

การเปลี่ยนแปลงของระบบต้านออกซิเดชันในสมองของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำ  
ภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์

Modulation of Antioxidant System in the Brains of Non-alcoholic  
Fatty Liver Disease (NAFLD) Induced Mice

ชรินญา พิมพ์สอน (Charinya Pimson)\* ดร.วรัญญา จตุพรประเสริฐ (Dr.Waranya Chatuphonprasert)\*\*

ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา (Dr.Kanokwan Jarukamjorn)\*\*\*

บทคัดย่อ

ภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) เป็นความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมที่ทำให้มีการสะสมไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับพยาธิวิทยาของโรคเริ่มจากระยะไขมันสะสมในตับ (steatosis) ไปสู่ระยะตับอักเสบจากไขมัน (steatohepatitis) ภาวะเกิดพังผืด (fibrosis) ภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และพัฒนาสู่การเป็นมะเร็งตับในที่สุด อนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในแต่ละระยะของโรคก่อให้เกิดความไม่สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระ การศึกษานี้ทำการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) คีตาเลส (CAT) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ตลอดจนสถานะของกลูตาไธโอนและระดับของลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับฟรุคโตส (high fat-high fructose diet, HFD) พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสมองของหนูเมาส์ที่ได้รับ HFD เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 8 ของการเหนี่ยวนำ (แต่ยังคงสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ) อัตราส่วนระหว่างรีดิวซ์กลูตาไธโอนและออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (GSH/GSSG) มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสมองของหนูเมาส์ที่ได้รับ HFD ในทุกช่วงเวลาของการเหนี่ยวนำฯ จากผลการศึกษานี้ให้เห็นว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงร่วมกับฟรุคโตสอย่างต่อเนื่องก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงลบต่อสมดุลออกซิเดนต์และแอนติออกซิเดนต์ (oxidant-antioxidant balance) ระหว่างการเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a metabolic disorder with triglyceride accumulation in the hepatocytes. The pathology of NAFLD starts from steatosis to steatohepatitis, followed by fibrosis, cirrhosis, and finally hepatocellular carcinoma. Reactive oxygen species produced during the progression of NAFLD result in the imbalance of oxidant-antioxidant system. In this study the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), including glutathione status and lipid peroxidation were determined in a high fat-high fructose diet (HFD) mouse model. The activities of SOD, CAT, and GPx were significantly increased in the 2-week-HFD mouse brains. After that these enzyme activities were slightly declined in the 8-week-HFD mice but all were greater than the normals. The ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione (GSH/GSSG) was extensively lowered than the control group in every stage of the HFD treatment. Moreover, level of lipid peroxidation was excessively increased in the HFD mouse brains. These observations suggested that the oxidative stress was generated by continuous consumption of HFD, resulting in negative modification of the oxidant-antioxidant balance during the NAFLD-induced periods.

คำสำคัญ: ภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ ภาวะเครียดออกซิเดชัน ระบบต้านออกซิเดชัน

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease, Oxidative stress, Antioxidant system

\* นักศึกษา หลักสูตรคุณวุฒิบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* อาจารย์ สาขาวิชาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

\*\*\* รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ (PANPB) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

ภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย ที่มีไขมันโดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์พอกหรือสะสมในเซลล์ตับ (Finelli, Tarantino, 2012) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อดับ พัฒนาการของโรคเริ่มจากการมีไขมันแทรกในเนื้อเยื่อตับ เรียกระยะนี้ว่า ภาวะไขมันสะสมในตับ (steatosis) (Browning et al., 2004) ไขมันที่สะสมนี้นำไปสู่การอักเสบของเนื้อเยื่อตับ (lobular inflammation) ส่งผลให้เซลล์ตับตายและเกิดเป็นช่องว่างที่เรียกว่า เฮปาทิกบอลลูนิง (hepatic ballooning) รวมถึงการมีเนื้อเยื่อพังผืดในตับ (fibrosis) ซึ่งระยะนี้เรียกว่า ระยะตับอักเสบจากไขมัน (non-alcoholic steatohepatitis หรือ NASH) (Day, 2002) โดยอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในขณะที่โรคกำลังพัฒนาจะสามารถเหนี่ยวนำให้โรคทวีความรุนแรงมากขึ้น (Abiru et al., 2006) ส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บและนำไปสู่ภาวะตับแข็งและอาจกลายเป็นมะเร็งได้ในที่สุด สาเหตุหลักที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคนี้นี้ ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) โรคอ้วน (obesity) และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Hanley et al., 2005) รวมถึงพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลปริมาณสูงเป็นเวลานานนับเป็นอีกหนึ่งปัจจัยคุกคามของโรคนี้นี้ (Anania, 2011)

ระบบต้านภาวะเครียดออกซิเดชัน (antioxidant system) ในร่างกาย ประกอบด้วยระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันและระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ที่ทำงานอย่างสัมพันธ์กัน (Maritim et al., 2003) ระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase, SOD) คีตาเลส (Catalase, CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) (Jakus et al., 2012) นอกจากระบบเอนไซม์แล้ว การรักษาสมดุลของอัตราส่วนระหว่างรีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH) และออกซิไดซ์กลูตาไธโอน

(GSSG) นับเป็นสิ่งสำคัญในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Caciatore et al., 2010) เนื่องจากกลูตาไธโอนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) และสารประกอบของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species) และเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชัน (Kals et al., 2008) ดังนั้น อัตราส่วนของ GSH/GSSG ที่ลดลงจึงเป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ส่งผลให้เซลล์และอวัยวะต่างๆ ทำงานผิดปกติและมีพยาธิสภาพ (Ristoff, Larsson, 2007) ซึ่งทั้งหมดนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยชี้พัฒนาการระยะต่างๆ ของภาวะ NAFLD

การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับในหนูทดลองโดยการกระตุ้นให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้างไขมันและการดูดกลับของกรดไขมันอิสระในร่างกายส่งผลให้ไขมันพอกสะสมในเซลล์ตับเกิดภาวะไขมันสะสมในตับที่มีพยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยาที่ใกล้เคียงในมนุษย์ (Vos, Lavine, 2013) การเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD แต่ละรูปแบบให้พัฒนาการของพยาธิสภาพของโรคที่แตกต่างกัน ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้น การพิจารณารูปแบบการเหนี่ยวนำให้ได้ภาวะไขมันสะสมในตับที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย จึงเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความถูกต้องแม่นยำของผลการวิจัย รูปแบบการเหนี่ยวนำฯ โดยการให้หนูทดลองได้รับอาหารที่มีไขมันสูงร่วมกับการได้รับน้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุกโตสต่อเนื่องเป็นเวลานานในการศึกษานี้ เป็นการเหนี่ยวนำโดยการเลียนแบบการรับประทานอาหารจานด่วน (fast food) ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูงและมีรสชาดหวาน

## วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษารูปแบบสมรรถนะของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx รวมถึงอัตราส่วนของ GSH/GSSH และระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่เปลี่ยนแปลงไปตามพัฒนาการของภาวะไขมันสะสมใน

ดับในระยะต่างๆ ในสมองของหนูไม่ซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับฟรุคโตส

**วิธีการวิจัย**

#### 1. สารเคมี

Hydrogenated soy bean oil (OP Soy Fryd) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Katevanich Industry Co. Ltd. กรุงเทพฯ ประเทศไทย น้ำตาลฟรุคโตส 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Chao Khun Agro Products Company (CKAP) Co. Ltd. กรุงเทพฯ ประเทศไทย 4-vinylpyridine (4-VP), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glutathione reductase (GR), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), nitro tetrazolium blue chloride (NBT), standard superoxide dismutase (SOD), standard malondialdehyde (MDA) และ xanthine oxidase เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma Aldrich Chemical รัฐมิสซูรี สหรัฐอเมริกา Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fisher Scientific สหราชอาณาจักร และ 2-thiobarbituric acid (TBA) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka Chemika Co. ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

#### 2. สัตว์ทดลอง

หนูไม่ซ์เพศผู้สายพันธุ์ ICR อายุ 7 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ. ศาลายา จ. นครปฐม เลี้ยงและดูแลภายในศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออก เลี้ยงเหนี่ยวนำมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย พักสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลองโดยให้ได้รับอาหารและน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลา ห้องเลี้ยงสัตว์ควบคุมอุณหภูมิที่  $23 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-60 เปอร์เซ็นต์ การระบายอากาศ 10-15 รอบต่อชั่วโมง และแสงสว่าง 12 ชั่วโมง/วัน การศึกษาในสัตว์ทดลองอยู่ภายใต้การกำกับดูแลของสัตวแพทย์ประจำศูนย์ฯ และเป็นไปตามข้อเสนองานที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐาน

การเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (AEKKU 92/2555)

#### 3. การเหนี่ยวนำภาวะไขมันสะสมในตับหนูไม่ซ์

การเหนี่ยวนำภาวะไขมันสะสมในตับโดยการป้อนไขมัน trans fat คือ hydrogenated soy bean oil 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว วันละ 2 ครั้ง ทางปาก ร่วมกับการผสมน้ำตาลฟรุคโตส 40 เปอร์เซ็นต์ในน้ำดื่มเป็นเวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

#### 4. การแบ่งกลุ่มการศึกษา

การแบ่งกลุ่มการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือหนูปกติ (จำนวน 5 ตัว) ได้รับอาหารปกติ (commercial regular diet) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะไขมันสะสมในตับ (ดังอธิบายข้างต้น) เป็นเวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ (กลุ่มละ 5 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการการุณฆาตภายใน 24 ชั่วโมงหลังการให้สารครั้งสุดท้าย โดยทำการสลบสัตว์ทดลองด้วย Nembutal® (pentobarbital sodium) 0.1 มิลลิลิตร/ตัว ก่อนทำการไล่เลือด (perfuse) จากหลอดเลือดดำพอร์ทัลเวน (portal vein) ด้วยสารละลาย 1.15% โพแทสเซียมคลอไรด์ จากนั้นทำการแยกสมองและเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

#### 5. การเตรียมตัวอย่างสมอง (brain homogenate)

นำตัวอย่างสมอง 0.2 กรัม บดในสารละลาย 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline; PBS) pH 7.4 ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักสมองบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดมือ (hand homogenizer) ก่อนเจือจาง 300 เท่า ด้วย 0.01 M PBS

#### 6. การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ SOD

การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ SOD โดยการวัดอัตราการยับยั้งฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง xanthine และ xanthine oxidase และทำให้เกิดสีด้วย NBT ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน SOD (Chatuphonprasert et al., 2013)

## 7. การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CAT

การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CAT ตามขั้นตอนของ Chatuphonprasert et al. (2013) โดยใช้  $H_2O_2$  เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) ได้สารประกอบสีเหลืองก่อนเติมโซโมจินเทของตัวอย่างสมองลงในปฏิกิริยาและเปรียบเทียบการยับยั้งปฏิกิริยากับหลอดควบคุมคำนวณสมรรถนะของ CAT เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน CAT

## 8. การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ GPx

การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ GPx โดยวัดอัตราการเปลี่ยนแปลง GSH ไปเป็น GSSG ในปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย  $H_2O_2$  ตามขั้นตอนของ Chatuphonprasert et al. (2013)

## 9. การตรวจวัดปริมาณกลูตาไธโอน และอัตราส่วนของ GSH/GSSG

การตรวจวัดปริมาณ GSH โดยดูการเปลี่ยน xanthine ในภาวะที่มี GR จากนั้นใช้ DTNB ทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน GSH ส่วนการตรวจวัดปริมาณ GSSG ทำการเติม 4-VP ในตัวอย่าง ก่อนทำการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจวัดปริมาณ GSH และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ GSSG (Kondo et al., 2011)

## 10. การตรวจวัดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยปฏิกิริยาของกรดไทโอบาร์บิทริก (Thiobarbituric acid reaction substance assay หรือ TBARS assay)

บ่มโซโมจินเทตัวอย่างสมองหรือสารมาตรฐาน MDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนเติมสารผสมที่ประกอบด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid), TBA และกรดอะซิติก และนำไปแช่อ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายใส่ส่วนบนไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 551 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง 528 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน MDA (Chatuphonprasert et al., 2013)

## 11. สถิติที่ใช้

ผลที่ได้แสดงเป็น mean $\pm$ SD และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มทดลองโดย ANOVA ร่วมกับ Tukey's *post hoc* test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  (โปรแกรม SPSS version 17.1)

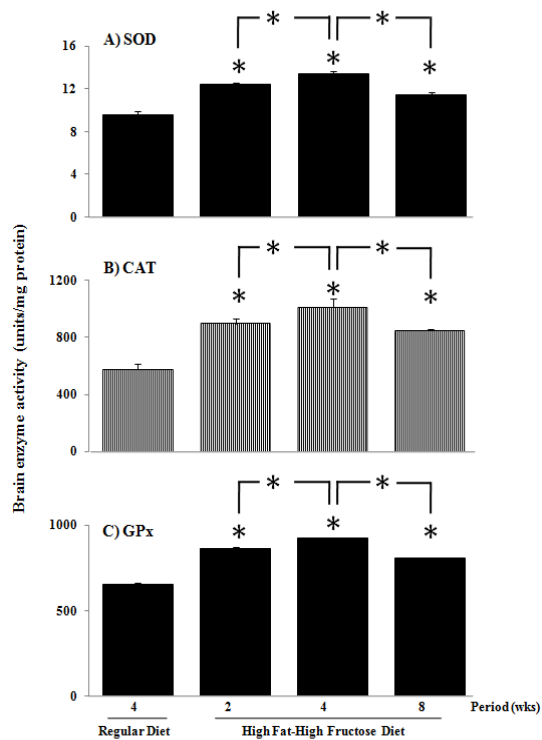
## ผลการวิจัย

สมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT ในสมองของหนูไม่เมาส์ที่ถูกชักนำภาวะ NAFLD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการเหนี่ยวนำ และสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 8 (แต่ยังคงสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ) สอดคล้องกับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสมรรถนะของเอนไซม์ GPx (รูปที่ 1)

อัตราส่วนของ GSH/GSSG ในสมองของหนูไม่เมาส์ที่ถูกชักนำภาวะ NAFLD ลดลงตามระยะเวลาของการเหนี่ยวนำ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และลดลงอย่างมากในสัปดาห์ที่ 8 (รูปที่ 2) สอดคล้องกับระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสมองของหนูไม่เมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD (รูปที่ 3) ซึ่งบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสและความไม่สมดุลในเชิงลบของระบบต้านออกซิเดชันในสมองหนูไม่เมาส์

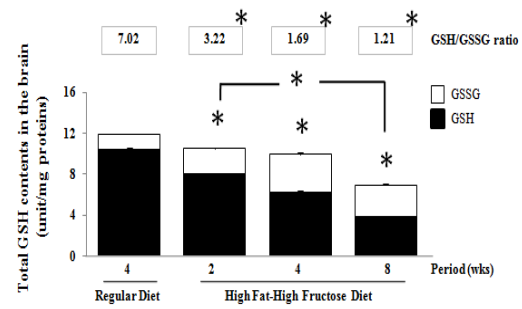
## อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ภาวะ NAFLD เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายซึ่งในระยะแรกมักไม่แสดงอาการใดแต่สามารถพัฒนาเป็นภาวะไขมันสะสมในตับชนิดที่มีการอักเสบของตับร่วมด้วย จากการยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระเป็นเหตุให้ตับไม่สามารถย่อยสลายไขมันออกจากเซลล์ได้จึงมีไขมันสะสมในเซลล์ตับและกลายเป็นไขมันสะสมในตับในที่สุด (Grattagliano et al., 2008)

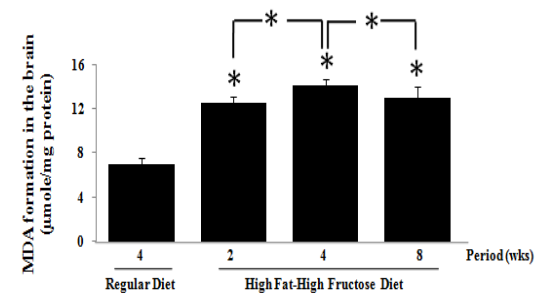


**รูปที่ 1** สมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) และ Glutathione peroxidase (GPx) ในสมองของหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารปกติ (Regular diet) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับฟรุคโตส (High fat-high fructose diet) เป็นเวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ \* $p < 0.05$ ,  $n = 5$  ตัว

เมื่อไขมันเกาะที่ตับมากขึ้นจะกระตุ้นการสร้าง ROS จากกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียมากขึ้น ก่อให้เกิดการทำลายสารต้านอนุมูลอิสระเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Hug et al., 1997) ที่ตามมาด้วยการกระตุ้นกลไกการอักเสบของเซลล์ตับ 3 กลไกหลักคือ ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน การกระตุ้นไซโตไคน์ และการเหนี่ยวนำฟาสลิแกน (Fas ligand) ส่งผลไปกระตุ้นเซลล์สเทเลต ที่ก่อให้เกิดการอักเสบของเนื้อตับจนตับกลายเป็นพังผืด เกิดภาวะตับแข็งและกลายเป็นมะเร็งตับในที่สุด (Chavin et al., 1999)



**รูปที่ 2** ปริมาณ GSH รวม, GSH, GSSG และอัตราส่วนของ GSH/GSSG ในสมองของหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารปกติ (Regular diet) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับฟรุคโตส (High fat-high fructose diet) เป็นเวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ \* $p < 0.05$ ,  $n = 5$  ตัว



**รูปที่ 3** ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองของหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารปกติ (Regular diet) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตส (High fat-high fructose diet) เป็นเวลา 2, 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ \* $p < 0.05$ ,  $n = 5$  ตัว

การศึกษาครั้งนี้ทำการเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ในหนูไมซ์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ โดยการป้อน hydrogenated soy bean oil 65 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นพลังงานจากไขมัน 27 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับการผสมน้ำตาลฟรุคโตส 40 เปอร์เซ็นต์ในน้ำดื่ม (คิดเป็นพลังงานจากฟรุคโตส 36.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นภาวะโภชนาการเกินที่เลียนแบบพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารจานด่วนในปัจจุบัน เปรียบเทียบกับการได้รับอาหาร

ปกติ ซึ่งจะได้รับพลังงานจากอาหารเพียง 11 เปอร์เซ็นต์ ที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย

ผู้ป่วยที่มีภาวะ NAFLD พบว่ามีปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ตับและอวัยวะอื่นๆ เพิ่มขึ้น รวมถึงสมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น แมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดีสมูเตส (Manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) คอปเปอร์ซิงค์ซูเปอร์ออกไซด์ดีสมูเตส (Copper-zinc superoxide dismutase, CuZn-SOD) และ GPx ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย (Giuglione et al., 1996) การชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระจึงส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Lenzen, 2007) สอดคล้องกับผลการศึกษานี้คือ การเพิ่มขึ้นของสมรรถนะของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx ในขณะที่อัตราส่วนของ GSH/GSSG ลดลงในสมองของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากการตอบสนองเพื่อทำลายอนุมูลอิสระของกระบวนการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งจะพบการทำงานของ SOD เป็นอันดับแรก ตามด้วย CAT ที่ทำงานร่วมกับ GPx อย่างเป็นระบบ (Devi et al., 2000)

เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของ GSH/GSSG ที่ลดลงในสมองของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับสมรรถนะของเอนไซม์ GPx กล่าวคือสมรรถนะของเอนไซม์ GPx จะแปรผกผันกับอัตราส่วนของ GSH/GSSG เนื่องจากเอนไซม์ GPx เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน GSH ให้กลายเป็น GSSG ดังนั้นหากสมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้น ปริมาณของ GSSG จะเพิ่มมากขึ้นด้วย ส่งผลให้อัตราส่วน GSH/GSSG ลดลง

ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนความเป็นไปได้ของการเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ในหนูเมาส์โดยการให้อาหารที่มีไขมันชนิด trans fat ปริมาณสูงร่วมกับน้ำตาลฟรุกโตส เพื่อใช้เป็นตัวแบบสัตว์ทดลองที่มีภาวะ NAFLD ที่ทำได้ง่ายและใช้ระยะเวลาไม่นานมากนัก ที่สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ของภาวะเครียด

ออกซิเดชันที่เปลี่ยนแปลงในเชิงลบในสมองของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ที่ขึ้นกับระยะเวลาของการเหนี่ยวนำๆ อย่างไรก็ดีเพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้การเปลี่ยนแปลงของภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นดัชนีติดตามพัฒนาการของภาวะ NAFLD ผ่านสมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและอัตราส่วนของ GSH/GSSG จึงจำเป็นต้องศึกษาในอวัยวะอื่นๆ ในเชิงลึกเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถบ่งชี้ระยะพัฒนาการของโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำต่อไป เพื่อให้สามารถได้ตัวแบบสัตว์ทดลองสำหรับการพัฒนาวิธีการป้องกันหรือรักษาโรคไขมันสะสมไขมันที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ที่ถูกต้องและเหมาะสมในอนาคต

#### กิตติกรรมประกาศ

ชรินญา พิมพ์สอน ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย สำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับสถานที่และอุปกรณ์วิจัย

#### เอกสารอ้างอิง

- Abiru, S., Migita, K., Maeda, Y., Daikoku, M., Ito, M., Ohata, K. 2006. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 26(1):39-45.
- Anania, FA. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease and fructose: bad for us, better for mice. *J. Hepatol.* 55(1):218-220.

- Browning, JD., Szczepaniak, LS., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, JD., Cohen, JC., et al. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 40(6):1387-1395.
- Caciatore, I., Cornacchia, C., Pinnen, F., Millica, A., Stefano, AD. 2010. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules*. 15(3):1242-1264.
- Chatuphonprasert, W., Udomsuk, L., Monthakantirat, O., Churikhit, Y., Putalun, W., Jarukamjorn, K. 2013. Effects of *Puerariamirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 65(3):447-456.
- Chavin, KD., Yang, SQ., Lin, HZ. 1999. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J. Biol. Chem.* 274(9):5692-5700.
- Day, CP. 2002. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16(5):663-678.
- Devi, GS., Prasad, MH., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, DN., Reddy PP. 2000. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin. Chim. Acta.* 293(1-2):53-62.
- Finelli, C., Tarantino, G. 2012. Is visceral fat reduction necessary to favour metabolic changes in the liver? *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 21(2):205-208.
- Giuglione, D., Paolisso, G., Cerillo, A. 1996. Oxidative stress and diabetes vascular complication. *Diabetes Care*. 19(3):257-267.
- Grattagliano, I., Caraceni, P., Calamita, G., Ferri, D., Gargano, I., Palasciano, G., et al. 2008. Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur. J. Clin. Invest.* 38(7):523-530.
- Hanley, GP., Piazza, CC., Fisher, WW., Maglieri, KA. 2005. On the effectiveness of and preference for punishment and extinction components of function-based interventions. *J. Appl. Behav. Anal.* 38(1):51-65.
- Hug, H., Strand, S., Grambihler, A. 1997. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 272(45):28191-28193.
- Jakus, V., Sapak, M., Kostolanska, J. 2012. Circulating TGF- $\beta$ 1, glycation, and oxidation in children with diabetes mellitus type 1. *Exp. Diabetes. Res.* 12(2):1-7.
- Kals, J., Starkopf, J., Zilmer, M., Pruler, T., Pulges, K., Hallaste, M., et al. 2008. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *In. J. Cardiol.* 125(1):133-135.
- Kondo, S., Chatuphonprasert, W., Jaruchotikamol, A., Sakuma, T., Nemoto, N. 2011. Cellular glutathione content modulates the effect of andrographolide on  $\beta$ -naphthoflavone-induced CYP1A1 mRNA expression in mouse hepatocytes. *Toxicology*. 280(1-2):11-23.
- Lenzen, S. 2007. The mechanism of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2): 216-226.

- Maritim, AC., Sanders, RA., Watkins, JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem Mol. Toxicol.* 17(1):24-38.
- Ristoff, E., Larsson, A. 2007. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2(1):16-19
- Vos, MB., Lavine, JE. 2013. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 57(6):2525–2531.