

ORIGINAL ARTICLE

การเปรียบเทียบผลของยาที่ทำให้เกิดโรคเบาหวาน ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ

ประพีร์ เศรษฐรักษ์,* กรองทอง เชาวลิต** และ อำนวย ธิธาพันธุ์**

*ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ **ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

COMPARATIVE EFFECTS OF DIABETOGENS ON LIVER MORPHOLOGY

Prapee Sretarugsa*, Krongtong Chawalit** and Amnuay Thithapandha**

**Department of Anatomy and **Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400.*

SUMMARY

The morphological alterations in hepatocytes from rats treated with four diabetogens were compared : alloxan (120 mg/kg, SC), 6-aminonicotinamide (35 mg/kg, IP), N-methylacetamide (6.25 ml/kg, P.O.) and streptozotocin (55 mg/kg, IP). It was found that these diabetogens were all able to cause hyperglycemia (blood sugar greater than 200 mg%) in the animals together with some changes in liver morphology and functions. Only N-methylacetamide could produce a significant increase in liver enzymes, SGPT and SGOT. Liver cells from alloxan and streptozotocin treated animals displayed similar appearance : depleted hepatic glycogen, decreased RER and increased SER, and the presence of lipid droplets, which were more prominent in cells from streptozotocin treatment. The parallel pattern of ER normally seen in control hepatocytes disappeared after treatment with 6-aminonicotinamide and N-methylacetamide. It was also found that glycogen granules in these cells were diminished, an effect which was confirmed by chemical measurement. Some degree of cell damage was observed only in liver cells from N-methylacetamide treated rats. It was concluded that the hepatocytes were also the site of attack by these four diabetogens though the degree of their severity might be different.

ตับเป็นอวัยวะที่มีหน้าที่สำคัญหลายอย่างในร่างกาย เช่นสะสมพลังงานจากสารอาหารในรูปของ glycogen การทำลายสารพิษ (detoxification) และเมตาบอลิซึม ขบวนการเหล่านี้อาศัยเอนไซม์ ที่อยู่ในส่วน Cytoplasm และใน Microsome ของเซลล์ เมื่อร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติ เช่น เกิดโรค หรือได้รับสารเคมีจากภายนอก อาจจะมีผลให้การทำงานของตับดังกล่าวข้างต้นมีการเปลี่ยนแปลงได้

การทดลองทำให้เกิดโรคเบาหวานโดยใช้สารเคมีในสัตว์ทดลองเพื่อใช้เป็นแบบ ได้กระทำมานานแล้ว (1) โดยใช้สารบางชนิดที่ไปทำลายเฉพาะ β -Cell ของตับอ่อนทำให้สัตว์ทดลองขาดฮอร์โมน Insulin โดยเฉียบพลัน (2) หรือสารบางชนิดทำให้เกิดสภาวะ Insulin resistant ผลของสภาวะโรคเบาหวานในสัตว์ทดลองคือตับได้มีการศึกษามาพอสมควรในหลายๆด้าน ทั้ง In vivo และ In vitro เช่น การรายงานผลของเบาหวานต่อการทำงานของเอนไซม์ Glycogen synthetase และ Glycogen phosphorylase (3) ต่อการสร้างโปรตีน (4), ต่อการสร้างไขมัน (5) และต่อโครงสร้างโดยละเอียดของตับ (6)

ผลของการทดลองเหล่านี้ ใช้สารที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานต่างชนิดกัน และใช้สารในขนาดต่างกันด้วย ระยะเวลาของการเป็นเบาหวานก็แตกต่างกันออกไป จึงทำให้เห็นผลขัดแย้งกัน ในบางส่วน เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตับ บางรายงานกล่าวว่า มี Rough endoplasmic reticulum เปลี่ยนแปลงไป และมี Smooth endoplasmic reticulum เพิ่มขึ้น (7,8) บางรายงานพบว่าการเสียรูปแบบของ Rough endoplasmic reticulum พร้อมทั้งการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondria (9) ในด้านการทดลองทางชีวเคมีก็มีผลที่ขัดแย้งกันมากมาย เช่น การเปลี่ยนแปลงของ Glycogen ในตับ การเปลี่ยนแปลงของ Lipid metabolism (5) เนื่องจากมีผู้เสนอว่าอาจมีการเกี่ยวข้องกันระหว่างระดับ Glycogen โครงสร้างของเซลล์และหน้าที่ของเซลล์ตับ (10) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาว่า 3 สิ่งนี้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มี 4 ตัว ได้แก่ Alloxan ซึ่งเป็นสารพวก Mesoxalylurea มีพิษโดยตรงต่อ β -Cell ของตับอ่อน และทำให้ β -Cell ตาย หรือหยุดการทำงาน สัตว์ทดลองเกิดสภาวะขาด Insulin โดยเฉียบพลัน (11,12) ตัวที่สอง คือ 6-Aminonicotinamide มีคุณสมบัติเป็น Antimetabolite ของ การสร้าง NADP มีผลไปหยุดยั้งการหลั่ง Insulin จาก β -Cell (13) มีข้อเสีย คือมีพิษต่อระบบอื่นของร่างกายด้วย เช่นประสาทและกล้ามเนื้อ (14) สารตัวที่ 3 คือ N-Methylacetamide เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติทำให้สัตว์ทดลองเกิดสภาวะไม่สนองตอบต่อ Insulin มีผู้พบว่า Metabolite ของมันมีพิษและอยู่ในสัตว์ทดลองได้นาน (15) สารตัวที่สี่ คือ Streptozotocin เป็น Broad spectrum antibiotic สกัดจากรา Streptomyces achromogenase (1)

มีรายงานว่าสารนี้มีพิษโดยเฉพาะเจาะจงต่อ β -Cell ของตับอ่อน (16) และสามารถทำให้เกิดสภาวะขาด Insulin โดยเฉียบพลันเหมือน Alloxan แต่โดยการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน สารนี้ปัจจุบันใช้รักษามะเร็งของ β -Cell ของตับอ่อน หลังให้ยาทั้งสี่ตัวนี้ สัตว์ทดลองจะมีอาการ Hyperglycemia, Glucosuria, Polydipsia, Hyperlipemia และ Ketonuria (17) ซึ่งเป็นอาการเช่นเดียวกับคนที่เป็นเบาหวาน อาการที่แสดงออกมามีทั้งภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และผลการทดลองด้านอื่นๆ ยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ ซึ่งน่าจะเกิดจากสภาพของการทดลองที่แตกต่างกัน

การทดลองครั้งนี้มุ่งจะศึกษาเปรียบเทียบผลของการทำให้เกิดเบาหวานในสัตว์ทดลอง โดยใช้สารเคมีชนิดต่างๆกัน 4 ตัว โดยใช้ระยะเวลาสั้น (Acute effect) ต่อโครงสร้าง โดยละเอียดของเซลล์ตับ ระดับ Glycogen ในตับ และทดสอบสภาพของตับด้วย เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ที่อาจเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

- 1) ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะโดยละเอียดของเซลล์ตับ หลังจากสัตว์ทดลองถูกทำให้เป็นโรคเบาหวาน โดยเฉียบพลัน จากการได้รับสารเคมีชนิดต่างๆ
- 2) วัดระดับของ กลัยโคเจน ที่สะสมในตับ เพื่อดูผลของโรคเบาหวานต่อ Carbohydrate metabolism และความสัมพันธ์ที่อาจเป็นไปได้กับการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบของเซลล์ส่วนที่มีหน้าที่ทำลายสารพิษ
- 3) ทดสอบสภาพของตับ โดยวัดระดับของเอนไซม์ Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) และ Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) เพื่อศึกษาถึงความเสียหายของเซลล์ตับ ว่าเกิดขึ้นหรือไม่ จากการให้สารเคมีต่างๆ

วัสดุ และวิธีการ

ใช้หนูตัวผู้ (Male Fischer rats) อายุ 60-75 วัน น้ำหนักประมาณ 160-200 กรัม โดยให้หนูทั้งหมดอดอาหารตลอดคืน ประมาณ 16 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง ภาวะเป็นเบาหวานของหนู ถ้าวัดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้เกินกว่า 200 มก.% แสดงว่าหนูเป็นเบาหวาน นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับหนูทดลองปกติกลุ่ม Control ซึ่งให้อัดอาหารมาตลอดคืน เช่นเดียวกัน สารเคมีที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานที่ใช้ ได้แก่

- ก. Alloxan ใช้ 120 มก./กก. ของน้ำหนักตัว ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูปล่อยให้หนูเป็นเบาหวาน 72 ชั่วโมง
- ข. 6-Aminonicotinamide ใช้ 35 มก./กก. ของน้ำหนักตัว ฉีดเข้าช่องท้องปล่อยให้หนูเป็นเบาหวาน 24 ชั่วโมง
- ค. N-Methylacetamide ใช้ 6.25 มล./กก. ของน้ำหนักตัวโดยให้หนูกินปล่อยให้หนูเป็นเบาหวาน 24 ชั่วโมง

ง. Streptozotocin ใช้ 55 มก./กก. ของน้ำหนักตัวฉีดเข้าช่องท้อง ปล่อยให้หนูเป็นเบาหวาน 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาที่ปล่อยให้หนูกลุ่มต่างๆ เป็นเบาหวานแล้วจึงฆ่าโดยการตัดคอและนำตับมาศึกษา ดังต่อไปนี้

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและ light microscope ทำโดยตัดชิ้นของตับให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 มม.³ ใน Fixative ที่เย็น (2.5% Glutaraldehyde in 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4) เป็นเวลา 1½ ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4 2 ครั้ง และ Post fix ใน 1 % OsO₄ in 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย Phosphate buffer 2 ครั้ง แล้ว Dehydrated ด้วยแอลกอฮอล์ Infiltrated ด้วย Propylene oxide, Propylene oxide ผสมกับ Plastic (Araldite) และ Embed ใน Plastic polymerized ที่ 30°C 45°C และ 60°C เป็นเวลา 1, 2 และ 2 วัน ตามลำดับ นำ Polymerized blocks มาตัดให้ได้ Sections บางๆ ด้วย Ultramicrotome MT-2 ด้วยมีดแก้ว เก็บ Sections ด้วย Copper grid ขนาด 200-300 Mesh ย้อมสีด้วย Uranyl acetate และ Lead citrate อย่างละ 15 นาที ตามลำดับ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน HU-11-C ใช้ 75 KV หรือดูจาก Light microscope โดยตัด Section หนา 1 ไมครอน ย้อมด้วย Methylene blue

การหาปริมาณ กลัยโคเจน ใช้วิธีของ Montgomery (18)

การวัดระดับ Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) และ Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) ใช้วิธีซึ่งได้อธิบายไว้โดย Reitman และ Frankel (19)

Plates 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับหลังจากได้รับสารที่ทำให้เกิดเบาหวานชนิดต่างๆ โดย Light microscope

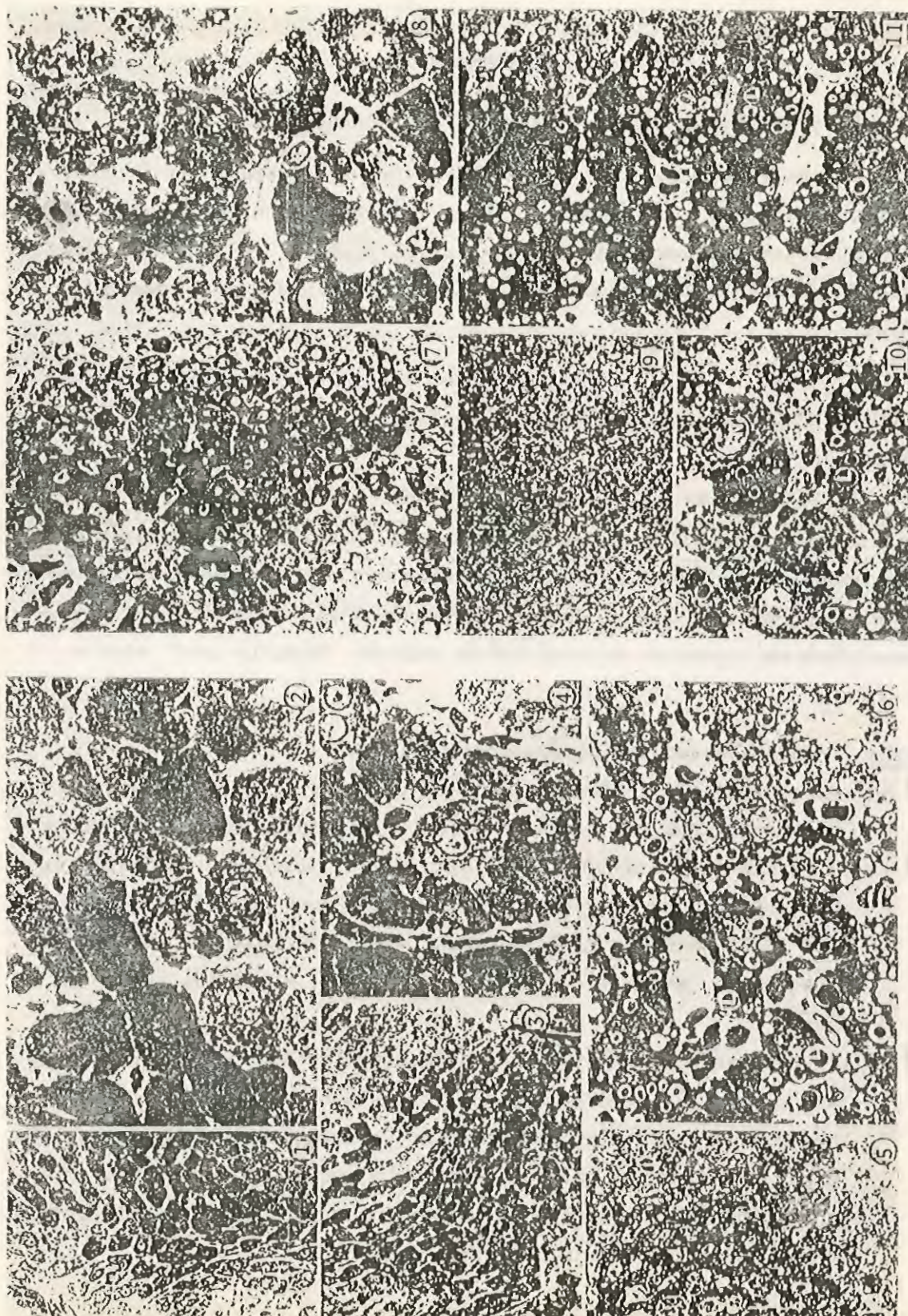
รูปที่ 1,2 แสดงเซลล์ตับของหนูปกติในกำลังขยายต่ำและกำลังขยายสูง มีหยดไขมัน (L) น้อยมาก

รูปที่ 3,4 แสดงเซลล์ตับหนูหลังจากที่ได้รับ Alloxan มาแล้ว 72 ชม. เห็นหยดไขมัน (L) เพิ่มขึ้น

รูปที่ 5,6 แสดงเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ 6-Aminonicotinamide เห็นหยดไขมัน (L และครี) มากมายกระจายโดยทั่วไป

รูปที่ 7,8 แสดงเซลล์ตับหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide พบว่า Nucleus (N) คัดสีอ่อนมาก และมีหยดไขมัน (L) กระจายทั่วไปในบางเซลล์

รูปที่ 9,10,11 แสดงเซลล์ตับหนูที่ได้รับ Streptozotocin มีหยดไขมัน (L และครี) กระจายมากมายทั่วตับ และภายในเซลล์



ผลการทดลอง

1. การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ตับ โดยกล้อง Light Microscope

เซลล์ตับของหนูปกติ (รูปที่ 1) จากกำลังขยายต่ำ เห็นเซลล์ตับติดสีเข้มเป็นปกติ มีหยดไขมันน้อยมากในเซลล์ ภาพกำลังขยายสูง (รูปที่ 2) เห็นเซลล์ตับลักษณะปกติ และแทบไม่เห็นหยดไขมันอยู่เลย เซลล์ตับของหนูที่ได้รับ Alloxan (รูปที่ 3 และ 4) เห็น Hepatic cord ลักษณะปกติ แต่ที่เห็นได้ชัด คือมีหยดไขมันมากกว่าปกติ และกระจายเป็นหย่อม หยดไขมันมีขนาดต่างๆ กัน

ในรูปที่ 5 และ 6 เซลล์ตับของหนูที่ได้รับ 6-Aminonicotinamide มีลักษณะที่เห็นเด่นชัด คือมีหยดไขมันขนาดใหญ่ บางที่มีขนาดใกล้เคียงกับ Nucleus กระจายอยู่ทั่วไปค่อนข้างจะสม่ำเสมอทั่วทั้งตับ

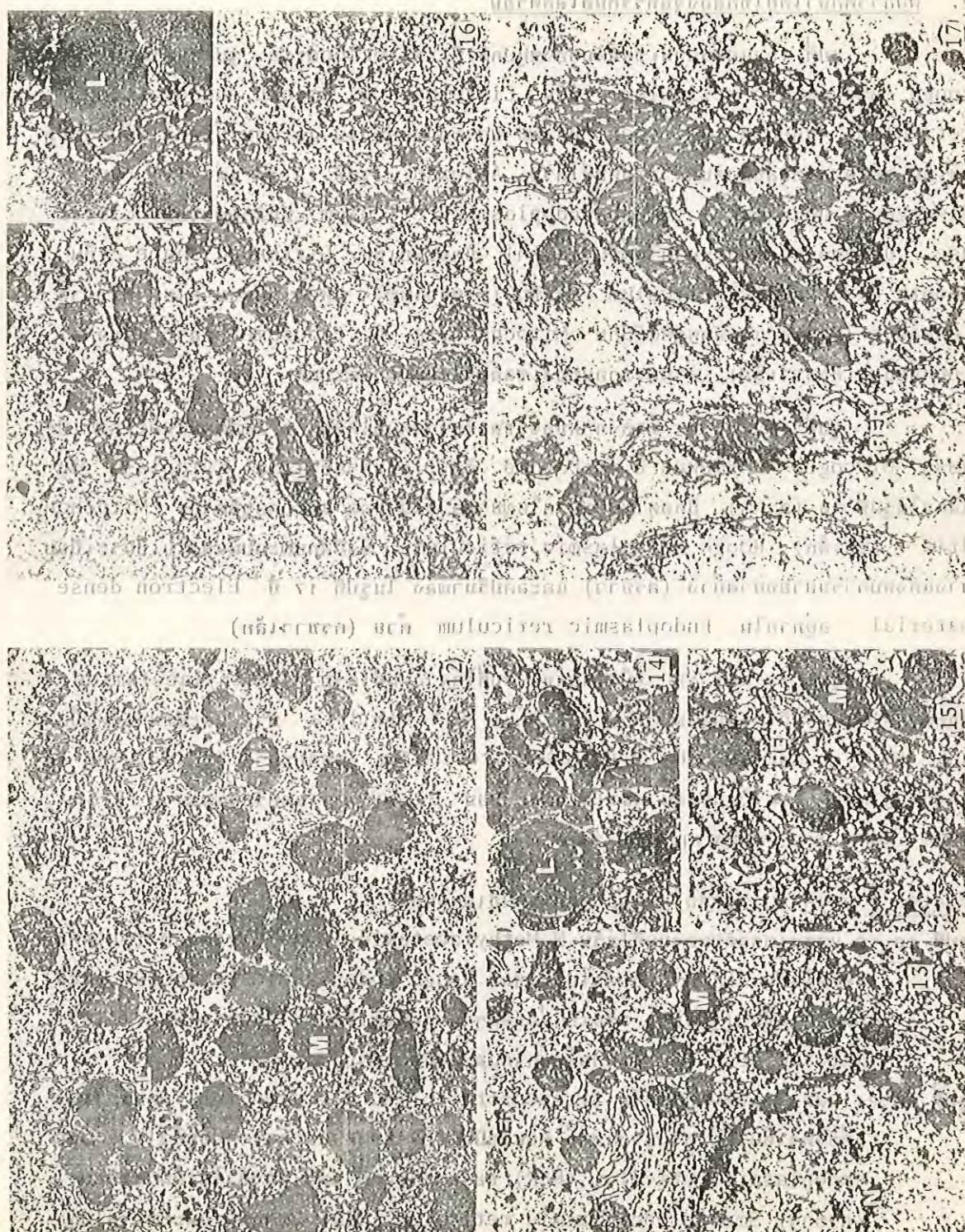
ในรูปที่ 7 และ 8 แสดงเซลล์ตับจากหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide มีหยดไขมันขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์บางส่วนของตับ และ Nucleus ติดสีอ่อนมากเมื่อเทียบกับ Cytoplasm Nucleus ของบางเซลล์ เห็นเป็นช่องว่างขาวขอบของเซลล์บางเซลล์ดูไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับรูปที่ 9, 10 และ 11 ซึ่งแสดงเซลล์ตับจากหนูที่ได้รับ Streptozotocin จะเห็นหยดไขมันขนาดต่างๆ มากมาย กระจายทั่วไปทั้งตับ แต่ลักษณะ Hepatic cord ค่อนข้างปกติ

Plates 2 การศึกษาโครงสร้างตับโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

รูปที่ 12 แสดงเซลล์ตับของหนูปกติโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มี Glycogen granule (GL) กระจายอยู่ทั่วเซลล์ และ Rough endoplasmic reticulum (RER) เรียงกันมากมาย

รูปที่ 13, 14, 15 แสดงเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ Alloxan แสดงว่า Glycogen (GL) ลดปริมาณลง มีหยดไขมันเพิ่มมากขึ้น และกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ Rough endoplasmic reticulum (RER) ขยายขนาด และมีปริมาณลดลง (สีดำ) เห็น Polysome กระจายเป็นกลุ่มๆ เพิ่มขึ้น (สีขาวเล็ก) มี Smooth endoplasmic reticulum (RER) เพิ่มขึ้นด้วย

รูปที่ 16, 17 แสดงเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ 6-Aminonicotinamide พบว่า Glycogen ลดปริมาณลงมาก แทบไม่เห็นเลย มีหยดไขมัน (L) กระจายทั่วไปในเซลล์ (รูปเล็ก) Rough endoplasmic reticulum (RER) มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ และไม่เป็นระเบียบ บางแห่งมีขนาด และรูปร่างขยาย (สีขาวใหญ่) และมีจำนวนน้อยลง Mitochondria (M) ลักษณะเหมือนปกติ มี ribosome อิสระ (สีดำ) กระจายทั่วไป และเห็น Electron dense material อยู่ภายใน RER (สีขาวเล็ก)



(Electron micrographs) of liver cells

2. ผลการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

รูปที่ 12 แสดงภาพเซลล์ตับของหนูปกติ มี Mitochondria รูปไข่และกลม เห็น Rough endoplasmic reticulum เป็น Cisternae มี Smooth endoplasmic reticulum น้อยมาก Glycogen มีมากมายกระจายอยู่ทั่วไป และแทบไม่มีหยดไขมันปรากฏให้เห็นเลย ส่วนเซลล์ของตับที่มาจากหนูที่ได้รับ Alloxan (รูปที่ 13, 14 และ 15) พบว่า Glycogen มีปริมาณลดลง Rough endoplasmic reticulum ที่มีลักษณะเป็น Cisternae มีน้อยลง และขยายขนาดใหญ่อขึ้น (ศรดำ) มักจะพบเป็น Distended shape เห็น Smooth endoplasmic reticulum เพิ่มขึ้น (ศรขาวใหญ่) มีหยดไขมันขนาดใหญ่ กระจายเป็นหย่อมๆ ในเซลล์ และมักพบติดกันกับ Mitochondria มี ribosome อิสระ กระจายเป็นหย่อมๆ (ศรขาวเล็ก) ส่วนประกอบของเซลล์อย่างอื่นมีลักษณะปกติ

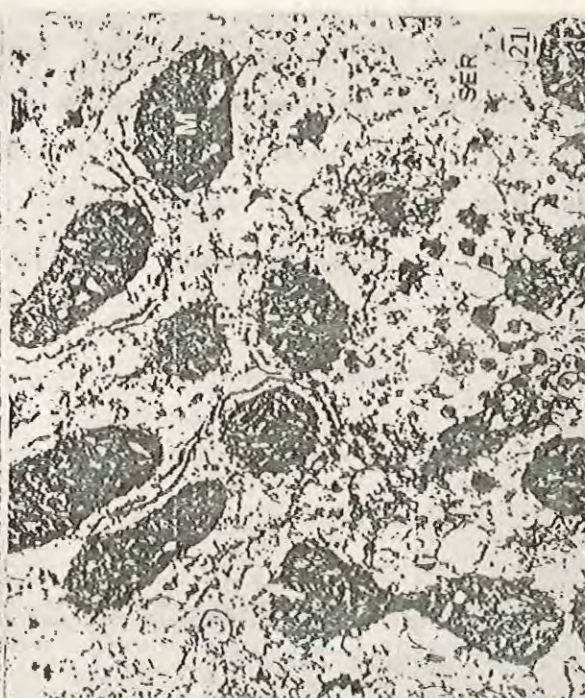
รูปที่ 16 และ 17 แสดงภาพของเซลล์ตับจากหนูที่ได้รับ 6-Aminonicotinamide พบว่า Glycogen หายไปหมด มี ribosome อิสระ กระจายทั่วไปใน Cytoplasm ดังแสดงในรูปที่ 18 (ศรดำ) มีหยดไขมันขนาดใหญ่มากมายในเซลล์ และมักอยู่ติดๆกับ Mitochondria (รูปเล็ก) Rough endoplasmic reticulum ยังมีลักษณะแบนและไม่เป็นระเบียบ บางแห่งพบการขยายขนาดบ้าง (ศรขาว) และลดปริมาณลง ในรูปที่ 17 มี Electron dense material อยู่ภายใน Endoplasmic reticulum ด้วย (ศรขาวเล็ก)

รูปที่ 18 และ 19 เป็นเซลล์ของตับที่ได้จากหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide ลักษณะทั่วไป แสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ ได้แก่ Mitochondria บวม และมีขนาดใหญ่อขึ้น มาก Rough และ Smooth endoplasmic reticulum ขยายขนาด (รูปเล็กในรูปที่ 18) และบางส่วน มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และไม่เป็นระเบียบ Glycogen ลดปริมาณลงมาก Ribosome อิสระ กระจายอยู่ทั่วไป ในเซลล์

Plates 3 การศึกษาเซลล์ตับโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

รูปที่ 18, 19 แสดงเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide พบว่า Glycogen (GL) ลดลง มีหยดไขมัน (L) กระจายทั่วไปในเซลล์ Rough endoplasmic reticulum (RER) มีขนาดโตขึ้น (รูปเล็ก) หรือเป็นท่อนสั้นๆ บางแห่งก็เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (ศรดำ) Mitochondria (M) มีขนาดใหญ่มากและมีลักษณะบวม

รูปที่ 20, 21 แสดงเซลล์ตับหนูที่ได้รับ Streptozotocin เห็น Glycogen (GL) ลดปริมาณลง แต่ยังคงเห็นได้บ้างในบางเซลล์ หยดไขมัน (L) มีมาก และกระจายอยู่ทั่วไป Rough endoplasmic reticulum (RER) ขยายขนาดมาก และเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (ศรขาว) Smooth endoplasmic reticulum (SER) มีมากขึ้น และมีขนาดใหญ่ Gol (Golgi complex), BC (Bile canaliculi)



ตารางที่ 1 ผลกระทบของสารเคมีที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานต่อปริมาณของกลัยโคเจนในตับ

Treatment	Hepatic Glycogen (mg %)
-----------	----------------------------

p < 0.05 (from control ; Newman-Keul's test)

ตารางที่ 2 ผลกระทบของสารเคมีที่ทำให้เกิดโรคเบาหวาน ต่อระดับของ Transaminase ในซีรัม

[illegible]

p< 0.05 (from control ; Newman-Keuls' test)

3. การศึกษาโดยวัดปริมาณ Glycogen ในตับ และการทดสอบสภาพของตับ

เมื่อวัดปริมาณของ Glycogen โดยวิธีของ Montgomery (18) พบว่าปริมาณ Glycogen ในตับจากหนูที่เป็นเบาหวานจากสารเคมีทุกตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการสนับสนุนข้อมูลจากภาพซึ่งได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนว่าการสะสมกลัยโคเจนในเซลล์ของตับลดลงมากใน Diabetic state (ตารางที่ 1) และเมื่อศึกษาผลกระทบของการทำให้เกิดโรคเบาหวานในสัตว์ทดลองต่อตับ โดยทดสอบสภาพของตับ (ตารางที่ 2) พบว่า ระดับของเอนไซม์ SGPT และ SGOT มีค่าอยู่ในระดับปกติ หรือ อยู่ที่ Border line ในหนูที่ได้รับ Alloxan, 6-aminocotininamide, และ Streptozotocin แต่ระดับของ SGPT และ SGOT ในซีรัมของหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโดยละเอียดของตับทั้งจากการเปลี่ยนแปลงของการเก็บ Carbohydrate ในรูป Glycogen และปริมาณของหยดไขมัน Hepatic glycogen ปกติจะเก็บในลักษณะของ β -Rosette ซึ่งเป็นการจับกลุ่มของกลัยโค β -Rosette เล็กๆ (20) แต่ในหนูที่เป็นเบาหวาน Glycogen ที่เก็บมีปริมาณน้อยลงมาก และมักพบ เป็น β -Granule มากกว่า ปริมาณของ Glycogen ในตับจะขึ้นกับการตอบสนองของเซลล์ ต่อ Glucagon และ Insulin และการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่มีหน้าที่สร้าง หรือ ทำลาย Glycogen (21) การลดปริมาณ Glycogen ในตับลงหลังจากเป็นเบาหวานแสดงถึงว่าต้องมีการเปลี่ยนแปลง ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ Metabolism ของ Carbohydrate ในเซลล์อย่างแน่นอน (6) ผลจากการวัดปริมาณกลัยโคเจนในตับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สนับสนุนผลที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การเปลี่ยนแปลงของระดับกลัยโคเจนในตับของหนูที่เป็นเบาหวานที่มีผู้ศึกษาในระดับเอนไซม์หลายกลุ่ม บางกลุ่มคิดว่าเกิดจากตับสูญเสียการทำงานของ Glycogen synthetase ไปเลย (22) บางกลุ่มคิดว่าหนูขาดความสามารถในการเก็บกลัยโคเจนไว้ได้ (23) แต่ Miller (3) เสนอว่าการลดของ Glycogen น่าจะเกิดจากการสลายไปของการสนองตอบของ Glycogen synthetase และ Glycogen phosphorylase ต่อการกระตุ้นของ Glucose แม้จะมี Glucose อยู่มากมายเนื่องจากสภาวะขาด Insulin

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์ตับ มีผู้สังเกตว่า Glycogen มักจะสะสมใน เซลล์บริเวณที่มี Smooth endoplasmic reticulum อยู่มาก (10) จึงมีผู้เสนอแนะว่า Glycogen อาจมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับหน้าที่ต่างๆของ Smooth endoplasmic reticulum

เช่น ขบวนการเมตาบอลิซึม และการทำลายสารพิษก็ได้ (10,24) ในกรณีที่สัตว์ทดลองเป็นเบาหวาน การลดลงของ Glycogen ไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างหรือปริมาณของ Smooth endoplasmic reticulum ที่เห็นได้ชัดเจน แต่ในทางด้านการทำงานของเอ็นไซม์ใน Smooth endoplasmic reticulum จะเปลี่ยนแปลงหรือไม่อย่างไร ก็เป็นปัญหาที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

หยดไขมันที่พบปรากฏมากมายจากการศึกษาโดยใช้ Light microscope และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งให้เห็ว่าน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิซึมของไขมัน จนทำให้เกิดสภาวะการสะสมไขมันในตับ หรือเกิด Fatty infiltration ขึ้นในเซลล์ตับจากหนูที่ได้รับ Alloxan, 6-Aminonicotinamide และ Streptozotocin ซึ่งทำให้เกิดการขาด Insulin และไม่แสดงพิษต่อส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ การเพิ่มของไขมันอาจอธิบายโดยใช้ผลการทดลองทางชีวเคมีที่พบว่า ในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานจะมีไขมันสูงขึ้นทั้งในเลือดและในเซลล์ตับ (5) ในขณะที่เดียวกันความสามารถในการหลั่งไขมันจากตับในรูป Very low density Lipid-Triglyceride กลับเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (5,25) จึงทำให้เกิดสภาวะนี้ขึ้นได้ ส่วนเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ N-Methylacetamide มีลักษณะของเซลล์บางส่วนถูกทำลาย และ Mitochondria บวมมาก เป็นไปได้ว่าขบวนการเมตาบอลิซึมหลายอย่างได้สูญเสียไปโดยไม่เฉพาะเจาะจง

ผลจากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอีกอย่างหนึ่งที่น่าสนใจสนับสนุนอธิบายการเพิ่มของไขมันได้ คือ การลดของ Rough endoplasmic reticulum และการเพิ่มของ ribosome อีสาระ ผลอันนี้ชี้แนะว่าการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์น่าจะลดลงด้วย ซึ่งตรงกับผลการรายงานของ Pain และ Garlic (26) และอีกหลายกลุ่ม (4,27) และผลอันนี้จะกระทบความสามารถของเซลล์ในการหลั่งไขมันในรูป Lipoprotein ด้วย นอกจากนี้ยังอาจคาดได้ว่าผลจากการลดการสร้างโปรตีนอาจมีผลต่อการทำงานอย่างอื่นในเซลล์ ซึ่งต้องอาศัยโปรตีนอีกด้วย (26) ความแตกต่างของลักษณะและจำนวนของไขมันในเซลล์ตับที่พบในการทดลองนี้น่าจะขึ้นกับความรุนแรง และระยะเวลาของการเกิดโรคเบาหวาน เนื่องจากยาแต่ละตัว (1)

ลักษณะอีกอย่างหนึ่งที่พบในเซลล์ของตับที่ได้รับ Alloxan และ Streptozotocin คือจะมี Smooth endoplasmic reticulum มากขึ้น เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า ส่วนประกอบของเซลล์นี้มีหน้าที่หลายอย่าง เช่น เกี่ยวกับการทำลายสารพิษ Lipid metabolism และ Biotransformation ของสารทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นและได้รับจากภายนอก (20) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ Smooth endoplasmic reticulum น่าจะมีผลกระทบกับขบวนการดังกล่าวบ้างไม่มากนักน้อย ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปทั้งทางด้านเภสัชวิทยา และชีวเคมี

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้นี้ กับรายงานอื่นๆ ที่มีข้อขัดแย้งกันอยู่บ้าง (9,28) สรุปได้ว่าแม้จะให้สารที่ทำให้เกิดเบาหวานในระยะอันสั้น (6-Aminonicotinamide, N-Methylacetamide และ Streptozotocin) เพียง 24 ชม. การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เห็นได้ชัดเจนมากที่ Endoplasmic reticulum และจำนวนหยดไขมัน และ Glycogen แต่ การเพิ่มของ Smooth endoplasmic reticulum ไม่มากเท่าที่มีรายงานมาก่อน (9) แม้ ในกรณีของ Alloxan จะรอถึง 72 ชม. ก็ตาม ความแตกต่างนี้น่าจะเกิดจากความรุนแรงของ การเป็นเบาหวานในสัตว์ทดลอง รวมทั้งขนาดของยาที่ใช้ และวิธีให้ยาอีกด้วย (1) ขนาดยาที่สูง มากไปจะก่อให้เกิดการเป็นพิษอย่างไม่เฉพาะเจาะจง ซึ่งอาจมีอิทธิพลมาเปลี่ยนแปลงลักษณะของ ข้อมูลที่ควรจะได้รับด้วย

โดยสรุป การทดลองเปรียบเทียบทำให้สัตว์เป็นเบาหวาน โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ กัน 4 ตัว คือ Alloxan, 6-Aminonicotinamide, N-Methylacetamide และ Streptozotocin มีผลต่าง ๆ กัน ต่อระดับ Glycogen และโครงสร้างของตับ และพบลักษณะของเซลล์ที่ เปลี่ยนแปลงมากหลังจากการให้ N-Methylacetamide โดยพิจารณาจากค่า SGPT และ SGOT ที่เพิ่มขึ้น การทดลองนี้ชี้แนะว่าสารที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดโรคเบาหวานในสัตว์ทดลอง คือ Alloxan, และ Streptozotocin เพราะออกฤทธิ์เร็วและเฉพาะเจาะจง ทั้งยังไม่ พบพิษโดยตรงต่อเซลล์ตับอีกด้วย การทดลองที่ควรทำต่อไปคือการศึกษาว่าสภาวะโรคเบาหวานนี้ สามารถเปลี่ยนให้กลับเป็นปกติโดยใช้ Insulin ได้หรือไม่ ทั้งด้านโครงสร้างและการทำงานของ เซลล์ตับ และอาจศึกษาต่อถึงกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของการเปลี่ยนแปลงด้วย เพื่อจะ เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ประกอบความรู้ทั้งชั้นพื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และในการ นำมาใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานอีกด้วย

นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังทำให้ทราบว่าสารเคมีทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้เกิดโรค เบาหวาน มีพิษไม่ใช่เฉพาะต่อตับอ่อนดังที่เข้าใจกันเท่านั้น แต่ยังมีพิษต่อเซลล์ของตับอีกด้วย ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบกันว่าสารเคมีเหล่านี้มีพิษต่อเซลล์ชนิดอื่นๆอีกหรือไม่ สารเหล่านี้ อาจจะมีผลต่อ เซลล์ของระบบสืบพันธุ์ หรือเซลล์ของไตด้วยก็ได้ รายละเอียดของข้อมูลดังกล่าวยังต้องการการ การศึกษาต่อไปอีกมาก

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Rerup, C.C. Drug producing diabetes through damage of insulin secreting cell. *Pharm. Rev.* 22:485-518, 1970.
2. Lukens, F.D.W. Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.* 28:304-330, 1948.
3. Miller, T.B. Effect of diabetes on glucose regulation of enzymes involved in hepatic glycogen metabolism. *Am. J. Physiol.* 3:E13-E19, 1978.
4. Tarachand, V. and Eapan, J. Effect of streptozotocin diabetes on in vivo protein synthesis by placenta and liver of mice. *Horm. Metab. Res.* 6:280-283, 1974.
5. Tamasi, G. and Borsi, J. Effect of compounds decreasing the free fatty acid concentration on rats with alloxan diabetes. *Kiserl. Orvostud.* 21:259-263, 1969.
6. Garfield, S.A. and Cardell, R.R. Hepatic glucose-6-phosphatase activities and ultrastructural alterations of diabetic rats. *Diabetes* 28:664-679, 1979.
7. Alford, E.P., Miller, M.E., Reavan, E.P., Shorestein, R.G. and Reaven, G.M. Effect of duration of insulin deficiency on membrane-bound and free ribosomes from livers of diabetic rats. *Diabetologia* 11:191-200, 1975.
8. Jakobson, S.V. and Dallner, G. Nature of the increase in liver microsomal glucose 6-phosphatase activity during the early stages of alloxan-induced diabetes. *Biochem. Biophys. Acta* 165:380-392, 1968.
9. Reaven, E.P., Peterson, D.T. and Reaven, G.M. The effect of experimental diabetes mellitus and insulin replacement on hepatic ultrastructure and protein synthesis. *J. Clin. Invest.* 52:248-262, 1973.

10. Porter, K.R. and Bruni, C. An electron microscope study of the early effect of 3-MeDAB on rat liver cells. *Cancer Res.* 19:997-1005, 1969.
11. Bruckmann, G. and Wertheimer, E. Alloxan studies. The action of alloxan homologues and related compounds. *J.Biol. Chem.* 168:241-256, 1947.
12. Dunn, J.S. and McLetchie, N.G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 2:384-387, 1943.
13. Ammon, H.P.T. and Steinke, J. 6-Aminonicotinamide (6-AN) as diabetogenic agent. *Diabetes* 21:143-148, 1972.
14. Mano, Y., Mano, K. and Mayer, R.F. Effects of paraplegia produced by intrathecal 6-aminonicotinamide on motor unit in the rat. *Exp. Neurol.* 65:435-456, 1979.
15. Peter, G.V., Guidoux, R. and Grassi, L. Die diabetogene wirkung von N-monomethylacetamide, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm.* 252:58, 1966.
16. Ganda, O.P., Rossini, A.A. and Like, A.A. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 25:595-603, 1976.
17. Hoftiezer, V. and Carpenter, A.M. Comparison of streptozotocin and alloxan induced diabetes in rat, including volumetric quantitative of the pancreatic islets. *Diabetologia* 9:178-184, 1973.
18. Montgomery, R. Determination of glycogen. *Arch. Biochem. Biophys.* 67:378-386, 1957.
19. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determinations of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.* 28:56-63, 1957.
20. Ham, A.H. and Cormack, D.H. Cytoplasm and its organelles. In: *Histology*. edited by H.H. Ham and D.H. Cormack. Chap. 5, pp. 121-159, J.B. Lippincott. Co., Philadelphia, 1979.

21. Madison, L.L. Role of insulin in hepatic handling of glucose. Arch. Intern. Med. 123:284-292, 1969.
22. Gold, A.H. The effect of diabetes and insulin on liver glycogen synthetase activation. J. Biol. Chem. 245:903-905, 1970.
23. Hornbrook, K.R. Synthesis of liver glycogen in starved alloxan diabetic rats. Diabetes 19:916-923, 1970.
24. Dixon, R.L., Hart, L.G. and Fouts, J.R. The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 133:7-11, 1961.
25. Hogberg, J. Alloxan induced fatty degeneration in rat. Its effect on the microsomal lipids. Exp. Molec. 22:20-28, 1975.
26. Pain, V.M. and Garlick, P.J. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. J. Biol. Chem. 249:4510-4514, 1974.
27. Arnquist, H.J. and Dahlkvist, H.H. Effect of experimental diabetes on the incorporation of amino acids into protein in rat aorta. Horm. Metab. Res. 11:384-388, 1979.
28. Stearns, S.B. and Benzo, C.A. Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (DB) and in streptozotocin-induced diabetic mice. Lab. Invest. 37:180-187, 1977.