Review Article

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลอง

กนกวรรณ จารุกำจร[1, 2,*], วิลัดดา สินทร[2,3], ชรินญา พิมพ์สอน[2]

Received: 22 April 2014 **Accepted**: 2 February 2015

บทคัดย่อ

จากรูปแบบการดำเนินชีวิตที่เร่งรีบและแข่งขันกับเวลาและพฤติกรรมการบริโภคที่นิยมอาหารจานด่วน ส่งผลให้เกิดความเครียดทางร่างกายและอารมณ์ ประกอบกับสภาพแวดล้อมที่มีมลพิษสูงเป็นสาเหตุให้ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เพิ่มขึ้น โดยปัจจัยหนึ่งคืออนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นในร่างกายร่วมกับการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ การพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระมีความจำเป็นต้องทดสอบเบื้องต้นในสัตว์ทดลองก่อนนำไปสู่การทดลองทางคลินิก ดังนั้นการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองจึงเป็นแบบจำลองที่มีความสำคัญที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพ รูปแบบการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองสามารถทำได้โดยการใช้ยาและ/หรือสารเคมี โดยขนาดที่ใช้ตลอดจนความถี่และวิธีการบริหารยาจะแตกต่างกันตามชนิด/สายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง การทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้ได้กล่าวถึงการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันโดยการใช้ยา ได้แก่ พาราเซตามอล (paracetamol) ไดอะซีแพม (diazepam) คีโตโคนาโซล (ketoconazole) คลอโรควิน (chloroquine) และยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) เช่น ไดโคลฟีแนค (diclofenac) และการใช้สารเคมี ได้แก่ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) และโลหะหนัก เช่น โครเมี่ยม (chromium) แคดเมี่ยม (cadmium) และสารหนู (arsenic) เพื่อเป็นข้อมูลหรือแนวทางสำหรับนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องในการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: ภาวะเครียดออกซิเดชัน ยา สารเคมี โลหะหนัก สัตว์ทดลอง
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(1): 1-17

---

[1] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2] กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ (PANPB) มหาวิทยาลัยวิจัย-มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[3] นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[*] **ติดต่อผู้นิพนธ์:** กนกวรรณ จารุกำจร สาขาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์: 043-202305, โทรสาร: 043-202379, อีเมล์: kanok_ja@kku.ac.th

Induction of Oxidative Stress in the Experimental Animals

Kanokwan Jarukamjorn[1,2*], Wiladda Sinthorn[2,3], Charinya Pimson[2]

Abstract

Physical and emotional stress caused by a fast-paced life,fast food consumption habits, and living in a polluted environment,increase the risk of various chronic diseases, which results in a higher level of free radicals and lower level of antioxidants in the body. Development of an antioxidant is required to be primarily tested in an animal model before performing the clinical trial. Hence, oxidative stress induction patterns in experimental animals have been studied extensively and continuously developed to assure the treatment outcomes and/or the biological activities of the compound. The induction of oxidative stress in animal models can be conducted through the use of either drugs or chemicals, depending on the species of experimental animal, as well as the route and frequency of drug administration. The induction of oxidative stress by paracetamol, diazepam, ketoconazole, chloroquine, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), diclofenac, carbon tetrachloride and heavy metals, such as chromium, cadmium, and arsenic, have been reviewed in order to inform and guide researchers who intend to implement these drugs in experimental models.

Keywords: oxidative stress, drugs, chemicals, heavy metals, experimental animals
IJPS 2015; 11(1): 1-17

[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

[2] Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB), National Research University-Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

[3] Graduate student Pharmaceutical Chemistry and Natural Products program, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

[*] **Corresponding author:** Kanokwan Jarukamjorn Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mueng District, Khon Kaen Province, Thailand 40002. Tel: 043-202305, Fax: 043-202379, E-mail: kanok_ja@kku.ac.th

บทนำ

จากภาวะเศรษฐกิจ สภาพสิ่งแวดล้อมและสังคมปัจจุบันที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้รูปแบบการดำเนินชีวิตต้องเร่งรีบและแข่งขันกับเวลาและพฤติกรรมการบริโภคที่นิยมอาหารจานด่วนเพื่อให้ทันต่อเหตุการณ์ต่างๆ ประกอบกับสภาพแวดล้อมที่มีมลพิษสูง ส่งผลให้เกิดความเครียดทางร่างกายและอารมณ์ ส่งผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ อาทิ โรคชรา (aging) โรคเบาหวาน (diabetes) โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคมะเร็ง (cancer) เป็นต้น โดยปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคและทำให้อาการของโรคทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นคือ อนุมูล

อิสระที่เพิ่มมากขึ้นในร่างกายร่วมกับการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสองปัจจัยเป็นสาเหตุของภาวะเครียดออกซิเดชัน (Valko et al., 2007) พัฒนาการของภาวะเครียดออกซิเดชันที่รุนแรงขึ้นจะทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่ส่งผลให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัวลดลง ทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจสังคมและงบประมาณของภาครัฐในการดูแลรักษาและฟื้นฟูสุขภาพของประชาชน ดังนั้นการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับภาวะเครียดออกซิเดชันควบคู่กับการศึกษาอุบัติการณ์ของการเกิดโรคต่าง ๆจึงมีความสำคัญ การพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารจากธรรมชาติ (natural antioxidants) เป็นสิ่งสำคัญ แต่ยังคงมีข้อจำกัดที่สำคัญเกี่ยวกับประสิทธิภาพ/การยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและผลกระทบด้านความปลอดภัย (Pokorny et al., 2001) จึงมีความจำเป็นต้องมีการทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษวิทยา ดังนั้นรูปแบบการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองจึงถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้สัตว์ทดลองตัวแบบ (animal model) ที่มีภาวะเครียดออกซิเดชันคล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกับในมนุษย์ ซึ่งมีข้อจำกัดทางจริยธรรมของการศึกษาโดยตรงในมนุษย์ นอกจากนี้การศึกษาในสัตว์ทดลองทำให้สามารถศึกษาผลทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นหรือการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต่าง ๆ เช่น สมอง ตับ ไต และหัวใจ ที่การศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถให้ผลดังกล่าวได้ ดังนั้นการสร้างแบบจำลองภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองจึงนับเป็นการศึกษาลำดับแรก ๆ ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาและพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อลดภาวะเครียดออกซิเดชัน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินในขณะที่สมรรถนะของระบบต้านออกซิเดชันในร่างกาย (antioxidant defense system) ลดลง จึงไม่สามารถทำลายอนุมูลอิสระที่มากเกินนั้นได้ ส่งผลให้กระบวนการทำงานของเซลล์เสียสมดุล โดยปกติร่างกายมีกระบวนการสร้างพลังงานที่ทำให้เซลล์สามารถทำงานได้ตามปกติและสื่อสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ซึ่งกระบวนการนี้จะมีการสร้างอนุมูลอิสระทั้งที่เป็นออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) (Deavall et al.,2012) ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวเรียกว่าระบบการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant system) เพื่อลดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น โดยระบบการต้านอนุมูลอิสระมี 2 ระบบคือ ระบบของเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD) คะตะเลส (catalase, CAT) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) เป็นต้น และระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น กลูตาไธโอน (glutathione, GSH) เป็นต้น (Al-Gubory et al., 2010)

เมื่อเกิดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical, O_2^-) ภายในเซลล์จะถูกเอนไซม์ SOD ทำการเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) จากนั้นเอนไซม์ CAT และ GPx จะเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็นออกซิเจน (O_2) และน้ำ (H_2O) นอกจากนี้ H_2O_2 จะถูกเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซีลแรดิคอล (hydroxyl radical, OH^-) จากการถูกทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนโดยโลหะทรานสิชันบางชนิดที่มีในร่างกาย เช่น Fe^{2+}(Fenton reaction) จากนั้น OH^- ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระความไวสูงจะไปดึงอิเล็กตรอนออกจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LOOH) เกิดกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ส่งผลให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวนั้นมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปและส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพและได้มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) และ 4-ไฮดรอกซิลอัลคีนัล (4-hydroxyalkenals, 4-HAE)

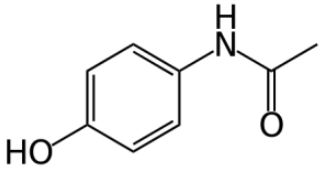
แนวทางการพัฒนาสัตว์ทดลองเพื่อใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน

กระบวนการการพัฒนายาต้องมีขั้นตอนของการทดสอบให้ได้ผลที่แน่นอนชัดเจนในสัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้ในมนุษย์ ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของยา รวมถึงความเป็นพิษของยาต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย นิยมใช้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ฟันแทะ ได้แก่ กระต่าย หนูถีบจักร และหนูขาว เป็นต้น โดยข้อมูลการศึกษาจะช่วยให้สามารถประเมินประสิทธิภาพ ประสิทธิผลและความปลอดภัยของยาก่อนการนำไปใช้จริงในมนุษย์ ดังนั้นการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์สัตว์ทดลองให้มีความเหมาะสมกับการศึกษา รวมถึงการชักนำให้สัตว์ทดลองมีสภาวะร่างกายที่สอดคล้องกับภาวะโรคที่ต้องการศึกษา จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง สำหรับรายงานการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองพบว่า หนูเป็นสัตว์ทดลองที่นิยมใช้มากที่สุดโดยมีการรายงานการศึกษาในหนูหลายชนิดและหลายสายพันธุ์แตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ในขณะที่การใช้ยา/สารเคมีชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นนอกจากจะมีความแตกต่างกันตามชนิด และขนาดของยา/สารเคมีแล้ว ยังขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองด้วย โดยยาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันมักเป็นตัวยาที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เกิดพิษต่อเนื้อเยื่อของอวัยวะนั้นๆ เช่น ตับ ไต และสมอง เป็นต้น โดยยา/สารเคมี มีวิถีการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ของอวัยวะเป้าหมาย ซึ่งการสะสมอนุมูลอิสระในเซลล์ที่มากเกินขีดความสามารถที่เซลล์จะจำกัดได้ จะทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ (DNA damage) โปรตีน และไขมันในเซลล์ (Deavall et al., 2012; Valko et al., 2007) แนวทางในการพัฒนาสัตว์ทดลองเพื่อใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นมีรายงานการใช้ยา/สารเคมีในหลายรูปแบบ ทั้งโดยการใช้ยา ได้แก่ พาราเซตามอล ไดอะซีแพม คีโตโคนาโซล คลอโรควิน และไดโคลฟีแนคและการใช้สารเคมี ได้แก่คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และโลหะหนัก ได้แก่ โครเมี่ยม แคดเมี่ยม และสารหนูเป็นต้น

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยยา

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยพาราเซตามอล

พาราเซตามอล (paracetamol) หรืออะเซตามิโนเฟน (acetaminophen) (รูปที่ 1) มีโครงสร้างประกอบไปด้วยวงเบนซีนที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลและไนโตรเจนจากหมู่เอไมด์ (Bales et al., 1985) มีฤทธิ์แก้ปวดและลดไข้ ใช้เพื่อบรรเทาอาการไข้ปวดศีรษะและอาการปวดเมื่อย โดยทั่วไปพาราเซตามอลมีความปลอดภัยค่อนข้างสูงต่อมนุษย์หากได้รับในปริมาณที่เหมาะสม (10 mg/kg) แต่หากได้รับปริมาณที่มากเกินจะทำให้เกิดความเสียหายต่อตับ ผู้ป่วยที่รับประทานพาราเซตามอลขนาดรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลานานก็สามารถส่งผลเชิงลบต่อตับได้เช่นเดียวกับผู้ที่รับประทานในปริมาณมากเกิน อันตรายจากการใช้ยาพาราเซตามอลจะเพิ่มมากขึ้นในผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์โดยพิษของพาราเซตามอลสามารถทำให้เกิดภาวะตับล้มเหลว (Mladenovi et al., 2013; Hinson et al., 2010; Kostopanagiotou et al., 2009)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของพาราเซตามอล (Bales et al., 1985)

การเมแทบอลิซึมของพาราเซตามอลจะเกิดผ่าน 2 วิถี โดยวิถีแรกซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมหลักนั้น พาราเซตามอลจะเกิดพันธะกับกลูคิวโรไนด์ (glucuronide) ซัลเฟต (sulphate) หรือซิสเตอีน (cysteine)ได้เมแทบอไลต์ที่ไม่มีพิษและขับออกจากร่างกายต่อไป แต่ถ้าปริมาณพาราเซตามอลในร่างกายมากเกินกว่าจะกำจัดได้หมดด้วยวิถีแรก พาราเซตามอลจะถูกเมแทบอลิซึมโดยวิถีออกซิเดชันเกิดเป็นเมแทบอไลต์ที่มีพิษที่สามารถจับกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulphydryl) บนเนื้อเยื่อตับและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ตับ อย่างไรก็ดีหากมี reduced glutathione (GSH) หรือ เอ็น- อะซีทิลซิสเทอีน (N-acetyl-cysteine, NAC) ในปริมาณที่พอเพียง GSH หรือ NAC จะเข้าจับเมแทบอไลต์ที่มีพิษนี้และได้สารประกอบที่สามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ (Ward and Alexander-Williams, 1999)

Singh และคณะ (2011) ชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss albino โดยการป้อนพาราเซตามอล 640 mg/kg ทางปากเพียงครั้งเดียวพบว่า ปริมาณของลิปิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxides) ในเลือดเพิ่มขึ้น ส่วนระดับของเอนไซม์ GPx กลูตาไธโอน เอสทรานสเฟอร์เรส (glutathione-S-transferase, GST) SOD และ CAT รวมถึงระดับของ GSH ลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติสอดคล้องกับการศึกษาของ Olaleye and Rocha (2008) ในหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss albino ที่ป้อนพาราเซตามอล 250 mg/kg/day ทางปากติดต่อกัน 7 วัน พบว่าระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตับเพิ่มขึ้นส่วนระดับของเอนไซม์ SOD และ CAT ลดต่ำลงซึ่งแสดงถึงภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจากการได้รับพาราเซตามอล (Singh et al., 2011)

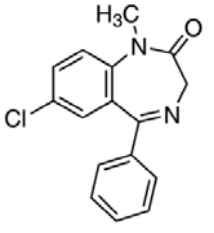
การศึกษาระดับ GSH ในหนูถีบจักรเพศเมียสายพันธุ์ Swiss (Arnaiz et al., 1995) หลังจากได้รับการป้อนพาราเซตามอล 375 mg/kg ทางปากครั้งเดียวเป็นเวลา 15 และ 60 นาที พบว่าระดับ GSH ลดลงตามเวลา สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Mladenovi และคณะ (2009) พบว่าหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss ที่ได้รับพาราเซตามอล 300 mg/kg โดยการฉีดเข้าช่องท้องครั้งเดียว จะมีระดับของเอนไซม์ SOD ลดลงตามเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ อีกทั้งการศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar ที่ได้รับพาราเซตามอล 500 mg/kg ทางปากครั้งเดียว พบว่าสัดส่วนคลอเลสเตอรอลต่อไขมันชนิดเอชดีแอล (cholesterol/HDL cholesterol) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับดัชนีการตายของเซลล์ตับ (Apoptotic index (n/100) of hepatocyte) ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลาเช่นกัน (Kostopanagiotou et al., 2009)

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar ที่ได้รับพาราเซตามอล 650 mg/kg ทางปากครั้งเดียวมีระดับของเอนไซม์ในซีรั่มที่บ่งบอกการทำงานของตับได้แก่ อะลานีนอะมิโนทรานเฟอเรส (alanine aminotransferase, ALT) และแอสพาเทตอะมิโนทรานเฟอเรส (aspartate aminotransferase, AST) ในระดับที่สูงขึ้น (Yousef et al., 2010) เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายหรือเกิดการอักเสบจะมีการรั่วไหลของเอนไซม์เหล่านี้ออกนอกเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด สามารถพบเอนไซม์ AST ในเซลล์อื่น เช่น หัวใจ ไต กล้ามเนื้อได้ ส่วนเอนไซม์ ALT นั้นมีความจำเพาะต่อการบ่งบอกภาวะของตับโดยเอนไซม์ ALT จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานอะมิเนชัน (transamination) จากแอล-อะลานิน (L-alanine) กับแอลฟา-คีโตกลูตาเรต (α-Ketoglutarate) ไปเป็นแอล-กลูตาเมต (L-glutamate) กับไพรูเวท (pyruvate) โดยไพรูเวทที่เกิดขึ้นจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแลคเทต (lactate) โดยเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase, LDH) พร้อมกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของนิโคตินาไมด์อะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinuclotide, NADH) ที่ถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบรีดิวซ์ (NAD) ในเซลล์ตับ ดังนั้นหนูที่ได้รับพาราเซตามอลจะมีระดับของเอนไซม์ ALT, AST และ LDH ในซีรั่มเพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงถึงผลการทำลายเซลล์ตับของพาราเซตามอล (Yousef et al., 2010) และเมื่อศึกษาถึงผลของพาราเซตามอลต่อตับ ไต สมองและหัวใจ พบว่าระดับของเอนไซม์ CAT, SOD, GPx และ GST ลดต่ำลงในขณะที่ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นซึ่งสนับสนุนการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากพาราเซตามอลต่ออวัยวะอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้จุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อตับยังพบช่องว่างในเซลล์เนื้อเยื่อตับที่แสดงถึงการตาย (necrosis) ของเนื้อเยื่อตับที่เกิดจากการได้รับพาราเซตามอลด้วย (Yousef et al., 2010)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยยาไดอะซีแพม

ไดอะซีแพม (diazepam) (รูปที่ 2) เป็นยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (benzodiazepines) ออกฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางโดยจับกับตัวรับเบนโซไดอะซีพีน (benzodiazepine receptor) ซึ่งจับกลุ่มอยู่บนตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ทำหน้าที่เป็นคลอไรด์แชนแนล (chloride channel) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ประสาททำให้ $GABA_A$ receptor ทำงานได้มากขึ้น ส่งผลให้ chloride channel เปิด และคลอไรด์อิออน (chloride ions) เข้าสู่เซลล์มากขึ้น เกิดภาวะไฮเปอร์โพลาไรเซชัน (hyperpolarization) ยับยั้งการทำหน้าที่ของเซลล์ประสาทต่างๆ จึงมีผลลดอาการวิตกกังวล ทำให้ง่วงหลับ ต้านอาการชักและคลายกล้ามเนื้อ (Mandelli et al., 1978) ไดอะซีแพมจับกับโปรตีนในพลาสมาได้มากถึงร้อยละ 98 และถูกเมแทบอลิซึมผ่าน CYP2C19 และ CYP3A4 ได้เป็นเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ (active metabolite) ได้แก่ เดสเมธิลไดอะซีแพม (desmethyldiazepam) เทมาซีแพม (temazepam) และออกซาซีแพม (oxazepam) ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) 40-120 ชั่วโมง 8-15 ชั่วโมง และ 5-15 ชั่วโมง ตามลำดับ (Inomata et al., 2005) จากนั้นจะถูกแปลงสภาพต่อโดยกระบวนการกลูคิวโลไนด์คอนจูเกชัน (glucolonide conjugation) ก่อนถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ อาการไม่พึงประสงค์จากฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางที่พบส่วนใหญ่คือ ง่วงซึม กล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน สูญเสียการควบคุมการเคลื่อนไหว สับสน มึนงง เวียนศีรษะ ใจสั่น ชีพจรเต้นเร็ว นอกจากนี้อาจเกิดภาวะสูญเสียความจำชั่วขณะ มีรายงานการเกิดอาการระคายเคืองทางเดินอาหารและพบปฏิกิริยาทางผิวหนัง อาการไม่พึงประสงค์ที่อาจพบได้จากการใช้ยาฉีดไดอะซีแพมคือ ภาวะหลอดเลือดดำอักเสบ (phlebitis) และภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด (venous thrombosis) (Mandelli et al., 1978)



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของไดอะซีแพม (Mandelli et al., 1978)

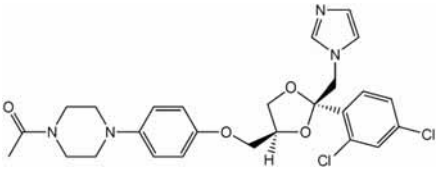
นอกจากนี้ยังพบการออกฤทธิ์ของไดอะซีแพมต่อระบบอื่นๆ ได้แก่ ตับและเนื้อเยื่อของต่อมไร้ท่อที่ใช้ในการผลิตฮอร์โมน (endocrine steroidogenic tissues) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แมคโครเฟจและลิมโฟไซต์ เซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง (Han et al., 2003) โดยพบการเพิ่มขึ้นของเซลล์เนื้องอกในตับ (Venturini et al., 1999) รังไข่ ลำไส้ และเต้านม (Miettinen et al., 1995) โดยจะไปกระตุ้นโปรตีนตัวรับของเบนโซไดอะซีพีน ที่อยู่นอกระบบประสาทส่วนกลาง (peripheral benzodiazepine receptor) ซึ่งตัวรับดังกล่าวเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของไมโตคอนเดรียพบการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิดด้วยกัน เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เซลล์ค้ำจุนประสาท (microglia) และแอสโตรไซท์ (astrocyte) อัณฑะ รังไข่ ต่อมหมวกไต (adrenal gland)

(Papadopoulos et al., 2006) ตัวรับของเบนโซไดอะซีพีนดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับชีววิทยาของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) การตายของเซลล์ (apoptosis) การหายใจของเซลล์และการควบคุมการสร้างสเตียรอยด์ (steroid) การแสดงออกของโปรตีนตัวรับของเบนโซไดอะซีพีนที่อยู่นอกระบบประสาทส่วนกลางนี้มีระดับเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับพัฒนาการของการเจริญและการรุกรานของเซลล์เนื้องอก (tumour progression and aggressiveness) เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งตับ รวมถึงเซลล์เนื้องอกเกลีย (glioma) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้องอกในสมองและไขสันหลัง (Brown et al., 2000) โดยพบว่าหากมีการแสดงออกของโปรตีนนี้เพิ่มขึ้นอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เนื้องอกจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากการทำลายเซลล์ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายแล้ว เมื่อเซลล์ตายจะมีการผลิตอนุมูลอิสระออกมาก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในอวัยวะต่างๆ ตามมาด้วย (Harrison, 2002)

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar ด้วยไดอะซีแพมของ Abdelmajeed ในปี 2009 โดยการให้ไดอะซีแพม ขนาด 10 mg/kg ทางปากเพียงครั้งเดียว ซึ่งเป็นขนาดยาที่สามารถทำอันตรายต่อตับ ไต และหัวใจ พบว่าระดับของแซนทีนออกซิเดส (xantine oxidase) และไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในตับหนูขาวมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลา บ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยไดอะซีแพมที่สัมพันธ์กับเวลาที่ยาวนานขึ้น (Abdelmajeed, 2009)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยคีโตโคนาโซล

คีโตโคนาโซล (ketoconazole) (รูปที่ 3) เป็นยาต้านเชื้อราในกลุ่มอิมิดาโซล (imidazoles) สามารถใช้รักษาได้ทั้งการติดเชื้อราในกระแสเลือดและบริเวณผิวหนัง ยาถูกดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารและจับกับพลาสมาโปรตีนได้ดี ที่เหลือร้อยละ 15 จับกับเม็ดเลือดแดงและประมาณร้อยละ 1 อยู่ในรูปคีโตโคนาโซลอิสระยาถูกเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็วได้เมแทบอไลท์ที่ไม่มีฤทธิ์ในการรักษาซึ่งถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดี (Schürmeyer and Nieschlag, 1984) การเมแทบอลิซึม คีโตโคนาโซลจะเพิ่มขึ้นถ้าให้ร่วมกับยาที่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ (enzyme inducer) เช่น ไรแฟมพิน (rifampin) นอกจากนี้ยังพบว่าคีโตโคนาโซลสามารถยับยั้งการทำงานของไซโตโครมพี 450 (cytochromes P450) ด้วย โดยเฉพาะ CYP3A4 (Moody et al., 2004) คีโตโคนาโซลจะกระจายตัวในสารคัดหลั่งทางช่องคลอด (vaginal fluid) และคีราติโนไซต์ (keratinocytes) ได้ดี แต่กระจายตัวเข้าสู่น้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) ได้ค่อนข้างน้อย (ความเข้มข้นของยาใน CSF จะมีประมาณร้อยละ 1-5 ของความเข้มข้นของยาในเลือด)



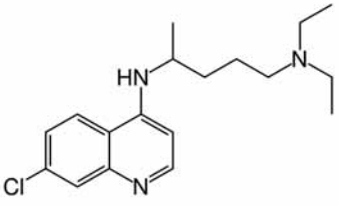
รูปที่ 3 โครงสร้างของคีโตโคนาโซล (Schürmeyer and Nieschlag, 1984)

คีโตโคนาโซลทำให้ระดับของอะมิโนทรานเฟอเรส (aminotransferase) ในพลาสมาเพิ่มขึ้นแต่ระดับของเอนไซม์จะกลับเข้าสู่สภาพปกติเมื่อใช้ยานานระยะเวลาหนึ่ง นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดตับอักเสบ (hepatitis) ได้แต่พบไม่บ่อย ผลการตรวจการทำงานของตับทางห้องปฏิบัติการจะคล้ายกับตับอักเสบชนิด A (hepatitis A) มีรายงานการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันโดยการใช้คีโตโคนาโซลในหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley (Rodriguez and

Buckholz, 2003) พบว่า คีโตโคนาโซลขนาด 40 และ 90 mg/kg โดยการป้อนทางปากเพียงครั้งเดียวและทำการวัดปริมาณของ ALT และระดับของ GSH ในกระแสเลือดทันที และ 24 ชั่วโมงหลังการให้ยา พบการเพิ่มขึ้นของระดับ ALT ในขณะที่ปริมาณ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาที่ได้รับยา จากการศึกษานี้พบว่าคีโตโคนาโซลกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันโดยการจับกับ GSH ในร่างกายก่อให้เกิดเมแทบอไลท์ที่เป็นพิษ (toxic metabolite) ส่งผลให้มีอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในขณะที่ปริมาณของ GSH ลดลง เกิดความไม่สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจึงเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันตามมา สอดคล้องกับการศึกษาของ Amin และ Hamza ในปี 2005 ที่ทำการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูขาวสายพันธุ์ Wistar ด้วยคีโตโคนาโซล ขนาด 100 mg/kg โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องเพียงครั้งเดียว พบว่าระดับเอนไซม์ SOD และ GSH ในตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่ปริมาณ MDA เพิ่มสูงขึ้นบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชันจากการชักนำด้วยคีโตโคนาโซล (Amin and Hamza, 2005)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยคลอโรควิน

คลอโรควิน (chloroquine) (รูปที่ 4) เป็นสารในกลุ่มอะมิโนควิโนลีน (4-aminoquinoline) ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้โดยยับยั้งการสร้างฮีโมซอยน์ (hemozoin) ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อมาลาเรียทำลายฮีโมโกลบินแล้วเปลี่ยนให้เป็นฮีโมซอยน์และทำให้เกิดการสะสมของฮีมอิสระจนเป็นพิษต่อเชื้อ นอกจากนั้นคลอโรควินยังทำให้ค่าความเป็นกรด/ด่างของฟูดแวคิวโอล (food vacuole) ซึ่งเป็นถุงสำหรับกักเก็บอาหารของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นส่งผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในฟูดแวคิวโอและรบกวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของเชื้อด้วย ปัจจุบันเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มักจะดื้อต่อคลอโรควิน เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีการพัฒนากลไกที่ใช้ขับยาออกจากฟูดแวคิวโอลโดยใช้กระบวนการผลักยาออก (efflux transporter) ทำให้ระดับของคลอโรควินลดลงได้



รูปที่ 4 โครงสร้างของคลอโรควิน (Daher et al., 2006)

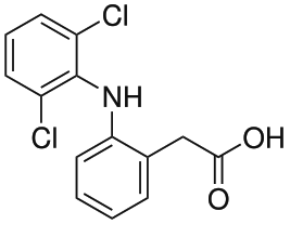
คลอโรควินกระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชันโดยการทำลายไมโตคอนเดรียส่งผลให้การขนส่งอิเล็กตรอนโดย NADH และ flavin adenine dinucleotide (FADH) ในวัฏจักรต่างๆ เสียไปซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระทั้งภายในไมโตคอนเดรียเองและในเซลล์ส่งผลให้มีการตายของเซลล์จากการทำลายไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงานและผลิตออกซิเจนให้แก่เซลล์ (Duchen, 2004)

จากการศึกษาของ Kumar และคณะในปี 2013 โดยการให้คลอโรควินในหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss albino ขนาด 360 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้ในการรักษา และขนาด 1,000 และ 2,000 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดที่เป็นพิษต่อตับ โดยการป้อนทางปากครั้งเดียว พบว่าการทำงานของเอนไซม์ตับ ALT และ AST เพิ่มมากขึ้นบ่งชี้ว่ามีการทำลายตับมากขึ้น และเมื่อศึกษาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันโดยเทคนิค Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) พบการเพิ่มขึ้นของ MDA ในตับหนูที่ได้รับคลอโรควินในขนาดที่เป็นพิษ แสดงถึงการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันที่เพิ่มมากขึ้นในตับ นอกจากนี้ยังพบระดับของเอนไซม์ CAT และ SOD ลดลง บ่งชี้ถึงการทำงานของระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดลงจากการเพิ่มมากขึ้นของอนุมูลอิสระ (Kumar et al., 2013)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยไดโคลฟีแนค

ไดโคลฟีแนค (diclofenac) (รูปที่ 5) เป็นยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal inflammatory drugs, NSAIDs) มีโครงสร้างหลักเป็นฟินิลลามีน (phenylamine) มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดและอักเสบ เช่น เกาต์กำเริบ (gouty arthritis) ข้ออักเสบ (bursitis) เอ็นกล้ามเนื้ออักเสบ (tendinitis) เป็นต้น ตัวยามีฤทธิ์ระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร (Berenguer et al., 2007; Gómez-Lechón et al., 2003) ไดโคลฟีแนคถูกเมแทบอลิซึมที่ตับด้วย 2 วิถี โดยวิถีแรกเอนไซม์ hCYP2C9 เร่งให้เกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4' ได้อนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ 4-hydroxy-diclofenac วิถีต่อมาเอนไซม์ hUGT2B7 ในมนุษย์ (เอนไซม์ UGT2B1 ในหนูขาว) เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน จากนั้น acylglucuronide จะถูกเอนไซม์ hCYP2C8 เร่งให้เกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' ได้อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ 4'-hydroxydiclofenac acylglucuronide เมแทบอไลต์ทั้งสองที่เกิดขึ้นนี้สามารถขับออกได้ทางน้ำดีและปัสสาวะ (Boelsterli, 2003; Gómez-Lechón et al., 2003)

ไดโคลฟีแนคสามารถชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ตับได้ แต่กลไกยังไม่ชัดเจน ทราบเบื้องต้นว่าเกิดโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไดโคลฟีแนค ทำให้เกิดการสร้าง RNS (จากฟินิลลามีน) หรือไอออนบวก รวมถึง 1'4'-diclofenac quinoneimine (มาจาก 4'-OH diclofenac) หรือ 2,5-diclofenac quinoneimine (มาจาก 5'-OH diclofenac) ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยารีดอกซ์และส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ตับได้ (Boelsterli, 2003)



รูปที่ 5 โครงสร้างของไดโคลฟีแนค (Boelsterli, 2003)

Yano และคณะ (2012) ศึกษาผลของไดโคลฟีแนคต่อตับหนูถีบจักรเพศเมียสายพันธุ์ BALB/cCrSlc พบว่าการให้ไดโคลฟีแนคความเข้มข้นตั้งแต่ 80 และ 120 mg/kg โดยการฉีดเข้าช่องท้องส่งผลให้ระดับของเอนไซม์ ALT และ AST ในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและจากจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อตับพบการตายของเนื้อเยื่อตับด้วย (Yano et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาในอวัยวะอื่นด้วย โดย Hickey และคณะ (2001) ศึกษาผลของไดโคลฟีแนคต่อไตหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ ICR โดยการให้ไดโคลฟีแนคความเข้มข้นตั้งแต่ 100, 200 และ 300 mg/kg โดยการป้อนทางปากครั้งเดียวพบว่าระดับของยูเรียไนโตรเจนในซีรั่ม (BUN) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การเมแทบอลิซึมของโปรตีนและอัตราการขับของโปรตีนเสียออกจากไตนั้น มีค่าเพิ่มขึ้นตามขนาดของไดโคลฟีแนคที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงการถูกทำลายของไตโดยไดโคลฟีแนค ในขณะเดียวกันระดับของ MDA ในซีรั่มและระดับของเอนไซม์ CAT ก็มีค่าเพิ่มขึ้นตามขนาดของไดโคลฟีแนค สอดคล้องกับรายงานของ Berenguer และคณะ (2007) ที่ทำการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียสายพันธุ์ Wistar โดยการป้อนไดโคลฟีแนค 100 mg/kg ทางปากเพียงครั้งเดียวและพบการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Berenguer et al., 2007; Hickey et al., 2001)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารเคมีหรือโลหะหนัก

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์

คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride; CCl_4) เป็นตัวทำละลายที่ใช้มากทางอุตสาหกรรม เช่น ใช้ทำความสะอาดพื้นพรม การสูดดมสัมผัสไอของ CCl_4 จะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตา จมูก คอ เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดศีรษะ ถ้าสูดดมปริมาณมากอาจทำให้ชักและตายได้จากการกดระบบประสาทส่วนกลาง ส่วนอาการพิษที่เกิดขึ้นภายหลัง (delayed toxic effects) ได้แก่ พิษต่อตับและไต (hepatotoxic and nephrotoxic) (Boll et al., 2001) กลไกที่เป็นพิษต่อตับเกิดขึ้นจากเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระไตรคลอโรเมธิล เช่น $-CCl_3$ หรือ Cl_3COO ซึ่งเกิดขึ้นภายในร่างกายโดยมี cytochrome-P450-dependent monooxygenase เป็นตัวเร่งโดย $-CCl_3$ จะทำปฏิกิริยากับไขมันและโปรตีนของเนื้อเยื่อตับและอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันเชิงซ้อน (polyenoic lipid) ของเอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) (Link et al., 1984)

การศึกษาการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันในตับหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar ของ Ebaid และคณะในปี 2013 ด้วย CCl_4 ขนาด 1 ml/kg ในพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว พบว่าระดับ H_2O_2 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น บ่งชี้ถึงการเกิดอนุมูลอิสระในกระแสเลือด และพบปริมาณ MDA ในตับเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่ปริมาณของ GSH และระดับของเอนไซม์ CAT ลดลง นอกจากนั้นยังพบการแสดงออกของยีน *Fas* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) เพิ่มขึ้น ในขณะที่พบการแสดงออกที่ลดลงของยีน *Akt1* และ *IFN-* γ ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้ถึงการมีชีวิตของเซลล์และการกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจตามลำดับ (Ebaid et al., 2013)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยโครเมียม

โครเมียม (chromium, Cr) เป็นโลหะหนักที่มีการใช้งานทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง มีลักษณะเป็นโลหะแข็ง เปราะ สีเทา Cr ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจและการดูดซึมผ่านทางเดินอาหาร และถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยทางปัสสาวะ มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 15-41 ชั่วโมง มีสถานะออกซิเดชันหลายสถานะและที่พบมากที่สุด คือ chromium (III) และ chromium (VI) โดยที่ Cr (III) เป็นสถานะที่มีความเสถียรมากที่สุดแต่ Cr (VI) ถูกดูดซึมได้ดีกว่า Cr (III) Cr เป็นธาตุที่จำเป็นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในร่างกาย โดย Cr (III) เป็นส่วนหนึ่งในกลูโคสโทเลอรานซ์แฟคเตอร์ (Glucose Tolerance Factor, GTF) ซึ่งประกอบไปด้วย Cr (III) 1 โมเลกุล วิตามินบี 3 หรือไนอาซิน 2 โมเลกุลและกรดอะมิโน 3 ตัวคือ ไกลซีน (glycine) ซีสเตอีน (cysteine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) GTF จะช่วยเพิ่มการทำงานของอินซูลินซึ่งมีหน้าที่ในการนำกลูโคสในเลือดเข้าไปในเซลล์เพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นพลังงานสำรอง โดย GTF จะไปเพิ่มความไวของตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ให้สามารถเปิดรับกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Vincent, 2002) ส่วน Cr (VI) มีความเป็นพิษสูงสุดและจัดเป็นสารก่อมะเร็ง ในร่างกาย Cr (VI) จะถูกเปลี่ยนเป็น Cr (III) ที่จับกับโปรตีนทรานสเฟอริง (transferring) ในพลาสมาแล้วกระจายไปทั่วร่างกาย Cr (VI) มีความเป็นพิษสูงเนื่องจากมีฤทธิ์เป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) และมีฤทธิ์ระคายเคืองเนื้อเยื่อต่างๆ นอกจากนี้ Cr (VI) ยังสามารถจับและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกโดยการเปลี่ยน $O_2^{\cdot-}$ ภายในเซลล์ให้เป็น H_2O_2 และ OH^- ในที่สุด (Jomova and Valko, 2011)

Wang และคณะ (2006) ทำการศึกษาผลของ Cr (VI) ต่อตับของหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์

Swiss albino พบว่าหนูที่ได้รับ Cr (VI) ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/kg เป็นเวลา 1-5 วัน มีปริมาณ ROS ในตับเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับระดับของเอนไซม์ CAT ที่ลดลงในตับหนูที่ได้รับ Cr (VI) 50 mg/kg เป็นเวลา 1-5 วัน และระดับของเอนไซม์ SOD ที่ลดลงหลังการได้รับ Cr (VI) 25 mg/kg นาน 5 วัน ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้แสดงถึงภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ตับจาก Cr (VI)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยแคดเมียม

แคดเมียม (cadmium) เป็นโลหะหนักเนื้ออ่อน มีสีขาว ฟ้า วาว ในอากาศที่มีความชื้นแคดเมียมจะถูกออกซิไดซ์ช้าๆ ให้แคดเมียมออกไซด์ ในธรรมชาติแคดเมียมมักจะอยู่รวมกับกำมะถันเป็นแคดเมียมซัลไฟด์ และมักปนอยู่ในสินแร่สังกะสี ตะกั่ว หรือทองแดง โลหะแคดเมียมถูกนำมาเป็นส่วนผสมของอมาลกัมในทันตกรรม ผลิตภัณฑ์ที่มีแคดเมียมเป็นส่วนประกอบหากได้รับความร้อนสูงเกินจุดหลอมเหลว (321 องศาเซลเซียส) จะเกิดควันของแคดเมียม (Cadmium fumes) (Al-Nasser, 2000) การสะสมของแคดเมียมในร่างกายก่อให้เกิดอาการพิษได้ (Bagchi et al., 1996)

แคดเมียมสามารถละลายได้ทั้งในกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ มีรายงานพิษของแคดเมียมจากการดื่มน้ำมะนาวที่บรรจุในภาชนะที่ฉาบด้วยแคดเมียม เนื่องจากความเป็นกรดของน้ำมะนาวสามารถละลายแคดเมียมออกมาปนเปื้อนได้ ปริมาณของแคดเมียมมากกว่า 300 mg อาจทำให้คนตายได้ แต่แคดเมียม 10 mg เป็นปริมาณต่ำสุดที่แสดงอาการพิษอย่างชัดเจน อาการพิษเฉียบพลันของแคดเมียมโดยการรับประทาน ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ มีน้ำลายไหล ปวดท้อง ไต และตับถูกทำลาย (Prozialeck et al., 2006) ในขณะที่อาการพิษจากการสูดดมควันของแคดเมียม ได้แก่ เจ็บหน้าอก หายใจถี่ มีกลิ่นโลหะในปาก ไอมีเสมหะเป็นฟองหรือมีเสมหะเป็นเลือด อ่อนเพลีย และปอดอักเสบอาการพิษเรื้อรังจากการหายใจควันของแคดเมียม คือ ไอ สูญเสียการรับกลิ่น น้ำหนักลด โลหิตจาง (anemia) หายใจลำบาก ตับและไตถูกทำลาย (Rikans and Yamano, 2000)

กลไกการเกิดพิษต่อตับยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าไอออนของแคดเมียมจะเข้าไปจับกับหมู่ไธออล (thiol groups) ของสารที่ใช้ในการปกป้องเซลล์ของร่างกาย ได้แก่ GSH และ เมทัลโลไธโอนีน (metallothionein) แล้วได้เป็นสารประกอบของแคดเมียม-ไธออล (cadmium–thiol complexes) ซึ่งสามารถรบกวนการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงโครงสร้างของโปรตีนและตัวรับ (Prozialeck et al., 2008) ในระยะแรกของการบาดเจ็บของเซลล์ตับแคดเมียมจะเข้าไปจับกับหมู่ไดซัลไฟด์ (sulfhydryl groups) นำไปสู่การทำงานที่ผิดปกติของไมโตคอนเดรียและเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและจากการที่แคดเมียมจับกับ GSH จะทำให้เกิดภาวะพร่อง GSH เกิดพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ตับและเกิดภาวะเซลล์ตับขาดเลือดจากการบาดเจ็บของหลอดเลือด sinusoidal endothelial ตามมาด้วยการกระตุ้นให้มีการแทรกตัวเข้ามาในหลอดเลือดของเซลล์อักเสบได้แก่ แมคโครฟาจและนิวโตรฟิลล์ อีกทั้งกระตุ้นการแทรกตัวเข้ามาของคัฟเฟอร์เซลล์ร่วมกับการรบกวนการทำงานของระบบไซโตไคน์ (cytokines) เคโมไคน์ (chemokine) ในเซลล์ตับ (Rikans and Yamano, 2000) ในปี 2012 Radosavljevi และคณะชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในตับหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar โดยการฉีดแคดเมี่ยมขนาด 2.5 mg/kg 5 ครั้ง ทุก 12 ชั่วโมง เข้าทางช่องท้อง พบว่าระดับของเอนไซม์ SOD ในตับเพิ่มขึ้นทั้งในรูป total SOD, CuZn-SOD และ Mn-SOD (Radosavljević et al., 2012)

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารหนู

สารหนู (arsenic, As) พบได้ในเหมืองเหล็กและเถ้าภูเขาไฟ ภาคอุตสาหกรรมใช้สารหนูในการหลอมตะกั่ว เงินหรือทอง As ในทางอุตสาหกรรมมี 2 ประเภทได้แก่ สารหนูอินทรีย์ เช่น arsenobetaine และสารหนูอนินทรีย์ โดยสารหนูอนินทรีย์มีพิษสูงกว่า นอกจากนี้เมื่อ As ทำปฏิกิริยากับกรดจะเกิดก๊าซอาร์ซีน (AsH_3) ที่เป็นก๊าซพิษ มีกลิ่นคล้ายกระเทียม การเทน้ำร้อนลงไปในโลหะที่มี As สามารถทำให้เกิดก๊าซชนิดนี้ได้เช่นกัน

สารประกอบของ As จะถูกดูดซึมได้โดยการรับประทาน การหายใจ หรือการซึมผ่านผิวหนัง และเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและสะสมในตับ ไต กล้ามเนื้อ กระดูก ผิวหนังและเส้นผม As^{3+} จะจับกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl groups) และรบกวนการทำงานของระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานของเซลล์ การเมแทบอลิซึมของ GSH และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้การสัมผัสกับ As จะทำให้เกิดการสะสมในผิวหนัง ผมและเล็บ ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายเกิดเป็นจุดดำตามผิวหนัง

Ince และคณะ (2013) ชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss albino โดยการให้ดื่มน้ำผสม As ความเข้มข้น 100 mg/l เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ระดับ MDA เพิ่มขึ้นทั้งในเลือด สมอง ตับ ไต และหัวใจส่วนระดับ GSH ลดลงในเลือด สมอง ตับ ไต และหัวใจและระดับของเอนไซม์ SOD และ CAT ในเม็ดเลือดแดงลดลงและมีแนวโน้มลดลงในสมอง ตับ ไต และหัวใจ (Ince et al., 2013)

จากการศึกษาของ Gao และคณะ (2013) ที่ชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูถีบจักรเพศเมียสายพันธุ์ Kunming โดยผสมโซเดียมอาร์เซไนต์ ($NaAsO_2$) ลงในน้ำดื่มความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/l โดยเฉลี่ย (ซึ่งเท่ากับการได้รับ $NaAsO_2$ 2.08 ± 0.07, 10.41 ± 0.43 และ 19.86 ± 0.94 mg/kg ตามลำดับ) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า $NaAsO_2$ ตั้งแต่ 10 mg/ml ขึ้นไป ส่งผลให้ระดับ MDA เพิ่มขึ้น ส่วนระดับ GSH ทั้งในเลือดและตับและระดับ GPx นั้นมีค่าลดต่ำลงเมื่อได้รับ $NaAsO_2$ ตั้งแต่ 50 mg/l ขึ้นไป (Gao et al., 2013) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar (Flora, 1999) ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยให้ As ความเข้มข้น 100 ppm ผสมกับน้ำดื่ม (โดยเฉลี่ยเท่ากับการได้รับ As 12 mg/kg) เป็นเวลา 12 สัปดาห์พบว่าระดับของ GSH ในตับและสมองลดต่ำลงแต่ระดับ MDA และ oxidized glutathione (GSSG) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ แสดงถึงภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจากการได้รับ As ส่วนหนูที่ได้รับ NAC ทางปากติดต่อกัน 5 วันร่วมด้วย พบว่าอัตราส่วนของ GSH/GSSG ในตับและสมองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่สามารถเพิ่มจนใกล้เคียงกับระดับปกติได้

นอกจากนี้ยังพบการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยการใช้แบคทีเรียก่อโรค ซึ่งจากการศึกษาของ MacMicking และคณะ (1997) ในหนูถีบจักรลูกรุ่นที่ 1 และ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ 129/SvEv และ C57BL/6 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และให้เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยฉีดเข้าเส้นเลือด ความเข้มข้น 10^5 CFU พบว่าระดับของ NO ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาภายหลังการได้รับเชื้อ 1, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูถีบจักร จากรายงานการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองสามารถสรุปเป็นแนวทางได้ (รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รูปแบบการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลอง

	Experimental animal	Sex		Dose	Route of administration	Affected organs				References
		male	female			blood	liver	kidney	others	
Drugs										
Paracetamol	Swiss albino	✓		300 - 640 mg/kg, single dose	intragastric	✓	✓			Singh et al., 2011; Mladenovic et al., 2009; Yousef et al., 2010
				250 mg/kg, 7 days	intragastric		✓			Olaleya and Rocha, 2008
			✓	375 mg/kg, single	intragastric		✓			Arnalz et al., 1995
	Wistar	✓		650 - 3,500 mg/kg, single dose	intragastric		✓			Kostopanagiotou et al., 2009
Diazepam	Wistar	✓		10 mg/kg, single	intragastric		✓			Abdelmajeed, 2009
Ketoconazole	Sprague-Dawley	✓		40 – 90 mg/kg, single dose	intragastric	✓	✓			Rodriguez and Buckholz, 2003
	Wistar	✓		100 mg/kg, single	intraperitoneal		✓			Amin and Hamza, 2005
Chloroquine	Swiss albino	✓		360 – 2,000mg/kg, single dose	intragastric	✓	✓			Kumar et al., 2013
Diclofenac	BALB/cCrSlc		✓	80 - 120 mg/kg, single dose	intraperitoneal	✓	✓			Yano et al., 2012
	ICR	✓		100 - 300mg/kg, single dose	intragastric	✓	✓	✓		Hickey et al., 2001
	Wistar	✓	✓	100 mg/kg, single dose	intragastric				stomach	Berenguer et al., 2007
Chemicals/Heavy metals										
Carbon tetrachloride	Wistar	✓		1 ml/kg, single	intraperitoneal	✓	✓			Ebaid et al., 2013
Chromium	Swiss albino	✓		25 – 50 mg/kg, 1-7 days			✓			Wang et al., 2006
Cadmium	Wistar	✓		2.5 mg/kg, 5 doses	intraperitoneal		✓			Radosavljevic et al., 2012
Arsenic	Swiss albino	✓		100 mg/l, 28 days	drinking water	✓	✓	✓	brain, heart	Ince et al., 2013
	Kunming		✓	10 - 100 mg/l, 6 weeks	drinking water	✓	✓			Gao et al., 2013
	Wistar	✓		10 mg/l, 12 weeks	drinking water	✓	✓			Flora, 1999
Pathogen										
Mycobacterium tuberculosis	129/SvEv Í C57BL/6	✓	✓	10^5 CFU	intravenous	✓				Macmiking et al., 1997

สรุปผลการวิจัย

การชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองสามารถทำได้ทั้งการใช้ยาและสารเคมี โดยขนาด ความถี่ และการบริหารยาจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิด/สายพันธุ์ของสัตว์ทดลองและอวัยวะเป้าหมาย แต่ที่นิยมปฏิบัติและให้ผลมากที่สุดมักเป็นการป้อนทางปาก อย่างไรก็ตามการชักนำภาวะเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลองยังมีข้อจำกัด เนื่องจากสารหรือยาบางชนิดยังไม่ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ที่ชัดเจนและยาบางชนิดสามารถชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้กับหลายอวัยวะ ทั้งยังอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อผู้วิจัย นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้แบคทีเรียก่อโรคในการชักนำให้หนูทดลองมีภาวะเครียดออกซิเดชันเพื่อให้ได้หนูทดลองที่เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันใกล้เคียงกับมนุษย์ เนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากหลายปัจจัย แต่มักเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการดำรงชีวิต อย่างไรก็ดีการพัฒนาสัตว์ทดลองยังไม่อิ่มตัวและยังจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไปเพื่อให้ได้สัตว์ทดลองตัวแบบที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัยและส่งผลต่อผลการศึกษาที่เชื่อถือได้และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง

References

Abdelmajeed NA. Diazepam-induced oxidative stress in rat different organs. *Res J Med Medical Sci* 2009; 4(2):295-302.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garret C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(10): 1634-1650.

Al-Nasser IA. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38(4):407-413.

Amin A, Hamza AA. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: A possible role of DNA fragmentation. *Toxicology* 2005; 208(3):367-375.

Arnaiz SL, Llesuy S, Cutrín JC, et al. Oxidative stress by acute acetaminophen adminis tration in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 1995; 19(3):303-310.

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, et al. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 52(2):143-154.

Bales JR, Jeremy K.Nicholson JK, et al. Two-dimensional proton nuclear magnetic resonance “Maps” of acetaminophen metabolites in human urine. *Clin Chem* 1985; 31(5):757-762.

Berenguer B, Trabadela C, Sánchez-Fidalgo S, et al. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(2):153-160.

Boelsterli UA. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 192(3): 307–322.

Boll M,Weber LW,Becker E,et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch C* 2001; 56(7-8):649-659.

Brown, RC, Degenhardt B, Kotoula M, et al. Locationdependent role of the human

glioma cell peripheral-type benzodiazepine receptor in proliferation and steroid biosynthesis. *Cancer Lett* 2000; 156(2):125-132.

Daher W, Biot C, Fandeur T, et al. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar J* 2006; 7:5-11.

Deavall DG, Martin EA, Horner JM, et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012; 2012:1-13.

Duchen MR. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 2004; 25(4): 365–451.

Ebaid H,Bashandy SA,Alhazza IM,et al.Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab (Lond)*2013; 10(1): 10-20.

Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clin Exp Pharmacol Physio*1999; 26(11): 865-869.

Gao S, Duan X, Wang X, et al. Curcumin attenuates arsenic-induced hepatic injuries and oxidative stress in experimental mice through activation of Nrf2 pathway, promotion of arsenic methylation and urinary excretion. *Food Chem Toxicol* 2013; 59:739-747.

Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, et al. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(11): 2155-2167.

Han Z, Slack RS, Li W, et al. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: Relationship to breast, corectal, and prostate tumor progression. *J Recept Signal Transduct Res* 2003; 23(2-3):225-238.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase :where are we now ? *Free Radic Biol Med* 2002; 33(6): 774-797.

Hickey EJ, Raje RR, Reid VE, et al. Diclofenac induced *in vivo* nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(2):139-152.

Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 2010; (196): 369-405.

Ince S, Kucukkurt I, Turkmen R, et al. Dietary *Yucca schidigera* supplementation reduces arsenic-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Toxicol Ind Health* 2013; 29(10):904-914.

Inomata S,Nagashima A, Itagaki F, et al. CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78(6):647-655.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011; 283(2-3):65-87.

Kostopanagiotou GG, Grypioti AD, Matsota P, et al. Acetaminophen-induced liver injury and oxidative stress: protective effect of propofol. *Eur J Anaesthesiol* 2009; 26(7):548-553.

Kumar MS, Singh P, Rath SK. Protective effect of quercetin on chloroquine-induced oxidative stress and hepatotoxicity in mice. *Malar Res Treat* 2013; doi: 10.1155/ 2013/141734

Link B, Dürk H, Thiel D, et al. Binding of trichloromethyl radicals to lipids of the hepatic endoplsmic reticulum during tetrachloromethane metabolism. *Biochem J* 1984;223(3):577–586.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R,et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(10):5243-5248.

Mandelli M,Tognoni G,Garattini S. Clinical pharmacokinetics of diazepam.*Clin Pharmacokinet* 1978;3(1):72-91.

Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, et al. Expression of peripheral-type benzo diazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: Relationship to cell proliferation. *Cancer Res* 1995; 55(12):2691-2695.

Mladenovi D, Ninkovi M, Vu evi D, et al. The effects of ethanol on paracetamol-induced oxidative stress in mice liver. *J Serb Chem Soc* 2013; 78(2):179-195.

Mladenovi D, Radosavljevi T, Ninkovi M, et al. Liver antioxidant capacity in the early phase of acute paracetamol-induced liver injury in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(4):866-870.

Moody DE, Walsh SL, Rollins DE,et al. Ketoconazole, a cytochrome P450 3A4 inhibitor, markedly increases concentrations of levo-acetyl-alpha-methadol in opioid-naive individuals. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76(2):154-166.

Olaleye MT, Rocha BT. Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59(5): 319-327.

Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, et al. Peripheral-typebenzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurologicaldisorders. *Neuroscience* 2006; 138(3):749-756.

Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidants in Food: Practical Applications. *Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, England* 2001; 12(1):147-154.

Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci* 2006; 79(16): 1493–1506.

Prozialeck WC, Edwards JR, Nebert DW, et al. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sci* 2008;102(2): 207-218.

Radosavljevi T, Mladenovi D, Ninkovi M, et al. Oxidative stress in rat liver during acute

cadmium and ethanol intoxication. *J Serb Chem Soc* 2012; *77*(2):159–176.

Rikans LE,Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(2):110-117.

Rodriguez, RJ, Buckholz, CJ. Hepatotoxicity of ketoconazole in Sprague–Dawley rats: Glutathione depletion, flavin-containing-monooxygenases-mediated bioactivation and hepatic covalent binding. *Xenobiotica* 2003; 33:429–441.

Schürmeyer T, Nieschlag E. Effect of ketoconazole and other imidazole fungicides on testosterone biosynthesis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 105(2):275-280.

Singh S, Singh SK,Kumar M,et al. Ameliorative potential of quercetin against paracetamol-induced oxidative stress in mice blood. *Toxicol Int* 2011; 18(2):140-145.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.

Venturini I, Alho H, Podkletnova I, et al. Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver. *Life Sci* 1999; 65:2223-2231.

Vincent JB.The biochemistry of chromium.*J Nutr* 2002;130(4):715-718.

Wang XF, Xing ML, Shen Y, et al. Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* 2006; 228(1):16-23.

Ward B, Alexander-Williams JM. Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain* 1999; 2(3):139-149.

Yano A, Higuchi S, Tsuneyama K, et al. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Toxicology* 2012; 293(1-3):107-114.

Yousef MI, Omar SA, El-Guendi MI, et al. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(11):3246-3261.