ระดับเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับคนไทย

วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์, Ph.D.
จาตุรงค์ กันชัย, พ.บ., น.บ.
อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, Ph.D.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2537

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ระดับเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับคนไทย

โดย

วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์*, Ph.D.
จาตุรงค์ กันชัย*, พ.บ., น.บ.
อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ**, Ph.D.

* ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนพัฒนาคณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนส่งเสริมการวิจัยปี 2536

Final Report

Research title

Cytochrome P-450 level in the livers of Thai people

By

Werawan Ruangyuttikarn*, Ph.D.
Chaturong Kanchai*, M.D.
Usanee Vinitketkumnuen**, Ph.D.

* Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiangmai University
** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiangmai University

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The project was supported by the Faculty of Medicine Endowment Fund for Medical Research, 1993.

สารบัญ

คำขอบคุณ	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
คำนำ	4
วัสดุและวิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์	18
สรุป	20
เอกสารอ้างอิง	21

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์นายแพทย์วิทยา ตันสุวรรณนนท์ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา ที่ได้อนุเคราะห์ให้ยืมใช้เครื่องวัดแสง (UV-VIS spectrophotometer) ในช่วงครึ่งแรกของระยะเวลาทำงานวิจัยนี้เนื่องจากเครื่องวัดแสงที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์และภาควิชาชีวเคมีเกิดขัดข้องใช้การไม่ได้

ขอขอบคุณคณะกรรมการกองทุนพัฒนาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนส่งเสริมการวิจัยปี 2536 ที่ได้ให้โอกาสแก่คณะผู้วิจัยได้ทำงานชิ้นนี้จนเป็นผลสำเร็จ และขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชานิติเวชศาสตร์ และหัวหน้าภาควิชาชีวเคมีที่ได้สนับสนุนงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไซโตโครม P450 (CYP450) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีบทบาทมากในการเปลี่ยนแปลงสารพิษและยาที่เข้าสู่ร่างกาย ในการเปลี่ยนแปลงนั้นอาจจะทำให้สารพิษหรือยามีความเป็นพิษลดลงหรือเพิ่มขึ้น ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างสารและ CYP450 ที่เฉพาะต่อสารนั้น ๆ และปริมาณของ CYP450 ในร่างกายของแต่ละบุคคล การศึกษาครั้งนี้ได้วัดดูระดับของ CYP450 จากตับคนไทยจำนวน 10 ราย เป็นหญิง 3 ราย ชาย 7 ราย มีอายุอยู่ระหว่าง 17-34 ปี ซึ่งเสียชีวิตด้วยอุบัติเหตุรถชนและจากอาวุธปืน ตับที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้พิจารณาเลือกเฉพาะตับปกติ ไม่เป็นตับแข็ง ตับอักเสบ และให้ผลลบกับการทดสอบ HIV เป็นตับที่ตัดออกจากศพหลังตายแล้วไม่นานเกิน 12 ชั่วโมง รายที่เก็บได้เร็วที่สุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง 40 นาที ส่วนรายที่เก็บได้ช้าที่สุด เป็นเวลา 11 ชม. 35 นาที ตับที่เก็บได้นี้จะแช่แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลวและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $-70^{\circ}C$ ก่อนการเตรียมไมโครโซม หลังจากแยก microsomal proteins โดยใช้ ultracentrifuge แล้ว นำมาวัดหาระดับโปรตีน และวัดปริมาณ CYP450 โดยอาศัยแก๊สคาร์บอนมอนอ็อกไซด์ที่เตรียมขึ้นเองจากปฏิกิริยาระหว่างกรดซัลฟูริคและกรดฟอร์มิค และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านแก๊สที่ได้ลงไปในด่างเข้มข้นที่เติม reducing agent อยู่ ผลการทดลองพบว่าแก๊สคาร์บอนมอนอ็อกไซด์ที่ผลิตขึ้นเองมีความบริสุทธิ์ดีสามารถนำมาใช้วัดปริมาณ CYP450 ได้ ทำให้ทราบว่าในตับคนไทยหลังตายแล้วไม่เกิน 12 ชั่วโมงมีค่าโดยเฉลี่ยของ CYP450 อยู่ระหว่าง 0.189 ± 0.051 nmol ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Cytochrome P-450 (CYP450) is an enzyme family which has its major role on the oxidation of metabolism of drugs and toxic substances. The metabolism of toxic substances is able to reduce or enhance the toxic effects of the substances depending on the reaction between the specific enzyme and the substances including the concentration of enzyme in each individual. In this study we measured CYP450 level in the livers of 10 Thais, 3 female and 7 male. Their age is between 17-34 years old. They died from traffic accident and gun shot wound. The livers were excised from the deceases no later than 12 hours after death and the livers from those negative for HIV and hepatitis were chosen for this study. The most freshed liver we excised from the deceases took about 4 hr and 40 min after death. The least freshed liver took about 11 hr and 35 min after death. The excised livers were frozen immediately in liquid nitrogen and transferred to -70°C freezer for storage. The microsomes were prepared and the amount of proteins was measured. The CYP450 was measured by using the carbonmonoxide (CO) produced from the reaction of concentrated sulfuric acid and formic acid. The generated CO was allowed to pass through concentrated sodium hydroxide and reducing agent to purify the gas before use. The CO was quite pure and gave a clear CYP450-CO complex peak. The average amount of CYP450 in Thai's livers is 0.189 $\pm$ 0.051 nmol/mg protein.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนำ

Cytochrome P–450 (CYP450) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ในร่างกายของคนและสัตว์ที่มีบทบาทอย่างมากมายมหาศาลในการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆทั้งสารที่มีอยู่แล้วในร่างกาย เช่น โปรตีนหรือฮอร์โมน และสารที่ได้รับจากภายนอกเข้าไปในร่างกาย ซึ่งอาจอยู่ในรูปของอาหาร ยา หรือ สารเคมีที่ปะปนเข้าไปกับลมหายใจ ปัจจุบันได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์นี้อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่คุณสมบัติคร่าวๆเช่นน้ำหนักโมเลกุลจนถึงสายพันธุ์ยีนที่ควบคุมการสร้างและการทำงานของเอนไซม์นี้[1,2] ตลอดจนศึกษาไปถึงการทำงานของเอนไซม์ย่อยหรือ isozymes ของ CYP450[3,4] ในการศึกษาถึงกลไกการเกิดพิษหรือการออกฤทธิ์ของสารพิษและยา หรือศึกษาความแตกต่างระหว่างบุคคลต่อการเกิดโรคเมื่อได้รับสารพิษชนิดเดียวกัน เช่น โรคมะเร็งปอดและการสูบบุหรี่กับ CYP4501A1[5] เป็นต้น อันอาจนำไปสู่การค้นพบวิธีการแก้พิษหรือวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการลดพิษของสารต่างๆ

คนแต่ละคนมีความแตกต่างกันอย่างมากมายในการตอบสนองต่อสารพิษที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อม หรือต่อฤทธิ์ข้างเคียงของยาที่ใช้รักษาโรค หรือต่อสารที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ปกติในร่างกายให้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง บางคนได้รับสารพิษมากมายแต่ไม่มีอาการพิษแสดง ในขณะที่บางคนได้รับสารพิษเพียงเล็กน้อยก็เกิดอาการพิษขึ้นทันที ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของแต่ละบุคคลในการเปลี่ยนแปลง หรือ metabolism ของยา หรือของสารพิษที่เข้าสู่ร่างกาย รวมถึงความสามารถของร่างกายที่จะกำจัดสารเหล่านี้ออกไป องค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งภายในร่างกายที่ใช้กำจัดสารคือ microsomal enzymes ที่ยังสามารถทำหน้าที่ได้ดีตลอดจนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารพิษในร่างกายกับ proteins, RNA หรือ DNA มีผลให้การทำงานของเซลล์ต่างๆในร่างกายผิดปกติไป ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกายจึงมีความสำคัญมากและมีอิทธิพลต่อการเกิดโรค หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงของร่างกายเมื่อมีอายุมากขึ้น

เอนไซม์ microsomal mixed function oxidase เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีการทำงานกันอย่างเป็นระบบ มีประสิทธิภาพมากในการช่วยเปลี่ยนแปลงสารต่างๆในร่างกาย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดและธรรมชาติของสารที่เข้าสู่ร่างกาย โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการช่วยเปลี่ยนแปลงสารไปเป็นสารที่มีพิษน้อยลง และมีคุณสมบัติในการกำจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น เช่นเพิ่มคุณสมบัติการละลายในน้ำได้ดีขึ้น สามารถกำจัดออกจากร่างกายได้สะดวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทางปัสสาวะ เอนไซม์กลุ่มนี้จะทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของ (1) cytochrome P-450 (2) NADPH-P-450 reductase และ (3) phospholipid และการเปลี่ยนแปลงสารบางอย่างในร่างกายอาจต้องอาศัยเอนไซม์ cytochrome b_5 และ NADH-cytochrome b_5 reductase ร่วมด้วย

ได้มีการศึกษาวัดปริมาณของเอนไซม์ CYP450, cytochrome b_5, cytochrome b_5 reductase จากตับของคนมาก่อนแล้ว ทั้งจากตับที่ได้จากศพ (autopsy) หรือจากคนไข้ที่ทำการผ่าตัดตับ (biopsy) หรือจากผู้บริจาคอวัยวะที่เสียชีวิตแล้ว (organ donor) ส่วนใหญ่ค่าที่มีรายงานออกมา ได้มาจากการทดลองกับอวัยวะหรือตับของคนผิวขาวและคนผิวดำชาวอเมริกันหรือชาวยุโรป[6-12] และมีรายงานแสดงปริมาณ CYP450 ของชาวญี่ปุ่นด้วย[13] แต่ไม่มีรายงานปริมาณ CYP450 ของคนไทยเลย

การทราบปริมาณของ CYP450 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยทางด้านพิษวิทยา ที่เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่า เอนไซม์ที่ได้แยกออกมาจากเนื้อเยื่อต่างๆนั้นยังอยู่ในสภาพที่ทำงานได้ไม่เสื่อมสลายไป ก่อนที่จะสามารถนำมาศึกษาการทำงานของมันในการเปลี่ยนแปลงสาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์

1. ต้องการวัดปริมาณหรือระดับของเอนไซม์ CYP450 นี้ในตับของคนไทย เพื่อเปรียบเทียบกับระดับ CYP450 ในตับของคนชาติอื่นๆที่มีรายงานแล้ว

2. จัดตรียมวิธีการวัดระดับ CYP450 ขึ้นในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในอนาคต เพราะทำให้ทราบถึงปริมาณของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อต่างๆที่แยกได้จากคนหรือสัตว์ทดลองก่อนการศึกษาที่ซับซ้อนขึ้นไป อาจจะนำเอาไมโครโซมจากตับคนนี้มาศึกษาถึงกลไกการเกิดพิษและการลดพิษของสารต่างๆที่อาศัย CYP450 ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงได้ เช่นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารพิษหรือยาโดย CYP450 ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางที่มีพิษมากขึ้น[6,14] หรือสำหรับการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็ง[15,16] ที่ปัจจุบันได้รับความสนใจมากในการค้นหาสารด้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่รุนแรงมากเหมือนยาสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ขณะนี้ และรวมถึงการศึกษาเอนไซม์ย่อยที่มีแตกต่างกันในแต่ละบุคคลกับความสัมพันธ์การเกิดโรคและการรักษาโรคบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยนั้น[17,18]

3. ได้ไมโครโซมจากตับคนที่สามารถเก็บไว้ใช้ศึกษา metabolism ของยาหรือสารพิษที่ต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงโดย CYP450 เนื่องจากการทดลองเกี่ยวกับ metabolism หรือกลไกการเกิดพิษของสารในคนที่มีชีวิตอยู่เป็นไปได้ยากมากต่างจากการทดลองในสัตว์ทดลอง ดังนั้นการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้เนื้อเยื่อที่แยกออกมาจากคนจึงมีความสำคัญมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เก็บตับในตู้เย็นอุณหภูมิ -70°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่จะรักษาสภาพของเอนไซม์ในตับให้คงสภาพเดิมได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลานานหลายเดือน[6]

(หมายเหตุ: คณะผู้วิจัยได้เก็บตับจากศพคนตายตามข้อกำหนดที่วางไว้ โดยที่ยังไม่ทราบผลการตรวจเลือด เริ่มเมื่อเดือนสิงหาคม 2536 จนถึงเดือนกรกฎาคม 2537 เป็นเวลา 12 เดือน ได้จำนวนตับคน 17 ราย แต่ตับที่มีผล HIV negative มีเพียง 10 ราย จึงได้ทำการเตรียมไมโครโซมได้เพียง 10 รายสำหรับการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งเป็นจำนวนที่ไม่ถึง 20-50 ราย ตามที่คาดหมายไว้และได้ระบุไว้ในโครงการงานวิจัย)

การเตรียมไมโครโซม

วิธีเตรียมไมโครโซมจากตับคนจะใช้วิธีของ Ruangyuttikarn และคณะ[6] โดยดัดแปลงในรายละเอียดเล็กน้อย มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. นำตับที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาทำให้อ่อนตัวลงโดยทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 30-60 นาที หลังจากนั้นแช่ตับใน homogenizing buffer หรือ 0.05 M Tris buffer, pH 7.4 ซึ่งเติมไว้ด้วย 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose และ 0.15 M KCl โดยทำให้ buffer เย็นก่อนใช้ หรือนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นหนึ่งคืนก่อนใช้
2. บดตับด้วย tissue homogenizer ขึ้นลงอย่างน้อย 6 ครั้ง แล้วนำไปตกตะกอนส่วนของเซลล์ที่ไม่ต้องการออก ที่ความเร็ว 9,000 g นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°C
3. นำ supernatant หรือ S_9 fraction ไปปั่นอีกครั้งหนึ่งใน ultracentrifuge ที่ความเร็ว 105,000 g นาน 60 นาที อุณหภูมิ 4°C
4. ล้าง microsomal pellets ที่ปั่นได้ใน 1 volume homogenizing buffer และนำไปปั่นอีกทีที่ความเร็ว 105,000 g นาน 60 นาที อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการล้างเอาฮีโมโกลบินออกไปจาก microsomal proteins
5. เก็บ microsomal pellets ใน 0.05 M Tris buffer, pH 7.4 ที่ผสมไว้ด้วย 1 mM EDTA, 0.25 sucrose และ 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -70°C ก่อนการวัดระดับ CYP450

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดระดับโปรตีนในไมโครโซม

เจือจาง microsomal proteins ด้วย phosphate buffer pH 7.4 และนำส่วนของ microsomes มาวัดหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Smith และคณะ[19] ซึ่งใช้ Bicinchoninic acid protein assay reagents โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียม protein standards โดยละลาย albumin standard (2 mg/mL) ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, และ 1.2 mg/mL ตามลำดับ อย่างละ 100 uL

2. เติมส่วนผสมของสารละลายระหว่าง Bicinchoninic acid (BCA) ในด่างที่ผสมด้วย sodium carbonate, sodium bicarbonate และ sodium tartrate กับ copper sulfate หรือ reagent A และ B จาก reagent kit ด้วยอัตราส่วน 50:1 (A:B) ในหลอด protein standards หลอดละ 2 mL

3. Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วอ่านสีม่วงของ BCA-Cu^{+1} protein complex ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 562 nm โดยใช้น้ำเป็น reference

4. เจือจาง microsomal proteins ด้วยน้ำ และนำไปวัดหาระดับโปรตีนเปรียบเทียบกับ pratein standard curve

การเตรียมแก๊สคาร์บอนมอนน๊อกไซด์

เนื่องจากแก๊สคาร์บอนมอนน๊อกไซด์ (CO) เป็นแก๊สพิษที่ไม่มีการผลิตขายในประเทศไทย เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องจัดเตรียม carbonmonoxide generating system ขึ้นเอง โดยเตรียมในตู้ดูดควัน อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดฟอร์มิค (HCOOH) และกรดซัลฟูริค (H_2SO_4) เข้มข้น[20] และดักจับอ๊อกซิเจนและ oxidising agents อื่นๆด้วย 6N sodium hydroxide และ sodium dithionite 0.5% ก่อนที่จะนำแก๊ส CO ไปใช้ ดังมีรายละเอียดการจัดเตรียมแสดงไว้ในภาพที่ 1

การวัดปริมาณไซโตโครม P450

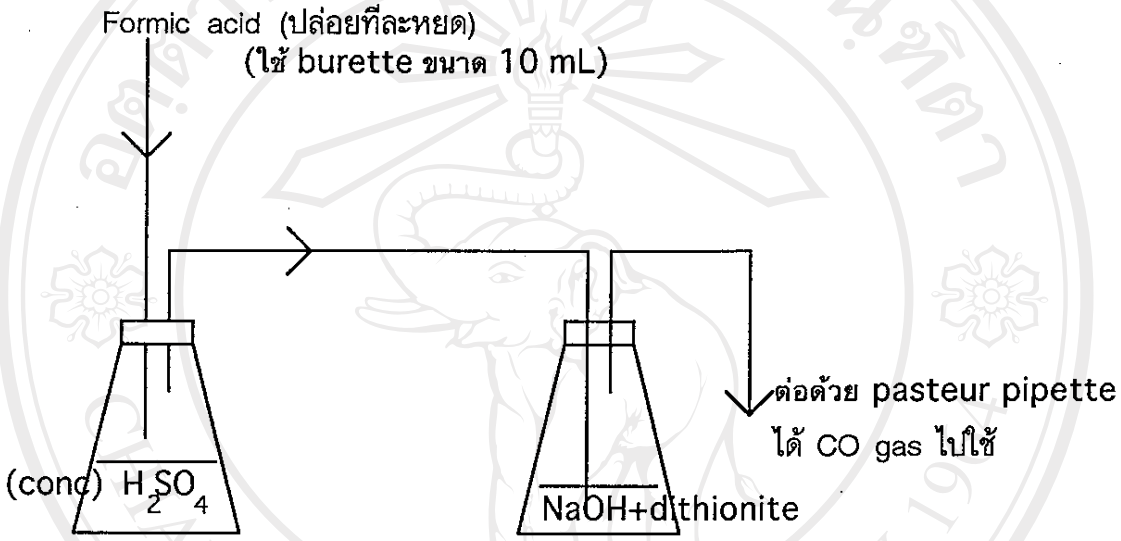
การวัด CYP450 ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับแก๊สคาร์บอนมอนน๊อกไซด์ของเอนไซม์ CYP450 เมื่อเปลี่ยนอนุมูลของเหล็กที่เป็นส่วนสำคัญของเอนไซม์ให้อยู่ใน ferrous form โดยการเติม sodium dithionite หรือ sodium hydrosulfite ลงไปใน microsomes suspension ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ที่มีปริมาณของเอนไซม์ CYP450 มากกว่า organelle อื่น ๆ

CYP450 ที่จับกับแก๊สคาร์บอนมอนน๊อกไซด์จะให้ maximum absorbance ที่ช่วงคลื่น 450 nm (ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ CYP450) และสามารถวัดปริมาณ CYP450 ในเนื้อเยื่อต่างๆได้ โดยคำนวนจากค่า maximum absorbance ที่ 450 nm ลบด้วยค่า absorbance ที่ 490 nm (ซึ่งเป็น base line) หารด้วยค่า extinction coefficient ของเอนไซม์ CYP450 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 91 cm^2/mmol ตามวิธีของ Johannesen และ DePierre[21] ที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีดั้งเดิมของ Omura และ Sato[22] และคำนวนค่า CYP450 ได้เป็น nmol/mg protein ที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1: แสดงการเตรียมแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดซัลฟูริค และกรดฟอร์มิค และทำให้แก๊สบริสุทธิ์โดยผ่านด่าง (sodium hydroxide) และสารรีดิวส์ซิ่ง dithionite ก่อนนำแก๊สไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ข้อสังเกต : ขณะที่เติมกรดฟอร์มิคลงไปควรเติมอย่างช้าๆ ทีละหยด เพื่อป้องกันการเกิดแก๊สขึ้นอย่างรวดเร็ว และมากเกินไป เมื่อปล่อยแก๊สลงไปใน cuvette ที่มี microsomal proteins อยู่จะทำให้เกิดฟองขึ้นมาก และจะสูญเสียปริมาณของ proteins ไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

ในช่วงระยะเวลาหนึ่งปีตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2536 ถึงเดือน กรกฎาคม 2537 คณะผู้วิจัยได้เก็บตับที่คัดเลือกตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ได้จำนวน 10 ราย เป็นหญิง 3 ราย ชาย 7 ราย มีอายุต่ำสุด 17 ปี และสูงสุด 34 ปี โดยเสียชีวิตเนื่องจากอุบัติเหตุบนท้องถนน 7 ราย อุบัติเหตุตกตึก 1 ราย และเสียชีวิตจากอาวุธปืน 2 ราย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนปริมาณของ CYP450 ที่วัดได้จากตับ 10 รายนี้ แสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยได้ค่าต่ำสุด = 0.132 nmol/mg protein ค่าสูงสุด = 0.264 nmol/mg protein ได้ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ CYP450 ทั้ง 10 ราย = 0.189 $\pm$ 0.051 nmol/mg protein

การวัดระดับโปรตีนโดยใช้ Bicinchoninic acid protein assay ทำได้เร็วและให้ผลที่มี accuracy ดีมาก Calibration curve ของโปรตีน standard (Bovine serum albumin) ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงไว้ในภาพที่ 2

ภาพที่ 3 แสดง spectrum ของ microsomal protein หลังจากทำปฏิกิริยากับแก๊สคาร์บอนมอนน๊อกไซด์และ sodium dithionite แล้ว ให้ peak ที่ความยาวคลื่น 450 nm ส่วน peak ที่ 425 nm เป็น peak ของ hemoglobin ที่ปนเปื้อนมาจากเลือดในตับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1: ประวัติอายุ เพศ และระยะเวลาที่เก็บดับหลังตาย รวมทั้งสาเหตุการตายของผู้ตายที่ได้ตับมาสำหรับการศึกษาวัดปริมาณ cytochrome P450 ในครั้งนี้

Case#	Age	Sex	Cause of death	Excision liver *post mortem* (hr : min)
1	20	F	TA:Hypovolumia	7 : 30
2	21	M	GSW:Chest	7 : 15
3	30	F	GSW:Head	7 : 00
4	19	M	TA:Respiratory failure	11 : 25
5	20	M	TA:Spinal cord injury	11 : 35
6	20	M	TA:Aspiration blood	11 : 25
7	24	M	TA:Brain damage	8 : 05
8	33	F	TA:Brain laceration	8 : 50
9	34	M	A:Internal hemorrhage (ตกตึก)	11 : 00
10	17	M	TA:Brain laceration	4 : 40

TA = Traffic accident,
GSW = Gun shot wound,
A = Accident

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ปริมาณเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับคนไทย

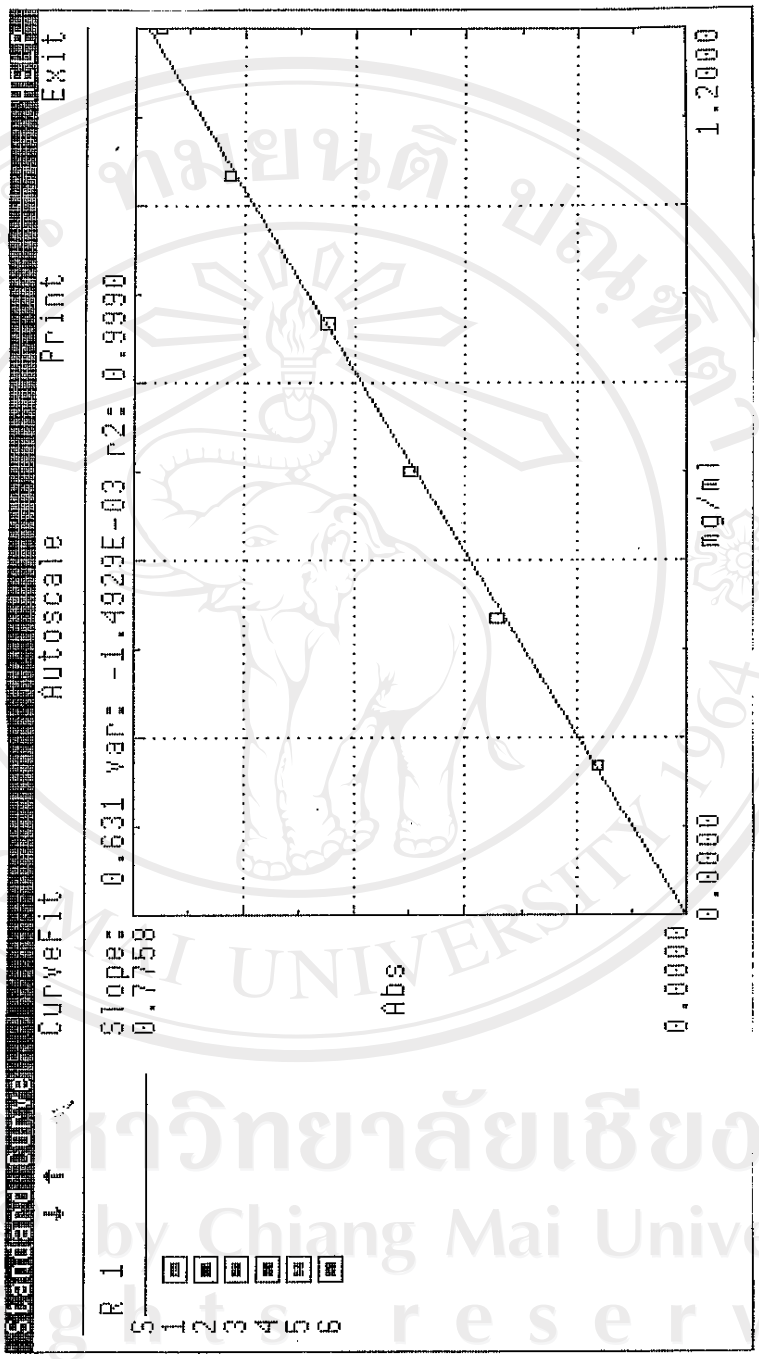
Case #	CYP450 content (nmol/mg protein)
1	0.187
2	0.154
3	0.132
4	0.254
5	0.132
6	0.154
7	0.231
8	0.231
9	0.264
10	0.154

mean $\pm$ SD = 0.189 $\pm$ 0.051 nmol/mg protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2: Protein standardard curve วัดโดยใช้ bovine serum albunin 6 ความเข้มข้นดังนี้ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 1.0 และ 1.2 mg/mL

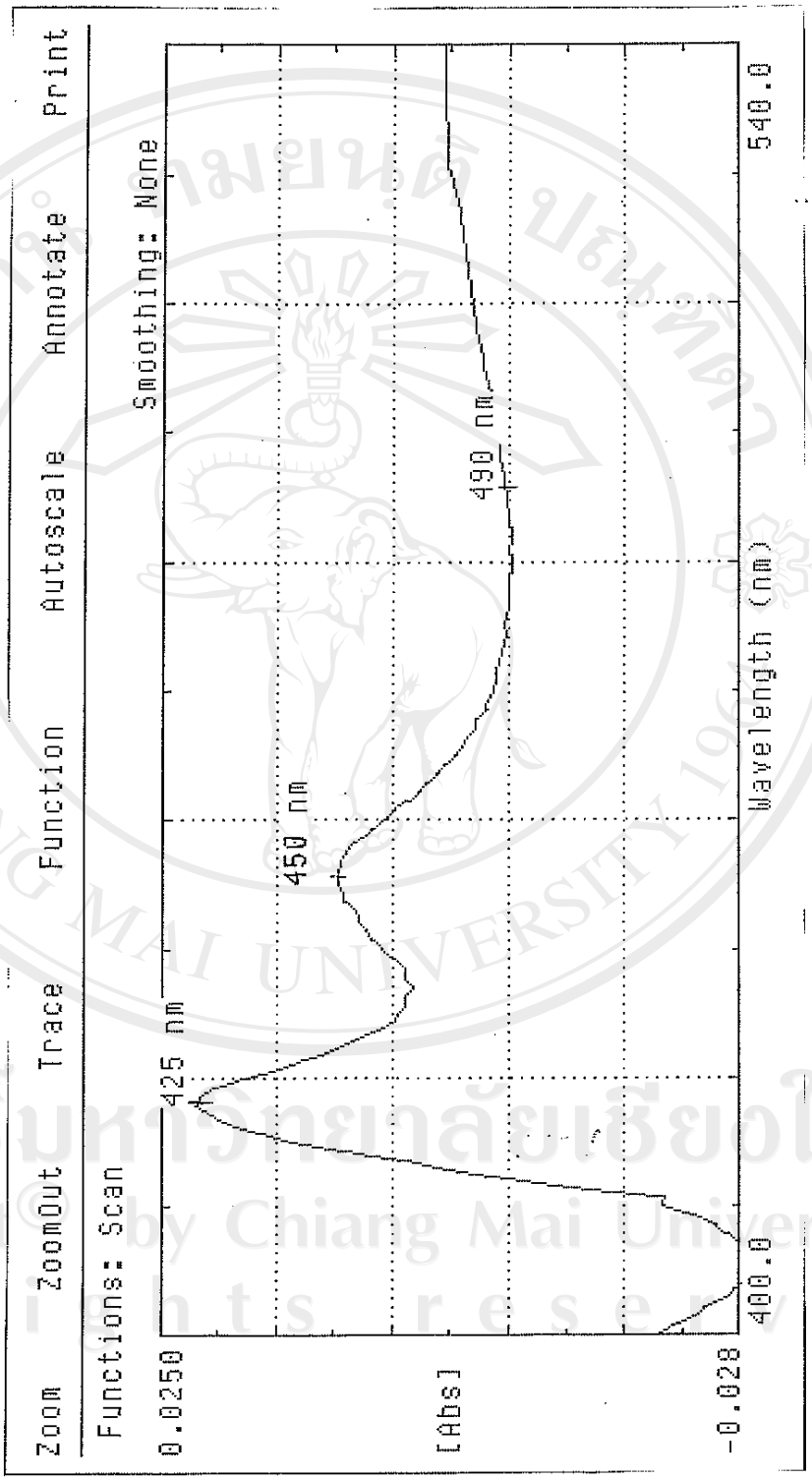
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3: P450 spectrum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์

โดยปกติคนที่เสียชีวิตแล้วระดับเอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกายจะลดลงเรื่อย ๆ จนไม่มีเหลือเมื่อทิ้งศพไว้เป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าแยกอวัยวะออกมาเช่นการแยกตับเพื่อการศึกษาครั้งนี้ และรักษาตับไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ที่ -70°C การลดลงของเอนไซม์จะช้าลง หรือแทบจะไม่เกิดขึ้นเลยเป็นระยะเวลานานถึง 6 เดือน[6] ในขบวนการเตรียม CYP450 ซึ่งได้ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ระดับต่ำอยู่ตลอดเวลาโดยการใช้น้ำแข็งจะสามารถชลอการลดลงของเอนไซม์ได้

การแยกตับออกจากผู้เสียชีวิตถ้าทำได้เร็วเท่าไรก็จะทำให้ tiissue นั้นมีระดับเอนไซม์เหลืออยู่ในปริมาณที่มากกว่าในรายที่ทำได้ช้า ในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นถึงผลการทดลองที่ได้ทำไว้ก่อนแล้วทั้งโดยผู้วิจัยเองและจากคณะผู้วิจัยอื่น ๆ ในต่างประเทศ พบว่าระดับเอนไซม์ CYP450 ใน tissues ที่ได้จาก biopsy และ จาก organ donors มีค่าสูงกว่า tissues ที่ได้จาก autopsy และใน autopsy เอง ก็ได้ค่า CYP450 ที่ต่างกันด้วยซึ่งขึ้นอยู่กับสาเหตุหรือองค์ประกอบหลายประการ ได้แก่ ระยะเวลาหลังตาย ความแตกต่างในรายละเอียดของขบวนการเตรียม CYP450 และการรักษา tiisues ในห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน ตลอดจนความแตกต่างของคนที่เป็นเจ้าของอวัยวะนั้น ๆ เอง ซึ่งมีความแตกต่างกันอยู่แล้วแม้ว่าจะเป็นประชาชนเชื้อชาติเดียวกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของการรับประทานอาหารตลอดจนถึงสายพันธ์ที่ต่างกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าแตกต่างจากผลที่ได้จากสัตว์ทดลองมากมาย เพราะในสัตว์ทดลองเราสามารถควบคุมความเป็นอยู่และอาหารให้เหมือน ๆ กันได้ง่าย

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของ CYP450 ที่วัดได้จากตับของคนไทยมีค่าต่ำกว่าของชาวต่างประเทศ ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากเหตุผลใดเหตุผลหนึ่งที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น โดยได้ค่าเฉลี่ยของ CYP450 เท่ากับ 0.189 $\pm$ 0.051 nmol/mg protein จากผลการทดลองในตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นได้ว่าระยะเวลาหลังตายไม่ได้สัมพันธ์กันโดยตรงกับปริมาณของ CYP450 ที่วัดได้ โดยในรายที่ 4 และ 9 วัดระดับ CYP450 ได้ 0.25 และ 0.26 nmol/mg protein ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ารายอื่น ๆ แต่เป็นรายที่เก็บตับได้หลังตายแล้วประมาณ 11 ชั่วโมงนานกว่ารายอื่น ๆ ซึ่งอาจเนื่องมาจากสาเหตุความแตกต่างของแต่ละบุคคลมากกว่าสาเหตุอย่างอื่น แต่ความแตกต่างของทั้ง 10 รายก็ไม่แตกต่างกันมากนัก และคาดว่าหากได้ตับมาจาก biopsy หรือ organ donors จะสามารถวัดระดับของ CYP450 ได้มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3: ปริมาณเอนไซม์ cytochrome P-450 ใน microsomes ของตับคน

แหล่งของตับ	จำนวน (n)	P-450 (nmol/mg)	Ref.
Autopsy	41	0.42 ± 0.22	7
	14	0.28 ± 0.12	8
	3	0.29 ± 0.17	9
Surgical biopsy	9	0.51 ± 0.05	10
	20	0.56 ± 0.13	11
	10	0.64 ± 0.26	13
Organ donors	8	0.59 ± 0.13	6
	2	0.46 ± 0.54	12
	6	0.44 ± 0.10	11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากโอกาสที่จะได้ตับจากคนไข้ทำ biopsy หรือจากผู้ตายที่เป็น organ donor เป็นไปได้ยากมากจึงไม่ได้รวมไว้ในการศึกษาครั้งนี้

สรุป

ผลการทดลองและศึกษาครั้งนี้ทำให้เราได้รับประโยชน์ตามเป้าหมายที่ได้วางไว้คือ

1. ได้ทราบว่าระดับ CYP450 ในตับคนไทยที่ตายแล้วไม่เกิน 12 ชั่วโมงจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.26 nmol/mg protein ซึ่งต่ำกว่าระดับ CYP450 ในตับชาวต่างชาติที่ได้มีรายงานไว้เล็กน้อย

2. มี Lab ที่สามารถวัดระดับ CYP450 ได้ในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งเป็นวิธีการพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางด้านพิษวิทยา

3. ได้ human liver microsomal proteins ที่ทราบปริมาณ CYP450 แน่นอนสำหรับนำไปใช้ในงานวิจัยอื่น ซึ่งได้นำไปใช้แล้วในงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นสารก่อมะเร็ง (Aflatoxin B1) โดยเปรียบเทียบผลระหว่างเอนไซม์ที่แยกได้จากตับหนูและจากตับคน เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ของสารยับยั้งการกลายพันธ์ที่แยกได้จากตะไคร้ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน

4. แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ที่ generate ได้ นอกเหนือจากนำใช้ในงานวัดระดับ CYP450 แล้วยังได้นำไปใช้ในงานวิเคราะห์ตรวจวัด carboxyhemoglobin (COHb) ด้วยในงานวิเคราะห์ทางด้านนิติพิษวิทยา โดยเป็น positive control สำหรับการวิเคราะห์หา COHb ในเลือดจากศพคดีที่เสียชีวิตจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งมีผู้ตายด้วยแก๊สพิษนี้ถูกส่งมารับการชันสูตรพลิกศพเพื่อหาสาเหตุการตายที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ทุกปีประมาณ 1-2 รายต่อปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Guengerich FP. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. The FASEB J 1992;6:745.
2. Hollenberg PF. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. The FASEB J 1992;6:686.
3. Guengerich FP. Molecular advances for the cytochrome P-450 superfamily. TIPS 1991;12:281.
4. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. J Biol Chem 1991;266:13469.
5. McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahon N A, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinske M, Wood TG, Storeng R, Lubet RA, Eggleston JC, Boyd MR and Hines RN. Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. J Natl Cancer inst 1990;82:1333.
6. Ruangyuttikarn W, Appleton ML and Yost GS. Metabolism of 3-methylindole in human tissues. Drug Metab Dispos 1991;19:977.
7. Jakobsson SW, Okita RT, Mock NI, Masters BSS, Buja LM and Prough RA. Monoxygensae activities of human liver, lung, and kidney microsomes-a study of 42 postmortem cases. Acta Pharmacol Toxicol 1982;50:332.
8. Nelson EB, Raj PP, Belfi KJ and Masters BSS. Oxidative drug metabolism in human liver microsomes. J Pharmacol Exp Ther 1971;178:580.
9. Ruangyuttikarn W. Metabolism and mechamism of toxicity of 3-methylindole in human and goat tissues. Dissertation for Doctor of Philosophy in Pharmacology, Department of Pharmacology and Toxicology, The University of Utah, December 1991.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. Boobis AR, Brodie MJ, McManus ME, Staiano N, Thorgeirsson SS and Davis DS. Metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by human liver and lung. Adv Exp Med Biol 1982;136B:1193.
11. Meier PJ, Mueller HK, Dick B and Meyer UA. Hepatic monooxygenase activities in subjects with a genetic defect in frug oxidation. Gastroenterology 1983;85:682.
12. Cresteil T, Beaune P, Kremers P, Flinois JP and Leroux JP. Drug-metabolizing enzymes in human foetal liver: partial resolution of multiple cytochromes P-450. Pediat Pharmacol 1982;2:199.
13. Tokola O, Pelkonen O, Karki NT, Luoma P, Kaltiala EH and Larmi TK. I.: Hepatic drug-oxidation enzyme systems and urinary D-glucaric acid excretion in patients with congestive heart failure. Br J Clin Pharmacol 1975;2:249.
14. Ruangyuttikarn W, Skiles GL and Yost GS. Identification of a cysteinyl adduct of oxidized 3-methylindole from goat lung and human liver microsomal proteins. Chem Res Toxicol 1992;5:713.
15. Vinitketkumnuen U, Purintrapibal J and Matsushima T. Mutagenicity of some Thai food plants in Salmonella mutation assay. Thai J Tocicol 1991;7:7.
16. Vinitketkumnuen U, Pantasri P and Wongchai V. Factors modifying mutagenesis of shallot (Allium ascalonicum) Chiangmai Med Bull 1992;31:17.
17. Eichelbaum M. Polymorphic drug oxidation in humans. Fed Proc 1984;43:2298.
18. Meyer UA, Skoda RC and Zanger UM. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-molecular mechanisms. Pharmac Ther 1990;46:297.
19. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Bilchem 1985;150:76.
20. Stecher PG. The Merch Index: An encyclopedia of chemicals and drugs. 8th ed. New Jercy:Merch & CO, Inc,1973.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21. Johannesen KAM and DePierre JW. Measurement of cytochrome P450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. Anal Biochem 1978;86:725.

22. Omura T and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem 1964;239:2370.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved