

ผลของบาราคอลต่อไซโตโครมพี 450 ยูดีพี-กลูคูโรนิลทรานสเฟอเรสและกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส
ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว



นางสาวเหมวลา เชิดชูพันธ์เสรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1943-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF BARAKOL ON CYTOCHROME P450,UDP-GLUCURONYLTRANSFERASE AND
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES



Miss Hemvala Chirdchupunsare

สภามหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Inter-Departmental Program in Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1943-4

นางสาวเหมวลา เชิดชูพันธ์เสรี : ผลของบาราคอลต่อไซโตโครมพี 450 ยูดีพี-กลูคูโรนิล ทรานสเฟอเรส และ กลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (EFFECT OF BARAKOL ON CYTOCHROME P450 , UDP-GLUCURONYLTRANSFERASE AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน , 70 หน้า. ISBN 974-17-1943-4

ทำการศึกษาผลของบาราคอลในความเข้มข้นต่างๆ (0.025,0.05,0.075,0.10 และ0.15 mM) ที่มีโดยตรงต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกจากหนูขาว โดยตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ใน phase I คือ aminopyrine N-demethylase (CYP2B,2C) และเอนไซม์ใน phase II คือ UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase รวมทั้งศึกษาผลที่อาจเกิดพิษต่อเซลล์ตับในขนาดที่ใช้ โดยวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ transaminase (ALT,AST) ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ ปริมาณของ reduced glutathione ที่อยู่ในเซลล์ และการเกิด lipid peroxidation (ปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น) ผลการทดลองพบว่าบาราคอลในทุกความเข้มข้นมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ aminopyrine N-demethylase และ glutathione S-transferase พร้อมกับมีผลลดการทำงานของ UDP-glucuronyltransferase ปริมาณของเอนไซม์ ALT และ AST รวมทั้ง GSH เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับบาราคอลในความเข้มข้นสูงเท่านั้น (0.10 และ 0.15 mM) แต่ไม่พบความแตกต่างของ MDA ที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองสรุปได้ว่าบาราคอลทำให้เกิดพิษต่อดับได้ในขนาดสูง โดยไม่สัมพันธ์กับการเกิด lipid peroxidation และอาจเกี่ยวข้องต่อการทำงานของเอนไซม์ใน phase I และ phase II

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อผู้คิด.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4389114020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORDS : BARAKOL / CYTOCHROME P450 / UDP-GLUCURONYLTRANSFERASE /
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE

HEMVALA CHIRDCHUPUNSARE : EFFECT OF BARAKOL ON CYTOCHROME
P450 , UDP-GLUCURONYLTRANSFERASE AND GLUTATHIONE S-
TRANSFERASE IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES. THESIS ADVISOR :
ASSOC.PROF.DR. PORNPEN PRAMYOTHIN , 70 pp. ISBN 974-17-1943-4.

Effect of barakol at various concentrations (0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 and 0.15mM) was studied directly in isolated rat hepatocytes by determining the activities of phase I enzyme , aminopyrine N-demethylase (CYP2B,2C), and phase II enzymes including UDP-glucuronyltransferase and glutathione S-transferase. The release of cellular transaminase (ALT,AST) , the reduced glutathione (GSH) contents and the extent of lipid peroxidation (as indicated by malondialdehyde (MDA) formation) were also measured and regarded as the cytotoxic criteria. Results indicated that barakol at all concentrations studied, increased the activities of aminopyrine N-demethylase and glutathione S-transferase with the reduction in UDP-glucuronyltransferase activity. Increase in the release of ALT,AST and GSH contents were found only with high concentrations of barakol (0.10 and 0.15 mM). There was no change in MDA formation. In conclusion, cytotoxicity induced by high concentrations of barakol may involve the activities of certain phase I and phase II enzymes but not the lipid peroxidation.

Inter-Department Pharmacology

Field of study Pharmacology

Academic year 2002

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ทุกๆด้าน ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและสังเคราะห์สาร นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา กล้ากสิกิจ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการใช้เครื่องมือในการทำวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์บัณฑิตศึกษา สหสาขาวิชาเภสัช ที่กรุณาให้ความรู้ตลอด การศึกษาระดับปริญญาโทบัณฑิต และขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวัชรภรณ์ เทวกุล ณ อยุธยา ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการทำการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา - มารดา ที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้าน การศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆและบุคคลอื่นทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ชี้เหล็ก	5
barakol(บาราคอล).....	6
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและคลินิกของ barakol.....	8
ตับและกระบวนการเมตาบอลิซึมของตับ.....	11
กลไกการเกิดพิษต่อตับ.....	26
บทบาทของ Glutathione (GSH).....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	45
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	54
รายการอ้างอิง.....	58

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	63
ประวัติผู้เขียน.....	70



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลของผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบจากยาสมุนไพรซีเหล็ก.....	3
ตารางที่ 2 การกระจายของ Cytochrome P450 และ glutathione S-transferase.....	15
ในอวัยวะต่างๆของหนูขาว	
ตารางที่ 3 Receptors Mediating the Induction of P450 Enzymes.....	20
ตารางที่ 4 Conjugation reactions.....	23
ตารางที่ 5 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ.....	64
aminopyrine N-demethylase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	
ตารางที่ 6 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ.....	65
UDP-glucuronyltransferase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	
ตารางที่ 7 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ.....	66
glutathione S-transferase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	
ตารางที่ 8 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ.....	67
เอนไซม์ transaminase (ALT & AST) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	
ตารางที่ 9 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อระดับ...68	68
reduced glutathione contents (GSH) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	
ตารางที่ 10 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ.....69	69
การเกิด lipid peroxidation ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว	

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 <i>Cassia siamea</i> , Lamk.....	5
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ barakol.....	6
รูปที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนของ anhydrobarakol hydrochloride เป็น..... barakol	7
รูปที่ 4 โครงสร้างของหลอดเลือดที่มายังตับ.....	12
รูปที่ 5 การติดต่อระหว่างเลือดและเซลล์ตับผ่านทาง space of Disse.....	13
รูปที่ 6 Cross-section of hepatocyte.....	13
รูปที่ 7 การแบ่งเซลล์ตับโดยอาศัยระยะห่างจากหลอดเลือดที่มาเลี้ยง.....	14
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม, การกำจัดสารพิษ..... และการเกิดพิษภายในร่างกายจากการได้รับยาหรือสารเคมีจากภายนอก	16
รูปที่ 9 NADPH-cytochrome P450 electron transport system.....	18
รูปที่ 10 กลไกการทำงานที่น่าจะเป็นไปได้ของ Cytochrome P450..... ใน mixed function oxidation	22
รูปที่ 11 ปฏิกิริยาการเกิด glutathione conjugation ของ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene..... ซึ่งถูกกระตุ้นโดย glutathione S-transferase	26
รูปที่ 12 กระบวนการเกิด lipid peroxidation.....	29

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1 Aminopyrine N-demethylase activity.....	47
แผนภูมิที่ 2 UDP-glucuronyltransferase activity.....	48
แผนภูมิที่ 3 Glutathione S-transferase activity.....	49
แผนภูมิที่ 4 Alanine aminotransferase activity.....	50
แผนภูมิที่ 5 Aspartate aminotransferase activity.....	51
แผนภูมิที่ 6 Reduced glutathione content.....	52
แผนภูมิที่ 7 Lipid peroxidation	53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANH = Aniline hydroxylase

AMD = Aminopyrine N-demethylase

ALT = Alanine aminotransferase

AST = Aspartate aminotransferase

CYP450 = Cytochrome P450

equiv. = equivalence

GSH = Reduced glutathione

GSSG = Glutathione disulfide

GST = Glutathione S-transferase

mM = millimolar

MDA = Malondialdehyde

NADPH = Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

RER = Rough endoplasmic reticulum

RNA = Ribonucleic acid

SER = Smooth endoplasmic reticulum

UDP = Uridine diphosphate

UGT= UDP-glucuronyltransferase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการแพทย์ทางเลือกหรือ alternative medicine มีแนวโน้มในการนำมาใช้เพิ่มขึ้น การนำสมุนไพรมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคจึงมีบทบาทเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในสภาพเศรษฐกิจและสังคมไทยในปัจจุบัน สมุนไพรไทยมีอยู่หลากหลายชนิดการจะนำมาใช้จึงควรพิจารณาและศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบสำคัญที่พบในยาสมุนไพร , ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา , ขบวนการเมตาบอลิซึมของยา , การทดสอบพิษและการติดตามผลที่เกิดขึ้นหลังการใช้ยาเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้

ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของส่วนสกัดจากพืชที่เป็นสมุนไพรพบว่าพืชหลายชนิดที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรืออาจมีน้อยมาก แต่ในทางตรงข้ามกลับมีฤทธิ์ด้านการเกิดการกลายพันธุ์ของสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หลายชนิดต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และพบว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดเช่น ใบขี้เหล็ก , ใบยอ ฯลฯ สามารถต้านฤทธิ์การเกิดการกลายพันธุ์จาก indirect mutagen เช่น Aflatoxin B₁ (AFB₁) และ benzo(a)pyrene (BP) ได้ (Tepsuwan and Kusamran, 1997) ซึ่งขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหรือยาที่ได้รับจากภายนอกได้เข้ามามีบทบาทที่สำคัญในการส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

กระบวนการเมตาบอลิซึมของยา (drug metabolism) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารที่ได้รับจากภายนอก (xenobiotics) ทั้งสารจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ กระบวนการ drug metabolism เป็นแบบ biphasic ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยา phase I และ phase II (Phase I & Phase II reactions) ใน phase I เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง functional group ภายในโมเลกุลของสารให้อยู่ในรูปที่มีขั้วและพร้อมที่จะถูกขับออกจากร่างกายหรือเป็นการเตรียมสารสำหรับปฏิกิริยา phase II ต่อไป โดยเมตาบอลิซึมที่ได้จะมีฤทธิ์หรือพิษมากขึ้น ซึ่งจะก่อให้เกิดพิษจากสารนั้นๆ ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึมในปฏิกิริยา phase I นี้อาจจัดได้ว่าเป็นกระบวนการที่กระตุ้นทำให้เกิดสารก่อมะเร็งให้ออกฤทธิ์ได้ ในปฏิกิริยา phase I นี้จะอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญในการทำงานได้แก่ กลุ่ม monooxygenases ซึ่งต้องใช้ Cytochrome P450 ในการทำงาน ส่วนในปฏิกิริยา phase II หรือปฏิกิริยา conjugation นี้เป็นปฏิกิริยาสังเคราะห์เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ดี ทำให้ถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดีหรือ

ปัสสาวะ ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดกระบวนการทำลายพิษหรือกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (detoxification) โดยในปฏิกิริยา phase II นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ glutathione S-transferase (GST) , UDP-glucuronyltransferase (UGT) ฯลฯ

Barakol เป็นสารสำคัญกลุ่ม chromone ซึ่งสกัดได้จากใบอ่อนและดอกของ ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Lamk.) มีการศึกษาทั้งทางด้านเภสัชวิทยาและคลินิก พบว่าสารสำคัญนี้มีฤทธิ์กีดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางเมื่อให้โดยการฉีดและกินในหนูตะเภา และยังสามารถชักนำการนอนหลับ ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทและมีพิษน้อยมากในคนและสัตว์ทดลอง (Arunluksana, 1949)

ในการศึกษาผลของสาร barakol ต่อขบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์ทดลองโดยศึกษาผลต่อระดับเอนไซม์ Cytochrome P450 ได้แก่ aniline hydroxylase , aminopyrine N-demethylase (phase I enzyme) และเอนไซม์ใน phase II ได้แก่ glutathione S-transferase (GST) , UDP-glucuronyltransferase (UGT) โดยผสมใบขี้เหล็กในอาหาร 5% ให้หนูทดลองกินเป็นเวลา 14 วันผลการทดลองพบว่าใบขี้เหล็กมีผลทำให้ระดับของเอนไซม์ใน phase I ได้แก่ aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase ลดลง ส่วนระดับของเอนไซม์ใน phase II ได้แก่ glutathione S-transferase , UDP-glucuronyltransferase เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tepsuwan and Kusamran, 1997)

ต่อมาได้มีการศึกษาถึงศักยภาพในการต้านมะเร็งของใบขี้เหล็ก โดยการศึกษาในหนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley เพศเมียที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านม โดยได้รับ 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) ผลการศึกษาพบว่าในหนูที่ได้รับอาหารที่ผสมใบขี้เหล็ก 2.5 % และ 4 % มีผลลดการเกิดก้อนเนื้อที่เต้านมและยังลดพัฒนาการของการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อออกให้ช้าลงได้ นอกจากนี้พบว่าในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมใบขี้เหล็ก 4% ยังมีอุบัติการณ์เกิดของก้อนเนื้อออกลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Tepsuwan , Kupradinun, and Kusamran, 1999)

นอกจากนี้มีการศึกษาถึงผลของการได้รับสาร barakol แบบกึ่งเรื้อรังต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 ได้แก่ CYP1A1 , CYP1A2 , CYP2B1/2B2 และ CYP2E1 รวมถึงเอนไซม์ glutathione S-transferase ในตับของหนูขาว โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับอาหารปกติและหนูที่ได้รับอาหารคลอโรสเตรอรอลสูง ซึ่งพบว่าสาร barakol มีผลลดสมรรถนะของ CYP1A2 อย่างมีนัยสำคัญในหนูทั้งสองกลุ่มและเช่นเดียวกับ CYP1A1 ในหนูที่ได้รับอาหารคลอโรสเตรอรอลสูง

ส่วนผลของสารต่อ CYP2B1/2B2 , CYP2E1 และ glutathione S-transferase ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Maniratanachote, 2001)

ในปี พ.ศ.2540 องค์การเภสัชกรรมนำสมุนไพรซี่เหล็กมาแปรรูปผลิตเป็นยาเม็ดออกมาจำหน่ายเพื่อใช้ในการรักษาภาวะนอนหลับยาก พบว่าทำให้เกิดผลข้างเคียงทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในผู้ป่วยจำนวน 9 ราย ซึ่งระดับความรุนแรงที่เกิดขึ้นมีตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงมีอาการของโรคมาก (ตารางที่ 1) โดยยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลโดยตรงของสาร barakol หรือสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบ(สมบัติ ตริประเสริฐสุข,มงคล หงษ์ศิริวิรัช และอนุชิต จูฑะพุทธิ, 2542)

ตารางที่ 1 ข้อมูลของผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบจากยาสมุนไพรซี่เหล็กจำนวน 9 ราย ในปี พ.ศ.2542 ของโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (สมบัติ ตริประเสริฐสุข และคณะ, 2542)

รายที่	อายุ	เพศ	ระยะเวลา (วัน) ที่ได้รับยาซี่เหล็ก	ขนาดยา (มก.) ซี่เหล็กต่อวัน	อาการตัว-ตาเหลือง อ่อนเพลีย	ค่าสูงสุดของ SGPT (ยูนิต/ลิตร)	ค่าสูงสุดของ Tb/Db (มก./ดล.)	ค่าการทำงานของตับ SGPT และ Tb เป็นปกติ ในระยะเวลา (สัปดาห์)
1	60	หญิง	60	20	มีอาการ	1146	15/12	23
2	61	ชาย	21	20-30	มีอาการ	1076	1.87/1.31	4
3	81	หญิง	150	10	ไม่มีอาการ	127	0.8/0.4	4
4	30	หญิง	30	20	ไม่มีอาการ	643	0.6/0.3	4
5	49	หญิง	3	20-40	มีอาการ	432	7.8/4.6	4
6	63	หญิง	90	20	มีอาการ	740	3.9/3.0	6
7	29	หญิง	120	20	มีอาการ	934	7/6.1	3
8	55	หญิง	30	20	มีอาการ	779	7.5/5.5	6
9	50	หญิง	180	20	มีอาการ	413	1/0.7	2

Tb = Total bilirubin

Db = Direct bilirubin,

* คือรายที่มีการทดลองใช้ยาซี่เหล็กซ้ำหลังจากมีอาการของภาวะตับอักเสบแล้วเกิดอาการซ้ำใหม่

อย่างไรก็ตามข้อมูลในการทำวิจัยในด้านเมตาบอลิซึมของสาร barakol นี้ยังมีน้อย ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่มักจะทำการศึกษาในรูปแบบ in vivo โดยการให้หนูทดลองกินยาในรูปแบบของใบซี่เหล็กผสมกับอาหาร หรือการป้อนสาร barakol แล้วดูผลของสารที่มีต่อตับและการเปลี่ยนแปลงค่าชีวเคมีในเลือด

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในรูปแบบของ in vitro ทำการศึกษาในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (isolated rat hepatocytes) เพื่อศึกษาผลของ barakol ต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ตับโดยตรง ซึ่งดูผลที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยา phase I ได้แก่ aminopyrine N-demethylase(CYP2B,2C)และเอนไซม์ในปฏิกิริยา phase II ได้แก่ UDP-glucuronyltransferase

และ glutathione S-transferase นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของ barakol ที่มีต่อตับโดยตรวจหา เอนไซม์ ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ตับและจะถูกปล่อยออกมาเมื่อเกิดอันตรายต่อเซลล์ตับ ได้แก่ alanine aminotransferase (ALT:glutamic pyruvic transaminase;GPT) และ aspartate aminotransferase (AST:glutamic oxaloacetic transaminase;GOT) รวมทั้งตรวจวัดผลการเกิด malondialdehyde (MDA) ของขบวนการ lipid peroxidation และการตรวจวัดปริมาณของ reduced glutathione (GSH)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ barakol ต่อการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 , UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาวและวิเคราะห์หาปริมาณของ reduced glutathione (GSH) , malondialdehyde (MDA) และ alanine aminotransferase (ALT) & aspartate aminotransferase (AST) activity

สมมติฐานการวิจัย

Barakol มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 , UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาวและมีผลต่อปริมาณของ reduced glutathione (GSH) , malondialdehyde (MDA) และ alanine aminotransferase (ALT) & aspartate aminotransferase (AST) activity

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความรู้เกี่ยวกับผลของ barakol ต่อเซลล์ตับอิสระของหนูขาวและผลของสารต่อการทำงานของ Cytochrome P450 , UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี หรือมลพิษหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม ทำให้ได้รับองค์ความรู้ใหม่อันเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ barakol ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ซีเหล็ก

ซีเหล็ก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Cassia siamea* Lamk. อยู่ในวงศ์ Leguminosae พบได้ในป่าเบญจพรรณทั่วไป ในบริเวณแถบอากาศค่อนข้างร้อน ในประเทศไทยมีชื่อท้องถิ่นที่ต่างกัน ได้แก่ ซีเหล็กแก่น (ราชบุรี), ซีเหล็กบ้าน (ลำปาง, สุราษฎร์ธานี), ซีเหล็กหลวง (ภาคเหนือ), ซีเหล็กใหญ่ (ภาคกลาง), ผักจี้ลี่ (ฉาน-แม่ฮ่องสอน), ซีเหล็กจิหรี (ภาคใต้) และ ยะหา (มาเลเซีย-ปัตตานี) ส่วนชื่ออังกฤษได้แก่ Capsod tree , Thai copper pod (Royal Forest Department, 1948: 71)

ลักษณะของต้นซีเหล็กเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ใบประกอบแบบขนนกออกเรียงตรงข้ามกัน ใบย่อยรูปไข่มนขนาดเล็ก ดอกช่อสีเหลือง ฝักแบนยาวเมื่อแก่จัดแตกออกได้ ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด (รูปที่ 1) คนไทยได้นำส่วนของใบและดอกมาทำอาหาร เช่น แกงซีเหล็ก แกงบวน ซึ่งใบและดอกมีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านให้พลังงาน เส้นใย แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เบต้า-แคโรทีน และวิตามินชนิดต่างๆ



รูปที่ 1 *Cassia siamea* Lamk.

ในตำรายาแผนโบราณได้นำส่วนต่างๆของซีเหล็กมาทำเป็นยา ได้แก่ ใบใช้สำหรับรักษาอาการนอนไม่หลับ , เบาหวาน , เป็นยาขับปัสสาวะ , ยาระบาย , ยาลดความดันโลหิต ,

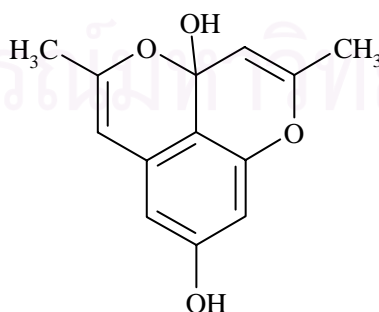
ยาถ่ายพยาธิ ดอกชี่เหล็กใช้รักษาอาการนอนไม่หลับ , หอบหืด , แก้วรงค์แค เปลือกฝักใช้รักษาเส้นเอ็นตึง เปลือกต้นใช้รักษาโรคผิวหนัง , โรคหิด แก่นใช้เป็นยาระบาย, ขับปัสสาวะ , ถ่ายพยาธิ รากใช้รักษาไข้, แก้ไข้กลับ, ไข้ซ้ำ (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

นอกจากนี้มีการศึกษาถึงสารเคมีที่พบได้ในใบและดอกของชี่เหล็ก พบว่ามีสารกลุ่ม chromone ซึ่งเป็นสารสำคัญ มีฤทธิ์คลายเครียดและช่วยให้นอนหลับ ได้แก่ barakol และพบว่ามีสารในกลุ่มของ anthraquinones เช่น aloe-emodin , rhein-8-monoglucoside , rhein , chrysophanic acid , anthrone , dianthrone , chrysophanol (Tutin, 1914) ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยให้ถ่าย , ระบายท้อง โดยสาร barakol เองนั้นไม่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (สมคิด รัตนจรัสกุล, สมศักดิ์ ชุตติศิลป์ และ เอกสิทธิ์ ศรีเสกสรร, 2524)

Barakol (บาราคอล)

Barakol เป็นสารสำคัญซึ่งสกัดได้จากใบอ่อนและดอกของชี่เหล็ก (*Cassia siamea* Lamk.) ในการศึกษาเริ่มแรกโดยคณะวิจัยมหาวิทยาลัย Nottingham ประเทศอังกฤษได้สกัดสารจากต้น *C. siamea* พบว่า สารนี้เป็นอนุพันธ์ของ dioxaphenalene ซึ่งเป็น chromone ชนิดหนึ่ง และให้ชื่อว่า barakol (Hassanali-Waliji, King, and Wallwork, 1969)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาโดย รศ.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ แห่งภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการศึกษาทางพิษเคมีของใบชี่เหล็กและสกัดสารสำคัญจากใบอ่อนของชี่เหล็กได้สารผลึกรูปเข็มสีเหลืองของ barakol โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ 3 α ,4-dihydro-3 α ,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่ามี barakol ในปริมาณร้อยละ 0.1 (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2521)

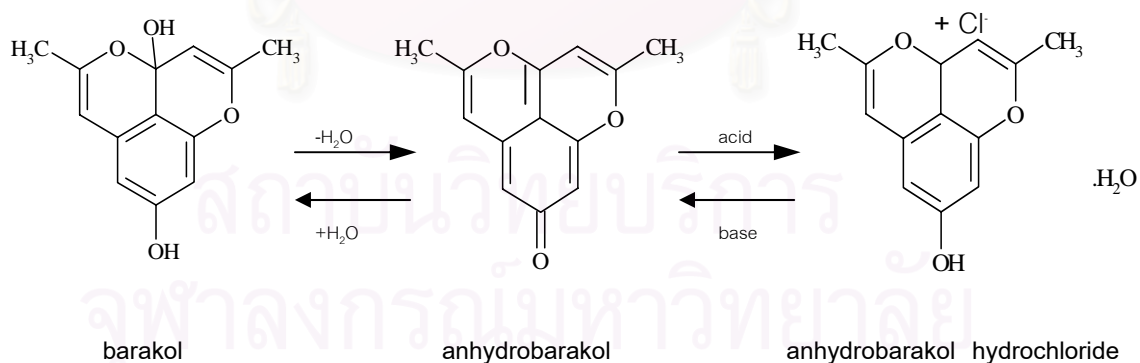


รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ barakol (3 α ,4-dihydro-3 α ,8-dihydroxy-2,5-dimethyl - 1,4-dioxaphenalene) (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2521)

ในการศึกษาถึงความคงตัวของสาร barakol พบว่าเมื่อสารอยู่ในรูปของ barakol เองนั้นจะไม่มี ความคงตัวโดยเมื่อสูญเสีย น้ำออกจากโมเลกุลจะถูกเปลี่ยนจาก barakol($C_{13}H_{12}O_4$) เป็น anhydrobarakol ($C_{13}H_{10}O_3$) ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นสารพวกควิโนน ซึ่งเป็นสารที่ไม่มี ความคงตัว และสลายตัวได้ง่าย

จากการทดลองเพื่อเตรียมอนุพันธ์ของบาราคอลในรูปเกลือของไฮโดรคลอไรด์, ซัลเฟตและซิติเตรต พบว่าสารที่ได้มีความคงตัวและละลายน้ำได้มากขึ้น และทำให้แห้งโดยที่สารจะ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารตัวอื่น โดยเฉพาะอนุพันธ์ของบาราคอลในรูปเกลือของไฮโดรคลอไรด์ และซัลเฟต จะละลายน้ำ ได้ดีและมีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น (ศุภชัย จิรวางวงศ์สกุล, ยุคล เกวลิน, สมศักดิ์ แซ่เจิน, 2542)

การเตรียมสารในการศึกษานี้จะเตรียมอนุพันธ์ของบาราคอลในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ คือ anhydrobarakol hydrochloride ($C_{13}H_{12}ClO_3$) (MW=268.5) โดยเมื่อ anhydrobarakol hydrochloride ละลายน้ำก็จะเปลี่ยนกลับเป็นสาร barakol ดั้งเดิมซึ่งแสดงโดยปฏิกิริยาดังรูป (รูปที่ 3) นอกจากนี้เมื่อสารอยู่ในรูปของสารละลาย สภาวะที่ดีที่สุดในการเก็บควรอยู่ในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสในที่มืด ซึ่งสารจะมีความคงตัวนานถึง 24 ชั่วโมง (Thongsaard et al, 2001) ส่วนสารละลายที่นำมาใช้ในการทดลองจะเตรียมและใช้ทันที และจะเก็บไว้ไม่เกิน 1 ชั่วโมง



รูปที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนของ anhydrobarakol hydrochloride เป็น barakol (Thongsaard et al., 2001)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและคลินิกของ barakol

ในปี พ.ศ.2492 พญ.อุไร อรุณลักษณ์ แผนกสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยการสกัดสารจากใบขี้เหล็กโดยใช้แอลกอฮอล์ (alcohol extract) ทำการวิจัยในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบขี้เหล็กมีฤทธิ์กดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางทั้งบริเวณสมองและไขสันหลัง มีผลทำให้สัตว์ทดลองซึม เคลื่อนไหวช้าลง และสามารถลดการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางของยาคาร์ดิอาโซล (cardiarsole) และสตริกนิน (strychnine) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีปัญหาในการนอนหลับและมีอาการกระวนกระวายนอนไม่หลับ พบว่าสารนี้ช่วยระงับอาการตื่นเต้นทางประสาทและช่วยให้ผู้ป่วยนอนหลับได้ดีขึ้นและยังพบว่าสารมีผลทำให้เกิดพิษได้น้อยมากเมื่อให้ในคนและสัตว์ทดลอง (อุไร อรุณลักษณ์, 2492)

จากการศึกษาของ พิภูล จันทรโยธา ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสาร barakol พบว่าอาจเป็น dopamine agonist โดยเมื่อให้ barakol ในขนาดต่ำ 10-100 มก./กก. สามารถลด locomotor activity ในหนูถีบจักรได้ และเมื่อให้ในขนาดสูง 100-200 มก./กก. จะมีฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวดโดยสามารถเพิ่ม nociceptive threshold ในการศึกษา hot plate test ได้ ส่วนในการศึกษาด้านพิษวิทยาพบว่า barakol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 296.17 มก./กก. (265.25-331.56 มก./กก.) และมีค่า LD_{50} เท่ากับ 324.09 มก./กก. (320.36-347.39 มก./กก.) (พิภูล จันทรโยธา, 2531)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อสนับสนุนการใช้ใบขี้เหล็กในการรักษาภาวะนอนไม่หลับในคนโดยการวิจัยของ ดำรงค์ดี บุญญเลิศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยศึกษาผลของ barakol ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยการวัดคลื่นสมอง EEG และจำนวนพลังงานที่เพิ่มขึ้นในหนูขาว พบว่าในหนูขาวที่ได้รับสาร barakol 25 มก./กก. จะนอนหลับภายใน 15-20 นาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง มี EEG pattern และจำนวนพลังงานที่เพิ่มขึ้นเท่ากับในหนูขาวที่นอนหลับปกติ ส่วนหนูขาวที่ได้รับสาร barakol 100 มก./กก. จะนอนหลับแต่มี EEG pattern และจำนวนพลังงานแตกต่างจากหนูขาวที่นอนหลับปกติ (Bulyalert, 1992)

ในการวิจัยของ วัชรวิวรรณ ทองสะอาด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พบว่าการให้ barakol 10 มก./กก. โดยฉีดเข้าช่องท้อง มีฤทธิ์คลายเครียดโดยมี

anxiolytic properties เหมือน diazepam แต่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันคือ barakol มีฤทธิ์เป็น dopamine agonist ที่อาจออกฤทธิ์เป็น serotonin antagonist ด้วย ทำให้หนูทดลองมีการแสดงพฤติกรรม exploratory แต่ไม่เกิดในกลุ่มที่ได้รับ diazepam พฤติกรรมนี้จะลดลงเมื่อเพิ่มขนาดของ barakol เป็น 25 , 50 และ 75 มก./กก. (Thongsaard et al., 1996) และในการศึกษา in vitro เพื่อดูผลของ barakol ต่อการหลั่งของ dopamine โดยใช้ rat striatal slice พบว่า barakol (1,10 และ 100 micromole) สามารถลดระดับของ K^+ -stimulated dopamine release เหมือนกับการให้ quinolorane dihydrochloride (1 micromole) และ pergolide methanesulfonate (100 micromole) ซึ่งเป็น dopamine D2 receptor agonists นอกจากนี้ barakol ในขนาด 10 micromole จะถูกยับยั้งโดย S(-)-eticlopride hydrochloride (10 micromole) ซึ่งเป็น dopamine D2 receptor antagonists (Thongsaard et al., 1997)

นอกจากการศึกษาฤทธิ์ของ barakol ต่อการช่วยคลายกังวลและระงับประสาทแล้ว ยังมีการศึกษาถึงบทบาทของ barakol ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดซึ่งมีการศึกษาในหนูถีบจักรและแมวพบว่าเมื่อให้ barakol 0.5-15 มก./กก. โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำจะมีผลทำให้ค่าความดันโลหิตทั้ง systolic และ diastolic ลดลงในลักษณะ dose dependent ส่วนในการศึกษา in vitro สาร barakol ในขนาด 10^{-5} - 10^{-3} M สามารถลดการหดตัวของ isolated thoracic aorta ของหนูขาวที่ถูกกระตุ้นโดย phenylephrine และจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวมากขึ้นเมื่อทดลองใน intact endothelium ซึ่งจากการทดลองพบว่าสาร barakol มีผลทำให้เกิด peripheral vasodilation โดยการทำงานผ่าน endothelium derived relaxing factor (EDRF) (Suwan et al., 1992)

ในการศึกษาเพื่อดูฤทธิ์ของ *Cassia siamea* ต่อการต้านเชื้อมาลาเรีย (antimalarial effect) โดยการนำส่วนของใบมาสกัดสารด้วยน้ำ (water extract) พบว่า IC_{50} (50% inhibition concentration) ของสารมีค่า $< 7.5 \mu\text{g}$ equiv. of plant extract และสารสกัดจากใบในขนาด $30 \mu\text{g}$ equiv. of plant extract สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium faciparum* ในหลอดทดลองได้ 100% (Gbeassor et al., 1989)

การศึกษามผลของซีเหล็กต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยดูระดับเอนไซม์ทั้งในกลุ่มที่กระตุ้นให้เกิดสารพิษ (phase I enzymes) ได้แก่ aniline hydroxylase (ANH) และ aminopyrine N-demethylase (AMD) และเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำลายพิษและกำจัดสารเคมี (phase II enzymes)

ได้แก่ glutathione S-transferase (GST) และ UDP-glucuronyltransferase (UGT) ทำการศึกษา โดยผสมใบชี้เหล็กลงในอาหารในอัตราส่วนร้อยละ 5 ให้นุหุตดลองกินเป็นเวลา 14 วันพบว่า มีผล ทำให้ระดับของเอนไซม์ aniline hydroxylase (ANH) และ aminopyrine N-demethylase (AMD) ลดลง แต่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase และ UDP-glucuronyltransferase ให้สูงขึ้น (Tepsuwan and Kusamran, 1997) ต่อมาได้มีการศึกษาถึง ศักยภาพในการต้านมะเร็งของใบชี้เหล็ก โดยทำการศึกษาในหนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley เพศเมียที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านม โดยได้รับ 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) ผลการศึกษาพบว่า ในหนูที่ได้รับอาหารที่ผสมใบชี้เหล็ก 2.5% และ 4% มีผลลดการเกิดก้อนเนื้อที่ เต้านม และยังลดพัฒนาการของการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อออกให้ช้าลงได้ นอกจากนี้พบว่าใน กลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมใบชี้เหล็ก 4% ยังมีอุบัติการณ์เกิด ก้อนเนื้ออกลดลงแต่ไม่มีความ แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Tepsuwan, Kupradinun, and Kusamran, 1999)

จากการศึกษาถึงผลในระยะกึ่งเรื้อรังของการให้สาร barakol โดยป้อนทางปาก ใน ขนาด 30 มก./กก./วัน เป็นเวลา 90 วัน ในหนูขาวที่ได้รับอาหารปกติเปรียบเทียบกับหนูขาวที่ ได้รับอาหารที่มีคลอโรสเตอรอลสูง โดยดูผลต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 ได้แก่ CYP1A1 , CYP1A2 , CYP2B1/2B2 และ CYP2E1 รวมทั้งเอนไซม์ glutathione S-transferase พบว่า barakol มีผลทำให้ CYP1A2 ลดลงในหนูขาวทั้งสองกลุ่ม และ CYP1A1 ลดลงในกลุ่มที่ได้รับ อาหารที่มีคลอโรสเตอรอลสูง ส่วนผลต่อ CYP2B1/2B2 และ CYP2E1 และเอนไซม์ glutathione S-transferase ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Maniratanachote, 2001)

จากข้อมูลการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยาและการทดสอบพิษ องค์การเภสัชกรรม ได้สังเกตเห็นศักยภาพของสมุนไพรชี้เหล็กในการนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในคนที่มีความวิตกกังวล และนอนไม่หลับซึ่งมีการทดสอบทางคลินิกโดยการใช้ยาน้ำเชื่อมชี้เหล็กและยาเม็ดชี้เหล็ก 400 มก. (ซึ่งมีความเข้มข้นของ anhydrobarakol 10 มก. / 5 มล. / เม็ด) เพื่อช่วยให้นอนหลับโดยทดสอบ กับผู้ป่วย 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นผู้ป่วยหลังผ่าตัดที่มีอาการนอนไม่หลับจำนวน 22 รายและ อาสาสมัคร จำนวน 20 ราย พบว่าการใช้ยาน้ำเชื่อมชี้เหล็กและยาเม็ดชี้เหล็กในขนาดยาที่มีความเข้มข้นของ anhydrobarakol 10 มก./ครั้ง จะช่วยให้ผู้ป่วยนอนหลับได้ดีพอควรและไม่ทำให้เกิดอาการ ข้างเคียงที่สำคัญ (วีระสิงห์ เมืองมัน และคณะ, 2543)

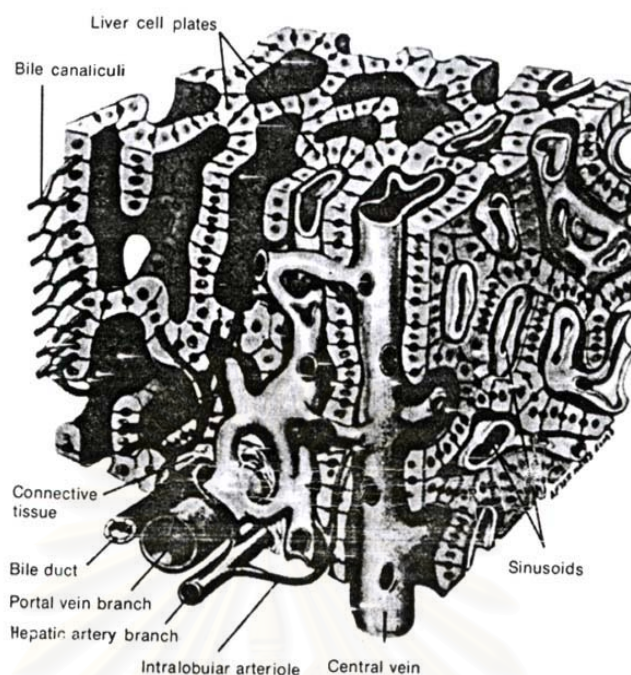
นอกจากนี้มีการทดสอบฤทธิ์ทำให้ง่วงหลับโดย ผศ.นพ.ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข แห่ง คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งใช้สมุนไพรแปรรูปชนิดเม็ด 400 ม.ก. มี anhydrobarakol 16 มก./เม็ด (กินครั้งละ 4 เม็ด) ทำการศึกษาฤทธิ์ทำให้ง่วงหลับในคนปกติจำนวน 20 ราย โดยรับประทานยาเพียงครั้งเดียว และศึกษาฤทธิ์ทำให้ง่วงหลับในกลุ่มที่มีปัญหาการนอนไม่หลับ จำนวน 31 ราย ผลการศึกษาพบว่ายาสมุนไพรแปรรูปชนิดเม็ดจากใบขี้เหล็กสามารถทำให้คน ปกติง่วงหลับได้และช่วยให้ผู้ที่มีปัญหาการนอนหลับยาก นอนหลับได้เร็วขึ้น มีคุณภาพการนอนดีขึ้น และเกิดความพึงพอใจต่อการนอนเพิ่มขึ้น (ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข, พิมลวรรณ ทัพยาทพิจารณ์ และ ธีรวิทย์ ธีระนันท์, 2543) แต่จากการใช้ยาเม็ดขี้เหล็กนี้ก็พบว่าก่อให้เกิดผลข้างเคียงในผู้ป่วย โดยทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในผู้ป่วยจำนวน 9 ราย ซึ่งระดับความรุนแรงที่เกิดขึ้นมี ตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงมีอาการของโรคมาก โดยยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลโดยตรงของสาร barakol หรือสารอื่นที่มาจาก barakol (สมบัติ ตรีประเสริฐสุข, มงคล หงษ์ศิรินิษฐ และ อนุชิต จุฑะพุทธิ, 2542)

ตับและกระบวนการเมตาบอลิซึมของตับ

ตับเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย มีหน้าที่สำคัญในการสร้างน้ำดี , การเปลี่ยนแปลงสารภายในร่างกายและสารต่างๆที่ได้รับจากภายนอก ตับมีเลือดมาเลี้ยงจาก hepatic artery ซึ่งจะนำเลือดที่มี oxygen สูง (ประมาณ 25% ของปริมาณเลือดทั้งหมด) นอกจากนี้ตับได้รับเลือดมาเลี้ยงจาก hepatic portal vein ซึ่งเป็นเลือดที่มีอาหารในปริมาณสูง (ประมาณ 75% ของปริมาณเลือดทั้งหมด)

ทั้ง hepatic artery และ hepatic portal vein จะแตกแขนงย่อยเป็น hepatic arterioles และ portal venules ซึ่งกระจายไปทั่วทุกโครงสร้างของตับ โดยจะมีแขนงของ bile ductule รวมไปด้วย ซึ่งจะรวมเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า portal tract หรือ hepatic triad

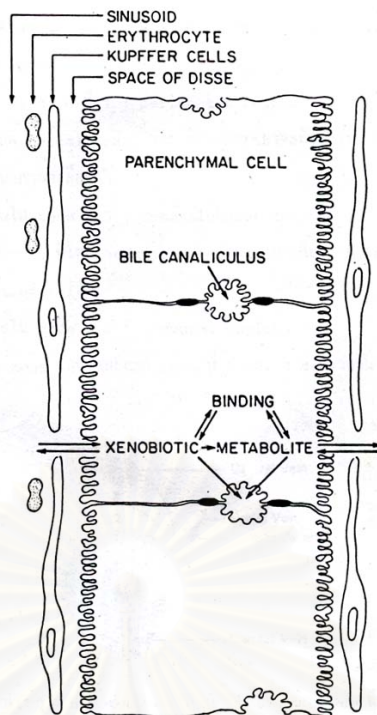
เลือดที่ไหลเข้าจาก hepatic arterioles และ portal venules จะเข้าสู่ sinusoids ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน แต่มีขนาดใหญ่กว่าหลอดเลือดฝอยธรรมดา จากนั้นเลือดที่ไหล ผ่าน sinusoids จะเข้าสู่ central vein ซึ่งเป็นปลายของ hepatic vein ซึ่งจะนำเลือดออกจากตับ (รูปที่ 4)



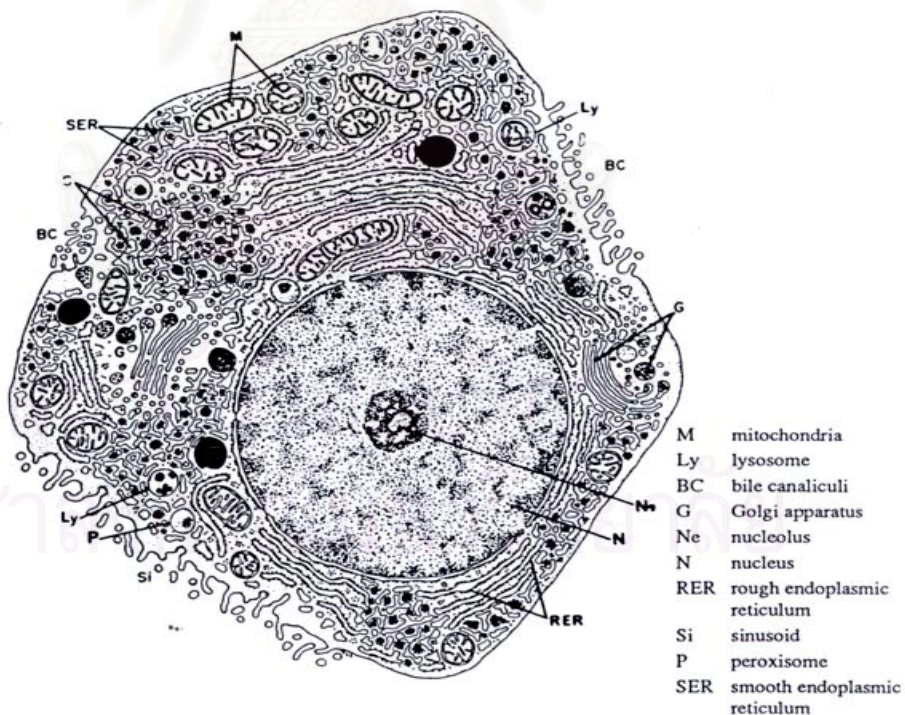
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของหลอดเลือดที่มายังตับ (Cohn and Roth, 1996)

ช่องว่างระหว่างหลอดเลือดจะเต็มไปด้วยเซลล์ตับ (hepatocytes หรือ parenchymal cells) ซึ่งจะเรียงรายอยู่รอบๆ sinusoids โดย sinusoids มีผนังเป็น endothelial cells ที่ไม่ติดกัน และมีชั้น basal lamina ที่ไม่สมบูรณ์ เรียกว่า Kupffer cells ซึ่งมีหน้าที่กำจัดจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านผนังลำไส้เล็กเข้ามาในเลือดช่องว่างระหว่าง hepatocytes และ Kupffer cells เรียกว่า space of Disse เป็นแหล่งแลกเปลี่ยนอาหารและ oxygen ระหว่างเลือดและ hepatocytes (รูปที่ 5)

Functional unit ของตับเรียกว่า acinus ซึ่งเป็นกลุ่มของ hepatocytes ที่มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอนจัดเรียงตัวรอบ portal tract โดย hepatocytes มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 μm ภายในประกอบด้วย nucleus , nucleolus , smooth & rough endoplasmic reticulum(SER,RER) , golgi complex , lysosome , mitochondria และ granule สำหรับสะสมสารต่างๆ (รูปที่ 6) ซึ่ง hepatocytes จะทำหน้าที่ในการสร้างน้ำดี และหลั่งออกโดยอาศัย excretory unit เรียกว่า bile canaliculus



รูปที่ 5 การติดต่อระหว่างเลือดและเซลล์ตับ (hepatocytes) ผ่านทาง space of Disse (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)



รูปที่ 6 cross - section of hepatocyte (Hodgson and Levi, 1994)

เซลล์ตับ (hepatocytes) แบ่งออกเป็น 3 zone โดยยึดหลักระยะห่างจากหลอดเลือดที่มาเลี้ยง (รูปที่ 7) ได้แก่

zone 1 (periportal region) : เซลล์จะอยู่ใกล้ portal tract เลือดที่มาเลี้ยงจะมีส่วนประกอบของเลือดแดงมากกว่าเลือดดำ ซึ่งเซลล์ตับจะได้รับ oxygen , อาหาร รวมถึงการสัมผัสกับสารภายในร่างกาย เช่น ฮอรโมน และสารต่างๆที่ได้รับจากภายนอกในปริมาณสูง โดยเซลล์ในกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มแรกที่เกิดการ regeneration ภายหลังเกิดอันตรายต่อตับ แต่จะเป็นกลุ่มสุดท้ายที่จะเกิด necrosis

zone 2 (midzonal region) : เป็น zone ที่แบ่งและแยก zone ที่ 1 และ zone ที่ 3 ออกจากกัน

zone 3 (centrilobular region) : เซลล์ใน zone นี้จะอยู่รอบๆ central vein ซึ่งจะไม่มี hepatic arteiole มาเลี้ยงดังนั้น hepatocytes จะได้รับเลือดที่มี oxygen น้อย นอกจากนี้เซลล์จะสัมผัสกับ metabolic products ของสารต่างๆ ในปริมาณสูง



รูปที่ 7 แสดงการแบ่งเซลล์ตับโดยอาศัยระยะห่างจากหลอดเลือดที่มาเลี้ยง (a;portal vein , b;hepatic artery , c;bile duct , star;centrilobular veins) (McIntyre et al., 1991)

เมื่อนำ hepatocytes มาปั่น โดยใช้ Ficoll density gradient สามารถแยกเซลล์ออกได้เป็น 2 แบบคือ

1. light hepatocytes (mean density 1.10) : ส่วนใหญ่เป็น hepatocytes ในส่วนของ centrilobular region มี smooth endoplasmic reticulum (SER) และ mitochondria อยู่เป็นจำนวนมาก และมี glycogen granules อยู่เป็นจำนวนน้อย

2. heavy hepatocytes (mean density 1.14) : ส่วนใหญ่เป็น hepatocytes ในส่วนของ periportal region มี rough endoplasmic reticulum (RER) อยู่เป็นจำนวนมาก และมี glycogen granules ที่มีขนาดใหญ่และอยู่กันอย่างแน่นหนา

จากลักษณะตำแหน่ง , โครงสร้างทางกายวิภาคและบทบาทหน้าที่ของตับ จะเห็นได้ว่าตับเป็นอวัยวะหลักที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีต่างๆ ที่ได้รับจากภายนอก นอกจากนี้ตับยังเป็นอวัยวะที่เป็นเป้าหมายสำคัญของการเกิดพิษจากยาและสารเคมีโดยตรง หรืออาจเกิดพิษจากเมตาบอไลต์ของยาและสารเคมี ได้อีกด้วย

กระบวนการเมตาบอลิซึม

ในการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึม อวัยวะที่สำคัญและมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีต่างๆ ที่ได้รับจากภายนอกคือ ตับ ยาและสารเคมีส่วนมากที่ละลายในไขมันจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการของเอนไซม์ในตับ ได้เมตาบอไลต์ที่ไม่มีฤทธิ์และละลายน้ำขับถ่ายออกจากร่างกายได้ดี แต่บางครั้งเมตาบอไลต์ที่ได้ อาจมีฤทธิ์หรือมีพิษมากขึ้น ทำให้เกิดพิษจากยาหรือสารเคมีนั้นๆ นอกจากการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยเอนไซม์ภายในตับแล้ว ก็ยังพบเอนไซม์ที่สำคัญซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีตามอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายได้แก่ ปอด , ผนังของลำไส้เล็ก , ไต ฯลฯ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของ Cytochrome P450 และ Glutathione S-transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญใน phase I และ phase II reaction ในอวัยวะต่างๆของหนูขาว (Katzung, 1998)

Tissue	CYP450 ^a	GSH Transferase ^b
Liver	0.73	599
Lung	0.046	61
Kidney	0.135	88
Small intestine	0.042	103
Colon	0.016	- ^c
Skin	0.12	- ^c
Adrenal gland	0.5	308

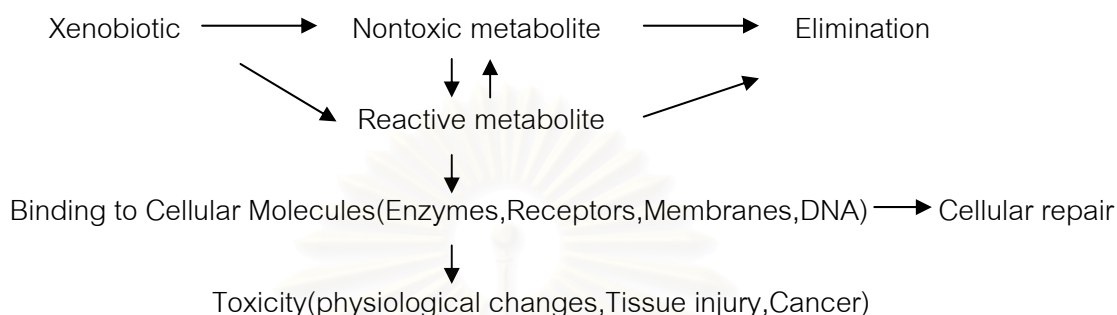
^a Cytochrome P450 , nmole/mg microsomal protein

^b Glutathione S-transferase , nmole conjugate formed/min/mg cytosolic protein

^c Values not available

ในการศึกษาเรื่องพิษที่เกิดจากเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ metabolic pathway ของสารที่ทำให้เกิดพิษ เมื่อสารต่างๆ เข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ภายในตับโดย metabolic pathway ที่มากกว่าหนึ่ง pathway เสมอ ในบาง pathway อาจได้เมตาบอไลต์ที่ไม่มีพิษ (nontoxic pathway) หรือบาง pathway อาจทำลายเมตาบอไลต์ที่ทำให้

เกิดพิษเพื่อป้องกันร่างกายจากการเกิดพิษนั้น (detoxification pathway) (รูปที่ 8) ดังนั้นปริมาณของเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจะมีมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับสมรรถนะของเอนไซม์ในแต่ละ pathway และปริมาณของ substrate ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม , การกำจัดสารพิษ และการเกิดพิษภายในร่างกาย จากการได้รับยาหรือสารเคมีจากภายนอก (Hodgson and Levi, 1994)

กระบวนการเมตาบอลิซึมของยา (Drug metabolism) แบ่งออกได้เป็น ปฏิกริยา phase I และ phase II ดังนี้

ปฏิกริยา phase I (Phase I reaction)

เป็นปฏิกริยาที่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง functional group ภายในโมเลกุลของยาหรือสารเคมี ให้อยู่ในรูปที่มีขั้วละลายน้ำได้ดีขึ้น พร้อมทั้งจะขับออกจากร่างกายหรือเป็นการเตรียม substrate สำหรับการเกิดปฏิกริยาใน phase II ต่อไป ซึ่งเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นในปฏิกริยาอาจถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ หรือเป็นเมตาบอไลต์ที่มีพิษทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้

ปฏิกริยาที่สำคัญใน phase I ได้แก่ ปฏิกริยาออกซิเดชัน (oxidation) , ปฏิกริยารีดักชัน (reduction) , ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยปฏิกริยาออกซิเดชันจะเป็นปฏิกริยาที่สำคัญและพบได้มากใน phase I reaction ปฏิกริยาออกซิเดชันนี้จะอาศัยเอนไซม์จาก microsome , NADPH และโมเลกุลออกซิเจนเข้าเป็นระบบของ mixed function oxidase (MFO) โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ Cytochrome P450 ซึ่งพบที่ microsomal membrane

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบ เช่น การเกิดออกซิเดชันของ aromatic rings , alkyl chains , dealkylation , N-oxidation , sulphoxidation และ epoxidation การเกิดออกซิเดชันของ aromatic rings มักจะเป็น hydroxylation ซึ่งพบได้เป็นส่วนใหญ่ของ xenobiotics และก่อให้เกิด phenols ส่วนการเกิดออกซิเดชันของ alkyl chains จะทำให้เกิด alcohol ปฏิกิริยาที่ค่อนข้างสำคัญทางคลินิก คือ epoxidation ซึ่งจะเกิดกับสารประกอบ aromatic ส่งผลให้ได้ reactive intermediates

องค์ประกอบของ mixed function oxidase system (MFO system)

ในการศึกษา drug metabolism ส่วนใหญ่ปฏิกิริยาที่สำคัญและมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงยาจะเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่ถูกควบคุมโดย MFO ผ่าน Cytochrome P450 ซึ่งจะก่อให้เกิด hydroxylation ของยาและสารเคมีต่างๆ ดังสมการ



SH : oxidisable drug substrate

SOH : hydroxylated metabolite

องค์ประกอบที่สำคัญของ MFO system ได้แก่

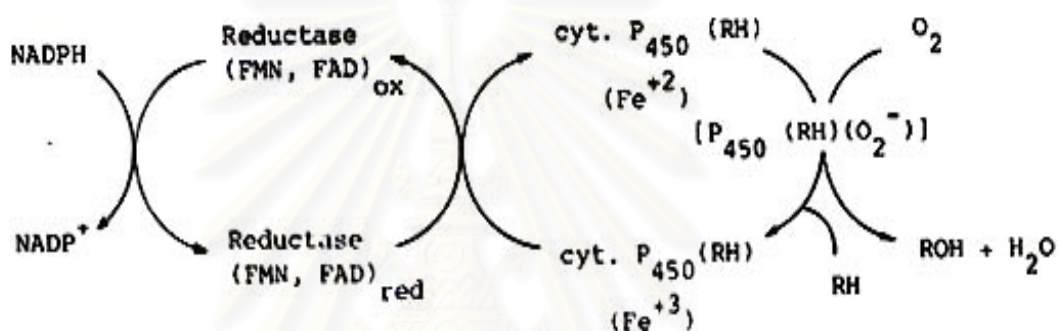
1. NADPH-Cytochrome P450 reductase : พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง เอนไซม์ชนิดนี้เป็น flavoprotein ในหนึ่ง mole ประกอบด้วย flavin mononucleotide (FMN) 1 mole และ flavin adenine dinucleotide (FDA) อีก 1 mole

2. Cytochrome P450 : เป็น oxidase ตัวทำยสุดที่สำคัญต่อการทำงานของ เอนไซม์ระบบนี้ โดยมีบทบาทในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของ endoplasmic reticulum (ER) เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของยาหรือสารเคมี

3. Phosphatidylcholine : เป็น phospholipid ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยตรง แต่จำเป็นสำหรับการทำงานของ MFO โดยเชื่อว่าสารนี้จะช่วยในการจับกันระหว่าง reductase กับ Cytochrome P450 และ Cytochrome P450 กับ substrate และยังเชื่อว่าจะช่วยทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปยัง Cytochrome P450 เป็นไปได้เร็วยิ่งขึ้น

กลไกการทำงานของ mixed function oxidase

การทำงานของ mixed function oxidase เกิดจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปให้กับ substrate โดย NADPH-Cytochrome P450 reductase จะถูก reduce ก่อน จากนั้นอิเล็กตรอนจึงถูกส่งผ่านไปให้ Cytochrome P450 เมื่อ Cytochrome P450 ถูก reduce จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจน โดยออกซิเจน 1 อะตอมจะถูก reduce ให้อยู่ในรูปของน้ำ และอีก 1 อะตอมจะถูกรวมเข้าไปในโมเลกุลของ substrate ได้เป็น hydroxylated substrate ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 NADPH-Cytochrome P450 electron transport system (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)

Cytochrome P450

เป็นเอนไซม์ที่มี heme เป็นส่วนประกอบ (hemoprotein) มีบทบาทสำคัญใน MFO system โดยทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนของ ER เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของยาหรือสารเคมี ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ฝังตัวอยู่ในผนัง เช่น ใน microsomes ที่ได้จากตับ , ไต , เนื้อชั้นนอกของต่อมหมวกไตและผนังของลำไส้เล็กใน mitochondria ที่ได้จากต่อมไร้ท่อต่างๆและใน particulate fractions ที่ได้จาก yeast

การกระจายของ Cytochrome P450 ในเซลล์ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า Cytochrome P450 เป็นจำนวนมากที่สุดใน smooth endoplasmic reticulum (SER) รองลงมาคือ rough endoplasmic reticulum (RER) พบจำนวนน้อยในผนังของ nucleus , lysosomes และ golgi apparatus สำหรับในเซลล์ของเนื้อเยื่อบางชนิด เช่น รก และเนื้อชั้นนอกของต่อมหมวกไต พบมี Cytochrome P450 มากใน mitochondria โดยทำหน้าที่พิเศษเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของ steroid hormone เท่านั้น

การเรียกชื่อว่า Cytochrome P450 ก็เนื่องมาจาก Cytochrome (pigment) ถูก reduce และเกิด complex กับคาร์บอนมอนอกไซด์(CO) แล้วให้ peak ของ spectrum ที่ 450 nm

Cytochrome P450 มีลักษณะเป็น superfamily มีหลาย isozymes เนื่องจากมีความแตกต่างในการจัดลำดับ (sequences) ของกรดอะมิโนในสายโปรตีน แต่ละ family จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อ substrate ที่แตกต่างกัน โดย Cytochrome P450 ใน gene family เดียวกันจะมี การจัดลำดับของกรดอะมิโนในสายโปรตีนเหมือนกัน ประมาณ 40 % และ Cytochrome P450 ใน gene subfamily เดียวกันจะมี การจัดลำดับของกรดอะมิโนในสายโปรตีนเหมือนกัน ประมาณ 70 %

การเหนี่ยวนำการทำงานของ Cytochrome P450

การเหนี่ยวนำการทำงานของ Cytochrome P450 อาจเกิดได้จากการจำลองของ gene (gene duplication) ขึ้นมาใหม่ ซึ่งมีผลให้เกิดการแสดงออกของ CYP450 ที่มากขึ้น, การได้รับสารจากภายนอก(xenobiotics) ที่มีผลเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์หรือ xenobiotics ที่ได้รับมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่เดิม (preexisting enzyme)

Inducer บางชนิดสามารถเหนี่ยวนำได้หลายเอนไซม์ เช่น indole-3-carbinol (I3C) อนุพันธ์กลุ่ม indole ที่พบในพืชตระกูล cruciferous สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP1A , CYP2B และ CYP3A subfamilies ใน rat hepatocytes culture ได้ (Renwick et al., 1999)

การศึกษากลไกการเหนี่ยวนำ Cytochrome P450 ในหนูขาวโดยทำการศึกษา inducer ที่สำคัญของ Cytochrome P450 ได้แก่ 3-methylcholanthrene , phenobarbital, pregnenolone-16 α -carbonitrile(PCN) และ clofibric acid ซึ่ง inducer แต่ละตัวจะทำงานโดยมี *trans-acting factors* ซึ่งเป็นส่วนของ ligand-activated receptors ที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3 และ ligand-receptor complex ที่เกิดขึ้นจะจับกับส่วนของ *cis-acting factors* หรือ response elements บน DNA มีผลต่อการ transcription ของ gene (Waxman, 1999; Honkakoski and Negishi, 2000)

ตารางที่ 3 Receptors Mediating the Induction of P450 Enzymes (Klaassen, 2001)

P450 Enzyme	Receptor	Receptor ligand	Coreceptor	Coreceptor ligand
CYP1A	AhR	TCDD, PAHs, β -NF*	Arnt	None
CYP2B	CAR β	Androstanol ⁺ , Phenobarbital?	RXR	9- <i>cis</i> -retinoic acid
CYP3A	PXR	PCN, Rifampin	RXR	9- <i>cis</i> -retinoic acid
CYP4A	PPAR α	Peroxisome proliferators	RXR	9- <i>cis</i> -retinoic acid

*TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; PAHs, Polycyclic aromatic hydrocarbon; β -NF, β -naphthoflavone

⁺Androstanol may represent a physiologic ligand that blocks the constitutive DNA-binding properties of CAR β

สารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons เช่น 3-methylcholanthrene, benzo[a]pyrene เป็น inducer ที่สำคัญของ CYP1A subfamily รวมถึงสารกลุ่ม flavones (β -naphthoflavone), polyhalogenated aromatic hydrocarbons (เช่น TCDD, 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), acid condensation products ของ indole-3-carbinol (13C) และยา เช่น chlorpromazine, phenothiazine, clotrimazole, ketoconazole, miconazole และ isosafrole

จากการศึกษาการให้ 3-methylcholanthrene (3-MC) ในหนูขาวมีผลเหนี่ยวนำ CYP1A1 และ CYP1A2 (>20 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งจะพบระดับของ CYP1A1 และ CYP1A2 ได้น้อยมาก จากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าการเหนี่ยวนำ CYP1A1 จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น transcription ของ CYP1A1 gene มีผลเพิ่มระดับของ mRNA และการสังเคราะห์โปรตีนขึ้นมาใหม่ โดยการกระตุ้นการทำงานของ Ah receptor ซึ่งเป็น cytosolic receptor ที่จะจับกับสารกลุ่ม aromatic hydrocarbons นี้

ในสภาวะปกติ (inactive form) Ah receptor จะจับอยู่กับ heat shock protein (hsp90) ภายใน cytosol เมื่อมีการจับกันระหว่าง ligand และ receptor heat shock protein จะแยกออกจาก receptor เกิด phosphorylation โดย tyrosine kinase จากนั้น ligand-receptor complex ที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนไปยัง nucleus รวมตัวเป็น heterodimer complex กับ Arnt (Ah receptor-nuclear translocator) ได้ Ah receptor-Arnt complex ซึ่งจะไปจับกับส่วนของ regulatory sequences หรือ xenobiotic responsive elements (XRE) มีผลกระตุ้นการ

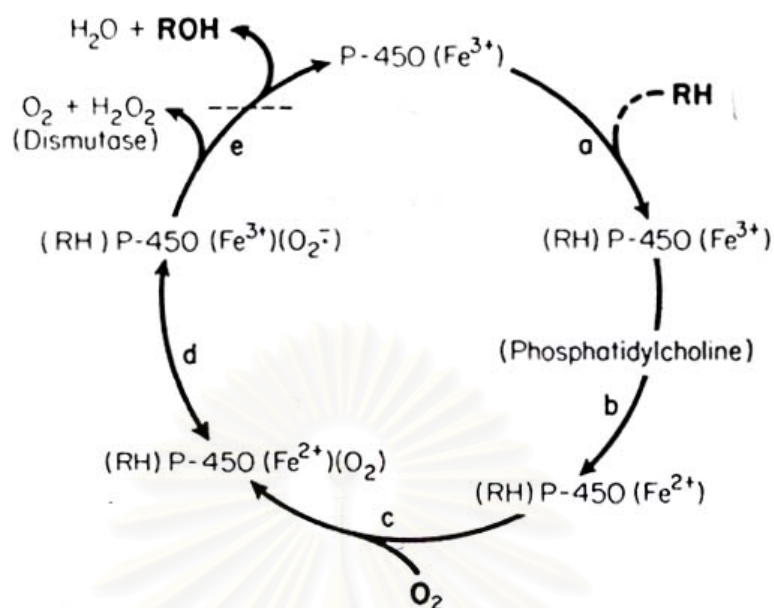
transcription ของ CYP1A1 gene และ genes อื่นๆ ที่มี XRE หรือ XRE-like sequences ในส่วน
ของ enhancer region (เช่น CYP1A2 , DT-diaphosase , glutathione S-transferase , UDP-
glucuronyltransferase (UGT1A6,UGT1A7) และ aldehyde dehydrogenase)

การศึกษาการเหนี่ยวนำ CYP2B1 โดยการให้ phenobarbital ซึ่งเป็น inducer ที่
สำคัญของ CYP2B subfamily พบว่า อาจทำงานโดยการจับกับ CAR β receptor ซึ่งจะ เกิดการ
dimerization กับ retinoid X receptor (RXR) ซึ่งเป็น nuclear receptor ที่ถูกกระตุ้นโดย 9-*cis*-
retinoic acid จากนั้น complex ที่เกิดขึ้นจะจับกับ phenobarbital-responsive element (PBRE)
บน DNA มีผลกระตุ้นการ transcription ของ CYP2B1 gene เพิ่มระดับของ mRNA และการ
สังเคราะห์โปรตีน

กลไกการทำงานของ Cytochrome P450 ใน mixed function oxidation

Cytochrome P450 เป็นตำแหน่งที่ substrate และออกซิเจน เข้าจับใน
กระบวนการเกิดปฏิกิริยาโดย MFO ซึ่งกลไกการทำงานของ Cytochrome P450 ที่น่าจะเป็นไป
ได้ในปฏิกิริยา ดังกล่าวอาจสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้ (รูปที่ 10)

- a. การจับกันระหว่าง substrate และ oxidized form ของ Cytochrome P450
(ferric, Fe³⁺) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นเร็วมากโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยอิเล็กตรอนจาก NADPH
- b. อะตอมของเหล็กในโมเลกุลของ Cytochrome ถูก reduce ให้อยู่ในรูปของ
ferrous (Fe²⁺) โดย NADPH-Cytochrome P450 reductase ปฏิกิริยานี้ต้องการ
phosphatidylcholine
- c. การรวมตัวของ complex จาก b กับออกซิเจน ได้ ternary complex
- d. เกิดการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลของ complex จาก c
กลายเป็น superoxide radical จับอยู่กับ oxidized Cytochrome P450-substrate complex
- e. superoxide radical ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ substrate โดยการรับ
อิเล็กตรอนอีก 1 ตัว ได้ hydroxylated substrate และ 1 โมเลกุลของน้ำ รวมทั้งได้ oxidized form
ของ Cytochrome P450 กลับมาเหมือนเดิม



รูปที่ 10 กลไกการทำงานที่น่าจะเป็นไปได้ของ Cytochrome P450 ใน mixed function oxidation

(พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)

ปฏิกิริยา Phase II (Phase II reaction or Conjugation reaction)

เป็นปฏิกิริยาสังเคราะห์ โดยสารที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย (xenobiotics) เช่น ยา, สารเคมีต่างๆ หรือ เมตาบอไลต์ของยา สารเคมีซึ่งมี functional group ที่เหมาะสมภายในโมเลกุล ได้ conjugate กับโมเลกุลของสารภายในร่างกาย (endogenous molecule) เช่น glucuronic acid , glutathione , glycine ฯลฯ แล้วได้เป็น conjugated substance ทำให้ได้อนุพันธ์ที่มีขั้วมากขึ้นหรือละลายน้ำได้ สามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ทางน้ำดีหรือปัสสาวะ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาในการทำให้สารนั้นหมดฤทธิ์ (detoxification)

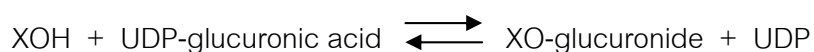
ปฏิกิริยาที่สำคัญใน phase II ได้แก่ glucuronidation , sulfation , glutathione conjugation ฯลฯ ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะถูก catalyze ด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกันและทำปฏิกิริยากับ substrate ที่มี functional group ในโมเลกุลที่เหมาะสม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 Conjugation reactions (Hodgson and Levi, 1994)

Reaction	Enzyme	Functional group
Glucuronidation	UDP-glucuronyltransferase	OH , COOH , NH ₂ , SH , C-C
Glucosidation	UDP-glucosyltransferase	OH , COOH , SH , C-C
Sulfation	Sulfotransferase	OH , NH ₂
Acetylation	Acetyltransferase	OH , NH ₂ , SO ₂ NH ₂
Methylation	Methyltransferase	OH , NH ₂ , SH
Amino acid Conjugation	Acytransferase	COOH
Glutathione Conjugation	Glutathione S-transferase	Epoxides , Organic halides , Organic nitro compounds , Unsaturated compound
Lipophilic Conjugation		OH , COOH

Glucuronidation

เป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญและพบมากในการกำจัดยาที่ละลายในไขมัน (lipid-soluble drug) , สารเคมีจากสิ่งแวดล้อม (environmental chemical) , เมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นจาก phase I reaction ซึ่งมักจะเป็นสารจำพวก highly carcinogenic, mutagenic , teratogenic และสารภายในร่างกาย (endogeneous compound) เช่น bilirubin , thyroxin , steroid hormones ฯลฯ (Bock et al., 1979) โดยยาหรือเมตาบอไลต์ของยาหรือสารที่ได้รับจากภายนอก conjugate กับ UDP-glucuronic acid ซึ่งเป็น endogenous substance ภายในร่างกาย จากการกระตุ้นปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ UDP-glucuronyltransferase ดังสมการ



UDP-glucuronyltransferase พบในส่วน of microsomal fraction ภายในเซลล์ตับ , ไต , ลำไส้เล็ก , Adrenal gland , ต่อมพิทูอิทารี , ปอด และ ม้าม glucuronide conjugates ที่

เกิดขึ้นจะถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดีและทางปัสสาวะ ซึ่งขึ้นกับขนาดของ aglycone ที่เกิดขึ้น ในหนูขาว glucuronides ที่มีขนาดของโมเลกุล < 250 จะถูกขับออกทางปัสสาวะ ส่วน glucuronides ที่มีขนาดของโมเลกุล > 350 มักถูกขับออกทางน้ำดี substrate ของเอนไซม์เป็น สารพวก phenols , alcohols , carboxylic acids , hydroxylamines , sulfonamides ซึ่ง glucuronide conjugate จะทำปฏิกิริยาโดยการจับที่ตำแหน่งของ O ,N, S ,C atom

UDP-glucuronyltransferase มีลักษณะเป็น superfamily มีหลาย isozymes ในหนูขาวแบ่งออกเป็น 2 gene families ได้แก่ UGT1 และ UGT2 โดย UGT1 แบ่งเป็น UGT1A subfamily ซึ่งประกอบด้วย 7 isozymes ได้แก่ UGT1A1 , 1A2 , 1A3 , 1A5 , 1A6 , 1A7 และ 1A8 ใน UGT2 สามารถแบ่งออกได้เป็น UGT2A และ UGT2B subfamilies ซึ่ง UGT2A (พบมากใน olfactory epithelium) ประกอบด้วย UGT2A1 ส่วน UGT2B (พบมากในตับ และ extrahepatic tissues) ประกอบด้วย 6 isozymes ได้แก่ UGT2B1 , 2B2 , 2B3 , 2B6 , 2B8 , 2B12 (Klaassen, 2001)

การเหนี่ยวนำเอนไซม์เกิดจากผลการกระตุ้นโดยสาร หรือ xenobiotics ที่ได้รับซึ่ง มีผลต่อการ transcription ของ UGTs gene เพิ่มระดับของ mRNA และการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่ง UGTs isozymes ที่เกิดขึ้นจะมี substrate ที่มีความจำเพาะเจาะจงแตกต่างกันได้

จากการศึกษาพบว่า UGT1 family จะถูก encode จาก single gene โดยมีการ สร้างขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงในส่วนของ first exon (variable region) ซึ่งจะทำงานร่วมกันแบบ cassette fashion กับส่วนของ exons 2-5 (constant region) ในหนูขาว UGT1A gene locus ใน ส่วนของ first exon จะประกอบด้วย 8 versions แต่จะสร้าง UGT1A เพียง 7 isozymes เนื่องจาก ในส่วนของตำแหน่งที่ 4 บน first exon เป็น pseudogene จึงทำให้ไม่พบ UGT1A4 ในหนูขาว ส่วน UGT2 family (UGT2A และ UGT2B) ทั้งหมดจะถูก encode จาก distinct gene ซึ่งจะมี ความจำเพาะเจาะจงต่อการสร้าง isozymes แต่ละตัว

การเหนี่ยวนำเอนไซม์ UGT โดย 3-MC พบว่ามีผลต่อ UGT1 locus โดยกระตุ้น การสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเกิด conjugation ของ planar molecules เช่น 1-naphthol (UGT1A6,UGT1A7) ส่วน phenobarbital และ clofibrilic acid จะกระตุ้นการสร้าง เอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเกิด conjugation ของ bilirubin (UGT1A1) นอกจากนี้ phenobarbital ยังสามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ UGT2B1 ซึ่งจะเกิด conjugation กับ bilirubin ได้

จากลักษณะการทำงานของ UGT1 gene locus นี้จะเห็นได้ว่า UGT1 enzymes ที่เกิดขึ้นจะถูกสร้างจากการจับของ substrate ที่ substrate binding site ที่แตกต่างกันมีผลให้เกิด multiple copies ในส่วนของ first exon (variable region) ซึ่งจะทำงานร่วมกับส่วนของ exons 2-5 (constant region) ซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ substrate ที่แตกต่างกัน

ในการทดลองส่วนใหญ่ใช้ 1-naphthol เป็น substrate สารมีคุณสมบัติ highly lipid soluble เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะได้ 1-naphthol glucuronide ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์โดยการ ใช้ radiochemical & fluorimetric assay ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ และมี sensitivity สูง

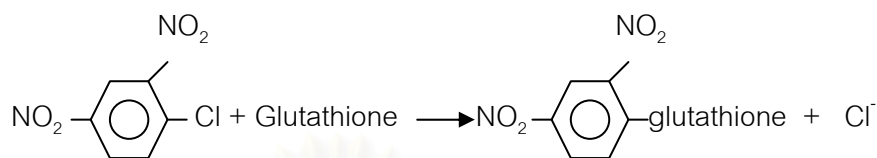
Glutathione Conjugation

ปฏิกิริยาจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งพบมากใน cytosol เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดพิษ (detoxification) โดยเฉพาะสารพวก electrophilic xenobiotics และเมตาบอไลต์จำพวก electrophile ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ phase I reaction โดยเอนไซม์ในกลุ่ม mixed function oxygenases (Mannervik and Danielson, 1988; Pickett and Lu, 1989; Hayes and Pulford, 1995) และยังมีบทบาทต่อสารจำพวก alkylating agents ซึ่ง product สุดท้ายของปฏิกิริยาจะได้สาร mercapturic acid (Habig et al, 1974) ปฏิกิริยา glutathione Conjugation เกิดขึ้นโดยการ conjugate ระหว่างสารประกอบจำพวก electrophilic substrates และ reduced glutathione (GSH) ซึ่ง electrophilic substrates ที่พบได้แก่ antibiotics, vasodilators, herbicides, insecticides, analgesics, anticancer agents และ carcinogens

Glutathione Conjugation สามารถแบ่งได้เป็น 2 reactions ได้แก่ displacement reactions โดย GSH จะเข้าแทนที่ตำแหน่งของ electron-withdrawing group ของสาร และ addition reactions โดย GSH จะถูกรวมเข้าไปที่ตำแหน่งของ activated double bond หรือ strained ring system ใน displacement reactions จะเกิดกับ substrate ที่ประกอบด้วย halide, sulfate, sulfonate, phosphate หรือ nitro group ซึ่ง displacement reactions จะเพิ่มขึ้นเมื่อ substrate มี electron-withdrawing group ได้แก่ -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -CN, -CHO และ -COOR

ในการทดลอง in vitro มักใช้ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) เป็น substrate (aromatic substrates) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการ (รูปที่ 11) โดยจากการศึกษาพบว่า

1-chloro-2,4-dinitrobenzene สามารถทำปฏิกิริยาได้กับทุก form ของ glutathione S-transferase เช่นเดียวกับ p-nitrobenzylchloride (Habig et al., 1974)



รูปที่ 11 แสดงปฏิกิริยาการเกิด glutathione conjugation ของ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ซึ่งถูกควบคุมโดย glutathione S-transferase (Gibson and Skett, 1994)

Glutathione S-transferase โดยปกติจะพบในเซลล์ได้มากถึง 10% ของโปรตีนที่พบภายในเซลล์ทั้งหมด จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าในตับหนูขาว glutathione S-transferase (rGST) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 classes ได้แก่ A, M, P และ T (alpha, mu, pi และ theta) โดย rGSTA สามารถแบ่งออกได้อีกอย่างน้อย 5 subunits ได้แก่ rGSTA1- rGSTA5 (อาจเรียกว่า Ya₁, Ya₂, Yc₁, Yk (Yα) และ Yc₂) ซึ่ง rGSTA1 และ rGSTA2 (หรือ ligandin) พบได้มากในตับและไต, rGSTM แบ่งออกได้เป็น 6 subunits ได้แก่ rGSTM1- rGSTM6, rGSTP ในหนูขาวพบเพียง 1 subunit คือ rGSTP1 ซึ่งจัดเป็น preneoplastic antigens โดยพบการทำงานของเอนไซม์มากเมื่อได้รับ chemical-induced tumors ส่วน rGSTT พบได้ 3 subunits ได้แก่ rGSTT1- rGSTT3 จากการศึกษา GST ใน alpha และ mu classes จะถูกเหนี่ยวนำการทำงานได้ (2-3 เท่า) โดย 3-MC, phenobarbital, corticosteroids, oltipraz และ antioxidants (เช่น ethoxyquin และ butylated hydroxyanisole) (Klaassen, 2001)

กลไกการเกิดพิษต่อตับ

ยาหรือสารเคมีที่มีผลทำให้เกิดพิษต่อตับ (hepatotoxicant) สามารถแบ่งได้ตามกลไกการออกฤทธิ์ ได้แก่ intrinsic และ idiosyncratic โดยพิษที่เกิดขึ้นจากสารเหล่านี้คือ cytotoxic (ซึ่งจะนำไปสู่การเกิด necrosis) และ cholestatic (ซึ่งจะนำไปสู่การเกิด fatty liver) หรือทั้งสองอย่าง

สารพวก intrinsic ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น

1. Direct toxicants:- เป็น cytotoxic agents ที่ทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะอื่น ด้วยนอกจากตับ ซึ่งอันตรายที่เกิดขึ้นจะเกิดกับ organelles ภายในเซลล์ พิษจะเกิดขึ้นถึงแม้จะได้รับสารช่วงระยะเวลาสั้นๆ และจะเกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์มากขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดของสาร (dose dependent injury) ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ CCl_4 , chlorinated hydrocarbons และโลหะหลายชนิด พิษที่เกิดขึ้นมักเป็น necrosis โดยมี steatosis หรือ fatty liver ร่วมด้วย

2. Indirect toxicants:- เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อตับโดยไปทำให้การทำงานของ metabolic routes ที่เฉพาะเจาะจงเสียไป การเกิดพิษจะมี selectivity และต้องได้รับสารเป็นระยะเวลา นาน สารในกลุ่มนี้เช่น ethanol , tetracycline , contraceptive , steroid ฯลฯ โดยลักษณะของพิษที่เกิดขึ้นจะเป็นการเกิด necrosis หรือ fatty liver

Fatty liver

เป็นสภาวะที่ตับมีปริมาณของไขมันมากกว่า 5% โดยน้ำหนัก ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของไขมันโดยสารหลายชนิด หรือจากการขาดสมดุลทางโภชนาการหรือจากโรคบางชนิดซึ่งทำให้เกิดการสะสมที่ผิดปกติของไขมันโดยเฉพาะพวก triglycerides

กลไกการเกิด fatty liver จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสารที่เป็นต้นเหตุ โดยกลไกที่น่าเป็นไปได้ เช่น การมีกรดไขมันมาที่ตับมากเกินไปซึ่งอาจเกิดจากสารที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของไขมันจากเนื้อเยื่อไขมัน ทำให้เกิดการสะสมของกรดไขมันอิสระภายในตับ , การลด oxidation ของกรดไขมัน , การลดการสร้างและหลั่ง VLDLP , การเกิด lipid peroxidation ฯลฯ

Liver necrosis

เป็นการตายของเซลล์ตับซึ่งมีสาเหตุมาจากการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ อย่างน้อยหนึ่งกระบวนการ เช่น การถูกทำลายของ nucleus และ endoplasmic reticulum ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง DNA , RNA และ โปรตีน หรือการยับยั้งการควบคุมและการสร้างพลังงานของ mitochondria เป็นต้น

กลไกการเกิด liver necrosis อาจเกิดขึ้นได้จากการถูกทำลายของ mitochondria, จากการทำลาย nucleus และ endoplasmic reticulum ทำให้การสร้าง DNA , RNA และ โปรตีน ถูกยับยั้ง , หรือในบางครั้งอาจเกิดจากเมตาบอลิท์จำพวก alkylating , arylating หรือ

acylating derivatives ที่สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆในเนื้อเยื่อแบบ covalent binding ได้ นอกจากนี้การเกิด lipid peroxidation ก็เป็นสาเหตุซึ่งทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์แบบนี้ได้

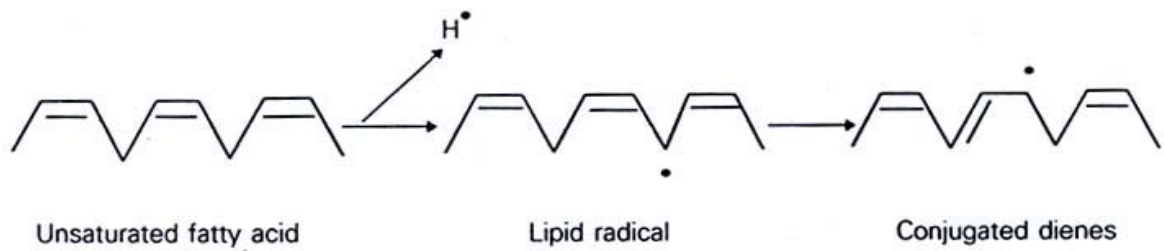
จะเห็นได้ว่าการเกิด lipid peroxidation เป็นกลไกที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ได้ทั้งการเกิด fatty liver และ liver necrosis โดย lipid peroxidation เป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน เริ่มด้วย initiation , propagation และ termination (รูปที่ 12)

ในปฏิกิริยา initiation เมื่อมี radical อิสระเกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของ hepatotoxicants บางตัว radical อิสระนี้จะไปแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid (LH) ได้ radical อิสระของ lipid (L) lipid radical นี้ไม่คงตัวจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น diene configuration ซึ่งจะจับกับ oxygen อย่างรวดเร็วได้เป็น lipid peroxy radical (LO_2) ซึ่งสามารถไปไล่ที่ hydrogen ออกจากโมเลกุลของ unsaturated fatty acids ที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้ hydroperoxide และ lipid radical ตัวใหม่ กระบวนการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องด้วยตัวของมันเองนี้ คือ propagation ซึ่งจะทำให้เกิด lipid peroxidation ขยายวงกว้างออกไปอีก hydroperoxide ที่เกิดขึ้นไม่คงตัวมักสลายได้ lipid radical เมื่อไม่มีโมเลกุลของ unsaturated fatty acids เหลืออยู่ปฏิกิริยา termination ก็เกิดขึ้นได้ผลเป็น nonradical products ซึ่งจะหยุดกระบวนการทั้งหมดของ lipid peroxidation

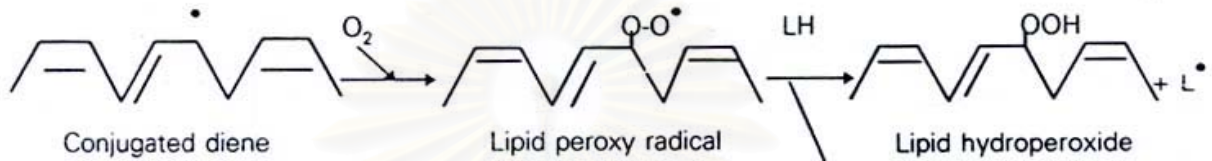
ผนังภายในเซลล์มีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) อยู่สูงจึงมักเป็นเป้าหมายของการโจมตีจาก lipid peroxidation ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียความคงตัว มีผลเพิ่มการซึมผ่านของผนังเซลล์ ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เกิดการตายของเซลล์ และนอกจากนี้สารต่างๆที่เกิดขึ้นจากการเกิด lipid peroxidation เช่น aldehyde มักเคลื่อนไปยังอวัยวะอื่น ซึ่งอาจทำให้เกิดพิษต่ออวัยวะนั้นๆได้เช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

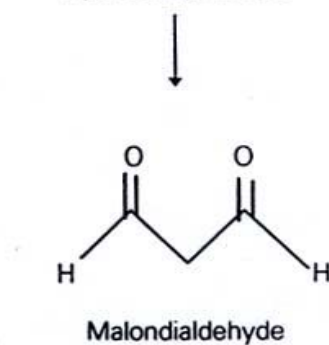
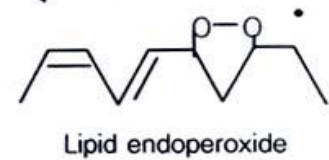
Initiation



Propagation



Termination



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 แสดงกระบวนการเกิด lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978)

บทบาทของ Glutathione (GSH)

Glutathione เป็น non-protein thiol ที่มีความสำคัญมากที่สุดเซลล์ของสัตว์ เซลล์ของพืชส่วนใหญ่และแบคทีเรีย ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีความเข้มข้นของ glutathione ในปริมาณสูง ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป thiol (GSH) ผสมกับ disulfides (G-SS-protein) และ thioethers ส่วนน้อยอยู่ในรูปของ glutathione disulfide (GSSG)

Glutathione พบได้มากใน cytoplasm มีบทบาทสำคัญโดยเกี่ยวข้องกับการรักษาความคงตัวของผนังเซลล์และกล้ามเนื้อ การสังเคราะห์โปรตีนและ DNA การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนและสมรรถนะของเอนไซม์ และการหลั่งของ neurotransmitter บางตัว นอกจากนี้ glutathione ยังมีบทบาทที่สำคัญคือ บทบาทเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของยา โดยที่ glutathione (GSH) เป็น strong nucleophile ทำให้สามารถจับกับยาหรือเมตาบอลิท์ของสารหรือยาที่เป็น electrophile โดยมีเอนไซม์ glutathione S-transferase เป็นตัวกระตุ้นและถูกทำให้ อยู่ในรูป glutathione conjugate ซึ่งมีผลให้ยาหรือเมตาบอลิท์ของสารหรือยานั้นหมดฤทธิ์

บทบาทของ glutathione ในการทำหน้าที่เป็น nucleophile

การเกิด glutathione conjugate นี้จะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจพบอยู่ในรูปที่เกาะอยู่ที่ผนังของ endoplasmic reticulum ซึ่งจะมี low affinity ต่อ electrophiles โดยเอนไซม์นี้สามารถรวมตัวกับยาได้เป็นจำนวนมากและสมรรถนะของเอนไซม์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยยาและสารหลายตัว

Glutathione(GSH) สามารถรวมตัวกับ electrophiles ได้หลายรูปแบบ electrophiles ซึ่งจับกับ glutathione ส่วนใหญ่เป็นสารนอกกร่างกายและมักเป็นเมตาบอลิท์ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนแปลงโดย Cytochrome P450 monooxygenase system ใน endoplasmic reticulum ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ paracetamol ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงโดย Cytochrome P450 monooxygenase system ได้สารพวก electrophilic intermediate ซึ่งจะจับกับ glutathione (GSH) ได้สารประกอบของ glutathione conjugate โดยพิษต่อตับของ paracetamol นี้จะมีความรุนแรงมากขึ้นหากมีการลดปริมาณของ glutathione ภายในเซลล์ ดังนั้นปริมาณของของ glutathione ภายในเซลล์จึงเป็นตัวจักรสำคัญในการป้องกันพิษจาก electrophilic drug metabolite ซึ่งสามารถไปจับและรวมตัวกับโมเลกุลที่สำคัญและจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์

ในการศึกษาถึงผลของสาร barakol ต่อเซลล์ตับอิสระ (isolated rat hepatocytes) ซึ่งจะดูผลของสารต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ reduced glutathione (GSH) ภายในเซลล์ และดูผลต่อการเกิดภาวะ lipid peroxidation โดยวิเคราะห์หาปริมาณของ malondialdehyde (MDA) รวมทั้งการดูผลของสารต่อ membrane integrity โดยการตรวจวัดปริมาณของ alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase (AST) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นภายในตับ และจะถูกปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดอันตรายต่อเซลล์ตับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี-อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว เพศผู้ พันธุ์วิสตา (Wistar)

น้ำหนักระหว่าง 200 – 250 กรัม

จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. สารเคมี และ เครื่องมือ

สารที่ต้องการศึกษา คือ anhydrobarakol hydrochloride สกัดได้จากใบอ่อนของขี้เหล็ก ในห้องปฏิบัติการเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สกัดโดย รศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

บริษัท คลินิกคอลไดแอคโนติกส์ ประเทศไทย

SGOT (AST) & SGPT (ALT) Sets

บริษัท อี เมอร์ค ประเทศเยอรมันนี

Ammonium acetate

Chloroform

Diethylether

Hydrochloric acid

บริษัท ลีโอ ฟาร์มาซูติคอลล ประเทศเดนมาร์ค

Heparin 5,000 iu/ml

บริษัท ซิกมา เคมีคัล ประเทศสหรัฐอเมริกา

Aminopyrine

Acetyl acetone

Bovine serum albumin (Fraction V) (1.2%BSA)

1-chloro-2,4-dinitrobenzene

Calcium chloride

Collagenase (Type IV)

5,5'- dithiobenzoic acid

D-glucuronic acid
 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 Ethanol
 Formaldehyde solution
 Glycine
 L-glutamine
 Magnesium chloride
 Magnesium sulfate crystalline
 Minimum Eagle's basal medium (MEM)
 1-naphthol
 α -naphthyl β -D-glucuronide
 Potassium chloride
 Potassium phosphate monobasic anhydrous
 Potassium phosphate dibasic anhydrous
 Sodium bicarbonate
 Sodium chloride
 Semicarbazide hydrochloride
 Sulfosalicylic acid
 Sodium phosphate monobasic anhydrous
 Sodium phosphate dibasic anhydrous
 Sodium hydroxide
 Trypan blue solution
 Thiobarbituric acid
 Trichloroacetic acid
 Trizma base

บริษัท ไทยอินดัสเทรียล แก๊ส

Carbogen gas (O₂ 95%, CO₂ 5%)

- เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

AutoPipetts ขนาด 20 , 100 , 200 , 1000 μ l และ 10 ml

Centrifuge

Counting chamber

Dissecting instruments

Disposable insulin syringe with needle

Glassware

Light microscope

Liver perfusion apparatus

Magnetic stirrer with magnetic bar

Metabolic shaker bath

Microtubule pump

Operation table

pH meter

Single pan balance

Sonicator

Spectrophonometer

Spectrofluorometer

Torsion balance

Vortex mixer

Water bath

3. สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมสารในการวิจัยและวิธีการทดลอง

1. การเตรียม anhydrobarakol hydrochloride solution นำ anhydrobarakol hydrochloride ละลายในน้ำกลั่น ตามความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา คือ 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM ซึ่งสารละลายที่ได้จะเตรียมและใช้ภายในไม่เกิน 1 ชั่วโมง และป้องกันการถูกแสงโดยห่อหุ้มด้วย aluminium foil

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว

การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาวใช้วิธีของ Berry and Friend (1969) ต่อมา Stacey and Priestly (1978) ได้ทำการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสม โดยใช้ Modified Kreb's and Henseleit Physiological (1932) ซึ่งจะอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและให้ carbogen gas ตลอดเวลา

วิธีการเตรียมสารละลายมีดังนี้

สารละลาย A : Calcium free medium (pH 7.4) ประกอบด้วย

NaCl	2.8053 กรัม
KCl	0.0522 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0863 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1701 กรัม
NaHCO ₃	1.26 กรัม
D-gluconic acid	2.3664 กรัม
Ultrapurified water to	500.0 มล.

Equilibrate with carbogen gas

(แยกชั่งและละลาย NaHCO₃ ต่างหากแล้วนำมาผสมกับสารละลายที่เหลือ)

สารละลาย B : Calcium buffer solution (pH 7.4) ประกอบด้วย

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0357 กรัม
Calcium free medium to	150.0 มล.

สารละลาย C : Cleaning solution (pH 7.4) ประกอบด้วย

[1].Bovine Serum Albumin	0.96 กรัม
Calcium buffer to	30.0 มล.
[2].Bovine Serum Albumin	1.2 กรัม
Calcium buffer to	100.0 มล.

สารละลาย D : Collagenase solution (pH7.4) ประกอบด้วย

[1].Collagenase	0.01	กรัม
Calcium free medium to	10.0	มล.
[2].Collagenase	0.04	กรัม
Calcium free medium to	20.0	มล.

สารละลาย E : Eagle's basal medium (pH7.4) ประกอบด้วย

Bovine Serum Albumin	1.2	กรัม
Minimum Eagle's basal medium(MEM;10%)	96	มล.
L-glutamine (200mM)	1	มล.
NaHCO ₃ (2.8%w/v) to adjust pH 7.4		

(แยกชั่ง NaHCO₃ 0.75 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ใช้ประมาณ 3 มล. ใน MEM 96 มล.)

3. การเตรียมเซลล์ตับอิสระของหนูขาว (Preparation of isolated rat hepatocytes)
มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ตมสลบหนูขาวด้วย diethylether ผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เพื่อสอดท่อแคนูล่าเข้า
portal vien

3.2 Two step perfusion โดยใช้ calcium free medium ไหลผ่านตับแบบไหล
ทิ้ง (nonrecirculating perfusion) ทำการตัดตับออกจากตัวหนูขาวหลังจากนั้นใช้ collagenase
solution [2] ไหลผ่านตับแบบไหลเวียนซ้ำ (recirculating perfusion) เป็นเวลา 10 นาที

3.3 Disruption of collagenase-perfused liver แกว่งให้เซลล์ตับหลุดเป็นอิสระ
ใน collagenase solution [2] แบ่งใส่ใน Erlenmeyer flask (250 ม.ล.) 2 ขวด ล้างด้วย
collagenase solution [1] เขย่าใน metabolic shaker bath (150 ครั้ง/นาที) ที่อุณหภูมิ 37
องศาเซลเซียส โดยให้ carbogen gas ตลอดเวลานาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านผ้า
กรองไนลอน 2 ครั้ง และล้างเอาเซลล์ออกให้มากที่สุดด้วย cleaning solution [1]

3.4 Purification of parenchymal cells นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยไปปั่นแยก
parenchymal cells ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที 2 ครั้งโดยล้างเซลล์ตับ
อิสระแขวนลอยด้วย cleaning solution [2] ในขั้นสุดท้ายเซลล์ตับอิสระจะแขวนลอยอยู่ใน

Eagle's basal medium ซึ่งควรมีความหนาแน่นของเซลล์ตับอิสระเท่ากับ 40 มก./มล. ($5-6 \times 10^6$ เซลล์/ชม.³) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาตร Eagle's basal medium ที่เติมในเซลล์ตับอิสระ (มล.)} = \frac{\text{จำนวนกรัมของเซลล์ตับอิสระ} \times \text{ปริมาตร Eagle's basal medium 1 มล.}}{\text{จำนวนเซลล์ตับอิสระ 0.04 กรัม}}$$

3.5 Trypan blue exclusion test ผสมเซลล์ตับอิสระแขวนลอย 50 μ l กับ 0.04% trypan blue 50 μ l ตรวจนับจำนวนเซลล์ใน counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

$$\% \text{ Trypan blue exclusion} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เป็น}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

โดยเซลล์ตับอิสระที่นำมาใช้ในการทดลองควรมีค่า Trypan blue exclusion index เกิน 90 %

3.6 การหาน้ำหนักเปียกของเซลล์ตับ (wet weight) ผลของค่าวัดส่วนใหญ่จะคำนวณต่อหน่วย wet weight โดยนำเซลล์แขวนลอย 1 มล. ใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนัก (2 ตัวอย่าง) ไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเหลวลอยตัว (supernatant) ทิ้งแล้วคว่ำหลอดทดลองเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักที่เหลือ (มก./มล.)

3.7 Incubation ของ isolated rat hepatocytes suspension ในทุกการทดลองใช้เซลล์ตับอิสระแขวนลอยปริมาตร 3 มล./ตัวอย่าง ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 25 มล. โดยอุ่นใน metabolic shaker bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยให้ carbogen gas ตลอดเวลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ phase I enzyme ได้แก่ Cytochrome P450 (CYP2B,2C) ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 control เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล.

กลุ่มที่ 2 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.025 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 3 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.05 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 4 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.075 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 5 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.10 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 6 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.15 mM ใน cell suspension 3 มล.

การทดสอบผลต่อ aminopyrine N-demethylase activity

ใช้ aminopyrine N-demethylation ตามวิธีการของ Gibson and Skett (1994) และ Marzel (1972) โดยนำมาเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสมดังนี้

1. นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยตัวอย่างละ 3 มล. ผสมกับ 0.1 มล. ของ 5 mM aminopyrine ใน 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) และ 5 mM semicarbazide

2. อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน metabolic shaker bath (150 ครั้ง/นาที) เป็นเวลา 30 นาที

3. ใส่ 1 มล. ของ 10% TCA (trichloroacetic acid) ที่ละลายใน 0.25 N HCl (hydrochloric acid) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

4. ปิเปตส่วนของ supernatant มา 2 มล. ผสมกับ 2 มล. ของ Nash reagent (30% ammonium acetate + 0.4% acetyl acetone) แล้วอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm คำนวณค่าของ aminopyrine N-demethylase activity กับ standard curve

การทำ standard curve ของ aminopyrine N-demethylase

1. เตรียม stock solution ของ 0.1 mM formaldehyde (0.75 มล. ของ 40% formaldehyde solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล. นำสารละลายที่เจือจางนี้มา 0.25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มล.)

2. นำ 0.1 mM formaldehyde มา 0 , 0.4 , 0.8 , 1.2 , 1.6 และ 2.0 มล. ใส่ในหลอดทดลองปรับปริมาตรให้เป็น 2 มล. ด้วยน้ำกลั่น

3. เติม 2 มล. Nash reagent (30 % ammonium acetate + 0.4 % acetyl acetone) แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm plot standard curve

2. ศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ phase II enzyme ได้แก่ UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 control เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล.

กลุ่มที่ 2 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.025 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 3 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.05 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 4 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.075 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 5 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.10 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 6 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.15 mM ใน cell suspension 3 มล.

การตรวจวัด UDP-glucuronyltransferase activity

ใช้วิธีการของ Bock , et al (1974) โดยนำมาปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสมดังนี้

1. นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยที่ incubate กับ anhydrobarakol hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆมาผสมกับสารละลาย 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.4 + 5 mM MgCl₂ + 0.5 mM 1-naphthol + 3 mM D-glucuronic acid ปริมาตร 1 มล. incubate นาน 4 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยใส่สารละลาย 0.6 M glycine + 0.4 M trichloroacetic acid buffer , pH 2.2 ปริมาตร 1 มล. นำสารละลายไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

3.บีบส่วนใส (supernatant) 3 มล. ผสมกับ chloroform 3 มล. จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

4.บีบส่วนน้ำใส (aqueous phase) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารละลาย 0.45 M NaOH (final pH 10.0 – 10.5) ปริมาตร 2 มล.

5.วัดปริมาณของ naphthol glucuronide โดยใช้ spectrofluorometer ที่ excitation wavelength 290 nm , emission wavelength 330 nm

การทำ standard curve ของ naphthol glucuronide formation

1.เตรียม α -naphthyl β -D-glucuronide (MW=342.3) solution ที่ความเข้มข้น 0.005 , 0.01 , 0.02 , 0.03 และ 0.04 mM

2.บีบ α -naphthyl β -D-glucuronide solution ความเข้มข้น 0.005 , 0.01 , 0.02, 0.03 และ 0.04 mM ปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารละลาย 0.45 M NaOH ปริมาตร 2 มล.

3.นำไปวัดค่า intensity โดยใช้ spectrofluorometer ที่ excitation wavelength 290 nm, emission wavelength 330 nm

4.plot standard curve ของ naphthol glucuronide โดยใช้ blank set 0 (blank = distilled water 1 มล. + 0.45 M NaOH 2 มล.) แล้วนำไปคำนวณเพื่อหา UDP-glucuronyltransferase activity

การตรวจวัด glutathione S-transferase activity

ใช้วิธีการของ Habig , et al (1974) โดยนำมาปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสมดังนี้

1.นำเซลล์ตับอิสระแขวนลอยที่ incubate กับ anhydrobarakol hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

2.นำส่วนตะกอน (pellet) ผสมกับ 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 ปริมาตร 2.2 มล. และ 30 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene ปริมาตร 0.1 มล. incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

3.ปิเปตส่วนใส (supernatant) มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยใช้ spectrophotometer คำนวณหา GST activity จากค่า extinction coefficient $9.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3. ศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ในขนาดที่ใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 ที่มีต่อการเกิดพิษต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 control เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล.

กลุ่มที่ 2 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.025 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 3 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.05 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 4 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.075 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 5 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.10 mM ใน cell suspension 3 มล.

กลุ่มที่ 6 เป็น isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ปริมาตร 0.1 มล. ความเข้มข้น 0.15 mM ใน cell suspension 3 มล.

การวิเคราะห์ activity ของ เอนไซม์ ALT & AST

เป็นการตรวจวัด cell membrane integrity โดยอาศัยการตรวจวัด transaminase activity ตามวิธีการของ Reitman and Frankel (1957) โดยใช้ยาสำเร็จรูป มีรายละเอียดดังนี้

การทำ standard curve โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ ALT&AST substrates

1. การทำ standard curve โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ ALT&AST substrates ดังนี้

Tube No.	Standard pyruvate (มล.)	ALT&AST substrates (มล.)	H ₂ O (มล.)	AST activity (SF units/มล.)	ALT activity (SF units/มล.)
1	0.00	0.50	0.1	0	0
2	0.05	0.45	0.1	20	25
3	0.10	0.40	0.1	55	50
4	0.15	0.35	0.1	95	83
5	0.20	0.30	0.1	148	126

2. ใส่ dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 0.5 มล. ทุกหลอดการทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

3. ใส่ 0.4 M NaOH 5 มล. ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set 0

5. plot curve ระหว่าง ALT และ AST units กับค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละค่า ลากเส้นต่อของแต่ละจุดจะได้ standard curve

การวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ ALT&AST มีขั้นตอนดังนี้

1. บีบเซลล์ตับอิสระแขวนลอย 1 มล./ตัวอย่าง มาปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนของเหลวใสเหนือตะกอน (supernatant) ไว้ใน microtube เพื่อนำมาวิเคราะห์หา ALT & AST activity

2. ใส่ ALT & AST substrate 0.5 มล. ในหลอดทดลองทุกหลอด

3. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. เติมส่วนของ supernatant ที่เก็บไว้ใน microtube ปริมาตร 0.1 มล./ตัวอย่าง ผสมแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับ AST และเป็นเวลา 15 นาที สำหรับ ALT

5.เติม dinitrophenyldrazine 0.5 มล. ทุกหลอดทดลอง ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

6.เติม 0.4 M NaOH 5 มล. ทุกหลอดทดลองผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

7.นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้ น้ำ เป็น blank สำหรับ set 0

8.นำค่าการดูดแสงที่วัดได้ไปหา activity ของ ALT & AST จาก standard curve
การตรวจวัด reduced glutathione (GSH)

ใช้วิธีการของ Ellman (1959) ซึ่งปรับปรุงโดย Jollow, et al. (1977) โดยนำเซลล์ตับ อีสุระแขวนลอย 0.5 มล./ตัวอย่าง ผสมกับ 4% sulfosalicylic acid 0.5 มล. ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที นำ supernatant 0.5 มล. เติมสารละลาย 0.1 mM dithiobenzoic acid (ใน 0.1 M phosphate buffer pH 8) ปริมาตร 4.5 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm (ความเข้มข้นของ GSH คำนวณจากค่า extinction coefficient $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

การตรวจวัดการเกิด lipid peroxidation (malondialdehyde : MDA)

ใช้ thiobarbituric acid assay ตามวิธีการของ Buege and Aust (1978) โดยนำเซลล์ ตับอีสุระแขวนลอย 1.5 มล./ตัวอย่าง ผสมกับสารละลาย stock TCA-TBA-HCL (15% trichloroacetic acid + 0.375% thiobarbituric acid ใน 0.25 N hydrochloric acid) ปริมาตร 3 มล. นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่น ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 535 nm (ความเข้มข้นของ malondialdehyde ที่เกิดขึ้นคำนวณจากค่า extinction coefficient $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแสดงผลการทดลองแสดงเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. แผนภูมิรูปแท่ง
2. ตาราง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. Mean \pm SEM : ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานใช้ในการนำเสนอข้อมูลของค่าทางชีวเคมี

2. ANOVA ทดสอบ โดยใช้ LSD test สำหรับข้อมูลแต่ละกลุ่มกันที่เวลาเดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) ซึ่งมีค่าของ cell viability จากการวิเคราะห์ด้วย Trypan blue exclusion index มากกว่า 90 %

1. การศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ phase I enzyme ได้แก่ Cytochrome P450 (CYP 2B , 2C) ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว โดยวัดหา aminopyrine N-demethylase activity พบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM ทำให้ aminopyrine N-demethylase activity มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 1)

2. การศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ phase II enzyme ได้แก่ UDP-glucuronyltransferase และ glutathione S-transferase ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว พบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM ทำให้ UDP-glucuronyltransferase มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 2) และทำให้ glutathione S-transferase มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 3)

3. การศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ในขนาดที่ใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 ที่มีต่อการเกิดพิษต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว โดยดูผลต่อ cell membrane integrity จากการตรวจวัด activity ของ alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase (AST) ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ตับอิสระ จากการทดลองพบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 , 0.05 และ 0.075 mM ไม่เพิ่ม ALT activity ซึ่งต่างจากความเข้มข้น 0.10 และ 0.15 mM ที่ทำให้ ALT activity มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 4)

สำหรับ aspartate aminotransferase activity (AST activity) พบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 mM ไม่เพิ่ม AST activity

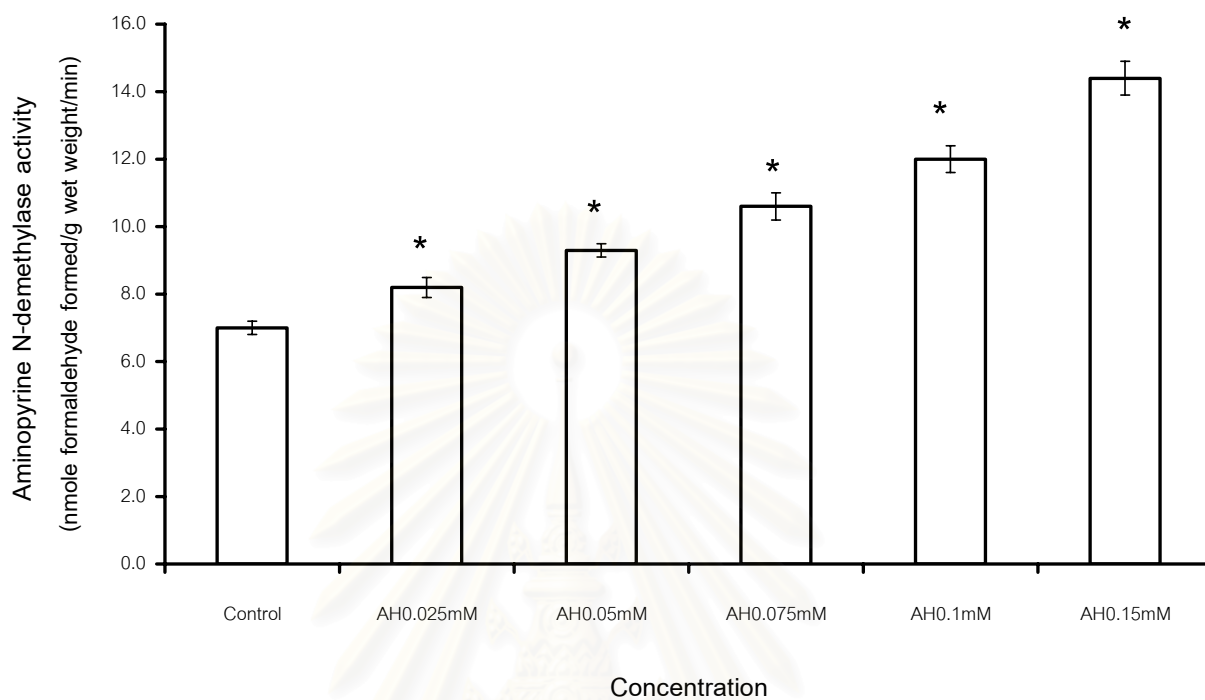
แต่ความเข้มข้น 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM ทำให้ AST activity มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 5)

ในการศึกษาผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อปริมาณของ reduced glutathione (GSH) ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว พบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 , 0.05 และ 0.075 mM มีผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.10 และ 0.15 mM ทำให้ GSH มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (แผนภูมิที่ 6)

ผลของ anhydrobarakol hydrochloride ต่อการเกิด lipid peroxidation โดยวิเคราะห์ปริมาณของ malondialdehyde (MDA) พบว่า anhydrobarakol hydrochloride ในความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM ไม่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 7)

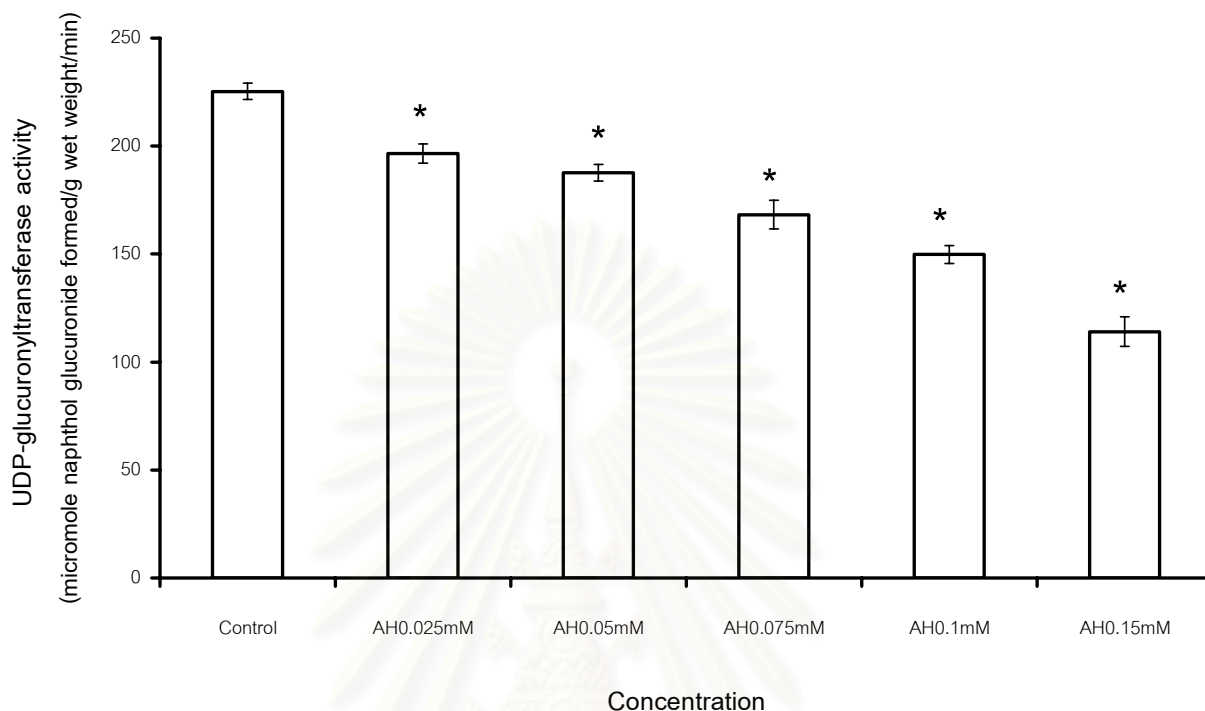


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



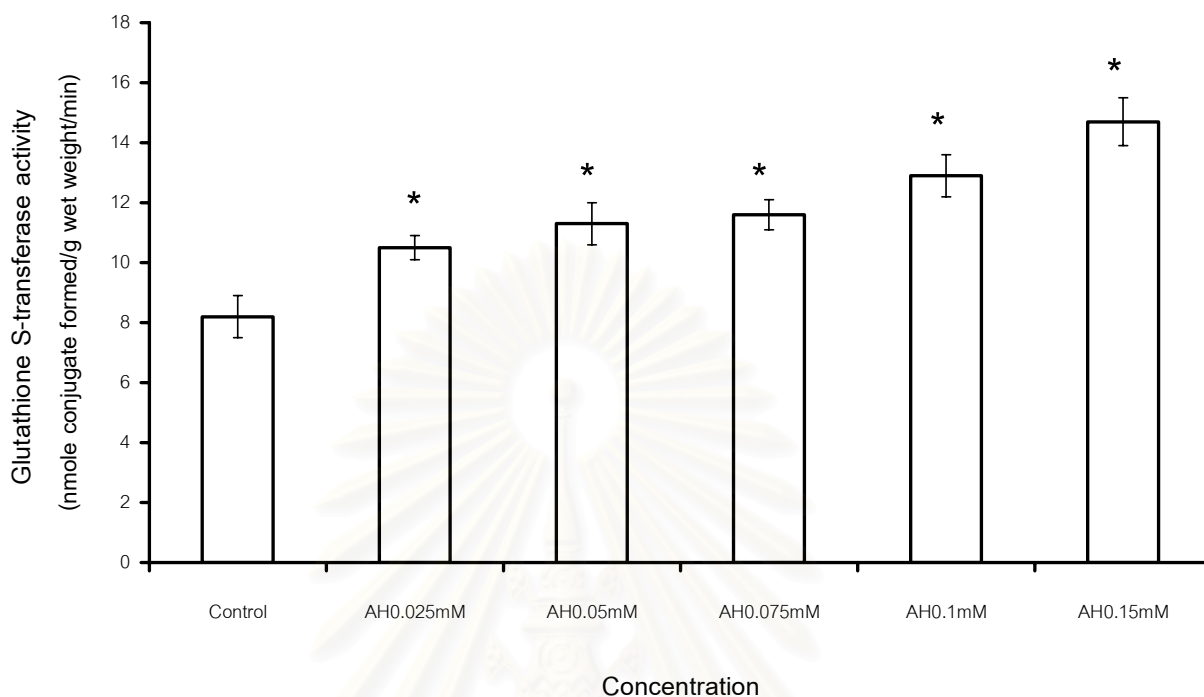
แผนภูมิที่ 1 Aminopyrine N-demethylase activity จาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 30 นาที ในการศึกษาผลของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ Cytochrome P450 (CYP2B,2C) ใน isolated rat hepatocytes (N=9 , Mean±SEM)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ Control



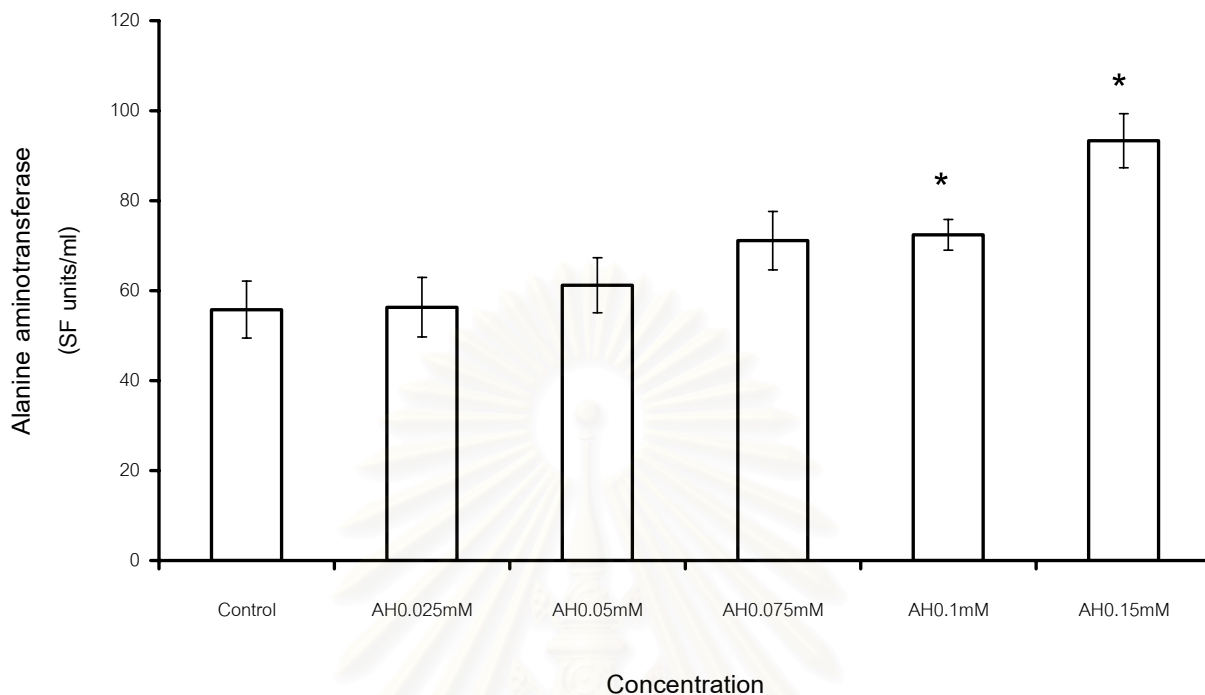
แผนภูมิที่ 2 UDP-glucuronyltransferase activity จาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาผลของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ UDP-glucuronyltransferase (phase II enzyme) ใน isolated rat hepatocytes (N=9 , Mean±SEM)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ Control



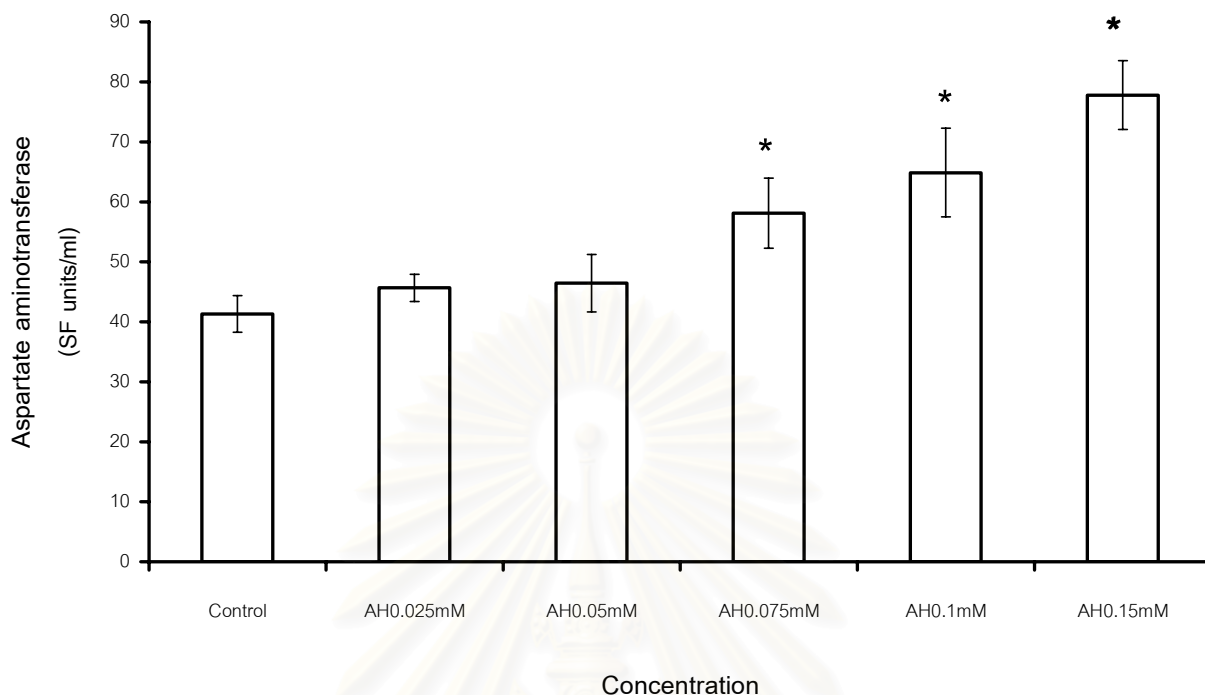
แผนภูมิที่ 3 Glutathione S-transferase activity จาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาผลของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อการทำงานของ glutathione S-transferase (phase II enzyme) ใน isolated rat hepatocytes (N=9 , Mean±SEM)

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Control



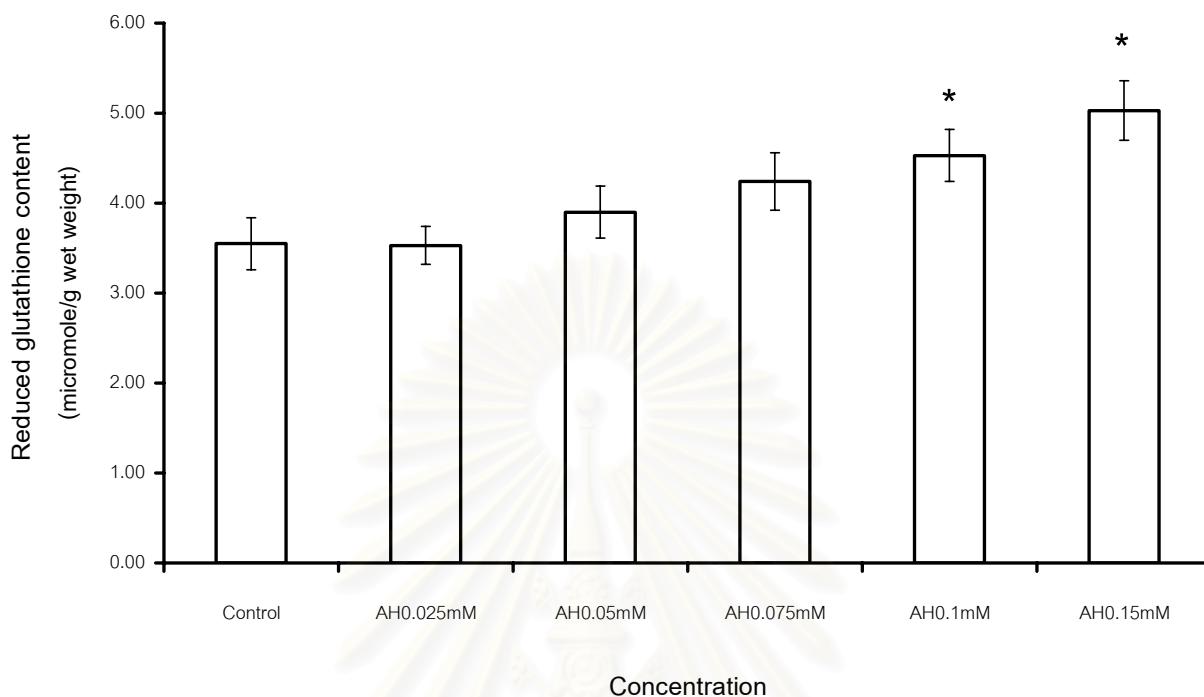
แผนภูมิที่ 4 activity ของ Alanine aminotrasferase (ALT) ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075, 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาการเกิดพิษของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อ isolated rat hepatocytes (N=9, Mean±SEM)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Control



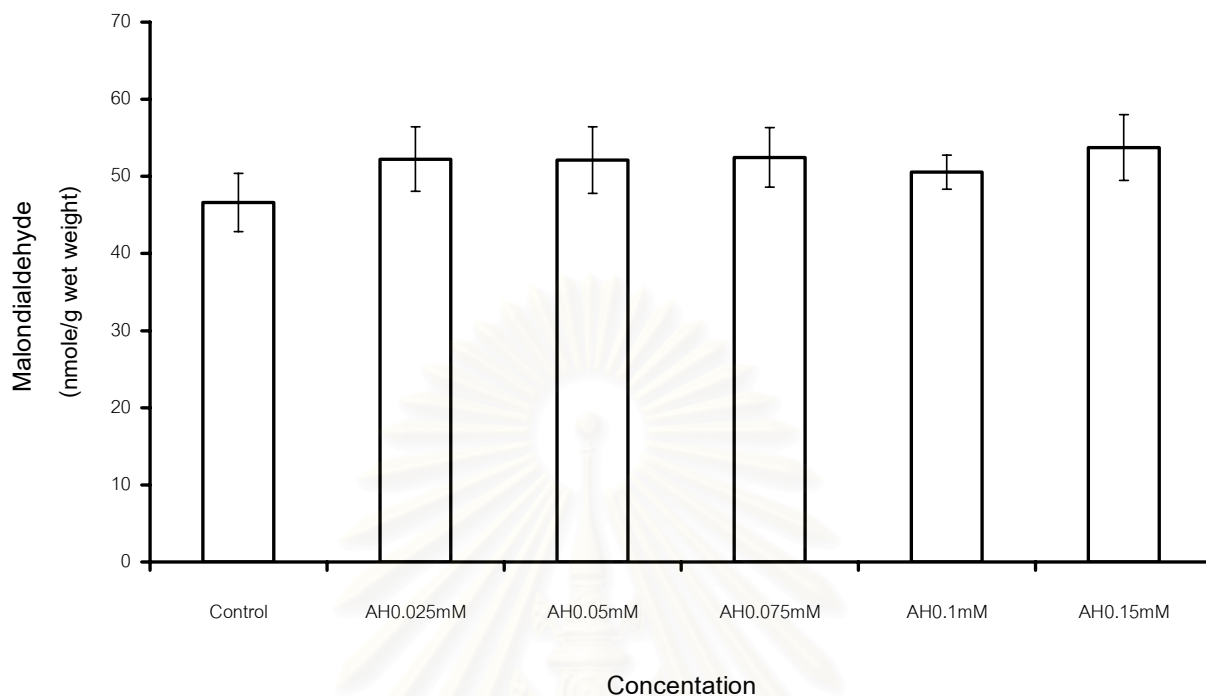
แผนภูมิที่ 5 activity ของ Aspartate aminotransferase (AST) ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075, 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาการเกิดพิษของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อ isolated rat hepatocytes (N=9, Mean±SEM)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Control



แผนภูมิที่ 6 reduced glutathione contents (GSH) ใน isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาการเกิดพิษของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อ isolated rat hepatocytes (N=10 , Mean±SEM)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Control



แผนภูมิที่ 7 lipid peroxidation จาก isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ความเข้มข้น 0.025 , 0.05 , 0.075 , 0.10 และ 0.15 mM เปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสัมผัสเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ในการศึกษาการเกิดพิษของ Anhydrobarakol hydrochloride ต่อ isolated rat hepatocytes (N=13 , Mean±SEM)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ชี้เหล็กเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านไทย ถูกนำมาใช้เป็นยา คลายกังวลและช่วยให้นอนหลับได้ดีขึ้น โดยสารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคือ barakol จากการศึกษาพบว่ายาชี้เหล็กมีผลข้างเคียงทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสาเหตุที่เกิดขึ้นเป็นผลโดยตรงจาก barakol หรือสารอื่นที่มาจาก barakol ดังนั้นจึงทำการการศึกษาเพื่อดูผลของ barakol ที่เกิดขึ้นโดยตรงต่อเซลล์ตับโดยใช้เซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ใน phase I และ phase II พร้อมกับตรวจหาความเป็นพิษต่อตับของสารโดยการวิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์ transaminase (ALT,AST) ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ , ปริมาณ reduced glutathione ภายในเซลล์ รวมถึงการเกิด lipid peroxidation (ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำมาใช้อธิบายผลของ barakol ที่มีต่อเซลล์ตับ

จากการทดลองพบว่าในทุกความเข้มข้นของ barakol เมื่อ incubate ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีผลเพิ่มการทำงานของ aminopyrine N-demethylase และ glutathione S-transferase แต่ลดการทำงานของ UDP-glucuronyltransferase โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดของสารที่ให้

ในหนูขาว Cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง aminopyrine คือ CYP2B และ 2C โดยการทำงานของ aminopyrine N-demethylase ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีสมรรถนะเพิ่มขึ้นด้วย enzyme inducers หลายชนิด โดยเฉพาะที่รู้จักกันดีคือ phenobarbital และ rifampin การเพิ่มขึ้นของ CYP activity อาจเกิดขึ้นจาก duplication ของ CYP gene หรือการเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง CYP มากขึ้น หรือการกระตุ้น preexisting enzyme ที่มีอยู่แล้วโดยสารต่างๆที่ได้รับเข้าไป ในกรณีของ phenobarbital ส่วนใหญ่จะเกิดจากการไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง CYP มากขึ้น โดยไปจับกับ cystolic receptor คือ CAR β receptor นอกจากนี้ยังพบว่า enzyme inducer ส่วนใหญ่จะเป็น substrate ของ CYP นั้นๆ (Klaassen, 2001) ในกรณีของ barakol เมื่อให้ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถเพิ่มการทำงานของ aminopyrine N-demethylase ได้ และผลการเพิ่มขึ้นจะเพิ่มตามขนาดของ barakol ที่เพิ่มขึ้น จากผลที่ได้นี้มีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่ barakol น่าจะเป็น substrate ของ CYP 2B,2C และ

เหนี่ยวนำทำให้การทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น มีหลายรายงานที่พบว่า aminopyrine N-demethylase ถูกกระตุ้นให้ทำงานเพิ่มขึ้นได้ในการทดลอง in vitro โดยใช้สมุนไพรหลายชนิดเช่น สมุนไพรพื้นบ้านของมาเลเซีย ได้แก่ Air Gamat Asli Lang Kawi , Faizol Tonik , Air Jamu Pak Tani และสมุนไพรพื้นบ้านของจีน ได้แก่ Yomeishu , Ginseng & Polygona Root Extractum , King To Nin Jiom Pei Pa Kao พบว่าสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ aminopyrine N-demethylase ในการทดลองโดยใช้ rat hepatocytes ได้ (Abas, Saringat and Rozana, 1998)

การศึกษาระดับโมเลกุลพบว่าการเหนี่ยวนำการทำงานของ Cytochrome P450 และ UDP-glucuronyltransferase มีความสัมพันธ์กันโดยมีลักษณะเป็น co-induction (Gibson, 1992) โดยจากการศึกษาถึงผลของการเหนี่ยวนำ CYP1A1 ของสารกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons เช่น 3-methylcholanthrene , TCCD ฯลฯ เชื่อว่าการทำงานเกิดจากสารหรือ ligands จะจับที่ตำแหน่งของ Ah locus ของ receptor ภายใน cytosol เกิด ligand-receptor complex ซึ่งจะเคลื่อนไปยัง nucleus แล้วจับกับส่วนของ responsive genes บน chromosomes มีผลกระตุ้นการ transcription ของ CYP1A1 genes และ UGTs genes โดย UGTs isozymes ที่เกิดขึ้น จะมีความเฉพาะเจาะจงต่อ substrate ในกลุ่ม planar phenol เช่น 1-naphthol , 4-nitrophenol และ 4-methylumbelliferone ดังนั้นผลการลดลงของ UGT ในการศึกษานี้อาจเป็นไปได้ว่า substrate ที่ใช้ในการศึกษา คือ 1-naphthol อาจไม่ใช่ substrate ที่เฉพาะเจาะจงของ UGTs isozymes ที่ถูกกระตุ้นโดย barakol เนื่องจาก barakol มีผลเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP2B ซึ่งจัดเป็น inducer ที่สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ UGT isozymes ที่ถูกกระตุ้นได้ โดย phenobarbital ซึ่งมี specific substrate ได้แก่ chloramphenicol , morphine , 4-hydroxybiphenyl และ monoterpenoid alcohols นอกจากการศึกษานี้ในหนูเขายังพบว่า rate ของปฏิกิริยา glucuronidation ที่เกิดขึ้นจะแปรตาม substrate ที่ใช้ (substrate-dependent) และจะถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ inducers ของ CYP450 (Klaassen, 2001)

การศึกษา in vivo ในหนูขาวที่ได้รับอาหารผสมใบขี้เหล็ก 5% เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์ aminopyrine N-demethylase ลดลง ส่วนการทำงานของ UDP-glucuronyltransferase เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ 4-nitrophenol เป็น substrate ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้มีความแตกต่างกับการศึกษานี้ ที่การทำงานของ aminopyrine N-demethylase เพิ่มขึ้นและการทำงานของ UDP-glucuronyltransferase ลดลง อาจอธิบายว่าในการทดลอง in vivo ผลที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการได้รับสารทั้งหมดในใบขี้เหล็กแบบเรื้อรังซึ่งสารอาจมีผลต่อการทำงานของ CYP450

isozymes กลุ่มอื่นที่มีผลต่อการสังเคราะห์ของ UGTs isozymes ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ 4-nitrophenol (Tepsuwan and Kusamran, 1997)

นอกจากนี้มีการศึกษาในหนูขาวที่ได้รับสาร barakol แบบกึ่งเรื้อรังโดยการกิน 30 มก./กก. โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและอาหารที่มีคลอเรสเตอรอลสูง พบว่า barakol มีผลลดสมรรถนะของ CYP1A2 อย่างมีนัยสำคัญในหนูทั้งสองกลุ่มและเช่นเดียวกับ CYP1A1 ในหนูที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูง ส่วนผลของ barakol ต่อ CYP2B1/2B2 , CYP2E1 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Maniratanachote, 2001) ดังนั้นการทดลองที่ดูผลของ barakol โดยตรงต่อเซลล์ตับใน in vitro model นี้ จึงอาจให้ผลที่ไม่เหมือนกับการให้ barakol แบบเรื้อรังหรือกึ่งเรื้อรัง

ในการทดลองครั้งนี้ barakol มีผลเพิ่มการทำงานของ glutathione S-transferase ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาใน in vivo ในหนูขาวที่ได้รับอาหารผสมไขเหล็ก 5% เป็นเวลา 14 วัน (Tepsuwan and Kusamran, 1997) แต่ให้ผลไม่ตรงกับการศึกษาในหนูขาวเมื่อให้ barakol แบบกึ่งเรื้อรังโดยการกินในขนาด 30 มก./กก. ที่พบว่าการทำงานของ glutathione S-transferase ไม่เปลี่ยนแปลง (Maniratanachote, 2001) จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงว่า barakol สามารถจับกับ glutathione S-transferase ได้ แต่อาจจะไม่ใช้ substrate ของเอนไซม์ เพราะ glutathione S-transferase นอกจากจะกระตุ้นปฏิกิริยา glutathione conjugation ที่ใช้ glutathione เป็น conjugating agent และมี specific substrate ที่ใช้กันมากคือ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene แล้ว ยังทำหน้าที่จับ (bind) , เก็บ (store) และ ขนถ่าย (transport) สารเป็นจำนวนมากที่ไม่ใช่ substrate ของมัน เช่น bilirubin , steroids , azo-dyes และสารพวก polycyclic aromatic hydrocarbon โดยจะมีปริมาณเป็นจำนวนมากในเซลล์ตับสูงถึง 10% ของโปรตีนในเซลล์ทั้งหมด จึงเป็นไปได้อย่างยิ่งว่า barakol เมื่อให้ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาว สามารถจับกับ glutathione S-transferase โดยไม่ใช้ glutathione จึงทำให้ระดับของ glutathione สูงขึ้น

การศึกษาผลของ barakol ในเซลล์ตับอิสระของหนูขาวครั้งนี้มีเป้าหมายหลักเพื่อดูผลของ barakol ที่มีต่อเอนไซม์ใน phase I และ phase II และต้องการดูว่า barakol ในขนาดที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์นั้น จะก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ตับด้วยหรือไม่ จากผลการทดลองยืนยันว่า barakol เมื่อใช้ในขนาดสูง (0.1 , 0.15 mM) สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ตับได้ โดยไปเพิ่มการหลั่งของ transaminase (ALT,AST) ออกจากเซลล์ตับ แสดงให้เห็น

ถึงการสูญเสียหน้าที่ของผนังเซลล์ (cell membrane integrity) แต่ไม่ทำให้เกิดการเพิ่มของ lipid peroxidation ดูได้จากปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ที่ไม่เปลี่ยนแปลงและระดับของ glutathione ที่มีอยู่ในเซลล์ที่นอกจากไม่ลดแล้วยังเพิ่มขึ้นด้วย แสดงว่าพิษต่อเซลล์ที่เกิดขึ้นไม่ใช่มาจาก lipid peroxidation หรือ lipid peroxidation ไม่ใช่ initial step ของการก่อพิษต่อเซลล์ดับ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าพิษของ barakol เป็น dose dependent

เป็นที่ทราบกันดีว่า lipid peroxidation นั้น ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นด้วย free radicals หรือ active oxygen species ซึ่งถูกทำลายได้ด้วย glutathione จึงมักพบเสมอว่าเมื่อ lipid peroxidation เพิ่มขึ้น ระดับ glutathione ในเซลล์จะลดลง ในกรณีของ barakol ในการศึกษาคั้งนี้ ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นไปได้อย่างยิ่งว่าพิษของ barakol ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด free radicals หรือ active oxygen species

สรุปและข้อเสนอแนะ

Barakol มีผลเพิ่ม aminopyrine N-demethylase (CYP2B,2C) และ glutathione S-transferase activity พร้อมกับลด UDP-glucuronyltransferase activity และ barakol ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ดับอิสระที่แยกได้จากหนูขาวได้ ซึ่งต้องใช้ในขนาดที่สูง (0.10 และ 0.15 mM) โดยมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST รวมถึง ปริมาณของ GSH โดยพิษที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด lipid peroxidation

ในการศึกษา in vitro เพื่อดูผลของ barakol ต่อการทำงานของเอนไซม์ใน phase I และ phase II ขนาดของ barakol ที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับ รวมถึงกลไกการเกิดพิษต่อตับ อาจมีความแตกต่างกับการศึกษา in vivo ซึ่งจะมีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงควรทำการศึกษา in vivo เพื่อดูผลของสารต่อการทำงานของเอนไซม์อื่นๆทั้งใน phase I และ phase II , ขนาดของสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับ , ผลของสารที่มีต่อตับ เพื่อเป็นแนวทางที่ทำให้เข้าใจถึงขบวนการเมตาบอลิซึมและกลไกการเกิดพิษของสารนี้ได้ดีขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- วีระสิงห์ เมื่องมัน, ศศิธร เจริญบุญ, วนิดา จันทรเทพขวัญ และ ชฎา พิศาลพงษ์. 2543. การทดสอบทางคลินิก: การใช้ยาน้ำเชื่อมซีเห็ดและยาเม็ดซีเห็ดช่วยให้นอนหลับ. วารสารสมุนไพร. ปีที่ 7(1) มิ.ย.: 19.
- พิกุล จันทโรยธา. 2531. ฤทธิ์ของบาราคอลสารสกัดจากใบอ่อนของต้นซีเห็ดต่อระบบประสาทส่วนกลาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข, พิมลวรรณ ทัญทุทธิจารณ์ และ ธริส หิณชีระนันท์. 2543. การศึกษาฤทธิ์ทำให้ง่วงหลับของยาสมุนไพรแปรรูปสกัดจากใบซีเห็ดในคน. วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย. 45(3): 253-261.
- พรเพ็ญ เปรมโยธิน. 2529. Hepatic pharmacology: ตอนที่ 1 เมตาบอลิซึมและพิษจากเมตาบอลิซึม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 51-64.
- ศุภชัย จิรวทวงศ์สกุล, ยุคล เกวลิณ, และ สมศักดิ์ แซ่เจ็ง. 2542. การเตรียมอนุพันธ์รูปเกลือของสารบาราคอลจากใบซีเห็ด. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมคิด รัตนจรัสกุล, สมศักดิ์ ชูดีศิลป์ และ เอกสิทธิ์ ศรีเสกสรร. 2524. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อและฤทธิ์ในการเป็นยาระบายของบาราคอลจากใบซีเห็ดเลือด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สมบัติ ตริประเสริฐสุข, มงคล หงษ์ศิรินิรชร และ อนุชิต จุฑาทุทธิ. 2542. "ภาวะตับอักเสบจากสมุนไพร "ซีเห็ด" บทเรียนเพื่อการพัฒนาสมุนไพรไทย" คลินิก. 186(16): 385-390.
- ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2521. การศึกษาทางพิษวิทยาของใบซีเห็ดและใบซีเห็ดอเมริกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อุไร อรุณลักษณ์. 2529. การศึกษาเภสัชวิทยาของใบซีเห็ด. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต แผนกสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Abas, H.H.; Saringat, H.B.; and Rozana, A.A. 1998. Interaction of several traditional medicine preparations with aminopyrine in rat hepatocytes. ARBEC. May.

- Arunluksana, U. 1949. Pharmacological study of Cassia siamea leaves. Siriraj. Hosp. Gaz. 1(9): 435- 444.
- Berry, MN., and Friend, DS. 1969. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells; a biochemical and fine structure study. J. Cell Biol. 43: 506- 520.
- Bock, K.W., and Ian, N.H., WHITE. 1974. UDP- glucuronyltransferase in Perfused Rat Liver and Microsomes: Influence of Phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Eur. J. Biochem. 46: 451-459.
- Buege, J.A., and Aust, S.D. 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. Methods Enzymol. Vol 52: 302-310.
- Bulyalert, D. 1992. Effect of Barakol on the Central Nervous System: Quantitative Analysis of EEG in the Rat. Chiengmai Vechasarn. 32(4): 191-196.
- Coecke, S.; Vanhecke, T.; Foriers, A.; Phillips, I.R.; Vercruyssen, A.; Shephard, E.A.; and Rogies, V. 2000. Hormonal regulation of glutathione S-transferase expression in co-cultured adult rat hepatocytes. J.Endocrinol. 166: 363-371.
- Cohn, R.M., and Roth, K.S. 1996. Biochemistry and Disease. 1st ed., 132.
- Croci, T., and Williams, G.W. 1985. Activities of several phase I and phase II xenobiotic biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. Biochem.Pharmacol. 34(17): 3029-3035.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-72.
- Farnsworth, NR., and Bunyapraphatsara, N. 1992. Thai medicinal plants recommended for primary health care system. Bangkok:Medicinal Plant Information Center. Faculty of Pharmacy., Mahidol University. 102-106.
- Gbeassor, M.; Kossou, Y.; Amegbo, K.; Souza, C.De.; Koumaglo, K.; and Denke, A. 1989. Antimicrobial effects of eight African medicinal plants. J.Ethnopharmacol. 25: 115-118.
- Gibson, G.G. 1992. Progress in Drug Metabolism. Vol 13. London: Taylor & Francis Ltd.
- Gibson, G.G., and Skett, P. 1994. Introduction of drug metabolism. London: Blackie academic and Professional, and imprint of chapman & Hall.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139.

- Hales, B.F., and Neims, A.H. 1976. A Sex Difference in Hepatic Glutathione S-Transferase B and the Effect of Hypophysectomy. Biochem.J. 160: 223-229.
- Hassanali-Waliji, A.; King, T.J.; and Wallwork, S.C. 1969. Barakol, a novel dioxaphenalene Derivative from *Cassia siamea*. J.Chem.Soc.Chem.Commun. 12: 678.
- Hayes, J.D., and Pulford, D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol. 30: 445-600.
- Hodgson, E., and Levi, P.E. 1994. Introduction to Biochemical Toxicology. London: Appleton & Lange.
- Honkakoski, P., and Negishi, M. 2000. Regulation of Cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. Biochem.J. 347: 321-337.
- Jollow, D.J.; Kocsis, J.J.; Snyder, R.; and Vainio, H. 1977. Biochemical aspects of toxic metabolites: formation, detoxication, and covalent binding. Biol.React.Int. 42-59.
- Katzung, B.G. 1998. Basic & Clinical Pharmacology. 7th ed.
- Klaassen, C.D. 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed. USA: The Mcgraw-Hill Companies.
- Krebs, HA., and Henseleit, K. 1932. Untersuchungen über die Harn-stoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's 2. Physiol.Chem. 210: 33-66.
- Maniratanachote, R. 2001. Effect of Barakol on hepatic Cytochrome P450 and blood chemistry parameters in normal and high cholesterol diet rats. Master's Thesis, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.
- Mannervik, B., and Danielson, U.H. 1988. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. Crit.Rev.Biochem. 23: 283-337.
- Mazel, P. 1972. Experiments illustrating drug metabolism in vitro. Fund.Drug Metab.Dispos. 546-550.
- McIntyre, N.; Pierre, J.; Benhamou, B.; Johannes, B.; Mario, R.; and Juan, R. 1991. Oxford textbook of clinical hepatology. Vol1. 13. New York: Oxford University Press.

- Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction. Biochem.J. 55: 416-421.
- Pickett, C.B., and Lu, AYH. 1989. Glutathione S-transferases gene structure, regulation and biological function. Annu.Rev.Biochem. 58: 734-764.
- Reitman, S., and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Amer. J. Clin. Pathol. 28: 56-63.
- Renwick, A.B.; Mistry, H.; Barton, P.T.; Mallet, F.; Price, R.J.; Beamand, J.A.; and Lake, B.G. 1999. Effect of some Indole Derivatives on Xenobiotic Metabolism and Xenobiotic-induced Toxicity in Cultured Rat Liver Slices. Fd.Chem.Toxic. 37: 609-618.
- Royal Forest Department. 1948. Siamese plant Names. Part 1, 1st ed. Bangkok : The Suri Ratana Press., P71.
- Suwan, G.; Sudsuang, R.; Dhumma-Upakorn, P.; and Werawong, C. 1992. Hypotensive effects of barakol extracted from leaves of *Cassia siamea* Lam. in rats and cats. Thai J.Physiol.Sci. 5(1): 53-65.
- Tepsuwan, A., and Kusamran, WR. 1997. Effect of the Leaves of Siamese Cassia , Indian Mulberry and Asiatic Pennywort on the Metabolizing Enzymes of Chemical Carcinogens in Rat liver. Bull. Dept. Med. Serv. 22: 425-437.
- Tepsuwan, A.; Kupradinum, P.; and Kusamran, WR. 1999. Effect of Siamese cassia leaves on the activities of chemical carcinogen metabolizing enzymes and on mammary gland carcinogenesis in the rat. Mutat.Res. 428: 363-373.
- Thongsaard, W. 1998. Physiological and pharmacological properties of *Cassia siamea* and its active constituent, barakol. Thai J.Physiol.Sci. 11(1): 1-26.
- Thongsaard, W.; Chainakul, S.; Bennett, G.W.; and Marsden, C.A. 2001. Determination of barakol extracted from *Cassia siamea* by HPLC with electrochemical detection. J.Pharm.Biomed.Anal. 25: 853-859.
- Thongsaard, W.; Deachapunya, C.; Pongsakorn, S.; Boyd, E.A.; Bennett, G.W.; and Marsden, C.A. 1996. Barakol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. Pharmacol.Biochem.Behav. 53(3): 753-758.

Thongsaard, W.; Pongsakorn, S.; Sudsuang, R.; Bennett, GW.; Kendall, DA.; and Marsden, CA. 1997. Barakol, a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but not uptake *in vitro*. Eur. J. Pharmacol. 319:157-164.

Tutin, F. 1914. J.Chem.Soc. 103 : 2006.

Waxman, DJ. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals:Central role of nuclear receptors CAR,PER, and PPAR. Arch.Biochem.Biophys. 369(1): 11-23.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ aminopyrine N-demethylase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=9 , Mean±SEM)

กลุ่มการทดลอง	aminopyrine N-demethylase activity (nmole formaldehyde formed /min/g wet weight)
control	7.0 ± 0.2
AH 0.025 mM	8.2 ± 0.3 *
AH 0.05 mM	9.3 ± 0.2 *
AH 0.075 mM	10.6 ± 0.4 *
AH 0.10 mM	12.0 ± 0.4 *
AH 0.15 mM	14.4 ± 0.5 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ control

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 6 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ UDP-glucuronyltransferase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=9 , Mean±SEM)

กลุ่มการทดลอง	UDP-glucuronyltransferase activity (micromole naphthol glucuronide formed / min / g wet weight)
control	75.131 ± 1.272
AH 0.025 mM	65.514 ± 1.464 *
AH 0.05 mM	62.579 ± 1.310 *
AH 0.075 mM	56.096 ± 2.204 *
AH 0.10 mM	49.937 ± 1.368 *
AH 0.15 mM	38.045 ± 2.309 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ control

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อ glutathione S-transferase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=9 , Mean \pm SEM)

กลุ่มการทดลอง	glutathione S-transferase activity (nmole conjugate formed/min/g wet weight)
control	99.3 \pm 9.0
AH 0.025 mM	126.7 \pm 5.7 *
AH 0.05 mM	135.8 \pm 9.4 *
AH 0.075 mM	140.0 \pm 6.6 *
AH 0.10 mM	154.6 \pm 8.8 *
AH 0.15 mM	176.8 \pm 9.6 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ control

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อเอนไซม์ transaminase (ALT,AST) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=9 , Mean±SEM)

กลุ่มการทดลอง	alanine aminotransferase(ALT) (SF units/มล.)	aspartate aminotransferase(AST) (SF units/มล.)
control	55.78 ± 6.36	41.33 ± 3.05
AH 0.025 mM	56.33 ± 6.64	45.67 ± 2.24
AH 0.05 mM	61.22 ± 6.10	46.44 ± 4.80
AH 0.075 mM	71.11 ± 6.49	58.11 ± 5.84 *
AH 0.10 mM	72.44 ± 3.42 *	64.89 ± 7.38 *
AH 0.15 mM	93.33 ± 6.00 *	77.78 ± 5.73 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ control

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride (AH) ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อระดับ reduced glutathione contents (GSH) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=10 , Mean \pm SEM)

กลุ่มการทดลอง	reduced glutathione contents (micromole/g wet weight)
control	3.553 \pm 0.290
AH 0.025 mM	3.532 \pm 0.211
AH 0.05 mM	3.899 \pm 0.289
AH 0.075 mM	4.244 \pm 0.324
AH 0.10 mM	4.526 \pm 0.292 [*]
AH 0.15 mM	5.025 \pm 0.330 [*]

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับ control

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 10 ผลของ Anhydrobarakol hydrochloride(AH)ในความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (N=13 , Mean±SEM)

กลุ่มการทดลอง	malondialdehyde (MDA) (nmole/g wet weight)
control	46.623 ± 3.782
AH 0.025 mM	52.251 ± 4.205
AH 0.05 mM	52.124 ± 4.314
AH 0.075 mM	52.463 ± 3.846
AH 0.10 mM	50.546 ± 2.212
AH 0.15 mM	53.751 ± 4.258

หมายเหตุ:-

control : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.025 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.025 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.05 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.075 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.075 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.10 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.10 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

AH 0.15 mM : isolated rat hepatocytes ที่ได้รับ anhydrobarakol hydrochloride solution ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 0.1 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเหมวลา เชิดชูพันธ์เสรี เกิดเมื่อวันที่ 20 มิถุนายน 2517 จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีพยาบาลศาสตรบัณฑิต จากวิทยาลัยพยาบาลสภากาชาดไทย ปีการศึกษา 2538 ปฏิบัติงานในตำแหน่งพยาบาลประจำการ กองการพยาบาล โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ เป็นเวลา 6 ปี ในปี 2543 ได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต หลักสูตร สหสาขาวิชา ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย