคอนเดรีย แทนที่จะใช้สังเคราะห์ ATP

- Indirect uncouplers เป็นสารที่ทำให้เกิดอันคัปปลิงได้ด้วยกลไกต่าง ๆ กัน เช่น picrate และ desaspidin จะจับกับโปรตีนเฉพาะ (specific protein) ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP (F_1 factor) แล้วทำให้เกิดอันคัปปลิงโดยเฉพาะ desaspidin ซึ่งมี phenolic groups อยู่ในโครงสร้างสามารถจับกับโปรตีนได้ถึง 0.7 นาโนโมลต่อ มก. โปรตีน ส่วน arsenite ทำให้เกิดอันคัปปลิงโดยจับกับ sulfhydryl groups อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่ม indirect uncouplers นี้จะไม่มีผลกระตุ้น ATPase activity

2. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดฟอสฟอริลเลชัน หรือการสังเคราะห์ ATP ได้แก่

- Oligomycin ซึ่งจะมีผลยับยั้งที่ F_0 ของเอนไซม์ ATPsynthase ทำให้ยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน รวมทั้งการใช้ออกซิเจน แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนได้เมื่อไมโตคอนเดรียอยู่ในสภาวะอันคัปปลิง (Senior, 1973)

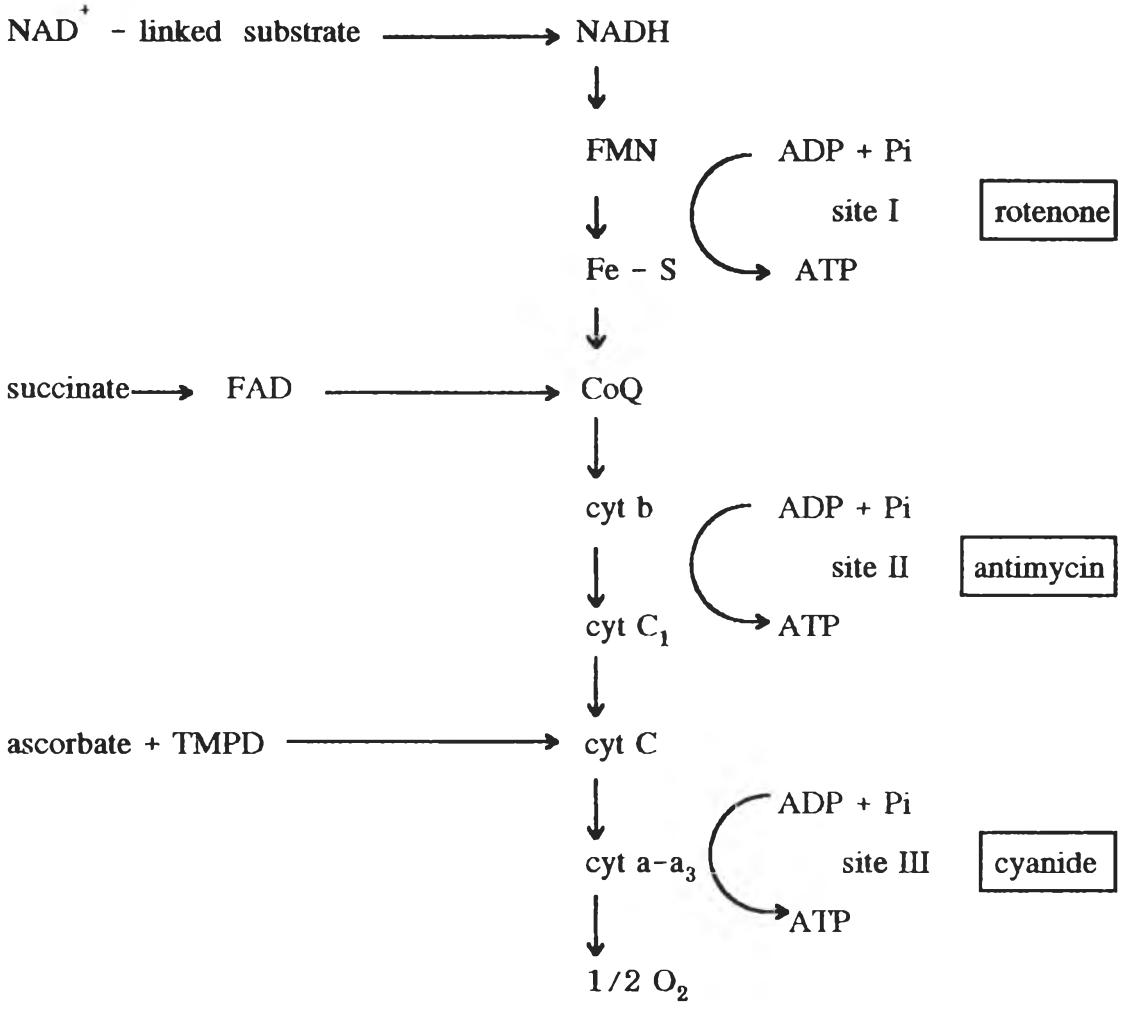
- Atractyloside จะยับยั้ง adenine nucleotide translocator ซึ่งทำหน้าที่เป็น carrier ในการขนส่ง ADP จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้ขาด ADP สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Lehninger, 1975)

- DTNB (5, 5′-dithio-bis-2-nitrobenzoate) เป็น aromatic disulfide ยับยั้งการส่งผ่าน Pi จากภายนอกเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย โดยไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl groups (-SH groups) ที่อยู่บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ทำให้ขาด Pi ในการทำปฏิกิริยา (Haugaard et al., 1969)

3. สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Danishefsky, 1980 ; Hatefi, 1985) (รูปที่ 8) ได้แก่

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH dehydrogenase ไปยัง coenzyme Q (site I) ได้แก่ rotenone, amytal, barbiturates, dimerol และ mercurials ดังนั้นสารประเภทนี้จึงยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนที่ site I แต่ไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ใช้ succinate เป็นสับสเตรท เนื่องจาก succinate จะส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ coenzyme Q โดยตรง

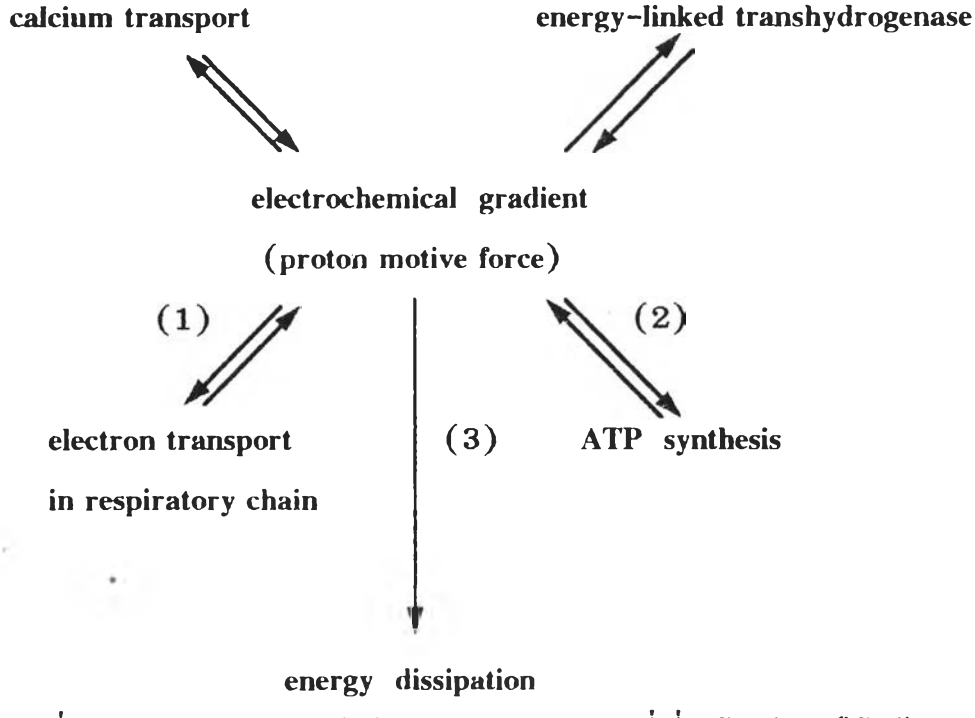
- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c (site II) ได้แก่ 2-thenoyltrifluoroacetone, antimycin แต่จะไม่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในกรณีที่ใช้สับสเตรทเป็น Ascorbate+TMPD ซึ่งส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง



รูปที่ 8 แสดงถึงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจ โดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอน ในลูกโซ่การหายใจ (Hatefi, 1985)

- สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน (site III) ได้แก่ cyanide, azide และ carbon monoxide ซึ่งจะไปยับยั้งที่ cytochrome oxidase (cytochrome aa_3) นั่นคือ ถ้ามีการยับยั้งที่ตำแหน่งนี้จะไม่สามารถส่งผ่านอิเลคตรอนไปยังออกซิเจนได้ และไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP ไม่ว่าจะใช้สับสเตรทชนิดใดก็ตาม

ประเด็นสุดท้ายที่จะขอกล่าวในบทนี้ คือ เรื่องเกี่ยวกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถสงวนไว้ซึ่งอยู่ในรูป electrochemical gradient หรือ proton motive force ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงที่ไมโตคอนเดรียสงวนไว้จากการส่งผ่านอิเลคตรอน นอกจากจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP แล้ว ยังสามารถใช้ในกระบวนการอื่น ๆ ได้ เช่น ใช้ในการขนส่งอิออน (ions) ต่าง ๆ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} ,Na^{+} , K^{+} ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การสะสมแคลเซียม และปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของ $NADP^{+}$ โดย NADH ซึ่งเรียกว่า transhydrogenation เป็นต้น ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ เหล่านี้สามารถแสดงได้ดังแผนภาพในรูปที่ 9 (Hanstein, 1976; Lehninger, 1975 ; Daniskefsky, 1980)



รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่ไมโตคอนเดรียสามารถ สงวนไว้ (high energy electrochemical gradient) และตำแหน่งต่าง ๆ ที่ตัวยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียไปออกฤทธิ์ (1) สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนบนลูกโซ่การหายใจ (2) สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP + Pi เช่น oligomycin, atractyloside และ DTNB (3) สารที่มีฤทธิ์อันคัปปลิง เช่น DNP และ CCCP (Hanstein, 1976)

เหตุจูงใจในการนำสาร 22-ไฮดรอกซีทิงจิโนนที่สกัดจากแฮนคอค่ำใหญ่มาวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากสารตัวนี้ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอยู่ไม่มากนัก และไม่มีรายงานการศึกษาผลของสารต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย มีเพียงรายงานว่ามีพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง โดยกลไกการออกฤทธิ์นี้ น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างพลังงานที่เกิดขึ้นจากการทำหน้าที่ตามปกติของไมโตคอนเดรีย เพราะหากสารใดมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียก็จะส่งผลถึง cellular system ของสิ่งมีชีวิตด้วย การศึกษานี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ข้อมูลที่ได้รับเพิ่มเติมจากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อประกอบการพิจารณาในการที่จะนำสารสกัดนี้มาใช้เป็นยาในทางคลินิกต่อไปในอนาคต