บทที่ 1

บทนำ

สมุนไพรเป็นทรัพยากรที่สำคัญยิ่งชนิดหนึ่งของประเทศ คนไทยในสมัยโบราณคุ้นเคยกับการนำสมุนไพรในรูปแบบต่าง ๆ มาใช้เป็นยารักษาโรคนานนับศตวรรษ และถ่ายทอดมาสู่รุ่นลูกหลาน โดยการบอกเล่า การบันทึกสืบทอดต่อ ๆ กันมา สมุนไพรจึงนับเป็นสิ่งมีค่ามาแต่โบราณ

ในปัจจุบันรัฐมีนโยบายให้ประชาชนพึ่งตนเองในการใช้ทรัพยากรใกล้ตัว ให้สามารถดำรงชีวิตโดยอาศัยปัจจัยภายนอกให้น้อยที่สุด ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาสถานการณ์ของโลกได้กระตุ้นให้มนุษย์เห็นคุณค่าของธรรมชาติมากขึ้น สมุนไพรเป็นทรัพยากรหนึ่งที่มนุษย์หวนกลับมาเห็นคุณค่าและพยายามฟื้นฟูศึกษา เพื่อนำมาแก้ปัญหาทางด้านสาธารณสุขบนพื้นฐานทางด้านเศรษฐกิจ จึงจะเห็นได้ว่า ยาแผนปัจจุบันบางชนิดได้ตัวยามาจากพืชสมุนไพร การนำพืชสมุนไพรมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงถือว่ามีความสำคัญซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แซนโธน (Xanthones)

แซนโธน (Xanthones) เป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกของผลมังคุด (mangosteen) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Guttiferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana* Linn.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มังคุดเป็นไม้ยืนต้น สูง 7 - 12 เมตร ลำต้นตรง เปลือกสีน้ำตาลถึงดำ กิ่งอ่อนเป็นสี่เหลี่ยม มีน้ำยางสีเหลือง

ใบ ออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน รูปไข่หรือรีแกมขอบขนาน โคนใบสอบ ปลายใบแหลมขอบใบเรียบกว้าง 6 - 11 เซนติเมตร ยาว 15 - 25 เซนติมตร เส้นใบจำนวนมากเรียงถี่ ๆ ปลายเส้นใบเชื่อมติดกัน เนื้อใบหนาด้านใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างสีอ่อนออกเหลือง

ดอก เพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกันออกดอกเดี่ยว ๆ หรือออกเป็นคู่ใกล้ปลายกิ่ง ดอกสีชมพูเข้ม

ผล มีลักษณะกลมแบนเล็กน้อย มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 - 7 เซนติเมตร ก้านผลสั้นอ้วน มีกลีบรองกลีบดอกซึ่งกลายเป็นจุกผลติดอยู่ที่ขั้ว ส่วนที่ปลายมีเกสรเมียติดอยู่ ผลสุกมีสีม่วงอมน้ำตาล เปลือกหนา ภายในมี 6 - 8 เมล็ด เมล็ดมีเนื้อสีขาวหุ้ม รูปที่ 1

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์

มังคุดเป็นพืชที่ชอบอากาศร้อนชื้น มีฤดูแล้งสั้น จึงปลูกมากทางภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ของไทย นอกจากนั้นยังพบในประเทศอินโดนีเซีย พม่า ศรีลังกา และประเทศในแถบอินโดจีน (สมพร หิรัญรามเดช, 2525)

รูปที่ 1 *Garcinia mangostana*

ตำรายาไทยหลายเล่มได้ระบุสรรพคุณของมังคุดในการบำบัดรักษาโรคต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. เนื้อหุ้มเมล็ด (aril) มีลักษณะเป็นเนื้อสีขาว มีรสหวานอมเปรี้ยว ประกอบด้วยน้ำตาล เช่น sucrose glucose และ fructose เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นยังพบกรดอินทรีย์ เช่น citric acid เป็นส่วนน้อย ถ้ารับประทานมากอาจทำให้เกิดอาการร้อนในได้

2. เปลือกผล มีสีม่วงเข้ม มีรสฝาดเนื่องจากมีสารพวกแทนนิน (tannin) สูง เปลือกผลฝนกับน้ำใช้สมานแผล ชะล้างบาดแผล แก้แผลเปื่อย แผลเป็นหนอง ยาพอก ทาแผลพุพอง แก้บิดลงท้องเป็นยาคุมธาตุ ตำรายากลางบ้านระบุว่า เมื่อใช้เปลือกมังคุดตากแห้งต้มกับน้ำปูนใส หรือฝนกับน้ำรับประทานแก้อาการท้องเดิน ท้องร่วงเรื้อรังเป็นมูกเลือดได้ มังคุดมีฤทธิ์ในการสมานแผล ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย Staphylococus aureus ซึ่งเป็นสาเหตุของหนองได้ นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ แพทย์แผนโบราณจึงนิยมนำมาใช้ในการรักษาแผล ส่วนฤทธิ์ในการแก้ท้องเดินคงเนื่องมาจากแทนนิน (tannin) ที่อยู่ในเปลือกผลนั่นเอง

จากผลการศึกษาทางเคมีพบว่า เมื่อนำเปลือกของมังคุดมาสกัดด้วย Petroleum ether จะได้สารประกอบในกลุ่ม xanthones หลายชนิด ดังนี้ (Wilawan Mahabusarakum, Pichaet Wiriyachita and Taylor, 1987 : Ashis et al, 1980 : Krishnamoothi, 1988) ดังนี้

(1) BR-Xanthone A
(2) BR-Xanthone B
(3) 8-Deoxygartanin
(4) 6-Deoxy-γ-mangostin
(5) 5,9-Dihydroxy-8-methoxy-2,2-dimethel-7-(3-methylbut-2-enyl)-2H, 6H-pyrano [3,2-b] xanthen-6-one
(6) 1,5-Dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone
(7) 1,7-Dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone
(8) Garcinone A
(9) Garcinone B
(10) Garcinone C
(11) Garcinone D

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(12) Garcinone E

(13) Gartanin

(14) 1-Isomangostin

(15) 3-Isomangostin

(16) 1-Isomangostin hydrate

(17) 3-Isomangostin hydrate

(18) α-mangostin

(19) β-mangostin

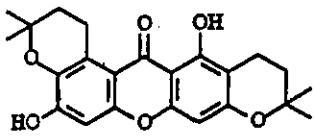
(20) γ- mangostin

(21) Mangostinone

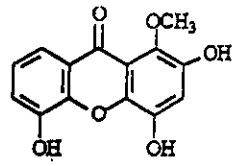
(22) 1,5,8-Trihydroxy-3-methoxy-2(3-methyl-2-butenyl)xanthone

ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 (วิสินี จันทร์มหเสถียร, 2539)

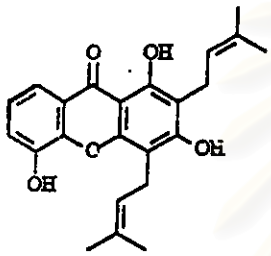
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



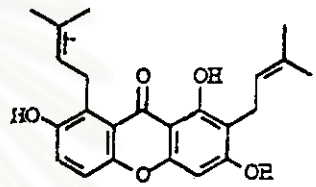
(1)



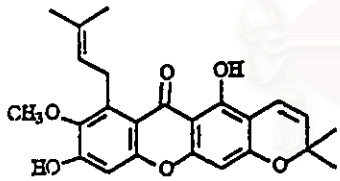
(2)



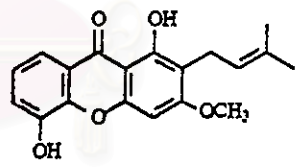
(3)



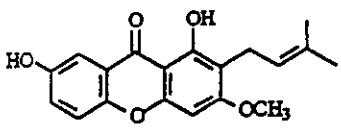
(4)



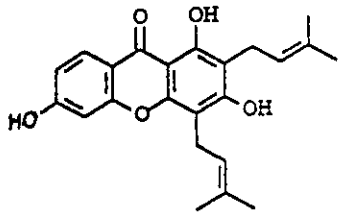
(5)



(6)

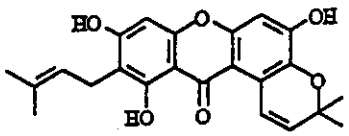


(7)

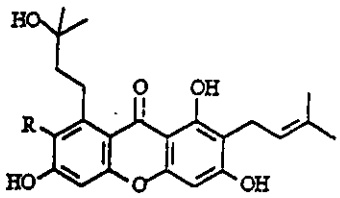


(8)

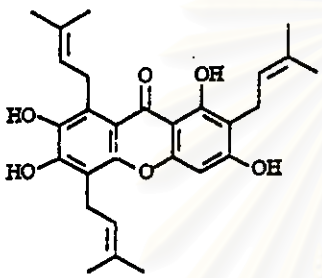
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



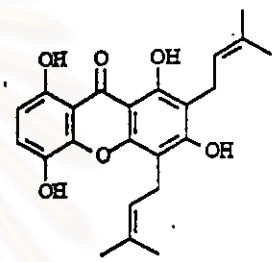
(9)



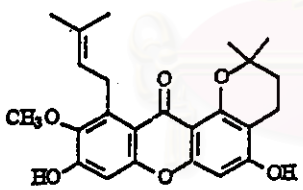
(10) R = OH
(11) R = OCH_3



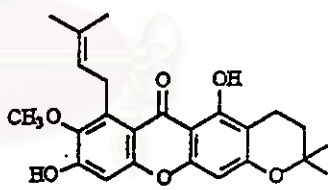
(12)



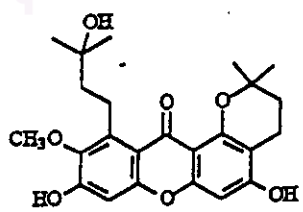
(13)



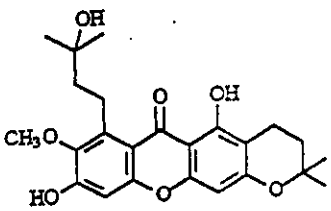
(14)



(15)

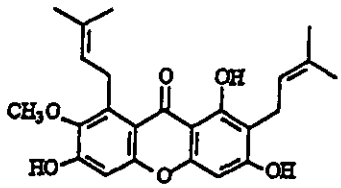


(16)

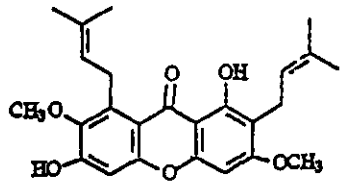


(17)

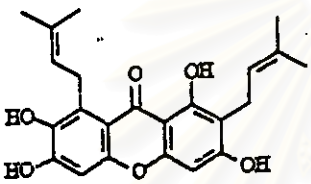
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



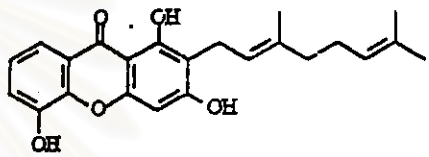
(18)



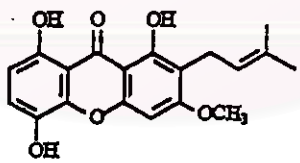
(19)



(20)



(21)



(22)

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสารในกลุ่ม Xanthones

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ xanthones

1. กดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS depressant)

xanthones และสารในกลุ่มของ xanthones ที่สกัดได้จากเปลือกของมังคุด เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ xanthones คือ 3-0-methyl mangostin, 1-isomangostin, mangostin triacetate มีฤทธิ์ในการกดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง โดยเมื่อให้สารเหล่านี้กับสัตว์ทดลองพบว่า สัตว์เหล่านี้จะมีอาการง่วงนอน (sedation) การทำงานของระบบประสาทยนต์ลดลง (decrease motor activity) เสริมฤทธิ์ของ pentobarbital ทำให้หลับนานขึ้น (Shankaranarayan, Gopalakrishnan and Kameswaran, 1979)

2. ผลต่อการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต

เมื่อใช้สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ xanthones คือ mangostin-6,6-di-O-glucoside ทดลองในกบและสุนัขพบว่า สารนี้กระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ และทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น ฤทธิ์นี้จะถูกยับยั้งโดย propranolol ซึ่งเป็นสารต้านตัวจับกับ recepter ชนิด β (β-receptor antagonist) (Shankaranarayan, Gopalakrishnan and Kameswaran, 1979)

3. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

สาร mangostin, 1-isomangostin, mangostin triacetate มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในหนูขาว ทำการศึกษาโดยการให้สารเหล่านี้ทั้งทางปาก (oral) และฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ผลการศึกษาพบว่าไม่ว่าจะใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยวิธีการฉีด carragenin วิธี cotton pellet implantation หรือวิธี granuloma pouch technique พบว่าสารนี้ก็ยังสามารถต้านการอักเสบได้ แม้แต่ในหนูที่มีการตัดต่อมหมวกไตออกแล้วก็ตาม

สารอนุพันธ์ของ xanthones ทั้ง 3 ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไม่มีผลในการ produce mast cell membrane stabilising effect และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง prothombin time ใน albino rats (Shankaranarayan, Gopalakrishnan and Kameswaran, 1979)

4. ผลการรักษาแผล (antiulcer)

สาร mangostin มีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร (antiulcer activities) ของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shankaranarayan, Gopalakrishnan and Kameswaran, 1979)

5. ผลต้านแบคทีเรีย

สาร xanthones ในเปลือกมังคุด ซึ่งสกัดด้วย benzene มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ Staphylococus aureus ซึ่งทำให้เกิดหนอง เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar plate) (Wilawan Mahabussarakum, 1982)

6. ผลต่อการขนส่ง Ca^{+2}

สาร mangostin และอนุพันธ์ 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthones (norathyriol) เมื่อนำมาทดสอบใน isolated sarcoplasmic reticulum ของเซลล์กล้ามเนื้อพบว่า xanthones และ norathyriol มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง Ca^{+2} ออกจาก SR ของเซลล์กล้ามเนื้อ โดยผ่าน Ca^{+2} release channel (ryanodine receptor) โดยที่ xanthones จะกระตุ้น Ca^{+2}-ATPase ของ SR ให้มีการหลั่ง Ca^{+2} เพิ่มขึ้นถึง 70% หรือประมาณ 300 µM. (Kang et al., 1996)

7. ผลต้านการ oxidation LDL

จากการศึกษาฤทธิ์ของ mangostin ซึ่งสกัดได้จากเปลือกมังคุดต่อฤทธิ์ของการ oxidation ของ low density lipoprotien (LDL) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค artherosclerosis โดยการให้ mangostin ปริมาณ 5-50 µM. แล้ววัดปริมาณของ conjugated dienes ที่ 234 นาโนเมตร พบว่าที่ปริมาณนี้ mangostin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง oxidation ของ LDL เมื่อวัดโดยวิธี thiobarbituric reactive substances (TBARS) เมื่อให้ Cu^{2+} 5 µM. และ mangostin ปริมาณ 50 µM. หรือ 100 µM. เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาพบว่า ที่เวลา 4 ชั่วโมง xanthones ในปริมาณ 50 µM. และ 100 µM. สามารถออกฤทธิ์เป็น antioxidant ของ LDL ได้ ($p = 0.027$) จากผลการศึกษาต่อมาพบว่า mangostin ออกฤทธิ์เหมือนกับ scarvenger ในการจับกับ free radical เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของ LDL (Williams et al., 1995)

ตับ (Liver)

ตับเป็นอวัยวะที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์ เป็นอวัยวะที่เชื่อมโยงระบบไหลเวียนโลหิตกับระบบย่อยอาหาร (Ernest and Patricia, 1994) ตับอยู่ภายในช่องท้องตอนบน มีลักษณะเป็นรูปลิ่ม (wedge-shaped) ด้านบนของตับจะโค้งนูนชิดอยู่กับด้านล่างของกระบังลม ซึ่งกั้นระหว่างช่องท้องกับช่องอก ด้านล่างติดกับถุงน้ำดี ส่วนบนของลำไส้ใหญ่ กระเพาะอาหาร และยังมีร่องให้เส้นเลือดภายในช่องท้องผ่านเข้าสู่ช่องอกอีกด้วย ตับถูกตรึงอยู่ในช่องท้องโดยมีเนื้อเยื่อหนา (ligament) ยึดไว้กับกระบังลมและผนังหน้าท้อง และยังมีเนื้อเยื่อยึดอย่างหลวม ๆ กับกระเพาะอาหาร (ยง ภู่สุวรรณ์ และ พงษ์พีระ สุวรรณกูล, 2533)

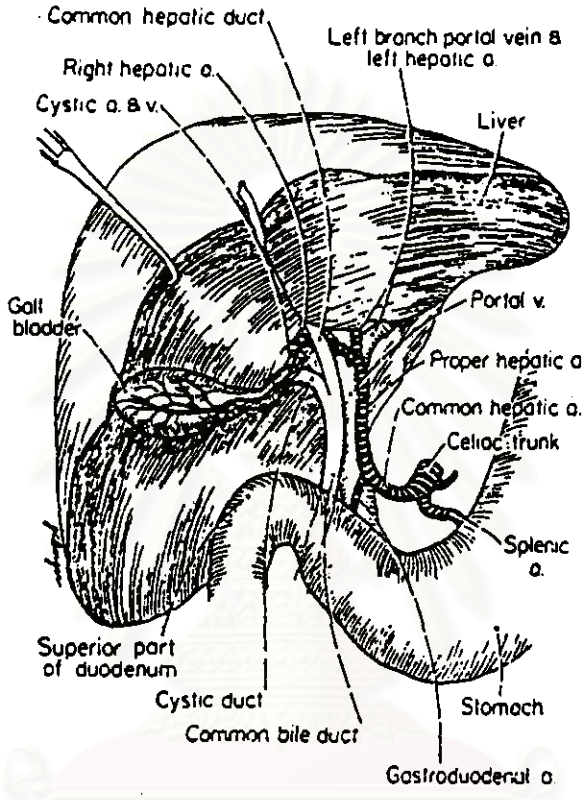
ตับมีหน้าที่สำคัญคือ การสร้างและการหลั่งน้ำดีเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร เพื่อช่วยย่อยอาหารจำพวกไขมัน และช่วยเก็บสะสมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตไว้ในรูปไกลโคเจน เก็บสะสมไขมันไว้ในรูปไตรกลีเซอร์ไรด์ การควบคุมสมดุลย์ของปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น การสังเคราะห์และการหลั่งสารชีวเคมีต่าง ๆ หลายชนิดที่ร่างกายต้องการเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการช่วยทำลายพิษที่เกิดจากสารแปลกปลอมต่าง ๆ ภายในร่างกาย (Leffert et al., 1982 ; Amenta, 1991)

น้ำหนักของตับจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล โดยเฉลี่ยตับจะมีน้ำหนักประมาณ 22 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (William and Stephen, 1995) ตับเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกายของมนุษย์มี 2 กลีบ คือกลีบซ้ายและกลีบขวา ในหนูขาวมี 6-7 กลีบ (Well, 1964) ได้แก่

- กลีบซ้าย (ขนาดใหญ่ที่สุด) ประกอบด้วย lobus sinister medialis - left medial lobe และ lobus sinister medialis - left lateral lobe

- กลีบขวา มี 2 กลีบติดกัน ประกอบด้วย lobus dexter medialis - light medial lobe และ lobus dexter medials - right lateral lobe

- กลีบกลาง มี 2 - 3 กลีบและกลีบรอบหลอดอาหารมีขนาดเล็กที่สุด เรียกว่า caudate lobe

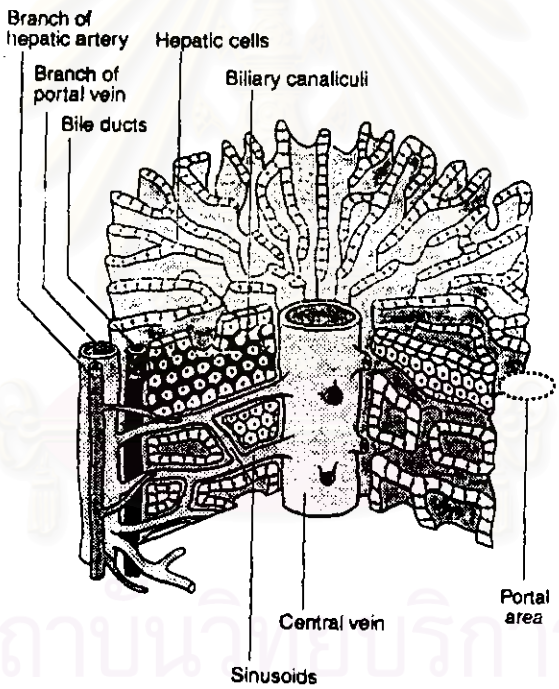


รูปที่ 3 **แสดงกายวิภาคของตับ หลอดเลือดแดง** Hepatic artery **หลอดเลือดดำ** Portal **ถุงน้ำดี และระบบท่อน้ำดี**

เลือดที่มาเลี้ยงตับมีประมาณ ¼ ของ cardiac output ซึ่งได้มาจาก 2 แหล่งใหญ่ที่ต่างกันคือ

1. portal vein เป็นหลอดเลือดดำที่นำเลือดมาสู่ตับถึง 75 % ของเลือดที่มาเลี้ยงตับทั้งหมด เป็นเลือดที่มีสารอาหารในปริมาณสูงและแตกแขนงย่อยเป็น venules

2. hepatic artery เป็นหลอดเลือดที่นำเลือดมาสู่ตับประมาณ 25 % ของเลือดที่มาสู่ตับทั้งหมด นำเลือดที่มีออกซิเจนสูงมาเลี้ยง connective tissue ต่าง ๆ รวมทั้งผนังของถุงน้ำดี และแตกแขนงออกเป็น arterioles



รูปที่ 4 โครงสร้างของตับในคนปกติ

(William and Stephen, 1995)

เลือดจาก hepatic arterioles และ portal venules จะเทเข้าสู่ sinusoid ซึ่งเป็นหลอดเลือดที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีขนาดใหญ่กว่าหลอดเลือดฝอยธรรมดา ผ่านเข้าสู่ central vien ซึ่งเป็นปลายของ hepatic vein เลือดที่ออกจากตับทาง hepatic vein จะเข้าสู่ inferior vana cava และเข้าสู่หัวใจห้องบนขวาต่อไป

ทั้ง hepatic arterioles และ portal venules จะกระจายทั่วโครงสร้างของตับ โดยมีแขนงของ bile ductule ร่วมไปด้วย รวมเป็นโครงสร้างหนึ่งซึ่งเรียกว่า portal tract หรือ hepatic triad บางครั้งอาจพบเส้นประสาทหลอดน้ำเหลือง และ fibrous tissue รวมอยู่ในโครงสร้างนี้ด้วย

ตับประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดดังนี้

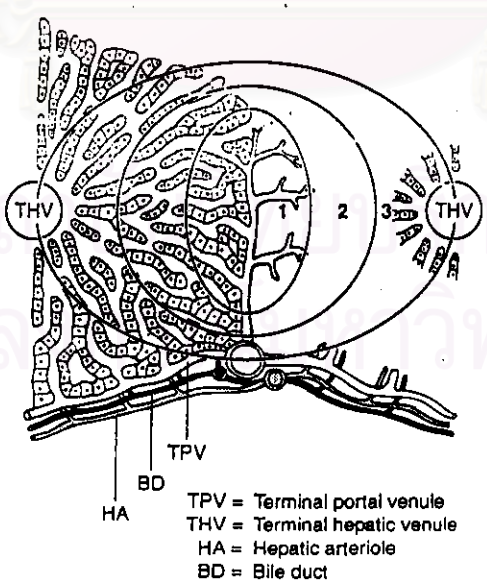
1. เซลล์ตับ (hepatocytes หรือ parenchymal cells) จำนวนมากมีประมาณ 65 - 70 % ของเซลล์ทั้งหมด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร ภายในประกอบด้วย nucleus, nucleolus, smooth และ rough endoplasmic reticulum (SER และ RER), golgi complex, lysosome, mitochondria และ granule สำหรับสะสมสารต่าง ๆ (Goldberg and Gornall, 1980)

2. เซลล์คัพเพอร์ (Kupffer 's cells) ประมาณ 20 - 25 %

3. เซลล์บุท่อน้ำดี (Bile duct cells) ประมาณ 10 - 20 %

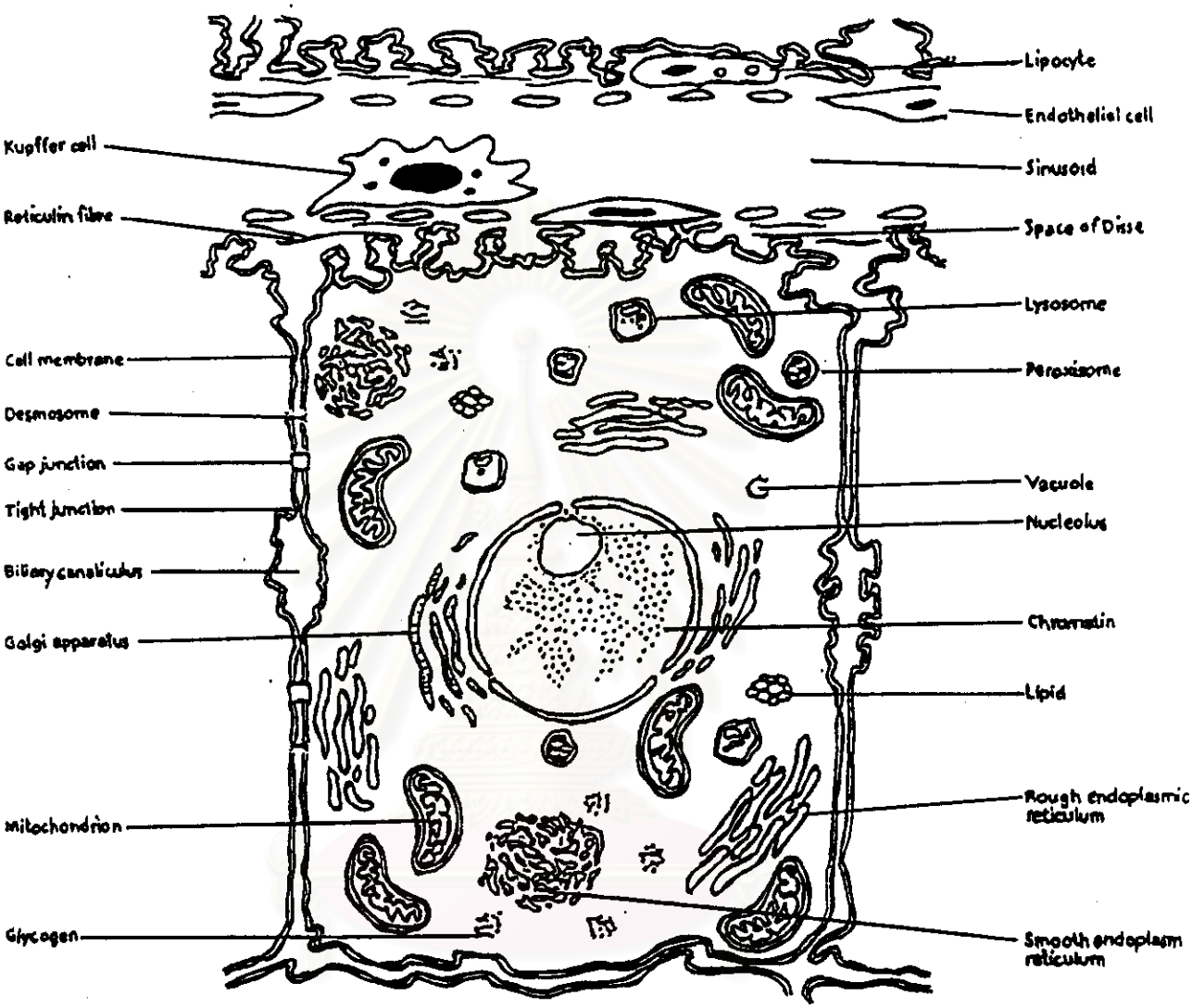
(ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2535)

hepatocyte สามารถแบ่งออกเป็นโซน (zone) เพื่อประโยชน์ทางพยาธิวิทยาของเซลล์ตับ โดยยึดระยะห่างระหว่างหลอดเลือดเป็นหลัก (William and Stephen, 1995; Rappaport, 1956)



รูปที่ 5 แสดงเลือดที่มาเลี้ยงตับและการแบ่งโซนของ liver acinus

(William and Stephen, 1995)



รูปที่ 6 ส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ตับ

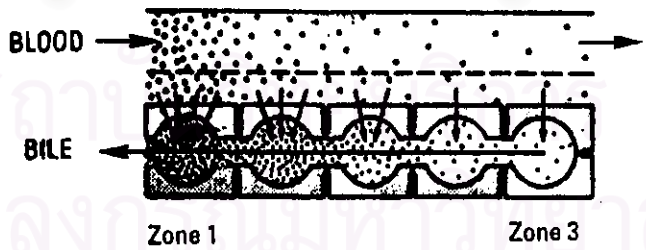
(Sherlock and Dooley, 1993)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. โซนที่ 1 (Zone 1) เรียกว่า periportal area เซลล์ที่อยู่ในโซนนี้ คือเซลล์ที่อยู่รอบ portal vein เป็นเซลล์ที่อยู่ใกล้ทางเข้าของเลือดที่มาเลี้ยง lobule ซึ่งเป็นเลือดที่มีส่วนประกอบของเลือดแดงมากกว่าเลือดดำ ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ในบริเวณนี้ จึงเป็นเซลล์กลุ่มแรกที่ได้รับเลือด สารอาหาร ฮอร์โมน และออกซิเจน ในปริมาณสูงที่สุดและเป็นเซลล์กลุ่มแรกที่จะเกิดการ regeneration ภายหลังการเกิดภยันตรายต่อตับ แต่จะเป็นเซลล์กลุ่มสุดท้ายที่จะเกิดการ necrosis เซลล์ที่อยู่ในโซนนี้จะเป็นเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ rough endoplasmic reticulum (RER) ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับเซลล์ในโซนอื่น ๆ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาใน phase II ของปฏิกิริยาการทำลายพิษ

2. โซนที่ 2 (Zone 2) เรียกว่า midzone หมายถึง เซลล์ที่อยู่ระหว่าง periportal area กับ centrilobular area เป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาใน phase I ของปฏิกิริยาการทำลายพิษ และมีเอนซัยม์ alcohol dehydrogenase มากที่สุด

3. โซนที่ 3 (Zone 3) เรียกว่า centrilobular หรือ periacinal area หมายถึง เซลล์ที่อยู่รอบ ๆ central vein เป็นเซลล์ที่อยู่ใกล้ทางออกของหลอดเลือดที่ออกจากตับ ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มี hepatic arterioles มาเลี้ยงเลย เซลล์ที่อยู่ในโซนนี้จะมีส่วนประกอบของ smooth endoplasmic reticulum (SER) ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับเซลล์อื่น ๆ



รูปที่ 7 แสดงปริมาณเลือดและน้ำดีในโซนต่าง ๆ ของตับ

(Casarett and Doulls, 1992)

เซลล์ที่อยู่ในโซน 2 และ 3 จะได้รับเลือดที่มีสารอาหารและออกซิเจนต่ำ จึงเป็นบริเวณที่มีความต้านทานต่อภยันตรายน้อย

ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของการออกฤทธิ์ของสารพิษ

1. สารพิษที่สามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยตนเอง

สารในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยโครงสร้างเดิม ซึ่งสารพิษเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม

2. สารพิษที่สามารถออกฤทธิ์ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

สารในกลุ่มนี้ จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใหม่จึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้ โครงสร้างใหม่ที่เกิดขึ้นนั้นจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างเดิมของสารนั้น

2.1 โครงสร้างใหม่อิเลคโทรไฟล์ (electrophile)

โครงสร้างลักษณะนี้จะมีคุณสมบัติที่เป็นประจุไฟฟ้า ซึ่งสามารถจับตัวกับกลุ่มของสารชีวโมเลกุล เช่น DNA, RNA แบบโควาเลนท์

2.2 โครงสร้างใหม่อนุมูลอิสระ (free radical)

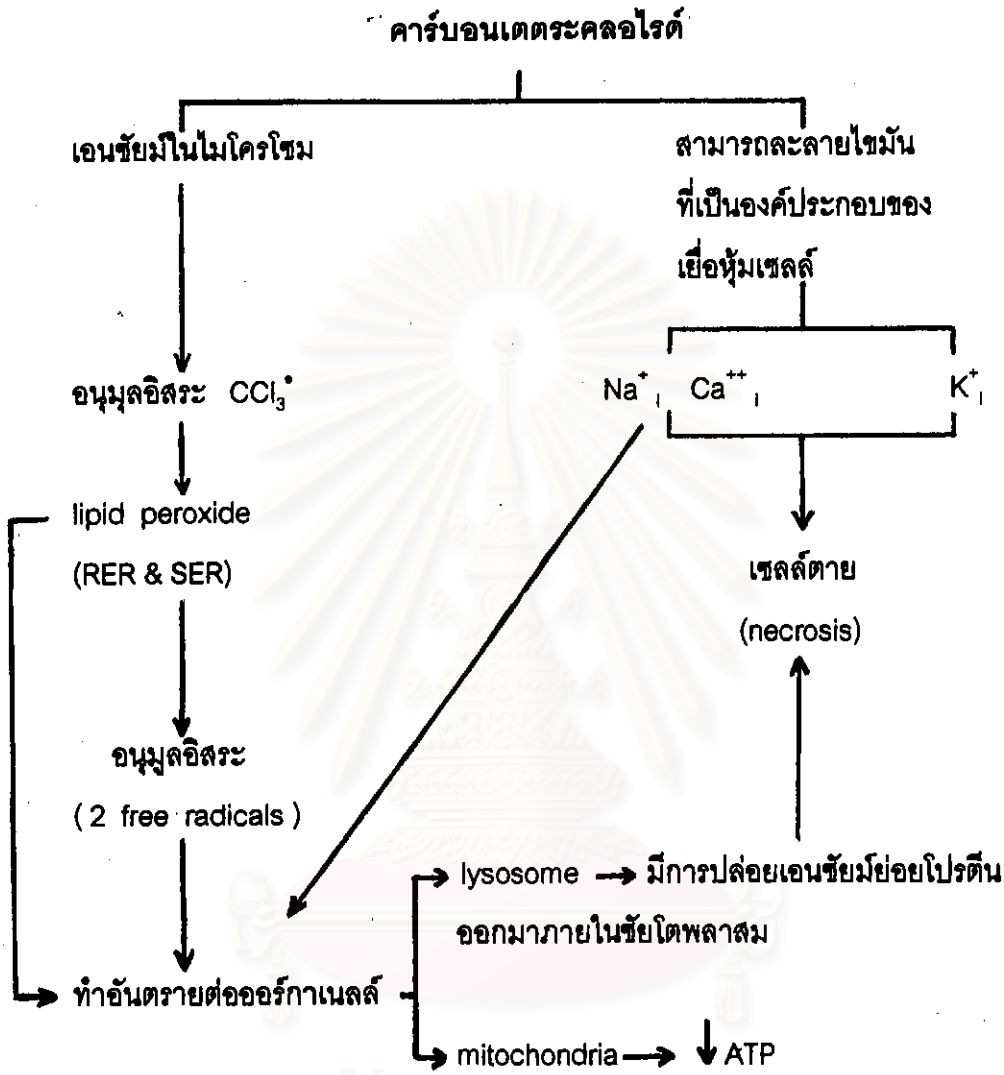
สารที่เป็นอนุมูลอิสระนั้น จะมีอิเลคตรอนโดดเดี่ยวอยู่วงโคจรชั้นนอกสุดของอะตอม จึงสามารถจับกับสารต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี และยังสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่จากสารจำพวกไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ จนทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบลูกโซ่

ก. อนุมูลอิสระออกซิเจน (O_2 free radical) อาจเกิดจากแหล่งต่าง ๆ ภายในเซลล์สภาวะปกติ สภาวะที่มีออกซิเจนมากกว่าปกติ (hyperoxia) หรือสภาวะที่มีการอักเสบ (inflammation) เป็นต้น

ข. อนุมูลอิสระจากสารพิษ สารพิษที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สำคัญคือ CCl_4 (carbon tetrachloride) เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ สารนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นอนุมูลอิสระไตโคลร์เมทธิล (trichlomethyl free radical, $CCl_3^{\cdot}$) อนุมูลนี้จะทำลายไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีผลผลิตเกิดขึ้น 2 ชนิดคือ

(1) อนุมูลอิสระของกรดไขมัน (organic free radical) ซึ่งจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ต่อเนื่องไปอีก

(2) ไลปิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) ซึ่งจะทำให้มี malondialdehyde เกิดขึ้นด้วย



หมายเหตุ i = ภายในเซลล์

รูปที่ 8 การเกิดพิษของคาร์บอนเตตระคลอไรด์
(ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2535)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเกิดพิษต่อตับ

ในชีวิตประจำวันของมนุษย์จำเป็นต้องมีการสัมผัสกับสารต่าง ๆ ทั้งที่ตั้งใจและไม่ตั้งใจ ซึ่งสารต่าง ๆ เหล่านั้นจะก่อให้เกิดอันตรายเป็นพิษต่อร่างกายหรือไม่นั้น ก็ขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณ และระยะเวลาของการสัมผัสสารนั้น ๆ ตับเป็นอวัยวะแรกที่มีการเปลี่ยนแปลงสาร (biotransformation) ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยการลดพิษ (detoxified) การกำจัด (eliminated) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดสารตัวกลาง (intermediate) ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในลักษณะต่าง ๆ กัน (Thomas and William, 1987) และความรุนแรงของอันตรายนั้นจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์จะสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้หรือไม่

การประเมินรูปร่างลักษณะ (morphological assessment) ของเซลล์ตับที่ได้รับอันตรายอย่างเฉียบพลันแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ถ้าอันตรายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อย จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่สามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible change) เรียก degeneration เป็นการเสื่อมของเซลล์ตับที่นำมาก่อนการเกิด cell death เช่น cloudy swelling (cellular swelling), hydropic degeneration, vacuolar degeneration และ fatty change (fatty degeneration) เป็นต้น

2. ถ้าอันตรายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงมาก จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่ไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ (irreversible change) เซลล์จะสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมเซลล์ เรียกระยะนี้ว่า cell death

3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ภายหลังสมดุลย์ระหว่างเซลล์ที่ตายกับของเหลวที่เหลืออยู่ล้อมรอบเซลล์นั้น เรียกว่า prenecrotic change

4. การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นภายหลัง cell death เรียก cell necrosis มีหลายชนิด เช่น coagulative necrosis, enzymatic fat necrosis เป็นต้น (วัชราภรณ์ ปัชชามาตย์, 1996 : สุพิศ จิงพาณิชย์ และ ชีพสุมน สุทธิพินทะวังค์, 2524)

กลไกที่เกี่ยวข้องในการเกิดพิษต่อตับ เช่น Lipid peroxidation, Covalent binding to proteins, Glutathione depletion, Peroxisome proliferation เป็นต้น ซึ่งกลไกที่ต่างกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของตับในลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ทำให้เกิด Fatty change, Necrosis, Cirrhosis, Carcinoma เป็นต้น ลักษณะที่ทำให้เกิดพิษต่อตับส่วนใหญ่มักเป็น fatty liver และ liver necrosis

Fatty liver

Fatty liver หรือ Steatosis หมายถึง ตับที่มีไขมันสะสมมากกว่า 5 % โดยน้ำหนัก (ปกติในตับจะมีไขมันประมาณ 5 กรัมต่อน้ำหนักตับ 100 กรัม) (McIntyre et al., 1991) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุต่าง ๆ หลายประการ เช่น สารพิษจากภายนอก การขาดสมดุลทางโภชนาการ หรือจากโรคบางชนิด มีผลทำให้เกิดการสะสมไขมันที่ผิดปกติ โดยเฉพาะไขมันจำพวก triglycerides (Ernest and Frank, 1982)

Triglyceride Cycle

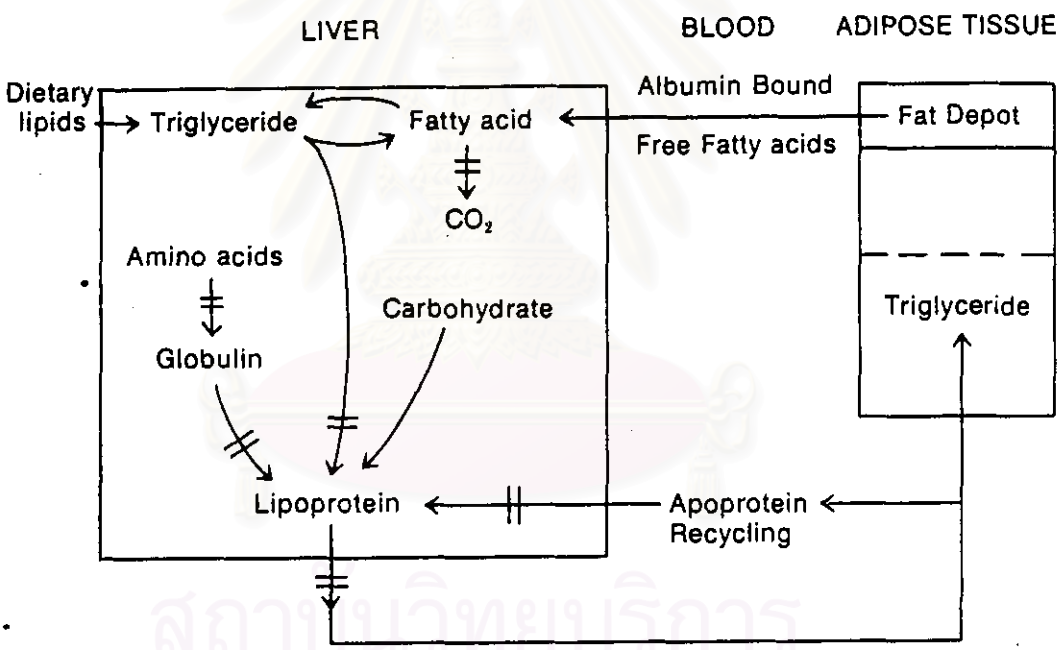
กรดไขมันอิสระที่จับกับ albumin (albumin - bound free fatty acids) ถูกนำออกจากเนื้อเยื่อของไขมันเข้าสู่เลือดที่มายังตับ เพื่อถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยปฏิกิริยา oxidation หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ triglyceride และ triglyceride ที่ถูกสร้างขึ้น รวมกับพวก phospholipids, cholesterol, esters ของ cholesterol และ carbohydrate จะจับรวมตัวกับตัวพาซึ่งเป็น globulin ได้สารใหม่ที่เรียกว่า VLDL (very low density lipoprotein)

VLDL นี้เป็น triglyceride ที่ตับหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด ในการสร้าง VLDL ยังมีกลไกช่วย คือ การนำ apoprotein ที่ช่วยในการสร้าง VLDL กลับมาใช้ใหม่ โดยเอนซัยม์ที่ใช้ในการสร้างกรดไขมันและโปรตีนในตับ

กรดไขมัน นอกจากจะมาจากเนื้อเยื่อไขมันแล้ว ยังมาจากอาหารจำพวกไขมัน คาร์โบไฮเดรท และโปรตีน ที่ร่างกายได้รับจากการกิน ระดับของ triglyceride ในตับจะแสดงให้เห็นถึงสมดุลย์ระหว่าง อัตราเร็วของการนำกรดไขมันเข้าสู่ร่างกายและการสร้างกรดไขมันใน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ร่างกาย กับ อัตราเร็วของการเปลี่ยนแปลงกรดไขมัน (oxidation) และการหลั่งของ triglyceride ออกจากตับ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 triglyceride cycle และการยับยั้งเมตาโบลิสม (≠) โดย hepatotoxicants (Ernest and Frank, 1982)

กลไกการเกิดแตกต่างกันขึ้นกับสารที่เป็นต้นเหตุ มีกลไกที่น่าจะเป็นไปได้มากมาย ดังนี้

1. การมีกรดไขมันมาที่ตับมากเกินไป

กลไกนี้น่าจะเป็นกลไกหลักของการเกิด fatty acid จาก CCl_4, ethionine และฟอสฟอรัส โดยสารเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของไขมันจากเนื้อเยื่อไขมัน ทำให้เกิดการสะสมของไขมันอิสระในตับ เอนซัยม์ต่าง ๆ ใน triglyceride cycle จึงต้องทำงานอย่างหนักจนถึงจุดอิ่มตัว และเกิดการสะสมของ triglyceride ขึ้น

2. การเปลี่ยนแปลงของ triglyceride cycle

กระบวนการใดที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง apoprotein, phospholipid, fatty acid, cholesterol, cholesterol esters และ carbohydrate ซึ่งจะรวมตัวกันเป็น VLDL มักจะส่งผลให้เกิด fatty liver ลักษณะการเกิดพิษต่อตับแบบนี้พบว่าเกิดจากสารหลายประเภท เช่น CCl_4 ethionine และ puromycin เป็นต้น กระบวนการเปลี่ยนแปลง triglyceride cycle ที่อาจเป็นไปได้ มีดังนี้

2.1 ลดการสร้างและหลั่ง VLDL

เกิดจากการมี choline และส่วนประกอบอื่นในการรวมตัวเป็น VLDL ไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการชักนำให้มี phospholipid ที่ผนังเซลล์มากขึ้น เป็นผลให้เกิดความเสียหายต่อเมตาโบลิสมของไขมัน และเกิดการสะสมของ triglyceride ในที่สุด

2.2 ยับยั้งกลไกช่วยของ triglyceride cycle

ในการหลั่ง VLDL จากตับ ต้องอาศัยกลไกช่วยร่วมไปกับการสร้าง VLDL นั่นคือการนำ apoprotein จากพลาสมากลับมาช่วยในการสร้าง VLDL ดังนั้นถ้ามีการยับยั้งกลไกช่วยนี้ จะก่อให้เกิดการสะสม triglyceride สังเกตได้จากพิษที่เกิดจาก CCl_4

2.3 lipid peroxidation

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดพิษโดย ethanol มี ethane เกิดขึ้น และ fatty liver ที่เกิดขึ้นป้องกันได้ด้วย antioxidants ดังนั้น lipid peroxidation จึงน่าจะเป็นกลไกที่ทำให้เกิด fatty liver เมื่อเกิดพิษเฉียบพลันพบว่า mitochondria ถูกทำลายอย่างมากและเกิดการสะสมของ conjugated diene (ผลจากการเกิด lipid peroxidation) มากกว่าใน

microsome แต่ถ้าเป็นพิษเรื้อรังจะเกิดพิษต่อ microsome มากกว่า mitochondria (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)

Liver necrosis

หมายถึง การตายของเซลล์ตับ จากการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิสมที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ อย่างน้อยหนึ่งกระบวนการ เช่น ยับยั้งการสร้าง DNA, RNA และโปรตีนอย่างรุนแรง (อันเป็นผลมาจากการทำลาย nucleus และ endoplasmic reticulum) ยับยั้งการควบคุมและการสร้างพลังงานของไมโตคอนเดรีย, ทำลาย lysosome (ทำให้เกิดการทำลายตัวเอง) เปลี่ยนสมดุลย์ของ Na^+ และ K^+ ระหว่างเซลล์ตับกับเลือด การเกิด necrosis อาจเกิดเฉพาะที่ หรือเกิดขึ้นทั่วไปทั้งตับ กลไกการเกิดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีผู้เสนอกลไกการเกิดดังนี้

1. การบกพร่องของ mitochondria

เนื่องจาก mitochondria มีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ เป็น organelle ที่มีการสังเคราะห์ ATP ให้กับเมตาบอลิสมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ของ mitochondria จะทำให้เกิดความบกพร่องในการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงการมีชีวิตของเซลล์ และอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ตับได้ ในปัจจุบันยังไม่เชื่อว่าการทำลายไมโตคอนเดรียเป็นขั้นตอนสำคัญของการเกิด liver necrosis

2. การจับกับ macromolecules

เมตาบอลิสมของสารต่างๆ โดยเอนซัยม์ที่ตับ บางครั้งอาจเกิดเมตาโบไลท์พวก alkylating หรือ arylating หรือ acylating derivatives ที่สามารถจับแบบ covalent binding กับโมเลกุลต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อได้ เมื่อมี covalent complex เกิดขึ้น กลไกอื่นอย่างน้อยหนึ่งกลไกจะถูกกระตุ้น และทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติไป ถ้ารุนแรงมากก็อาจทำให้เซลล์ตายได้ (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)

3. lipid peroxidation

เป็นการบาดเจ็บของเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะ และสามารถทำให้เกิด liver necrosis ขึ้นได้ โดย hepatotoxicants ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดต่อไป

4. ความบกพร่องของการควบคุมระดับ Ca^{2+} อิสระภายในเซลล์

ในสภาวะปกติ จะมี Ca^{2+} อยู่นอกเซลล์ประมาณ 10^{-3} M (mM) แต่ Ca^{2+} ในเซลล์จะมีน้อยกว่านอกเซลล์ คือมีประมาณ 10^{-6} M ทำให้เกิดแรงขับ ให้ Ca^{2+} จากนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์ แต่ถูกควบคุมให้สมดุลโดยเอนซัยม์ที่อยู่บน plasma membrane และส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อใดที่ระบบเหล่านี้ถูกรบกวน สมดุล Ca^{2+} เสียไป ทำให้มี Ca^{2+} ภายในเซลล์มากขึ้น เกิดการรบกวนเมตาบอลิสมต่าง ๆ ภายในเซลล์ นำไปสู่การเกิด cell necrosis ได้ (Alan, Duncan, and Donald, 1989 ; Sten., et al, 1989)

5. ยับยั้งการสร้างโปรตีน

เกิดจากการที่สารไปทำลาย *nucleus* และ *endoplasmic reticulum* ทำให้ไม่มีการสร้าง DNA, RNA และโปรตีน แต่ระยะเวลาที่เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนกับเวลาที่เริ่มเกิด necrosis มักไม่แน่นอน จึงอาจสรุปได้ว่า การทำลายการสร้างโปรตีนไม่ใช่เหตุการณ์แรกที่ทำให้เซลล์ตาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินการบาดเจ็บของเซลล์ตับในสัตว์ทดลอง

การประเมินการบาดเจ็บของเซลล์ตับในสัตว์ทดลองทำได้หลายวิธี ที่นิยมมากก็คือ enzyme tests, hepatic excretory tests, histological analysis และการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบทางเคมีภายในตับ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกที่จะทำการศึกษา ดังนี้

enzyme tests

เมื่อเซลล์ได้รับอันตราย เช่น มีการอักเสบ มีการบวมของเซลล์ ไม่ว่าเซลล์จะถูกทำลายจนตายหรือไม่ก็ตาม เซลล์จะปล่อยเอนซัยม์ออกจากเซลล์ เอนซัยม์ภายในเซลล์ที่สำคัญที่จะสามารถนำมาเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าเซลล์ตับกำลังได้รับอันตรายได้แก่

1. Aminotransferase
2. Isocitrate dehydrogenase (ICD)
3. Lactate dehydrogenase (LDH)

เนื่องจากเอนซัยม์ LDH นั้นมักมีค่าสูงในภาวะต่าง ๆ ได้หลายภาวะ ไม่ได้สูงขึ้นในกรณีที่ตับอักเสบเท่านั้น การทดสอบนี้จึงมีประโยชน์น้อย ส่วนเอนซัยม์ ICD แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงในระบบเลือดจะแสดงความจำเพาะให้เห็นว่าตับมีพยาธิสภาพ แต่ผลที่ได้ก็ไม่ได้เหนือไปกว่าการตรวจหาเอนซัยม์ Aminotransferase ดังนั้นเอนซัยม์ Aminotransferase จึงนิยมนำมาทดสอบเพื่อดูการเสื่อมสลายของเซลล์ตับมากกว่าเอนซัยม์อื่น ๆ (ประเสริฐ ทองเจริญ, 2528)

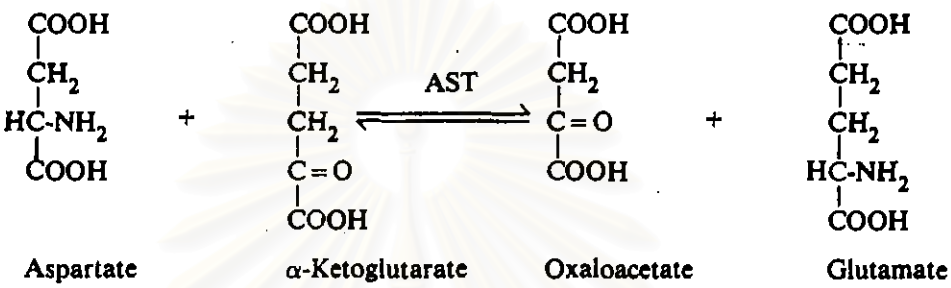
Enzyme Aminotransferase ประกอบด้วยเอนซัยม์ 2 ชนิดคือ

1. Aspartate aminotransferase หรือ Aspartate transaminase (AST) หรือ Glutamate Oxaloacetate transaminase (GOT)

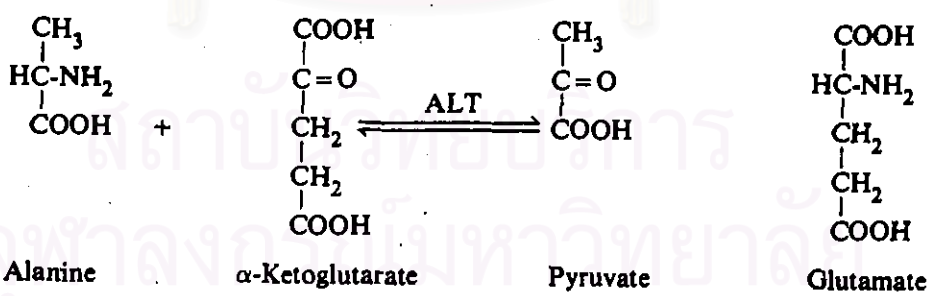
2. Alanine aminotransferase หรือ Alanine transaminase (ALT) หรือ Glutamate Pyruvate transminase (GPT)

Aminotransferase เป็นเอนซัยม์ที่ทำหน้าที่ในการนำ alpha amino จาก amino acid ไป ยัง alpha ketoacid โดยที่

GOT จะเร่งปฏิกิริยาการขนย้ายหมู่ amino ระหว่าง amino acid และ α - oxoacid ดังนี้



GPT จะเร่งปฏิกิริยาการขนย้ายหมู่ amino ระหว่าง amino acid และ α - oxoacid ดังนี้ (ปิยวรรณ์ สุรินทร์, 2530)



โดยทั่วไป GOT จะมี activity มากกว่า GPT GOT activity จะตรวจพบในกล้ามเนื้อกระบังลม กล้ามเนื้อหัวใจ และเนื้อเยื่อตับ ส่วน GPT activity นั้นมักพบที่ตับ ในหนูขาวทั้ง GPT และ GOT จะเป็นเอนซัยม์ที่ไวมากต่อการเกิดพิษต่อตับ ที่กระตุ้นให้เกิดขึ้นด้วยสารเคมีต่าง ๆ (ธาดา สืบหลินวงศ์ และ นวลทิพย์ กมลวารินทร์, 2539)

หลักการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์หาระดับเอนซัยม์ GOT และ GPT คือ หลักการวิเคราะห์โดยการวัดเทียบสี (colorimetric method) ของ Reitman and Frankel ทั้งนี้เนื่องจากเอนซัยม์ทั้งสองชนิดคือ GOT และ GPT ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการขนย้ายหมู่ amino ของ amino acid ไปยัง α - oxoacid ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งจะทำให้เกิด amino acid และ α - oxoacid ตัวใหม่ ดังนั้นในระบบการวิเคราะห์เอนซัยม์ GOT และ GPT นี้จึงประกอบด้วย amino acid 2 ตัว oxoacid 2 ตัว หลักการของวิธีนี้คือ การหาปริมาณ oxoacid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาหรือหาปริมาณของ oxoacid ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยการให้ oxoacid ทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine จะได้ phenylhydrazone ของ oxoacid ซึ่งมีสีในภาวะต่าง

เนื่องจากในการเร่งปฏิกิริยาของเอนซัยม์ GOT จะมี oxoacid ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 ตัว ได้แก่ α - oxoglutarate และ pyruvate ซึ่ง oxoacid ทั้ง 2 ตัวของแต่ละปฏิกิริยาสามารถทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ดังนั้นการวิเคราะห์เอนซัยม์ GOT จะวัดสีที่เกิดจาก phenylhydrazone ของ oxaloacetate ส่วนการวิเคราะห์หาเอนซัยม์ GPT จะวัดสีจาก phenylhydrazone ของ pyruvate โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร

การวัดหาส่วนประกอบทางเคมีของตับที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการได้รับ hepatotoxins

การวัดหาส่วนประกอบทางเคมีของตับที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากการได้รับสารต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับ นับเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการประเมินหาความรุนแรง ตลอดจนหากลไกที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษที่เกิดขึ้น ตัวอย่างที่ใช้กันมากคือ การวัดค่า hepatic lipid content และ lipid peroxidation

lipid peroxidation เป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน (multiphasic phase) ประกอบด้วย initiation, propagation, และ termination

initiation

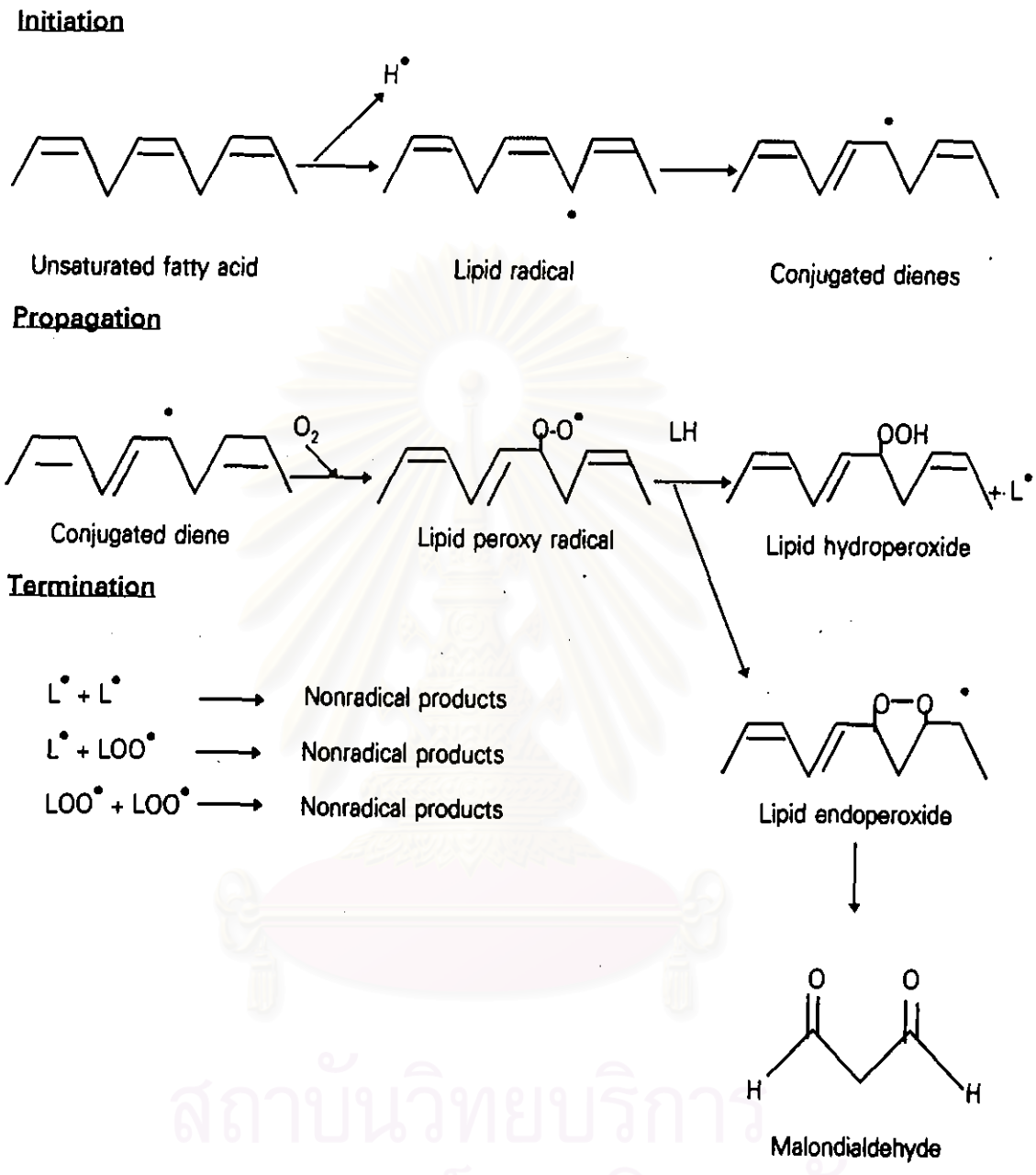
เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเมตาบอลิสมของสารพิษบางชนิดซึ่งจะไปแย่งที่ของ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid (ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของ lipid ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้ไม่คงตัว สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเคลื่อนที่ของ พันธะคู่ภายในโมเลกุล จนทำให้เกิด lipid radical ที่เป็น conjugated diene

propagation

conjugated diene ที่เกิดขึ้นในช่วง initiation จะเกิดการรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิด lipid peroxyl radicals ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้จะสามารถแย่งที่ hydrogen ของ methylene carbon ในโมเลกุลของ polyunsaturated lipid ที่อยู่ใกล้เคียงได้ ทำให้เกิด lipid hydroperoxide และ lipid radicals ตัวใหม่ กระบวนการเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาได้ด้วยตัวเอง จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์เป็นวงกว้าง

termination

เมื่อ lipid peroxidation ขยายวงกว้างขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่มีโมเลกุลของ unsaturated fatty acid เหลืออยู่ อนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ก็จะทำปฏิกิริยากันเองจนกลายเป็น nonradical เป็นการหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดในกระบวนการ lipid peroxidation (Ernest and Patricia, 1994 ; Ernest and Frank, 1982) ผนังเซลล์ที่มีปริมาณ unsaturated fatty acid มาก มักเป็นเป้าหมายในการเกิด lipid peroxidation และการเกิด lipid peroxidation นี้เองมักทำให้ผนังเซลล์สูญเสียความทรงตัว และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เกิดอันตรายต่อเซลล์นั้น ๆ โดยตรง นอกจากนั้นผลของ lipid peroxidation ยังสามารถเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน ดังรูปที่ 10



หมายเหตุ : LH = unsaturated fatty acid

$L^{\bullet}$ = lipid radical

$LOO^{\bullet}$ = lipid peroxy radical

รูปที่ 10 แสดงกระบวนการเกิด lipid peroxidation

(Buege and Aust, 1978)

วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหา lipid peroxidation คือ Thiobarbituric acid assay (Steven, 1994) โดยในระหว่างการเกิด lipid peroxidation จะมีเมตาบอไลท์เกิดขึ้นหลายตัวเช่น lipid hydroperoxide, hydroxylated fatty acids, aldehydes และ malondialdehyde ปฏิกิริยาที่ใช้เป็นตัวชี้วัดคือ ปฏิกิริยาระหว่าง malondialdehyde กับ thiobarbituric acid (TBA) ได้เป็น TBA-malondialdehyde chromophore (Buege and Aust, 1978)

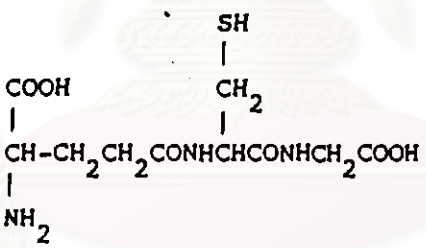
ปัจจุบันมีความเชื่อว่า lipid peroxidation น่าจะไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เซลล์ตาย แต่ควรเป็น consequence ที่เกิดขึ้นมากกว่า พบว่า lipid peroxides และ peroxy radicals ถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดย glutathione peroxidase และ vitamin E hydroxyalkenals ถูกขับถ่ายอย่างรวดเร็วโดย conjugate กับ reduced glutathione (GSH) นอกจากนี้เอนซัยม์ glutathione peroxidase, superoxide dismutase และ catalase ยังทำลายพวก superoxide anion ให้กลายเป็นโมเลกุลที่หมดพิษ (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, พรพิมล กิจสนาโยธิน และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2538)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Glutathione

glutathione เป็น non protein thiol ที่มีความสำคัญที่สุดในเซลล์สัตว์ ถูกค้นพบโดย F.G.hopkins ในปี ค.ศ. 1921 ในรูปของ tripeptides คือ γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine

glutathione ที่พบภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ reduced form (GSH) และส่วนน้อยในรูปของ mixed disulfide (G-SS-protein) thioesters และ glutathione disulfide (GSSG) glutathione จะพบมากภายใน cytoplasm และส่วนน้อยใน mitochondria นอกจากนี้อาจพบ GSH และ GSSG ในของเหลวส่วนอื่นของร่างกาย. เช่น พลาสมา น้ำดี ปัสสาวะ แต่จะพบในความเข้มข้นที่น้อยกว่าในเซลล์ (Evan, Terrance and David, 1994)



รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของ glutathione

หน้าที่ของ glutathione

1. การรักษาความคงตัวของผนังเซลล์ และกล้ามเนื้อ
2. การสังเคราะห์โปรตีน และ DNA
3. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน และสมรรถนะของเอนซัยม์
4. การหลั่งของ neurotransmitter บางชนิด

นอกจากนั้น glutathione ยังมีหน้าที่ที่สำคัญอีกคือ หน้าที่ในการเมตาบอลิสมของยา โดยที่ glutathione เป็น strong nucleophile จับกับเมตาโบไลท์ของสารที่เป็น electrophile ทำให้

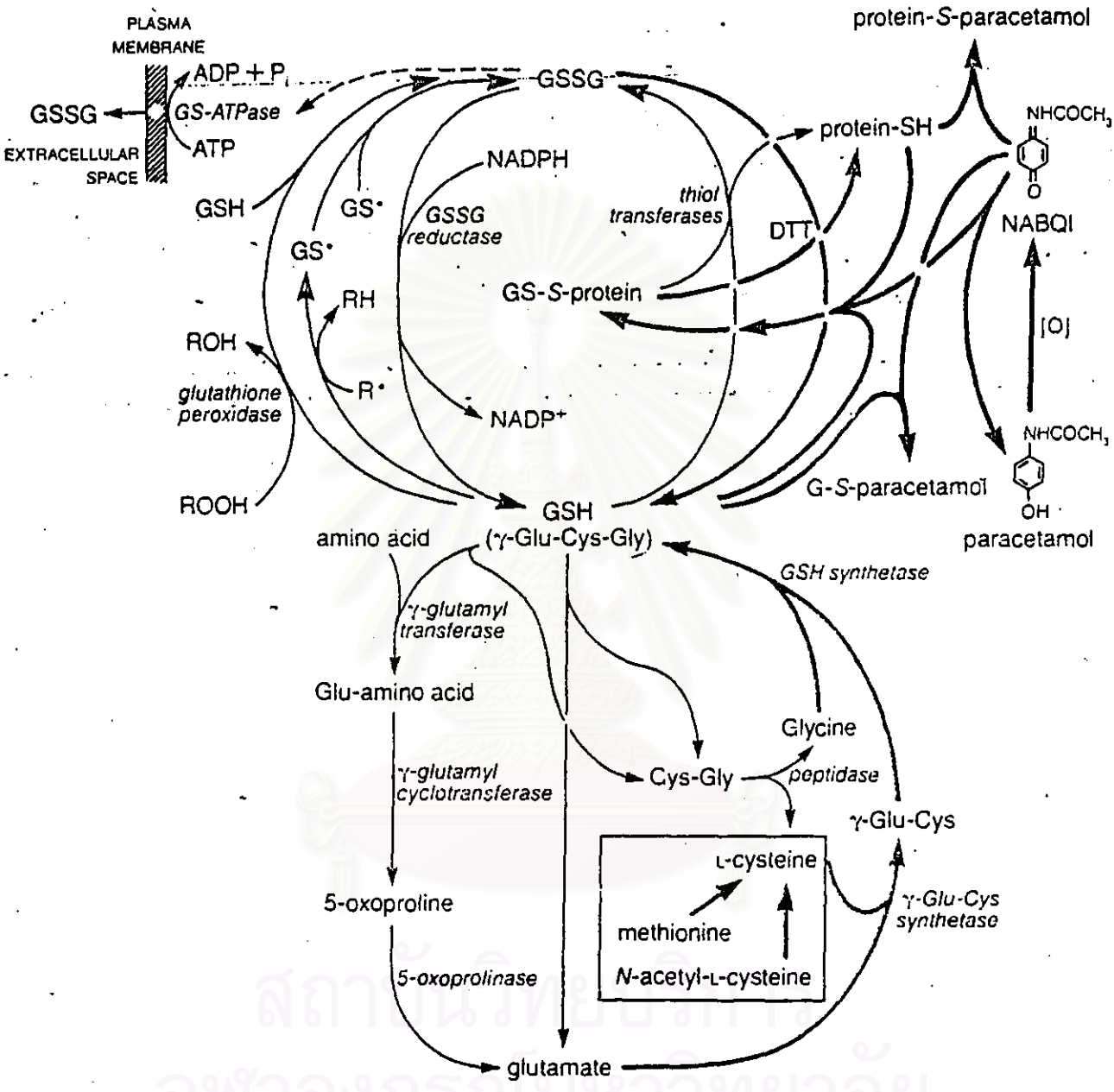
เมตาโบไลท์นั้นหมดฤทธิ์ และถูกทำให้อยู่ในรูปของ glutathione conjugate เพื่อกำจัดต่อไป glutathione ยังทำหน้าที่เป็น reductant ในเมตาบอลิสมของ peroxides และ radicals อิสระอีกเป็นจำนวนมาก ปฏิกิริยาต่าง ๆ เหล่านี้อาจเกิดขึ้นเองแบบทันทีทันใด หรืออาจถูกกระตุ้นโดยเอนซัยม์ glutathione transferase และ/หรือ glutathione peroxidase

การสังเคราะห์ glutathione

การสังเคราะห์ glutathione ถูกควบคุมโดย feedback inhibition นั่นคือ เมื่อมีการใช้ glutathione ก็จะมีการกระตุ้นให้สร้างมากขึ้น ดังนั้นปริมาณของ sulfur amino acids โดยเฉพาะ cysteine ที่มีอยู่ในร่างกาย จึงเป็นตัวควบคุมความเร็วของการสร้าง glutathione glutathione ที่ถูกสร้างขึ้น จะสามารถทำหน้าที่เป็น reductant ในกระบวนการเมตาบอลิสมของ H_2O_2 (เมตาบอไลท์ปกติที่พบในเซลล์โดยทั่วไป) และ organic hydroperoxide (ถ้าเกิดการสะสมจะทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย) เมตาบอลิสมของ H_2O_2 และ organic hydroperoxide โดย glutathione peroxidase นี้จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation ของ glutathione โดยจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ glutathione disulfide (GSSG) ซึ่ง GSSG ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น GSH โดยเอนซัยม์ reductase ซึ่งต้องอาศัย NADPH ที่ได้มาจาก pentose phosphate shunt

ในบางครั้งถ้ามี GSSG มากจนเกินความสามารถของเอนซัยม์ reductase หรือมีการสร้าง NADPH ไม่ทัน GSSG ก็จะถูกขับออกจากเซลล์โดยกระบวนการ active transport (คือมีการใช้ ATP ในกระบวนการ) การเปลี่ยน GSH ไปเป็น GSSG ในระหว่างการเมตาบอลิสมของยานั้น อาจเป็นผลมาจาก การจับกันโดยตรงระหว่าง GSH กับ radicals อิสระที่สร้างขึ้นจากสารและยาหลายตัว โดยเอนซัยม์ที่พบทั่วไปภายในเซลล์

ตัวอย่างของ paracetamol เมื่อทำปฏิกิริยากับ GSH จะดึงอะตอมของ hydrogen ไปจาก GSH ทำให้ GSH กลายเป็น thiyl radical ($GS^{\bullet}$) thiyl radical 2 ตัว รวมตัวกันจะได้ GSSG ในกรณีที่มี GSH อยู่เป็นจำนวนมาก radical อิสระอาจรวมตัวกับ GSH หรือเปลี่ยนกลับไปเป็น paracetamol และ electrophilic metabolite ในที่นี้คือ N-acetyl [p] benzoquinone imine ซึ่งจะรวมตัวกับ GSH ได้เป็น glutathione conjugate ซึ่งจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ mercapturates ในไตและถูกกำจัดต่อไป ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 กลไกการสร้างและกระบวนการลดพิษของ hepatotoxicants โดย glutathione (Alan, Duncan and Donald, 1989)

การ วิเคราะห์เพื่อตรวจวัด glutathione วัดโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง GSH กับ DTNB (5,5' -dithiobis-2-nitrobenzoic acid) ดังสมการ

$$2\,GSH + DTNB \longrightarrow GSSG + TNB$$

$$GSSG + NADPH + H^{+} \longrightarrow 2\,GSH + NADP^{+}$$

การตรวจวัดนี้จะใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ปริมาณที่หาได้นำมาเปรียบเทียบกับ standard curve

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไมโตคอนเดรีย (*Mitochondria*)

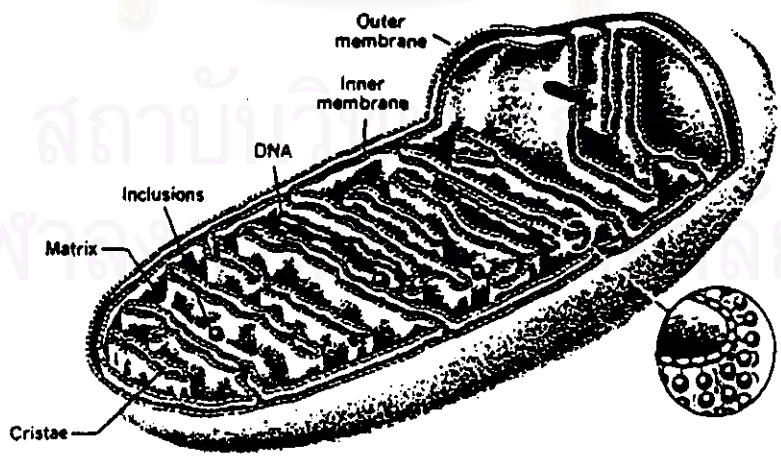
ไมโตคอนเดรียเป็น organelle สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปของพลังงาน (energy transduction) ภายในเซลล์ และปฏิกิริยาส่วนใหญ่ที่ต้องอาศัยพลังงานจะต้องใช้ ATP (adenosine triphosphate) ไม่ว่าโดยทางตรงหรือทางอ้อม ดังนั้นจึงถือว่าไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ (cell powerhouse) เพราะ ATP ส่วนใหญ่ภายในเซลล์ถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย (Sheeler and Biomchi, 1987)

ปฏิกิริยาสำคัญที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย

- ปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle)
- การออกซิไดซ์ของกรดไขมัน (Fatty acid oxidation)
- ออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น (Oxidative phosphorylation)

สารอาหารต่าง ๆ ที่ร่างกายได้รับ จะถูกเมตาบอไลท์ และถูกออกซิไดซ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุด โดยพลังงานที่ปล่อยออกมาจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP

ลักษณะรูปร่าง ขนาด และจำนวนของไมโตคอนเดรียภายในเซลล์ จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อ แต่ลักษณะโดยทั่วไปของไมโตคอนเดรีย มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันดังนี้



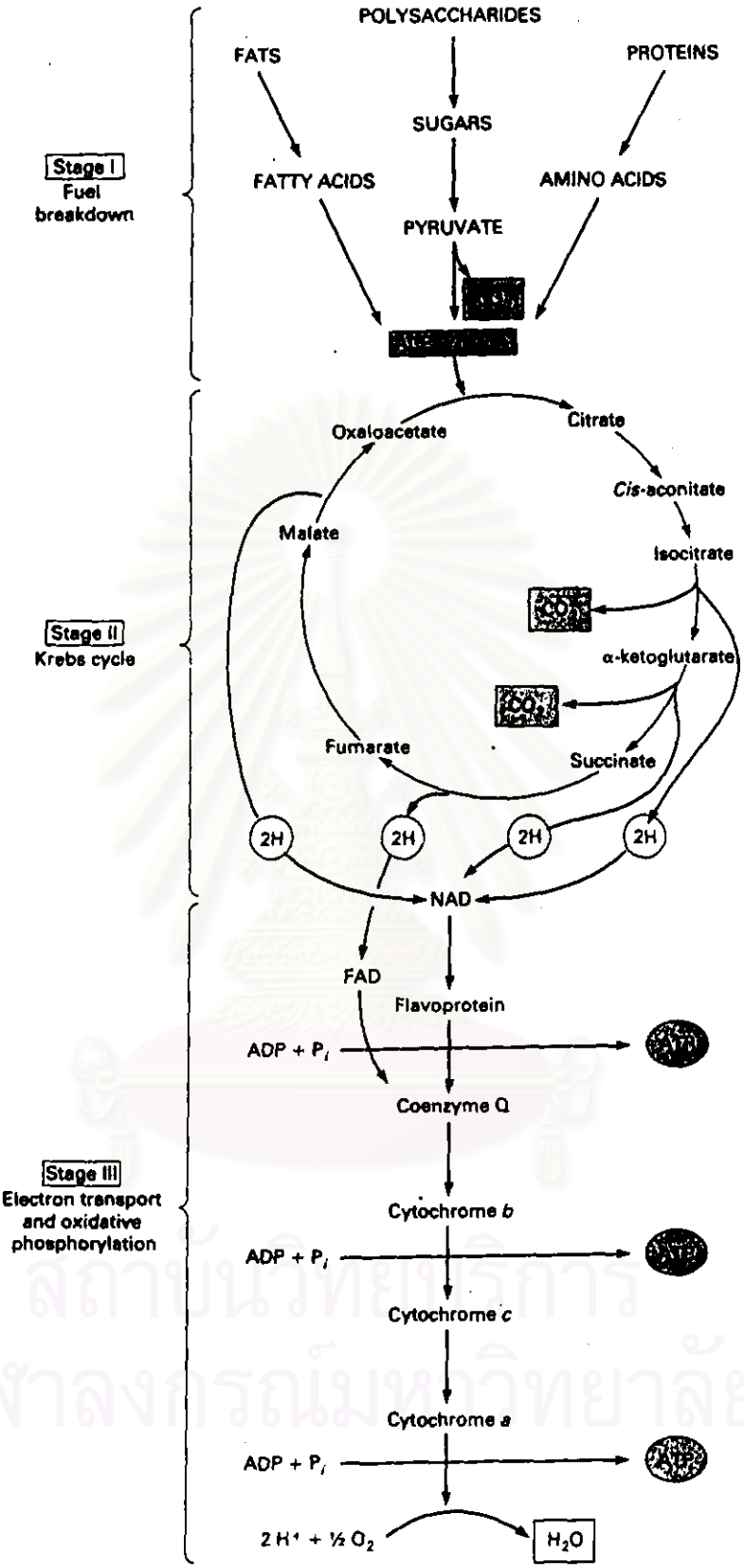
รูปที่ 13 โครงสร้างภายในของไมโตคอนเดรีย

I 18206219

ไมโตคอนเดรียประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) มีการพับ (fold) ของผนังเข้าไปใน matrix เรียกว่า cristae ระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นจะเป็นช่องว่าง (intermembrane space) ซึ่งมีของเหลวบรรจุอยู่ภายใน ผนังชั้นในจะหุ้มของเหลวที่มีลักษณะคล้ายเจล เรียกว่า matrix ผนังชั้นนอกจะ permeable ต่อสารโมเลกุลเล็ก และอิออนต่าง ๆ ในขณะที่ผนังชั้นในจะไม่ permeable ต่อสารต่าง ๆ เพราะฉนั้น การผ่านเข้าออกของสารจากไซโตซอล (cytosol) จะต้องอาศัยโปรตีนที่เป็นตัวพาเฉพาะ (specific carrier protein) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย (Sjostrand, 1978)

สารต่าง ๆ ที่ได้จากการเมตาบอลิสมของสารอาหารในไซโตซอล จะถูกนำเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย และถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยผ่านปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวัฏจักรเครปส์ จากการทำงานของเอนซัยม์ต่าง ๆ ในวัฏจักรดังกล่าว จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนไฮโดรเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากสารตัวกลาง (intermediates) ในปฏิกิริยาเหล่านี้จะรีดิวซ์ NAD^+ และ FAD ไปเป็น $NADH + H^+$ และ $FADH_2$ ตามลำดับ ทั้ง NADH และ $FADH_2$ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจจะเป็นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่น (oxidation - reduction) หลายขั้นตอนตามลำดับของสารตัวกลางที่รับส่งอิเลคตรอน (electron carriers) หลายชนิดที่เรียงตัวกันอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย ผลที่ได้จากปฏิกิริยาในลูกโซ่การหายใจ คือการรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนพร้อมกับมีการรับ H^+ ไปเป็นโมเลกุลของน้ำดังรูปที่ 14 (ณัฐาศิริ แซ่ยิบ, 2535)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs' cycle respiratory chain และปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (Avers et al., 1986)

สารตัวกลางที่ทำหน้าที่รับส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจ แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ

1. Pyridine - linked dehydrogenase มี NAD^+ หรือ $NADP^+$ เป็น coenzyme
2. Flavin - linked dehydrogenase อาจเรียก flavoprotein จะอาศัย FAD หรือ FMN เป็น prosthetic group ในการรับส่งอิเลคตรอน
3. Coenzyme Q หรือ Ubiquinone
4. ระบบ cytochromes จะประกอบด้วย iron - porphyrin เป็น prosthetic groups
5. Iron - sulfur proteins

ลูกโซ่การหายใจแบ่งออกเป็น 4 complexs

complex I NADH - Ubiquinone oxidoreductase

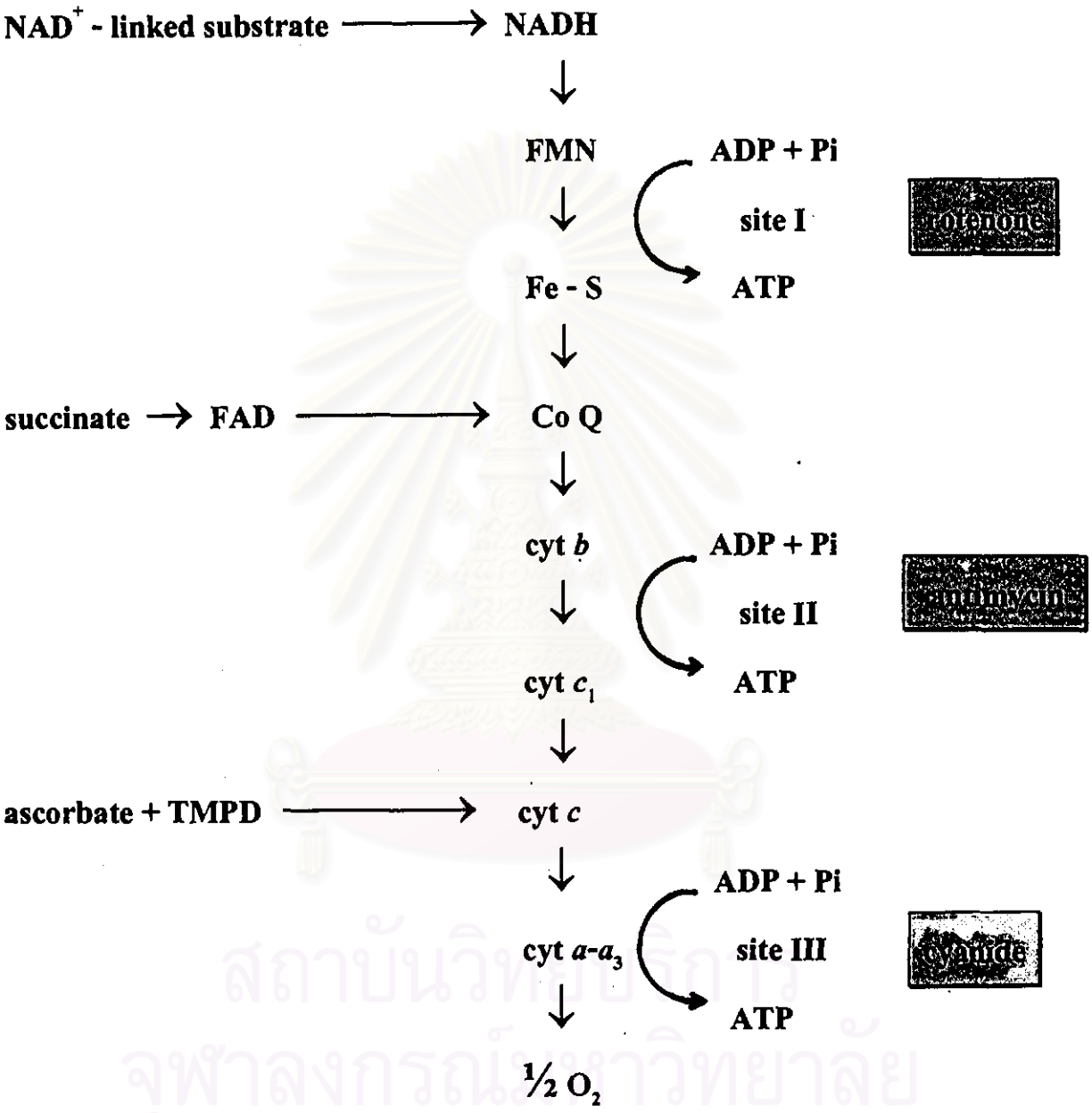
complex II succinate - ubiquinone oxidoreductase

complex III ubiquinol - ferricyto C oxidoreductase

complex IV ferrocyto C - oxygen oxidoreductase

การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ จะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งพลังงานเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP โดยการ phosphorylation ของ ADP เรียกว่ากระบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งพบว่าเกิดขึ้น 3 ตำแหน่ง (sites) ในลูกโซ่การหายใจ ที่มีการปลดปล่อยพลังงานอิสระออกมามากพอที่จะใช้ในการสังเคราะห์ ATP ดังรูปที่ 15 (วิภาวดี โสมเกษตรินทร์, 2535)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 แสดงตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจโดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ (Hatefi, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสภาวะปกติการสังเคราะห์ ATP และการส่งผ่านอิเลคตรอนจะเกิดควบคู่กันไป (tightly couples) แต่ในบางกรณีทั้ง 2 กระบวนการอาจแยกกันได้ เช่น ในกรณีที่ไมโตคอนเดรียที่ได้มีคุณภาพไม่ดีพอ เก็บไว้นานเกินไป (aging mitochondria) หรือได้รับสารบางอย่าง เช่น uncouplers สารประเภทนี้สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรีย ใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทในลูกโซ่การหายใจได้อย่างอิสระและรวดเร็ว โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกสภาวะนี้ว่า อันคัปปลิง (uncoupling)

กลไกที่แท้จริงของการเชื่อมโยงระหว่าง การส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ กับการเกิด phosphorylation ของ ADP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันแนวคิดที่ได้รับการยอมรับคือ chemiosmotic theory ซึ่งเสนอโดย Peter Mitchell ได้กล่าวว่า

ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ จะมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในการผลักดัน (pump) H^+ จาก matrix ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ออกสู่ intermembrane space และเนื่องจาก H^+ มีประจุบวก ดังนั้นจึงทำให้เกิด electrochemical gradients ขึ้นระหว่างผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งอยู่ในรูปของ H^+ gradient และ electrical gradient โดยมีความต่างศักย์ลบที่ผนังด้านในของไมโตคอนเดรีย รวมเรียกว่า proton motive force (P) เมื่อ H^+ จากภายนอกกลับเข้าสู่ matrix ทาง H^+ channel พลังงานในรูปนี้จะถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อนำไปสังเคราะห์ ATP โดยอาศัย ATP synthase

Electrochemical gradients ดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ต้องเป็น intact mitochondria คือสามารถควบคุมการเคลื่อนที่เข้าออกของ H^+ ได้ H^+ - gradient จะเป็นตัวเชื่อมโยงการเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ในขณะที่มีการส่งผ่านอิเลคตรอนจากสับสเตรทไปยังออกซิเจน ดังนั้นสารเคมีที่ทำลาย H^+ - gradient ที่เกิดขึ้น จะทำให้เกิดสภาวะอันคัปปลิง (uncoupling) ของไมโตคอนเดรีย ADP มีผลทำให้ไมโตคอนเดรียพยายามสร้าง H^+ - gradient ขึ้นมาใหม่ โดยการออกซิไดซ์สับสเตรทโดยใช้ออกซิเจนไปเรื่อย ๆ นั่นคือ ยังมีการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แต่ H^+ - gradient ไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และพบว่าในสภาวะดังกล่าว ATP synthase จะกระตุ้นให้มีการสลายตัวของ ATP แทน คือ ATPase activity เพื่อผลักดันให้เกิด H^+ - gradient ขึ้นอีกทางหนึ่งด้วย ด้วยเหตุนี้สาร uncoupler จึงกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย แต่ในสภาวะปกติ ไมโตคอนเดรียจะมี ATPase activity ต่ำมาก เนื่องจาก ATP synthase จะเร่งปฏิกิริยาในทิศทางของการสังเคราะห์ ATP เป็นสำคัญ (Danishefsky, 1980)

สารที่สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

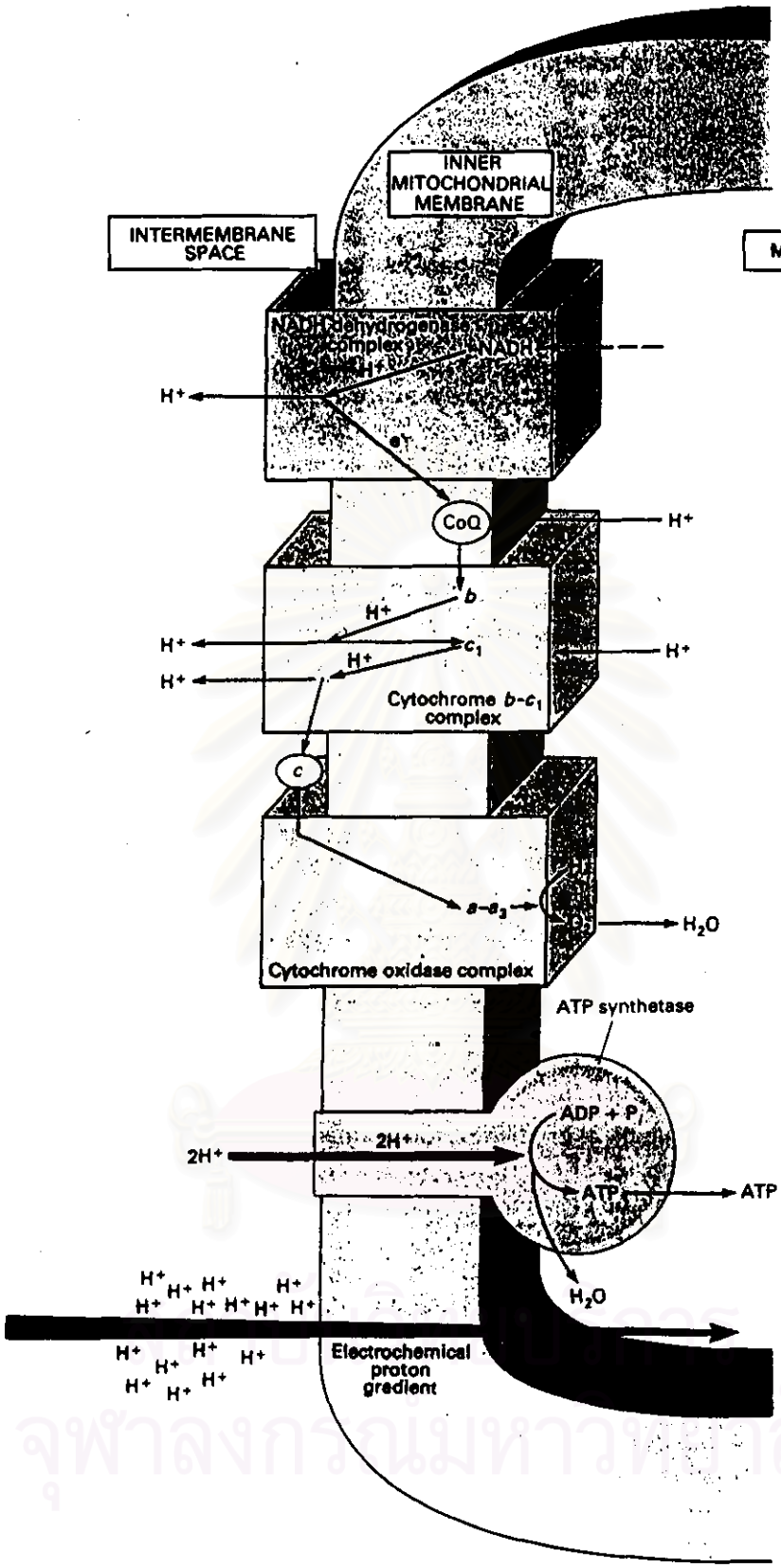
1. สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนใน NADH-Q reductase complex เช่น rotenone, amytal ดังนั้นจึงยับยั้งการเกิด H^+ - gradient ที่ site I สารเหล่านี้จะไม่ยับยั้งการออกซิเดชั่นของ succinate เนื่องจากอิเลคตรอนจากสับสเตรทชนิดนี้จะผ่านเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจไปยัง coenzyme Q โดยตรง

2. สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c ดังนั้นจึงยับยั้งการผลักดัน H^+ จาก matrix ออกสู่ภายนอกใน site II แต่การยับยั้งนี้สามารถหลีกเลี่ยงโดยการใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรทซึ่งจะส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ cytochrome c โดยตรง ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้คือ antimycin A

3. สารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนจาก cytochrome c ไปยังออกซิเจน จึงยับยั้งการสร้าง proton motive force ที่ site III โดยการยับยั้ง cytochrome oxidase เช่น cyanide, azide และ carbon monoxide เป็นต้น (Flickger, et al, 1979 : Heteffi, 1985)

Electrochemical gradients ที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านอิเลคตรอน นอกจากจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP แล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอื่น ๆ ได้ เช่น active transport ของอิออน และ metabolize ต่าง ๆ ผ่านผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย การสังเคราะห์ NADPH เป็นต้น ดังรูปที่ 16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 แสดงการควบคู่ระหว่างการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่การหายใจกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis (Avers et al., 1986)

ตับเป็นอวัยวะที่มีหน้าที่สำคัญต่าง ๆ มากมาย อีกทั้งยังเป็นอวัยวะแรกที่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงสาร (biotransformation) ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยการลดพิษ (detoxified) การกำจัด (eliminated) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจก่อให้เกิดสารตัวกลางที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในลักษณะต่าง ๆ กัน การวิจัยในครั้งนี้มุ่งศึกษาความเป็นพิษของสาร เซลล์ตับจึงเป็น model ที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ xanthones ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาวทั้งในภาวะปกติและภาวะที่ได้รับ carbon tetrachloride
2. เพื่อศึกษาผลของ xanthones ที่มีต่อเอนซัยม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยาในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของ xanthones ต่อเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว
2. นำผลที่ได้จากการศึกษานี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณานำ xanthones มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย