บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลเบื้องต้นของมะขามป้อม

(Parmar and Kaushal,1992; Pioneer Enterprise, 2000; In-depth on the major ingredients, 2002)

English / Common Name: Indian Gooseberry, Myrobalar, Emblic

Ayurvedic Name: Amla / Amlaki

Indian Name: Amalkamu, Uririkai, Aonla, Onilika, Nelli, Alathanda, Adiphala, Dhatri, Shriphala, Vrittophala, Khondona

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Phyllanthus emblica* Linn.

ชื่อวงศ์ : EUPHORBIACEAE

การกระจายพันธุ์: เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ ป่าเบญจพรรณแล้ง หรือป่าแดง

การขยายพันธุ์: เพาะเมล็ด สภาพที่เหมาะสม เหมาะสมกับดินทุกชนิดทนแล้งได้ ถิ่นกำเนิดอยู่ใน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และป่าเบญจพรรณแล้ง หรือ ป่าแดง

ลักษณะ: เป็นไม้ยืนต้นสูง 8 – 12 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลปนเทา ผิวค่อนข้างเรียบ เรือนยอดรูปร่ม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก รูปขอบขนานติดเป็นคู่ ขนาดเล็ก เรียงสลับ ออกดอกรวมกันเป็นกระจุกตามง่ามใบเป็นช่อ ดอกขนาดเล็ก ก้านดอกสั้น มีกลีบ 5 กลีบ สีเริ่มผลิเป็นสีแดงอ่อนๆ และกลายเป็นสีเหลืองนวลอมเขียว หลังจากเริ่มผลิดอก 2-3 วัน ผลสดทรงกลมสีเขียวอมเหลือง

ฤดูกาล: ออกดอกช่วงเดือนมกราคม-เมษายน ฤดูการเก็บเกี่ยวประมาณเดือนธันวาคม และสามารถเก็บได้จนถึงมีนาคม โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ หรือ yield ของผล

Yield: ค่าเฉลี่ยของ yield ของผลมะขามป้อมที่เจริญในป่าประมาณ 23.5 กิโลกรัมต่อต้น

ส่วนประกอบทางเคมีของผล: เนื้อผลคิดเป็น 90.97 % ของ whole fruit ประกอบด้วย 70.5 % moisture ภายในมีส่วนที่เป็น acid 3.28 %, total sugars 5.09 % เป็น reducing sugars 5.08 % มีส่วนของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตเป็น 0.75 %, 0.5%, 0.1% มี pectin, quercetin และ tannin จำนวนมาก รวมทั้ง emblicanin A &B, puniglucanin, pedunculagin, 2-keto gluconolactone, hexahydroxy-diphenic acid (Zhang et al.,2001) และ แร่ธาตุ phosphorus, potassium, calcium, magnesium และ iron เป็น 0.027, 0.368, 0.059, 0.248 และ 0.004 % ตามลำดับ นอกจากนั้นผลแห้งยังประกอบด้วย mucic acid 4-9% เปลือกผลมี ellagic acid, phyllemblic acid และสารพวก phenols (Zhang et al.,2001)

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมี *Phyllantus emblica* LINN. (Euphorbiacceae)

Class	Compound	Occurence	References
Alkaloid	Phyllantine phyllantidine	leaves, fruit	Khanna and Bansal,1975
	Zeatin Zeatin nucleotide Zeatin riboside	leaves fruit	Ram and Rao,1976
Benzenoid	Chebulic acid Chebulinic acid Chebulagic acid	leaves	Theresa et al.,1965; 1967
	Gallic acid	Leaves, fruit	Theresa et al.,1965; 1967 Basa and Srinivasulu,1987
	Ellagic acid	leaves	Theresa et al.,1965; Hui and Sung 1968; Subramanian et al.,1971
		fruit	Desai et al.,1977
	Amlaic acid	fruit	Theresa et al.,1967
	Corilagin 3-6-di-O-Galloyl-ß-D-glucose Ethyl gallate	fruit	Srivastava and Ranjan,1967
	ß-glucogallin	leaves	Taeresa et al.,1967
		fruit	Srivastava and Ranjan,1967
	Phyllembic acid Emblicol Music acid	fruit	Pillay and Iver,1958; Basa and Srinivasulu,1987

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมี *Phyllantus emblica* LINN. (Euphorbiacceae)

Class	Compound	Occurence	References
Benzenoid	1,6-di-O-Galloyl-ß-D-glucose 1-di-O-Galloyl-ß-D-glucose Putranjivain A Digallic acid	fruit	El-mekkawy et al.,1995
Furanolactone	ascorbic acid	fruit	Damoradan and Srinivasan,1935; QUADRY et al.,1962; Shah and Hamid,1968
		leaves	Basa and Srinivasulu,1987
Diterpene	gibberlin A-1 gibberlin A-3 gibberlin A-4 gibberlin A-7 gibberlin A-9	leaves	Ram and Raja,1978
Triterpene	Lupeol	fruit	Desai et al.,1997
		leaves	Hui and Sung,1968
Flavonoid	leucodelphinidin	leaves	Laumas and Seshardi,1958
	Kaempherol	leaves	Subramanian et al., 1971
	Kaempherol-3-O-β-D-glucoside	leaves	Yrjonen et al, cited in Summanen,1995
	Rutin	leaves	
	Quercetin	leaves	Yrjonen et al, cited in Summanen,1995

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมี *Phyllantus emblica* LINN. (Euphorbiacceae)

Class	Compound	Occurence	Reference
Flavonoid	Kaempherol-3-O-ß-D-glucoside	fruit	El-Mekkawy et al.,1995
	Quercetin-3-O-ß-D-Glucoside		
Sterol	ß-sitosterol	leaves	Hui and Sung,1968
Carbohydrate	Acidic and neutral polysaccharides	fruit	Nizzamuddin et al.,1982
	Glucose	leaves	Theresa et al., 1967

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 ก

รูปที่ 1 ข

รูปที่ 1 ค

รูปที่ 1 แสดงรูปลักษณะทั่วไปของมะขามป้อม (Vichiara, A J., 2000)

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามะขามป้อมมีฤทธิ์ทางการรักษาที่หลากหลาย และใช้เป็นยารักษาโรคในท้องถิ่นต่าง ๆ ในหลาย ๆประเทศเช่น อินเดีย มาเลเซีย จีน เป็นต้น ในประเทศไทยการศึกษารวมทั้งการใช้ประโยชน์ทางการรักษาโรคจากมะขามป้อมยังมีน้อย และการศึกษาในประเทศต่าง ๆ ที่ผ่านมา ได้ศึกษาฤทธิ์การปกป้องตับของมะขามป้อม โดยใช้ CCL_4 และ paracetamol เป็นตัวชักนำให้เกิดภาวะการทำลายตับ ซึ่งยังขาดการศึกษาภาวะของตับที่ถูกทำลายจากเอทานอล ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของมะขามป้อมในการปกป้องตับโดยการทำลายจากเอทานอล เพื่อเป็นข้อมูลและความรู้เบื้องต้น ในการที่จะพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยา

ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

การศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ลดระดับของ cholesterol และ lipid ทั้งใน serum และในเนื้อเยื่อ โดยลด cholesterol – phospholipid ratio ทำให้ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค Atheroscerosis และยังเพิ่มระดับ HDL โดยมีผลลดการเกิด oxidation ของ LDL จึงสามารถลดขนาดของ plaque ที่หลอดเลือดที่หัวใจ อีกทั้งเพิ่มขนาดของ lumen ของหลอดเลือดหัวใจ (Thakur et al.,1988; Mathur et al.,1996) และการลดการเกิดภาวะ hyperlipidemia โดยลด activity ของ HMG-COA reductase ร่วมทั้งช่วยในการสลาย การขับออกและลดการสร้าง cholesterol (Anila and Vijayalakshmi, 2002) มะขามป้อมยังมีผล neutralize พิษงู (Vipera russellii และ Najakaouthia) ที่ทำให้เกิด haemorrhage, coagulant, defibrinogenating และ inflammatory (Alam and Gomes, 2003) เมื่อให้สารสกัด flavonoids จากมะขามป้อมและ *Mangifera indica* ทำให้เพิ่มระดับของเอ็นไซม์ที่ช่วยเก็บกินสาร free radicals ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione reductase (GPr) จึงลดปริมาณการเกิด lipid peroxide ได้ (Anila and Vijayalakshmi, 2003) และเป็นส่วนประกอบ 1 ใน 3 ของ Triphala ซึ่งเป็นยาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxide formation เป็นตัวเก็บกิน hydroxyl และ superoxide radicals ใช้เป็นยารักษาภาวะโรคโดยเป็น anti-arthritic, anti-inflammatory, anti-aging (Wohlmuth et al, 1999) และช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน (Sabu and Kuttan, 2002)

ผลต่อระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ เป็น ulcer protective และมี healing effect โดยมีผลช่วยยับยั้ง gastric secretion จึงลดการทำลายของ mucosa และกระตุ้นการหลั่งของ mucus เป็นการลด offensive factor เช่น acid และ pepsin อีกทั้งช่วยเพิ่ม defensive factor โดยฤทธิ์ดังกล่าวเป็นแบบ dose dependent นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ช่วยในการย่อยและการดูดซึม iron และ calcium ส่งผลดีต่อระบบเลือดและกระดูกตามลำดับ (Bandyopadhyay et al., 2000; Sairam et al., 2002; Rehaily et al., 2003)

ผลต่อระบบ immunity

การศึกษาพบว่าฤทธิ์ antioxidant และ immunomodulating ของมะขามป้อมสามารถลด free radicals และ lipid peroxidation ที่เกิดจากการได้รับ chromium จึงทำให้เกิดผลดีต่อภาวะโรคต่างๆ ซึ่งการลดลงนี้เกิดจากฤทธิ์ของมะขามป้อมที่มีผลเพิ่มระดับของ glutathione peroxidase activity เช่นช่วยเพิ่ม เอ็นไซม์ SOD, CAT, GPx ซึ่งช่วยในการเก็บกิน free radicals ช่วยเพิ่มการทำงานของระบบ immune (Ram et al., 2002) และจากฤทธิ์ที่เป็น antioxidant สามารถช่วยยับยั้งการเกิด apoptosis และ DNA fragmentation นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ยับยั้ง leukotriene B_4 ที่หลั่งจาก PMN และ leukotriene B_2 ที่หลั่งจาก platelet (Ram et al., 2003) จากกลไกเหล่านี้มะขามป้อมจึงมีฤทธิ์ anti-inflammation และ antipyretic ช่วยการทำงานของระบบ immune

ผลต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาพบว่ามะขามป้อมมี ascorbic acid (AA) เป็นส่วนประกอบหลักและมีฤทธิ์เป็น anticancer จากส่วนนี้ เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบโดยให้ crude extract กับ AA พบว่า AA มีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งเฉพาะ ในระดับ low dose ของตัว induce ขณะที่ crude extract มีผลยับยั้งทั้งในระดับ low และ high dose ผลยับยั้งการเกิดมะเร็งจึงเกิดจากการออกฤทธิ์ของสารสำคัญหลาย ๆ ตัวในมะขามป้อม (Dhir et al., 1991) นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ในการช่วยลดผลข้างเคียง จากการใช้ cyclophosphamide (cp) ซึ่งเป็นยารักษามะเร็ง โดยช่วยป้องกันการเกิดพิษต่อไต จากฤทธิ์ที่เป็น antioxidant ด้วยการเพิ่มระดับของ antioxidant enzyme ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจาก การรบกวน cell cycle ในแบบ dose dependent มะขามป้อมจึงอาจนำมาใช้เป็น adjuvant therapy ของการรักษามะเร็งได้ (Jeena et al.,1999; 2001)

ผลต่อการปกป้องตับ

เมื่อให้กินมะขามป้อมติดต่อกัน 10 วันสามารถป้องกันการเกิด oxidation จากการให้ธาตุเหล็กปริมาณสูง นอกจากนั้นยังมีผลยับยั้งการเพิ่มของระดับเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นตัวชี้สภาพของตับ ได้แก่ alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase และ lactate dehydrogenase โดยมะขามป้อมแสดงฤทธิ์ปกป้องตับด้วยกลไก antioxidant เช่นเดียวกับซิไลมารีน ซึ่งเป็นสารเปรียบเทียบ (Mahidol news, 2002) และสามารถป้องกันพิษต่อตับที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอล (Gulati and Agarwal, 1995) และคาร์บอนเตตะคลอไรด์ (Jose and Kuttan, 2000)

2. ตับ

ภาวะการทำหน้าที่อย่างปกติของตับมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกาย และมีบทบาทหน้าที่สำคัญและจำเป็น (Avenue, 2004) ดังนี้

- ควบคุมสมดุลของสารอาหารในร่างกาย เช่น การสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) จากกรดไขมัน กรดอะมิโนและแลคเตท เก็บไขมันไว้ในรูปไตรกลีเซอร์ไรด์ และสะสมคาร์โบไฮเดรตไว้ในรูปของไกลโคเจน

- สังเคราะห์โปรตีน ที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น clotting factors, albumin, transport proteins เป็นต้น

- เปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลและทำลายสารพิษที่เป็นสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย

- สร้างน้ำดีเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ช่วยในการย่อยและการดูดซึม อาหารพวกไขมันและวิตามินบางชนิด

ตับประกอบด้วยเซลล์ตับ (parenchymal cells หรือ hepatocytes) เป็นจำนวนมาก คิดเป็น 70% ของเซลล์ทั้งหมด มีองค์ประกอบภายในเซลล์จำนวนมากเช่น nucleus, endoplasmic reticulum (พบประมาณ 15 % ของปริมาตรทั้งหมดของเซลล์), mitochondria (พบมากกว่า 1,000 หน่วย), lysosome, peroxisome, Golgi complex, cytoskeleton เป็นต้น (Arias et al., 1994)

นอกจากนี้ตับยังประกอบด้วยเซลล์อื่น ๆ เช่น endothelial cells, Kupffer cells, Ito cells (fat-storing cells) เป็นต้น

เซลล์ในตับเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวกับ การควบคุมปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในตับ การเผาผลาญสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการบาดเจ็บและกระบวนการอักเสบภายในตับ เป็นต้น

ภายในโครงสร้างของตับประกอบด้วย lobule ที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป แยกจากกันได้โดย interlobular connective tissue ลักษณะปลายสุดของ lobule มีแขนงหลอดเลือด portal triads ซึ่งประกอบด้วย portal vein, hepatic arteriole และ bile duct กระจายอยู่ทั่วไปในโครงสร้างตับ นอกจากนั้น ตับยังประกอบด้วยโครงสร้างที่เล็กที่สุด เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดในตับที่สามารถทำงานได้ คือ acinus สามารถแบ่งเซลล์ตับออกเป็นโซน ๆ (Amdur, Doull and Klaassen, 1991) ดังนี้

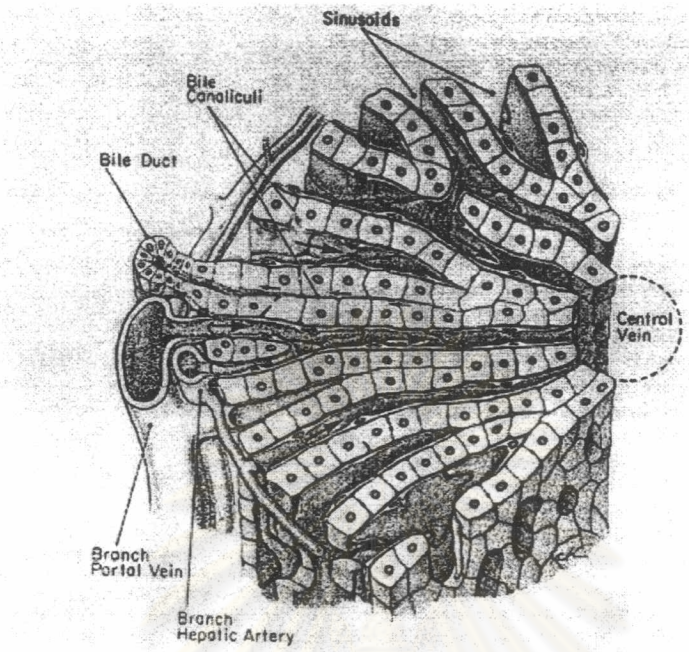
1. โซนที่ 1 หรือเรียกว่า periportal zone หมายถึงเซลล์ตับที่อยู่รอบ portal vein เป็นบริเวณที่อยู่ใกล้ทางเข้าหลอดเลือดที่มาเลี้ยง lobule จึงมีสารอาหารสูงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนในเลือดสูง

2. โซนที่ 2 เรียกว่า mid-zone หมายถึงเซลล์ตับที่อยู่บริเวณที่อยู่ถัดจาก โซนที่ 1 คืออยู่ระหว่าง periportal zone และ centrilobular zone

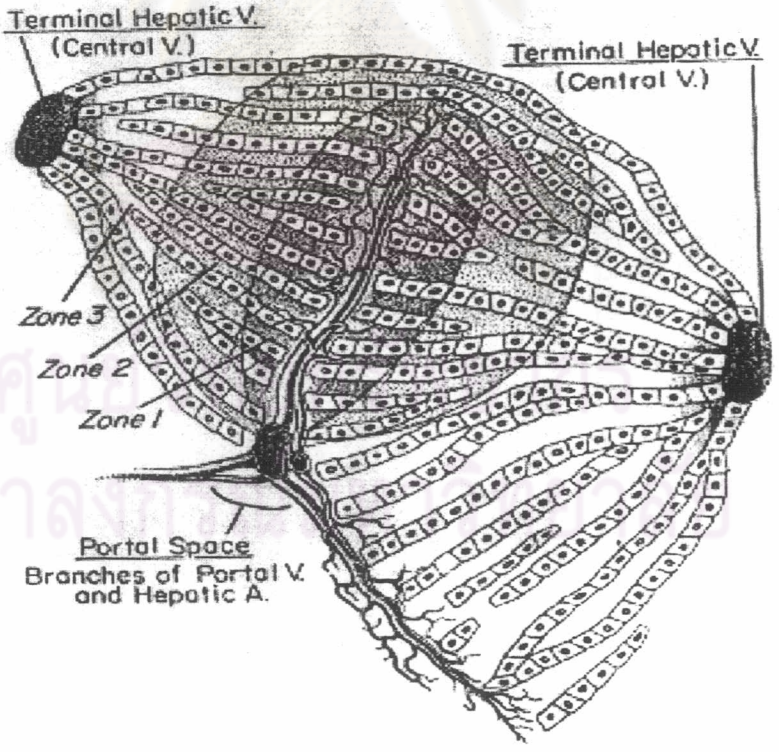
3. โซนที่ 3 เรียกว่า periacinar (centrilobular, central vein) zone หมายถึงเซลล์ตับที่อยู่รอบ ๆ terminal hepatic vein (central vein) เซลล์ตับบริเวณนี้ประกอบด้วย Cytochrome P450 โดยเฉพาะ CYP2E1 isoform มากกว่าบริเวณอื่น ๆ (Tsutsumi et al., 1989) และบริเวณนี้มีปริมาณออกซิเจนที่มาเลี้ยงน้อยกว่าบริเวณโซนอื่น เนื่องจากอยู่ห่างจากหลอดเลือดที่มาเลี้ยงตับ

ดังนั้นเซลล์ตับที่อยู่บริเวณโซนที่ 2 และ โซนที่ 3 จึงได้รับเลือดที่มีสารอาหารและออกซิเจนต่ำ จึงมีความสามารถในการต้านทานต่อการบาดเจ็บ ที่เกิดจากสารพิษหรือสารเคมีต่างๆได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับที่อยู่บริเวณโซนที่ 1

ตับเป็นอวัยวะที่มีเลือดมาเลี้ยงประมาณ 1.5 ลิตรต่อนาที โดยเลือด 75% ที่มาเลี้ยงตับมาจาก portal vein และส่วนที่เหลือของเลือดที่เลี้ยงตับมาจาก hepatic artery เลือดเหล่านี้จะนำสารอาหารและออกซิเจนมายังตับ จากนั้นเลือดทั้งหมดที่ไหลสู่ตับ จะไหลออกจากตับทาง portal venle เข้าสู่ sinusoids ซึ่งเป็นหลอดเลือดที่มีรูปร่างไม่แน่นอนแล้วไหลต่อไปยัง terminal hepatic vein (central vein) จากนั้น ไหลกลับสู่หัวใจห้องบนขวาทาง inferior vena cava



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทั่วไปของเซลล์ตับ (Bloom, 1968)



รูปที่ 3 แสดงโซนต่าง ๆ ของตับ (Bloom, 1968)

จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ตับที่อาจได้รับสารพิษหรือสารเคมีที่มาพร้อมกับเลือด เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ตับขึ้นได้ การเกิดพยาธิสภาพจะแตกต่างกันไป สัมพันธ์กับชนิดของสาร ระยะเวลาการสัมผัสสาร กลไกการบาดเจ็บ รวมทั้งลักษณะและปริมาณหลอดเลือดในโครงสร้างของตับบริเวณนั้น ๆ โดยทั่วไปการบาดเจ็บของตับจะสามารถบ่งชี้ได้จากค่าเคมีคลินิกและการตรวจชิ้นเนื้อตับ

- ALT / AST ในภาวะปกติที่เซลล์ตับไม่ถูกทำลาย เอ็นไซม์ทั้งสองนี้จะมีระดับน้อยมากในเลือดแต่ถ้ามีการทำลายของเซลล์ตับ (hepatocellular injury) หรือเซลล์ตับตาย (hepatocellular death) ไม่ว่าจากสาเหตุใดก็ตามจะทำให้เอ็นไซม์ทั้งสองตัวรั่วไหลออกนอกเซลล์ตับสู่กระแสเลือดและสามารถตรวจวัดได้ ระดับจะสูงขึ้นเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาพของเซลล์ที่ถูกทำลายและระยะเวลาที่สัมผัสกับสารที่เป็นสาเหตุ เอ็นไซม์ทั้งสองถือเป็นค่าเคมีคลินิกที่มีความไวสูงต่อการบ่งชี้การถูกทำลายของตับ เอ็นไซม์ AST นั้นนอกจากพบได้ในตับแล้วยังพบได้ในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ เซลล์หัวใจ กล้ามเนื้อ และไต ส่วนเอ็นไซม์ ALT นั้นสามารถพบได้ในอวัยวะอื่น ๆ นอกจากตับเช่นเดียวกับเอ็นไซม์ AST แต่เอ็นไซม์ ALT มีปริมาณในตับมากกว่าอวัยวะอื่นๆ (Johnston E.D., 2002)

- Triglycerides จัดเป็นไขมันพวก neutral fat เกิดจากการ esterification ระหว่าง กลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) โดยกรดไขมันเหล่านี้มักมีลักษณะยาวเป็นลูกโซ่และมีคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคู่ ซึ่งกรดไขมันอาจเป็นชนิดที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัวก็ได้ ในภาวะปกติระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ในตับจะมีในระดับต่ำมาก แต่ถ้าตับมีพยาธิสภาพจากการได้รับสารที่เป็นพิษต่อตับบางชนิด รวมถึงเอทานอลซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ ได้สารตัวหนึ่งที่เป็นพิษต่อตับคือ acetaldehyde ซึ่งมีผลให้การทำหน้าที่ของการเผาผลาญไขมันของตับเสียไป และนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่เรียกว่า fatty liver หรือ steatosis ซึ่งเกิดจากการเพิ่มการนำเข้าของกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ตับ การลดกระบวนการ oxidation ของกรดไขมันและการเพิ่มอัตราการ esterification ของกรดไขมันไปเป็นไตรกลีเซอร์ไรด์ ซึ่งสารเคมีจำนวนมากรวมทั้งแอลกอฮอล์ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไตรกลีเซอร์ไรด์ในซีรั่ม (Nestel et al., 1965; Hemell, 1973) รวมทั้งมีการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับ (Mccullough , 1998; Lieber, 2000; Haggai et al., 2003) ดังนั้นระดับไตรกลีเซอร์ไรด์ในซีรั่มและตับจึงเป็นค่าเคมีคลินิกที่บ่งบอกถึงการถูกทำลายของเซลล์ตับหรือการเกิด fatty liver ในสัตว์ทดลองได้

- Malondialdehyde (MDA) สารเคมีหลายๆตัวถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) ขึ้นและชักนำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress คือภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของการสร้างอนุมูลอิสระและมีการลดลงของ antioxidant defenses ของเนื้อเยื่อ (Hashimoto et al., 1968) เป็นผลให้กระตุ้นกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งจะทำลายไขมัน (lipid) ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ (เช่นเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์) ทำให้เกิดความเสียหายทั้งด้านโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ตามมา (Imam and Recknagel, 1977) ซึ่งสามารถวัดการเกิด lipid peroxidation โดยวัดสารที่เป็นผลลัพธ์ของกระบวนการ คือ Malondialdehyde (MDA)

- Glutathione ในเนื้อเยื่อตับจะมีกลไกป้องกันการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระและกระบวนการ lipid peroxidation ได้โดย glutathione ซึ่งเป็น antioxidant ของตับ ระดับของ glutathione จึงลดลงจากการถูกนำไปใช้ในการทำลายพิษของแอลกอฮอล์ (Cho.Il et al., 1998)

- Cytokines (TNF-alpha, IL-1beta) สารที่เป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบนั้นจะเป็นสาเหตุให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ Kupffer cells ให้หลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น TNF-alpha, IL-1beta (Vrba and Modriansky, 2002) จึงเกิดการกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพต่อตับ อีกทั้ง Kupffer cells ยังเป็นตัวสร้างและหลั่งอนุมูลอิสระ กระตุ้นให้เกิด oxidative stress ขึ้นได้อีกทาง ซึ่งภาวะนี้ยังสามารถการกระตุ้นการสร้าง TNF-alpha เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย (Zhanxiang et al., 2003)

Histopathology เป็นการตรวจเพื่อยืนยันถึงการเกิดโรคและผลการรักษา เมื่อตับถูกทำลาย การทำหน้าที่ต่างๆ จะเกิดความบกพร่อง เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ และมักจะพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic or Histopathologic lesions) ตับที่มีพยาธิสภาพจะพบลักษณะของการเสื่อม (Degeneration) และการตายของเซลล์ตับ (Necrosis) การเสื่อมของตับนั้นมีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ cell swelling หรือเกิด fatty liver (Steatosis) คือการมีไขมันสะสมอยู่มากเกินไป เป็นลักษณะรอยโรคที่เกิดจาก ความผิดปกติของ lipid metabolism เห็นเป็นลักษณะ fat globules ถ้าเป็นโรครุนแรง fat globules จะรวมกันเป็นเม็ดใหญ่อยู่ใน cytoplasm และอาจมีผลดัน nucleus ไปอยู่ด้านหนึ่งของเซลล์ ถ้าโรครุนแรงจะพบ hepatic cell death มีลักษณะต่างๆ กัน เช่น single cell necrosis จนถึง focal หรือ zonal necrosis นอกจากนั้นพยาธิสภาพของตับอาจพบได้ในอีกลักษณะหนึ่งคือการสะสมไกลโคเจน ปกติตับจะสะสมไกลโคเจนไว้เป็นพลังงานในตับจะเห็นลักษณะที่ติดสี PAS สม่ำเสมอ แต่ในภาวะโรคจะพบ ลักษณะที่ติดสี PAS ซีดลงเนื่องจากตับมีการ

ดึงพลังงานไปใช้มากขึ้นจากการได้รับสารที่เป็นพิษต่อตับ หรืออาจพบได้อีกลักษณะคือติดสี PAS เข้มเป็นจุด ๆ ลักษณะเป็น globules กระจายแทรกอยู่ในบริเวณที่ติดสีจางในเนื้อตับ (เสรี ดอนแก้วบัว, 2539; บุญมี สัญญสุจจารี, 2543)

จากค่าเคมีคลินิกเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้การถูกทำลายของตับซึ่งกลไกการเกิดและวิธีการตรวจวัดจะได้อธิบายต่อไป

3. **ฤทธิ์ในการทำให้เกิดพิษต่อตับจากเอทานอล**

เอทานอลเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก คุณสมบัติเป็นกลางและสามารถละลายน้ำได้ดี ดูดซึมได้อย่างรวดเร็วโดยการแพร่และเกิดขึ้นค่อนข้างสมบูรณ์ อัตราการดูดซึมขึ้นกับ gastric emptying time ซึ่งขึ้นกับปริมาณและชนิดของอาหาร รวมทั้งขึ้นอยู่กับความแปรผันระหว่างบุคคลซึ่งเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรม จากการดูดซึมที่ค่อนข้างสมบูรณ์และการกระจายตัวได้ดีทั่วร่างกายจึงทำให้เกิดผลต่ออวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย มากน้อยแปรผันตามปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะนั้นๆ (Comporti,1985; Dewey, 1991) การกำจัดเอทานอลประมาณ 90% จะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยปริมาณที่ถูกออกซิไดส์ จะเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ (Lieber,1985) รวมทั้งขึ้นกับปัจจัยทางพันธุกรรม (Radel and Goldman, 2000; Reth et al., 2003) ตับเป็นอวัยวะที่มีเลือดมาเลี้ยงสูงจึงได้รับผลกระทบจากเอทานอลโดยตรง

3.1 **กลไกการทำลายตับของเอทานอล มีดังต่อไปนี้**

3.1.1 เกิดจากพิษของเอทานอลโดยตรง

3.1.2 เกิดพิษจากเมแทบอไลต์ของเอทานอลที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชั่นโดยเอ็นไซม์ 3 ระบบ ได้แก่

- Alcohol dehydrogenase (ADH) พบได้ในส่วน liver cytosol จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเอทานอลดังนี้ (Cunningham and Ivester,1999)

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} CH_3CHO + NADH + H^+$$

ในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเอทานอลโดย ADH ต้องใช้ NAD^+ เป็น cofactor ในการทำงานของเอ็นไซม์นี้ เป็น NAD^+ dependent dehydrogenase enzyme เมื่อ NAD^+ ร่วมกับ ADH และเอทานอลแล้วจะจับตัวกันเป็น binary complex จากนั้นจะเกิดการย้ายไฮโดรเจนออกจากเอทานอลไปให้ NAD^+ ผลลัพธ์จะได้ acetaldehyde และ NADH จากนั้น NADH จะเข้าสู่กระบวนการหายใจ

(respiratory chain) ในไมโตคอนเดรียผ่านกระบวนการส่งผ่านอิเล็คตรอน จากนั้นจะได้ NAD^+ กลับมาใช้เป็น cofactor ในกระบวนการออกซิเดชั่น ของ เอทานอลได้ใหม่ (Comporti,1995)

- Catalase

catalase เอ็นไซม์นี้พบในเยื่อบุทั่วไปเช่น ตับ ไต เม็ดเลือดแดง เป็นต้น เป็นเอ็นไซม์หลักของการออกซิเดชั่นเอทานอลนอกเซลล์ตับ catalase จะเกิดออกซิเดชั่นโดยจับกับ H_2O_2 แต่กรณีที่มี H_2O_2 ปริมาณมาก catalase จะเร่งการสลาย H_2O_2 ได้น้ำและออกซิเจน อัตราเร็วของกระบวนการ นี้ขึ้นอยู่กับ อัตราเร็วของ การเกิด H_2O_2 และความเข้มข้นของ catalase และเอทานอล แต่กระบวนการนี้ไม่เกิดเด่นชัดในสัตว์ทดลอง (Comporti,1985)

- Microsomal ethanol oxidizing system (MESO)

ระบบนี้ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในปฏิกิริยา มี cofactor คือ NADPH เอ็นไซม์ในระบบนี้สามารถเพิ่มการทำงานมากขึ้นได้เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น เอ็นไซม์ที่สำคัญในระบบนี้คือ Cytochorm P450 enzyme ที่สำคัญคือ CYP2E1 ในภาวะปกติจะเป็น pathway ย่อยในการเปลี่ยนแปลงเอทานอล แต่เมื่อได้รับเอทานอลในขนาดสูงเป็นเวลานานจะมีการชักนำให้มีการสร้าง CYP2E1 เพิ่มขึ้น (Abdalla, 2001) ผลของเอ็นไซม์นี้จะทำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species คือ hydroxyethyl free radicals ซึ่งจะไปกระตุ้นการเกิด lipid peroxidation และทำให้เกิดความเสียหายต่อตับตามมา CYP2E1 ที่เพิ่มขึ้นยังเป็นผลให้เกิดการลดลงของ GSH (Lindors,1995) จากการศึกษาของ Tomas Zima และคณะ (2001) พบว่า free radicals ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการทำงานของ CYP2E1 ที่เพิ่มขึ้น กลไกการเกิดพยาธิสภาพต่อตับเกิดจากการเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ free radicals เป็นผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลงหน้าที่และโครงสร้างของตับ เกิดการทำปฏิกิริยาขึ้นบน membrane และเกิดการเสียหายของหน้าที่และโครงสร้างของ cell membrane รวมทั้งชักนำให้เกิดความผิดปกติ ทางระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokines ต่าง ๆ พบว่าเอทานอลจะกระตุ้นภาวะดังกล่าวแล้ว ยังเป็นผลมาจากการชักนำ CYP2E1 ทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation (Nieto and Greenwel, 2000)

หลังจากเอทานอลผ่านกระบวนการ oxidation โดยเอ็นไซม์ ADH, MEOS และ catalase แล้ว จะได้ acetaldehyde ซึ่ง เป็น pathogenetic agent ทำให้เกิดพิษมากกว่าเอทานอล acetaldehyde มีผลไปจับกับโปรตีนในตับเช่น collagen, albumin และ lipoprotein เกิดเป็น acetaldehyde adducts ที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นผลให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน

กลไกของ acetaldehyde ที่ก่อให้เกิด alcohol liver disease สรุปไว้โดย Lindros (1995)

1) metabolic

- ทำให้เกิดความบกพร่อง ของ mitochondrial oxidative phosphorylation จากการทำให้มีการเพิ่มของ NADH/NAD ratio
- เป็น enzyme inhibitor โดยจับกับ free amino group อื่น ๆ

2) oxidative

- เพิ่มการการเกิด free radicals activity และ lipid peroxidation
- รบกวนการเคลื่อนย้าย toxic aldehydes
- ทำให้เกิดความบกพร่องของ glutathione action และ antioxidant function

3) immunototoxic

- ทำให้เกิด protein-acetaldehyde adducts: immunogenic adducts

4) Proinflammatory or profibrotic

- กระตุ้นการหลั่งของ cytokines
- กระตุ้นการสร้าง collagen

นอกจากนี้ พบว่าเอทานอลทำให้เกิดภาวะ hyperlipidemia และ fatty liver (FAO/WHO Expert committee on food additives,1970) โดยกระตุ้นตับให้สร้างไขมันและไตรกลีเซอร์ไรด์เพิ่มขึ้น และลดการสลายกรดไขมันทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง

3.1.3 เกิดจากการกระตุ้น Kupffer cells

นอกจากการเกิดพิษต่อตับจะเป็นผลมาจากเอทานอลโดยตรง เมแทบอไลต์ของเอทานอลและ protein adducts ที่เกิดขึ้นแล้ว ในปัจจุบันมีหลายการศึกษายืนยันว่า Kupffer cells เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญและเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดพยาธิสภาพต่อตับที่เกิดจากการได้รับเอทานอล (Tsukamoto and Shelly, 2001)โดยทำให้เกิดการเพิ่ม permeability ของลำไส้ต่อ endotoxin ที่หลั่งจากแบคทีเรียในลำไส้ เป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ endotoxin หรือ LPS (lipopolysacharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียกรัมลบ จากการแยกลำไส้เล็กของหนูขาวออกมาศึกษานอกตัว พบว่า เมื่อได้รับเอทานอลในระยะเฉียบพลันจะเพิ่ม permeability ของลำไส้ต่อ endotoxin มากขึ้นตามขนาดของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นโดยเอทานอลจะเพิ่มความสามารถของสารต่างๆในการซึมผ่านผนังเซลล์ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ lipid และ lipoprotein ของผนังเซลล์ จึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการขนย้ายและการดูดซึมสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เพิ่มขึ้น (Thurman,1998; Keshvarzian et al., 2001) LPS ในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นจะเข้าสู่ตับ ทาง portal vein นอกจากนั้น

ฤทธิ์ของเอทานอลยังมีผลต่อหน้าที่ของ Kupffer cells ในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี phagocytosis เสียไป (Bautista and Spitzer,1999; Vrba and Modriansky, 2002) เมื่อ Kupffer cells ถูกกระตุ้นก็จะเป็นผลให้เกิดการหลั่งสารที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบและเกิดพยาธิสภาพต่อตับ เช่น TNF- alpha, IL-1 (Mcclain et al., 1997; Thurman et al., 1999; Hoek and Pastorino, 2002) และ free radicals (Wheeler et al., 2001) จากการได้รับเอทานอลแบบเรื้อรังนั้นเกิดจาก endotoxin influx จากลำไส้ไปกระตุ้น Kupffer cells ดังกล่าว และจากการศึกษายืนยันว่า Kupffer cells เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดพยาธิสภาพโดยให้ $GdCL_3$ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการหน้าที่ของ kupffer cells และทำการวัด free radicals พบว่าสามารถลดจำนวนการสร้าง free radicals ลงได้ (Jarvelainen, 2000) อย่างไรก็ตามการสร้าง free radicals จาก CYP2E1 หลังจากเกิดภาวะ hypoxia ก็เป็นอีกทางที่เกิดขึ้นได้เช่นกัน

4 **หลักการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์**

กล้องจุลทรรศน์เป็นเครื่องช่วยตา ใช้ขยายวัตถุหรือเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยทั่วไป ประกอบด้วย 3 ระบบ (อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, 2531) คือ

1. Illuminating System เป็นระบบผลิตลำแสงให้พุ่งตรงไปตกยังชิ้นเนื้อ ประกอบด้วย

   - แหล่งผลิตลำแสง ซึ่งได้แก่ หลอดไฟฟ้าและดวงอาทิตย์ แหล่งผลิตอิเลคตรอน คือ เส้นทังสเตน ที่ใช้กำลังไฟฟ้าพลังแรงสูงผ่าน

   - Condenser lens ทำหน้าที่รวบรวม ลำแสงที่กระจายออกจากแหล่งผลิตให้เป็นลำพุ่งตรงไปตกที่ชิ้นเนื้อ เพื่อเกิดความเข้มของแสงมากที่สุด

2. Imaging System ระบบนี้ประกอบด้วยเลนส์ชนิดต่างๆ มาประกอบกันเพื่อรวบรวมแสงที่ผ่านออกจากชิ้นเนื้อนั้นให้เกิดภาพขยายใหญ่มากขึ้นเป็นลำดับได้แก่

   - Objective lens เป็นเลนส์ที่อยู่ใกล้วัตถุหรือชิ้นเนื้อ เป็นตัวรวบรวมแสงที่ผ่านออกจากชิ้นเนื้อแล้วให้ภาพขยายขึ้นมีขนาดกลาง

   - Projector lens (Ocular หรือ eyepiece) เป็นเลนส์ที่อยู่ใกล้ตา และสามารถขยายภาพขนาดกลาง เพื่อให้ภาพสุดท้ายขยายใหญ่ขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Image Recording System ระบบนี้เปลี่ยนลำแสงให้เกิดภาพขึ้น แล้วบันทึกออกมาในลักษณะดังต่อไปนี้คือ

- การเห็นภาพหรือรับภาพบนจอเรืองแสง (ถ้าใช้ลำแสงอิเลคตรอน)
- ใช้ฟิล์มถ่ายภาพแล้วอัดหรือขยายภาพออกมาศึกษา

โดยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้คือ Light microscope ซึ่งประกอบด้วยระบบ 3 ระบบดังกล่าว โดยใช้แสงไฟฟ้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเป็นลำแสงซึ่งจะถูกรวบรวมโดย condenser lens ไปตกที่ชิ้นเนื้อที่วางอยู่บน stage ส่วน objective lens จะรับแสงที่ผ่านออกจากชิ้นเนื้อขยายออกเป็นภาพ ส่งต่อไปที่ ocular lens เพื่อขยายภาพสุดท้ายให้มีขนาดใหญ่ไปตกบนจอหรือ retina บนตาของคนที่ดูกล้อง ดังนั้นกำลังขยายของชิ้นเนื้อ ได้มาจากผลคูณของความสามารถของ objective และ ocular lens (eyepiece) ชิ้นเนื้อที่ต้องการศึกษาด้วย Light microscope ควรมีความบางพอเพื่อให้ลำแสงผ่านทะลุได้ แสงบางส่วนจะถูกดูดซับด้วยองค์ประกอบที่แตกต่างกันของชิ้นเนื้อ ผลของความแตกต่างของการดูดซับแสงทำให้เกิด contrast ขึ้น เป็นผลให้เห็นลักษณะโครงสร้างของชิ้นเนื้อนั้น และการย้อมสีจะช่วยในการเพิ่ม contrast มากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย