

กลไกทางชีวเคมีของการเกิดพิษจากสารไตรโคธีซินส์

วรรณิ โรจนโพธิ์

งานชีวเคมีและวิจัยสารก่อมะเร็ง ฝ่ายวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

Biochemical Characteristics of Trichothecenes

Wannee Rojanapo

National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand.

SUMMARY

In this report, the author summarized the biochemical characteristics of trichothecenes which are a chemically related group of fungal metabolites produced by various species of *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* and *Stachybotrys*. They are cytotoxic to several kinds of animals and fungal cells and can induce skin inflammation, nausea, vomiting, diarrhea, leukopenia, destruction of bone marrow and haemorrhage in various organs of both human and animals. Biochemical studies on the mechanism of action revealed that trichothecenes are potent inhibitors of protein and DNA synthesis especially in the eukaryotic cells. Binding to the eukaryotic polysomes and ribosomes and the subsequent inactivation of ribosomal cycle may be responsible for their inhibitory effects to initiation and termination reactions. However, different types of trichothecenes were found to have different degree of toxicity between the in vivo and in vitro systems. Thus, lipophilicity of these toxins may have some influences on their cytotoxic properties, and this membrane involvement may be related to their selectivity toward target organs in the whole animal. In addition, trichothecenes have been reported to react with the reactive SH-group of some enzymes through their epoxide ring at C₁₂-C₁₃, thereby suggesting that this reactivity of the epoxide ring of trichothecenes with SH-group of proteins may also be important in determining their biochemical effects.

ไตรโคธีซินส์ (trichothecenes) เป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากเชื้อราหลาย ๆ ชนิด เช่น *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* และ *Stachybotrys* สำหรับพิษของเชื้อราเหล่านี้ ได้มีผู้ศึกษาและได้รายงานกันมานานแล้วว่าทำให้เกิดโรคร้ายแรงต่อคนและปศุสัตว์ในหลายพื้นที่ทั่วโลก (1) เช่น ในทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น อาการพิษเฉียบพลันที่เกิดขึ้น ได้แก่ การระคายเคืองที่ผิวหนัง ทำให้ผิวหนังอักเสบ บวม มีตุ่มพอง มีพิษ

ต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน และท้องร่วง มีการผิดปกติของระบบสร้างเม็ดเลือด เช่น ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง เลือดจาง และมีเลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น กระเพาะอาหาร และลำไส้ นอกจากนี้ก็พบว่ามีความผิดปกติทางระบบประสาท และอาจทำให้แท้งลูกได้ (ตารางที่ 1) และได้พิสูจน์กันต่อมา ปรากฏว่า โรคและอาการเป็นพิษเหล่านี้เกิดจากสารพิษ ไทรโคธีซินส์

สารพิษไทรโคธีซินส์ เป็นสารเคมีประเภท sesquiterpene และมีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยรูปร่างแหวนชื่อ trichothecene (2) และมี epoxy ring ที่ตำแหน่งที่ C₁₂-C₁₃ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 พวก ตามลักษณะสูตรโครงสร้าง (รูปที่ 1) คือ T-2 toxin type (A),

ตารางที่ 1 การเป็นพิษและอาการของพิษที่เกิดจากเชื้อราต่าง ๆ ในคนและสัตว์ (1)

การเป็นพิษของเชื้อรา	สถานที่และสัตว์ที่มีอาการ	อาการพิษ	เชื้อราที่เป็นสาเหตุ
"Tausalgetreide" Toxicosis	Siberia man, horse, pig, fowl	headaches, chills, nausea, vomiting	<i>C. saubineti</i>
Alimentary Toxic Aleukia	USSR man, horse, pig	vomiting, diarrhea, skin inflammation, leukopenia, angina	<i>F. sporotrichioides</i>
Stachibotryotoxicosis	Europe horse	shock, somatitis dermal necrosis, leukopenia	<i>Stachybotrys atra</i>
Bean-hull Toxicosis	Japan horse	convulsion, cyclic movement	<i>F. solani</i> , etc.
Dendrochiotoxycosis	Europe horse	skin inflammation	<i>Dendrochium toxicum</i>
Moldy Corn Toxicosis	USA pig, cow	emesis, hemorrhage, refusal of feed.	<i>F. tricinatum</i>
Red-mold Toxicosis	Japan man, horse, pig, cow	vomiting, diarrhea, emesis, abortion	<i>F. graminearum</i>



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารไทโรโคซินส์ที่เกิดในธรรมชาติ (20)

nivalenol type (B), macrocyclic type (C) และ type D เช่น crotoxin ซึ่งมี epoxide ที่ตำแหน่งที่ C₇-C₈ (1) จากการศึกษาฤทธิ์ของสารพิษไตรโคธีซินส์ชนิดต่าง ๆ ที่สกัดออกมาได้คือสัตว์ทดลอง พบว่าอาการคล้ายคลึงกับพิษที่เกิดกับปศุสัตว์และคน คือ มีพิษรุนแรงต่อผิวหนัง ต่อเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร และเซลล์ในระบบการสร้างเม็ดเลือด (3) อาการและพยาธิสภาพเหล่านี้คล้ายกับพิษของรังสี หรือ alkylating agent เช่น mitomycin C หรือ nitrogen mustard (4) นอกจากนี้เมื่อศึกษาใน cultured cells พบว่า สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของโปรโตซัว และเซลล์มะเร็งได้ (5,6) บทความนี้จะกล่าวถึงการศึกษาทางชีวเคมีของผลกระทบ หรือพิษของไตรโคธีซินส์ ทั้งนี้เพื่อที่จะได้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษเหล่านี้ในระดับโมเลกุล

การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

หลักฐานจากการศึกษาวิจัยในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า สารพิษ trichothecenes เป็นสารพิษกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ eukaryotic cells ที่รุนแรงที่สุด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว หรือ metabolically active เช่น เซลล์ในระบบทางเดินอาหาร และเซลล์ในระบบเม็ดเลือดของคนและสัตว์ นอกจากนี้ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในพืช และพวกเชื้อราและยีสต์อีกด้วย

ในปี 1968-1969 Ueno และคณะ ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ได้ศึกษาและรายงานเป็นครั้งแรกว่า nivalenol และ fusarenon-x ซึ่งเป็นไตรโคธีซินส์ type B สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย Ehrlich ascites tumor cells และเซลล์ของหนู mouse (7,8,9) แต่ไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ต่อมาในปี ค.ศ. 1972 Ohtsubo และคณะ (10) ได้พิสูจน์ว่า fusarenon-x ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระยะเริ่มต้น (initiation step) หลังจากนั้น Ueno และคณะ (11-12) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่า สารพิษไตรโคธีซินส์ 17 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนทั้งในเซลล์และ cell free system (ตารางที่ 2) ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่าของความเข้มข้นของสารพิษชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ 50% ในการทดลองนี้ หอสรุปได้ว่าสารพิษไตรโคธีซินส์ type C มีฤทธิ์มากที่สุดในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อทำการทดสอบโดยใช้เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (intact หรือ whole cells) รองลงมาได้แก่ type A และ type B ตามลำดับ ซึ่งตรงกับความเป็นพิษของไตรโคธีซินส์ที่มีต่อสัตว์ทดลอง และ cultured cells (ตารางที่ 3) และเมื่อเปรียบเทียบสูตรโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีกับฤทธิ์ของสารพิษในแต่ละกลุ่มที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3 จะเห็นได้ว่าคุณสมบัติในการละลายได้ในไขมัน (lipophilicity) ของไตรโคธีซินส์สำคัญมากต่อการเป็นพิษและการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่า ไตรโคธีซินส์ ที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี อาจจะผ่านเยื่อเซลล์ได้ดีกว่า จึงมีฤทธิ์มากกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการใช้ whole cell กับ cell free system ในการศึกษาการสังเคราะห์โปรตีน ชี้ให้เห็นว่าไตรโคธีซินส์บางชนิดอาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะเกิดผลกระทบต่อการดูดซึมและนำเข้าของ precursor เข้าไปในเซลล์

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ ไทรโคธีซินส์
ชนิดต่าง ๆ (11-12)

ชนิดของไตรโคธีซินส์		ID ₅₀ [*] (μg/ml) in protein synthesis			
		Rabbit reticulocyte		Tumor cells	Rat liver
		Whole-cell	Cell-free	Whole-cell	Cell-free
A	T-2 toxin	0.03	0.15		5
	HT-2 toxin	0.03			
	Diacetoxyscirpenol (DS)	0.03	5.0	0.035	> 50
	Neosolaniol	0.25			20
	7-Hydroxy-DS	0.3			
	7,8-Dihydroxy-DS	0.6			
B	Nivalenol	3.0	0.5	6.0	8.0
	Fusarenon-X	0.25	0.2	0.35	8.0
	Diacetylnivalenol	0.10			
	Tetraacetylnivalenol	> 10			
	Dehydronivalenol (Rd)	2.0			
	Dehydronivalenol-monoacetate (Rc)	> 10			
	Trichothecin	0.15			
	Trichothecolon	20			
C	Dihydronivalenol	3.0			
	Verrucaric acid	0.015			
	Roridin A	0.006			

* ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ร้อยละ 50

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบพิษและผลทางชีววิทยาของ ไทรโคธีซินส์ (3,5,6)

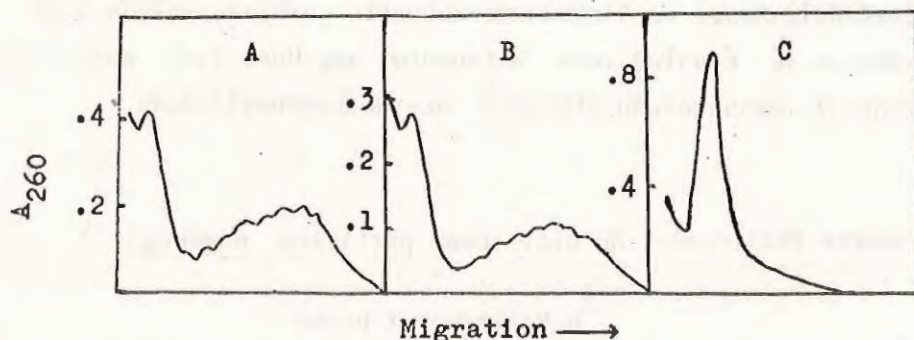
ไทรโคธีซินส์	LD ₅₀		Skin inflamma- tion (μg)	ID ₅₀ (μg/ml) MED (μg/ml)	
	mice mg/kg i.p.	Chick embryo μg/egg		<u>Tetrahymena</u> pyriformia	HeLa cells
(A) T-2 toxin	5.2	0.07	0.2	0.05	0.01
HT-2 toxin	9.0	0.5	0.2	0.5	
Diacetoxyscirpenol	23	0.09	0.2	0.05	
Neosolaniol	14.5	5.0	1	0.5	
(B) Nivalenol	4.1	4.0	10	10	0.2
Fusarenol-X	3.3	2.6	1	5	0.1
Diacetylnivalenol	9.6	1.9	1	1	0.1
Deoxynivalenol	70			5	
(C) Verrucaric acid	1.5 (i.v)		0.05		0.001
Roridin A	1.0 (i.v)		0.05		
Verticillium				0.001	
(D) Crotonoside	700 (i.v)		10		

LD = Lethal dose

ID = Inhibitory dose

MED = Minimum effective dose

สำหรับการศึกษาว่า ไทรโคธีซินส์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระยะ initiation, elongation หรือ termination นั้น ได้มีนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม ศึกษาโดยการวัด poly-some profiles ใน HeLa cells (13) และยีสต์ (14-15) โดยอาศัยหลักที่ว่าในขณะที่เซลล์กำลังสังเคราะห์โปรตีนนั้น ribosome จะอยู่ในสภาพของ polyribosome หรือ polysome แต่ initiation inhibitor จะเปลี่ยน polysome ให้เป็น monosome และ ribosomal subunits อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ elongation และ/หรือ termination inhibitor จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยที่ polyribosome ยังคงสภาพอยู่เหมือนเดิม จากรูปที่ 2 ซึ่งแสดง polysome profiles ของยีสต์ที่การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้งด้วย trichodermin และ verrucaric acid ชี้ให้เห็นว่า trichodermin ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระยะ elongation



รูปที่ 2 แสดง polysome profiles ของยีสต์ที่ได้รับ trichodermin (B) และ verrucaric acid (C) ส่วน รูป 2A เป็น control culture

หรือ termination ส่วน verrucaric acid ยับยั้งที่ระยะ initiation และจากการศึกษาโทรโค-
ซิซินส์ชนิดต่าง ๆ อีก 14 ชนิด โดยวิธีนี้ ทำให้สามารถแบ่งสารเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามระยะ
ของขบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สารแต่ละชนิดไปรบกวน (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อ Staf-
ford และ McLaughlin (14) ได้ศึกษาเพิ่มเติม พบว่า trichodermin ยับยั้งการสังเคราะห์
โปรตีนในระยะ termination ได้ดีกว่าที่ระยะ elongation

ในปี 1974 Ueno และคณะ (16) ได้ศึกษากลไกการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนพบว่า
trichodermin สามารถจับกับ 80 S ribosome ของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและของ HeLa
cells ได้อย่างดี ทั้งขณะที่ ribosome เกาะกับ mRNA เป็น polyribosome และเป็น free

ตารางที่ 4 ระยะของการสังเคราะห์โปรตีนที่ถูกยับยั้งโดย โทรโคซิซินส์ (13-15)

Initiation	Elongation or Termination
Scirpentriol	Trichodermin
15-acetoxyscirpentriol	Trichodermol
Diacetoxyscirpenol	Crotocol
Verrucaric acid	Trichothecolone
T-2 toxin	Crotocin
Nivalenol	Trichothecin
Fusarenon-X	Verrucarol
Calonectrin	15-Desacetylcalonectrin

80 S monosome โดยจับกับโปรตีนของ 60 S ribosome subunit แต่ไม่สามารถจับกับ free 60 S ribosomal subunit ได้ ต่อมาในปี 1975 Matsumoto และ Ueno (17) พบว่า T-2 toxin และ fusarenon-X ก็สามารถจับกับ ribosome ของเซลล์ของคัปปาซินได้เช่นกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การจับของ fusarenon-X กับ microsomal particles ของคัปปาซิน (17)

Particles	³ H-Fusarenon-X bound μg/A ₂₆₀
Microsomes	0.53
Polysomes	0.33
Ribosomes	0.31
60 S subunit	0.02
40 S subunit	0.05

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการจับกับ ribosome ของ ไทรโคดีซินส์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งศึกษาโดยการใส่ trichodermin ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี กับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไทรโคดีซินส์ ส่วนใหญ่ที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ก็สามารถจับกับ ribosome และยับยั้ง activity ของ peptidyl transferase ได้

จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมาแล้ว ทำให้สรุปกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ดังต่อไปนี้ คือ ไทรโคดีซินส์ จะไปจับกับ ribosome และรบกวน active center ของ peptidyl transferase ที่อยู่บน ribosome ทำให้ activity ลดลง และไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระยะ initiation หรือ termination แต่ในปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดทราบว่า ไทรโคดีซินส์ แต่ละชนิดเกาะกับ ribosome ต่างกันอย่างไร จึงยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระยะที่ต่างกัน Wei และ McLaughlin (18) ได้เสนอคำอธิบายไว้ 2 แบบ คือ

1. ไทรโคดีซินส์ แต่ละชนิดเกาะกับ ribosome เฉพาะบางขณะใน ribosome cycle เท่านั้น เช่น พวก initiation inhibitor จะเกาะกับ ribosome ในขณะที่ ribosome เริ่มเกาะกับ mRNA เป็น initiation complex เท่านั้น ในกรณีนี้เชื่อว่า conformation ของ ribosome ในแต่ละขั้นของการสังเคราะห์โปรตีนแตกต่างกันทำให้ ribosome binding constants สำหรับไทรโคดีซินส์ แต่ละชนิดต่างกัน

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความสามารถในการจับ ribosome กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (16,18)

		% Inhibition				
	H^3 -Trichodermin binding	Peptidyl transferase	in vivo protein synthesis	in vivo site of action		
		5 μ g/ml	20 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	
Control	--	100	100	100	100	
Trichodermin	(100)	88	93	50	93	E/T
Trichothecin	100	92	97	94	98	E/T
Scirpentriol	104	91	95	89	98	I
15-Acetoxyscirpendiol	97	81	89	91	99	I
Crotocin	79	66	78	89	98	E/T
Diacetoxyscirpenol	78	74	85	96	100	I
Verrucaric A	66	58	70	77	100	I
Trichodermol	49	27	60	60	87	E/T
Calonectrin	30	7	17	52	79	I
Trichothecolone	28	12	32	26	77	E/T
15-Desacetylcalonectrin	17	1	3	29	71	E/T
9,10-Dihydrotrichodermin	14	2	10	0	35	
Verrucarol	11	19	33	32	37	E/T
9,10-Dihydrotrichodermol	6	3	13	0	48	
4-Epitrichodermol	3	2	7	0	0	
Trichodermone	2	0	1	0	17	
Crotocol	-7	2	6	21	51	E/T

I = initiation step, E = elongation step, T = termination step.

2. ไทรโคธีซินส์ ทุกชนิดเกาะกับ ribosome ได้เท่ากันไม่ว่า ribosome จะอยู่ในระยะใด แต่จะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ได้เฉพาะเมื่อ ribosome อยู่ในบางระยะใน ribosome cycle เท่านั้น เช่น termination inhibitor จะเกาะกับ ribosome ได้ทุกระยะ แต่จะรบกวนเอนไซม์ peptidyl transferase เฉพาะเมื่อ ribosome อยู่ในระยะ termination เท่านั้น

การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

ได้มีผู้ศึกษาผลของไตรโคธีซินส์ ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ด้วยเช่นกัน แต่มีน้อยกว่าที่ศึกษาการสังเคราะห์โปรตีน Ueno และคณะ (9-11) รายงานว่า nivalenol, fusarenon-X และ diacetoxyscirpenol สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์มะเร็ง Ehrlich ascites และ HeLa ได้ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ส่วน Oldham และคณะ (19) พบว่า T-2 toxin และ T-2 tetraol ก็สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ human fibroblast ได้ จากการศึกษาผลของสารพิษเหล่านี้คือเอนไซม์ DNA polymerase, thymidine และ thymidylate kinase พบว่าไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้เลย ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ผลกระทบของสารพิษต่อการสังเคราะห์ DNA อาจจะเป็นไปโดยทางอ้อม เช่น อาจเป็นเพราะสารพิษไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ DNA อย่างไรก็ตาม Ueno (20) พบว่า ระดับของ TDP และ TTP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ DNA สูงขึ้นและมีการคั่งของ DNA ท่อนสั้น ๆ ในเซลล์ที่ได้รับ ไตรโคธีซินส์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารพิษเหล่านี้อาจไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ ligase ก็เป็นไปได้

นอกจากนี้ได้มีผู้ศึกษาปฏิกิริยาของ ไตรโคธีซินส์ กับ DNA ทั้งทางตรงและทางอ้อม พบว่า สารส่วนใหญ่ไม่ทำให้ DNA แตกหัก (21) ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ยกเว้น crotoxin (20) และ fusarenon-X (22) ซึ่งพบว่าทำให้ *Salmonella typhimurium* TA 100 กลายพันธุ์ได้ และมีฤทธิ์ก่อมะเร็งค่อนข้างมาก (23) แต่อย่างไรก็ตาม Oldham และคณะ (19) พบว่า T-2 และ T-2 tetraol ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA ผิดแบบแผนในเนื้อเยื่อของคนที่ชี้ให้เห็นว่าไตรโคธีซินส์ อาจมีฤทธิ์ทำลาย DNA

สำหรับการสังเคราะห์ RNA นั้น Stafford และ McLaughlin (14) พบว่า trichodermin สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ในยีสต์ได้ แต่ Ueno และคณะ พบว่า nivalenol, fusarenon-X และ diacetoxyscirpenol นั้นไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ใน ascites tumor cells (11), protozoa (5) และ cultured cells (10) จากการศึกษาต่อมาในเซลล์ตับหนู ปรากฏว่าสารเหล่านี้ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ RNA หรือ activity ของ DNA-dependent RNA polymerase (20) เลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ที่พบในยีสต์นั้นน่าจะเป็นผลทางอ้อมของไตรโคธีซินส์ ที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีนมากกว่า (14)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1975 Ueno และ Matsumoto (24) ได้ศึกษาผลกระทบของสารพิษไตรโคธีซินส์ ต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่มี thiol (SH) group อยู่ที่ active center เช่น creatinine phosphokinase, lactate dehydrogenase และ alcohol dehydrogenase และพบว่า T-2 toxin, fusarenon-X และ neosolaniol สามารถ

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ได้เมื่อ incubate กับเอนไซม์ก่อนที่จะเติม substrate และจากการศึกษาโดยการผสมเอนไซม์ alcohol dehydrogenase กับ สารพิษ fusarenon-X ที่คิดผลากด้วยกับมันคภาพรังสีแล้วแยกโดยใช้วิธี gel-filtration พบว่า สารพิษสามารถจับกับเอนไซม์ได้ในอัตราส่วน 4:1 (4 โมเลกุลของไตรโคธีซินส์ ต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์) เอนไซม์ alcohol dehydrogenase มี thiol group อยู่ทั้งหมด 36 กลุ่ม และมีอยู่ 4 กลุ่ม ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ SH-reagents ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่า ไตรโคธีซินส์ สามารถจับกับ thiol (SH) group ที่อยู่ active center ของเอนไซม์ได้โดยอาจจับที่ epoxide residue ที่ตำแหน่ง C₁₂-C₁₃ ของมัน แต่ก็มีผู้อื่นที่ได้ศึกษาใน human fibroblast แล้วพบว่า T-2 toxin และ T-2 tetraol ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อื่น ๆ เช่น acid phosphatase, β -glucuronidase, 5'-mononucleotidase, ATPase, alkaline phosphatase และ γ -glutamyltranspeptidase (19)

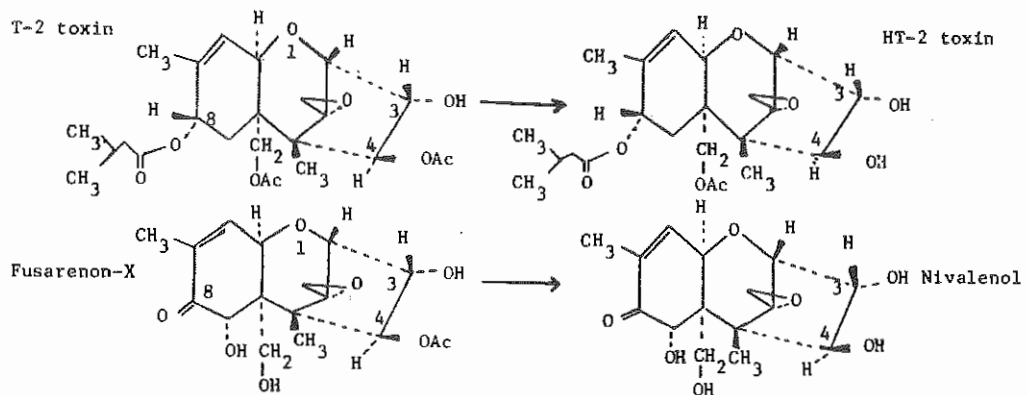
จากการที่พบว่าไตรโคธีซินส์ สามารถเกาะกับ reactive SH group ในเอนไซม์หรือโปรตีนนี้ ทำให้มีผู้สงสัยว่าปฏิกิริยานี้น่าจะมีความสำคัญมากในการที่จะอธิบายถึงกลไกของไตรโคธีซินส์ ในการเกาะกับ ribosome และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งขณะนี้กำลังมีผู้ศึกษากันอยู่

คุณสมบัติอื่น ๆ ของสารพิษไตรโคธีซินส์

ไตรโคธีซินส์ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ polysaccharides ในยีสต์ (15), การสังเคราะห์ไขมันและการดูดซึมหมู่ phosphate ในโปรโตซัว Tetrahymena pyriformis ได้ และตารางที่ 2 แสดงให้เห็นความแตกต่างของไตรโคธีซินส์ แต่ละชนิดในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ และใน cell free system จากผลการศึกษาเหล่านี้ ชี้ให้เห็นว่าไตรโคธีซินส์ อาจจะมีผลทำให้การทำงานของเยื่อเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง และกลไกเหล่านี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดท้องร่วง เมื่อได้รับสารพิษกลุ่มนี้ก็เป็นได้

ขบวนการเมตาบอลิซึม

Ueno และคณะ (26,27) ได้ศึกษาการกระจายและการขับถ่ายของ T-2 toxin และ fusarenon-X ในหนูถีบจักร พบว่า หลังจากฉีด fusarenon-X เข้าได้ผิวหนังแล้ว สารพิษจะกระจายไปยังตับ ไต ลำไส้ อย่างรวดเร็ว และ 25% จะถูกขับออกไปกับปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง และปรากฏว่าสารพิษที่ออกมากับปัสสาวะนี้ คือ nivalenol ส่วนถ้าให้ T-2 toxin แก่หนูขาวและหนูถีบจักร โดยทางปาก ปรากฏว่า สารพิษจะกระจายไปยังตับ ม้าม ไต และ ลำไส้ เช่นเดียวกัน แต่จะถูกขับออกไปกับอุจจาระเป็นส่วนใหญ่ซึ่งสารที่ออกมาได้พบว่าเป็น HT-2 toxin และเมื่อได้ศึกษาเพิ่มเติมในตับหนู สรุปได้ว่า fusarenon-X และ T-2 toxin จะถูก deacetylate ที่ตำแหน่งที่ C₄ โดยเอนไซม์ esterase ที่อยู่ใน microsomal fraction และเปลี่ยนไปเป็น nivalenol และ HT-2 toxin ตามลำดับ (28) ซึ่งจะถูกขับออกไปกับปัสสาวะและอุจจาระต่อไป ดังในรูปที่ 3

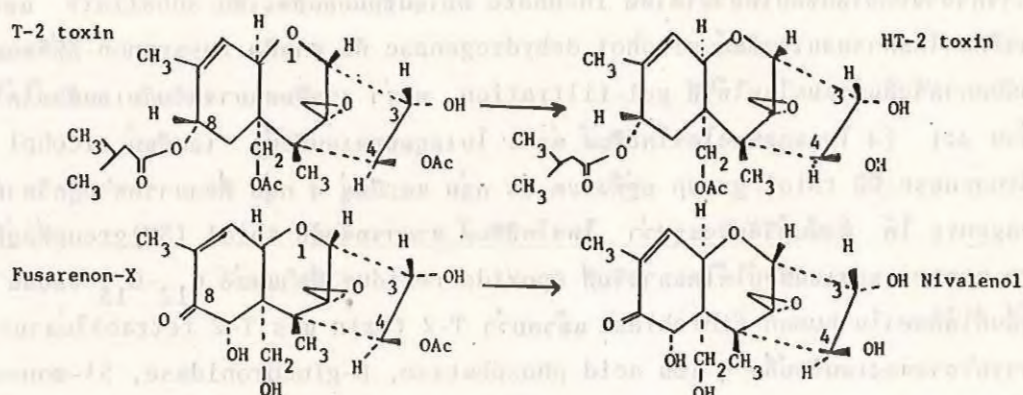


รูปที่ 3 Deacetylation ของโทรโคซินส์ ใน microsomal fraction

นอกจากนี้ก็พบว่าในตับคน วัว และ กระต่าย ก็มีเอนไซม์ esterase นี้ด้วยเหมือนกัน (20,29) และจากการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์นี้จะ deacetylate T-2 toxin ให้เป็น HT-2 toxin ปรากฏว่า ในตับกระต่ายมีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตับคน และ ตับหมู (ตารางที่ 7) และเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอวัยวะของกระต่าย ปรากฏว่า ในตับมีเอนไซม์มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ไค ม้าม และ สมอง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากหนู ที่พบว่า ในสมองมีเอนไซม์มากกว่าในไตถึง 10 เท่า

ตารางที่ 7 Microsomal deacetylation ของ T-2 toxin ในอวัยวะต่าง ๆ (20)

	HT-2 toxin formed		
	μ mole/mg protein/10 min		
	human	rat	rabbit
Liver	331	31	3401
Kidneys		1	1571
Spleen		1	73
Brain		10	25
Serum		0	



รูปที่ 3 Deacetylation ของไตรโคธีซินส์ ใน microsomal fraction

นอกจากนี้ก็พบว่าในตับคน วัว และ กระต่าย ก็มีเอนไซม์ esterase ที่อยู่คล้ายเหมือนกัน (20,29) และจากการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ที่จะ deacetylate T-2 toxin ให้เป็น HT-2 toxin พบว่า ในตับกระต่ายมีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตับคน และ ตับหนู (ตารางที่ 7) และเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอวัยวะของกระต่าย พบว่า ในตับมีเอนไซม์มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ไต ม้าม และ สมอง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากหนู ที่พบว่า ในสมองมีเอนไซม์มากกว่าในไตถึง 10 เท่า

ตารางที่ 7 Microsomal deacetylation ของ T-2 toxin ในอวัยวะต่าง ๆ (20)

	HT-2 toxin formed		
	μ mole/mg protein/10 min		
	human	rat	rabbit
Liver	331	31	3401
Kidneys		1	1571
Spleen		1	73
Brain		10	25
Serum		0	

บทสรุป

จากผลการศึกษาทางชีวเคมีดังกล่าวข้างต้น ทำให้ทราบถึงกลไกของการเกิดพิษของสารพิษ ไทรโคธีซินส์ ที่มีต่อเซลล์ที่แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น เซลล์ในระบบทางเดินอาหาร และระบบการสร้าง เม็ดเลือด ว่าเป็นเพราะสารพิษกลุ่มนี้ไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และโปรตีนในเซลล์ ส่วนกลไกการ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนนั้น สรุปได้ว่า สารพิษจับกับโปรตีน (ซึ่งอาจจะจับกับหมู่ thiol (SH) ใน โปรตีน) ของ 80 S ribosome และทำให้การทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ลดลง นอกจากนี้จากการศึกษาที่พบว่า ไทรโคธีซินส์ แต่ละชนิดที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ต่างกัน มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ และใน cell free system ต่างกัน ทำให้คิดว่า ไทรโคธีซินส์ อาจทำปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์ ซึ่งอาจจะทำให้การดูดซึมและการนำเข้าของ precursor ของ DNA และโปรตีนลดลง ในขณะที่นักวิทยาศาสตร์ก็กำลังศึกษาถึงปฏิกิริยาของไทรโคธีซินส์กับเยื่อเซลล์ และขบวนการเบตาออกซิสมของสารพิษกลุ่มนี้ในเซลล์ ทั้งนี้เพื่อจะได้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์และความ สัมพันธ์ของโครงสร้างกับฤทธิ์ของมันอย่างถูกต้องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ueno, Y. In : Mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V., et al, eds. Pathotox Publishers. Inc. Illinois pp. 189-207, 1977.
2. Godtfredsen, W.O., Grove, J.F. and Tamm, Ch. Helv. Chim. Acta, 50; 1666-1668, 1967.
3. Sato, N. and Ueno, Y. In : Mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V. et al, eds. Pathotox Publishers, Illinois; 295-307, 1977.
4. Saito, M., Enomoto, M. and Tatsuno, T. Cann, 60; 599-603, 1969.
5. Ueno, Y. and Yamakawa, H. Japan J. Exp. Med., 40; 385-390, 1970.
6. Ohtsubo, K and Saito, M. Japan, J. Med. Sci. Biol., 23; 217-225, 1970.
7. Ueno, Y., Hosoya, M, Morita, V., Ueno, I. and Tatsuno, T.J. Biochem (Tokyo) 64; 479-485, 1968.
8. Ueno, Y., Hosoya, M., and Ishikawa, Y. J. Biochem. (Tokyo) 66; 419-422, 1969.
9. Ueno, Y. and Fukushima, K. Experientia, 24; 1032-1033, 1968.
10. Ohtsubo, K., Kaden, P. and Mittermayer, C. Biochim. Biophys. Acta. 287; 520-525, 1972.
11. Ueno, Y. Nakajima, K., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N., and Shimada, N. J. Biochem. (Tokyo) 74; 285-296, 1973.

12. Ueno, Y. and Shimada, N. Chem. Pharm. Bull. 22; 2744-2746, 1974.
13. Cundliffe, E., Cannon, M., and Davies, J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71; 30-34, 1974.
14. Stafford, M.E. and McLaughlin, C.S. J. Cell. Physiol., 82;121-128, 1973.
15. McLaughlin, C.S., Vaughan, M.H., Campbell, I.M., Wei, C.M., Stafford, M.E. and Hansen, B.S. In : Mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V., et al. eds. Pathotox Publishers Inc. Illinois. 9; 263-273,1977.
16. Wei, C.M., Campbell, I.M., McLaughlin, C.S., and Vaughan, M.H. Mol. Cell. Biochem. 3; 215-219, 1974.
17. Matsumoto, H and Ueno, Y. Proc. 95 th Ann. Meet. Japan. Pharmaceut Soc. III - 102, 1975.
18. Wei, C.M. and McLaughlin, C.S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 57; 838-844, 1974.
19. Oldham, J. W., Allred, L.E., Milo, G.E., Kindig, O., and Capen, C.C. Toxicol. Appl. Pharmacol. 52; 159-168, 1980.
20. Ueno, Y. Mode of action of trichothecenes Pure Appl. Chem. 49; 1737-1745, 1977.
21. Umeda, M., Yamamoto, T. and Saito, M. Japan, J. Exp. Med., 42; 527-535, 1972.
22. Nagao, M., Honda, M., Kinono, Y. et al. Proc. 4 Meet. Jap. Assoc. Mycotoxicology, (9), 1976.
23. Ohtsubo, K. and Saito, M. In : Mycotoxins in human and animal health, Rodricks, J.V., et al, eds. Pathotox Publishers Inc. Illinois; 244-262, 1977.
24. Ueno, Y. and Matsumoto, H. Chem. Pharm. Bull. 23; 2439-2443, 1975.
25. Chiba, J., Nakano, N., Morooka, N., Nakazawa, S. and Watanabe, Y. Japan. J. Med. Sci. Biol., 25; 291-296, 1972.
26. Ueno, Y. Ueno. I., Iitol, Y., Tsunoda, H., Enomoto, M., and Ohtsubo, K. Japan. J. Exp. Med. 41; 521-539, 1971.
27. Ueno, Y., Matsumoto, Y., Ito, I., and Ohta, M. Proc. 96th. ann. Meet. J Japan. Pharmaceut. Soc., III - 240, 1976.
28. Otha, M., and Ueno, Y. Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol. 2; 34-35, 1976.
29. Ellison, R.A. and Kotsonis, F.N. Appl. Microbiol. 27; 423-424, 1974.