บทที่ 1

บทนำ

ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพร เพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำพืชสมุนไพรนี้มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา นั่นคือข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของพืชสมุนไพรดังกล่าว

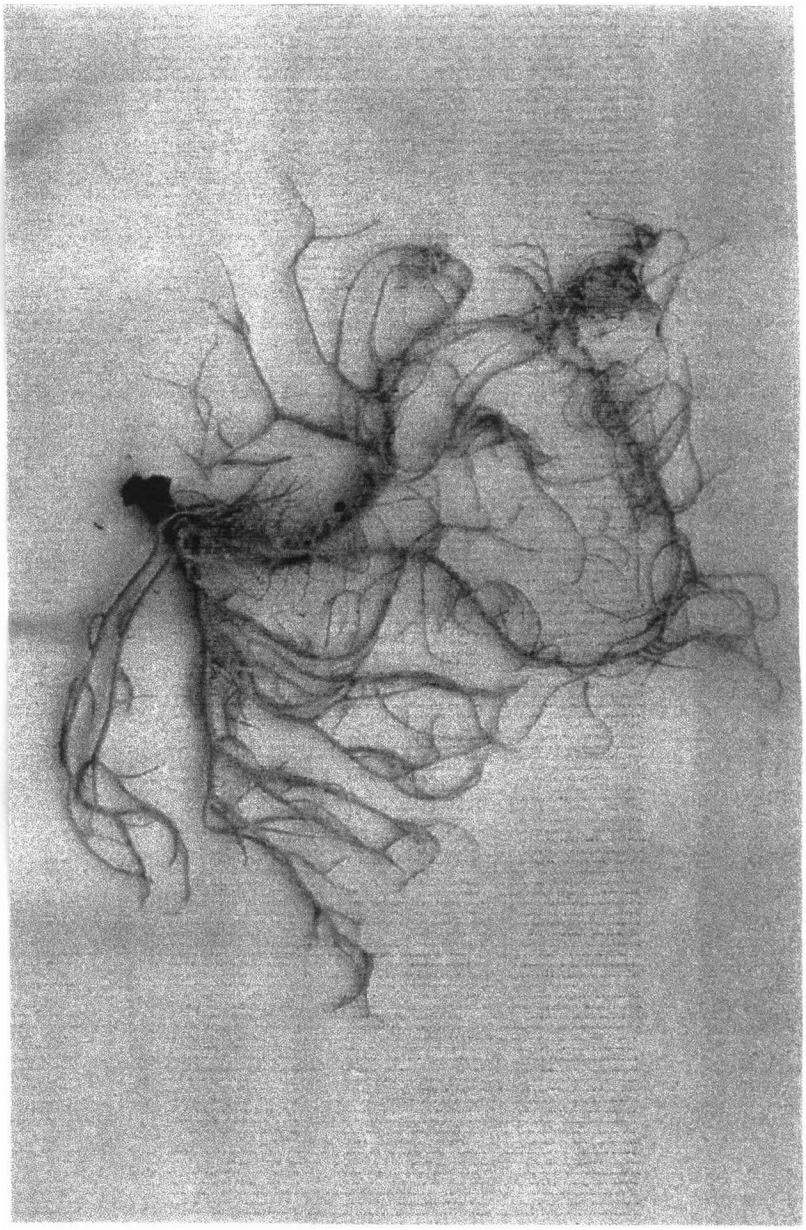
ในบทนี้มีเนื้อหาที่สำคัญ คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นข้อมูลเกี่ยวกับฝอยลม (Foi-lom) และ usnic acid ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในฝอยลม ในแง่ของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเท่าที่มีการศึกษา ส่วนที่สองเป็นทฤษฎีเกี่ยวกับตับและเมตาบอลิสม

ฝอยลม (Foi-lom) และ Usnic acid

ฝอยลม (Foi-lom)

ฝอยลมเป็นพืชจำพวก lichens ซึ่งเป็นพืชที่ประกอบด้วยการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (symbiotic association) นั่นคือ เชื้อรา (fungi) และ พืชจำพวกเห็ด (algae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Usnea siamensis* Wainio อยู่ในวงศ์ Usneaceae พืชในสกุล Usnea นี้เป็นกลุ่มของพืชที่มีสปีชีส์ (species) ประมาณ 18,000 สปีชีส์ พบได้ทั่วไปทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ทั่วโลก ทั้งในเขตขั้วโลกเหนือ (arctic) และ เขตร้อน (tropic) การพบพืชชนิดนี้ในหลายๆ สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน แสดงถึงความสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและสภาพอากาศได้เป็นอย่างดี มักพบว่าพืชชนิดนี้จะเจริญเติบโตช้าและจะต้องเกาะอยู่กับแหล่งอาศัยต่างๆ เช่น เกาะอยู่บนเปลือกต้นไม้ บนก้อนหิน หรือ บริเวณภูเขา อาจมีสีขาวหรือสีเขียวปนเทา แต่บางครั้งจะมีสีเหลือง เนื่องจากมีการสะสมของ carotenoid pigment

ลักษณะโดยทั่วไปของพืชชนิดนี้ จะมีลักษณะเป็นเส้น (strands) แขวนตัวลงมาจากกิ่งก้านสาขา (branches) ของต้นไม้ อาจเรียก old man's beard หรือ spanish mass (รูปที่ 1)



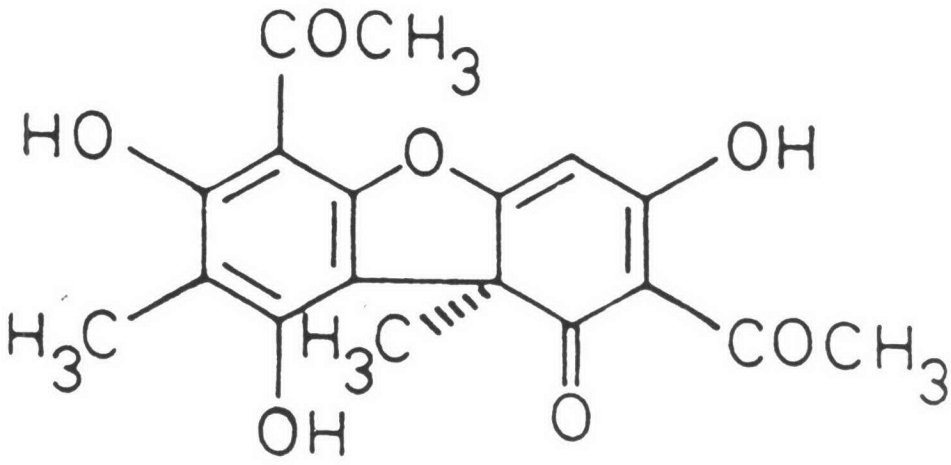
รูปที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปของฝอยลม (*Usnea siamensis* Wainio)

พืชในสกุลนี้ใช้เป็นยาพื้นบ้าน (folk medicine) มาตั้งแต่ A.D. 970 โดยใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียและเชื้อรา และฤทธิ์ในการต้านเนื้องอก ในแต่ละท้องถิ่นนำพืชสกุลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์แตกต่างกัน เช่น ในแถบยุโรปจะใช้ต้นของพืชชนิดนี้มาเป็นยาฝาดสมาน (astringent) ในประเทศมาเลเซียนำมาใช้เป็นยาทั้งภายในและภายนอก สำหรับใช้ภายใน คือ เป็นยารักษาโรคบิด (dysentry) และอาการท้องเดิน (diarrhoea) นอกจากนี้ยังนำมาต้มใช้ดื่มเป็นน้ำชาเพื่อรักษาไข้ที่ไม่ทราบสาเหตุ ส่วนในแง่ที่ใช้ภายนอก จะใช้ต้นฝอยลมผสมกับหัวหอม (onion), ตดหมูตดหมา (Paederia) และสะตอ (Parkia) ทาบริเวณท้องบรรเทาอาการปวดท้อง (stomachache) สำหรับในประเทศไทย มีปรากฏในตำราสมุนไพรล้านนาว่า การใช้ฝอยลมผสมกับรากส้มป่อย นำมาฝนกับน้ำปูนใสและใช้รับประทาน สามารถรักษามะเร็งได้ (นริศา คำแก่น, 2537 ; สิริวรรณ พฤกษ์อุดม, 2536 ; Bergerhausen, 1976)

จากการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในฝอยลม โดย รศ. ดร. นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าสารสำคัญส่วนใหญ่ในพืชชนิดนี้ คือ (+)-usnic acid

Usnic acid

Usnic acid (usninic acid, usnein หรือ usniacin) (รูปที่ 2) พบในพืชจำพวก lichens ชนิดต่างๆ ถึง 70 ชนิด มีชื่อทางเคมี 2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl 1,3 (2H,9bH)-dibenzofurandione ($C_{18}H_{16}O_7$) น้ำหนักโมเลกุล 344.31 ประกอบด้วย C = 62.79%, H = 4.68% และ O = 32.53% มีลักษณะเป็นปริสมสีเหลือง (yellow orthorhombic prisms) เป็นกรดชนิด monobasic ค่าการละลายที่ 25 °C (g/100 ml) ในน้ำ < 0.01, acetone 0.77, ethyl acetate 0.88, เอธิลอัลกอฮอล 0.02, methyl cellulose 0.22, ethyl cellosolve 0.32, furfural 7.32, furfural alcohol 1.2 ในรูปของเกลือ usnic acid จะสามารถละลายได้ดีแต่ไม่ค่อยคงตัว usnic acid จะละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นผลมาจากพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรง 3 พันธะในโมเลกุล (นริศา คำแก่น, 2537 ; Krishna and Venkataramana, 1992 ; Bergerhausen, 1976 ; Makoto et al., 1979)



รูปที่ 2 **แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ** (+)-usnic acid (2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy- 8,9b -dimethyl 1,3 (2H,9bH) - dibenzofurandione : $C_{18}H_{16}O_7$) (Krishna and Venkataramana, 1992 ; Luckner, 1990)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ usnic acid ที่ได้มีการศึกษา มีดังนี้

จากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของ usnic acid โดยอาศัยแนวทางการศึกษา in vitro พบว่า usnic acid ทั้งในรูป d(+), l(-) และเกลือ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และ *M. lufu* ที่ความเข้มข้น 8 μg/ml ดังนั้นระดับของ usnic acid ในพลาสม่า หรือ ระบบไหลเวียนในร่างกายควรจะต้องสูงกว่า 8 μg/ml จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในกระต่ายที่ได้รับ (+)-usnic acid ในรูปของสารละลายเกลือโซเดียมทางหลอดเลือดดำ 5 mg/kg จะมีระดับของ (+)-usnic acid ในระบบไหลเวียนเลือดสูงกว่า 8 μg/ml อยู่นาน 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการให้ทางปากขนาด 20 mg/kg จะสูงอยู่นานเกิน 48 ชั่วโมง การให้ (+)-usnic acid ทางปากจะมีค่า bioavailability ประมาณ 77.8% แต่ใช้เวลาค่อนข้างนาน (t_{max} > 12 ชั่วโมง) และมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนานกว่าการให้ทางหลอดเลือดดำ (ค่าครึ่งชีวิตการให้ทางปาก 18.9 ชั่วโมง : ค่าครึ่งชีวิตการให้ทางหลอดเลือดดำ 11.4 ชั่วโมง) สิ่งนี้อาจบ่งบอกให้ทราบถึง capacity-limited metabolism สำหรับค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ของการให้ (+)-usnic acid ทางหลอดเลือดดำ คือ $AUC_{0-\infty}$ 426.7 μg hr/ml, V_{ss} (volume of distribution) 163.3 ml/kg, MRT (mean residence time) 13.3 ชั่วโมง และ CL (clearance) 12.3 ml/hr/kg สำหรับการให้ทางปาก MRT 30.9 ชั่วโมง, AUC 1330.6 μg hr/ml, C_{max} 32.45 μg/ml และ t_{max} 16.6 ชั่วโมง (Krishna and Venkataramana, 1992)

ได้มีการศึกษาพบว่า usnic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียชนิดกรัมบวก (bacteriostatic and bactericidal effect) ในบางครั้งสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ, เชื้อ Candida และ Saccharomyces กลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งและทำลายจุลชีพคล้ายกับกลไกการออกฤทธิ์ของยา Aureomycin, Gramicidin และ Atabrin โดยการยับยั้งขบวนการ oxidative phosphorylation แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการใช้ออกซิเจน นั่นคือทำหน้าที่เป็น uncouple นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ของเซลล์แบคทีเรียและของเซลล์โฮส์ท (host) ต่อ usnic acid จากการทดลองได้ให้ usnic acid ในขนาดสูงๆ กับหนูถีบจักร ซึ่งสามารถทนต่อขนาดดังกล่าวได้ การซึมผ่านของ usnic acid เข้าเซลล์สัตว์ทดลองจะเกิดขึ้นได้น้อย ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ แบคทีเรียกรัมบวกจะตาย แสดงว่า usnic acid สามารถผ่านเข้าไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียได้ในความ

เข้มข้นที่ต่ำ ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นพื้นฐานในแง่ของความเฉพาะต่อการออกฤทธิ์ของ usnic acid และประโยชน์ในการนำมาใช้รักษาโรคทางคลีนิก (Bergerhausen, 1976 ; Johnson, Feldott and Lardy, 1950)

usnic acid ที่สกัดได้จาก *Usnea diffracta* สามารถบรรเทาความเจ็บปวด (analgesic effect) อันเนื่องมาจาก acetic acid (writhing test) และ tail pressure test ในหนูถีบจักรที่ได้รับ usnic acid 30 และ 100 mg/kg โดยการให้ทางปาก และสามารถลดอาการไข้สูงจากผลของ lipopolysaccharide (LPS) ในขนาด 100 และ 300 mg/kg (Okuyama et al., 1994)

usnic acid ได้มีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (cosmetics) และฤทธิ์ในการระงับกลิ่นกาย (deodorizing action) เนื่องจากความสามารถของ usnic acid ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียกรัมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียปกติในร่างกายมนุษย์ (normal flora) ที่ทำให้เกิดกลิ่นกาย โดยทำในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน usnic acid กับ triethanolamine ในช่วง pH ≥ 7.8-7.9 เพื่อแก้ไขปัญหาการละลายและความคงตัวของ usnic acid ทำให้ usnic acid ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนนี้ละลายได้ดีในน้ำ, เอธิลอัลกอฮอล, isopropyl alcohols, glycols, ไขมัน, น้ำมันหอมระเหย (essential oils) และตัวกระจายผิวหน้า (surfactants) มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกประมาณ 98% ทำลายเชื้อรา-ยีสต์ทุกชนิดประมาณ 99% (Anon, 1983 ; Bergerhausen, 1976)

มีการศึกษาผลของการแพ้แบบ delayed hypersensitivity ในคนไข้ที่ได้รับ usnic acid ต่อความสัมพันธ์กับสูตรโครงสร้างของสาร (stereoisomeric specificity) คนไข้ที่ได้รับ usnic acid ชนิด d-form และ racemic form ให้ผลบวก โดยจะเกิดอาการแพ้ทางผิวหนัง (contact dermatitis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบวมน้ำระหว่างเซลล์ของหนังกำพร้า (spongiosis) และ erythema ภาวะดังกล่าวนี้ไม่พบในคนไข้ที่ได้รับ usnic acid ชนิด l-form (Michell, 1966)

Kupchan และ Kopperman (1975) ได้พบฤทธิ์ของ (-)-usnic acid ซึ่งสกัดได้จาก *Cladonia leptoclada* ในการยับยั้ง lewis lung carcinoma โดยใช้ขนาดของสารในช่วง 20-200 mg/kg ซึ่งทำให้ช่วงชีวิตของหนูถีบจักรที่เป็นเนื้องอก (life span of tumored mice) เพิ่มขึ้น 35-52% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับ (-)-usnic acid โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบ

ในการพิจารณาความสามารถของสารต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง ซึ่งให้ค่า T/C 135-152% (สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งจะมีค่า T/C ≥ 125% : T-จำนวนสัตว์ที่รอดชีวิตในกลุ่มทดลอง, C-จำนวนสัตว์ที่รอดชีวิตในกลุ่มควบคุม) ฤทธิ์ในการต้านเนื้องอก (antitumor) ดังกล่าวมีฤทธิ์ปานกลาง ซึ่งนำไปสู่แนวทางในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ usnic acid ที่มีฤทธิ์ในการต้านเนื้องอกที่สูงขึ้น

การศึกษาผลของ (+)-usnic acid ต่อการกดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitodepressive potential) และผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (clastogenic potential) เพื่อประเมินความปลอดภัยก่อนนำมาใช้ทาง clinical trial พบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 100 และ 200 mg/kg ทางปาก จะมีการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ของ polychromatic erythrocytes เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง จะเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.001$ (+)-usnic acid มีผลต่อจำนวนโปรตีนและระดับของนิวคลีอิค แอซิด (nucleic acid) ในเซลล์ตับ คือ มีการลดลงของระดับ RNA ภายหลังได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 100 และ 200 mg/kg ไปแล้ว 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณโปรตีนมีการลดลงภายหลังผ่านไป 48 ชั่วโมงหลังการให้ (+)-usnic acid ทั้งสองขนาด แสดงว่า (+)-usnic acid อาจไปยับยั้ง translation process โดยรบกวนการสังเคราะห์ RNA หรือ อาจไปมีผลต่อโมเลกุลของ mRNA สำหรับผลการศึกษา (+)-usnic acid ต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม (clastogenic activity) โดยใช้เซลล์กระดูกขาอ่อนของหนูถีบจักร (femur cells) ปรากฏว่ามีการเพิ่ม micronucleus ของ polychromatic erythrocytes ภายหลังให้ (+)-usnic acid 100 และ 200 mg/kg ไปแล้ว 24 และ 48 ชั่วโมง แต่จะกลับสู่ภาวะปกติเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ DNA ในเซลล์ตับ ดังนั้นการเพิ่ม micronucleus ของ polychromatic erythrocytes โดยไม่มีผลต่อระดับของ DNA แสดงให้เห็นว่า (+)-usnic acid ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยอาจมีผลต่อ spindle apparatus (Al-Berkairi et al., 1991)

นอกจากนี้ยังพบว่า usnic acid มีฤทธิ์ต่อการหายใจของเซลล์ โดยมีการศึกษาใน washed rat kidney particles พบว่า usnic acid ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M จะยับยั้งการใช้ออกซิเจนเล็กน้อยเมื่อใช้ succinate, fumalate และ citrate เป็นสับสเตรท (substrate) แต่จะกระตุ้นการหายใจเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนมากขึ้นถ้าใช้ glutamate, α-ketoglutarate, malate,

pyruvate+fumalate หรือ cisaconitate เป็นสับสเตรท และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ usnic acid เป็น 10^{-4} M จะมีผลยับยั้งการหายใจ 50-90% ในทุกสับสเตรท (Johnson et al., 1950)

การศึกษาฤทธิ์ของ (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio ต่อขบวนการหายใจและ oxidative phosphorylation ของไมโตคอนเดรีย พบว่า (+)-usnic acid มีฤทธิ์สองอย่างต่อขบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย คือ จะกระตุ้นการใช้ออกซิเจนในขนาด 0.1-4 μg (0.15-6.0 μM) เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท และขนาด 0.1-3 μg (0.15-4.5 μM) เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท แต่ในขนาดที่มากกว่า 4.5 หรือ 6.0 μM จะยับยั้งการหายใจ นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย จึงกล่าวได้ว่า (+)-usnic acid มีฤทธิ์เป็น uncouple ของขบวนการ oxidative phosphorylation นั่นคือ มีฤทธิ์ทำให้เกิดการไม่ควบคู่กันของการออกซิไดซ์สับสเตรทกับการสังเคราะห์ ATP กระตุ้นการออกซิไดซ์สับสเตรทเพิ่มขึ้น แต่ขณะเดียวกันก็เพิ่มการสลายของ ATP มากขึ้นเช่นกัน โดยกระตุ้น ATPase activity ทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง ซึ่ง ATP เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเซลล์ เช่น ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อทุกชนิด ดังนั้นการลดลงของ ATP ภายในเซลล์ที่เกิดจากฤทธิ์ของ (+)-usnic acid จะส่งผลให้กิจกรรม (activity) ต่างๆ ลดลงไปด้วย มีการคลายตัวของกล้ามเนื้อต่างๆ เช่น ที่ลำไส้ ทำให้แก้ไขอาการท้องเสียได้ นอกจากนี้ปริมาณ ATP ที่ลดลงอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียได้ ซึ่งเป็นข้อมูลสนับสนุนการแพทย์แผนโบราณที่ใช้สมุนไพรในสกุล Usnea มาใช้รักษาโรคบิด, แก้อาการท้องเสีย ตลอดจนใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียและต้านการอักเสบ (สิริวรรณ พฤกษ์อุดม, 2536)

มีสิ่งที่น่าสนใจ ก็คือ ความเป็นพิษจากฤทธิ์ uncoupling ที่อาจเกิดขึ้นได้ จากการทดลอง in vitro ของ (+)-usnic acid ในขนาดสูงกว่า 4 μg (6.0 μM) มีผลรบกวนการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์กาเนลล์ (organelle) ที่สำคัญ เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ กล่าวคือ การออกฤทธิ์ของ (+)-usnic acid อาจจะก่อให้เกิดทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์และอาจทำให้มีประโยชน์ทางเภสัชวิทยาเมื่อมีการปรับขนาดที่ใช้ให้เหมาะสม (สิริวรรณ พฤกษ์อุดม, 2536)

ในการศึกษาความเป็นพิษของ usnic acid ได้ทำการทดสอบครั้งแรกในปี 1936 มีค่า LD_{50} ในหนูถีบจักร 700 mg/kg เมื่อฉีด usnic acid เข้าใต้ผิวหนัง และ 25 mg/kg เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ค่า LD_{50} ในหนูขาวและกระต่าย 30 mg/kg เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ในสุนัขให้

usnic acid ทางหลอดเลือดดำค่า LD_{50} 40 mg/kg (Bergerhausen, 1976)

การศึกษาผลของ (+)-usnic acid ต่อการเหนี่ยวนำ (induction) cytochrome P450 3A, 2E และ 1A ในหนูถีบจักร โดยการทดสอบผลของ (+)-usnic acid ต่อ ethylmorphine N-demethylation (catalytic marker สำหรับ CYP 3A), aniline hydroxylation (catalytic marker สำหรับ CYP 2E), และ benzopyrene-hydroxylation (catalytic marker สำหรับ CYP 1A) พบว่า (+)-usnic acid ทำให้ค่า activity ของ ethylmorphine demethylase สูงกว่ากลุ่มควบคุม ประมาณ 1.6, 3.9, 7.2 และ 9.2 เท่า ในความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.20% ของ (+)-usnic acid ในอาหาร แต่มีผลเพิ่ม aniline hydroxylase activity ค่อนข้างน้อยเพียง 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20% ของ (+)-usnic acid ในอาหาร ผลต่อการเพิ่ม benzopyrene-hydroxylase activity ก็ทำนองเดียวกับ aniline hydroxylase activity คือ ประมาณ 1.3, 1.5, 2.0 และ 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้นของ (+)-usnic acid 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.20% ในอาหาร (Gilbert, Mannering and Janice, 1994)

ฝอยลมเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อบำบัดอาการเจ็บป่วยมาเป็นเวลานาน มีสารสำคัญซึ่งให้ฤทธิ์ในการรักษา คือ (+)-usnic acid จากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่า (+)-usnic acid อาจทำให้เกิดพิษจากฤทธิ์ uncoupling ต่อไมโตคอนเดรียในเซลล์ตับของหนูขาว หรือ อาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยมีผลต่อ RNA หรือ spindle appalatus นอกจากนี้ (+)-usnic acid ยังมีผลเหนี่ยวนำ CYP 3A, 2E และ 1A ในหนูถีบจักร จากผลดังกล่าวสามารถเป็นแนวทางในการวิจัยความเป็นพิษต่อตับของ (+)-usnic acid จากฝอยลมและการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 isoenzymes ซึ่งข้อมูลการศึกษาทางด้านนี้ค่อนข้างมีน้อยและตับยังเป็นอวัยวะที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์

ตับและขบวนการเมตาบอลิสมของตับ

ตับ

การศึกษาเมตาบอลิสมและพิษจากเมตาบอลิสม อวัยวะที่มีความสำคัญและเป็นเป้าหมายของการเกิดพิษ ก็คือ ตับ ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของร่างกายและจำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ตับมีลักษณะรูปร่างคล้ายลิ่ม น้ำหนักประมาณ 1,200-1,500 กรัม ตำแหน่งที่อยู่ใต้กระบังลมด้านขวา แบ่งออกเป็น 2 พูใหญ่ (lobe) ซ้าย-ขวา โดยมี falciform ligament เป็นตัวยึดติดกับกระบังลมและผนังหน้าท้องทางด้านใน

ตับมีหน้าที่ที่สำคัญ คือ การสร้างและการหลั่งน้ำดีเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารเพื่อช่วยย่อยอาหารจำพวกไขมัน ช่วยเก็บสะสมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรทไว้ในรูปของไกลโคเจน เป็นคลังสะสมไขมันซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น cholesterol ในการเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการสังเคราะห์สารอาหารจำพวกโปรตีนและสารสำคัญหลายชนิด เช่น heparin, fibrinogen, plasma protein, angiotensinogen และ antitoxin รวมทั้งตับยังมีหน้าที่ช่วยทำลายพิษ (detoxification) อีกด้วย ดังนั้นหากร่างกายได้รับสารที่มีพิษต่อตับ ก็จะมีผลทำให้หน้าที่และการทำงานของตับเสียไป นำไปสู่การเกิดโรคของตับหรือโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529 ; เติมชัย ไชยนุวัติ, 2538 และ เพ็ญโฉม พึ่งวิชา, ยุวดี วงษ์กระจ่าง และ สุจิตรา ทองประดิษฐโชติ, 2538)

ตับมีเลือดมาเลี้ยง 2 เส้นเลือดใหญ่ๆ คือ portal vein และ hepatic artery

- portal vein เป็นเลือดที่มาจากลำไส้ทั้งหมดและม้าม จะเป็นเส้นเลือดที่มีปริมาณของอาหารสูงและนำเลือดเข้าสู่ตับประมาณ 70%

- hepatic artery เป็นเส้นเลือดที่มาจาก coeliac axis ซึ่งมีออกซิเจนปริมาณสูงและนำเลือดเข้าสู่ตับประมาณ 30%

portal vein จะนำเลือดที่มีสารอาหาร ซึ่งดูดซึมจากทางเดินอาหารสู่ตับพร้อมกับ hepatic artery ผ่านเข้าสู่ central vein จะระบายสู่หลอดเลือด hepatic vein แล้วเปิดสู่ inferior vena

cava และเข้าหัวใจห้องบนขวา (วัชราภรณ์ ปัชชามาตย์, 2539 ; เติมชัย ไชยนุวัติ, 2538 และ เพ็ญโฉม พึ่งวิชา และคณะ, 2538)

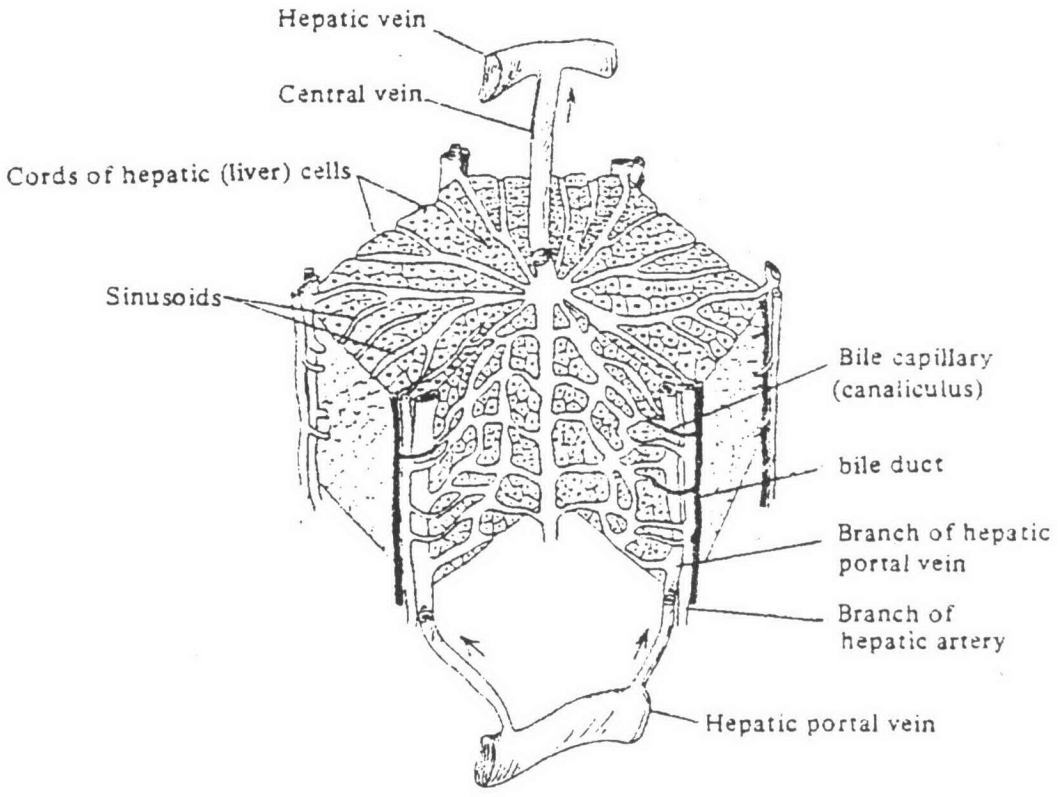
โครงสร้างของตับแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ (รูปที่ 3)

1. Structural unit หรือ classic lobule : ตับส่วนนี้เป็น hepatic lobule มีโครงสร้างประกอบด้วย central vein อยู่ตรงกลางกับ hepatic cells ที่เรียงตัวเป็นรัศมีออกไปจาก central vein ในลักษณะของแท่งเซลล์ที่เรียกว่า hepatic cord ระหว่าง cord จะเป็นแอ่งเลือดเล็กๆ เรียกว่า sinusoid ระหว่าง hepatic cells มีท่อเล็กๆ แทรกอยู่เรียกว่า bile canaliculi ซึ่งนำน้ำดีที่สร้างจากเซลล์ของตับออกไปจากตับ

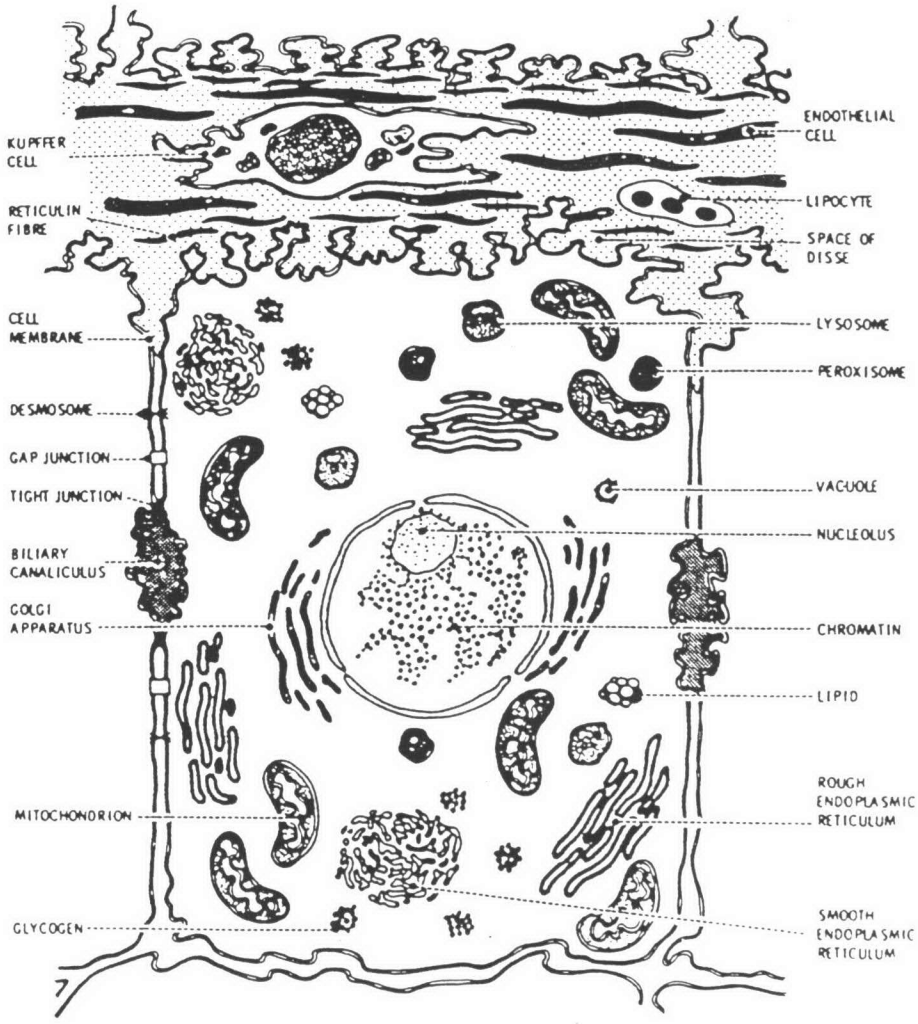
2. Functional unit หรือ portal lobule : บริเวณที่มีรูปลักษณะเป็นสามเหลี่ยมที่เกิดจาก hepatic lobules 3 อัน ที่อยู่ใกล้เคียงกัน บริเวณสามเหลี่ยมนี้มีจุดศูนย์กลางเรียกว่า portal canal หรือ portal area ซึ่งจะมีแขนงของ hepatic artery, portal vein และ bile duct โดยที่เป็นศูนย์กลางของ functional unit เพราะทั้ง hepatic artery และ portal vein ที่เข้าสู่ตับนั้น จะเข้ามาทางขั้วตับและแตกแขนงเข้าสู่เนื้อตับ ส่วน bile duct จะรับน้ำดีจาก canaliculi จากเซลล์ตับเพื่อรวบรวมกันเป็น hepatic duct นำน้ำดีไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี

3. Liver acinus : เป็น functional unit ที่เล็กที่สุด รูปร่างเป็นวงรีหรือไม่แน่นอน ประกอบด้วย central veins อย่างน้อย 2 อัน, hepatic cords ระหว่าง central veins จนถึง portal triad (เพ็ญโฉม พึ่งวิชา และคณะ, 2538)

ตับประกอบด้วยเซลล์ตับ (hepatocytes หรือ parenchymal cells) จำนวนมาก ประมาณ 70% ของเซลล์ทั้งหมด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 μm ภายในประกอบด้วย nucleus, nucleolus, smooth & rough endoplasmic reticulum (SER, RER), golgi complex, lysosome, mitochondria และ granule สำหรับสะสมสารต่างๆ (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของตับ (เพ็ญโฉม พึ่งวิชา และคณะ, 2538)



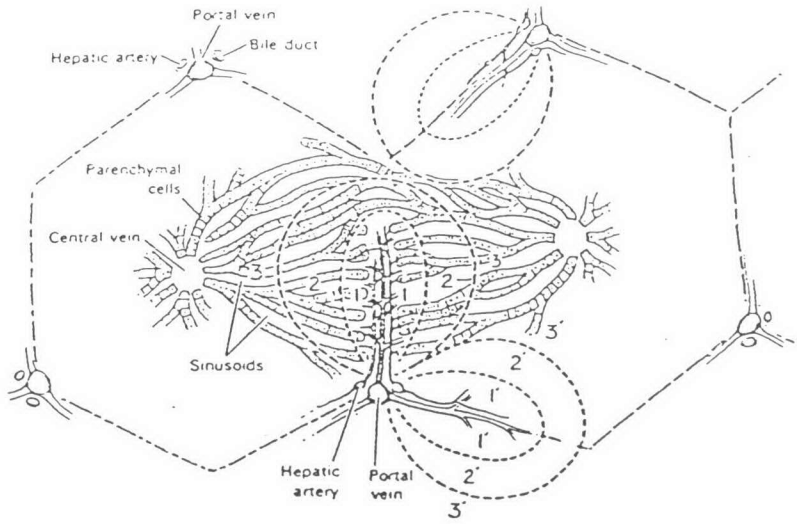
รูปที่ 4 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ตับ (Sherlock and Dooley, 1993)

เซลล์ตับแบ่งได้เป็น 3 โซน เพื่อประโยชน์ทางเภสัชวิทยาของเซลล์ตับ โดยยึดระยะห่างระหว่างหลอดเลือดเป็นหลัก ดังนี้ (รูปที่ 5)

1. เซลล์ที่อยู่ในโซนที่ 1 (zone 1) : periportal area คือ เซลล์ที่อยู่รอบๆ portal vein เป็นเซลล์กลุ่มแรกที่ได้รับเลือดและเกิดการ regeneration ภายหลังเกิดอันตรายต่อตับ แต่จะเป็นเซลล์กลุ่มสุดท้ายที่จะเกิด necrosis

2. เซลล์ที่อยู่ในโซนที่ 2 (zone 2) : midzone คือ เซลล์ที่อยู่ระหว่าง periportal area กับ centrilobular area

3. เซลล์ที่อยู่ในโซนที่ 3 (zone 3) : centrilobular area คือ เซลล์ที่อยู่รอบๆ central vein เป็นเซลล์ที่อยู่ใกล้ทางออกของหลอดเลือดที่ออกจากตับ (เพ็ญโฉม พึ่งวิชา, 2538 และ อุชุจิตรา เกียรติวีระสกุล, 2538)



รูปที่ 5 แสดงเส้นเลือดที่มาเลี้ยงตับและการแบ่งโซนของ liver acinus (Rappaport, 1956)

ขบวนการเมตาบอลิสมของตับ

เมตาบอลิสม (metabolism) มาจากคำภาษากรีก แปลว่า mutation หรือ transformation ซึ่งเป็นขบวนการทางชีววิทยา (biological process) ในการเปลี่ยนแปลงสารทั้งจากภายในและที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย (endogenous and exogenous substances) โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นภายในร่างกาย ทำให้คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และ/หรือโครงสร้างของสารดังกล่าวถูกปรับเปลี่ยน

drug metabolism เป็นขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารที่ได้รับจากภายนอก (xenobiotics) ทั้งสารจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ ซึ่งสารส่วนใหญ่จะเป็นโมเลกุลที่ละลายในไขมันและไม่แตกตัว โดยมนุษย์หรือสัตว์ได้รับสารนั้นเพื่อใช้ในการรักษา ทำให้สารดังกล่าวถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยกว่า parent drug ละลายน้ำได้มากขึ้นหรือมีขั้ว (polar) เพื่อง่ายต่อการกำจัดหรือขับออกจากร่างกายโดยผ่านทางน้ำดีและ/หรือทางไต ซึ่งถือเป็นขบวนการ detoxification แต่ในบางครั้งเมตาบอไลท์ที่ได้อาจมีฤทธิ์หรือพิษมากขึ้น ทำให้เกิดพิษจากสารเคมีนั้นๆ นั่นคือขบวนการ toxification

ขบวนการ drug metabolism จะเป็นแบบ biphasic แบ่งเป็น ปฏิกริยาเฟส 1 และเฟส 2 (phase I and phase II reactions) ดังนี้

- ปฏิกริยาเฟส 1 ประกอบด้วยปฏิกริยาออกซิเดชั่น, รีดักชั่น และไฮโดรไลซีส เป็นต้น เป็นการเปลี่ยนแปลง functional group ภายในโมเลกุลของสารให้อยู่ในรูปที่มีขั้ว เช่น -OH, -COOH, $-NH_2$, -SH และพร้อมที่จะถูกขับออกจากร่างกาย หรือเป็นการเตรียมสับสเตรทสำหรับการเกิดปฏิกริยาเฟส 2 การดำเนินไปของปฏิกริยาจะอาศัยระบบเอ็นไซม์ที่มีอยู่ใน SER หรือ microsomal fraction ของเซลล์ตับ

ปฏิกริยาออกซิเดชั่น จะอาศัยเอ็นไซม์จาก microsome, NADPH และโมเลกุลออกซิเจนเข้าเป็นระบบของ mixed function oxidase (MFO) ปฏิกริยาส่วนใหญ่จะถูก catalyse ด้วย MFO ที่มี cytochrome P450 ซึ่งฝังตัวอยู่ที่ microsomal membrane cytochrome P450 เป็น superfamily มีหลาย isozymes เนื่องจากมีความแตกต่างในการจัดลำดับ (sequences) ของกรดอะมิโนในสายโปรตีน

ปฏิกริยาออกซิเดชั่นที่พบ เช่น การเกิดออกซิเดชั่นของ aromatic rings, alkyl chains, dealkylation, N-oxidation, sulphoxidation และ epoxidation การเกิดออกซิเดชั่นของ aromatic rings มักจะเป็น hydroxylation พบได้ส่วนใหญ่ของ xenobiotics และก่อให้เกิด phenols ส่วนการออกซิเดชั่นของ alkyl chains จะทำให้เกิดอัลกอฮอล์ ปฏิกริยาที่ค่อนข้างสำคัญทางคลีนิก คือ epoxidation ซึ่งจะเกิดกับสารประกอบ aromatic ส่งผลให้ได้ reactive intermediates

• ปฏิกริยาเฟส 2 หรือปฏิกริยา conjugation เป็นปฏิกริยาสังเคราะห์ คือ การที่สารจากภายนอกร่างกาย (xenobiotics) ได้ conjugate กับโมเลกุลของสารภายในร่างกาย (endogenous molecules) แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น conjugates ดังนั้นการเกิด conjugation ของยาหรือเมตาโบไลท์ของยา ซึ่งมี functional group ที่เหมาะสมภายในโมเลกุล (-OH, -COOH, $-NH_2$, -SH) ไปจับรวมกับสารภายในร่างกาย (เช่น glucuronic acid, glutathione, acetyl group, glycine, taurine หรือ glucosamine) เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีขั้วมากขึ้นหรือละลายน้ำได้ ทำให้ถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดีหรือปัสสาวะ ซึ่งเป็นปฏิกริยาในการทำให้สารนั้นหมดฤทธิ์ (detoxification) (Morselli, 1995 ; Meyer, 1996)

Microsome

microsome คือ ส่วนของ endoplasmic reticulum (ER) ที่ทำให้แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยเอ็นไซม์ซึ่งอยู่ที่ membrane ยังคงมี activity อยู่ สำหรับ ER นั้นเป็น sub-cellular organelles มีลักษณะเป็นผนังของ lipoprotein ที่สานกันเป็นตาข่ายยื่นออกมาจากผนังเซลล์เข้าไปอยู่ใน cytoplasm มีความหนาของ membrane 50-80 A° ในปริมาตรของเซลล์ตับทั้งหมดจะมี ER เป็นองค์ประกอบ 15% ER ของเซลล์ตับหนึ่งเซลล์มีไรโบโซม (ribosome) เกาะติดอยู่ประมาณ 13×10^6 พื้นที่ผิวของ ER จะมากกว่า plasma membrane 37 เท่า ER ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 19%, phospholipid 48% และ RNA 58% นอกจากนี้ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยยาหลายชนิด เช่น phenobarbitone ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโปรตีนและ phospholipid

ER เป็นออร์กาเนลล์ที่มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ albumin, fibrinogen, พลาสม่าโปรตีนอื่นๆ ; การสังเคราะห์ cholesterol และ bile acids ; การ conjugation ของ bilirubin,

ยาและสเตียรอยด์ก่อนขับออกทางน้ำดี ; มีส่วนร่วมในขบวนการเมตาบอลิสมของปฏิกริยาออกซิเดชั่นในยาและสเตียรอยด์ ; มีส่วนร่วมในการเกิด esterification ของกรดไขมันเป็น triglycerides รวมทั้งมีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมระดับแคลเซี่ยมภายในเซลล์

ER มีอยู่ด้วยกันสองแบบ คือ RER (rough ER) และ SER (smooth ER) RER ต่างจาก SER ตรงที่มีไรโบโซมเกาะอยู่เต็ม ทำให้มันมีหน้าที่สร้างโปรตีน ในที่นี้ คือ mixed function oxidase (MFO) เมื่อ RER อิ่มตัวด้วยเอ็นไซม์ที่สร้างขึ้น ไรโบโซมก็จะหลุดออก ทำให้ RER กลายเป็น SER ดังนั้นสมรรถนะของเอ็นไซม์ใน SER จึงสูงกว่า RER

องค์ประกอบของ Mixed function oxidase system

ในการศึกษาปฏิกริยาเมตาบอลิสมของยาส่วนใหญ่ (xenobiotics) จะเป็นปฏิกริยาออกซิเดชั่นที่ถูกกระตุ้นด้วย MFO โดย cytochrome P450 กระตุ้นให้เกิดการ hydroxylation ของยาและสารเคมีต่างๆ เป็นจำนวนมาก ดังสมการ (stoichiometry)

$$NADPH + H^+ + O_2 + RH \longrightarrow NADP^+ + H_2O + ROH$$

RH : oxidisable drug substrate

ROH : hydroxylated metabolite

MFO system ประกอบด้วย cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase และ lipid

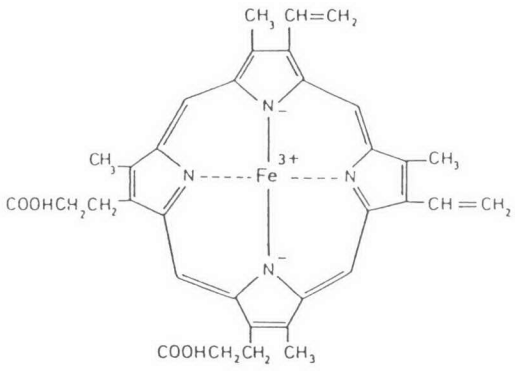
1. Cytochrome P450 เป็นองค์ประกอบสุดท้ายของ MFO ในการส่งผ่านอิเล็คตรอนของ ER เมื่อเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นของยาหรือสารเคมี cytochrome P450 เป็นเอ็นไซม์ที่มี haem เป็นส่วนประกอบ (haemoprotein) ซึ่งมี iron protoporphyrin IX เป็น prosthetic group การจับของ haem กับ apoprotein จะเป็นแบบ non-covalent (รูปที่ 6)

การเรียกชื่อว่า cytochrome P450 ก็เนื่องจาก cytochrome (pigment) ถูกรีดิวซ์และเกิด complex กับคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) แล้วสามารถดูดกลืนแสงได้มากสุดที่ 450 nm

ในส่วนของ haemoprotein จะเป็นตำแหน่งที่ออกซิเจนและสับสเตรทเข้าจับเมื่อเกิดปฏิกริยาโดย MFO และเชื่อมต่อกับ flavoprotein reductase เพื่อเกิดเป็นวงจรออกซิเดชั่น-รีดักชั่นของ haem-iron

cytochrome P450 ประกอบด้วย isoenzymes (multiple forms) ที่ฝังตัวอยู่ในผนัง ER จากการตั้งชื่อที่เป็นสากล ทำให้สามารถแบ่ง cytochrome P450 ออกเป็น gene families และ gene sub-families โดยที่ cytochrome P450 sequences ใน gene families เดียวกัน จะเหมือนกันประมาณ 40% จาก gene families จะถูกแบ่งเป็น gene sub-families ซึ่งมีความเหมือนกันของ sequences ประมาณ 70%

จากการศึกษา cytochrome P450 ในคนพบว่า cytochrome P450 ที่เมตาบอลิสมยาส่วนใหญ่ในร่างกาย คือ cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1), 2C9, 2D6 และ 3A4 ซึ่งถือเป็นเอ็นไซม์กลุ่มใหญ่ของคน (ประมาณ 50% ของ cytochrome P450 ทั้งหมด) โดยต้องคำนึงถึงความแตกต่างของตัวบุคคล (inter-individual variation)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้าง ferric protoporphyrin IX และ prosthetic group ของ cytochrome P450 (Gibson and Skett, 1994)

2. NADPH-cytochrome P450 reductase เป็น flavoprotein enzyme ในหนึ่งโมลประกอบด้วยหนึ่งโมลของ flavin adenine dinucleotide (FAD) และหนึ่งโมลของ flavin

mononucleotide (FMN) มีมวลโมเลกุลประมาณ 78,000 Da โดยทำหน้าที่ส่งผ่าน reducing equivalents จาก NADPH + H^+ ไปยัง cytochrome P450 ดังนี้

$$NADPH + H^+ \rightarrow (FAD \xrightarrow{\text{NADPH- cytochrome P450 reductase}} FMN) \rightarrow \text{cytochrome P450}$$

NADPH + H^+ จะเป็นตัวให้สองอิเล็คตรอนในขณะที่ cytochrome P450 เพียงตัวเดียวรับสองอิเล็คตรอน ดังนั้น NADPH- cytochrome P450 reductase จึงทำตัวเป็น "transducer" ของ reducing equivalents

3. Lipid ในที่นี้ คือ phosphatidylcholine เป็น phospholipid พบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำงานของส่วนประกอบใน MFO activity หน้าที่ของ lipid นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกี่ยวข้องกับการจับของสับสเตรท ช่วยเสริมการส่งผ่านอิเล็คตรอน หรือให้ template สำหรับเวลาที่โมเลกุลของ cytochrome P450 และ NADPH- cytochrome P450 reductase กระทำต่อกัน

กลไกการทำงานของ Cytochrome P450

cytochrome P450 เป็นตำแหน่งที่ทั้งสับสเตรทและออกซิเจนเข้าจับในขบวนการเกิดปฏิกริยาโดย MFO ซึ่งกลไกการทำงานของ cytochrome P450 ที่น่าจะเป็นไปได้ในปฏิกริยาดังกล่าว อาจสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้ (รูปที่ 7)

ขั้นตอนที่ 1 : เป็นการจับของสับสเตรทเข้ากับ oxidised form ของ cytochrome P450 (ferric, Fe^{3+}) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นเร็วมากโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยอิเล็คตรอนจาก NADPH

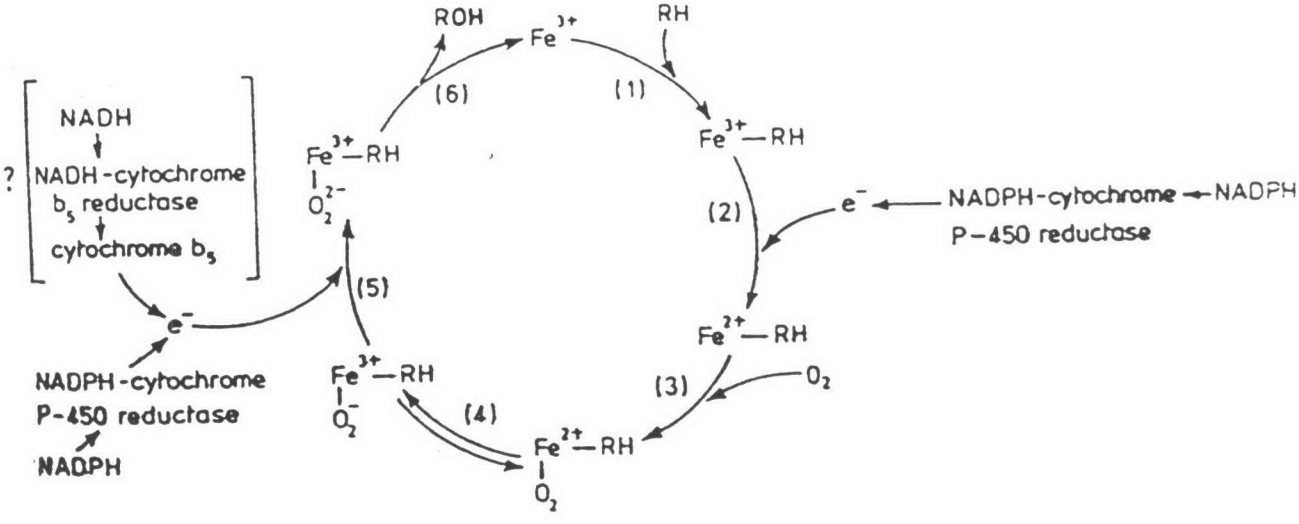
ขั้นตอนที่ 2 : การเกิดรีดักชั่นอิเล็คตรอนตัวแรกของสับสเตรทที่จับอยู่กับ ferric cytochrome P450 (Fe^{3+}) ทำให้ได้ ferrous form (Fe^{2+}) ของ cytochrome P450 ซึ่ง reducing equivalent นี้ได้มาจาก NADPH + H^+ ส่งผ่านมาทาง flavoprotein หรือ NADPH- cytochrome P450 reductase (รูปที่ 8)

ขั้นตอนที่ 3 : เกี่ยวข้องกับการเข้าจับของโมเลกุลออกซิเจนกับ binary ferrous (Fe^{2+}) cytochrome P450-substrate adduct ได้ ternary complex

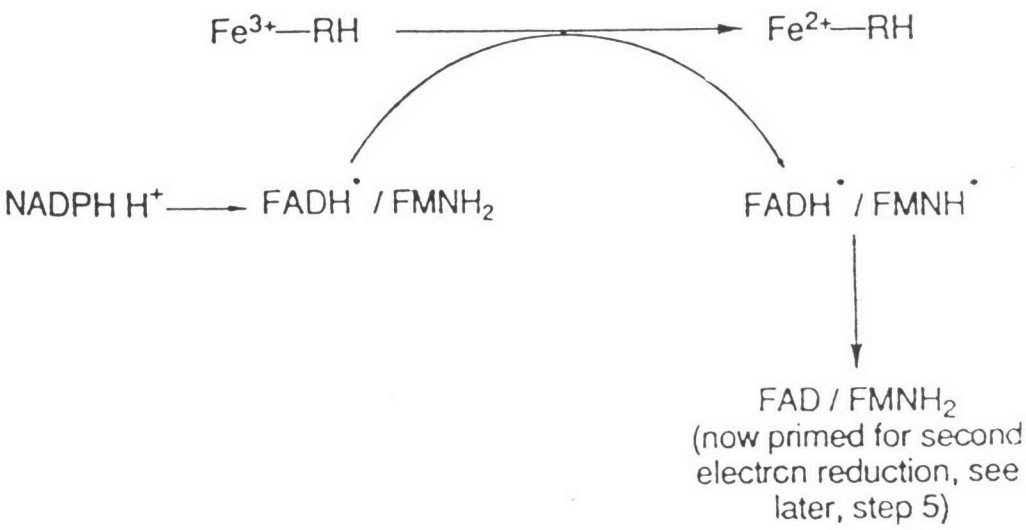
ขั้นตอนที่ 4 : เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของอิเล็คตรอนภายในโมเลกุลของ complex กลายเป็น superoxide radical จับอยู่กับ oxidised cytochrome P450-substrate complex

ขั้นตอนที่ 5 : ได้รับอิเล็คตรอนตัวที่สองจาก NADPH- cytochrome P450 reductase แต่บางครั้งอาจได้จาก cytochrome b_5

ขั้นตอนที่ 6 : เป็นการเติมหนึ่งอะตอมของออกซิเจนที่จับอยู่กับ cytochrome P450 ให้กับสับสเตรทได้ hydroxylated substrate และอีกหนึ่งอะตอมถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ ในที่สุดจะได้ oxidised form ของ cytochrome P450 กลับมาเหมือนเดิม (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529 ; Gibson andSkett, 1994 and Mahendale, 1987)



รูปที่ 7 แสดง catalytic cycle ของ cytochrome P450 (RH : drug substrate, ROH : hydroxylated metabolite) (Gibson and Skett, 1994)



รูปที่ 8 แสดงบทบาทของ flavins ต่อการส่งผ่านอิเล็คตรอนของ cytochrome P450 (Gibson and Skett, 1994)

กลไกการเกิดพิษต่อตับ

ในการดำรงชีวิตของคนเราในปัจจุบันนี้ วันหนึ่งๆ เราต้องสัมผัส กิน สูดดม หรือรับเอาสารต่างๆ (ทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมเข้าไปเป็นจำนวนมาก ตับนับเป็นอวัยวะแรกที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้ โดยอาศัยเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในตับเป็นจำนวนมากทำการเปลี่ยนแปลงสารเหล่านี้ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีพิษ หรือบางครั้งอาจได้สารที่ก่อให้เกิดพิษต่อตับ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสารนั้นๆ และระยะเวลาที่ได้รับ จะเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของเซลล์ตับในการกลับสู่สภาพเดิม (regeneration)

การประเมินรูปร่างลักษณะ (morphological assessment) ของเซลล์ตับที่ได้รับอันตรายอย่างเฉียบพลัน (acute injury) สามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. ในกรณีที่อันตรายนั้นมีความรุนแรงน้อย จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่สามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible change) เรียกว่า degeneration เป็นการเสื่อมของเซลล์ตับที่นำมาก่อนการเกิด cell death เช่น cloudy swelling, hydropic degeneration, vacuolar degeneration และ fatty degeneration เป็นต้น

2. ในกรณีที่อันตรายนั้นมีความรุนแรงมาก จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่ไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ (irreversible change) เซลล์จะมีการสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมเซลล์ เรียกระยะนี้ว่า cell death

3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังสมดุลระหว่างเซลล์ที่ตายกับของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ เรียกว่า prenecrotic change

4. การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นภายหลัง cell death เรียก cell necrosis มีหลายชนิด เช่น coagulative necrosis, enzymatic fat necrosis เป็นต้น (สุพิศ จึงพาณิชย์ และชีพสุมน สุทธิพินทะวังค์, 2524 ; อุชุจิตรา เกียรติวีระสกุล, 2538 ; Kepple and Proper, 1986)

การเกิดพิษต่อตับส่วนใหญ่ จะมีลักษณะเป็น fatty liver และ liver necrosis โดยที่กลไกการเกิดพิษต่อตับของสารต่างๆ มีดังนี้

Liposes

liposes หรือ fatty liver หรือ steatosis หมายถึง สภาวะที่ตับมีปริมาณไขมันมากกว่า 5% โดยน้ำหนัก หรือเกิดการสะสมของไขมันในตับ (โดยปกติจะมีไขมันอยู่ในตับประมาณ 5 กรัม ต่อน้ำหนักตับ 100 กรัม) ส่วนใหญ่ของไขมันที่สะสมประกอบด้วย triglycerides และกรดไขมัน ซึ่งกลไกที่ทำให้เกิดภาวะดังกล่าวมีอยู่ 6 กลไกด้วยกัน คือ

1) เพิ่มการสังเคราะห์ triglycerides
2) ลดการปล่อย (release) ของ triglycerides จากตับไปยังกระแสเลือด
3) การสังเคราะห์ triglycerides อาจถูกแบ่งเป็น nonsecretory pool หรือ slow-secreting pool
4) การรวมกันของอัตราการสังเคราะห์ที่เพิ่มขึ้นและการปล่อยที่ลดลงของ triglycerides และกรดไขมัน
5) เพิ่มแหล่ง supply ของกรดไขมัน
6) ลดการสังเคราะห์ glycoproteins

triglyceride cycle เป็นวงจรปกติของ triglyceride กรดไขมันอิสระที่จับอยู่กับอัลบูมิน ถูกนำออกจากเนื้อเยื่อของไขมันเข้าสู่เลือดที่มายังตับ เพื่อถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยปฏิกริยาออกซิเดชั่นหรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ triglyceride ซึ่งจะไปรวมตัวกับ phospholipid, cholesterol, cholesterol ester และคาร์โบไฮเดรต จากนั้นจะจับกับตัวพาที่เป็น globulin ได้สารใหม่ เรียกว่า very low density lipoprotein (VLDL) ก็คือ triglyceride ที่ตับหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีกลไกช่วยสร้าง VLDL โดยการนำเอา apoprotein ที่ช่วยในการสร้าง VLDL กลับมาใช้ใหม่ (รูปที่ 9)

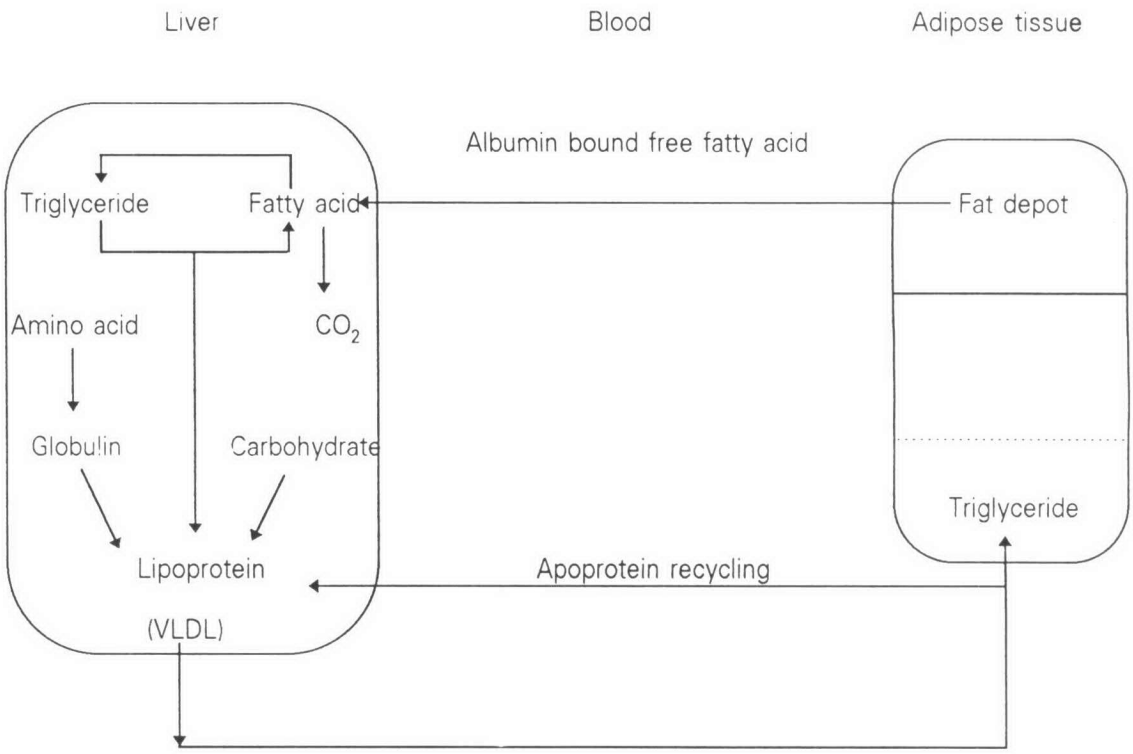
การเกิด liposes เป็นผลที่เกิดขึ้นโดยผ่านทางการเปลี่ยนแปลงกลไกการลำเลียง, การสังเคราะห์ หรือ catabolic บางกรณีสามารถเกิดขึ้นทางอ้อมผ่านทางการเปลี่ยนแปลงกลไกที่

อาศัยฮอร์โมนในการควบคุม (hormonal regulating mechanisms) สารพิษสามารถไปเปลี่ยนแปลงขบวนการเคลื่อนที่ของไขมันในร่างกาย (body-fat mobilization) ซึ่งถูกควบคุมโดย catecholamine ส่งผลให้เกิดการเพิ่มของกรดไขมัน การเพิ่มของกรดไขมันและ glycerol phosphate จะทำให้เพิ่มการสังเคราะห์และการสะสมของ triglyceride ในตับ ซึ่งพบได้ในพิษที่เกิดจากเอธิลอัลกอฮอล์ ขบวนการเมตาบอลิสมของอัลกอฮอล์โดยอาศัยเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ส่งผลเพิ่ม NADPH และ acetyl fragments ซึ่งเป็นตัวช่วยให้มีการเพิ่มของกรดไขมัน แต่ในทางกลับกันการผลิต reducing equivalents อาจมีผลยับยั้งประโยชน์ของ acetyl fragments ทำให้ระงับการต่อสาย (elongation) ของกรดไขมัน ดังนั้นการได้รับอัลกอฮอล์จะก่อให้เกิดผล 2 ลักษณะด้วยกัน คือ ลดการออกซิเดชั่นของกรดไขมัน และเพิ่มการสังเคราะห์ของกรดไขมัน

การสะสมของไขมันในตับเนื่องจากพิษของคาร์บอนเตตระคลอไรด์(CCl_4), ethionine และฟอสฟอรัส จะไปมีผลลดการปล่อย triglyceride ในรูปของ lipoprotein ออกจากตับไปยังกระแสเลือด โดยทำให้เกิดความผิดปกติของขบวนการเมตาบอลิสมและสูญเสียการสังเคราะห์ lipoprotein CCl_4 และ ethionine จะไปลดระดับของ VLDL ในระบบไหลเวียนโดยมีความบกพร่องของการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน VLDL และเกี่ยวข้องกับการลำเลียง triglyceride ในตับออกไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ ethionine และฟอสฟอรัส ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสังเคราะห์ lipoprotein การขาด choline ทำให้สูญเสียการสังคราะห์ phospholipid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ VLDL และเกิดภาวะ fatty liver ได้ เนื่องจากสูญเสียการหลั่งของ VLDL ออกจากตับ ซึ่งภาวะเช่นนี้ก็พบได้ใน orotic acid เช่นกัน การขาดการสังเคราะห์ apoprotein ของ VLDL สำหรับใช้ในการนำ triglyceride ออกจากตับจะทำให้เกิด fatty liver อันเป็นผลมาจากพิษของ ethionine นอกจากนี้ทั้ง orotic acid และ ethionine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการขาด ATP ซึ่งจำเป็นต่อขบวนการต่างๆ ภายในตับและนำไปสู่การสะสมของไขมันในตับ

การสะสมไขมันในตับเนื่องจาก CCl_4 พบว่า protective agents ไม่สามารถป้องกันภาวะดังกล่าว แต่ป้องกันการตายของเซลล์ตับได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิด liposes ไม่ใช่สิ่งจำเป็นที่บ่งบอกถึงเนื้อเยื่อของตับถูกทำลาย เพียงแต่ metabolic pathways ได้เปลี่ยนแปลงไปจากภาวะปกติเนื่องจากสารพิษ และเป็นสัญญาณเตือนว่าภาวะนี้มีความเสี่ยงสูงที่เนื้อเยื่อของตับจะ

ถูกทำลายด้วยสารอื่นๆ ต่อไป (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529 ; Lawrence and Dean, 1996 ; Mahendale, 1987 ; Zimmerman, 1978)



รูปที่ 9 แสดง triglyceride cycle ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด liposes (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529)

Liver necrosis

liver necrosis หมายถึง การตายของเซลล์ตับ เมื่อเซลล์ได้สัมผัสกับสารพิษ ทำให้เกิดภาวะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่ไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ สมดุลย์ของของเหลวภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมเซลล์ โดยที่สาเหตุนั้นมาจากการยับยั้งขบวนการเมตาบอลิสมที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ เช่น ยับยั้งการสร้างพลังงานของไมโตคอนเดรีย หรือ ยับยั้งการสร้าง DNA, RNA และ โปรตีน

กลไกการเกิด liver necrosis ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีการเสนอแนวทางที่เป็นไปได้ ดังนี้

1. Lipid peroxidation

การเกิด lipid peroxidation เป็นรูปแบบการบาดเจ็บของเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะและทำให้เกิด liver necrosis ขึ้นได้ เป็นขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง (formation) และการแพร่ออกไปอย่างต่อเนื่อง (propagation) ของ lipid radical เนื่องจากได้รับอะตอมของออกซิเจนทำให้มีการจัดเรียงตัวใหม่ของพันธะคู่ในไขมันที่ไม่อิ่มตัว ส่งผลต่อการทำลาย membrane lipids และมีการสร้างผลิตภัณฑ์ขึ้นใหม่ เช่น อัลกอฮอล, คีโตน, อัลดีไฮล์ และอีเธอร์ (Buege and Aust, 1978)

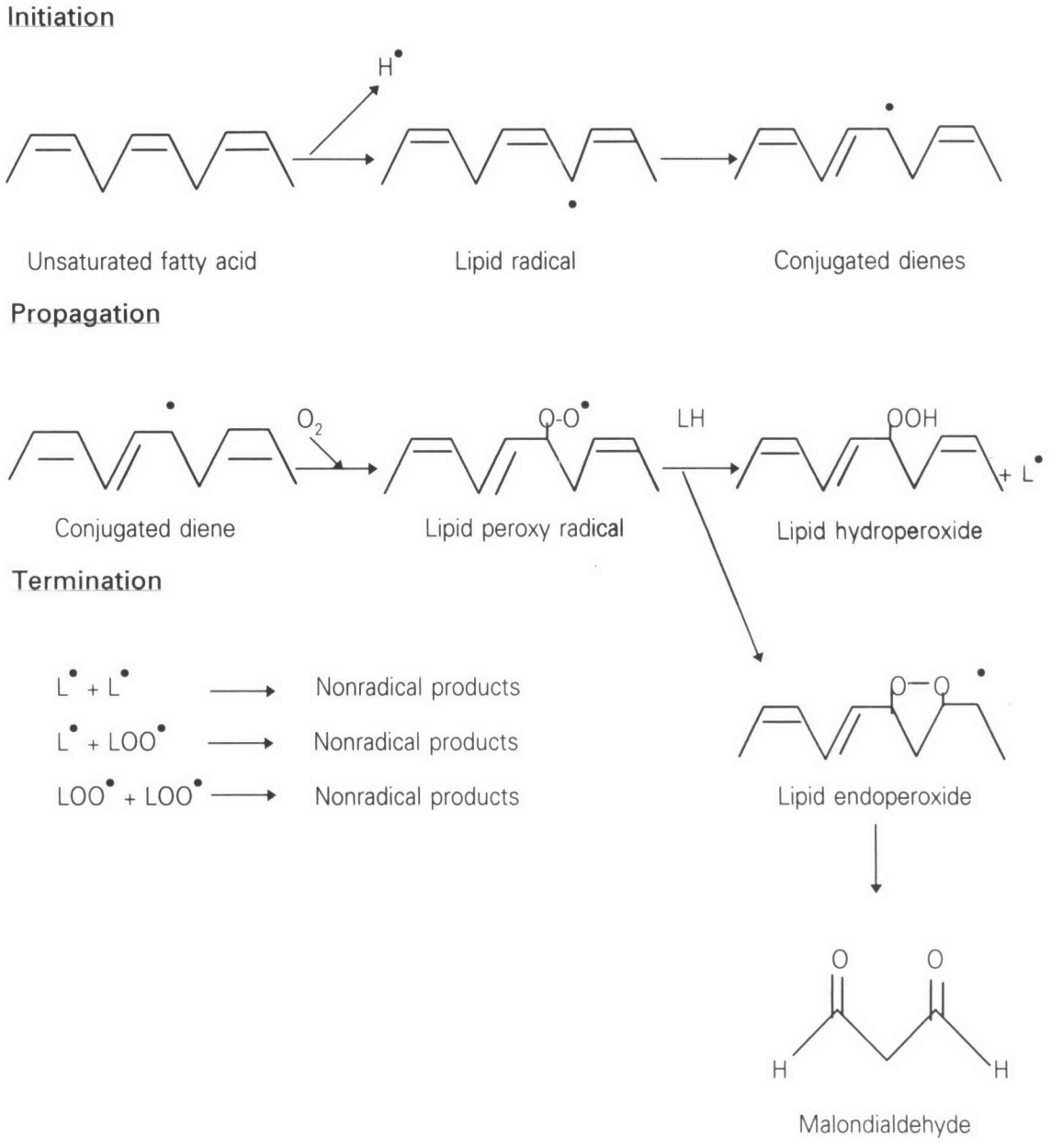
lipid peroxidation เป็นขบวนการเชิงซ้อนที่มีหลายขั้นตอน เริ่มด้วย initiation, propagation และ termination (รูปที่ 10)

ในปฏิกริยา initiation เมื่อได้รับสารบางตัวภายหลังถูกเมตาบอลิสมสามารถให้ free radical ซึ่งจะไปแย่งที่ไฮโดรเจนของ methylene carbon ในโมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ส่งผลให้เกิด lipid radical ที่ไม่คงตัว มักเปลี่ยนแปลงต่อไปได้ conjugated diene เมื่อออกซิเจนเข้าไปจับในตำแหน่งที่มีอิเล็คตรอนอิสระอย่างรวดเร็ว จึงได้ lipid peroxy radical ซึ่งสามารถไปรวมกับไฮโดรเจนอะตอมจากไขมันที่ใกล้เคียงได้ lipid hydroperoxide, lipid endoperoxide และ lipid radical ตัวใหม่ สำหรับ lipid endoperoxide ในกรดไขมันไม่อิ่มตัว

สามารถถูกเปลี่ยนเป็น malondialdehyde ขบวนการกระตุ้นให้เกิดปฏิกริยาต่อเนื่องด้วยตัวของมันเอง เรียกว่า propagation ซึ่งจะทำให้ lipid peroxidation ขยายวงกว้างออกไป สำหรับ hydroperoxide ที่เกิดขึ้นจะไม่คงตัว มักสลายได้ lipid radical เมื่อไม่มีโมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเหลืออยู่ ปฏิกริยา termination ก็จะเกิดขึ้น ได้ผลเป็น nonradical products ซึ่งจะหยุดขบวนการทั้งหมดของ lipid peroxidation (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529 ; Buege and Aust, 1978)

ผนังภายในเซลล์ที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่สูง มักเป็นเป้าหมายที่ถูกโจมตีด้วย lipid peroxidation ทำให้ผนังนั้นสูญเสียความคงตัว เพิ่มการซึมผ่านของผนัง (plasma membrane permeability) และเกิดการตายของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการที่ lipid peroxidation ทำอันตรายต่อเซลล์อาจเนื่องมาจากมีการปล่อย hydroxyalkenals ออกมา โดยเฉพาะ hydroxynoenal ซึ่งมีพิษต่อเซลล์อย่างแรง (potent cytotoxin) (Alan, Ducan and Donald, 1989) นอกจากนี้ lipid peroxidation ที่เกิดจาก paracetamol ใน isolated hepatocytes ของหนูขาวและหนูถีบจักร ยังถือเป็นกลไกความเสื่อมพื้นฐานในห่วงโซ่ที่นำไปสู่การสูญเสียหน้าที่ของตับ (Albrecht, Sylvia and Karl-Heinz, 1979 ; Yoshiyuki, Toshiharu and Shoji, 1992)

ในการศึกษาความเป็นพิษต่อตับของ (+)-usnic acid นี้ แนวทางหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบ ก็คือ การตรวจวัดการเกิด lipid peroxidation ซึ่งอาจจะเกิดจากสารนี้หรือเมตาบอไลท์ของมันและเป็นเครื่องบ่งชี้ว่ามี free radical หรือ electrophile เกิดขึ้นในขบวนการเมตาบอลิสมของ (+)-usnic acid โดยทำการตรวจวัดปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นในขบวนการของ lipid peroxidation



รูปที่ 10 แสดงขบวนการเกิด lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978)

2. Mitochondria

สารพิษหลายชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรีย ทำลายสมดุลย์ของเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญต่อเซลล์และมีบทบาทในการควบคุมอิออน (ions) ภายในเซลล์ เช่น แคลเซี่ยม (Ca^{2+})

จากการศึกษาพิษของ paracetamol ต่อไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไมโตคอนเดรีย เกิดการลดของ ATP ภายในเซลล์ และ/หรือ มีการเปลี่ยนแปลงของ reducing equivalents ในไมโตคอนเดรีย และยับยั้งการหายใจเมื่อใช้สับสเตรทเป็น glutamate+malate แต่ไม่พบใน succinate ซึ่งนำไปสู่ cell necrosis

ไมโตคอนเดรียนับเป็นแหล่งที่ให้ GSH ประมาณ 10% ของ GSH ในตับ ดังนั้น เมื่อไมโตคอนเดรียถูกทำลาย จะทำให้มีการลดลงของ GSH และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} permeability ส่งผลให้ Ca^{2+} ถูกปล่อยออกมาจากไมโตคอนเดรียและออร์กาเนลล์มีลักษณะบวมขึ้น ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบภายหลังได้รับ paracetamol

การลดลงของ ATP จะส่งผลให้เกิดการทำลายหน้าที่หลายอย่างของเซลล์ รวมทั้งหน้าที่การทำลายพิษจาก paracetamol และสารอื่นๆ ดังนั้นถือได้ว่าผลของ paracetamol ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย อาจเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้น และ/หรือ การดำเนินไปของความเป็นพิษต่อตับของสารนี้ (Laraine et al., 1988 ; Rona, Mohamed and Sidney, 1989 ; Russell, Sidhartha and Sungchul, 1989)

สารพิษพวก menadione, CCl_4, t-butyl hydroperoxide และ benzoquinones เป็นสาเหตุทำให้เกิดการออกซิเดชั่น NADPH ของไมโตคอนเดรียและมีการลดลงของ ATP ซึ่งเชื่อว่านำไปสู่การปล่อยของ Ca^{2+} ออกมาจากไมโตคอนเดรีย ผลจาก isolated mitochondria ต่อกลไกที่สูญเสีย pyridine nucleotide จะเกี่ยวข้องกับการทำลาย DNA (single-strand breaks) ซึ่งนำไปสู่การลดลงของ NAD^+ และ ATP (Alan, 1989)

ในการศึกษาฤทธิ์ของ (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio ต่อขบวนการหายใจและ oxidative phosphorylation ของไมโตคอนเดรีย พบว่า (+)-usnic acid มีฤทธิ์เป็น uncouple นั่นคือ กระตุ้นการออกซิไดซ์สับสเตรทเพิ่มขึ้นพร้อมกับเพิ่มการสลายของ ATP ทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง ดังนั้น (+)-usnic acid อาจแสดงความเป็นพิษจากฤทธิ์ uncoupling ในขนาดที่สูงกว่า 6.0 μM โดยมีผลรบกวนการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์กาเนลล์ที่สำคัญและเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานของเซลล์ (สิริวรรณ พฤกษ์อุดม, 2536)

3. Macromolecule

เมตาบอลิสมของสารต่างๆ โดยเอ็นไซม์ที่ตับ อาจทำให้เกิดเมตาบอไลท์พวก alkylating, arylating หรือ acylating derivatives ที่สามารถจับแบบ covalent binding กับโปรตีน, ไขมัน, ไกลโคเจน, RNA หรือ DNA ซึ่งเชื่อกันว่าจะไปกระตุ้นกลไกอย่างน้อยหนึ่งกลไกและส่งผลให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ

การศึกษาความเป็นพิษของ acetaminophen ต่อตับ ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นโดยการจับของ NAPQI (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine) กับ sulfhydryl groups ของโปรตีนเป็นสาเหตุทำลายสมดุลย์ของเซลล์และเกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (Albrecht et al., 1979 ; Laraine et al., 1988 ; Yoshiyuki et al., 1992)

4. Protein synthesis

สารที่ทำให้เกิดพิษต่อตับหลายชนิดมีผลรบกวนการสร้างโปรตีนของเซลล์ตับ เช่น galactosamine, 2-acetylaminofluorine, CCl_4, 3,4-dimethylaminoazobenzene, diethylnitrosamine, DMN, thioacetamide และ ethionine โดยยับยั้งการรวมกันของกรดอะมิโนให้เป็นโปรตีนตับ ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งในการตายของเซลล์ตับ (hepatic or liver necrosis) แต่ไม่ทุกกรณี เช่น cycloheximide และ ethionine สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยไม่เกิดการตายของเซลล์ตับ บทบาทการยับยั้งการสร้างโปรตีนของสารพิษต่อการตายของเซลล์ตับนี้ยังไม่กระจ่างชัดนัก จึงได้มีการศึกษากลไกของสารพิษดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างโปรตีน พบว่า galactosamine จะลดการสร้าง RNA และพลาสม่าโปรตีน (coagulation factors) เนื่องจากขาด UTP ถ้าให้ uridine

ก็สามารถผันกลับการยับยั้งการสร้างโปรตีนได้ สำหรับ ethionine นั้นมีผลยับยั้งการรวมกันของกรดอะมิโนให้เป็นโปรตีนของ microsome เป็นผลของการแทนที่ methionine ใน S-adenosyl methionine เกิดการจับ adenine ของเซลล์ทำให้ลดอัตราการสร้าง ATP นอกจากนี้การที่ ethionine ทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ตับในรูปของ triglyceride ก็เนื่องจากการรบกวนขบวนการเมตาบอลิสมของโปรตีน ในกรณีของ CCl_4 จะลดการรวมกันของกรดอะมิโนเป็น lipoprotein, hepatic proteins, albumin และ plasma clotting factors ซึ่งการทำให้เกิดการเสียหายต่อการสร้างโปรตีนของ CCl_4 นี้เป็นชนิดผันกลับไม่ได้และนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด (Mehendale, 1987)

จากการศึกษาผลของ (+)-usnic acid ต่อการกดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสและการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในหนูถีบจักร พบว่า (+)-usnic acid มีผลรบกวนการสังเคราะห์ RNA และผลต่อ spindle apparatus (Al-Berkairi et al., 1991)

5. แคลเซี่ยม

เซลล์ทุกเซลล์ในร่างกายจะอยู่ในของเหลวที่มีแคลเซี่ยมในความเข้มข้นที่สูง (10^{-3} M) ขณะภายในเซลล์จะมีความเข้มข้นของแคลเซี่ยมที่ต่ำกว่า (10^{-6} M) electrochemical gradient จะเป็นตัวทำให้เกิดการเคลื่อนของแคลเซี่ยมเข้าสู่เซลล์และมีการรักษาสภาพสมดุลย์โดยไม่ยอมให้แคลเซี่ยมซึมผ่าน plasma membrane และโดย active extrusion

การทำลาย plasma membrane โดยกลไกต่างๆ จะทำลาย permeability barrier และทำให้แคลเซี่ยมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ (influx) แคลเซี่ยมเป็นสารทางชีวภาพที่ active มากและสามารถไปทำลาย metabolic order ต่างๆ การตายของเซลล์ตับอันเนื่องมาจากสารเคมีที่เป็นพิษจะแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของแคลเซี่ยมภายในเซลล์และเกิดการสะสมของแคลเซี่ยมขึ้นอย่างมาก (Francis, Agnes, Ellora and John, 1979 ; Wei shen, Lisa, Sidhartha and George, 1991)

บทบาทของ Glutathione (GSH)

glutathione เป็น non-protein thiol มีสูตรโครงสร้างในรูปของ tripeptides คือ γ-L-glutamyl-L-cyteinyl-glycine ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน cytosol ในรูปของ reduced form (GSH) หลังจากนั้นจึงถูกเคลื่อนย้ายไปยังไมโตคอนเดรียและนิวเคลียส เพื่อสำรองไว้เป็น antioxidant reducer และสำหรับทำลายพิษของสารประกอบพวก electrophile (รูปที่ 11)

ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่จะมีความเข้มข้นของ glutathione ค่อนข้างสูง (มากกว่า 4 mM) มากกว่า 90% จะอยู่ในรูป reduced form (GSH) โดยเฉพาะในเซลล์ตับจะพบ GSH หนาแน่นมากในโซนที่ 1 (periportal area) และมีจำนวนน้อยในโซนที่ 3 (centrilobular area) การสังเคราะห์ glutathione จะขึ้นอยู่กับ cysteine ที่มีอยู่ซึ่งมีขีดจำกัด

glutathione มีบทบาทหลายอย่างในส่วนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ที่สำคัญของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน, DNA, การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนและสมรรถนะของเอ็นไซม์ รวมทั้งการหลั่งของ neurotransmitter บางตัว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทในเมตาบอลิสมของสาร โดยทำหน้าที่เป็น strong nucleophiles จึงไปจับกับสารหรือเมตาบอไลท์ของสารที่เป็น electrophiles จะอาศัย glutathione-S-transferases เป็นตัวกระตุ้น ทำให้อยู่ในรูปของ glutathione conjugates ที่หมดฤทธิ์ เอ็นไซม์นี้พบได้ทั่วไปใน cytosol ของตับ, ไต, ทางเดินอาหารและเนื้อเยื่ออื่นๆ

สารหรือเมตาบอไลท์ของสารที่เป็น electrophiles เช่น NAPQI ของ paracetamol ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์เนื่องจากการจับแบบ covalent binding ของ reactive intermediate กับโปรตีน โดยเฉพาะ -SH group ใน cysteine residue นอกจากนี้ยังพบว่า dithiothreitol (DTT) ของเซลล์ตับ ซึ่งเป็น direct-acting thiol reductant สามารถป้องกันและทำให้เกิดการผันกลับในการตายของเซลล์ รวมทั้งการเกิด blebbing อันเป็นผลจากได้สัมผัสกับ reactive metabolite ของ paracetamol

glutathione สามารถทำหน้าที่เป็น reductant ในขบวนการเมตาบอลิสมของ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ organic hydroperoxide ปฏิกิริยานี้จะถูกกระตุ้นโดยเอ็นไซม์

glutathione peroxidase (พบที่ cytoplasm, mitochondria) และ catalase (พบส่วนใหญ่ที่ peroxisomes) ทำให้ได้น้ำ hydrogen peroxide เป็นสารที่ถูกเปลี่ยนแปลงมาจาก superoxide radicals เป็นเมตาบอไลท์ปกติที่พบในเซลล์ทั่วไป ถูกสร้างขึ้นเกือบจะทุกส่วนของร่างกาย ซึ่งในสภาวะปกติของร่างกายจะมีเสถียรภาพอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ reactive oxygen species อื่นๆ เช่น superoxide, hydroxyl radicals hydrogen peroxide จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอ็นไซม์ glutathione peroxidase ยกเว้นใน peroxisomes ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอ็นไซม์ catalase ดังนั้นเอ็นไซม์ทั้งสองจึงช่วยกำจัดพิษจาก hydrogen peroxide

สำหรับ organic hydroperoxide ถูกสร้างอย่างต่อเนื่องจากเมตาบอลิสมของสารในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นพวก polyunsaturated fatty acids ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นของเอ็นไซม์ lipoxygenase และเอ็นไซม์อื่นๆ สารนี้เมื่อเกิดการสะสมจะทำให้เกิดพิษ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสารดังกล่าวด้วยเอ็นไซม์ glutathione peroxidase จะสามารถช่วยกำจัดพิษได้

ขบวนการเมตาบอลิสมของ hydrogen peroxide และ organic hydroperoxide โดย glutathione peroxidase เกี่ยวข้องกับปฏิกริยาออกซิเดชั่นของ GSH ไปเป็น GSSG ซึ่งจะถูกรีดิวซ์กลับมาเป็น GSH โดย NADPH-dependent GSSG-reductase (glutathione reductase) เมื่ออัตราการเกิดออกซิเดชั่นของ GSH ไปเป็น GSSG มีมากเกินความสามารถของ glutathione reductase ที่จะเปลี่ยนกลับมาเป็น GSH GSSG จะถูกลำเลียงออกจากเซลล์ตับและขับออกสู่น้ำดีโดยขบวนการ active transport

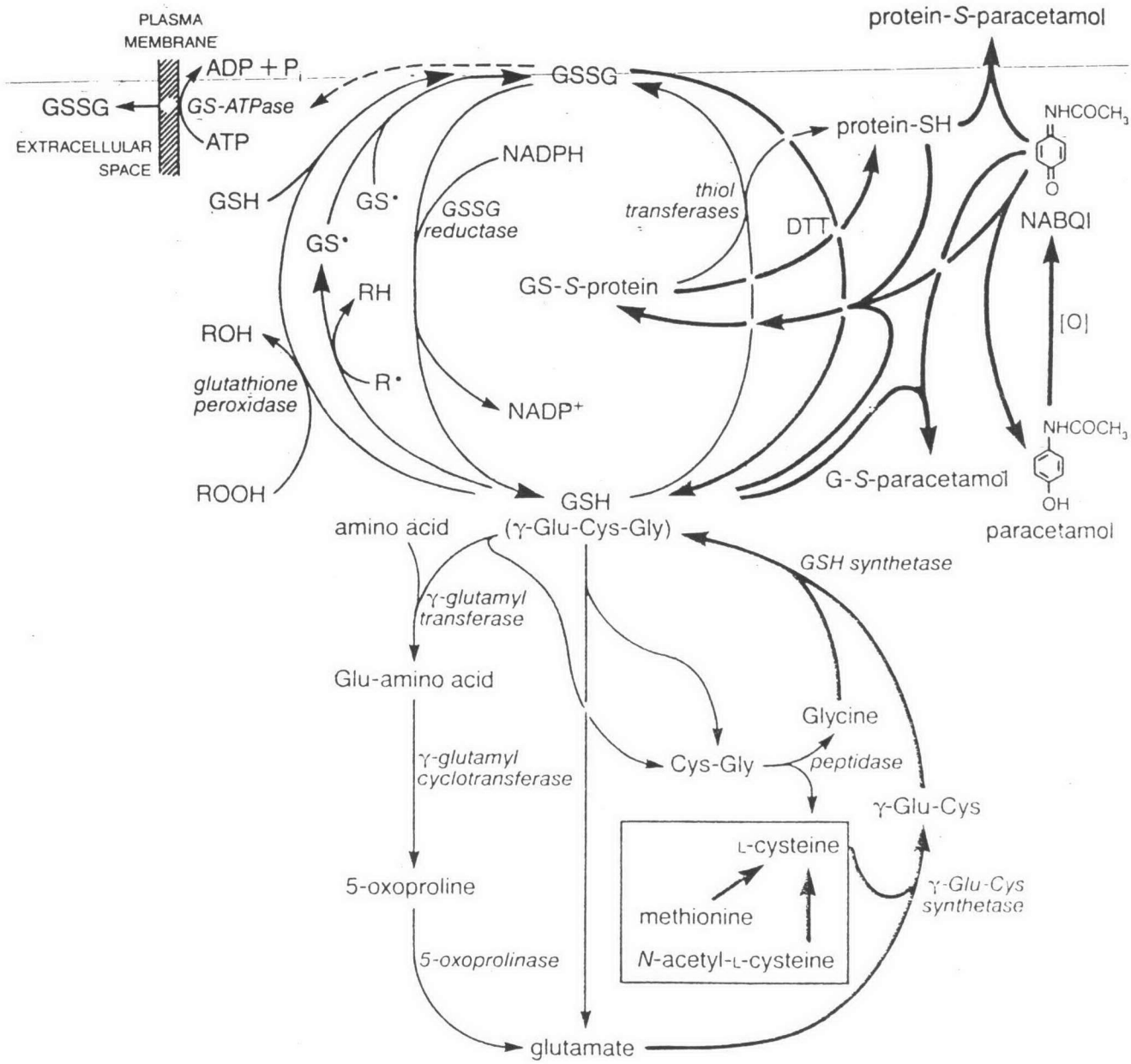
นอกจากนี้ GSH ยังสามารถจับกับ free radical ซึ่งเกิดจากยาหรือสารต่างๆ ทำให้ดึงไฮโดรเจนอะตอมออกจาก GSH กลายเป็น thiyl radical ($GS^{\bullet}$) โดยอาศัยเอ็นไซม์ peroxidase เมื่อ thiyl radical 2 ตัวรวมกันจะได้ GSSG

การสร้าง GSH ถูกควบคุมโดย feedback inhibition เมื่อมีการใช้ GSH ก็จะกระตุ้นให้มีการสร้างขึ้นมาใหม่เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของ GSH ให้อยู่ในภาวะปกติ โดยอาศัยเอ็นไซม์ γ-glutamylcysteine synthetase (γ-Glu-Cys synthetase) และ glutathione synthetase (GSH synthetase) สำหรับการทำลาย glutathione และ glutathione S-conjugates ให้เป็นกรดอะมิโนจะอาศัยเอ็นไซม์ γ-glutamyltransferase (GGT) และ peptidases ในส่วนของน้ำดีพบเอ็นไซม์

ดังกล่าวที่ luminal surface ของ biliary cells และ epithelial cells ของลำไส้เล็ก ซึ่ง glutathione และ glutathione S-conjugates จะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ใน lumen ของลำไส้เล็กได้องค์ประกอบของกรดอะมิโน ต่อจากนั้นจะถูกดูดซึมโดยขบวนการ active transport ของลำไส้เล็กเพื่อลำเลียงไปยังตับและให้เซลล์ตับดูดซึมนำกลับไปสังเคราะห์เป็น glutathione ต่อไป ดังนั้นการเมตาบอลิสมของ glutathione และเมตาบอไลท์ในน้ำดีจึงเกิดขึ้นโดยผ่านทาง intrahepatic cycle และ enterohepatic cycle สำหรับ GSH และ glutathione S-conjugates ในพลาสม่าหรือระบบไหลเวียนจะถูกทำลายโดย hepatorenal cycle จะพบ GGT ใน proximal tubules ของไต ซึ่งจะทำการตัดเอาส่วนของ γ-glutamyl ออก ต่อจากนั้นเอ็นไซม์ dipeptidase จะตัดส่วนของ glycine ออก และเกิด N-acetylation โดยเอ็นไซม์ N-acetyltransferase ได้ผลเป็น mercapturic acid (N-acetylcysteine conjugate) (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2529 ; Alan et al., 1989 ; Gibson and Skett, 1994 ; Jack et al, 1981 ; Masayasu, 1994)

ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของ (+)-usnic acid ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ GSH ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแนวทางบ่งชี้ว่า สารหรือเมตาบอไลท์ของสารนี้สามารถก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ตับได้หรือไม่ และอย่างไร

เป็นที่ทราบว่ามีสารจำนวนมากภายหลังเกิดขบวนการเมตาบอลิสมแล้วก่อให้เกิดพิษต่อตับ ดังนั้นจึงมีการทดสอบพิษของสารเหล่านี้ โดยการตรวจหาเอ็นไซม์ในพลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ตับและจะถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดเมื่อเกิดการตายของเซลล์ตับ เช่น alanine aminotransferase (ALT : glutamic pyruvic transaminase, GPT) และ aspartate aminotransferase (AST : glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) รวมทั้งตรวจวัดผลการเกิด malondialdehyde (MDA) ของขบวนการ lipid peroxidation และ การตรวจวัดปริมาณของ reduced glutathione (GSH)

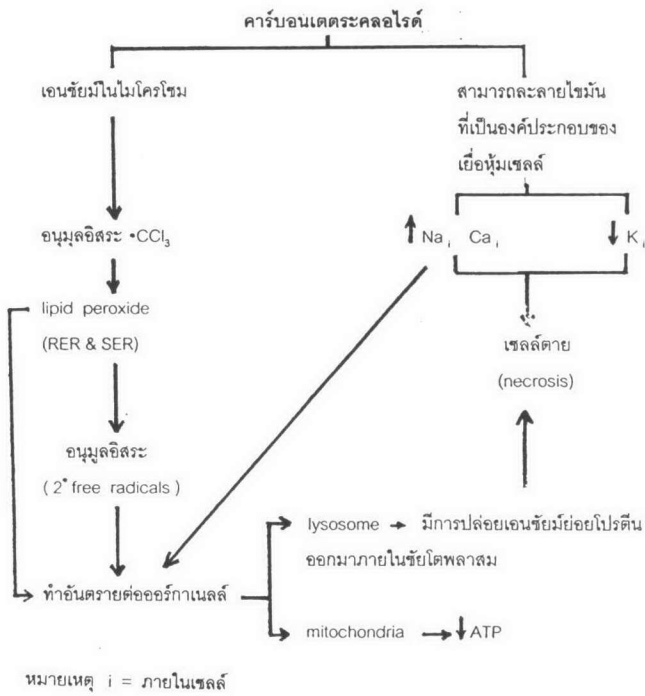


รูปที่ 11 แสดงการสังเคราะห์และกลไกการทำงานของ reduced glutathione (GSH) (Alan et al., 1989)

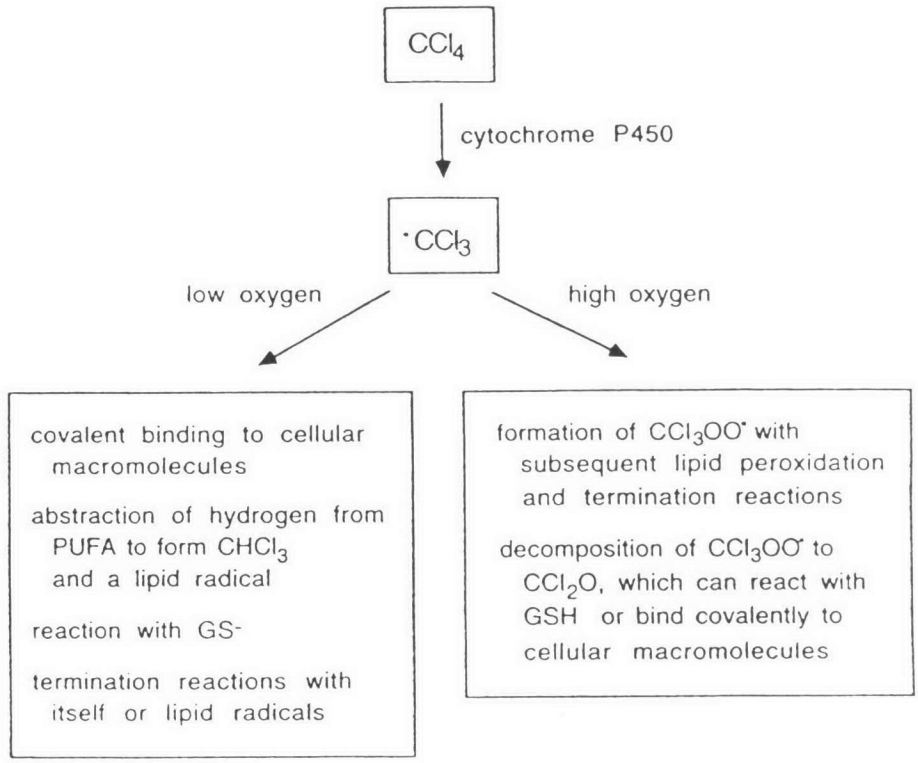
I18253180

กลไกการเกิดพิษต่อตับของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4)

CCl_4 เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อตับในลักษณะ centrilobular necrosis และ fatty liver ได้มีการนำสารนี้มาใช้เป็นแบบมาตรฐานในการศึกษากลไกการเกิดพิษต่อตับของสารอื่นๆ เนื่องจาก CCl_4 เป็นสารที่ทราบกลไกการเกิดพิษต่อตับที่ชัดเจนแล้ว โดยที่ CCl_4 ถูกเปลี่ยนไปเป็น trichloromethyl free radical ($^{\bullet}CCl_3$) โดยอาศัยเอ็นไซม์ mixed-function oxidase $^{\bullet}CCl_3$ จะดึงไฮโดรเจนจาก polyunsaturated fatty acid ซึ่งเป็นจุดเริ่มของการเกิด lipid peroxidation ทำให้มีผลทำลาย cytochrome P450 haemoprotein, MFO activity ใน ER และออร์กาเนลล์อื่นๆ เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด หรือในอีกแนวทางหนึ่ง คือ CCl_4 สามารถละลายในไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ไปมีผลต่อ membrane permeability ทำให้เปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของอิออนต่างๆ ภายในเซลล์ หรือ ไปทำลายออร์กาเนลล์และเกิดการตายของเซลล์ตามมา (รูปที่ 12) ในภาวะที่มีออกซิเจนอยู่มาก CCl_4 จะเกิดเป็น reactive trichloromethylperoxy free radical ที่แรงมาก ($CCl_3OO^{\bullet}$) ซึ่งจะเข้าสู่ขบวนการของ lipid peroxidation ต่อไป หรือถูกสลายต่อเป็น phosgene (CCl_2O) (รูปที่ 13) (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2535 ; Lawrence and Dean, 1996 ; Mehendale, 1987)



รูปที่ 12 แสดงกลไกการเกิดพิษของ CCl_4 (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2535)



รูปที่ 13 แสดงขบวนการเมตาบอลิสมของ CCl_4 ในตับ (Lawrence and Dean, 1996)

Induction และกลไกการเกิด induction

ในกลางปี 1960 ได้มีการศึกษาพบว่า ทั้ง cytochrome P450 และ NADPH-cytochrome P450 reductase จะถูกเหนี่ยวนำเมื่อให้ phenobarbitone เข้าไปก่อน ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำในขบวนการเมตาบอลิสมของยา เนื่องจากมีการเพิ่มของ cytochrome P450 content ใน ER ของตับ นั่นก็คือ การเหนี่ยวนำให้เอ็นไซม์มีสมรรถนะเพิ่มขึ้นโดยยาหรือสารเคมีต่างๆ (enzyme induction) และสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการดังกล่าวเรียกว่า enzyme inducer ซึ่งจะมีความสามารถและรูปแบบไม่เหมือนกันในการเพิ่มเมตาบอลิสมของสารชนิดเดียวกัน inducer ตัวหนึ่งมีผลเพิ่มเมตาบอลิสมของสารตัวหนึ่ง แต่ inducer อีกตัวหนึ่งกลับให้ผลที่ตรงกันข้ามหรือลดเมตาบอลิสมของสารตัวนี้ก็ได้ การเกิดการเหนี่ยวนำจะเป็นในลักษณะ dose-dependent, reversible และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการสร้างเอ็นไซม์ขึ้นใหม่ ไม่ใช่การไปเพิ่ม

สมรรถนะของเอ็นไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นแล้ว ทั้งนี้เพราะขบวนการทั้งหมดถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ซึ่งเกิดขึ้นในระดับ transcription เพิ่มการสร้าง mRNA โดยไม่มีผลต่อการสร้าง DNA

inducer ของ MFO ในปัจจุบัน มีอย่างน้อย 4 กลุ่ม คือ

1. Phenobarbitone (PB) ถือเป็น prototypic inducer ของ liver monooxygenases ซึ่งจะไปเหนี่ยวนำ cytochrome P450 ใน subfamilies CYP 2B, 2C และ 3A โดยเฉพาะ CYP 2B1 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับ phenobarbitone พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA มีการขยายตัวของ SER และการเพิ่มขึ้นของ cytochrome P450 จะมีการดูดซึมแสงไม่เปลี่ยนไปจาก cytochrome P450 ของสัตว์ปกติ

2. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) เช่น 3-methylcholanthrene (MC), -naphthoflavone และ benzo(a)pyrene การเกิดการเหนี่ยวนำในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับ cytosolic receptor ที่เฉพาะเจาะจง นั่นคือ Ah receptor ได้ inducer-receptor complex เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะเหนี่ยวนำ mRNA ที่เฉพาะสำหรับ isoenzymes

3. Glucocorticoids (เช่น dexamethasone : DEX) และ antiglucocorticoids (เช่น pregnenolone-16α-carbonitrile : PCN)

4. Ethanol และสารประกอบอื่นๆ เช่น imidazole, isoniazid, acetone และ pyrazole ซึ่งจะไปเหนี่ยวนำ CYP 2E1 โดยผ่านกลไกหลายขั้นตอนขึ้นอยู่กับว่าจะเป็น inducer ตัวใดมากระตุ้น แต่ส่วนใหญ่จะมีผลต่อความคงตัวและการยับยั้งการทำลายหรือสลายตัวของ CYP 2E1 apoprotein

นอกจากนี้อาจจัด clofibrate ซึ่งเป็นยาลดไขมันในเลือดได้อีกหนึ่งกลุ่ม พบว่า clofibrate จะมีความจำเพาะในการเหนี่ยวนำ CYP 4 gene family และเหนี่ยวนำ isoenzymes ที่เมตาบอไลท์ไขมันโดยเฉพาะกรดไขมัน

จากการศึกษา (+)-usnic acid ต่อการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำ CYP 3A, 2E และ 1A ในหนูถีบจักร ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อทำการทดลองผลของ (+)-usnic acid ในการเป็น enzyme inducer ของ cytochrome P450 isoenzymes ในหนูขาวต่อไป (พรเพ็ญ, 2529 ; Gibson and Skett, 1994 ; Gilbert et al., 1994 ; Meyer, 1996 ; Margarida et al., 1992 ; Steven et al., 1985)

เนื่องจากสมุนไพรเป็นสิ่งที่มีคุณค่าและได้นำมาใช้เป็นยารักษาโรคมาตั้งแต่โบราณ ในปัจจุบันนี้ยาแผนปัจจุบันหลายชนิด ได้ตัวยาสำคัญมาจากพืชสมุนไพรต่างๆ ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการค้นคว้าวิจัย เพื่อสกัดเอาตัวยาที่มีฤทธิ์ในการรักษาออกมาผลิตเป็นยาที่มีคุณภาพ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษของพืชสมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญ ฝอยลมจัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อบำบัดอาการเจ็บป่วยมาเป็นเวลานาน มีสารสำคัญซึ่งให้ฤทธิ์ในการรักษา คือ (+)-usnic acid จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ (+)-usnic acid พบว่า มีฤทธิ์เป็น uncoupler มีผลยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียจากเซลล์ตับของหนูขาวเมื่อให้ขนาดมากกว่า 6 μM ทำให้เพิ่มการสลายของ ATP ภายในเซลล์ แสดงว่าสารนี้อาจทำให้เกิดพิษจากฤทธิ์ uncoupling มีการลดลงของระดับนิวคลีอิค แอซิด และ RNA ของ polychromatic erythrocytes ในเซลล์ตับของหนูถีบจักรและการเพิ่มขึ้นของ micronucleus ใน femur cells ของหนูถีบจักร นั่นคือ (+)-usnic acid อาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยมีผลต่อ RNA หรือ spindle appalatus นอกจากนี้ (+)-usnic acid ยังมีผลเหนี่ยวนำ CYP 3A, 2E และ 1A ในหนูถีบจักร จากผลดังกล่าวนำไปสู่แนวทางในการศึกษาผลของสารนี้ต่อตับในแง่ของการเกิดพิษและการเป็น enzyme inducer ซึ่งข้อมูลการศึกษาทางด้านนี้ค่อนข้างมีน้อยและตับยังเป็นอวัยวะที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของมนุษย์ เป็นอวัยวะแรกที่จะเกิดขบวนการเมตาบอลิสมของสารต่างๆ มีหน้าที่ที่สำคัญหลายอย่าง หากร่างกายได้รับสารที่มีพิษต่อตับ ก็จะทำให้หน้าที่และการทำงานของตับเสียไป นำไปสู่การเกิดโรคของตับ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid จาก *Usnea siamensis* Wainio ในหนูขาวและเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว (isolated rat hepatocytes) การเกิดพิษเมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว และศึกษาผลต่อการเหนี่ยวนำ isoenzymes ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว ซึ่งอาจจะทำให้ทราบถึงสาเหตุและกลไกการเกิดพิษต่อตับที่น่าจะเป็นไปได้ของ (+)-usnic acid เพื่อเป็นข้อมูลทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาสำหรับการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป