บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย มีสรรพคุณในการรักษาโรคและอาการต่างๆได้อย่างมากมาย โดยส่วนของฟ้าทะลายโจรที่นำมาใช้เป็นยา คือ ใบและส่วนที่อยู่เหนือดิน ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญประเภทแลคโตนสูง (นาถฤดี สิทธิสมวงศ์, 2532) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ แอนโดรกราโฟไลด์ สามารถฆ่าเชื้อโรคและรักษาอาการท้องร่วงได้ โดยไม่มีผลข้างเคียงหรืออาการพิษใดๆ นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันพิษต่อตับจากสารพิษหรือยาต่างๆได้ เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Handa and Sharma, 1990a) กาแลคโตซามีนและอะเซตามิโนเฟน (Handa and Sharma, 1990b) เอธานอล (วันดี อุดมอักษร, 2536; Pornpen et al., 1994) เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาที่ผ่านมามุ่งเน้นผลของแอนโดรกราโฟไลด์ในการป้องกันพิษต่อตับจากสารต่างๆเป็นสำคัญ การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ในการรักษาโรคหรืออาการที่เกิดขึ้นต่อตับยังมีค่อนข้างน้อย จึงเป็นที่น่าสนใจในการวิจัยครั้งนี้ที่จะศึกษาฤทธิ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ ในการรักษาอาการพิษที่เกิดจากอะเซตามิโนเฟน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนานำแอนโดรกราโฟไลด์ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และเกิดโทษน้อยที่สุด

1. ขนาดของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ให้ทางปากหนูขาว แล้วทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับ

Zieve และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาขนาดของอะเซตามิโนเฟน ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับหนูขาว พบว่า อะเซตามิโนเฟนขนาด 850 และ 1,400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ที่ให้ 1 ครั้ง ทางปาก ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับหนูขาวเป็นวงกว้างโดยที่หนูขาวยังมีชีวิตอยู่ เทียบได้กับการตัดตับหนูขาวออก 50% และ 80-90% ตามลำดับ ต่อมามีการศึกษาถึงขนาดของอะเซตามิโนเฟนในการก่อพิษต่อตับ โดยใช้อะเซตามิโนเฟนขนาด 900 1,200 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่า อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,200 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทำให้เกิดการตายของเซล์ตับได้มากกว่า 50% ผลจากการเกิดพิษต่อตับขึ้นอยู่กับขนาดที่ใช้ เมื่อให้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทำให้ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนฟน และลดลงสู่ระดับปกติที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน มีการทำลายของเซลล์ตับระดับปานกลาง และเกิดการตายของเซลล์ตับรอบๆ central vein (centrilobular zone) ขณะที่อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ลดลงสู่ระดับปกติที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน มีการทำลายของเซลล์ตับระดับรุนแรง และเกิดการตายของเซลล์ตับเป็นวงกว้างขึ้น (centrilobular zone และ midzone) (อุชุจิตรา เกียรติวีระสกุล, 2538)

ดังนั้นในการศึกษาขนาดของอะเซตามิโนเฟนที่ให้ทางปากหนูขาว แล้วทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับครั้งนี้ จึงได้ใช้อะเซตามิโนเฟนขนาด 1,200 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นสารก่อพิษต่อตับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มหนูขาว เป็นพารามิเตอร์ในการบ่งชี้พยาธิสภาพของเซลล์ตับ ผลการศึกษาพบว่า อะเซาตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ก่อให้เกิดพิษต่อตับได้มากกว่าอะเซตามิโนเฟนขนาด 1,200 มิลลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน (แผนภูมิที่ 2 และ 3) จึงได้นำอะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลิกรัมมาใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับของหนูขาว ในการศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการทดแทนเซลล์เก่าภายหลังการทำลายเซลล์ตับด้วยอะเซตามิโนเฟน

2. ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อการทดแทนเซลล์เก่าของตับภายหลังการทำลายเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

เนื่องจากได้มีการศึกษาพบว่า แอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เมื่อให้ก่อนอะเซตามิโนเฟน 48 ชั่วโมง ทำให้การทดแทนเซลล์เก่าของตับที่ถูกทำลายโดยพิษต่อตับจากอะเซตามิโนเฟนเกิดเร็วขึ้น โดยพิจารณาจากระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มหนูขาวที่ลดลงสู่ระดับปกติเร็วขึ้น สอดคล้องกับผลการถูกทำลายของเซลล์ตับที่ลดลงจากระดับปานกลางมาเป็นระดับเล็กน้อย ขณะเดียวกันก็พบว่า เมื่อให้แอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เพียงอย่างเดียว กลับทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับมากขึ้น โดยพบจำนวนของเซลล์ตับปกติลดลง การถูกทำลายของเซลล์ตับมีระดับตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงปานกลาง ที่เวลา 12, 24 และ 36 ชั่วโมงหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ จึงอาจเป็นไปได้ว่า แอนโดรกราโฟไลด์มีผลทำลายเซลล์ตับหนูขาว ร่วมกับการกระตุ้นให้การทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายจากพิษต่อตับจากอะเซตามิโนเฟนเกิดเร็วขึ้น (อุชุจิตรา เกียรติวีระสกุล, 2538)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้แอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เพื่อศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการทดแทนเซลล์เก่าของตับภายหลังการทำลายของเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟนขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่า ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนร่วมกับแอนโดรกราโฟไลด์ ยังคงสูงอยู่จนกระทั่งที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน ขณะที่ระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนอย่างเดียว ลดลงสู่ระดับปกติ (แผนภูมิที่ 5 และ 6) อาจเป็นไปได้ว่า ไม่เพียงอะเซตามิโนเฟนเท่านั้นที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับ แอนโดรกราโฟไลด์อาจมีฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับด้วย ทำให้การทำลายตับเพิ่มมากขึ้น โดยปกติแล้วเอนไซม์ SGOT และ SGPTจะอยู่ภายในเซลล์ (cytoplasm หรือ mitochondria) ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาได้ เมื่อเกิดการบาดเจ็บจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆขึ้นภายในเซลล์ตับ เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการซึมผ่านของสาร (membrane permeability) เกิดการรั่วไหลของเอนไซม์ SGOT และ SGPT ออกนอกเซลล์ (Robbins, 1974) เมื่อพิจารณาจากระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT

ในซีรั่มของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์อย่างเดียว พบว่า เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 และ 60 ชั่วโมงหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ (24 และ 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน) ซึ่งสัมพันธ์กับระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนร่วมกับแอนโดรกราโฟไลด์ ที่เพิ่มมากกว่ากลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนเพียงอย่างเดียว ($p<0.05$)

นอกจากนี้ ยังพบว่า หนูขาวกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์อย่างเดียว มีระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 และ 60 ชั่วโมงหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ สอดคล้องกับผลของอุชุจิตรา (2538) ในการศึกษาฤทธิ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ที่มี peak ของระดับเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรั่มหนูขาว ลักษณะคล้ายกัน และยังสัมพันธ์กับผลตรวจทางพยาธิวิทยา ที่พบว่าแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง (มีค่าเป็น + 1½ ถึง +2) ที่เวลาเดียวกัน

จากการศึกษาปริมาณ DNA ในตับของหนูขาวกลุ่มต่างๆ พบว่า ในระยะแรก (12-24 หลังได้รับอะเซตามิโนเฟน) มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ DNA ในตับน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและค่าเริ่มต้นภายในกลุ่มเดียวกัน (แผนภูมิที่ 7.) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณ DNA ในตับของหนูขาวภายหลังการตัดตับ (70% partial hepatectomy) ที่พบว่า การสังเคราะห์ DNA ในตับของหนูขาวไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมงหลังการตัดตับ (สัมพันธ์กับระยะ G_1 phase) จนกระทั่งที่เวลา 22-24 ชั่วโมงหลังการตัดตับ (S phase) ปริมาณของ DNA ในตับของหนูขาวจึงเพิ่มขึ้นสูงสุด (Arias et al., 1994) จากนั้นจึงลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลา 24-30 ชั่วโมงหลังการตัดตับ (Bollum and Potter, 1959) อย่างไรก็ตาม เชื่อว่า การสังเคราะห์ DNA ในตับที่เกิดขึ้นภายหลังการบาดเจ็บของเซลล์ตับจากสารพิษหรือการผ่าตัดนั้น มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งการบาดเจ็บของเซลล์ตับ พบว่า เซลล์ตับที่อยู่บริเวณ periportal zone จะมีความสามารถในการสังเคราะห์ DNA มากกว่าเซลล์ตับบริเวณอื่นๆ เนื่องจากมีจำนวนของ EGF receptors มากกว่า อาจเป็นไปได้ว่า อะเซตามิโนเฟนทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับบริเวณ centrilobular zone ที่มีอัตราการสังเคราะห์ DNA ช้ากว่าเซลล์ตับบริเวณ periportal zone ขณะเดียวกันเมื่อเกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทำให้ระดับแคลเซี่ยมอิสระภายในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น กระตุ้นเอนไซม์ Ca^{2+}-dependent endonuclease ให้ทำงานมากขึ้น เกิดการแตกหักของ DNA ในนิวเคลียสของเซลล์ตับ (Saido, Sorimashi and Suzuki, 1994) จึงทำให้ DNA ในตับมีปริมาณค่อนข้างคงที่

เมื่อพิจารณาระดับเอนไซม์ thymidine kinase ในหนูขาวทั้งสองกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟน พบว่าเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน ขณะที่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์อย่างเดียว ระดับเอนไซม์ thymidine kinase เพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ (24 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน) เช่นเดียวกัน (แผนภูมิที่ 9.) สอดคล้องกับผลการศึกษาการทดแทนเซลล์เก่าของตับที่ถูกทำลายจากการตัดตับ (70% partial hepatectomy) พบว่า ระดับเอนไซม์ thymidine kinase ในซีรั่มหนูขาวเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 12-24 ชั่วโมงหลังการตัดตับ และระดับเอนไซม์ thymidine kinase ใน cytoplasm ของ

เซลล์ตับก็เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการตัดตับเช่นเดียวกัน โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการตัดตับ (Morimoto, Numato and Tanaka, 1995)

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า เอนไซม์ thymidine kinase เป็น rate-limiting enzyme ของกระบวนการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์ตับที่มีการเจริญแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว หรือเซลล์ตับที่มีการบาดเจ็บ เช่น 70% partial hepatectomy, embryonal development, tumor growth และ foetus liver เป็นต้น โดยระดับเอนไซม์ thymidine kinase จะเพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลานาน 24-48 ชั่วโมงหลังการตัดตับ ขณะที่ปริมาณของ DNA ในตับลดลง (Bollum and Potter, 1959) ระดับเอนไซม์ thymidine kinase จะเพิ่มขึ้นสูงสุดสัมพันธ์กับการสังเคราะห์ DNA ในระยะ S phase มากกว่าระยะ G_1 phase ในวัฏจักรเซลล์ (Sherley and Kelly, 1988) การสังเคราะห์เอนไซม์ thymidine kinase ขึ้นอยู่กับปริมาณ thymidine triphosphate ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ DNA และปริมาณของ DNA ในตับ พบว่า เมื่อปริมาณของ DNA ในตับมีการจำลองแบบทางพันธุกรรมมากกว่า 59% จะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ thymidine kinase ของเซลล์ตับลดลง (Bello, 1974)

จะเห็นได้ว่าในการวิจัยครั้งนี้ ระดับเอนไซม์ thymidine kinase ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนอย่างเดียว ยังคงเพิ่มขึ้นจนกระทั่งที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน แสดงถึงการแบ่งตัวของเซลล์ตับอย่างต่อเนื่องภายหลังการถูกทำลายของเซลล์ตับจากอะเซตามิโนเฟน ขณะที่ระดับเอนไซม์ thymidine kinase ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์อย่างเดียวลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ (36 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน) เช่นเดียวกับระดับเอนไซม์ thymidine kinase ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟน
ร่วมกับแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งลดลงที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน (รูปภาพที่ 16.) อาจเป็นไปได้ว่า แอนโดรกราโฟไลด์มีฤทธิ์ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับของหนูขาว จึงกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ตับเพิ่มขึ้นในระยะแรกหลังได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ สอดคล้องกับผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์อย่างเดียว ที่พบการบวมของ mitochondria และมีการจัดเรียงตัวของ rough ER ไม่เป็นระเบียบ (รูปภาพที่ 22.) ขณะที่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนร่วมกับแอนโดรกราโฟไลด์ มีปริมาณของ mitochondria และ rough ER ลดลงเป็น 50% ของกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน และมีการสะสมของไกลโคเจนมากขึ้น (รูปภาพที่ 24.) ซึ่งผลการทำลายเซลล์ตับนี้เพิ่มมากกว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนอย่างเดียว ที่พบมีการทำลายของ inner membrane ของ mitochondria เป็นบางส่วน และมีการบวมของ mitochondria และการจัดเรียงตัวของ rough ER ใน cytoplasm ไม่เป็นระเบียบ (รูปภาพที่ 20.)

อาจสรุปได้ว่า ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีต่อการแบ่งตัวของเซลล์ตับเพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายภายหลังการก่อพิษต่อตับด้วยอะเซตามิโนเฟน เป็นผลมาจากการก่อให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ตับของแอนโดรกราโฟไลด์ โดยลักษณะและกลไกการทำลายเซลล์ตับจากแอนโดรกราโฟไลด์ยังไม่ทราบแน่ชัด และผลของแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาพิษต่อตับภายหลังได้รับอะเซตามิโนเฟน 12 ชั่วโมง จึงน่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการบาดเจ็บของเซลล์ตับจากแอนโดรกราโฟไลด์ โดยเฉพาะผลที่มีต่อ mitochondria ของเซลล์ตับ และอาจเป็นไปได้ว่า ระยะเวลาที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์และขนาดของแอนโดรกราโฟไดล์ที่นำมาใช้ มีส่วนสำคัญต่อฤทธิ์ในการรักษาการบาดเจ็บที่เกิดกับเซลล์ตับโดยแอนโดรกราโฟไลด์