ผลของการสัมผัสร่วมของสาร 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียมและเอทานอลต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2

ธนู ทองคำสุก[1] ปราโมทย์ มหคุณากร[2,*]

[1]นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2] สาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

สาร 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นสารที่เกษตรกรนิยมใช้ในการกำจัดวัชพืช และการดื่มแอลกอฮอล์ก็เป็นที่นิยมเช่นกัน ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดเป็นอันตรายต่อตับ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการสัมผัสร่วมของสาร 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียมและเอทานอล ต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน และการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ด้วยสาร 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียม หรือเอทานอล หรือ 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียมร่วมกับเอทานอล ซึ่งทำการศึกษาการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระ การทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คะตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนและมาลอนไดอัลดีไฮด์ ผลการศึกษาพบว่าการสัมผัสร่วมของสารทั้ง 2 ชนิด เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และมีการเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คะตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มมากขึ้น มีระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์เพิ่มมากขึ้น และมีระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนลดลง เมื่อเทียบกับการได้รับสารชนิดเดียว ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการรับสัมผัสร่วมของสารทั้ง 2 ชนิด สามารถเสริมฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุหลักต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปเป็นแนวทางในการศึกษาในสัตว์ทดลอง และศึกษาแนวโน้มการเกิดพิษในกรณีได้รับสัมผัสสารร่วมกัน รวมทั้งกำหนดเป็นข้อควรระวังสำหรับผู้ที่ใช้สารกำจัดวัชพืชและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่อไป

คำสำคัญ: 2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียม เอทานอล การสัมผัสร่วม ภาวะเครียดออกซิเดชัน เซลล์ HepG2

รับบทความ: *7 ธันวาคม 2565* ***แก้ไข:*** *13 กุมภาพันธ์ 2565* ***ตอบรับ:*** *22 กุมภาพันธ์ 2566*

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ

ปราโมทย์ มหคุณากร

สาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย 40002

อีเมล: pramah@kku.ac.th

Effects of 2,4-D Dimethylammonium and Ethanol Co-Exposure on Oxidative Stress and Toxicity in HepG2 Cells

Thanoo Thongkamsuk[1] Pramote Mahakunakorn[2,*]

[1] Graduate program in Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

[2] Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

Abstract

2,4-D dimethylammonium is a popular herbicide used by farmers. Alcohol consumption is also popular in society, both of which can cause adverse effect on the liver. This study aimed to study the effects of combined exposure of 2,4-D dimethylammonium and ethanol on oxidative stress and cytotoxicity on HepG2 cell line. The HepG2 cells were cultured with 2,4-D dimethylammonium, ethanol or the combination of 2,4-D dimethylammonium and ethanol to investigate the inhibition of cell growth, occurrence of free radicals, activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, reduced glutathione and malondialdehyde levels. The results showed that the combined exposure of 2,4-D dimethyl ammonium and ethanol resulting in increased cytotoxicity. There was an increase in intracellular oxidants. The activities of superoxide, dismutase, catalase, glutathione peroxidase also increased. The levels of malondialdehyde have increased while reduced glutathione was reduced compared to a single exposure. It was concluded that the exposure of comminated 2,4-D dimethyl ammonium and ethanol enhanced the intracellular oxidants. Therefore, this study shows that the combined exposure of 2,4-D dimethylammonium and ethanol enhanced the intracellular oxidants, which is the major cause of oxidative stress and cytotoxicity. The data from this study can be used as a guideline for animal studies and study of the toxicity trend have been combined exposure. It is also specified as a precaution for those who was used herbicides and alcohol.

Keywords: 2,4-D dimethylammonium, ethanol, combined exposure, oxidative stress, HepG2 cells

Received: *7 December 2022,* ***Revised:*** *13 February 2023,* ***Accepted:*** *22 February 2023*

[*]Corresponding author

Pramote Mahakunakorn

Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002

E-mail: pramah@kku.ac.th

บทนำ

2,4-ดี ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D-dimethyl ammonium; 2,4-D DMA) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการนำเข้าประเทศไทยในปริมาณที่สูง ซึ่งเกษตรกรอาจได้รับสัมผัสจากการประกอบอาชีพ การปนเปื้อนในอาหาร น้ำ อากาศ หรือดิน ผ่านการกิน การหายใจ หรือทางผิวหนัง ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อตับซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการลดความเป็นพิษและขับออกนอกร่างกาย รวมทั้งส่งผลกระทบต่ออวัยวะอื่น ๆ[1]

เอทานอล (Ethanol; EtOH) เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หลายชนิด ซึ่งเป็นที่นิยมในสังคมไทย ข้อมูลจากการสำรวจพฤติกรรมการดื่มสุราของประชากรไทย พ.ศ. 2560 ของสำนักงานสถิติแห่งชาติ พบว่าผู้ที่ดื่มสุราส่วนใหญ่ประกอบอาชีพด้านการเกษตรและประมง โดยมีจำนวน 1,885,115 คน[2] ซึ่งผลจากการดื่มสุรานั้นส่งผลให้เกิดอันตรายต่อตับได้เช่นกันดังที่แสดงให้เห็นจากการศึกษาในสัตว์ทดลองและทางคลินิก

ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาผลของการสัมผัสร่วมของ 2,4-D DMA และ EtOH ต่อตับ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาผลที่เกิดจากการได้รับสัมผัสสารชนิดเดียว จากการศึกษาของ Gunness (2007) พบว่าการให้ 2,4-D DMA แก่เซลล์ HepG2 ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์และกระตุ้นการสร้าง Reactive oxygen species: ROS[3] การศึกษาของ Chen, Shaw, Chang และคณะ พบว่าการให้ EtOH แก่เซลล์ HepG2 สามารถกระตุ้นการสร้าง ROS และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ[4] แสดงให้เห็นว่าสารแต่ละชนิดก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ที่นิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษากลไกการทำงานของตับ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการสัมผัสร่วมของ 2,4-D DMA และ EtOH โดยให้ 2,4-D DMA เพียงชนิดเดียว และให้ EtOH เพียงชนิดเดียวแก่เซลล์ HepG2 เปรียบเทียบกับการให้สาร 2,4-D DMA ร่วมกับ EtOH เพื่อศึกษาถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน และการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2

วัสดุ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงเซลล์ HepG2

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ HepG2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ผสมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS) และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มใน incubator โดยมีสภาวะ 5 % CO_2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

การวัดการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ใช้วิธี MTT assay โดยเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96-well plate จำนวน $3x10^3$ cell/well ร่วมกับสารทดสอบ (กลุ่มที่ 1 ให้ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 1 – 3 mM กลุ่มที่ 2 ให้ EtOH ความเข้มข้น 200 – 600 mM กลุ่มที่ 3 ให้ 2,4-D DMA และ EtOH พร้อมกันโดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 1 : 200 (เป็นผลจากทดสอบค่า IC_{50} ของสารทั้งสองชนิดซึ่งพบว่าแตกต่างกันประมาณ 200 เท่า) ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นขึ้นแบบคงที่โดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1 mM : 200 mM – 3 mM : 600 mM กลุ่มที่ 4 ให้ 2,4-D DMA

และ EtOH พร้อมกันโดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1 mM : 600 mM และ 3 mM : 200 mM กลุ่มที่ 5 ให้ 0.2% H_2O_2 เป็น positive control และ DMEM เป็น negative control) หลังจาก 24 ชั่วโมง เติมสาร MTT (5 mg/mL Phosphate buffered saline) ในแต่ละหลุม บ่มที่ 5% CO_2 และ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ละลายผลึก Formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร[5]

การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของ 2,4-D DMA และ EtOH

วิเคราะห์โดยนำข้อมูลผลการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ บันทึกลงในโปรแกรม CompuSyn ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดย Ting-Chao chou และ Nick Martin ในปี 2005 โดยพิจารณาผลจากค่า Combination Index; CI ซึ่งค่า CI แสดงปฏิกิริยาของสารสองชนิดที่รวมกัน ได้แก่ additive effect (CI=1) synergism (CI<1) และ antagonism (CI > 1) [6]

การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ใช้วิธี Dichlorofluorescein (DCF) assay โดยเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96-well plate สีดำ จำนวน $3x10^3$ cell/well บ่มที่ 5% CO_2 และ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย Phosphate buffered saline แล้วเติม DCFH-DA 50 µM โดยเจือจางใน DMEM ที่ไม่มี FBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะเดิม 45 นาที ในที่มืด ล้างด้วย Phosphate buffered saline ปริมาตร 100 ไมโครลิตรจำนวน 2 รอบ เติมสารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร (กลุ่มที่ 1 ให้ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 1 และ 3 mM กลุ่มที่ 2 ให้ EtOH ความเข้มข้น 200 และ 600 mM กลุ่มที่ 3 ให้ 2,4-D DMA และ EtOH พร้อมกันโดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1 mM : 200 mM, 3 mM : 600 mM, 1 mM : 600 mM และ 3 mM : 200 mM กลุ่มที่ 4 ให้ 0.2% H_2O_2 เป็น positive control และ DMEM เป็น negative control) เจือจางด้วย DMEM ที่ไม่มี FBS บ่มที่สภาวะเดิม 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร จะเป็นค่ากระตุ้น (excitation) และความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร เป็นค่าที่ใช้ในการวัด (emission) คำนวณปริมาณอนุมูลอิสระในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ซึ่งปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ของจิราภรณ์และคณะ (2561)[7]

การวัดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) คะตาเลส (CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx))

เลี้ยงเซลล์ HepG2 เพาะเลี้ยงใน 24-well plate จำนวน $2x10^5$ cell/well บ่มที่ 5% CO_2 และ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย Phosphate buffered saline 1 mL เติมสารทดสอบปริมาตร 1 mL โดยมีความเข้มข้นเช่นเดียวกับการวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ซึ่งตัด positive control ออกเนื่องจากไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ โดยเหลือเพียง negative control ซึ่งสารทดสอบทั้งหมดเจือจางด้วย DMEM ที่ไม่มี FBS จากนั้นบ่มใน incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์ HepG2 แตกใน Sodium

phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 M เก็บส่วนใสไว้สำหรับตรวจวัดการทำงานและปริมาณของเอนไซม์อื่น ๆ ต่อไป ทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) โดยนำส่วนใส ปริมาตร 20 µL/well ลงใน 96 well plate เติม SOD reagent (ซึ่งประกอบด้วย nicotinamide adinine dinucleotide (NADH) ความเข้มข้น 780 µM ปริมาตร 2 mL nitro-blue-tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 300 µM ปริมาตร 3 mL จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 12 mL ด้วย sodium phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 50 mM) ในปริมาตร 160 µL แล้วเติม Phenazine methosulfate (PMS) ความเข้มข้น 186 µM ปริมาตร 20 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่าที่ได้คำนวณตามวิธีของ Mahakunakorn และคณะ (2005)[8] นำค่าที่ได้หารด้วยปริมาณโปรตีน จากนั้นคำนวณการทำงานของ SOD ในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์คะตาเลส (CAT) โดยนำส่วนใสของเซลล์ ปริมาตร 25 µL/well ลงใน 96 well plate เติม sodium phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 50 µL และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 130 mM ปริมาตร 75 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลล์เซียส 1 นาที เติม ammonium molybdate ความเข้มข้น 32.4 mM เขย่า 1 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm นำค่าที่ได้คำนวณตามวิธีของ Buraphaka และ Putalun (2020)[9] นำค่าที่ได้หารด้วยปริมาณโปรตีน จากนั้นคำนวณการทำงานของคะตาเลสในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

และวัดการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) โดยเตรียมสารละลายให้มีปริมาตร 880 µL (ซึ่งประกอบด้วย NADPH ความเข้มข้น 0.15 mM GSH ความเข้มข้น 1 mM glutathione reductase ความเข้มข้น 0.1 U/mL และ sodium azide ความเข้มข้น 100 mM ปรับปริมาตรด้วย potassium phosphate buffer pH 7.0) เติมน้ำปริมาตร 20 µL เติมส่วนใสของเซลล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม H_2O_2 ความเข้มข้น 0.4 mM ปริมาตร 100 µL แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่ได้คำนวณตามวิธีของ Adeyemi และคณะ (2015)[10] นำค่าที่ได้หารด้วยปริมาณโปรตีน จากนั้นนำค่าที่ได้คำนวณการทำงานของ GPx ในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

การวัดปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA)

ทำการวัดปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอน โดยนำส่วนใสของเซลล์ ปริมาตร 20 µL เติมลงใน 96-well plate เติมสารละลายที่ประกอบด้วย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 5 mM 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ความเข้มเข้มข้น 0.6 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ความเข้มข้น 0.2 mM และ glutathione reductase ความเข้มข้น 1 U/mL ที่ละลายใน sodium phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 80 µL นำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 412 nm คำนวณปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอนเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูตาไธโอน ตามวิธีของ Tadee และคณะ (2020)[11] นำค่าที่ได้หารด้วยปริมาณโปรตีน จากนั้นนำค่าที่ได้คำนวณปริมาณของ GSH ในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบ

และวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) โดยนำส่วนใสปริมาตร 20 µL เติมลง Eppendorf ขนาด 1.5 mL จากนั้นเติมสารละลาย TBA (ประกอบด้วย butyl hydroxytoluene ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 5 µL ร้อยละ 10 ของ trichloroacetic acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร EDTA ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 50 µL ร้อยละ 8.1 ของ sodium dodecyl sulphate ปริมาตร 100 µL และร้อยละ 0.6 ของ triobabituric acid ปริมาตร 150 µL) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วรอให้อุณหภูมิลดลง จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 200 µL ลงใน 96 well plate เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ด้วยเครื่อง microplate reader และหักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm คำนวณปริมาณของมาลอนไดแอลดีไฮด์มีหน่วยเป็น µM เทียบกับกราฟมาตรฐาน 1,1,3,3- tetramethoxypropane (TMP) ตามวิธีของ Armstrong และ Browne (1994)[12] จากนั้นนำค่าที่ได้หารด้วยปริมาณโปรตีน นำค่าที่ได้คำนวณปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ในรูปร้อยละโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการศึกษาแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation (SD)) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง และความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value <0.05 การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS 28.0.0.0

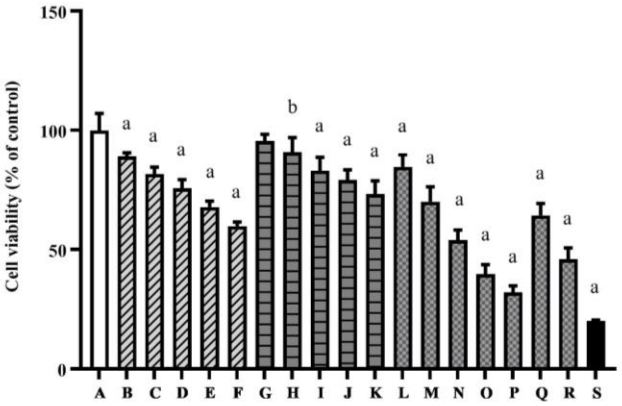
ผลการวิจัย

ผลการวัดการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

พบว่าเซลล์ที่ได้รับ 2,4-D DMA อย่างเดียว มีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงในทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ที่ได้รับ EtOH เพียงอย่างเดียว พบว่าความเข้มข้น 300 mM มีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นตั้งแต่ 400 - 600 mM มีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันในกลุ่มที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นแบบคงที่โดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1 mM : 200 mM - 3 mM : 600 mM และกลุ่มอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1 mM : 600 mM และ 3 mM : 200 mM พบว่าในทุกความเข้มข้นมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลจากการเปรียบเทียบการได้รับสัมผัสสารชนิดเดียวและได้รับสัมผัสร่วมสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่า 2,4-D DMA

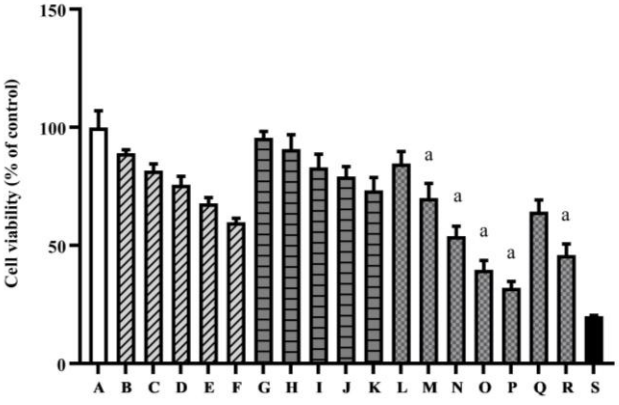
และ EtOH กรณีที่กลุ่มที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นแบบคงที่โดยมีอัตราส่วนความเข้มข้น 2 ,4 -D DMA : EtOH คือ 1.5:300 2:400 2.5:500 และ 3:600 mM:mM มีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับการได้รับสัมผัสสารเพียงชนิดเดียว ส่วนกลุ่มอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH 3:200 mM:mM มีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับการได้รับสัมผัสสารเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 1)

A



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Control	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D DMA (mM)	-	1	1.5	2	2.5	3	-	-	-	-	-	1	1.5	2	2.5	3	1	3	-
EtOH (mM)	-	-	-	-	-	-	200	300	400	500	600	200	300	400	500	600	600	200	-
H_2O_2 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2

B



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Control	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D DMA (mM)	-	1	1.5	2	2.5	3	-	-	-	-	-	1	1.5	2	2.5	3	1	3	-
EtOH (mM)	-	-	-	-	-	-	200	300	400	500	600	200	300	400	500	600	600	200	-
H_2O_2 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2

รูปที่ 1. (A) ความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ 2,4-D DMA และ EtOH ในกรณีที่รับสารชนิดเดียวและรับสัมผัสร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation (SD)) โดยที่ a = $p < 0.01$ และ b = $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม **(B)** ความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ 2,4-D DMA และ EtOH ในกรณีที่รับสัมผัสร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation (SD)) โดยที่ a = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับสารแต่ละชนิดคือ 2,4-D DMA และ EtOH โดยมีความเข้มข้น ได้แก่ 1) 1.5 mM และ 300 mM 2) 2 mM และ 400 mM 3) 2.5 mM และ 500 mM 4) 3 mM และ 600 mM 5) 3 mM และ 200 mM ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาของ 2,4-D DMA และ EtOH

พบว่า 2,4-D DMA และ EtOH อัตราส่วนความเข้มข้น 1:200 1.5:300 และ 1:600 mM:mM มีค่า CI มากกว่า 1 แสดงว่ามีปฏิกิริยาแบบต้านฤทธิ์ (antagonism) ส่วน 2,4-D DMA และ EtOH อัตราส่วนความเข้มข้น 2:400 2.5:500 3:600 และ 3:200 mM:mM มีค่า CI น้อยกว่า 1 แสดงว่ามีปฏิกิริยาแบบเสริมฤทธิ์ (synergism) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. การวิเคราะห์ผลของการสัมผัสร่วมของ 2,4-D DMA และ EtOH ด้วยโปรแกรม compusyn

Total Concentration		Fa	CI Value
2,4 D DMA (mM)	**EtOH (mM)**		
กรณีค่าแตกต่างกันที่เพิ่มขึ้นแบบคงที่ (200 เท่า)			
1	200	0.15	1.27187
1.5	300	0.30	1.12463
2	400	0.46	0.99949
2.5	500	0.60	0.89662
3	600	0.68	0.87812
กรณีค่าแตกต่างกันแบบไม่คงที่			
1	600	0.36	1.19789
3	200	0.54	0.85434

หมายเหตุ: ค่า Fa หมายถึง Fractional inhibition ระดับประสิทธิภาพร่วม อยู่ในช่วง 0 - 1
ค่า CI หมายถึง Value combination index โดยที่ additive effect (CI = 1) synergism (CI < 1), and antagonism (CI > 1) (Chou & Talalay, 1984)

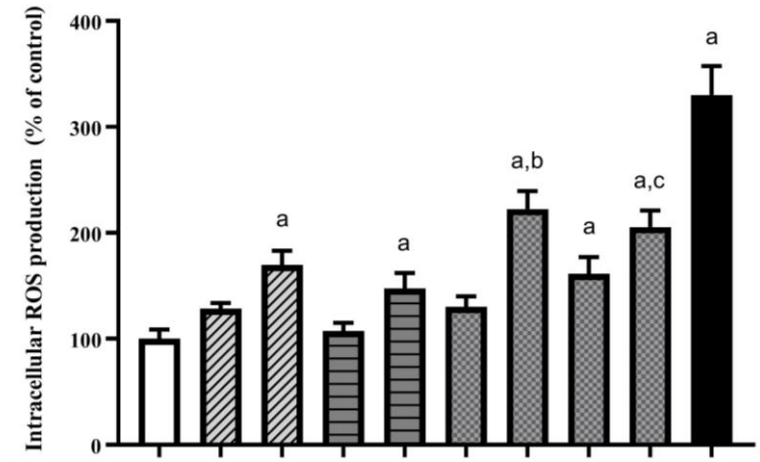
ผลการวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์

พบว่าเซลล์ที่ได้รับสาร 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM เพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่ได้รับสาร EtOH ความเข้มข้น 600 mM เพียงอย่างเดียว มีการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม เซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันในกลุ่มที่มีอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600, 1:600 และ 3:200 mM:mM มีการเกิดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบการได้รับสัมผัสสารชนิดเดียวและได้รับสัมผัสร่วมสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่า 2,4-D DMA และ EtOH กรณีที่อัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600 mM:mM มีการเกิดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM และอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:200 mM:mM มีการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ

2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM (รูปที่ 2)

ผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) คะตาเลส (CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx))

พบว่าเซลล์ที่ได้รับสาร 2,4-D DMA เพียงอย่างเดียว มีระดับการทำงานของ SOD และ GPx เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้น ส่วน CAT มีเพียงความเข้มข้น 3,000 µM ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนกรณีที่ได้รับ EtOH เพียงอย่างเดียวมีระดับการทำงานของ SOD เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้น ส่วน CAT และ GPx มีเพียงความเข้มข้น 600 mM เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันพบว่าทุกอัตราส่วนความเข้มข้น มีระดับการทำงานของ SOD และ GPx เพิ่มขึ้น ส่วน CAT มีเพียงอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600, 1:600 และ 3:200 mM:mM ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบในกรณีที่ได้รับสารชนิดเดียวกับการได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600 mM:mM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM ส่วนอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:200 mM:mM มีระดับทำงานของ SOD และ GPx เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) มีระดับทำงานของ CATเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM (ตารางที่ 2)



Control	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D DMA (mM)	-	1	3	-	-	1	3	1	3	-
EtOH (mM)	-	-	-	200	600	200	600	600	200	-
H_2O_2 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2

รูปที่ 2. ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ 2,4-D DMA และ EtOH ในกรณีที่รับสารชนิดเดียว และรับสัมผัสร่วม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี DCFH-DA แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation (SD)) โดยที่ a = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม b = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM และ c = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM

ตารางที่ 2. ผลการทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) คะตาเลส (CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

ชนิดสารทดสอบ	จำนวนเท่าการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น (+) เมื่อเทียบกับ control		
	SOD	CAT	GPx
2,4-D DMA 1 mM	+10.68[a]	+1.39	+10.62[a]
2,4-D DMA 3 mM	+18.37[a]	+4.89[a]	+14.54[a]
EtOH 200 mM	+6.98[a]	+1.11	+4.38
EtOH 600 mM	+11.18[a]	+2.52[a]	+12.10[a]
2,4-D DMA 1 mM + EtOH 200 mM	+11.16[a]	+2.28	+11.04[a]
2,4-D DMA 3 mM + EtOH 600 mM	+50.68[a, b]	+7.79[a, b]	+28.94[a, b]
2,4-D DMA 1 mM + EtOH 600 mM	+13.31[a]	+3.23[a]	+13.90[a]
2,4-D DMA 3 mM + EtOH 200 mM	+20.79[a, c]	+6.08[a, d]	+21.34[a, c]

การทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) คะตาเลส (CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ 2,4-D DMA และ EtOH ในกรณีที่รับสารชนิดเดียวและรับสัมผัสร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ HepG2 กลุ่มควบคุม โดยที่ a = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม b = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM c = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM และ d = $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM

ผลการวัดปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH)

เซลล์ที่ได้รับ 2,4-D DMA หรือ EtOH เพียงอย่างเดียว และได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 1:200, 3:600, 1:600 และ 3:200 mM:mM ทุกอัตราส่วนความเข้มข้นทำให้ระดับ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน อัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600 mM:mM มีระดับ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:200 mM:mM มีระดับ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM (ตารางที่ 3)

ผลการวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA)

พบว่าเซลล์ที่ได้รับ 2,4-D DMA เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 3 mM และได้รับ EtOH เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 600 mM มีระดับ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน อัตราส่วนความเข้มข้น

2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600, 1:600 และ 3:200 mM:mM มีระดับ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:600 mM:mM มีระดับ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM ส่วนอัตราส่วนความเข้มข้น 2,4-D DMA : EtOH คือ 3:200 mM:mM มีระดับ MDAเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA)

ชนิดสารทดสอบ	จำนวนเท่าปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) เมื่อเทียบกับ control	
	GSH	MDA
2,4-D DMA 1 mM	-0.26 [a]	+1.16
2,4-D DMA 3 mM	-0.53 [a]	+1.95 [a]
EtOH 200 mM	-0.22 [a]	+1.06
EtOH 600 mM	-0.45 [a]	+1.77 [a]
2,4-D DMA 1 mM + EtOH 200 mM	-0.33 [a]	+1.26
2,4-D DMA 3 mM + EtOH 600 mM	-0.87 [a, b]	+3.20 [a, b]
2,4-D DMA 1 mM + EtOH 600 mM	-0.50 [a]	+1.84 [a]
2,4-D DMA 3 mM + EtOH 200 mM	-0.73 [a, c]	+2.53 [a, d]

ปริมาณรีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ในเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ 2,4-D DMA และ EtOH ในกรณีที่รับสารชนิดเดียวและรับสัมผัสร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ HepG2 กลุ่มควบคุม โดยที่ a = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม b = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 600 mM c = $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM และ d = $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับ 2,4-D DMA ความเข้มข้น 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า 2,4-D DMA และ EtOH มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (dose dependent) โดยมีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร 2,4-ดี และอนุพันธ์ รวมถึง EtOH ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ได้โดยจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis[13,14] และผลของการสัมผัสร่วมของ 2,4-D DMA และ EtOH ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม compusyn (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า 2,4-D DMA: EtOH 2:400, 2.5:500 และ 3:200 mM:mM) จะมีปฏิกิริยาแบบเสริมฤทธิ์ (synergism) โดยมีค่า Value combination Index: CI

< 1 ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายเพิ่มมากขึ้นกว่าการได้รับสารเดี่ยว

จากการวัดปริมาณการเกิดอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species : ROS) แสดงให้เห็นว่าการได้รับสัมผัสสารทั้งสองชนิดสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งจะส่งผลให้เพิ่มภาวะออกซิเดชันภายในเซลล์ได้ ซึ่งกลไกการ Metabolism และการเกิดความเป็นพิษจากสารกลุ่ม Chlorophenoxy ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ แต่ผลลัพธ์จากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าสามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ตับและอวัยวะอื่น ๆ ได้[15] สามารถกระตุ้นการผลิตอนุมูลอิสระ (hydroxyl radicals) ในยีสต์[16] รวมทั้งกระตุ้นการผลิตสารอนุมูลอิสระในเซลล์ HepG2 โดยมีระดับอนุมูลอิสระมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่ได้รับ ส่วนการได้รับสัมผัส EtOH นั้นมีกลไกในกระบวนกำจัดสารพิษในเซลล์ตับหลายกลไก แต่มีกลไกที่สำคัญคือเซลล์ตับจะเปลี่ยน EtOH ให้เป็นอะซิทัลดีไฮด์ ซึ่งจะส่งผลให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นโดยที่สารอนุมูลอิสระสามารถจับกับ membrane phospholipid เกิดเป็น lipid peroxidation ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ malondialdehyde และ 4-hydroxy-2-noenol ซึ่ง 4-hydroxy-2-noenol สามารถกระตุ้นให้เกิด Reactive oxygen species และกระตุ้นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระให้เพิ่มมากขึ้น เช่น SOD CAT เป็นต้น[17,18]

ผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD CAT และ GPx พบว่าการได้รับสัมผัสสาร 2,4-D DMA และการได้รับสัมผัส EtOH ทำให้มีร้อยละการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบ แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของ SOD เกิดขึ้นเพื่อเร่งปฏิกิริยา dismutation ของ superoxide anion ให้เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มากขึ้น จากนั้นการทำงานของ CAT และ GPx จึงเพิ่มขึ้นเพื่อลดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเปลี่ยนให้เป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการเกิดอนุมูลอิสระ กล่าวคือเมื่อมีปริมาณอนุมูลอิสระมากขึ้น จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระให้สูงขึ้น[19]

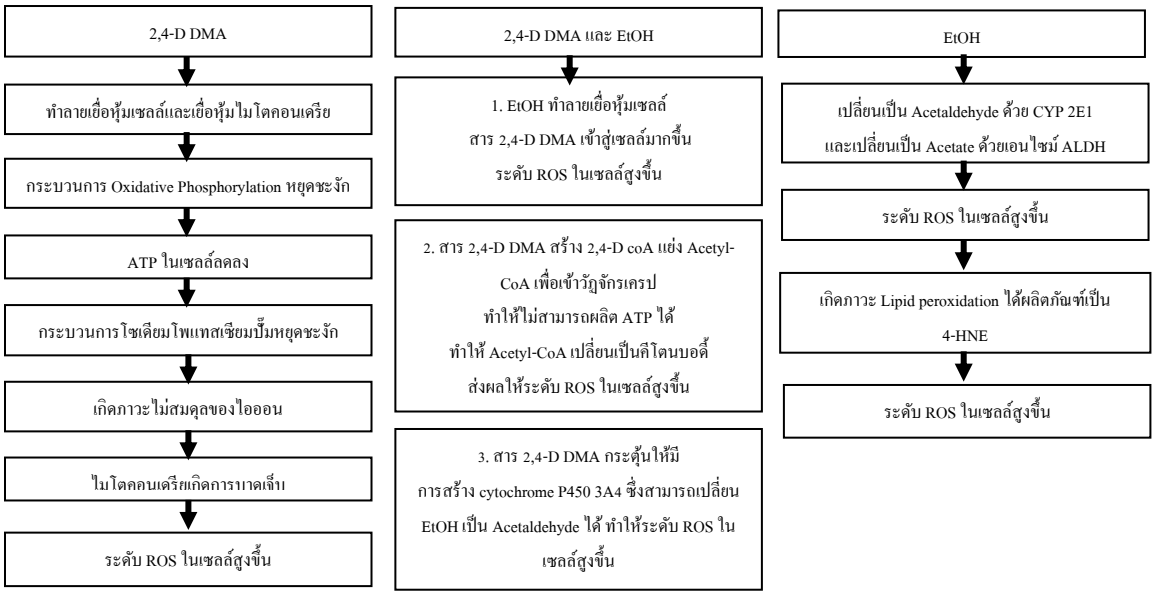
การรับสัมผัส 2,4-D DMA และ EtOH ทำให้มีร้อยละของปริมาณ GSH ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาของ Shafeeq and Mahboob (2019) และ Ogony et al. (2008) พบว่าการได้รับ 2-4 ดี และการได้รับสัมผัส EtOH ต่างก็มีผลทำให้ระดับ GSH ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมทั้งผลการศึกษาดังกล่าวยังสอดคล้องกับผลของการศึกษาการทำงานของ GPx ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการทำงานของ GPx ที่สูงขึ้นจะทำให้ระดับ GSH ลดลง เนื่องจากในกระบวนการกำจัด Hydrogen peroxide (H_2O_2) GSH จะรวมตัวกับ H_2O_2 แล้วถูกเปลี่ยนเป็น Oxidized form และน้ำ โดยอาศัยการทำงานของ GPx[20,21]

ผลการวัดระดับ MDA แสดงให้เห็นว่าเกิด lipid peroxidation ทำให้มี MDA ภายในเซลล์มากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Shafeeq and Mahboob (2019) และ Ogony et al. (2008) โดยการได้รับ 2-4 ดี และการได้รับสัมผัส EtOH ต่างก็มีผลทำให้ระดับ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งกระบวนการเกิด lipid peroxidation จะได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ MDA แล้วยังเกิด 4-hydroxy-2-noenol ขึ้นได้ ซึ่ง

4-hydroxy-2-noenol สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ได้อีกเช่นกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ROS จะเป็นสื่อกลางของความเป็นพิษของ 2,4-D DMA และ EtOH จากข้อมูลการศึกษาต่าง ๆ จะเห็นได้ว่ามีการสร้าง ROS เกิดขึ้น รวมทั้งการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารกลุ่ม Chorophenoxy จะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย และการสร้าง 2,4-D CoA จึงส่งผลต่อการสร้างพลังงานและกลไกที่ต้องใช้พลังงานภายในเซลล์ รวมทั้งพบว่า EtOH สามารถรบกวนโครงสร้างทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ด้วยการละลายไขมันและรบกวนโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์[22] ซึ่งสาเหตุนี้อาจทำให้สาร 2,4-D DMA สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้นจึงส่งผลกระทบต่อเซลล์มากขึ้น รวมทั้งการ metabolism EtOH ในการเปลี่ยน EtOH เป็น Acetaldehyde จะผลิต ROS จำนวนมาก นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่าสาร 2,4-D สามารถถูก metabolized เป็น 2,4-DCP โดยใช้ cytochrome p450 3A4 (CYP3A4)[23] ทั้งนี้ CYP3A4 ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานยังสามารถ metabolism EtOH ได้จึงจะทำให้ผลิต ROS ได้

กรณีที่เซลล์ไม่สามารถสร้างพลังงานได้เซลล์จะสลายกลูโคสเพื่อให้เกิดพลังงานด้วยกระบวนการไกลโคไลซีสซึ่งสารกลุ่ม Chorophenoxy จะยับยั้งกระบวนการสร้าง ATP ทำให้รบกวนกระบวนการไกลโคไลซีส รวมทั้งมีการสร้าง 2,4-D CoA [24] อาจทำให้เกิดการแย่งกันกับ acetyl-CoA เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ซึ่งจะไม่เกิดการสร้างพลังงาน ในกรณีที่ acetyl-CoA คั่งอยู่ในเซลล์มากจะเข้าสู่กระบวนการสร้างคีโตนบอดี้ ซึ่งการมีคีโตนบอดี้ในเซลล์สามารถส่งผลให้เกิด ROS ได้ [25] (รูปที่ 3)



รูปที่ 3. สรุปกลไกการสร้าง ROS ของ 2,4-D DMA และ EtOH

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าเซลล์ HepG2 ที่มีการสัมผัสร่วมของสาร 2,4-D DMA ความเข้มข้นตั้งแต่ 3 mM และ EtOH ความเข้มข้น 200 mM ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ โดยผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นได้ว่ามีการสร้าง Reactive oxygen species เพิ่มขึ้นมากกว่าการได้รับสัมผัสสารเพียงชนิดเดียว รวมทั้งมีการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นมากกว่าการได้รับสัมผัสสารเพียงชนิดเดียวเช่นกัน ได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส การทำงานของเอนไซม์คะตาเลส และการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ตลอดจนการลดลงของปริมาณ รีดิวซ์กลูตาไธโอนและการเพิ่มขึ้นของปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ นอกจากนี้การสัมผัสร่วมของสาร 2,4-D DMA และ EtOH ยังเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการสัมผัสร่วมของสาร 2,4-D DMA และ EtOH มีปฏิกิริยาแบบเสริมฤทธิ์ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลประโยชน์ทับซ้อน

คณะผู้วิจัยขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนใด ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Hiran S, Kumar S. 2,4-D Dichlorophenoxyacetic Acid Poisoning; Case Report and Literature Review. *Asia Pac J Med Toxicol*. 2017; 6(1): 29-33.
2. สำนักงานสถิติแห่งชาติ. การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ.2560, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดีการพิมพ์, 2561: 31-45.
3. Gunness PF. The Effect of 2,4-D on gene expression in cultured cells. (Master's Thesis). Saskatoon: University of Saskatchewan, 2007: i-204.
4. Chen W, Shaw L, Chang P, *et al.* Hepatoprotective effect of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase in vivo and in vitro. *Exp Ther Med* 2016; 11: 1231-8.
5. Abnova. MTT Assay [Video], 2010. Available at https://www.youtube.com/watch?v=vn6enA6lSKs, accessed on April 8, 2020.
6. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22: 27-55.
7. จิราภรณ์ รังผึ้ง, รัชนี คงคาฉุยฉาย, สุจิรา มุกดา และคณะ. ผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะขามหวานและกล้วยไข่ต่อการเกิดพิษจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ประสาทมนุษย์ชนิด SH-SY5Y. *วารสารพิษวิทยาไทย* 2561; 33(2): 63-81.
8. Mahakunakorn P, Tohda M, Murakami Y, *et al.* Effects of Choto-san and Its Related Constituents on Endogenous Antioxidant Systems. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 53-7.
9. Buraphaka H, Putalun W. Stimulation of Health-promoting triterpenids accumulation in *Centella asiatica* (L.) Urban leaves triggered by postharvest application of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. *Ind Crops Prod* 2020; 146: 112171.
10. Adeyemi JA, Martins-junior AC, Barbosa FJ. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in

zebrafish embryos (Danio rerio) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comp Biochem Physiol* 2015; 7–12.

11. Tadee A, Mahakunakorn P, Porasuphatana S. Oxidative stress and genotoxicity of co-exposure of chlorpyrifos and aflatoxin B1 in HepG2 cells. *Toxicol Ind Health* 2020; 1-10.
12. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 366: 43-58.
13. Tuschl H, Schwab C. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(3): 385-93.
14. Zhang Y, Wang C, Yu B, *et al.* Gastrodin Protects against Ethanol-Induced Liver Injury and Apoptosis in HepG2 Cells and Animal Models of Alcoholic Liver Disease. *Biol Pharm Bull* 2018; 41(5): 670-9.
15. Bradberry SM, Watt BE, Proudfoot AT, *et al.* Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: A review. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2000; 38(2): 111–122.
16. Teixeira MC, Telo, JP, Duarte NF, *et al.* The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1101-7.
17. Carrasco D, Carrasco C, Souza-Mello V, *et al.* Effectiveness of antioxidant treatments on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) activity after alcohol exposure in humans and in vitro models: A systematic review. *Int j food prop* 2021; 24: 1300-17.
18. ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. พิษแอลกอฮอล์เชิงชีวเคมี. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 2557; 14(3): 405–30.
19. Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2(4): 191-206.
20. Shafeeq S, Mahboob T. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid induced hepatic and renal toxicological perturbations in rat model: Attenuation by selenium supplementation. *Toxicol Ind Health* 2021; 37(3): 152-63.
21. Ogony J, Matthews R, Anni H, *et al.* The mechanism of elevated toxicity in HepG2 cells due to combined exposure to ethanol and ionizing radiation. *J Appl Toxicol* 2008; 28(3): 345-55.
22. Goldstein DB. Effect of alcohol on cellular membranes. *Ann Emerg Med* 1986; 15(9): 1013-8.
23. Mehmood Z, Williamson MP, Kelly DE, *et al.* Human cytochrome P450 3A4 is involved in the biotransformation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Toxicol Pharmacol* 1996; 2(4): 397-401.
24. Bradberry SM, Vale JA. Chlorophenoxy Herbicides. *Critical Care Toxicology* 2017; 1789–96.
25. Paoli A. Ketogenic diet for obesity: friend or foe? *Int J Environ Res public health* 2014; 11(2): 2092–107.