Original Article

ผลของสารสกัดแคลลัสหม่อนและมัลเบอร์โรไซด์เอต่อระดับกลูตาไธโอนในตับหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล

ยลดา ศรีเศรษฐ์[1], วราภรณ์ ภูตะลุน[2], วรัญญา จตุพรประเสริฐ[3]*

[1] นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44000 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (ศทพ.) กรุงเทพมหานครฯ 10400

[2] ปร.ด. รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

[3] ปร.ด. อาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44000

***ติดต่อผู้นิพนธ์:** วรัญญา จตุพรประเสริฐ อาจารย์สาขาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44000
โทรศัพท์: 043-754121 โทรสาร: 043-754121 อีเมล์: waranya.c@msu.ac.th

บทคัดย่อ

ผลของสารสกัดแคลลัสหม่อนและมัลเบอร์โรไซด์เอต่อระดับกลูตาไธโอนในตับหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล

ยลดา ศรีเศรษฐ์[1], วราภรณ์ ภูตะลุน[2], วรัญญา จตุพรประเสริฐ[3]*

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2559; 12(1) : 49-60

รับบทความ : 24 พฤศจิกายน 2558 **ตอบรับ :** 29 เมษายน 2559

บทนำ: หม่อน (*Morus alba* Linn.) ในการแพทย์แผนไทยเป็นยาขับเหงื่อ ปกป้องตับและไต มัลเบอร์โรไซด์เอ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในหม่อน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องตับ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของสารสกัดแคลลัสหม่อนด้วยเมธานอล (MA) และมัลเบอร์โรไซด์เอ (MBS) ต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตับและระดับกลูตาไธโอนในตับของหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล **วิธีดำเนินการวิจัย:** หนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ ได้รับพาราเซตามอล 400 มก./กก./วัน โดยการป้อนทางปาก ร่วมกับเอ็นอะซิทิลซิสเตอีน (NAC) 300 มก./กก./วัน หรือ MBS 50 มก./กก./วัน หรือ MA 250, 500, และ 1,000 มก./กก./วัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ติดต่อกัน 7 วัน ขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสร้อยละ 0.5 ทำการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับโดยการย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน ร่วมกับการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และออกซิไดซ์ (GSSG) และสมรรถนะเอนไซม์กลูตา ไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) **ผลการวิจัย:** เนื้อเยื่อตับเกิดการบาดเจ็บหลังจากได้รับพาราเซตามอลโดยพิจารณาจากลักษณะสำคัญทางจุลพยาธิวิทยา คือ นิวเคลียสเหี่ยว (pyknosis) ร่วมกับการมีปริมาณ GSH, GSSG และสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อตับในหนูที่ได้รับ NAC, MBS และ MA ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับเพียงพาราเซตามอลเท่านั้น สอดคล้องกับปริมาณ GSH และ GSSG รวมถึงสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับ MBS และ MA **สรุปผลการวิจัย:** พาราเซตา มอลส่งผลลดระดับกลูตาไธโอนและสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในตับทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการบาดเจ็บของเซลล์ตับของหนูถีบจักร MBS และ MA มีประสิทธิผลในการปกป้องตับโดยการเพิ่มปริมาณกลูตาไธโอนและสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ดังนั้น MBS และ MA จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นยาทางเลือกหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพช่วยปกป้องตับได้

คำสำคัญ: หม่อน; มัลเบอร์โรไซด์เอ; กลูตาไธโอน; ภาวะเครียดออกซิเดชั่น; พาราเซตามอล

Effects of Extract of *Morus alba* Linn. Callus and Mulberroside A on Glutathione Profiles in Paracetamol-Induced Oxidative Stress Mouse Livers

Yonlada Sriset[1], Waraporn Putalun[2], Waranya Chatuphonprasert[3]*

[1] Graduate student (M.Sc. program in Health Sciences), Faculty of Medicine, Mahasarakam University, Mahasarakham 44000 and Center of Excellence on Medical Biotechnology (CEMB)/PERDO, Bangkok 10400

[2] Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) Associate Professor, Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[3] Ph.D. (Research and Development in Pharmaceuticals) Lecturer, Faculty of Medicine, Mahasarakam University, Mahasarakham 44000

***Corresponding author:** Waranya Chatuphonprasert , Preclinic Division, Faculty of Medicine, Mahasarakam University, Mahasarakham 44000 Tel: 043-754121 Fax: 043-754121 E-mail: waranya.c@msu.ac.th

Abstract

Effects of Extract of *Morus alba* Linn. Callus and Mulberroside A on Glutathione Profiles in Paracetamol-Induced Oxidative Stress Mouse Livers

Yonlada Sriset[1], Waraporn Putalun[2], Waranya Chatuphonprasert[3]*

IJPS, 2016; 12(1) : 49-60

Received : 24 November 2015 **Accepted :** 29 April 20163

Introduction: *Morus alba* Linn. (Mulberry) has been used in Thai traditional medicine as a perspiration drug, and as a hepatoprotective and nephroprotective agent. Mulberroside A is the major bioactive compound of *M. alba,* possessing antioxidant and hepatoprotective activities. The objective of this study was to evaluate the effect of methanolic extract of *M. alba* callus (MA) and mulberroside A (MBS) on hepatic histopathology and the glutathione profile of livers of mice with paracetamol-induced oxidative stress. **Methods:** Seven-week-old male ICR mice were given paracetamol (400 mg/kg/day, p.o.), in combination with N-acetylcysteine (NAC) (300 mg/kg/day, i.p.), or MBS (50 mg/kg/day, i.p.), or MA (250, 500 and 1,000 mg/kg/day, i.p.) for 7 consecutive days, while the control group received the vehicle, 0.5% carboxymethylcellulose. Histopathological examination of the liver tissue was by hematoxylin and eosin staining and the reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents, and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined. **Results:** Injury of hepatic tissue after receiving paracetamol was observed as pyknosis, the characteristic histopathology of necrosis and apoptosis. In addition, the levels of GSH and GSSG, and the activity of GPx were significantly decreased in mice receiving paracetamol. Treatment of paracetamol-induced oxidative stress mice with NAC, MBS, and MA reduced the hepatic tissue injury compared to the controls, in accordance with increased GSH and GSSG levels. Treatment with MBS and MA also significantly increased GPx activity. **Conclusion:** Paracetamol treatment diminished the glutathione profile and GPx activity in mouse livers leading to oxidative stress and hepatic injury. MBS and MA exhibited effective hepatoprotective activity by improving the glutathione profile and GPx activity. Therefore, MBS and MA may be worth further development as alternative medicines or health supplement products for hepatoprotection.

Keywords: *Morus alba*; mulberroside A; glutathione; oxidative stress; paracetamol

บทนำ

ตับเป็นอวัยวะหลักของร่างกายที่มีหน้าที่สำคัญ เช่น ผลิตน้ำดี สังเคราะห์โปรตีน เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกาย ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรค กำจัดสารพิษและของเสียออกนอกร่างกาย เป็นต้น หากตับสูญเสียการทำงานจะส่งผลให้ร่างกายเกิดความผิดปกติต่างๆ ที่สำคัญ คือ มีน้ำในช่องท้อง ตัวตาเหลืองหรือโรคดีซ่าน ตับอักเสบ และการติดเชื้อรุนแรงของร่างกาย (Polson and Lee, 2005) สาเหตุสำคัญที่ทำให้ตับได้รับความเสียหาย ได้แก่ การดื่มแอลกอฮอล์ การได้รับพิษของโลหะหนัก ความผิดปกติของภูมิต้านทาน หรือการได้รับพิษจากยา ซึ่งที่พบได้บ่อย คือ พิษจากการได้รับพาราเซตามอลเกินขนาด (D'Agata and Balistreri, 1999)

พาราเซตามอล (paracetamol) หรือ อะเซตามิโนเฟน (acetaminophen) เป็นยาสามัญประจำบ้านเพื่อบรรเทาปวดและลดไข้ การได้รับพาราเซตามอลขนาดปกตินั้นร่างกายจะมีกลไกในการเปลี่ยนแปลงยาที่ตับเพื่อกำจัดออกจากร่างกาย โดยร้อยละ 95 ของยาถูกกำจัดผ่านกระบวนการกลูคิวโรนิเดชั่น (glucoronidation) และซัลเฟชั่น (sulfation) แล้วถูกขับออกทางปัสสาวะ อีกร้อยละ 5 จะถูกกำจัดผ่านเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2อี1 (cytochrome p450 2e1) ในตับและเกิดผลผลิตเป็นสารพิษ คือ N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) ซึ่งสามารถเข้าจับกับกลูตาไธโอน (glutathione) เป็นสารที่ไม่มีพิษและถูกขับออกทางปัสสาวะ การได้รับพาราเซตามอลเกินขนาดจะทำให้ปริมาณของ NAPQI มากเกินกว่าความสามารถของกลูตาไธโอนที่จะกำจัดได้หมด (Vale and Proudfoot, 1995) ทำให้ NAPQI ถูกสะสมในร่างกายและก่อให้เกิดพิษต่ออวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะตับ นอกจากนี้ NAPQI ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมาก (James *et al*., 2003) เกิดความไม่สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น ทำให้มีการทำลายเซลล์และอวัยวะต่างๆ ดังนั้นการรักษาสมดุลของกลูตาไธโอนจึงมีความสำคัญต่อการลดพิษในตับ เนื่องจากกลูตาไธโอนมีหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์หรือต่อต้านอนุมูลอิสระและกำจัดสารพิษในร่างกาย (Kals *et al*., 2008) และเป็นสารที่พบมากในตับซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการสังเคราะห์กลูตาไธโอน การศึกษาวิจัยค้นคว้าพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ปกป้องตับหรือป้องกันพิษต่อตับจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้ในการป้องกันหรือลดการทำลายตับได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อร่างกาย

หม่อน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* Linn. เป็นพืชสมุนไพรที่มีสารสำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สติลบีนอยด์ (stilbenoids) เป็นต้น รายงานวิจัยพบว่าสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สำคัญ (Rice-Evans *et al*., 1997) หม่อนมี มัลเบอร์โรไซด์เอ (mulberroside A) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบมากที่สุดในส่วนของราก ร้อยละ 0.51 รองลงมาพบในส่วนเปลือกไม้ ร้อยละ 0.26 และลำต้น ร้อยละ 0.02 (Jin *et al*., 2013) มัลเบอร์โรไซด์เอเป็นสารกลุ่มสติลบีนอยด์ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้ออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) (Komaikul *et al*., 2014) ที่มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการปกป้องตับ (Shi *et al*., 2008) ต้านอนุมูลอิสระ (Aftab *et al*., 2010) ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tengamnuay *et al*., 2006) และต้านไวรัส (Galindo *et al*., 2011; Lipipun *et al*., 2011) เป็นต้น หม่อนในทางการแพทย์แผนไทยใช้เป็นยาขับเหงื่อ ปรับสมดุลของธาตุในร่างกาย บำรุงตับและไต (Wuttidhammaved, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อนในการปกป้องตับ จึงมีความเป็นไปได้ว่าหม่อนมีศักยภาพในการปกป้องหรือลดพิษในตับได้จากคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่จะป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระและช่วยเสริมสร้างระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Shapoval and Gromovaia, 2003) อย่างไรก็ตามยังไม่พบข้อมูลการวิจัยสนับสนุนฤทธิ์ของหม่อนในการปกป้องตับจากพิษของพาราเซตามอล การศึกษานี้จึงใช้สารสกัดแคลลัสหม่อนและมัลเบอร์โรไซด์เอ ซึ่งแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพื้นฐานของระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนต่างๆของพืชได้ เช่น ใบ, ลำต้น, ราก เป็นต้น และวิธีการนี้ทำให้ได้ปริมาณหม่อนเป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้นและได้สารสำคัญมากกว่าการเพาะปลูกหม่อนแบบธรรมชาติ (Yoshimatsu, 2008; Komaikul *et al*., 2014) จึงเลือกนำแคลลัสมาทำการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อมุ่งศึกษาผลของสารสกัดแคลลัสหม่อนและมัลเบอร์โรไซด์เอต่อระดับกลูตาไธโอน ประกอบด้วยกลูตาไธโอนรูปแบบรีดิวซ์ (reduced glutathione หรือ GSH) และรูปแบบออกซิไดซ์ (oxidized glutathione หรือ GSSG) ในตับหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล รวมทั้งการศึกษาสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase หรือ GPx) ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญต่อการรักษา

สมดุลของระดับ กลูตาไธโอนภายในตับ และการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (hematoxyline and eosin, H&E) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลภาคหรือพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับ ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนศักยภาพของสารสกัดแคลลัสหม่อนและมัลเบอร์โรไซด์เอในการพัฒนาต่อยอดเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อปกป้องตับต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ: เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (SUNRISE, Tecan, Austria Gmbh) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Model 2-16K, Sartorius, Germany) เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับเพลทชนิด 96 หลุม (Model LMC-3000, Biosan®, Latvia) เครื่องทำให้แห้งโดยการเยือกแข็ง (Scanvac, Sweden) เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Model SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Major Science®, Taiwan)

สารเคมี: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Vivantis Ins (Selangor Darul Ehsan, Malaysia), glutathione reductase (GR), β-nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate (NADPH), 5-sulfosalicylic acid (SSA), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione peroxidase (GPx) และ 4-vinylpyridine (4-VP) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)

การเตรียมสารสกัดแคลลัสหม่อน

การเพาะเลี้ยงแคลลัสหม่อน นำใบอ่อนของต้นหม่อนมาล้างด้วยน้ำประปา แล้วนำไปแช่ในเอธานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 10 และร้อยละ 5 ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10 นาที เติมน้ำสบู่เหลว (Tween 20) 1-2 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำใบอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่มีไธไดอะซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรด 1-แนฟทาลีนอะซิติก (1-naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสหม่อนถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน (Saensouk and Suddee, 2004; Komaikul *et al*., 2014)

เนื้อเยื่อแคลลัสหม่อนที่อบแห้งแล้วนำมาแช่ในสารละลายไฮโดรเมธานอล (hydromethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ก่อนนำสารละลายแคลลัสหม่อนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนแล้วทำให้แห้งโดยวิธีเยือกแข็ง สารสกัดแคลลัสหม่อนเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป สารสกัดแคลลัสหม่อนมีมัลเบอร์โรไซด์เอ ร้อยละ 10.3 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Komaikul *et al*., 2014)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย นำมาเลี้ยงดูแลในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย โดยให้ได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดเวลา ห้องเลี้ยงสัตว์ควบคุมอุณหภูมิที่ 23±2 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน พักสัตว์ทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองเป็นไปตามข้อเสนอการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (AEKKU44/2556)

การแบ่งกลุ่มการศึกษา

หนูถีบจักร แบ่งออกเป็น 12 กลุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) ประกอบด้วย 1) กลุ่มควบคุม (control) ได้รับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ทางช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 2) กลุ่มที่ได้รับเอ็น อะซิทิลซิสเตอีน (*N*-acetylcysteine หรือ NAC) ขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทางช่องท้อง 3) กลุ่มที่ได้รับ มัลเบอร์โรไซด์เอ (MBS) ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทางช่องท้อง 4) - 6) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแคลลัสหม่อน (MA) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ ทางช่องท้อง 7) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล (Para) ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยการป้อนทางปาก (per oral, p.o.) 8) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยการป้อนทางปากร่วมกับเอ็นอะซิทิลซิสเต

อีนขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทางช่องท้อง (Para+NAC) 9) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยการป้อนทางปากร่วมกับมัลเบอร์โรไซด์เอขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทางช่องท้อง (Para+MBS) 10) - 12) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยการป้อนทางปากร่วมกับสารสกัดแคลลัสหม่อนขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ ทางช่องท้อง (Para+MA250, Para+MA500, Para+MA1000 ตามลำดับ) โดยทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน และหลังการให้สารทดสอบครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง ทำการการุณฆาตหนูถีบจักร และแยกตับเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับ (Histopathological examination)

เนื้อเยื่อตับแช่ในสารละลายฟอร์มาลิน (formalin) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) การทำให้ใส (clearing) และการนำเนื้อเยื่อไปผ่านการแทรกพาราฟิน (infiltration) ก่อนนำเนื้อเยื่อเข้าบล็อกด้วยพาราฟิน แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนา 5 ไมครอน ตรึงเนื้อเยื่อให้ติดสไลด์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสไลด์ตัวอย่างย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (hematoxyline and eosin, H&E) หลังจากอบสไลด์ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำสไลด์ที่ได้ให้เป็นสไลด์ถาวร (permount) เพื่อนำไปตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (Jearapong *et al*., 2015) และบันทึกรูปเซลล์ตับด้วยกล้อง Nikon รุ่น Eclipse TS100 ร่วมกับโปรแกรม NIS element D เวอร์ชั่น 3.2

การตรวจวัดระดับกลูตาไธโอนในรูปของปริมาณกลูตาไธโอนรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และรูปแบบออกซิไดซ์ (GSSG) ในตับหนูถีบจักร

ตัวอย่างตับหนูบดละเอียดในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (potassium phosphate buffer saline, PBS) pH 7 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ แล้วนำไปหาปริมาณกลูตาไธโอนรวม โดยการตกตะกอนสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างด้วย SSA ความเข้มข้น ร้อยละ 5 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ปิเปตส่วนใสด้านบน (supernatant) มาเจือจาง 5 เท่าด้วย SSA แล้วนำไปผสมกับสารละลายปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย PBS, GR และ DTNB ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม NADPH ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ กลูตาไธโอนรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน GSH (Kondo *et al*., 2011; Chatuphonprasert *et al*., 2012)

สำหรับการหาปริมาณ GSSG มีขั้นตอนเช่นเดียวกับการหาปริมาณกลูตาไธโอนรวม ดังกล่าวข้างต้น แต่นำส่วนใสด้านบนของตัวอย่างมาเติม 4-VP บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนการเติมสารละลายปฏิกิริยาและ NADPH จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ GSSG ของตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน GSSG (Kondo *et al*., 2011; Chatuphonprasert *et al*., 2012) ส่วนปริมาณ GSH คำนวณจากผลต่างระหว่างปริมาณกลูตาไธโอนรวมและ GSSG

การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ GPx

ตัวอย่างตับหนูบดละเอียดใน PBS ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำออกมาเติม GSH ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ สุดท้ายเติม SSA ความเข้มข้นร้อยละ 5 ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,900 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที นำส่วนใสด้านบนมาเติม 4-VP บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนผสมกับสารละลายปฏิกิริยาของ PBS, GR และ DTNB จากนั้นเติม NADPH และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร สมรรถนะของเอนไซม์ GPx คำนวณจากปริมาณ GSSG ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน GPx (Chatuphonprasert *et al*., 2012)

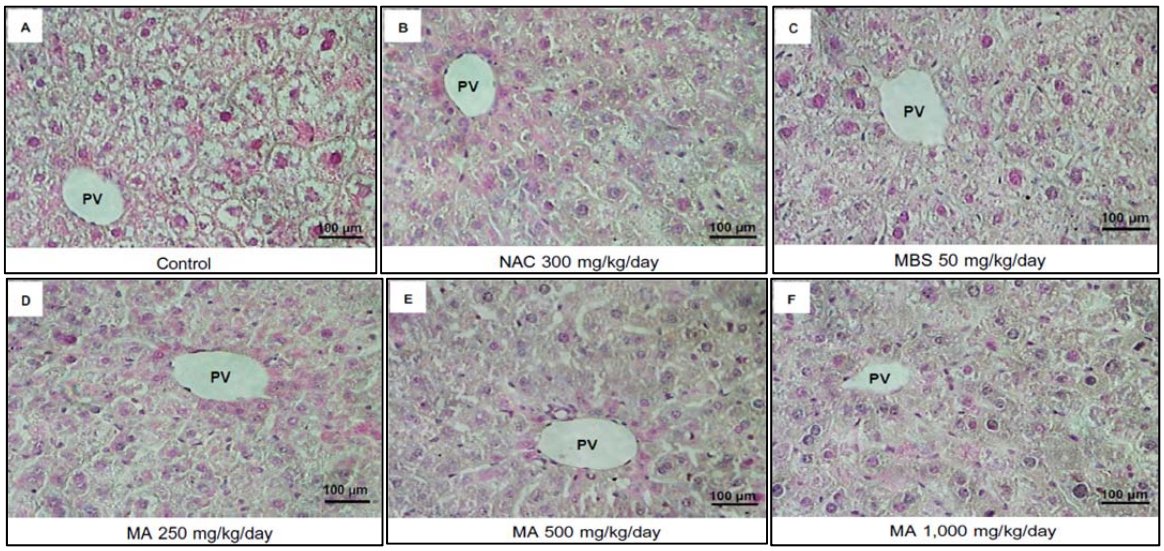
การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ร่วมกับการทดสอบแบบ Fisher's Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS (statistical package for the social science) เวอร์ชั่น 22.0 (ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

ผลการวิจัย

ผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับ

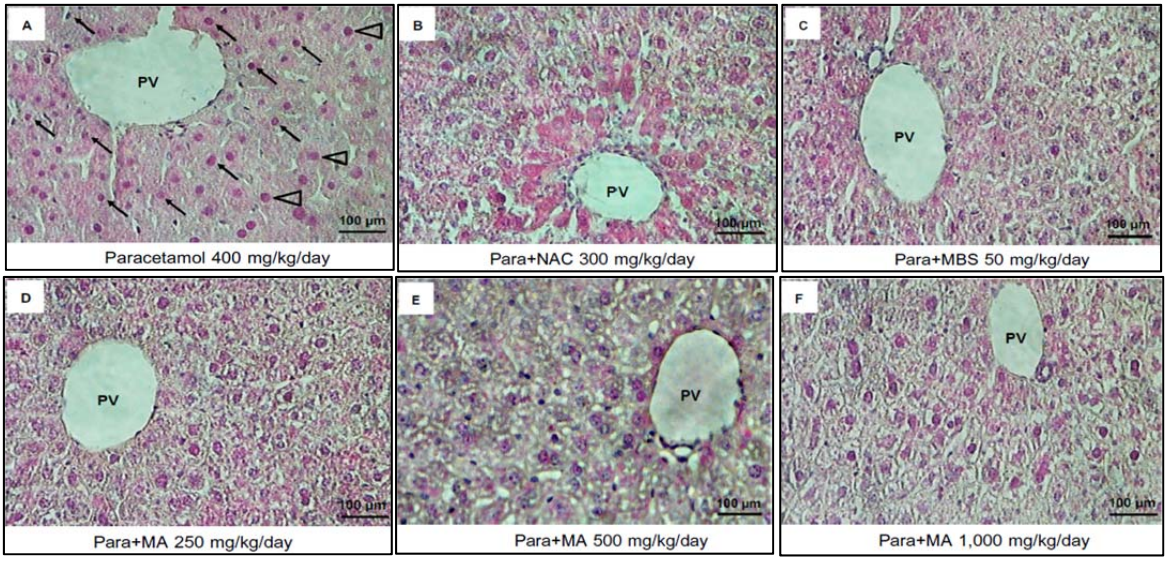
จากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูถีบจักรพบว่า NAC (รูปที่ 1B) มัลเบอร์โรไซด์เอ (รูปที่ 1C) และสารสกัดแคลลัสหม่อนทุกขนาด (รูปที่ 1D-F) ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับที่แสดงถึงความผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1A) โดยเซลล์ตับมีการจัดเรียงตัวเป็นปกติ เป็นแถวกระจายในแนวรัศมีรอบหลอดเลือดดำ (portal vein) และเซลล์มีขอบเขตที่ชัดเจน (รูปที่ 1B-F)



รูปที่ 1 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับของหนูถีบจักร ด้วยวิธีการย้อมสี H&E และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า; Control, กลุ่มควบคุม; NAC, เอ็นอะซิทิลซิสเตอีน (300 mg/kg/day, i.p.); MBS, มัลเบอร์โรไซด์เอ (50 mg/kg/day, i.p.); MA 250, 500 และ 1,000, สารสกัดแคลลัสหม่อน (250, 500 และ 1,000 mg/kg/day, i.p.ตามลำดับ); PV = หลอดเลือดดำ (portal vein)

ส่วนหนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล พบเซลล์ตับที่มีความผิดปกติ คือมีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบกระจัดกระจายออกจากหลอดเลือดดำ เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากหกเหลี่ยมเป็นค่อนข้างกลมรีและมีขอบเขตไม่ชัดเจน นิวเคลียสมีรูปร่างเปลี่ยนแปลง คือ มีลักษณะเหี่ยว อัดกันแน่นและย้อมติดสีเข้มขึ้น (pyknosis) ซึ่งแสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ตับจากพาราเซตามอลเกินขนาด (รูปที่ 2A) เมื่อให้พารา เซตามอลร่วมกับ NAC (รูปที่ 2B) มัลเบอร์โรไซด์เอ (รูปที่ 2C) และสารสกัดแคลลัสหม่อนขนาดเดียวกับในหนูปกติ (รูปที่ 2D-F) พบว่าเซลล์ตับได้รับความเสียหายลดลงและมีลักษณะของเซลล์ที่ใกล้เคียงกับหนูปกติ (รูปที่ 1A)

ดังนั้นมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนจึงมีประสิทธิผลในการปกป้องตับได้โดยสามารถลดการบาดเจ็บของตับจากภาวะเครียดออกซิเดชั่นที่เหนี่ยวนำด้วยพาราเซตามอล



รูปที่ 2 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล ด้วยวิธีการย้อมสี H&E และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า; Para, พาราเซตามอล (400 mg/kg/day, p.o.); NAC, เอ็นอะซิทิลซิสเตอีน (300 mg/kg/day, i.p.); MBS, มัลเบอร์โรไซด์เอ (50 mg/kg/day, i.p.); MA 250, 500 และ 1,000, สารสกัดแคลลัสหม่อน (250, 500 และ 1,000 mg/kg/day, i.p. ตามลำดับ); PV = หลอดเลือดดำ (portal vein); ← แสดงการจัดเรียงตัวของเซลล์ตับไม่เป็นระเบียบและกระจัดกระจายออกจากหลอดเลือดดำ; ◁ แสดงนิวเคลียสเหี่ยวและย้อมติดสีเข้ม (pyknosis); B-F, นิวเคลียสไม่เหี่ยวและไม่พบการอักเสบของตับ

ผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อระดับกลูตาไธโอนในตับ

การตรวจวัดระดับกลูตาไธโอนรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) พบว่า หนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลมีระดับ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ในขณะที่ NAC มัลเบอร์โรไซด์เอ และสารสกัดแคลลัสหม่อนทุกขนาดสามารถเพิ่มระดับ GSH ในหนูที่ได้รับพาราเซตามอลได้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ในขณะที่การตรวจวัดระดับกลูตาไธโอนรูปแบบออกซิไดซ์ (GSSG) นั้นพบว่า หนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลมีระดับ GSSG ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) และ NAC มัลเบอร์โรไซด์เอ และสารสกัดแคลลัสหม่อนสามารถเพิ่มระดับ GSSG ในหนูที่ได้รับพาราเซตามอลได้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิผลของทั้งมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนในการปรับสมดุลของกลูตาไธโอนโปรไฟล์ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับพาราเซตามอลเพื่อการปกป้องตับจากอนุมูลอิสระและลดความเป็นพิษจากพาราเซตามอล

ตารางที่ 1 ผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อระดับกลูตาไธโอนในรูปของปริมาณ GSH และ GSSG ในตับหนูถีบจักร

Treatment[1]	GSH (nmole/mg protein)	GSSG (nmole/mg protein)
Control	450.6±6.8	89.9±0.9
NAC	428.7±5.5*	95.1±0.7*
MBS	332.6±7.7*	49.1±6.3*
MA 250	263.6±2.5*	45.2±1.7*
MA 500	427.6±1.3*	66.9±6.1*
MA 1000	454.4±20.3	71.3±4.1*

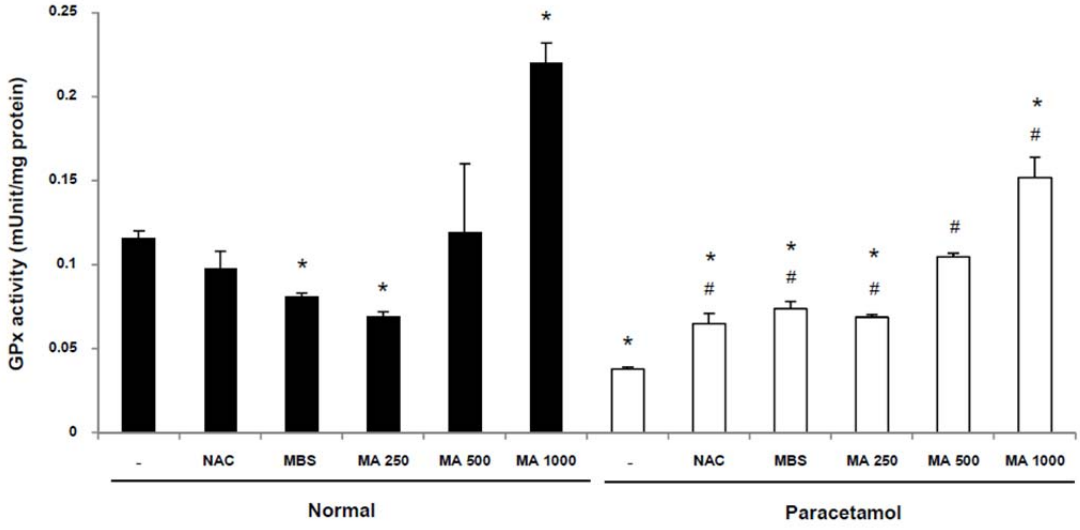
Treatment[1]	GSH (nmole/mg protein)	GSSG (nmole/mg protein)
Para	101.7±9.2*	21.9±1.2*
Para+NAC	186.4±7.4*#	50.8±2.8*#
Para+MBS	223.7±18.4*#	62.6±1.4*#
Para+MA 250	236.5±14.0*#	51.8±6.1*#
Para+MA 500	323.7±7.8*#	72.8±8.1*#
Para+MA 1000	370.1±7.8*#	85.7±0.7#

*หมายเหตุ [1]Control, หนูกลุ่มควบคุม; Para, หนูกลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอล (400 mg/kg/day, p.o.); NAC, เอ็นอะซิทิลซิสเตอีน (300 mg/kg/day, i.p.); MBS, มัลเบอโรไซด์เอ (50 mg/kg/day, i.p.); MA 250, 500 และ 1,000, สารสกัดแคลลัสหม่อน (250, 500 และ 1,000 mg/kg/day, i.p., ตามลำดับ); *p<0.05 VS Control, #p<0.05 VS Para

ผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

การศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในหนูปกติ พบว่า NAC และสารสกัดแคลลัสหม่อน ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ GPx แต่มัลเบอร์โรไซด์เอ ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และสารสกัดแคลลัสหม่อน ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ส่งผลให้สมรรถนะของเอนไซม์ GPx ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดแคลลัสหม่อน ขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3)

ในขณะที่สมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่า NAC มัลเบอร์โรไซด์เอ และสารสกัดแคลลัสหม่อนทุกขนาด ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในตับหนูถีบจักร Normal, หนูปกติ; Paracetamol, หนูที่ได้รับพาราเซตามอล (400 mg/kg/day, p.o.); NAC, เอ็นอะซิทิลซิสเตอีน (300 mg/kg/day, i.p.); MBS, มัลเบอโรไซด์เอ (50 mg/kg/day, i.p.); MA 250, 500 และ 1,000, สารสกัดแคลลัสหม่อน (250, 500 และ 1,000 mg/kg/day, i.p., ตามลำดับ); *p<0.05VS Control, #p<0.05 VS Para

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การได้รับพาราเซตามอลเกินขนาดก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นและความเป็นพิษต่อตับ (Shah and Deval, 2011) เนื่องจากการอิ่มตัวของกระบวนการกำจัดยาที่ตับผ่านกระบวนการกลูคิวโรนิเดชั่นและซัลเฟชั่นทำให้ไม่สามารถกำจัดพาราเซตามอลออกจากร่างกายได้หมด ส่วนที่เหลือจึงต้องถูกกำจัดด้วยวิถีของเอนไซม์ไซโตโครม พี450 2อี1 ส่งผลให้มีปริมาณของ NAPQI ที่มากเกินความสามารถของกลูตาไธโอนภายในตับจะกำจัดได้หมด จึงเกิดการสะสมของ NAPQI มากจนก่อให้เกิดพิษต่อตับและเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากโดยเฉพาะอนุมูลอิสระออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species หรือ ROS) (James *et al*., 2003) ส่งผลรบกวนสมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระและเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในร่างกาย (Somparn, 2013)

กลูตาไธโอน (glutathione, γ-glutamyl-L-cysteinyl glycine) เป็นไตรเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ กลูตาเมต (glutamate) ซิสเตอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) โดยตับเป็นเนื้อเยื่อหลักในการสังเคราะห์ กลูตาไธโอนและเป็นอวัยวะที่มีกลูตาไธโอนมากที่สุด ภาวะปกติกลูตาไธโอนร้อยละ 98 เป็น GSH และส่วนที่เหลือเป็น GSSG (Caciatore *et al*., 2010) กลูตาไธโอนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระและกำจัดสารพิษในร่างกาย อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นต้น ดังนั้นหากร่างกายมีระดับของกลูตาไธโอนลดลงจะส่งผลให้เซลล์และอวัยวะต่างๆ ทำงานผิดปกติก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ ดังนั้นการรักษาสมดุลของกลูตาไธโอนจึงมีความสำคัญต่อเซลล์ของสิ่งชีวิต (Erfan *et al*., 2011) จากการศึกษาผลของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อระดับ กลูตาไธโอนในตับของหนูถีบจักรปกติพบว่า มัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อน ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่รบกวนระดับของ GSH และ GSSG ในขณะที่สมรรถนะของเอนไซม์ GPx ลดลง แต่อย่างไรก็ดีไม่ได้มีผลบ่งชี้ถึงความเป็นพิษของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนซึ่งยืนยันได้ด้วยผลการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่แสดงให้เห็นถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ตับ เช่น นิวเคลียสไม่เหี่ยว เซลล์ตับไม่บวม และไม่พบการอักเสบของตับ เป็นต้น อีกทั้งในสภาวะปกติร่างกายจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นไม่มากจึงมีความต้องการ GSH น้อยในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งระดับของ GSH, GSSG และสมรรถนะของเอนไซม์ GPx จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากในร่างกาย โดย GSH จะทำลายอนุมูลอิสระด้วยการแลกเปลี่ยนอิเลคตรอนกับอนุมูลอิสระทำให้โครงสร้างของ GSH ต้องถูกเปลี่ยนไปเป็น GSSG โดยการทำงานของเอนไซม์ GPx (Kidd, 1997) และจากการศึกษาพบว่าสารสกัดแคลลัสหม่อนขนาดสูงสุด (1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ GSH แต่ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้สูงเพียงพอต่อการเพิ่มระดับของ GSH และการเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในขณะที่ระดับของ GSSG ไม่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งสนับสนุนการมีสภาวะที่ปกติของร่างกายที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นน้อยและไม่มีผลบ่งชี้ถึงความเป็นพิษที่ยืนยันได้ด้วยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเช่นเดียวกับการได้รับมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนอีกสองขนาดในการศึกษาครั้งนี้

การเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นในหนูถีบจักร โดยการป้อนพาราเซตามอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำให้ตับเกิดพยาธิสภาพจากพิษของพาราเซตามอลโดยเลียนแบบพฤติกรรมการใช้ยาของผู้บริโภคที่พบได้บ่อย ผลจากการศึกษาพบว่า หนูถีบจักรที่ได้รับพาราเซตามอลมีลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ตับที่เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ตับปกติทั้งนี้เนื่องจาก NAPQI สามารถชักนำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอได้ทำให้ดีเอ็นเอและนิวเคลียสสูญเสียสภาพการทำงานปกติ (Hamza and Al-Harbi, 2015) จึงส่งผลให้นิวเคลียสเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีลักษณะที่เรียกว่า pyknosis อีกทั้งยังทำให้เซลล์ตับเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลักษณะค่อนข้างกลมรีที่มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาไปสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสได้ (Hinson *et al*., 2004) สอดคล้องกับการลดลงของระดับ GSH และ GSSG ร่วมกับการลดลงของสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ซึ่งแสดงให้เห็นถึงภาวะพร่องกลูตา ไธโอนในตับส่งผลให้มีปริมาณกลูตาไธโอนไม่เพียงพอต่อการกำจัด NAPQI ออกจากร่างกายและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ตับ (James *et al*., 2003) อีกทั้งระบบต้านอนุมูลอิสระถูกรบกวนจากปริมาณอนุมูลอิสระที่มากขึ้น ซึ่งแสดงถึงภาวะเครียดออกซิเดชั่นที่ถูกเหนี่ยวนำโดยพาราเซตามอล สอดคล้องกับการศึกษาของ Meyers และคณะ (1988) ที่รายงานว่า NAPQI สามารถจับกับโปรตีนในไมโตคอนเดรียส่งผลให้ไมโตคอนเดรียสูญเสียหน้าที่จึงไม่สามารถผลิตพลังงานในรูป ATP ที่

จำเป็นต่อกระบวนการสร้าง NADPH ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ซึ่งการลดลงของ NADPH จะส่งผลต่อการลดสมรรถนะของเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเทส (glutathione reductase) ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน GSSG ไปเป็น GSH ดังนั้นจึงทำให้มีระดับ GSH ซึ่งเป็นรูปแบบที่พร้อมกำจัดอนุมูลอิสระในปริมาณที่ลดลง (Caciatore, 2010) ในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Tiwari และ Khosa (2009) ที่พบว่าการได้รับพาราเซตามอลเกินขนาดทำให้ตับถูกทำลายได้โดยการส่งผลลดสมรรถนะของเอนไซม์ GPx

การได้รับมัลเบอร์โรไซด์เอ และสารสกัดแคลลัสหม่อนร่วมกับพาราเซตามอล พบว่าลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ตับมีความใกล้เคียงกับเซลล์ตับปกติ สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ GSH และ GSSG ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ที่ส่งผลให้มีปริมาณกลูตาไธโอนเพียงพอที่จะกำจัด NAPQI ออกจากร่างกาย (Francesco, 2009) หม่อนนอกจากจะมีมัลเบอร์โรไซด์เอ เป็นสารออกฤทธิ์หลักทางชีวภาพแล้วยังมีสารประกอบ ทุติยภูมิกลุ่มโพลีฟีนอลอื่นมาก (Qiu *et al*., 1996) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยเสริมการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Rice-Evans *et al*., 1996; Shapoval and Gromovaia, 2003) โดยทั้งมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ ของกลูตาไธโอนทั้งรูปแบบ GSH และ GSSG และเพิ่มสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ GPx เพื่อปกป้องตับจากอนุมูลอิสระ นอกจากนี้การได้รับ NAC ก็ให้ผลต่อกลูตาไธโอนโปรไฟล์ในลักษณะเช่นเดียวกันกับมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อน ทั้งนี้เนื่องจาก NAC เป็นยาต้านพิษพาราเซตามอลที่ใช้ในทางการแพทย์แผนปัจจุบันที่เป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์กลูตาไธโอนในร่างกาย จึงทำให้ NAC สามารถเพิ่มระดับของ GSH, GSSG และสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ได้ (Hodgman and Garrard, 2012)

เมื่อพิจารณาสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอลจะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับระดับของ GSSG กล่าวคือระดับของ GSSG จะแปรผันตามสมรรถนะของเอนไซม์ GPx เนื่องจากเอนไซม์นี้มีบทบาทในการเปลี่ยน GSH ไปเป็น GSSG (Caciatore, 2010) ดังนั้นหากสมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้นจะมีผลให้ระดับ GSSG เพิ่มขึ้นด้วย

จากผลการศึกษาทั้งหมดสนับสนุนฤทธิ์ปกป้องตับของมัลเบอร์โรไซด์เอ และสารสกัดแคลลัสหม่อน ที่สามารถลดความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ตับของหนูถีบจักรได้ ด้วยกลไกในการปกป้องตับโดยการเพิ่มระดับของกลูตาไธโอนรูปแบบต่างๆ ได้แก่ GSH และ GSSG รวมทั้งการเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยพาราเซตามอล ซึ่งนับเป็นสัตว์ตัวแบบที่เลียนแบบพยาธิสภาพที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับที่ใช้ระยะเวลาไม่นานและทำโดยง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงนับเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสนับสนุนการนำมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนไปพัฒนาต่อยอดเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพเพื่อการปกป้องตับต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกของมัลเบอร์โรไซด์เอและสารสกัดแคลลัสหม่อนต่อระบบต้านอนุมูลอิสระเพื่อสนับสนุนฤทธิ์การปกป้องตับของหม่อนให้มีความชัดเจนน่าเชื่อถือและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับทุนวิจัยและเครื่องมือปฏิบัติการวิจัย และขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับทุนสนับสนุนบางส่วนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

References

Aftab N, Likhitwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. Nat Prod Res 2010; 24: 1726-33.

Caciatore I, Cornacchia C, Pinnen F, Mllica A, Stefano AD. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. Molecules 2010; 15: 1242-64.

Chatuphonprasert W, Udomsuk L, Monthak O, Churikhit Y, Putalun W, Jarukamjorn K. Effect of *Pueraria mirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzyme in ovariectomized mice. J Pharm Pharmacol 2012; 65: 447-56.

D'Agata LD, Balistreri WF. Evaluation of liver disease in the pediatric patient. Pediatr Rev 1999; 20(11): 376-89.

Erfan N, Mirjam V, Dirk W, et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. Biochim Biophys Acta 2011; 1812(11): 1412-17.

Francesco M, Hariom Y, Upendra G, Amr H, Shalini J, Emilio M. Protective effect of a phytocompound on oxidative stress and DNA fragmentation against paracetamol induced-liver damage. Ann Hepatol 2009; 8(1): 50-6.

Galindo I, Hernaez B, Berna J, et al. Comparative inhibitory activity of the stilbene resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. Antiviral Res 2011; 9: 57-63.

Hamza RZ, Al-Harbi MS. Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplement. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(7): 521-31.

Hinson JA, Reid AB, Mccullough SS, James LP. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation reactive oxygen/nitrogen species and mitochondrial permeability transition. Drug Metab Rev 2004; 36: 805-22.

Hodgman JM, Garrard RA. A review of acetaminophen poisoning. Crit Care Nurs Clin North Am 2012; 28: 499-516.

James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab Dispos 2003; 31(12): 1499-506.

Jearapong N, Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K. Effect of tetrahydrocurcumin on the profiles of drug-metabolizing enzymes induced by a high fat and high fructose diet in mice. Chem Biol Interact 2015; 239: 67-75.

Jin Zhou, Shun-xiang Li, Wei Wang, et al. Variation in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth. Sci World J 2013; 2013: 1-7.

Kals J, Starkopf J, Zilmer M, et al. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. Int J Cardiol 2008; 125: 133-5.

Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. Altern Med Rev 1997; 1: 155-76.

Komaikul J, Kitisripanya T, Tanaka H, Sritularak B, Putalun W. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of mulberroside A in mulberry (*Morus alba* L.) using anti-mulberroside A polyclonal antibody. Food Anal Method 2014; 7(1): 58-63.

Kondo S, Chatuphonprasert W, Jaruchotikamol A, Sakuma T, Nemoto N. Cellular glutathione content modulates the effect of andrographolide on β-naphthoflavone-induced CYP1A1 mRNA expression in mouse hepatocytes. Toxicology 2011; 280(1-2): 18-23.

Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, et al. Topical cream- based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Res 2011; 91: 154-60.

Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of mitochondrial respiration in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 93: 378-87.

Polson J, Lee WM. The management of acute liver failure. Hepatology 2005; 41(5): 1179-97.

Qiu F, Komatsu K, Kawasaki K, Satio K, Yao XS, Kano Y. A novel stilbene glucoside, oxyresveratrol 3'-O-beta-glucopyranoside from the root bark of *Morus alba*. Planta Med 1996; 62(6): 559-61.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997; 2(4): 152-9.

Saensouk P, Suddee N. Effect of NAA and BA on callus and shoot formation of *Asparagus racemosus* Wild. KKU Res J 2004; 9(2): 31-9.

Shah VN, Deval K. Hepatoprotective activity of leaves of *Parkinsonia aculeate* Linn. against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. Int J Pharm 2011; 1(2): 59-66.

Shapoval GS, Gromovaia VF. Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. Ukr Biochem J 2003; 75(2): 5-13.

Shi L, Zhang Z, Jin J. Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from *Ramulus mori* against ethanol-induced hepatic damage. Environ Toxicol Phar 2008; 26: 325-30.

Somparn N, Jitvaropas R, Saenthaweesuk S, Thuppia A. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Polygonum odoratum* L. extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Thammasat Med J 2013; 13(4): 456-64.

Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansri I, Likhitwitayawuid K. Artocarpus lakoocha heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. Int J Cosmet Sci 2006; 28: 269-76.

Tiwari B, Khosa R. Hepatoprotective and antioxidant effect of Sphaeranthus indicus against acetaminophen–induced hepatotoxicity in rats. J Trop Med 2009; 6(2): 1-5.

Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. Lancet Neurol 1995; 346(8974): 547-52.

Wuttidhammaved W. The Rattanakosin pharmacy ancient book. Bangkok: Odian store; 2007.

Yoshimatsu K. Tissue culture of medicinal plant: Micropropagation, transformation and production of useful secondary of metabolites. Stud Nat Prod Chem 2008; 34: 647-752.