

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ฝอยลม (*Usnea siamensis* Wainio) เป็นพืชสมุนไพรที่จะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยมีสารสำคัญซึ่งให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ (+)-usnic acid พืชชนิดนี้ได้นำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านสำหรับต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา บรรเทาอาการปวดท้องและรักษามะเร็ง จากการศึกษาค้นคว้าได้พบพิษของ (+)-usnic acid ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียและการสร้าง RNA ของเซลล์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อตับของ (+)-usnic acid จากฝอยลม เพื่อเป็นข้อมูลทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา ในการนำเอาสารสำคัญของพืชชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

การศึกษา in vivo

1. ผลการศึกษาขนาดและระยะเวลาการเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว

จากการศึกษาของสิริวรรณ พุกษุอุดม (2536) พบว่า (+)-usnic acid จากฝอยลมมีผลต่อขบวนการหายใจและ oxidative phosphorylation ของไมโทคอนเดรีย โดยเมื่อให้ (+)-usnic acid ในขนาดมากกว่า 6.0 μM จะยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียและกระตุ้น ATPase activity นั่นคือ สารนี้จะทำหน้าที่เป็น uncoupler กระตุ้นการออกซิไดซ์สับสเตรทมากขึ้นพร้อมกับเพิ่มการสลายของ ATP ซึ่ง ATP เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเซลล์ เมื่อปริมาณของ ATP ภายในเซลล์ลดลง น่าจะส่งผลต่อการทำงานและควมมีชีวิตอยู่ได้ของเซลล์ (cell viability)

ในผลการศึกษา (+)-usnic acid ต่อการกดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitodepressive potential) และผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (clastogenic potential) ในหนูถีบจักร (+)-usnic acid มีผลรบกวนการสังเคราะห์ RNA มีการเพิ่ม micronucleus ของ

polychromatic erythrocytes โดยไม่เปลี่ยนแปลงระดับ DNA ในเซลล์ตับ แสดงให้เห็นว่า (+)-usnic acid ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยอาจมีผลต่อ spindle apparatus (Al-Berkairi et al. , 1991)

จากการศึกษาในครั้งนี้ ผลของ (+)-usnic acid ในขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม ภายหลังได้รับ (+)-usnic acid เป็นเวลา 5 วัน พบการทำลายของเซลล์ตับ โดยในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัมมีการเริ่มต้นการทำลายไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 19 และ 20) ขอบเขตของไมโทคอนเดรียไม่ค่อยชัดเจนและค่อนข้างบวมขึ้นเล็กน้อย ลักษณะของเซลล์ตับและนิวเคลียสยังไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ (+)-usnic acid ในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม จะพบการทำลายของเซลล์ตับมากกว่า (รูปที่ 21, 22, 23, 24 และ 25) ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน และนิวเคลียสมีรูปร่างผิดไปจากกลุ่มควบคุม ไมโทคอนเดรียบวมมากขึ้น ความเข้มของ matrix เพิ่มขึ้น และมีจุดโปร่งแสงในไมโทคอนเดรียซึ่งลำแสงอิเล็กตรอนสามารถผ่านได้ รวมทั้งเกิดการพองตัวของ ER (dilated ER)

การศึกษาทาง histopathology (EM) ของ Zimmerman (1978) พบว่า ถ้า ER และไมโทคอนเดรียถูกทำลาย ถือเป็นเหตุการณ์หนึ่งของการเกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยในส่วนของ ER จะเห็นการพองหรือขยายออกของ ER สำหรับไมโทคอนเดรียนั้นสิ่งที่เปลี่ยนแปลงมีทั้งขนาดเพิ่มขึ้น, ความเข้มของ matrix เพิ่มขึ้น, สูญเสีย cristae หรือ มีจำนวนไมโทคอนเดรียลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างมักเป็นไปในทิศทางเดียวกับการลดการสร้างของ ATP หรือมีความบกพร่องในหน้าที่การทำงานอื่นๆ นอกจากนี้การทำลาย plasma membrane ก็ถือเป็นพยาธิสภาพอย่างหนึ่งในการเกิดพิษต่อเซลล์ ทำให้สูญเสียอิลเล็กโตรไลต์ภายในเซลล์ รวมทั้งเอนไซม์และโคเอนไซม์ต่างๆ

การตายของเซลล์ตับจะเกี่ยวข้องกับการไปทำลายหรือทำให้บาดเจ็บของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ ส่งผลต่อสมดุลของแคลเซียม มีการลดลงของระดับ GSH และขบวนการ oxidative phosphorylation ของไมโทคอนเดรียซึ่งมีบทบาทสำคัญโดยเป็นแหล่งพลังงาน (ATP) ให้กับขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ สารจากภายนอก (xenobiotics) ที่มีผลต่อไมโทคอนเดรีย จะส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ (Dipak, Gazala, Milind and Surendra, 1995)

ดังนั้น (+)-usnic acid จากฝอยลม อาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ตับในลักษณะที่สัมพันธ์กับขนาดของสารที่หนูขาวได้รับ ซึ่งกลไกในการเกิดพิษต่อดับของ (+)-usnic acid ยังไม่ทราบแน่ชัด โดยอาจมีผลต่อออร์กาเนลล์ที่สำคัญภายในเซลล์หรือ cell membrane integrity

การศึกษา in vitro

1. ผลการศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว

ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ การตรวจวัดระดับของเอนไซม์ซึ่งถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลาย เป็นพารามิเตอร์หนึ่งสำหรับบ่งบอกพยาธิสภาพของ cell membrane integrity (Zimmerman, 1978) สำหรับการศึกษานี้ใช้การตรวจหาระดับของเอนไซม์ GOT และ GPT ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ตับภายหลังได้รับสารที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยเมื่อให้ (+)-usnic acid ต่อเซลล์ตับที่แยกได้จากหนูขาวในความเข้มข้น 10^{-3} M พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ GOT และ GPT ที่เด่นชัด (แผนภูมิที่ 3 และ 4)

(+)-usnic acid มีปัญหาในเรื่องของการละลาย เตรียมได้ในรูปของ suspension เวลาทำการทดลองต้องทำให้สารกระจายตัวให้ดีก่อนทุกครั้งเพื่อลดค่าผิดพลาดอันเนื่องจากสารเคมีและจะเตรียมได้ในความเข้มข้นที่จำกัด คือ สูงสุดที่ 10^{-2} M

สารส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดพิษต่อดับ มักจะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงเป็นเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ (reactive metabolites) โดยผ่านทางเอนไซม์ของ cytochrome P450 เมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์มักจะเป็น electrophiles หรือ free radicals ซึ่งสามารถไปจับแบบ covalent กับโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (macromolecules) เช่น โปรตีน, ไขมัน และ นิวคลีอิก แอซิด ซึ่งมี nucleophilic centers (เช่น protein thiols) นำไปสู่การทำลายหน้าที่การทำงานของเซลล์ (Nathan and Robert, 1996 ; Lawrence and Dean, 1996)

จากการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิด lipid peroxidation ของ membrane ภายหลังจากให้เซลล์ตับอิสระที่แยกจากหนูขาวสัมผัสกับ (+)-usnic acid ในความเข้มข้น 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

(แผนภูมิที่ 6) จะพบมีการเพิ่มขึ้นของ MDA ในความเข้มข้นของ (+)-usnic acid 10^3 M โดยที่ DMSO ไม่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation (Furono, Suetsuga and Sugihara, 1996)

การเกิด lipid peroxidation เป็นลักษณะที่ชัดเจนอย่างหนึ่งของสารที่จะไปชักนำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับ ซึ่งจะมีกลไกสำคัญในการทำลายเซลล์ตับโดยเป็นผลมาจาก free radical เช่น การทำลายเซลล์ตับของอัลกอฮอล์ (Lurdes, Luisa, Luisa and Manso, 1995 ; Nathan and Robert, 1996)

เนื่องจากผนังภายในเซลล์ที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่สูง มักเป็นเป้าหมายที่ถูกโจมตีด้วย lipid peroxidation ทำให้ผนังนั้นสูญเสียความคงตัว เพิ่มการซึมผ่านของผนัง (plasma membrane permeability) และเกิดการตายของเซลล์ได้ (Alan, 1989)

สารที่เป็นพิษต่อตับสามารถถูกปรับเปลี่ยนหรือถูกป้องกันด้วยกลไกภายในเซลล์ที่สำคัญที่สุดก็คือ tripeptide glutathione (GSH) ซึ่งเป็น antioxidant ส่วนใหญ่ภายในเซลล์จะไป conjugate กับสารประกอบพวก peroxides, electrophiles และ free radicals ทำให้สารพิษนั้นหมดฤทธิ์และง่ายต่อการขับออกทางน้ำดี

GSH ในเซลล์ตับจะพบอยู่ใน cytoplasm ประมาณ 85-90% ส่วนที่เหลือประมาณ 10-15% เชื่อกันว่าจะอยู่ในแหล่งเก็บของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial pool) เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสร้าง GSH นั้นจะมีใน cytoplasm แต่ไม่พบในไมโทคอนเดรีย เป็นไปได้ว่าการสะสมของ GSH ในไมโทคอนเดรียอาจอาศัยการลำเลียงมาจาก cytoplasm ดังนั้นเมื่อ GSH ใน cytoplasm ลดลง ก็จะมีการปล่อย GSH ออกมาจากไมโทคอนเดรีย การลดลงของ GSH ในไมโทคอนเดรีย จะไปมีผลทำให้เปลี่ยนแปลง Ca^{2+} permeability มีการปล่อยแคลเซียมออกมาจากไมโทคอนเดรีย เกิดการบวมของออร์กาเนลล์ การเกิด electrophiles หรือ free radicals เป็นจำนวนมากในตับ จะส่งผลกระทบต่อแหล่งเก็บ GSH ภายในเซลล์ลดลง ทำให้เพิ่มการจับแบบ covalent กับโมเลกุลขนาดใหญ่และเกิดการตายของเซลล์ตามมา (Beatrice et al., 1984 ; Nathan and Robert, 1996 ; Laraine et al., 1988 ; Lawrence and Dean, 1996)

จากการศึกษาผลของ (+)-usnic acid จากผลยับยั้งต่อความเป็นพิษในเซลล์ตับ ได้อาศัยการตรวจวัดระดับของ GSH ภายในเซลล์ พบว่า (+)-usnic acid ในความเข้มข้น 10^{-4}

และ 10^{-3} M ทำให้ระดับ GSH ภายในเซลล์ลดลง โดยเฉพาะในความเข้มข้นที่ 10^{-3} M (แผนภูมิที่ 5)

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งการตรวจวัด cell membrane integrity ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของ GOT และ GPT การตรวจหา lipid peroxidation หรือการเกิดพวก reactive oxygen, electrophiles หรือ free radicals โดยค่า MDA เพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของระดับ GSH ภายในเซลล์ สามารถบ่งบอกได้ว่า (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio อาจมีผลทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยการเกิดสารประกอบพวก reactive oxygen, electrophiles หรือ free radicals ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบ, การทำงานและออร์กาเนลล์ภายในเซลล์รวมทั้ง plasma membrane (cell membrane integrity)

2 . ผลการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว

การเกิด lipid peroxidation จาก CCl_4 จะไปมีผลต่อ enzyme activity ใน ER, fatty transport และการสร้างโปรตีน มีการศึกษาสารที่ไปมีผลเพิ่มหรือลดการเกิดพิษต่อตับของ CCl_4 ทั้งใน in vivo และ in vitro ซึ่งจะช่วยสนับสนุนบทบาทของ lipid peroxidation ต่อการทำลายเซลล์ free radical ที่เกิดจาก CCl_4 จะสามารถทำให้เกิด lipid peroxidation ทำลาย plasma membrane และออร์กาเนลล์ มีการเปลี่ยนแปลงสมดุขยของอออนภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์แบบ irreversible และเกิด necrosis ภาวะดังกล่าวสามารถบ่งบอกได้จากการเกิด leakage ของ alanine aminotransferase ออกมาสู่ภายนอกเซลล์

จากการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 พบว่า ผลของ CCl_4 และ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 มีการเปลี่ยนแปลงของ GOT, GPT (สำหรับการตรวจวัด cell membrane integrity), MDA (สำหรับการตรวจวัดการเกิด lipid peroxidation) และ GSH content (สำหรับการตรวจวัด reactive oxygen, electrophile หรือ free radical) ในทำนองเดียวกับผลของการเกิดพิษต่อตับเมื่อให้ (+)-usnic acid เพียงอย่างเดียว คือ เพิ่ม GOT, GPT, MDA และลดระดับของ GSH content (แผนภูมิที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid อาจมีกลไกที่คล้ายกับการเกิดพิษของ CCl_4 โดยน่าจะมีผลต่อความสมบูรณ์ของ plasma membrane เนื่องจากมีการปล่อยเอ็นไซม์ GOT และ GPT ออกมาจาก

เซลล์ ซึ่งภาวะดังกล่าวคาดว่าเป็นผลจาก reactive metabolite ของ (+)-usnic acid ที่เป็นพวก reactive oxygen หรือ free radical ทำให้เกิดขบวนการ lipid peroxidation (จากผล MDA ที่สูงขึ้น และ GSH ที่ลดลง) (แผนภูมิที่ 5 และ 6) เป็นไปได้ว่าเมื่อ plasma membrane ถูกทำลายด้วย ขบวนการนี้น่าจะส่งผลกระทบต่อภาวะอื่นๆ ตามมา เช่น ผลต่อออร์กาเนลล์ หรือ สมดุลย์ของ อีออนภายในเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความรุนแรง ในการเกิดพิษต่อตับเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ (+)-usnic acid ร่วมกับ CCl_4 คือ ค่าของ GOT เพิ่มขึ้น 1.6-2.2 เท่า, GPT เพิ่มขึ้น 1.9-3.3 เท่า, MDA เพิ่มขึ้น 1.3-1.8 เท่า และ GSH content ลดลง 1.1-2.5 เท่า เมื่อเทียบกับ CCl_4 แสดงว่าทั้ง (+)-usnic acid และ CCl_4 น่าจะเสริมฤทธิ์กันต่อการทำลาย เซลล์ตับ (แผนภูมิที่ 7, 8, 9 และ 10)

ดังนั้นจากผลการทดลอง (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio อาจมี กลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ตับที่คล้าย CCl_4 โดยเกิดขบวนการ lipid peroxidation มีผลต่อ plasma membrane ทำให้เกิดการทำลายออร์กาเนลล์และเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของอีออนภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบความรุนแรงของการเกิดพิษต่อตับเพิ่มมากขึ้น เมื่อให้สารทั้งสองร่วมกัน ซึ่งน่าจะมาจากผลของการเกิด toxic metabolite ที่มากขึ้น

3. ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2B, 2C, 2E1) ของ (+)-usnic acid ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว

cytochrome P450 เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีความสำคัญ ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิต ต่างๆ โดยทำหน้าที่เปลี่ยนสารแปลกปลอมที่ละลายในไขมัน รวมถึงยาโรค ยาฆ่าแมลงและสารพิษจากสิ่งแวดล้อม ให้เป็นสารหรือเมตาบอไลต์ที่ละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อช่วยในการขับออกจากร่างกาย isoenzymes ของ cytochrome P450 สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ โดยสารชนิดต่างๆ (Stelvio, Szilvia, Song, Malcolm and Ross, 1995)

สารแปลกปลอมต่างๆ จะถูกเมตาบอไลต์ได้หลายๆ pathways ขึ้นอยู่กับชนิดของ isoenzymes ซึ่ง isoenzymes ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายของมนุษย์ คือ CYP 2E1, 2C9, 2D6 และ 3A4 inducer บางชนิดอาจจะไปเพิ่มเมตาบอลิซึมของ สารพิษให้เป็นพิษมากขึ้นหรือบางชนิดอาจไปลดความเป็นพิษ เช่น phenobarbital สามารถเหนี่ยวนำ

นำ MFO ทำให้เพิ่มพิษต่อตับของ bromobenzene ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วย 3-MC กลับทำให้ความเป็นพิษของสารนี้ลดลง (Gibson and Skett, 1994 ; Zimmerman, 1978)

จากผลการศึกษาของ Gilbert et al. (1994) พบว่า (+)-usnic acid สามารถเหนี่ยวนำ cytochrome P450 3A, 2E และ 1A ในหนูถีบจักรได้ จึงเป็นแนวทางในการศึกษาครั้งใหม่ของ (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio ต่อการเป็น enzyme inducer ของ CYP 2C, 2B จากการวัดผล aminopyrine N-demethylase activity และ CYP 2E1 โดยวัดผลของ aniline hydroxylase activity พบว่า (+)-usnic acid ในความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-2} M ทำให้ aniline hydroxylase activity เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในทางตรงกันข้าม (+)-usnic acid ในความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} M กลับทำให้ค่าของ aminopyrine N-demethylase activity ลดลง (แผนภูมิที่ 10 และ 11)

ดังนั้น (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio สามารถมีผลเหนี่ยวนำ cytochrome P450 2E1 ในเซลล์ตับอิสระที่แยกจากหนูขาวได้ ซึ่ง isoenzyme นี้มีความสำคัญต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของสารต่างๆ โดยเฉพาะ cytochrome P450 2E1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำและเกี่ยวข้องกับ toxic pathway จะส่งผลเพิ่มความเป็นพิษของสารนั้นๆ มากขึ้น หรือเพิ่ม biotransformation ของยาและสารที่อาศัย isoenzyme นี้ในการเมตาบอลิซึม

สรุปและข้อเสนอแนะ

(+)-usnic acid ที่สกัดได้จาก *Usnea siamensis* Wainio สามารถทำให้เกิดพิษต่อตับได้ทั้งในหนูขาวและเซลล์ตับอิสระที่แยกจากหนูขาว ซึ่งต้องใช้ในขนาดที่สูง การเกิดพิษจาก (+)-usnic acid จะทำให้ activity ของเอนไซม์ GOT และ GPT ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ตับสูงขึ้น MDA เพิ่มขึ้น และ GSH ลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลง morphology ของเซลล์รวมทั้งออร์แกเนลล์ มีลักษณะผลการตอบสนองของการเกิดพิษต่อเซลล์ตับค่อนข้างคล้ายกับผลของ CCl_4 และความรุนแรงของการพิษเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 นอกจากนี้ยังเพิ่ม aniline hydroxylase activity ซึ่งเป็นแนวทางว่าอาจมีผลเหนี่ยวนำ CYP 2E1 ได้ แต่ไม่มีผลต่อ aminopyrine N-demethylase activity (CYP 2B และ 2C)

จากการศึกษายังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับ metabolic product ของ (+)-usnic acid ซึ่งอาจจะเป็น reactive

electrophiles หรือ free radicals ซึ่งส่งผลต่อระบบการทำงาน, plasma membrane และ ออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ สำหรับการเป็น inducer ของ (+)-usnic acid ต่อ isoenzymes บางตัว ของ cytochrome P450 เป็นการศึกษาเฉพาะ in vitro ดังนั้นการศึกษาต่อไปน่าจะศึกษา metabolic pathway และเมตาบอไลต์ของ (+)-usnic acid การเป็น enzyme inducer ต่อ isoenzymes อื่นๆ หรือการเป็น inhibitor เพื่อเป็นแนวทางที่จะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดพิษต่อตับ จากสารนี้มากขึ้น