รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันความเป็นพิษต่อตับของหนูขาวที่ได้รับพาราเซทตะมอล

Effect of the aqueous extract from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. and its protective mechanism on paracetamol hepatotoxicity in rats

โดย

มาลินี วงศ์นาวา*

พีรรัชต์ ไทยนะ*

นิสิตา บำรุงวงศ์*

อนุพงษ์ นิติเรืองจรัส**

อภิชาต มูชอ**

วิภาวดี ประสาททอง***

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์* ภาควิชาพยาธิวิทยา ** และภาควิชาชีวเวชศาสตร์ ***
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ประจำปี 2544
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สมอ
เลขหมู่ QK495 E9 ว33 ม5452
ISBN 228466

ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของลูกใต้ใบในการป้องกันความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาว

มาลินี วงศ์นาวา[1] พีรรัชต์ ไทยนะ[1] นิสิตา บำรุงวงศ์[1]
อนุพงศ์ นิติเรืองจรัส[2] อภิชาติ มูซอ[2] และวิภาวดี ประสาททอง[3]
[1]ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ [2]ภาควิชาพยาธิวิทยา [3]ภาควิชาชีวเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันการเกิดพิษต่อตับของหนูขาวที่ได้รับพาราเซทตะมอลขนาดสูง โดยวัดระดับเอนซัยม์ transaminase(SGOT และ SGPT) alkaline phosphatase (SALP) และบิลิรูบินในซีรั่ม ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของตับพร้อมทั้งวัดระดับพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอล (glucuronide , sulfate, cysteine และ mercapturic acid conjugate) ในปัสสาวะ และวัดระดับรีดิวส์กลูตาไธโอนที่ตับของหนูขาวใหญ่ที่ได้รับลูกใต้ใบวันละ 2 ครั้ง ในขนาด 0.8, 1.6 และ 3.2 กรัม/กก. ที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 7 วันติดต่อกันก่อน หรือ 2 วันติดต่อกันหลัง หรือ 7 วันติดต่อกันก่อนและ 2 วันติดต่อกันหลังได้รับพาราเซทตะมอลทางปาก 1 ครั้งในขนาด 3 กรัม/กก. พบว่าน้ำต้มลูกใต้ใบในขนาด 1.6 และ 3.2 กรัม/กก มีผลลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้เมื่อพิจารณาจากค่า SGOT, SGPT, bilirubin และ histopathology score ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนขนาด 0.8 กรัม/กก ไม่สามารถลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้ โดยที่การให้น้ำต้มลูกใต้ใบก่อนพาราเซทตะมอลมีแนวโน้มว่าให้ผลดีกว่าเมื่อให้หลังพาราเซทตะมอล และการให้ทั้งก่อนและหลังพาราเซทตะมอลให้ผลดีที่สุด ส่วนปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอลทั้ง 4 ชนิดในปัสสาวะ และปริมาณรีดิวส์ กลูตาไธโอนในตับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นน้ำต้มลูกใต้ใบยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้โดยมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน(BHT) 1 เท่า แสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับไม่ได้เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนซัยม์ cytochrome P450 แต่ส่วนหนึ่งเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ป้องกันการลดระดับรีดิวส์กลูตาไธโอนในตับ ผลการวิจัยในครั้งนี้สนับสนุนสรรพคุณของลูกใต้ใบในการใช้ป้องกันความเป็นพิษของสารเคมีต่อตับ

คำสำคัญ : ลูกใต้ใบ พาราเซทตะมอล พิษต่อตับ เอนซัยม์ไซโตโครมพี 450 กลูตาไธโอน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Effect of *Phyllanthus amarus* and Its Hepatoprotective Mechanism on Paracetamol Hepatotoxicity in Rats

Malinee Wongnawa[1], Peerarat Thaina[1], Nisita Bumrungwong[1], Anupong Nitiruangjarat,[2] Apichat Muso[2] and Vipavadee Prasartthong[3]

[1] Department of Pharmacology, Faculty of Science [2] Department of Pathology, and [3]Department of Biomedical Science, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University.

ABSTRACT

The effect of *Phyllanthus amarus* Schum.& Thonn and its hepatoprotective mechanism were studied on paracetamol hepatotoxicity in rats by monitoring serum transaminase (SGOT and SGPT) , alkaline phosphataseas(ALP) and bilirubin as well as by histopathological examination of liver. Furthermore, the amount of paracetamol and its metabolites (glucuronide, sulfate, cysteine and mercapturic acid conjugate) in urine and hepatic reduced glutathion were also determined. *P. amarus* hot water extract at the dose of 0.8, 1.6 or 3.2 g/kg were orally administered bid. for 7 days prior to, or 2 consecutive days after , or for 7 days prior to and 2 consecutive days after single oral dose of paracetamol (3 g/kg). The results showed that the extract of *P. amarus* at the dose of 1.6 and 3.2 g/kg decreased the hepatotoxicity caused by paracetamol as indicated by the decrease in SGOT and SGPT , bilirubin and histopathological scale while the SALP were not change. The hepatoprotective mechanism of this plant was not related to the inhibition of cytochrome P450 activity, but partly due to the antioxidant activity and the protective effect on the decrease of hepatic reduced glutathione. These results support the value of *P. amarus* which had been used in folk medicine for the treatment of toxic liver diseases.

Keywords : *Phyllanthus amarus*, Paracetamol, Hepatotoxicity, Cytochrome P450, Glutathione Antioxidant activity

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1-2
วิธีวิจัย	3-6
ผลการวิจัย	6-9
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	9-12
เอกสารอ้างอิง	17-19

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. รูปถ่ายชิ้นเนื้อตับแสดงจุลพยาธิสภาพ 13
รูปที่ 2. แผนภาพแสดงกลไกการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับ 14

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อระดับ bilirubin , SGOT, SGPT , ALP ในซีรั่ม ปริมาณรีดิวส์กลูตาไธโอนในตับและ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในหนูขาวที่ได้รับพาราเซทตะมอล 15

ตารางที่ 2 ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอล(glucuronide, sulfate,cysteine และ mercapturic acid conjugates) ที่ถูกขับออกในปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง 16

บทนำ

ลูกใต้ใบ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae พืชชนิดนี้เดิมเคยเรียกชื่อพ้องกับ *Phyllanthus niruri* Linn. แต่ปัจจุบันจัดว่าเป็นพืชคนละชนิดกัน ชนิดที่พบในประเทศไทยเป็น *P. amarus* (จารีย์ บันสิทธิ์, 2534) ซึ่งเป็นพืชล้มลุก ลำต้นตรง สูงประมาณ 10-60 ซม. ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน ผลมีขนาดเล็ก รูปกลมแบน ผิวเกลี้ยง ขึ้นตามที่รกร้างและตามข้างทางทั่วไป ส่วนที่ใช้เป็นยา ใช้ทั้งต้น มีรสขมจัด โดยมีสรรพคุณทางยา คือ แก้พิษไข้ทุกชนิด แก้ดีซ่าน โรคท้องมาน แก้ริดสีดวง จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมี พบว่า สมุนไพรชนิดนี้มีสารประกอบประเภท ลิกแนน (lignan) เช่น Phyllanthin, Hypophyllanthin นอกจากนี้ยังมีสารอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ และไตรเทอร์ปีน เป็นต้น (เอมอร โสมนะพันธ์ และคณะ,2533)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาโดย ตระกูล กิตติสิน ตั้งแต่ปี 2495 พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์กดหัวใจ ขยายหลอดเลือด ลดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ และมีฤทธิ์ลดไข้ในสัตว์ทดลอง นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดอีกด้วย (Moshi M.J.,et al. 1997)

ปัจจุบันมีนักวิจัยทั้งชาวไทยและต่างประเทศหลายคณะที่สนใจศึกษาพืชชนิดนี้เพื่อศึกษาผลในการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบ แต่รายงานผลการทดลองมีทั้งสนับสนุนและขัดแย้งกัน ตัวอย่าง เช่น การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย Venkateswaran และคณะ (1987) พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบสามารถจับกับแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบี และยับยั้งเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งจำเป็นในการเพิ่มจำนวนของไวรัส และทำให้ปริมาณของแอนติเจนพื้นผิว (HBsAg) ของสัตว์ทดลองที่เป็นพาหะเรื้อรังลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดลูกใต้ใบยังสามารถลดปริมาณเซลล์ตับของสัตว์ทดลองที่ถูกทำลายโดยไวรัสตับอักเสบ บี ได้

ผลการศึกษาทางคลินิกโดย Thyagarajan และคณะ (1988) พบว่า ลูกใต้ใบสามารถขจัดสภาวะการเป็นพาหะในผู้ป่วยและอาสาสมัครที่เป็นพาหะเรื้อรังของไวรัสตับอักเสบ บี ได้ประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ที่รับประทานผงลูกใต้ใบในขนาด 200 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 30 วัน เช่นเดียวกับ นิลวรรณและคณะ (2533) ซึ่งได้รายงานการศึกษาผลของการใช้ลูกใต้ใบในอาสาสมัครคนไทยพบว่าปริมาณ HBsAg ลดลง 20 % ในกลุ่มพาหะที่ไม่มีอาการตับอักเสบ ส่วนกลุ่มที่มีอาการตับอักเสบเรื้อรังซึ่งมีทั้ง HBsAg และ HBeAg ระดับ DNA ของไวรัสลดลง และกลุ่มที่มีความผิดปกติของสมรรถภาพของตับ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (12 ใน 14 ราย) จะมีการทำงานของตับกลับเป็นปกติหลังให้ยา 5 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม Leelarasame, et. al (1990) พบว่าลูกใต้ใบไม่มีผลในการกำจัด HBsAg ในผู้ที่เป็นพาหะซึ่งไม่มีอาการตับอักเสบ เช่นเดียวกับ Thamlikitkul และคณะ(1991) พบว่า

ลูกใต้ใบมีผลเล็กน้อย (5%) ในการกำจัด HBsAg ในผู้ที่เป็นพาหะดังกล่าว เมื่อให้ลูกใต้ใบในขนาด 600-1,200 มก.ต่อวัน เป็นเวลานาน 30-60 วัน โดยไม่พบอาการข้างเคียงใดๆ ส่วนการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง ของน้ำสกัดจากลูกใต้ใบในหนูถีบจักรไม่พบอาการพิษหรือความผิดปกติใดๆ ต่ออวัยวะภายในของสัตว์ทดลอง (Venkateswaran et al, 1987)

ส่วนผลของลูกใต้ใบในการรักษาโรคตับอื่นๆ มีผู้ศึกษาน้อยทั้ง ๆ ที่ในตำราแพทย์แผนโบราณของทั้งไทยและต่างประเทศต่างระบุสรรพคุณในการรักษาดีซ่าน และโรคตับ มีเพียงรายงานของ Syamasundar และคณะ (1985) ที่ศึกษา สารสกัดจากลูกใต้ใบ เช่น phyllanthin, hypophyllanthin และ triacontanal ซึ่งพบว่าสามารถป้องกันการเกิดพิษต่อตับจาก คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) และกาแลคโตซามีน (galactosamine) ในเซลล์ตับของหนูขาว (primary cultured rat hepatocytes) ส่วนฤทธิ์ของลูกใต้ใบในการป้องกันความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับนั้นยังมีผู้ศึกษาน้อย

จากผลการศึกษาเบื้องต้น(มาลินี วงศ์นาวา และคณะ 2542) ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับในหนูขาวใหญ่โดยให้น้ำต้มลูกใต้ใบครั้งเดียวในขนาด 0.8-3.2 ก/กก ที่เวลาต่างๆกันคือ 1 ชม.ก่อน, 2 หรือ 4 ชม.หลังพาราเซทตะมอล แล้วตรวจวัดการทำงานของตับโดยใช้ระดับเอนซัยม์ SGOT, SGPT, ALP เป็นตัวบ่งชี้และศึกษา histopathology ของเนื้อเยื่อตับ พบว่าน้ำต้มลูกใต้ใบมีฤทธิ์ลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับได้ดีที่สุดเมื่อให้ล่วงหน้า 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามทั้งระดับเอนซัยม์และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับยังไม่กลับคืนสู่สภาพปกติ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าการให้ยาเพียง 1 ครั้งอาจไม่เพียงพอในการป้องกันการเกิดพิษอย่างสมบูรณ์ จึงควรมีการศึกษาผลการให้ยาแบบต่อเนื่องเพื่อประเมินประสิทธิภาพและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของลูกใต้ใบในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับชีวิตประจำวันได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้ประกอบการพัฒนายาสมุนไพรชนิดนี้ให้เป็นยารักษาโรคตับหรือป้องกันสารพิษต่อตับได้ในอนาคตและยังเป็นการส่งเสริมการพัฒนายาสมุนไพรอย่างครบวงจรต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) ศึกษาฤทธิ์ของลูกใต้ใบในการป้องกัน หรือ รักษาความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาว
2) ศึกษาขนาด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ลูกใต้ใบเพื่อป้องกันหรือรักษาความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาว

3) ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันหรือรักษาความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับ

วิธีวิจัย

1. ขั้นตอนการวิจัย

1.1 วิธีการเตรียมสมุนไพร

ลูกใต้ใบที่ใช้ในการศึกษาเก็บจากแหล่งต่างๆในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้ต้นโตเต็มที่สูงประมาณ 1 ฟุต ตัวอย่างพืชที่เก็บทุกครั้งได้รับการตรวจเอกลักษณ์โดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์และเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (PSU Herbarium, voucher number 111555) นำต้นลูกใต้ใบที่เก็บได้ไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาดเพื่อล้างสารปนเปื้อนที่อาจติดมาหลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งประมาณ 12 ชั่วโมง หั่นเป็นท่อนประมาณ 1 นิ้ว อบที่อุณหภูมิ 50-60°C ให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นให้ละเอียด เก็บไว้ในขวดโหลปิดสนิทซึ่งบรรจุ silica gel เพื่อป้องกันความชื้น

การเตรียมน้ำต้มลูกใต้ใบ เตรียมโดยใช้ผงลูกใต้ใบแห้งหนัก 100 กรัม ต้มกับน้ำ 500 มล. ให้เดือดประมาณ 15 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรอง(Whatman no.1) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ได้น้ำต้มลูกใต้ใบที่มีความเข้มข้น 1 กรัม/มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ น้ำหนัก 250-300 กรัม เลี้ยงไว้ล่วงหน้าในกรงเดี่ยว 1 อาทิตย์ ก่อนการทดลอง ตลอดการทดลองสัตว์ทดลองถูกเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ (22 $\pm$3° C) และแสงสว่าง(12 ชั่วโมงมืด/สว่าง) ให้อาหารสำเร็จรูป(ซี.พี. 082, บริษัทเอส.คับบลิวที จำกัด) และน้ำดื่มตามต้องการ ในการให้ยาแต่ละครั้งให้ในปริมาตร 10 มล/กก.

1.3 การศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ลูกใต้ใบที่มีฤทธิ์ในการป้องกันพิษของพาราเซตะมอล ต่อตับในหนูขาว

สัตว์ทดลองได้รับการอดอาหาร 16 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดลองและ 3 ชั่วโมงหลังให้พาราเซทตะมอล แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 16 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ 50% sucrose1 ครั้งขนาด 10 ml/kg ทางปาก

กลุ่มที่ 2 ให้พาราเซทตะมอล 1 ครั้งในขนาด 3 g/kg ทางปากในรูปยาน้ำแขวนตะกอนใน 50% sucrose

กลุ่มที่ 3-5 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 0.8, 1.6, 3.2 g/kg ทางปาก วันละ 2 ครั้งเช้า-เย็น ติดต่อกัน 7 วัน

กลุ่มที่ 6-8 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 0.8, 1.6, 3.2 g/kg ทางปาก วันละ 2 ครั้งเช้า- เย็น ติดต่อกัน 7 วัน ก่อนให้ พาราเซทตะมอล 1 ครั้งในขนาด 3 g/kg

กลุ่มที่ 9-11 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 0.8, 1.6, 3.2 g/kg ทางปาก วันละ 2 ครั้งเช้า-เย็น ติดต่อกัน 2 วันหลังให้พาราเซทตะมอล 1 ครั้งในขนาด 3 g/kg

กลุ่มที่ 12-14 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 0.8, 1.6, 3.2 g/kg ทางปาก 1 ครั้ง ก่อนให้ พาราเซทตะมอล 1 ชั่วโมง และวันละ 2 ครั้งเช้า-เย็นติดต่อกัน ต่อไปอีก 2 วัน

กลุ่มที่ 15-16 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 1.6, 3.2 g/kg ทางปาก วันละ 2 ครั้งเช้า-เย็นติดต่อกัน 7 วัน ก่อนให้พาราเซทตะมอล 3 g/kg และวันละ 2 ครั้งเช้า-เย็นติดต่อกันต่อไปอีก 2 วัน

1.4 การวิเคราะห์หาระดับเอนซัยม์ SGOT, SGPT , SALP และ bilirubin ในเลือด

หลังจากให้พาราเซทตะมอลไปแล้ว 48 ชั่วโมง เจาะเลือดจากแอ่งใต้ตา (orbital plexus) ของหนูขณะสลบด้วย ether ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำซีรั่มที่ได้ไปหาระดับเอนซัยม์ SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase) , SGPT (serum glutamic pyruvic transaminase), SALP (serum alkaline phosphatase) และ bilirubin โดยใช้เครื่อง Automated analyzer(HITACHI 717) ใช้ kit reagent ของบริษัท เบอริงเกอร์มันน์ไฮม์ (ประเทศไทย) จำกัด

1.5 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ

หลังจากเก็บเลือดจากสัตว์ทดลองแล้ว ทำให้สัตว์ทดลองหมดความรู้สึกโดยใช้วิธี cervical dislocation ผ่าตัดเปิดหน้าท้องและตัดตับเป็นชิ้นขนาด 5-8 ลบ.มม. แช่ใน 10% formalin นำไปเตรียมเนื้อเยื่อแล้วย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทัศน์ชนิดธรรมดาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และ lymphocytic infiltration เป็นต้น การจำแนกความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้คือ

เกรด 0 ลักษณะเซลล์ตับปกติ ขอบเขตของเซลล์ชัดเจน นิวเคลียสกลม มีนิวคลิโอลัสชัดเจน เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดปรากฏอยู่รอบๆ central vein และข้างเซลล์ตับ

เกรด 1 เซลล์ตับรอบๆ central vein 1-2 แถวเกิด degeneration พบได้อย่างน้อย 1 central vein ต่อกำลังขยาย 100 เท่า พบ single cell necrosis ได้ในบาง hepatic lobule มี lymphocytic infiltration ในบริเวณที่เกิด necrosis

เกรด 2 เซลล์ตับรอบๆ central vein 3-4 แถวแรกเกิด degeneration หรือ necrosis โดยพบลักษณะดังกล่าวมากกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวน central vein ทั้งหมด พบ lymphocytic infiltration ในบริเวณที่เกิด necrosis เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดส่วนใหญ่ถูกทำลาย

เกรด 3 เซลล์ตับรอบๆ central vein ถูกทำลายอย่างมากจนไปถึง mid zone และอาจมีการเชื่อมต่อกันของบริเวณที่เกิด necrosis ไปยัง hepatic lobule ข้างเคียง พบลักษณะดังกล่าว เกือบทุก central vein เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทั้งหมดถูกทำลาย มี lymphocytic infiltration ในบริเวณที่เกิด necrosis

1.6 การหาปริมาณ reduced glutathione ในเซลล์ตับ

ตัดแยกตับ 1 กรัมออกมาจากสัตว์ทดลองในข้อ 1.3 บดให้ละเอียดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์(0.1 mM, pH 7.4) แล้วนำไปหาปริมาณ reduced glutathione ตามวิธีของ Mitchell et al. (1973) เปรียบเทียบปริมาณ reduced glutathione ในสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม

1.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบเสถียรด้วยการให้ไฮโดรเจนอิออน โดยที่ DPPH (1,1-diphenyl-2–picryl hydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรซึ่งมีสีม่วง เมื่อถูกรีดิวส์จะเปลี่ยนไปเป็นสาร diphenyl -picrylhydrazine ซึ่งมีสีเหลือง

วิธีการทดลอง นำน้ำต้มลูกใต้ใบความเข้มข้น 100-300 มคก/มล มาทำปฏิกิริยา 1:1 กับสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 60ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน นำไปวางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งปฏิกิริยา ตามวิธีของ Hatano,T. และคณะ(1989) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT(butylated hydroxytoluene)

1.8 การหาปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอลในปัสสาวะ

แบ่งหนูขาวออกเป็น 3 กลุ่ม ให้อดอาหาร 16 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมซึ่งให้ 50% sucrose ทางปากในขนาด 10 มล/กก

กลุ่มที่ 2 ให้พาราเซทตะมอลในขนาด 3 กรัม/กก 1 ครั้งในรูปยาน้ำแขวนตะกอนใน 50% sucrose

กลุ่มที่ 3 ให้น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาด 3.2 กรัม/กก วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ติดต่อกัน 7 วัน ก่อนให้พาราเซทตะมอลในขนาด 3 กรัม/กก

เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง วัดปริมาตรแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -70^{0} C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูป (glucuronide, sulfate, cysteinee และ mercapturic acid conjugate) ตามวิธีของ Miners, J. และคณะ(1984) โดยใช้ HPLC ซึ่งประกอบด้วย Water 717 plus Autosampler, Water 515 pump, Water 2487 absorbance detector(UV) และใช้คอลัมน์ชนิด C18 μ Bondapak (3.9x300 mm) mobile phase ประกอบด้วย 2.5% acetonitrile - 97.5% 20mmol/l orthophosphoric acid (pH 7.4) อัตราการไหล 2 มล/นาที เปรียบเทียบ peak area ของพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปในสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม

2. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าตัวแปรต่างๆ นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($X \pm SE$) การวิเคราะห์หาความแตกต่างของตัวแปรทางชีวเคมี (SGOT, SGPT, bilirubin, ALP) และ ปริมาณ reduced glutathione ใช้วิธี one-way analysis of variance(ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มใช้วิธี planned comparison การเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อของตับใช้สถิติแบบ nonparamrtric โดยวิธี Kruskal Wallis ตามด้วย Newman-Keuls test

ผลการวิจัย

1. ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาว

ผลของการให้น้ำต้มลูกใต้ใบ พาราเซทตะมอล และน้ำต้มลูกใต้ใบร่วมกับพาราเซทตะมอล ต่อระดับเอนซัยม์ SGOT, SGPT, ALP และ bilirubin ในซีรั่ม และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของตับแสดงไว้ในตารางที่ 1.

จากผลการทดลองพบว่าการให้พาราเซทตะมอลครั้งเดียวในขนาด 3 กรัม/กกในหนูขาว

ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ เมื่อพิจารณาจากระดับเอนซัยม์ SGOT, SGPT, ALP และ bilirubin ในซีรั่ม ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (3569.5 ± 615.4, 2622.3 ± 460.6, 353.1 ± 27.7U/L และ 0.24 ± 0.04 mg% ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (106.9 ± 5.3, 53.1 ± 2.9, 282.6 ± 19.7U/L และ 0.04 ± 0.01 mg% ตามลำดับ) คิดเป็น 33, 49, 1.2 และ 6 เท่าตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลต่อเนื้อเยื่อตับที่พบว่าถูกทำลายอย่างรุนแรง (score 2.9 ± 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (score 0)โดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ central vein (centrilobular area) ดังแสดงในรูปที่ 1.

ส่วนกลุ่มที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบอย่างเดียวในขนาด 0.8, 1.6 หรือ 3.2 กรัม/กก วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนซัยม์และ bilirubin เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับผลการตรวจเนื้อเยื่อตับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

จากการเปรียบเทียบขนาดของน้ำต้มลูกใต้ใบที่ใช้ในการทดลองพบว่า น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาด 0.8 กรัม/กก ไม่มีผลในการลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่ว่าจะให้ก่อนหรือหลังพาราเซทตะมอล ส่วนขนาด 1.6 และ 3.2 กรัม/กกให้ผลในการลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้ แต่ผลที่เกิดจากน้ำต้มลูกใต้ใบทั้งสองขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

การให้น้ำต้มลูกใต้ใบติดต่อกันเป็นเวลา 7 วันก่อนให้พาราเซทตะมอลมีผลป้องกันการเกิดพิษต่อตับได้บางส่วน โดยน้ำต้มลูกใต้ในขนาด 1.6 และ 3.2 กรัม/กก ทำให้ระดับเอนซัยม์ SGPT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญคิดเป็น 53 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงไปอยู่ที่ระดับ 1239.7 ± 351.6 และ 1106.0 ± 350.2 U/L ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า SGOT ที่ลดลง 53 % (1660.9± 489.4 U/L) และ 40 % (2111.5 ± 810.1 U/L) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อที่พบว่าถูกทำลายน้อยลงโดย score ลดลงจาก 2.9 ± 0.05 ในกลุ่มที่ได้รับพาราเซทตะมอลอย่างเดียว ไปเป็น 2.3 ± 0.2 และ 2.5 ± 0.02 ในกลุ่มที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบ 1.6 และ 3.2 กรัม/กก ตามลำดับ ส่วนค่า bilirubin ลดลงเล็กน้อย(21 % และ17% ตามลำดับ)

ส่วนการให้น้ำต้มลูกใต้ใบติดต่อกัน 2 วันภายหลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับพาราเซทตะมอลแล้ว ให้ผลในการลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับน้อยกว่าการให้ล่วงหน้า โดยมีผลลดระดับเอนซัยม์ SGOT ลงได้ 39% และ 32% (2162.0 ± 781.2, 2416 ± 649.2 U/L) ลดระดับ SGPT ลงได้ 46% และ 41% (1390.4 ± 383.0, 1546.0 ± 493.6 U/L) และการทำลายเนื้อเยื่อตับลดลง (score = 2.2 ± 0.4 , 2.4 ± 0.4) เมื่อให้ในขนาด 1.6 และ 3.2 กรัม/กก ตามลำดับ โดยไม่มีผลลดระดับ bilirubin

เมื่อทดลองให้น้ำต้มลูกใต้ใบ 1 ครั้งก่อนให้พาราเซทตะมอล 1 ชั่วโมง และหลังจากนั้นให้น้ำต้มลูกใต้ใบติดต่อกันไปอีก 2 วัน พบว่ามีผลลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้ดีกว่าเมื่อให้หลังพาราเซทตะมอลอย่างเดียว โดยที่ระดับเอนซัยม์ SGOT ลดลง 42% และ 46% (2038.1±

730.6, 1924.9 ± 715.1 U/L) ส่วนค่า SGPT ลดลง 50% และ 71% (1299.6 ± 499.0, 759.2 ± 240.1)) เมื่อให้ในขนาด 1.6 และ 3.2 กรัม/กก ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า bilirubin ที่ลดลง 33% อยู่ที่ระดับ 0.16 ± 0.03 ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อตับที่พบว่าถูกทำลายน้อยลง (score 2.4 ± 0.3, 2.4 ±0.2 ตามลำดับ)

เมื่อให้น้ำต้มลูกใต้ใบวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เป็นเวลา 7 วันก่อนให้พาราเซทตะมอล และให้ติดต่อกันไปอีก 2 วันหลังให้พาราเซทตะมอล พบว่ามีผลในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลได้ดีที่สุด โดยที่ระดับเอนซัยม์ SGOT ลดลง 70% และ 66% อยู่ที่ระดับ 921.0 ± 265.0 และ 1210.2 ± 391.8 U/L เช่นเดียวกับค่า SGPT ซึ่งลดลง 62% และ 41% อยู่ที่ระดับ 994.3 ± 334.3 และ 1538.9 ±536.3 และค่า bilirubin ลดลง 41% และ 25% อยู่ที่ระดับ 0.41 ± 0.02 และ 0.18 ± 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อตับที่พบว่าถูกทำลายน้อยลง (score 2.3 ± 0.3 และ 2.0 ±0.4 ตามลำดับ)

เป็นที่น่าสังเกตุว่าการให้น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาดและเวลาต่าง ๆ กันไม่มีผลลดระดับเอนซัยม์ ALP ในซีรั่มของหนูขาวที่เกิดความเป็นพิษเนื่องจากพาราเซทตะมอล

2. ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อการแปรรูปของพาราเซทตะมอล

ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อการแปรรูปของพาราเซทตะมอลในหนูขาวแสดงไว้ในตารางที่2 จากการวัดปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอลในปัสสาวะพบว่าการให้น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาด 3.2 กรัม/กก วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ติดต่อกัน 7 วันก่อนให้พาราเซทตะมอลไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปทั้ง 4 คือ glucuronide, sulfate, cysteine และ mercapturic acid conjugates ที่ถูกขับออกมาในปัสสาวะภายในเวลา 24 ชั่วโมง (21.36, 43.9, 23.18 , 1.27 และ 10.68 % ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับพาราเซทตะมอลเพียงอย่างเดียว (18.92, 41.84, 26.37, 1.57 และ 11.46 % ตามลำดับ)

3. ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อระดับ reduced glutathione (GSH) ในตับ

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าระดับ reduced glutathione (GSH) ในตับของหนูที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบอย่างเดียวเป็นเวลา 7 วัน ในขนาด 0.8, 1.6 และ 3.2 กรัม/กก (5.4 ±0.2, 5.8 ± 0.2 และ 6.0 ±0.2 μmol/ g.liver ตามลำดับ) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (5.9 ± 0.5 μmol/ g.liver) ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับพาราเซทตะมอลเพียงอย่างเดียว หรือได้รับพาราเซทตะมอลร่วมกับน้ำต้มลูกใต้ใบในขนาดและเวลาต่างๆ มีระดับ reduced glutathione ในตับเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 6.8- 9.4 μmol/ g.liver

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบเสถียรด้วยการให้ไฮโดรเจนอิออน

น้ำต้มลูกใต้ใบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ(DPPH radical scavenging activity) ได้สูงสุด 88.82 % ที่ความเข้มข้น 150 μg/ml โดยมีค่า EC_{50} = 45 μg/ml ในขณะที่สารมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} = 20 μg/ml

วิจารณ์ผลการวิจัย

พาราเซทตะมอลเป็นยาลดไข้แก้ปวดที่นิยมใช้กันทั่วไป ซึ่งมีความปลอดภัยเมื่อให้ในขนาดรักษาตามปกติ (500-1,000 mg) แต่ถ้าได้รับในขนาดสูงมีผลทำให้ตับถูกทำลายอย่างรุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ทั้งในคนและสัตว์ทดลอง(Michell et al., 1973, Prescott, 1979, Zimmerman, 1981)

ในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ป้องกันการทำลายตับ พาราเซทตะมอลเป็นสารชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ นอกเหนือจาก ethanol, carbontetrachloride และ galactosamine การทดลองในครั้งนี้ใช้พาราเซทตะมอลขนาด 3 กรัม/กก โดยให้ยาทางปาก ซึ่งพบว่าเป็นขนาดที่สูงเพียงพอในการทำให้เกิดพิษต่อตับได้ โดยพิจารณาจากระดับเอนซัยม์ SGOT, SGPT , ALP และ bilirubin ที่เพิ่มสูงขึ้นในซีรั่ม ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เซลล์ตับถูกทำลายทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป มีผลให้เกิดการรั่วไหลของเอนซัยม์และสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ออกสู่กระแสเลือด นอกจากนั้นผลการตรวจสอบเนื้อเยื่อตับก็พบว่าถูกทำลายอย่างรุนแรงและมีลักษณะเฉพาะคือ เซลล์ตับที่ถูกทำลายมักอยู่บริเวณ centrilobular area (zone 3)

กลไกของพาราเซทตะมอลในการทำลายตับเกิดจากการที่สารแปรรูปชนิดหนึ่งของพาราเซทตะมอลที่มีความว่องไวในการจับกับอิเล็คตรอน (electrophilic metabolite) คือ N-acetyl-*p*-benzoquinoneimmine (NAPQI) เข้าไปจับกับสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ (covalent binding or adduction) เกิดการ ออกซิไดซ์ sulphydryl group (-SH) ในโปรตีน(protein thiol) ได้แก่ Ca^{2+}-ATPase ใน endoplasmic reticulum ซึ่งมีความสำคัญในการเคลื่อนย้ายแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย (Mitchell et al.,1973) นอกจากนั้นระดับแคลเซียมที่เพิ่มสูงขึ้นยังสามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide radical ($NO^{\bullet}$) และ calpains ซึ่งเปลี่ยน xanthine deoxygenase ไปเป็น xanthine oxidase ประกอบกับระดับของเหล็กและทองแดงที่พบว่าเพิ่มสูงขึ้น อาจเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ตามมาจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999)(รูปที่ 2)

การแปรรูปพาราเซทตะมอลไปเป็น NAPQI ซึ่งเป็นพิษต่อตับนี้อาศัยการทำงานของเอนซัยม์ cytochrome P450 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYP2E1 และ CYP 3A ซึ่งพบมากในบริเวณ centri - lobular area ของตับ ในวิถีการแปรรูปตามปกติพาราเซทตะมอลส่วนใหญ่ถูกแปรรูปโดยการรวมตัวกับ glucuronide และ sulfate มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ถูกแปรรูปไปเป็นสารพิษ NAPQI (น้อยกว่า 10%) ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้ว จะถูกลดความเป็นพิษโดยการทำปฏิกิริยากับกลูตาไธโอน (GSH) ได้เป็น mercapturic acid และ cysteinee conjugate แล้วถูกขับออกทางปัสสาวะ

ความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับจะเกิดขึ้นเมื่อปริมาณของ NAPQI มีมากเกินกว่าที่ GSH จะทำลายฤทธิ์ได้หมดซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อได้รับยาในขนาดสูงมาก หรือมีการกระตุ้นการทำงานของ cytochrome P450 หรือปริมาณ GSH มีไม่เพียงพอ (Zimmerman and Maddrey,1993) นอกจากนั้น nitric oxide radical อาจเป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งในการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับจากพาราเซทตะมอลได้ (Michael, et al, 1999)

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้น้ำต้มลูกใต้ใบอย่างเดียวในขนาด 0.8-3.2 กรัม/ก ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลต่อการทำงานของตับ ส่วนการศึกษาผลของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันหรือลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลโดยการให้น้ำต้มลูกใต้ใบก่อนหรือ/และหลังพาราเซทตะมอลพบว่า การให้น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาดต่ำ (0.8 กรัม/กก) ไม่สามารถป้องกันหรือลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้ แต่เมื่อให้ในขนาดที่สูงขึ้น(1.6 และ 3.2 กรัม/กก) โดยให้ล่วงหน้า 1 อาทิตย์จะมีผลในการลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลลงได้ดีกว่าการให้หลังจากที่หนูได้พาราเซทตะมอลแล้ว นอกจากนั้นการให้น้ำต้มลูกใต้ใบทั้งก่อนและหลังพาราเซทตะมอลจะให้ผลดียิ่งขึ้น ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่า SGOT , SGPT และ bilirubin ที่ลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำต้มลูกใต้ใบมีผลในการป้องกันการรั่วของสารดังกล่าวออกมานอกเซลล์ อย่างไรก็ตามค่า ALP ที่ไม่เปลี่ยนแปลงอาจมีสาเหตุมาจากการที่มีเซลล์บางส่วนถูกทำลายอย่างถาวรจนเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตันของทางเดินน้ำดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อที่ยังคงพบเซลล์ตายโดยเฉพาะในบริเวณ centrilobular area แม้จะพบในปริมาณที่น้อยลง

จากการศึกษาผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อการแปรรูปของพาราเซทตะมอลซึ่งพบว่าปริมาณสารแปรรูปของพาราเซทตะมอลในปัสสาวะทุกชนิดไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับลูกใต้ใบร่วมกับพาราเซทตะมอลเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับพาราเซทตะมอลอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าน้ำต้มลูกใต้ใบไม่มีผลในการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการทำงานของเอนซัยม์ cytochrome P450 ทั้งนี้จากการศึกษาของ Miners และคณะ (1984) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ phenobarbitone หรือ 3-methylcholan-threne ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการทำงานของ cytochrome P450 จะมีผลทำให้พาราเซทตะมอลถูกขับออกในรูปของ cysteine และ mercapturic acid conjugates มากขึ้น เนื่องจากสารเหนี่ยวนำดังกล่าวจะทำให้เกิดสารแปรรูปที่มีความว่องไวมากขึ้นซึ่งจะไปจับกับ glutathione และถูกขับออกใน

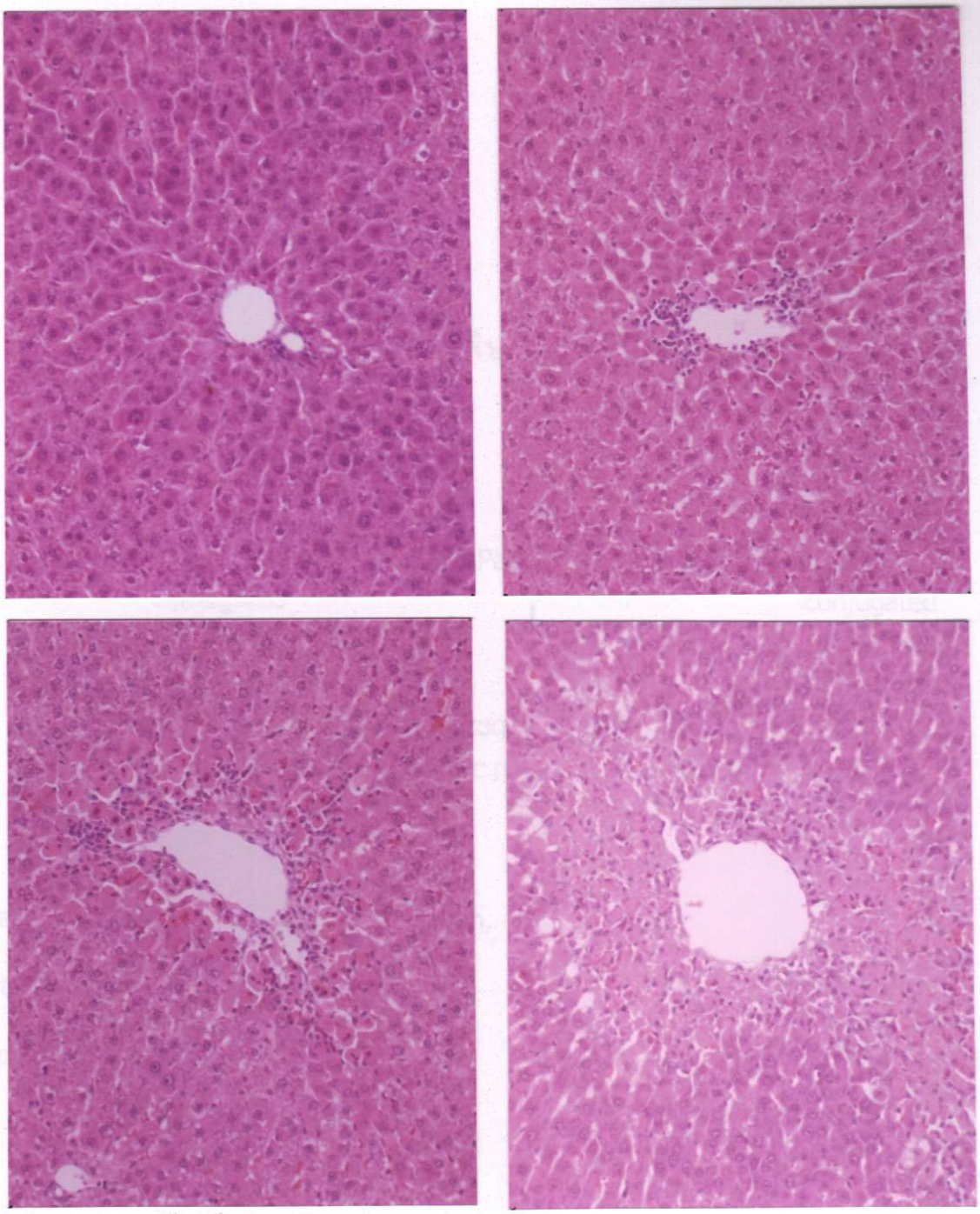
รูปของ cysteinee และ mercapturic acid conjugates มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อให้ piperonyl butoxide ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนซัยม์ cytochrome P450 มีผลทำให้พาราเซทตะมอลถูกขับออกในรูปของ cysteinee และ mercapturic acid conjugates น้อยลง ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการสูญเสียการทรงตัวของหนูขาวที่ได้รับ pentobarbital เมื่อให้น้ำต้มลูกใต้ใบในขนาดเดียวกัน (มาลินี วงศ์นาวา และ คณะ 2542) ดังนั้นการที่ลูกใต้ใบสามารถลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอลได้จึงไม่น่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนซัยม์ cytochrome P450 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYP 2E1 และ/หรือ CYP 3A อย่างไรก็ตามมีรายงานที่พบว่าสารสกัดของลูกใต้ใบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนซัยม์ aniline hydroxylase ซึ่งเป็น cytochrome P450 ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็ง (Jeena, Joy and Kuttan 1999)

จากการวัดระดับ reduced glutathione (GSH) ในตับ ซึ่งพบว่าหนูที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบติดต่อกัน 7 วันมีระดับ GSH ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าน้ำต้มลูกใต้ใบไม่มีฤทธิ์ในการเพิ่มระดับ GSH ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่มีอยู่ในร่างกาย ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับพาราเซทตะมอลเพียงอย่างเดียวเมื่อวัดระดับ GSH ภายหลังได้รับยา 48 ชั่วโมง พบว่ามีระดับ GSH เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบร่วมกับพาราเซทตะมอล เข้าใจว่าเกิดจากการตอบสนองของร่างกาย (compensate mechanism) ในการป้องกันหรือรักษาความเป็นพิษ ทั้งนี้ Vendemiale และคณะ (1996) ได้แสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับพาราเซทตะมอลในขนาดสูงระดับ GSH ในตับจะลดลงต่ำสุดภายในเวลา 4-6 ชั่วโมง ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวจะพบการเกิด lipid peroxidation สูงเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นระดับ GSH จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นและการเกิด lipid peroxidation จะลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นกลไกของน้ำต้มลูกใต้ใบในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลอาจไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับ GSH โดยตรงแต่อาจเกิดจากการป้องกันการลดระดับ GSHในช่วงวิกฤติ (4-6 ชั่วโมงหลังให้พาราเซทตะมอล) ดังที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (มาลินี วงศ์นาวา และคณะ 2542) ซึ่งพบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับพาราเซทตะมอล หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำต้มลูกใต้ใบร่วมกับพาราเซทตะมอลมีระดับ GSH สูงกว่าหนูที่ได้รับพาราเซทตะมอลเพียงอย่างเดียว (2.53± 0.24 VS 1.91 ±0.15 μg/g)

จากการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบว่าน้ำต้มลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) (IC_{50}=45 μg/ml) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT แล้วน้ำต้มลูกใต้ใบจะมีฤทธิ์อ่อนกว่า BHT (IC_{50}=20 μg/ml) ประมาณ 1 เท่า โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับพริกไทยและดีปลี (IC_{50}= 56-69 μg/ml) (Tewtrakul, 1998) และมีฤทธิ์อ่อนกว่า curcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญในขมิ้นประมาณ 40 เท่า (IC_{50}= 1.03 μg/ml) (Song, et al. 2001) และเนื่องจากสารสำคัญที่พบในลูกใต้ใบได้แก่ สารประกอบ lignans เช่น phyllanthin และ hypophyllanthin สารประกอบพวก flavonoids ได้แก่ quercetin และ astragalin สารประกอบ ellagitannins เช่น amarinic acid สารประกอบพวก

hydrolysable tannins เช่น phyllanthisiin D และ amarin เป็นต้น สารสำคัญเหล่านี้เป็นสารพวก polyphenol ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์หลายอย่างเช่น radical scavenging activity , metal chelating activity หรือยับยั้งเอนซัยม์ที่กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Lebeau,J. et al 2000, Sreejayan and Rao,1996) นอกจากนั้นผลการทดลองเบื้องต้นของผู้วิจัย(ยังไม่ได้เผยแพร่) ยังพบว่าน้ำต้มลูกใต้ใบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและ UV spectrum ของสารประกอบเหล็กที่อาจแสดงถึง chelating activity ของน้ำต้มลูกใต้ใบ ประกอบกับผลการทดลองในสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการให้น้ำต้มลูกใต้ใบก่อนได้รับสารพิษมีผลลดความเป็นพิษได้ดีกว่าเมื่อให้ภายหลังได้รับสารพิษ ดังนั้นกลไกในการป้องกันการเกิดพิษต่อตับของลูกใต้ใบอาจเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับฤทธิ์ของขมิ้นหรือพริกไทยในการป้องกันการเกิดพิษต่อตับ (Song, et al. 2001, Koul and Kapil, 1993)

ผลการศึกษาในครั้งนี้และผลการทดลองอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน (มาลินี วงศ์นาวา และคณะ 2542, Prakash, A. et al 1995, Syamasundar, K.V. et al 1985) แสดงให้เห็นว่าลูกใต้ใบมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดพิษของสารเคมีต่อตับ จึงเป็นการสนับสนุนสรรพคุณของลูกใต้ใบในการใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคเกี่ยวกับตับ เช่น ดีซ่าน ตับอักเสบ โดยที่กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษต่อตับอาจเกิดจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ในการป้องกันการลดระดับรีดิวส์กลูตาไธโอนในตับ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนซัยม์ cytochrome P450 โดยเฉพาะ CYP 2E1 และ/หรือ CYP 3A นอกจากนั้นอาจเกิดจากกลไกอื่น ๆที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพิจารณาประกอบการศึกษาทางคลินิคในการทดสอบประสิทธิภาพของลูกใต้ใบในการป้องกันหรือรักษาโรคตับต่อไป



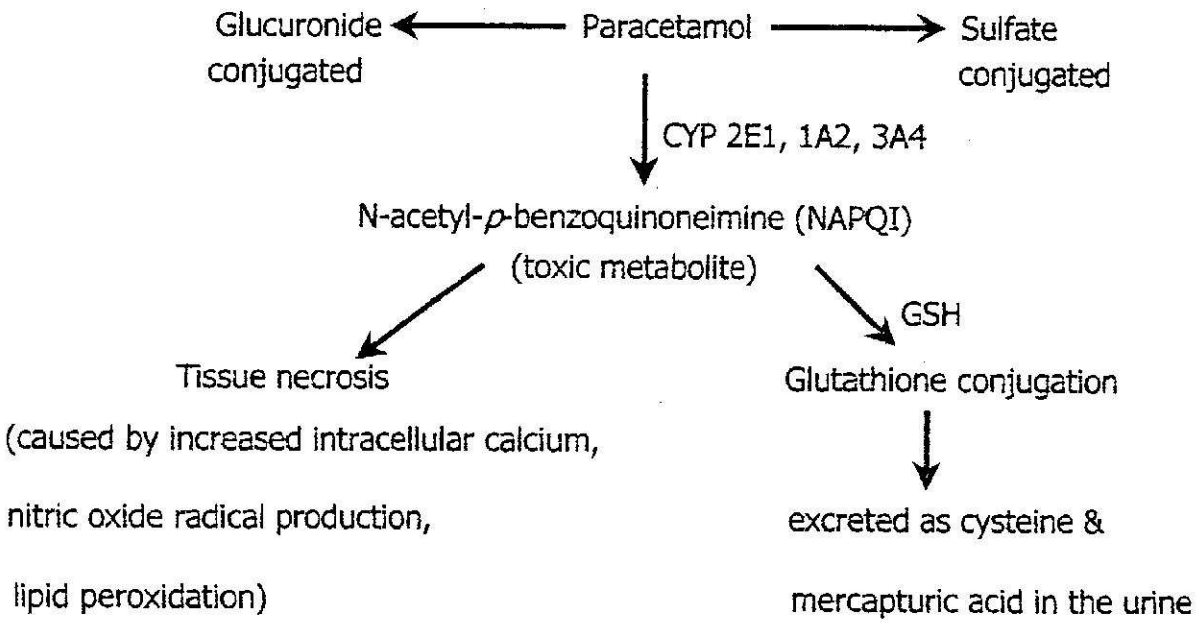
รูปที่ 1 รูปถ่ายชิ้นเนื้อตับแสดงจุลพยาธิสภาพ

a) เกรด 0 b) เกรด 1 c) เกรด 2 d) เกรด 3

(รายละเอียดดูในเนื้อหาเรื่องการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ)

a	**b**
c	**d**

รูปที่ 2 การแปรรูปและการเกิดพิษของพาราเซทตะมอล



ตารางที่ 1 ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อระดับ bilirubin, SGOT, SGPT, ALP ในซีรั่ม ปริมาณกลูตาไธโอนในตับและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ [ค่าที่แสดง = ค่าเฉลี่ย(ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)]

Treatment	Number	Total.bilirubin (mg %)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	ALP (U/L)	GSH (umol/g.liver)	Histopathological scale
control	14	0.04(0.01)	106.9(5.3)	53.1(2.9)	282.6(19.7)	5.9(0.5)	0
paracetamol 3 g/kg	19	0.24(0.04)*	3569.5(615.4)*	2622.3(460.6)*	353.0(27.7)*	7.5(0.5)*	2.9(0.1)*
P.amarus 0.8 g/kg	7	0.04(0.01)	123.71(4.5)	45.3(2.9)	256.7(26.5)	5.4(0.2)	0
1.6 g/kg	7	0.03(0.01)	107.1(3.9)	55.9(3.4)	287.9(36.3)	5.8(0.2)	0
3.2 g/kg	7	0.03(0.01)	110.6(5.3)	54.3(4.6)	272.6(29.2)	6.0(0.2)	0
P.amarus for 7 days before paracetamol 0.8 g/kg	11	0.22(0.02)	3116.4(757.3)	1796.9(333.6)	380.5(31.3)	7.3(0.8)	2.4(0.2)
1.6 g/kg	11	0.18(0.03)	1660.9(489.4)**	1239.7(351.6)**	351.5(31.9)	6.9(0.8)	2.3(0.2)**
3.2 g/kg	10	0.19(0.05)	2111.5(810.0)	1106.0(350.2)**	328.4(21.6)	6.8(0.8)	2.5(0.2)
P.amarus for 2 days after paracetamol 0.8 g/kg	6	0.22(0.04)	3092.2(929.4)	2205.2(753.8)	379.8(45.0)	7.3(1.5)	2.7(0.2)
1.6 g/kg	5	0.25(0.06)	2162.0(781.2)	1390.4(383.0)	443.2(42.8)	9.4(1.1)	2.2(0.4)*
3.2 g/kg	5	0.23(0.05)	2416.8(649.2)	1546.0(493.6)	349.2(16.7)	5.9(0.7)	2.4(0.4)
P.amarus once before, and 2 days after paracetamol 0.8 g/kg	10	0.26(0.04)	4414.9(752.4)	2601.8(569.7)	377.3(20.8)	7.4(0.5)	3(0)
1.6 g/kg	7	0.16(0.03)	2038.1(730.6)	1299.6(499.0)	361.0(27.6)	7.1(0.8)	2.4(0.3)
3.2 g/kg	9	0.16(0.03)	1924.9(715.1)	759.2(240.1)**	339.0(17.7)	8.5(0.5)	2.4(0.2)
P.amarus for 7 days before, and 2 days after paracetamol 1.6 g/kg	7	0.14(0.02)**	921.0(265.0)**	994.3(334.3)**	293.6(26.4)	7.6(1.1)	2.3(0.3)**
3.2 g/kg	9	0.18(0.05)	1210.2(391.8)**	1538.9(536.3)	303.9(40.4)	7.2(0.8)	2.0(0.4)**

* significantly different from control group(P< 0.05) , ** significantly different from paracetamol group (P<0.05)

ตารางที่ 2 ผลของน้ำต้มลูกใต้ใบต่อปริมาณพาราเซทตะมอลและสารแปรรูปของพาราเซทตะมอล(glucuronide, sulfate, cysteine และ mercapturic acid conjugates) ที่ถูกขับออกในปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง [ค่าเฉลี่ย(ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)]

Treatment	% excreted in urine				
	Glucuronide	Sulfate	Paracetamol	Cysteine	Mercapuric acid
Paracetamol 3 g/kg single dose oally	41.84 (3.16)	26.37 (4.04)	18.2 (2.62)	1.57 (0.39)	11.46 (0.8)
P. amarus 3.2 g/kg bid for7 day before paracetamol 3 g/kg	43.9 (2.73) NS	23.18 (3.41) NS	21.36 (2.69) NS	1.27 (0.41) NS	10.68 (1.04) NS

NS = Not sigificantly different from paraetamol group

เอกสารอ้างอิง

1) จารีย์ บันสิทธิ์. เปรียบเทียบลักษณะพฤษศาสตร์ของลูกใต้ใบ-หญ้าใต้ใบสกุล Phyllanthus ในภาคกลางของไทย. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 33(4) , 2534 : 155-168

2) ตระกูล กิติสิน. การศึกษาเภสัชวิทยาต้นหญ้าใต้ใบ. สารศิริราช. 4(2), 2495 : 641-649.

3) นิลวรรณ พิชญโยธิน และ คณะ. คุณหมอพิชิตโรคภัย"ไวรัส บี" ไทยรัฐ ฉบับวันศุกร์ที่ 26 มกราคม 2533.

4) มาลินี วงศ์นาวา และคณะ (2542). ฤทธิ์ของลูกใต้ใบและกลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดพิษของพาราเซทตะมอลต่อตับหนูขาว. รายงานการวิจัยซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี 2541

5) เอมอร โสมนะพันธ์,นพมาศ สรรพคุณ,วีณา จิรัจฉริยากูล และ อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. ยาจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ : Text and Journal corporation, 2533.

6) Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine 1999 Oxford University Press , pp. 576-577

7) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., and Okuda,T. Effects of the interaction of tannins with Co-existing substances. VI: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull. 37(8) (1989), 2016-2021.

8) Jeena, K.J. ; Joy, K.L. and Kuttan, R. Effect of Emblica officinalis, Phyllanthus amarus and Picrorrhiza kurroa on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. Cancer Letters. 136 (1) 1999:11-16

9) Koul, I.B., Kapil, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principal of black and long pepper. Planta Medica 59(5) 1993, 413-417

10) Lebeau, J. , Furman,C. , Bernier, J. , Duriez, P. ,Teissier, E. and Cotelle, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. Free Radical Biology & Medicine. 29(9) 2000, 900-912

11) Leelarasamee, A., et al. Failure of *Phyllanthus amarus* to eradicate hepatitis B surface antigen from symptomless carriers .The Lancet. 335(8750) 1990 : 1600-01.

12) Miners, J. , Adams, J.F. and Birkett, D.J. A simple HPLC assay for urinary paracetamol metabolites and its use to characterize the C3H mouse as a model for paracetamol metabolism studies. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology 11(1984) 209-217

13) Mitchell, J.R. , Jollow, D.J. , Potter, W.S. , Davis, D.C. , Gillette, J.R. and Brodie, B.B. Acetaminophen induced hepatic necrosis I. Role of drug metabolism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 1973:185-194

14) Michael, S.L., Pumford, N.R. Mayeu, P.R. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decrease acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. Hepatology 30:1999,186-195.

15) Moshi, M.J., Uiso, F.C., Mahunnah, R.L.A., Malele, S.R. and Swai, A.B.M. A study of the effect of *Phyllanthus amarus* extracts on blood glucose in rabbits. International Journal of pharmacognosy. 35(3) 1997: 167-173

16) Prakash, A., Satyan, K.S., Wahi, S.P. and Singh, R.P. Comparative hepatoprotective activity of three *Phyllanthus* species, *P. urinaria, P. niruri* and *P. simplex*, on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. Phytotherapy research. 9(1995) pp 594-596.

17) Prescott, L.F. The Nephrotoxicity and Hepatotoxicity of Antipyretic Analgesics. British Journal of Clinical Pharmacology. 7 (1979) 453-462

18) Song, E K; Cho, H; Kim, N Y; An N H; Kim, J A ; Lee, S H; Kim, Y C . Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa* Planta Medica 67(9) 2001 : 876-877

19) Sreejayan, N. and Rao, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. Arzneimittel-Forschung 46(2)1996:169-171

20) Syamasundar, K.V., Singh, B., Thakur, R.S., Husain, A., Kiso, Y. and Hikino, H. Antihepatotoxicity Principles of *Phyllanthus niruri* Herbs. Journal of Ethnopharmacology. 14,1985 : 41-44.

21) Tewtrakul, S. Antioxidant activity of selected Piper species. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20(2) 1998:178-181

22) Thamlikitkul, V.; Wasuwat, S. and Kanchanapee, P. Efficacy of *Phyllanthus amarus* for eradication of hepatitis B virus in chronic carriers . J-Med-Assoc-Thai. 79(9) 1991: 381-5

23) Thyagarajan, S.P., Subramanian, S., Thirunalasundari, T., Venkateswaran, P.S. and Blumberg, B.S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. The Lancet. (1)1988 : 764-766

24) Vendemiale, G. , Grattagliano, I. , Altomare, E. , Turturro, N. and Guerrieri F. Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy metabolism in the rat. Biochemical Pharmacology 52 : 1996 : 1147-1154

25) Venkateswaran, P.S. ; Millman, I. ; Blumberg, B.S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and Woodchuck hepatitis viruses : *in vitro* and *in vivo* studies. Proc.-Natl.-Acad.-Sci.-U.S.A.. 84(1) 1987 : 274-8.

26) Zimmerman, H.J Effects of Aspirin and Acetaminophen on the Liver. Archives Internal Medicine. 141 : 1981, 333-342.

27) Zimmerman, H.J. and Maddrey, W.C. Disease of the Liver, 7th Edn., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, .1993, pp 707-769