

ขนาดยาด้านวัณโรคมาตรฐานที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำความเป็นพิษต่อตับในหนูถีบจักร

ณัฐพล กุลเจริญวิรัตน์¹, ยลดา ศรีเศรษฐ², นัตตา สุขเกษม³, กนกวรรณ จารุกัจจา⁴, วรัญญา จตุพรประเสริฐ^{5*}

¹ นักศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต (นานาชาติ) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

² นักวิจัย กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

³ นักศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

⁴ пр.ด. รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

⁵ пр.ด. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

* ติดต่อผู้พิมพ์: วรัญญา จตุพรประเสริฐ อาจารย์สาขาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

โทรศัพท์: 043-754121 โทรสาร: 043-754121 อีเมล: waranya.c@msu.ac.th

บทคัดย่อ

ขนาดยาด้านวัณโรคมาตรฐานที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำความเป็นพิษต่อตับในหนูถีบจักร

ณัฐพล กุลเจริญวิรัตน์¹, ยลดา ศรีเศรษฐ², นัตตา สุขเกษม³, กนกวรรณ จารุกัจจา⁴, วรัญญา จตุพรประเสริฐ^{5*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2560; 13(1) : 52-62

รับบทความ : 31 สิงหาคม 2559

ตอบรับ : 3 มีนาคม 2560

ยาด้านวัณโรคสูตรปัจจุบันประกอบด้วยยาหลายชนิดที่จำเป็นต้องใช้ร่วมกันเป็นระยะเวลานาน เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาโรค และป้องกันการดื้อยา อาการข้างเคียงที่สำคัญของยาด้านวัณโรคคือการเกิดพิษต่อตับ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินขนาดยาด้านวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับเป็นโมเดลสัตว์ทดลองในการศึกษาพิษต่อตับ เพื่อการพัฒนาสารปกป้องตับจากพิษของยาด้านวัณโรคต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย: หนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ (กลุ่มละ 10 ตัว) ได้รับสูตรยาด้านวัณโรคมาตรฐาน (ไอโซไนอะซิด H, ไรแฟมพิซิน R, ไพราซินามิด Z และอีแทมบูทอล E) ในขนาดมากกว่าขนาดแนะนำในมนุษย์ 5 เท่า (HRZE-5) และ 10 เท่า (HRZE-10) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับโดยการย้อมสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน ร่วมกับการวิเคราะห์สมรรถนะเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) และเอนไซม์แคตาเลส (CAT) ในตับหนูถีบจักร

ผลการวิจัย: เนื้อเยื่อตับปรากฏจุลพยาธิสภาพหลังจากได้รับยาด้านวัณโรคทั้ง HRZE-5 และ HRZE-10 ในระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเกิดการบวมพองของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (Hydropic degeneration); นิวเคลียสของเซลล์แตก (Karyolysis) และมีแนวโน้มที่จะนำไปสู่การตายของเซลล์ตับ (Piecemeal necrosis) สมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตับหนูกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 ทั้งในหนูถีบจักรที่ได้รับยาเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

สรุปผลการวิจัย: ยาด้านวัณโรคทั้งสูตร HRZE-5 และ HRZE-10 ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อตับโดยการทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อและการลดลงของสมรรถนะเอนไซม์ SOD และ CAT ดังนั้นโมเดลยาด้านวัณโรคในการศึกษานี้ทั้งที่ระยะเวลา 7 และ 14 วันจึงเหมาะสมสำหรับการศึกษาพิษต่อตับจากยาด้านวัณโรคเพื่อค้นหาสารปกป้องตับต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษาเพียงสมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT อาจไม่สามารถสะท้อนถึงผลความเสียหายทั้งหมดที่เกิดขึ้น ดังนั้นลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญที่สนับสนุนผลการทดลองให้สามารถสะท้อนผลความเสียหายของตับได้อย่างแม่นยำ

คำสำคัญ: ยาด้านวัณโรค, แคตาเลส, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, หนูถีบจักร

Appropriate Dose of Standard Anti-Tuberculosis Regimen to Induce Hepatotoxicity in Mice

Nathaphon Kuncharoenwirat¹, Yollada Sriset², Nadta Sukkasem³, Kanokwan Jarukamjorn⁴,
Waranya Chatuphonprasert^{5*}

¹ Undergraduate student (Pharm. D. Program), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² Researcher, Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB),
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ Graduate student in M.Ps. (Pharmaceutics), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

⁴ 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

⁵ Ph.D. (Research and Development in Pharmaceuticals), Assistant Professor, Faculty of Medicine,
Maharakham University, Maharakham 44000

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

Abstract

Appropriate Dose of Standard Anti-Tuberculosis Regimen to Induce Hepatotoxicity in Mice

Nathaphon Kuncharoenwirat¹, Yollada Sriset², Nadta Sukkasem³, Kanokwan Jarukamjorn⁴, Waranya Chatuphonprasert^{5*}

IJPS, 2017; 13(1) : 52-62

Received : 31 August 2016

Accepted : 3 March 2017

The current regimen of anti-tuberculosis drugs has to combine several drugs for long period for the efficacy to cure the disease and prevent of drugs resistance. But the most important of anti-tuberculosis drugs is hepatotoxicity. This study aimed to investigate the appropriate dose of anti-tuberculosis drug regimen in animal model for further study to develop the new compound against anti-tuberculosis toxicity. **Methods:** The 7-week-old male ICR mice (n=10 per group) were given standard regimen of anti-tuberculosis (Isoniazid (H), Rifampicin (R), Pyrazinamide (Z), and Ethambutol (E) at 5 (HRZE-5) and 10 (HRZE-10) times the human normal dose for 7 and 14 days. After that, mouse livers were collected for histopathological examination using hematoxyline and eosin staining with analyzing the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). **Results:** The damage of hepatic tissue and the abnormality was observed after receiving anti-tuberculosis drug both of HRZE-5 and HRZE-10 for 7 and 14 days. Hydropic degeneration, Karyolysis and the trend to become Piecemeal necrosis of hepatic cells were observed. The hepatic SOD and CAT enzyme activities were significantly decreased in HRZE-5 and HRZE-10 groups in mice which were treated for 7 and 14 days. **Conclusion:** Anti-tuberculosis regimens of HRZE-5 and HRZE-10 induced the hepatotoxicity by tissue damage and reduction of activity SOD and CAT enzymes. Hence, the model in this study at 7 and 14 days is appropriate for further study about new compounds to protect hepatotoxicity by anti-tuberculosis drugs. However, the investigation only SOD enzyme and CAT enzyme activity may not enough to reflect the total result of hepatic cells damage. Therefore, the hepatic histopathology is necessary to be the supported information for more accurately in showing the damage that occur in the hepatic cells.

Keywords: anti-tuberculosis drugs, catalase, superoxide dismutase, mice.

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อซึ่งเป็นหนึ่งในปัญหาหลักด้านสาธารณสุขของโลก องค์การอนามัยโลกได้จัดกลุ่มประเทศที่มีภาระวัณโรคสูง (High Burden Country Lists) เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) มีภาระโรควัณโรคสูง (TB) 2) มีภาระวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวีสูง (TB/HIV) และ 3) มีวัณโรคดื้อยาหลายขนานสูง(MDR-TB) ซึ่งประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศ ที่มีปัญหาวัณโรคสูงทั้ง 3 กลุ่มดังกล่าวมา ดังนั้นตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 องค์การอนามัยโลกได้กำหนดยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (The End TB Strategy) โดยมีเป้าหมายลดอุบัติการณ์วัณโรค (Incidence) ให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากรโลกภายในปี พ.ศ. 2578 (World Health Organization, 2016) จากการคาดการณ์ในปี 2557 พบว่ามีผู้ป่วยวัณโรค ถึง 9.6 ล้านรายและเสียชีวิตถึง 1.5 ล้านรายทั่วโลก โดยประมาณ 4.9 ล้านราย (ร้อยละ 52) ของผู้ป่วยวัณโรคพบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (World Health Organization, 2016; Nair *et al.*, 2010) ซึ่งไทยอยู่ในอันดับที่ 17 จาก 22 ประเทศที่มีอุบัติการณ์การเกิดวัณโรคค่อนข้างสูง (Jittimane *et al.*, 2009) จากการคาดการณ์ในปี 2552 ขององค์การอนามัยโลกประเทศไทยจะมีอัตราความชุกของวัณโรคประมาณ 130,000 ราย (189 ต่อแสนประชากร) อุบัติการณ์ของผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 93,000 ราย (137 ต่อแสนประชากร) และจำนวนผู้ป่วยเสียชีวิตปีละ 12,000 ราย (18 ต่อแสนประชากร) (Eamsamang *et al.*, 2013) ปัจจุบันมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกในการรักษาวัณโรคต้องใช้ยาต้านวัณโรคร่วมกันอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (Isoniazid, H) ไรแฟมพิซิน (Rifampicin, R) ไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide, Z) และอีแทมบูทอล (Ethambutol, E) โดยใช้สูตร HRZE เป็นระยะเวลา 2 เดือนแรก จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะการรักษาต่อเนื่องจะใช้สูตร HR ต่อไปเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 เดือน (World Health Organization, 2010) จึงทำให้มีโอกาสสูงในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา โดยพิษต่อดับพบได้บ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 86.9 และการเกิดผื่นร้อยละ 8.2 เมื่อเปรียบเทียบกับอาการไม่พึงประสงค์อื่น และเป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่มักเป็นสาเหตุของการหยุดยา ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพของการรักษารวมไปถึงการดื้อยาของเชื้อวัณโรค (Castro *et al.*, 2015)

ยาต้านวัณโรค 3 ชนิดที่มีความเป็นพิษต่อดับ (Hepatotoxicity) ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (H) ไรแฟมพิซิน (R) และไพราซิनाไมด์ (Z) โดยพบว่าการรับประทานยาต้านวัณโรคทั้ง

สามชนิดนี้ร่วมกันจะยิ่งเพิ่มโอกาสการเกิดความเป็นพิษต่อดับเนื่องจากไรแฟมพิซินจัดเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450 enzymes inducer) จึงส่งผลเพิ่มความเป็นพิษต่อดับของไอโซไนอะซิด (Attri *et al.*, 2000; Tostmann *et al.*, 2008) แต่กลไกความเป็นพิษต่อดับของไพราซิनाไมด์ยังไม่แน่ชัด โดยการติดตามความผิดปกติหรือความเป็นพิษต่อดับสามารถตรวจวัดได้จากระดับอะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (Alanine aminotransferase หรือ ALT) ที่จะสูงมากกว่า 3 เท่าของพิกิตบนของค่าปกติร่วมกับอาการตัวเหลืองตาเหลือง หรือระดับ ALT มากกว่า 5 เท่าของพิกิตบนของค่าปกติร่วมกับอาการตับอักเสบก็ได้ (Chang *et al.*, 2008) ซึ่งการหยุดยาเหล่านี้มีโอกาสทำให้เชื้อดื้อยาหรือการรักษาที่ล้มเหลว

สารอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้เองตามปกติจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ หรือเกิดเมื่อได้รับสารพิษหรือยาที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ แต่เมื่อเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้แล้ว ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวนี้เพื่อเป็นการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระบบการต้านอนุมูลอิสระประกอบไปด้วยระบบที่เป็นเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase หรือ SOD) (Zelko *et al.*, 2002) เมื่อเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$) ขึ้นภายในเซลล์ เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอนุมูลอิสระดังกล่าวเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วจะถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซิเจนและน้ำด้วยเอนไซม์คะตาเลส (catalase หรือ CAT) (Zotova *et al.*, 2004) อีกทั้งยังพบว่ายาไอโซไนอะซิดสามารถทำให้ระดับเอนไซม์ SOD ลดลงในตับอ่อนของปลาม้าลาย (Zou *et al.*, 2017) ดังนั้นระบบการทำงานของ SOD และ CAT จึงมีความสำคัญมากในการต้านพิษหรือต้านออกซิเดชันในตับ

ปัจจุบันมีความพยายามในการเสาะแสวงหาสารจากธรรมชาติหรือสารต้านออกซิเดชันเพื่อใช้ในการปกป้องตับ โดยเฉพาะเพื่อป้องกันหรือลดพิษจากยาต้านวัณโรค (Matés, 2000) จึงเป็นที่น่าสนใจและมีความจำเป็นในการทำการศึกษาในกายสัตว์ทดลอง ซึ่งสัตว์ฟันแทะโดยเฉพาะหนูถีบจักรเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการศึกษามากเนื่องจากมีความใกล้เคียงของการจัดเรียงของจีโนมที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ (Speakman, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบความต่างของตำแหน่งการจับขององค์ประกอบในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (Transcription factor binding site) (Mak, 2014) และอัตราการผลิตเมแทบอลิซึม

(Basal metabolic rate) ในหนูที่มีมากกว่ามนุษย์ถึง 7 เท่า อีกทั้งยังมีความแตกต่างกันในด้านความเสถียรของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (Demetrius, 2005) ซึ่งอาจนำไปสู่ความไม่สอดคล้องของปริมาณยาที่เป็นขนาดแนะนำในมนุษย์และการแปลผลที่คลาดเคลื่อน ทำให้โมเดลสัตว์ทดลองจำเป็นต้องคัดเลือกรูปแบบการให้ยาว่าโรคที่เหมาะสม ในระดับที่สามารถทำให้เกิดพิษในตับสัตว์ทดลองได้ ซึ่งข้อมูลการใช้โมเดลสัตว์รวมถึงขนาดยาที่ใช้ยังไม่ชัดเจน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของยาด้านวัณโรคสูตรยามาตรฐาน (Standard regimen) ของมนุษย์ ซึ่งมีการเพิ่มขนาดของยาเป็น 5 เท่า (HRZE-5) และ 10 เท่า (HRZE-10) ตามลำดับ โดยทำการทดลองในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันขนาดยาที่เหมาะสมที่จะเป็นโมเดลการเหนี่ยวนำการเกิดพิษต่อตับโดยผ่านวิธีของเอนไซม์คะตาเลส (Catalase, CAT) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) รวมทั้งตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มที่ได้รับยาสูตร HRZE-5 และ HRZE-10

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

ไรแฟมพิซิน (Rifampicin, R) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Siam Bheasach Co Ltd (Bangkok, Thailand) ไอโซไนอะไซด์ (Isoniazid, H), อีแทมบูทอล (Ethambutol, E) และ ไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide, Z) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Atlantic Laboratories Co Ltd (Bangkok, Thailand) Ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Copper chloride ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Sodium carbonate (Na_2CO_3) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd (New South Wales, Australia), Bovine serum albumin (BSA), Catalase (CAT), Nitroblue tetrazolium (NBT), Superoxide dismutase (SOD), Xanthine oxidase (XO), Xanthine เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma Aldrich Chemical (Missouri, USA) Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท VWR International (Leicestershire, England) และ Eosin Y soluzione acquosa, Mayer's hematoxylin เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Optica (Milano, Italy)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ (จำนวน 60 ตัวแบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอสองคา จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย นำมาเลี้ยงดูแลในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย โดยให้ได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดเวลา ห้องเลี้ยงสัตว์ควบคุมอุณหภูมิที่ 23 ± 2 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน พักสัตว์ทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองเป็นไปตามข้อเสนองานใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (จส.มช. 21/2558)

หนูถีบจักร แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ตัว) คือ

1) กลุ่มควบคุม (Control) ได้รับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยการป้อนทางปาก (Per oral, o.p.) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

2) กลุ่มที่ได้รับสูตรยาด้านวัณโรคในปริมาณเกินขนาด 5 เท่า (HRZE-5) ซึ่งสูตรยาประกอบด้วย ไอโซไนอะไซด์ (Isoniazid) 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide) 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน อีแทมบูทอล (Ethambutol) 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

3) กลุ่มที่ได้รับสูตรยาด้านวัณโรคในปริมาณเกินขนาด 10 เท่า (HRZE-10) ซึ่งสูตรยาประกอบด้วย ไอโซไนอะไซด์ (Isoniazid) 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide) 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน อีแทมบูทอล (Ethambutol) 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน

และกลุ่มที่ 4) ถึง 6) ได้รับสารทดสอบ เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1) ถึง 3) ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 14 วัน ตามลำดับ หลังการให้สารทดสอบครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง ทำการการุณฆาตหนูถีบจักร และแยกตับไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับ (Histopathological examination)

เนื้อเยื่อตับล้างด้วยสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Potassium phosphate buffer saline) นำไปแช่ในสารละลายฟอร์มาลิน (Formalin) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (Dehydration) เพื่อนำเนื้อเยื่อไปผ่านการแทรกพาราฟิน (Infiltration) ก่อนนำเนื้อเยื่อเข้าบล็อกด้วยพาราฟิน แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ให้มีความหนา 5 ไมครอน ตีรังเนื้อเยื่อให้ติดสไลด์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสไลด์ตัวอย่างย้อมสีฮีมาทอกซาลิน (Hematoxyline) และอีโอซิน (Eosin) ความเข้มข้นร้อยละ 1 หลังจากอบสไลด์ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำสไลด์ที่ได้ออกเป็นสไลด์ถาวร (Permount) เพื่อนำไปตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (Jearapong *et al.*, 2015) และบันทึกภาพเซลล์ด้วยกล้อง Nikon รุ่น Eclipse TS100 ร่วมกับโปรแกรม NIS element D เวอร์ชัน 3.2

การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase enzyme, SOD) ในตับหนูถีบจักร

ตัวอย่างตับหนูทดลองแช่ในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Potassium phosphate buffer saline, PBS) pH 7 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ นำไปหำร้อยละการยับยั้ง โดยการตกตะกอนสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม (Chloroform) และเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethanol) ในอัตราส่วน 5:3:5 (Sample:Chloroform:Ethanol) ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเฉพาะส่วนใสด้านบน (Supernatant) นำไปผสมกับสารละลายปฏิกิริยา (Reaction mixture) ที่ประกอบด้วยกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylene diamine tetra-acetic acid) ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ไนโตรบลูเตตราโซเลียม (Nitroblue tetrazolium) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ แซนทีน (Xanthine) ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติม แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมคอปเปอร์คลอไรด์ (Copper chloride) ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ก่อนคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมาตรฐาน (Chatuphonprasert *et al.*, 2012)

การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์คะตาเลส (Catalase enzyme, CAT) ในตับหนูถีบจักร

ตัวอย่างตับหนูทดลองแช่ในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Potassium phosphate buffer saline, PBS) pH 7 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ นำไปเจือจางอีกครั้งด้วยสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 130 ไมโครโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 นาที ก่อนเติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate) ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1900 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที ปิเปตเฉพาะส่วนใสด้านบน (Supernatant) เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ก่อนคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์คะตาเลส โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์คะตาเลสมาตรฐาน (Chatuphonprasert *et al.*, 2012)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ร่วมกับการทดสอบแบบ Turkey's ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.001$ ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical package for the social science) เวอร์ชัน 23.0

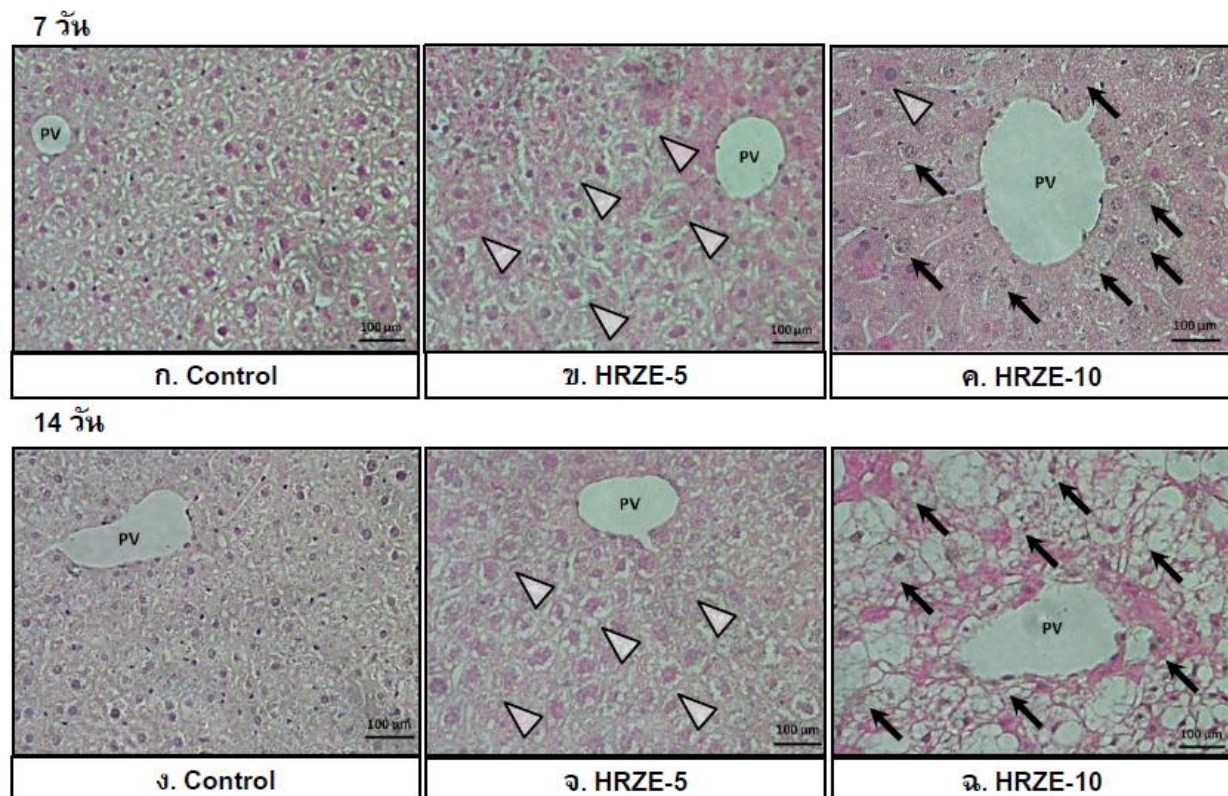
ผลการวิจัย

ผลของยาต้านวัณโรคในปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า และ 10 เท่าในระยะเวลา 7 และ 14 วันต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับ

จากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาต้านวัณโรคเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 1ก.) เซลล์ตับมีการจัดเรียงตัวเป็นปกติ เป็นแถวกระจายในแนวรัศมีรอบหลอดเลือดดำ (Portal vein) และเซลล์มีขอบเขตที่ชัดเจน ส่วนหนูที่ได้รับยาต้านวัณโรคทั้งในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 นั้นพบว่าเซลล์ตับที่มีความผิดปกติ คือมีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเหลี่ยมเป็นค่อนข้างกลมและมีขอบเขตไม่ชัดเจน

เนื่องจากเกิดการบวมตัวของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (Hydropic degeneration) (รูปที่ 1ข.-ค.) ซึ่งแสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ตับจากยาต้านวัณโรค ในกลุ่ม HRZE-10 (รูปที่ 1ค.) เซลล์ตับเสียหายและมีความผิดปกติของรูปร่างมากกว่ากลุ่ม HRZE-5 (รูปที่ 1ข.) สังเกตได้จากการมีเซลล์ที่เกิดการบวมขึ้นอย่างมากจนไม่สามารถระบุขอบเขตของเซลล์ได้ และนิวเคลียสของบางเซลล์เกิดการแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (Karyorrhexis) ขณะที่ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาต้านวัณโรคเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 1ง.) เซลล์ตับมีการจัดเรียงตัวเป็นปกติ ลักษณะเป็นแถวกระจายในแนวรัศมีรอบหลอดเลือดดำ (Portal vein) และเซลล์มีขอบเขตที่ชัดเจน ส่วนหนูถีบจักรที่ได้รับยา

ต้านวัณโรค HRZE-5 พบเซลล์ตับที่มีความผิดปกติ คือมีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากหกเหลี่ยมเป็นค่อนข้างกลมรี จากการบวมตัวของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (Hydropic degeneration) และมีขอบเขตไม่ชัดเจน (รูปที่ 1จ.) และในกลุ่ม HRZE-10 เซลล์ตับปรากฏความผิดปกติของรูปร่างเป็นอย่างมาก โดยไม่สามารถบอกถึงขอบเขตที่ชัดเจนของเซลล์ได้ และนิวเคลียสของเซลล์ส่วนใหญ่เกิดการแตก (Karyolysis) บ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในระดับที่รุนแรงและอาจจะนำไปสู่การตายของเซลล์ตับ (Piecemeal necrosis) (รูปที่ 1ฉ.)

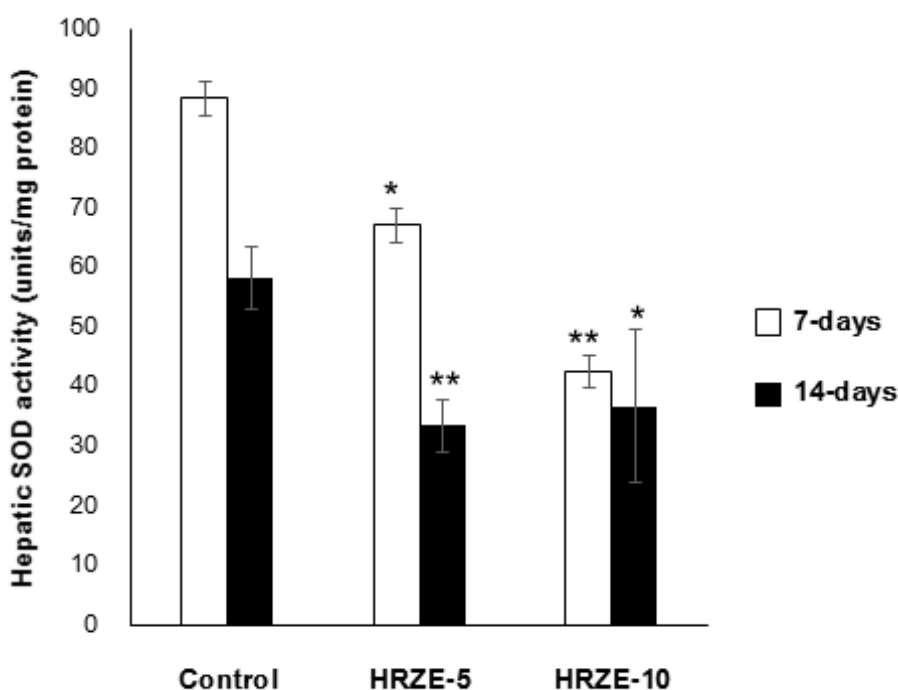


รูปที่ 1 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับของหนูถีบจักร ด้วยวิธีการย้อมสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซินและบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า; Control, กลุ่มควบคุม; HRZE-5, ไอโซไนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิनाไมด์ และอีแทมบูทอล (30, 60, 100, 125 mg/kg/day, ตามลำดับ) ในคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 ป้อนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน ; HRZE-10, ไอโซไนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิनाไมด์ และอีแทมบูทอล (60, 120, 200, 250 mg/kg/day, ตามลำดับ) ในคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 ป้อนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน; PV = หลอดเลือดดำ (Portal vein); ◁ แสดงถึงการบวมตัวของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (Hydropic degeneration); ← แสดงการแตกของนิวเคลียส (Karyolysis)

ผลของยาดำเนินโรคในปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า และ 10 เท่าในระยะเวลา 7 และ 14 วันต่อสมรรถนะของเอนไซม์ SOD

การศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาดำเนินโรคในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 มีสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม (Control) โดย HRZE-10 ส่งผลของสมรรถนะ SOD มากที่สุด (รูปที่ 2) สำหรับการศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาดำเนินโรคทั้งกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 มีสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

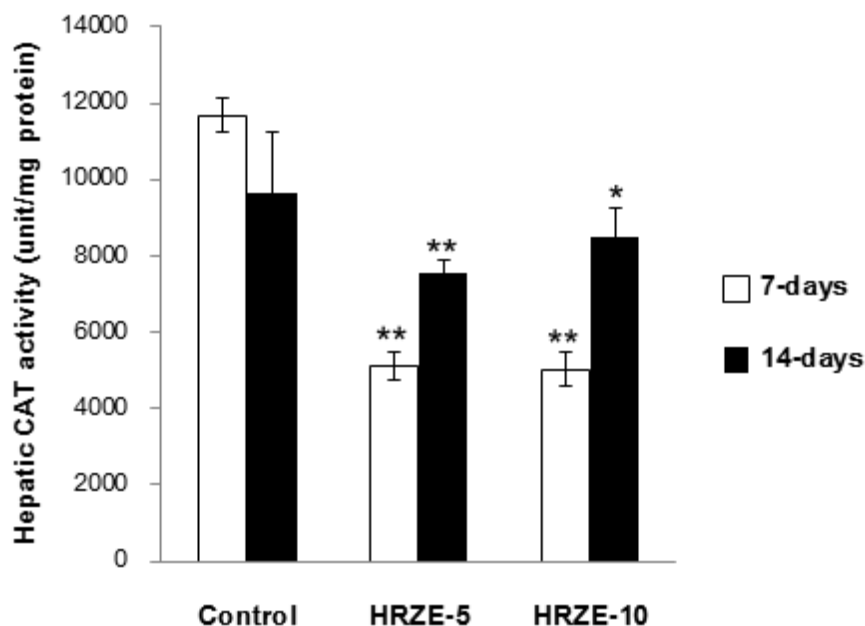


รูปที่ 2 ผลของยาดำเนินโรคในปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า และ 10 เท่าในระยะเวลา 7 และ 14 วันต่อสมรรถนะของเอนไซม์ SOD; Control, กลุ่มควบคุม; HRZE-5, ไอโซโนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิโนไมด์ และอีแทมบูทอล (30, 60, 100, 125 mg/kg/day, ตามลำดับ) ในคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 บ้วนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน ; HRZE-10, ไอโซโนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิโนไมด์ และอีแทมบูทอล (60, 120, 200, 250 mg/kg/day, ตามลำดับ) ในคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 บ้วนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน; ** $p < 0.01$ VS Control, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน

ผลของยาดำเนินโรคในปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า และ 10 เท่าในระยะเวลา 7 และ 14 วันต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CAT

การศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาในระยะเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาดำเนินโรคในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 มีสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในระดับที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) และการศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์

CAT ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยา HRZE ในระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาดำเนินโรคในกลุ่ม HRZE-5 มีสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับการได้รับยา HRZE เป็นระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของยาต้านวัณโรคในปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า และ 10 เท่าในระยะเวลา 7 และ 14 วันต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CAT; Control, กลุ่มควบคุม; HRZE-5, ไอโซไนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิनाไมด์ และอีแทมบูทอล (30, 60, 100, 125 mg/kg/day, ตามลำดับ) ในคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 ป้อนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน; HRZE-10, ไอโซไนอะซิด, ไรแฟมพิซิน, ไพราซิनाไมด์ และอีแทมบูทอล (60, 120, 200, 250 mg/kg/day, ตามลำดับ) ใน คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (CMC) ร้อยละ 0.5 ป้อนผ่านทางปาก (p.o.) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน; ** $p < 0.01$ VS Control, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การได้รับยาต้านวัณโรคต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะเหี่ยวหน้าให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ (World Health Organization, 2014) จากสูตรยามาตรฐานพบว่ายาต้านวัณโรค 3 ชนิดที่มีความเป็นพิษต่อตับ (Hepatotoxicity) ได้แก่ ไอโซไนอะซิด ไรแฟมพิซิน และไพราซิनाไมด์ เนื่องจากยาทั้ง 3 ชนิดนี้ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมในตับเป็นหลัก โดยยาไอโซไนอะซิดจะถูกเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์เอ็นอะเซทิลทรานสเฟอเรส 2 (N-acetyltransferase 2, NAT2) ซึ่งในสภาวะปกติ NAT2 ทำหน้าที่เปลี่ยนไอโซไนอะซิดเป็น อะเซทิลไฮดราซีน (Acetyl hydrazine) จากนั้นจึงถูกเมแทบอลิซึมด้วยกระบวนการอะเซทิลเลชัน (Acetylation) ได้สารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อตับคือไดอะเซทิลไฮดราซีน (Diacetyl hydrazine) (Tostmann *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามกระบวนการอะเซทิลเลชันเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ อีกทั้งไอโซไนอะซิดเองก็มีความสามารถในการกดกระบวนการอะเซทิลเลชันจึงทำให้เกิดการสะสมของไอโซไนอะซิดและทำให้ไอโซไนอะซิดเกิดการไฮโดรลิซิสไปเป็นไอโซไนอะซิดไฮดราซีน (Isoniazid hydrazine) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ (Oxidized) ด้วยเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไปเป็นอะเซทิล ไอเนียมไอออน

(Acetyl onium ion) อะเซทิลเรดิคัล (Acetyl radical) และคีโตน (Ketone) ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ที่มีความเป็นพิษต่อตับ เนื่องจากเมแทบอลิต์ทั้งสามนี้สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับโมเลกุลขนาดใหญ่ของเซลล์ตับ จึงส่งผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์ตับได้ (Ramappa and Aithal, 2013) นอกจากนี้การรับประทานยาต้านวัณโรคหลายชนิดร่วมกันตามสูตรยามาตรฐานจะยิ่งเพิ่มโอกาสการเกิดความเป็นพิษต่อตับ โดยเฉพาะการรับประทานไรแฟมพิซินร่วมกับไอโซไนอะซิด เนื่องจากไรแฟมพิซินมีคุณสมบัติเป็นตัวเหี่ยวหน้าเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Cytochrome P450 enzymes inducer) จึงส่งผลให้ไอโซไนอะซิด ถูกเมแทบอลิซึมไปอยู่ในรูปของเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษต่อตับในปริมาณที่มากขึ้น นอกจากนี้ไรแฟมพิซินยังจัดเป็นยาต้นแบบที่มีความสามารถเหี่ยวหน้าความเป็นพิษต่อตับ (Drug induce liver injury, DILI) (Ramappa and Aithal, 2013) ส่วนไพราซิनाไมด์ยังไม่พบรายงานกลไกการเป็นพิษต่อตับ แต่ความเป็นพิษต่อตับของไพราซิनाไมด์มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามขนาดยา (Dose dependent) ร่วมกับปัจจัยทางกรรมพันธุ์ (Chang *et al.*, 2008)

ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพโดยวิธีการย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินของตับสัตว์ฟันแทะ เช่น กระต่าย และหนูแรทที่ได้รับยาต้านวัณโรคเป็นเวลา 12 และ 14 วัน ตามลำดับ พบความผิดปกติของเซลล์ตับซึ่งสังเกตได้จากเยื่อหุ้มเซลล์ตับเกิดความเสียหาย (Membrane damage) เซลล์ตับมีลักษณะบวมและมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น (Ballooning degeneration) เส้นเลือดตับ (Portal vein) เกิดการอักเสบ (Portal inflammation) ร่วมกับการตายของเซลล์ตับ (Hepatic necrosis) (Maryam *et al.*, 2010; Kheyabany *et al.*, 2013; Eminzade S *et al.*, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลของลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในตับของหนูถีบจักรที่ได้รับยาต้านวัณโรคปริมาณมากกว่าสูตรมาตรฐาน 5 เท่า (HRZE-5) และ 10 เท่า (HRZE-10) ในระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ โดยในหนูกลุ่ม HRZE-5 เซลล์ตับมีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เกิดการบวมตัวของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (Hydropic degeneration) ซึ่งจะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนยิ่งขึ้นในกลุ่ม HRZE-10 ที่เซลล์เกิดการบวมขึ้นอย่างมากจนไม่สามารถระบุขอบเขตและนิวเคลียสของบางเซลล์เกิดการแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (Karyorrhexis) ซึ่งอาจจะนำไปสู่การตายของเซลล์ตับได้ อีกทั้งยังสังเกตเห็นความเสียหายของเซลล์ตับในหนูที่ได้รับยาเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่มีความรุนแรงมากกว่าหนูที่ได้รับยาเป็นระยะเวลา 7 วันอย่างชัดเจน โดยหนูที่ได้รับยาทั้งในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 เป็นเวลา 14 วัน พบการบวมตัวของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์และการแตกของนิวเคลียสของเซลล์ส่วนใหญ่ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในระดับที่รุนแรง ซึ่งสามารถนำไปสู่การตายของเซลล์ตับ

เซลล์ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) จำนวนมาก รวมไปถึงเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในการป้องกันหรือซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระ (Free radical, ROS) เอนไซม์ CAT และเอนไซม์ SOD จะทำงานร่วมกันในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากระบบเมแทบอลิซึมระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (Weydert and Cullen, 2010) เอนไซม์ SOD ทำหน้าที่หลักในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนโดยทำให้รวมตัวกันกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นเอนไซม์ CAT จะย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อไปเป็นน้ำและออกซิเจนซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003) เมื่อใดที่สารต้านอนุมูลอิสระหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีปริมาณที่น้อยกว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากระบบเมแทบอลิซึมของร่างกาย หรือจากการเหนี่ยวนำของ

ยาต้านวัณโรคจะส่งผลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งจะนำไปสู่ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic) การกลายพันธุ์ของเซลล์ (Mutation) หรือกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง (Carcinogenic) ได้ เอนไซม์ SOD ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถจำแนกได้เป็น 3 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ SOD1 (CuZn-SOD) SOD2 (Mn-SOD) และ SOD3 (ec-SOD) ซึ่งแต่ละไอโซฟอร์มสังเคราะห์จากยีนที่แตกต่างกันที่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน โดยในไซโตซอล (Cytosol) จะพบเอนไซม์ SOD1 ที่มีสังกะสีหรือทองแดงเป็นองค์ประกอบ และในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) จะพบเอนไซม์ SOD2 ที่มีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบ ส่วนภายนอกเซลล์ (extracellular) จะพบเอนไซม์ SOD3 ที่มีสังกะสีหรือทองแดงเป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับ SOD1 (Fukai and Fukai, 2011) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ SOD ทั้งสามไอโซฟอร์มดังกล่าวทำหน้าที่หลักในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนโดยการให้โปรตอนแก่ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และทำให้เกิดการรวมตัวกันกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และออกซิเจนซึ่งมีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่จะเกิดขึ้นจากซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับ (Matsumoto and Fridovich, 2001; Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003) ผลการศึกษามรรณนะของเอนไซม์ SOD ในตับหนูที่ได้รับยาในระยะเวลา 7 วัน ในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับหนูที่ได้รับยาในระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 ส่งผลให้สมรรถนะของเอนไซม์ SOD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน อย่างไรก็ตามการที่กลุ่ม HRZE-10 แสดงสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ที่สูงกว่ากลุ่ม HRZE-5 เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการได้รับยาเท่ากันนั้นอาจเป็นผลจากการที่เนื้อเยื่อเซลล์ตับของกลุ่ม HRZE-10 ถูกทำลายจากการได้รับยาในปริมาณที่สูง ส่งผลให้การวัดผลด้วยสมรรถนะของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนไม่สามารถสะท้อนถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริงได้อย่างแม่นยำ

เอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยเรียงตัวเป็นโครงสร้างปิระมิดฐานสามเหลี่ยม แต่ละหน่วยประกอบด้วยฮีม (Heme) และ NADPH ส่วนใหญ่พบในเปอร์ออกซิโซม (Peroxisome) และไซโตซอลของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003) เอนไซม์ CAT สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในร่างกาย โดยเมื่อร่างกายมีความ

เข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงจะเกิดการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (Catalytic reaction) ในทางตรงกันข้ามหากร่างกายมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ำจะเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (Peroxidation reaction) ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยาดังกล่าวทำหน้าที่สำคัญในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปอยู่ในรูปของน้ำและออกซิเจนซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Scibior and Czczot, 2006) จากผลการศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาในระยะเวลา 7 วัน ในกลุ่ม HRZE-5 และ HRZE-10 พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในระดับที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในตับหนูถีบจักรที่ได้รับยาในระยะเวลา 14 วัน นั้นเฉพาะกลุ่มที่ได้รับยาต้านวัณโรคกลุ่ม HRZE-5 ที่มีสมรรถนะของเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่ม HRZE-10 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสมรรถนะของเอนไซม์ CAT เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่สมรรถนะของเอนไซม์ CAT กลุ่ม HRZE-10 ไม่ลดลงนั้นอาจเป็นผลมาจากการที่ได้รับยาในปริมาณที่สูง จึงไม่สามารถแสดงความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ตับได้อย่างแท้จริงจากสมรรถนะของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน ในทำนองเดียวกับสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ที่กล่าวข้างต้น

โดยสรุปการเหี่ยวหน้าความเป็นพิษต่อตับด้วยยาต้านวัณโรคในปริมาณที่มากกว่าสูตรมาตรฐานของมนุษย์ 5 เท่า (HRZE-5) เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน ส่งผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์ตับเนื่องจากการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของสมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT แต่การเหี่ยวหน้าด้วยปริมาณที่มากกว่าสูตรมาตรฐานของมนุษย์ 10 เท่า (HRZE-10) ทั้งที่ระยะเวลา 7 วัน และ 14 วันนั้น การวัดผลด้วยสมรรถนะของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนอาจไม่เพียงพอที่จะบ่งชี้ความเสียหายที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริงเนื่องจากเซลล์ตับถูกทำลายในปริมาณมาก ดังนั้นการศึกษสมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT จึงอาจยังไม่เพียงพอต่อการแปลผล ดังนั้นลักษณะของจุลพยาธิสภาพตับจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อสนับสนุนและยืนยันการสรุปผลให้มีความแม่นยำในการสะท้อนความเสียหายของตับจากการเหี่ยวหน้าของยาต้านวัณโรค โดยความรุนแรงของความเสียหายที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับเนื่องจากยาต้านวัณโรคนั้นเป็นผลของทั้งปริมาณของยาและระยะเวลาที่ได้รับยา นอกจากนี้ การศึกษานี้เป็นการสร้างโมเดลต้นแบบสัตว์ทดลองแรกๆ ที่เหี่ยวหน้าความเป็นพิษต่อตับในหนูถีบจักรด้วยการใช้ยาต้านวัณโรคสูตร HRZE-5 และ HRZE-10 เป็นระยะเวลา 7 และ 14

วัน ซึ่งสามารถใช้เป็นโมเดลที่สำคัญในการศึกษาการเกิดพิษต่อตับของยาต้านวัณโรคในเชิงลึก รวมทั้งใช้ในการศึกษาสารจากธรรมชาติเพื่อต้านพิษต่อตับในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2559 และกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับทุนวิจัยและเครื่องมือปฏิบัติการวิจัยในครั้งนี้

References

- Attri S, Rana SV, Vaiphei K, *et al.* Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury -protection by N-acetylcysteine. *HET* 2000; 19: 517-522.
- Castro AT, Mendesb M, Freitas S, Roxoc PC. Incidence and risk factors of major toxicity associated to first-line antituberculosis drugs for latent and active tuberculosis during a period of 10 years. *Rev Port Pneumol* 2015; 21(3): 144-150.
- Chang KC, Leung CC, Yew WW, Lau TY, Tam CM. Hepatotoxicity of pyrazinamide cohort and case-control analyses. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1391-1396.
- Chatuphonpraserta W, Udomsuk L, Monthakantirat O, Churikhit Y, Putalun W, Jarukamjorn K. Effects of *Pueraria mirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. *J Pharm Pharmacol* 2012; 65: 447-456.
- Demetrius L. Of mice and men. *EMBO Rep* 2005; 6: S39-S44.
- Eamsumang N, Khumsaeng P, Panko S. Nature of died of tuberculosis patients in Rayong year 2009-2011. Chonburi: Office of Disease Prevention and Control 3 Chonburi; 2013. Sponsored by Office of Disease Prevention and Control 3 Chonburi.
- Eminzade S, Uras F, Izzettin FV. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr Metab* 2008; 5(18): 1-8.

- Fukai T, Fukai MU. Superoxide Dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(6): 1583-1606.
- 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.
- Jittimanee S, Vorasingha J, Mad-asin W, Nateniyom S, Rienthong S, Varma JK. Tuberculosis in Thailand: epidemiology and program performance, 2001-2005. *Int J Infect Dis* 2009; 13:436-442.
- Kheyabany SSK, Nabavizadeh F, Vaezi GH, *et al.* Protective effect of Ghrelin on isoniazid-induced liver injury in rat. *J Stress Physiol Biochem* 2013; 9(1): 273-282.
- Mak IWY, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 2014; 6(2): 114-118.
- Maryam S, Bhatti ASA, Shahzad AW. Protective effects of Silymarin in isoniazid induced hepatotoxicity in rabbits. *ANNALS* 2010; 16(1): 43-47.
- Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153(1-3): 83-104.
- Matsumoto AO, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38388-38393.
- Nair N, Wares F, Sahu S. Tuberculosis in the WHO South-East Asia Region. *Bull World Health Organ* 2010; 88(3): 161-240.
- Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis drugs: mechanisms and management. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3(1): 37-49.
- Ścibior D, Cieczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 170-180.
- Speakman JR. Measuring energy metabolism in the mouse –Theoretical, Practical, and Analytical Considerations. *Front Physiol* 2013; 4(34): 1-23.
- Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, *et al.* Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 309-315.
- Tostmann A, Boeree MJ, Petersc WH, *et al.* Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce *in vitro* pyrazinamide toxicity. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(6): 577-580.
- Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010; 5(1): 51-66.
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. France: World Health Organization; 2014.
- World Health Organization. Treatment of tuberculosis guidelines .Geneva: World Health Organization; 2010.
- World Health Organization Country Office for Thailand. Tuberculosis [online]. [cited 14 Jun 2016]. Available from: <http://www.searo.who.int/thailand/areas/tuberculosis/en/>
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. *Free Rad Biol Med* 2002; 33(3): 337-349.
- Zotova EV, Savostianov KV, Chistiakov DA, *et al.* Association of polymorphic markers for genes coding for antioxidant defense enzymes, with development of diabetic polyneuropathies in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mol Biol* 2004; 38(2): 244-249.
- Zou Y, Zhang Y, Han L, *et al.* Oxidative stress-mediated developmental toxicity induced by isoniazide in zebrafish embryos and larvae. *J Appl Toxicol* 2017; doi: 10.1002/jat.3432.