

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อะฟลาทอกซินและ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (aflatoxin and aflatoxin B₁, AFB₁)

Mycotoxins เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ผลิตขึ้นเพื่อการเจริญงอกงามและแผ่ขยายขนาด ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดเชื้อราและสารพิษนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอน ตั้งแต่ระหว่างการผลิต การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาในคลังสินค้า หรือในขณะลำเลียงเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารทั้งที่เป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ สารพิษจากราที่พบเป็นอันตรายมีหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดจากราในสกุล (genus) *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* (Davis และ Diener, 1987)

AFB₁ จัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีเป็นอันตรายมากต่อมนุษย์และสัตว์ มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตสาร aflatoxin ได้ ดังนี้ *Aspergillus flavus* Link, *A. flavus varcolumnaris* Raper and Fennell, *A. flavus oryzae* Saito, *A. niger* van Tieghem, *A. ostianus* Wehmer, *A. parasiticus*, *A. ruber* Thom and Church และ *A. wentii* Wehmer นอกจากเชื้อรา *Aspergillus* แล้วเชื้อรา *Penicillium* สามารถสร้าง aflatoxin ได้เช่นเดียวกัน เช่น *P. citrinum*, *P. frequenta* Westling, *P. puber* Bainier และ *P. variable* Sopp. เป็นต้น

นอกจากสายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ ที่สามารถผลิตสารพิษ AFB₁ ได้แล้วยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่ถือได้ว่าเป็นปัจจัยในการสร้างสารพิษของเชื้อรา ดังนี้

1. ปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อรา พบว่า *A. flavus* สามารถผลิต aflatoxins ได้แตกต่างกัน Glinsukon, Thamavit และ Ruchirawat (1976) ได้รายงานว่า มีเพียง 80 % ของ *A. flavus* ที่สามารถผลิตสาร aflatoxins ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อตรวจเชื้อ *A. flavus* แต่อาจไม่พบ aflatoxin ปะปนอยู่
2. ปัจจัยเกี่ยวกับอาหารที่เชื้อราใช้ในการเจริญเติบโต โดยปกติเชื้อราจะสร้างเส้นใยและสปอร์เท่านั้นจนกระทั่งปริมาณของธาตุอาหารบางชนิดถูกจำกัดจึงทำให้การเจริญเติบโตในระยะเส้นใยและสปอร์ช้าลง เกิดการสะสมของ pyruvate, malonate, acetate และ amino acid จึงทำให้เกิดการพัฒนาและกระตุ้นให้มีการสร้าง secondary metabolites ขึ้นมีการสังเคราะห์ aflatoxins ขึ้นแทน fatty acid ในกระบวนการ polyketide biosynthesis (Nesbitt, O'Kelly, Sargeant และ Sherid, 1962) โดยแหล่งอาหารที่เชื้อราที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีดังนี้ ธาตุไนโตรเจน, ธาตุคาร์บอน, ธาตุสังกะสีและเกลือแร่บางชนิด

3. ปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดมีผลต่อการสร้าง aflatoxins ของเชื้อรา เช่น *fusarium sp.* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* จะไม่พบสาร aflatoxins (Sauer และ Burronghs, 1980) ขณะที่เชื้อ *Flavobacterium aurantiracum* สามารถทำลาย aflatoxins ได้ (Sargeant, Sheridan, O'Kelley และ Carnaghan, 1961)

4. ปัจจัยเกี่ยวกับสภาพแวดล้อม

- ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศและความชื้นภายในเมล็ดพืช เชื้อราจะเจริญได้น้อย เมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศต่ำกว่า 85% หรือเมื่อในเมล็ดมีความชื้นต่ำกว่า 16% แต่ถ้าเมื่อในอากาศมีความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 85–87% เชื้อราจะมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและสร้าง aflatoxins ได้ (Sauer และ Burronghs, 1980)

- อุณหภูมิ เชื้อราจะเจริญเติบโตและมีการสร้าง aflatoxins ได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส (Shantha และ Murthy, 1981) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราอยู่ในช่วง 29 – 35 องศาเซลเซียส

- แสง แสงแดดมีผลต่อการทำลายการปนเปื้อนของ aflatoxins (Shantha และ Murthy, 1981)

- ค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ราจะสามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่กว้างคือตั้งแต่ 2-8.5 แต่ส่วนใหญ่มักชอบสภาพที่เป็นกรด (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) Buchanan และ Ayres (1976) พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้ในช่วง pH 3.0-8.0 ซึ่ง pH 6 เป็น pH ที่เหมาะสม

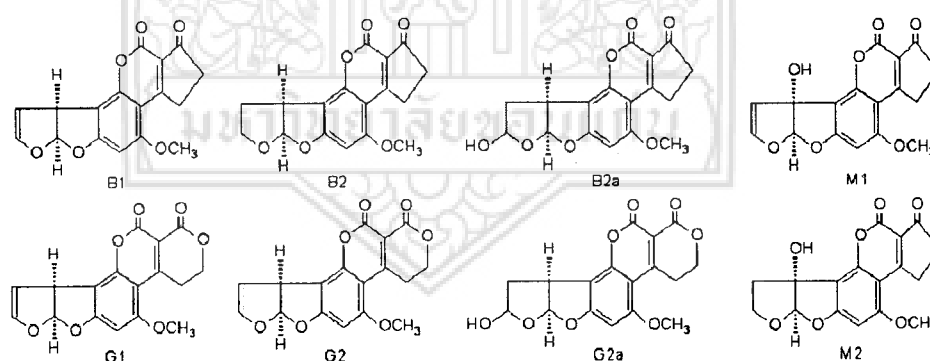
คุณสมบัติทางเคมีของ aflatoxin

Aflatoxin เป็นสารพวก bis – furano – isocoumarin โดยเชื่อมกับ Cyclopentenone สำหรับกลุ่ม aflatoxin B หรือกับ Lactone ring ในกลุ่ม aflatoxin G จึงทำให้มีสาร aflatoxins หลัก อยู่ 4 ชนิด คือ AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ดังภาพที่ 1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของ aflatoxins คือ ทนความร้อนได้สูงที่ประมาณ 250 °C ละลายได้ในน้ำและละลายได้ในสารพวกโพลาไรซ์ได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เบนซีนและอะซิโตน แต่ไม่ละลายในอีเธอร์และปิโตรเลียมอีเธอร์ ไม่ทนต่อสารเคมีพวกแอมโมเนีย เบสแก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถเสื่อมสลายได้ในแสงอุลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมมา ในภาวะเบส lactone ring จะแตกออกจากกันแต่ก็อาจจะกลับคืนสู่โครงสร้างเดิมได้อีก เมื่อภาวะนั้นกลายเป็นกรดหรือกลาง สำหรับการเรืองแสงนั้น จะมีการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 256–365 นาโนเมตร aflatoxin B เรืองแสงสีน้ำเงิน ส่วน aflatoxin G เรืองแสงสีเขียว ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของการเรืองแสงนั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารพิษ aflatoxins ด้วยคุณสมบัตินี้เองที่นำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณของ aflatoxins

AFB₁ และ AFB₂ มีคุณสมบัติที่เฉพาะ คือ มีการเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตแต่โครงสร้างของ aflatoxins ทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกันเพราะ AFB₁ มีพันธะคู่ ส่วน AFB₂ ไม่มีพันธะคู่ในวงแหวนแรกองค์ประกอบต่างๆ ในโครงสร้างของวงแหวนนั้นเหมือนกัน ส่วน AFG₁ และ AFG₂ มีคุณสมบัติในการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตและมีความแตกต่างกันของ aflatoxins ทั้งสองชนิดนี้ที่วงแหวนแรกเนื่องจาก AFG₁ มีพันธะคู่แต่ AFG₂ ไม่มีพันธะคู่ในวงแหวนแรก ทั้ง AFB₁ และ AFG₁ มีความแตกต่างกันตรงที่ AFB₁ ไม่มีกลุ่ม lactone อยู่ในโครงสร้างเหมือน AFG₁ แต่ถ้าเติมหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 2 ของ furan ring ใน AFB₁ และ AFG₁ จะเกิดเป็น AFB_{2a} และ AFG_{2a} ตามลำดับ (ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช, 2540; Steyn และ Stander, 1999)

จากการที่ aflatoxins มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันจึงทำให้ความรุนแรงของการเกิดพิษแตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือ การที่ aflatoxins มีพันธะคู่ใน furan ring และไม่มีกลุ่ม lactone นั้นสามารถทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลันและมะเร็งตับมากกว่า aflatoxins ที่ไม่มีพันธะคู่ และมีกลุ่ม lactone (Wogan, Edwards และ Newberne, 1971)

นอกจาก aflatoxins ทั้ง 6 ชนิดแล้วพบว่ายังมี aflatoxins ชนิดอื่นๆ อีกแต่เป็นสาร metabolites ของ aflatoxins มีดังนี้ aflatoxin GM₁, aflatoxin GM₂, aflatoxin GM_{2a}, aflatoxin H₁, aflatoxin M₁, aflatoxin M₂, aflatoxin M_{2a}, aflatoxin MP₁, aflatoxin P₁, aflatoxin Q₁, aflatoxical I, aflatoxical II, aflatoxin B₁-8,9- dihydrodiol และ Parasitical



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, G_{2a}, M₁ และ M₂ (aflatoxin, 2007)

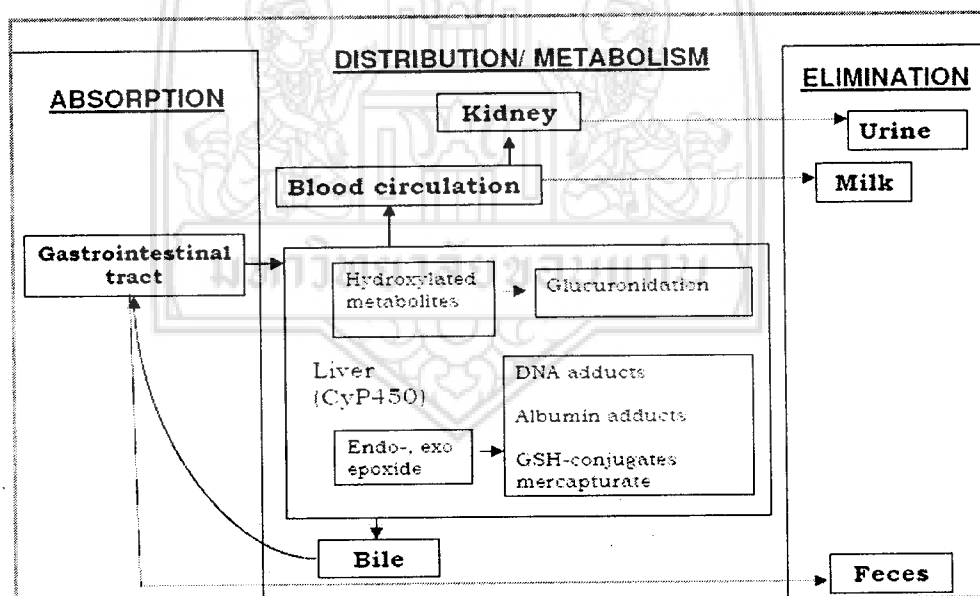
ตารางที่ 1 ชนิดของ aflatoxins สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จุดหลอมเหลว (°C)

ชนิดของอะฟลาทอกซิน	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (°C)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293

(properties of aflatoxin and aflatoxin producing fungi, 2007)

จลนศาสตร์ของ aflatoxins

จลนศาสตร์ของ aflatoxins ประกอบไปด้วย 4 กระบวนการด้วยกันคือ การดูดซึม (absorption) การกระจาย (distribution) การเปลี่ยนแปลงสาร (biotransformation) และการขับออก (elimination) ดังภาพที่ 2



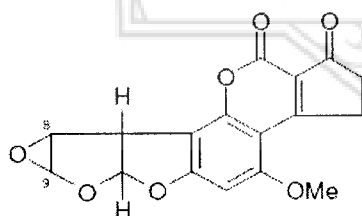
ภาพที่ 2 แสดงจลนศาสตร์ของ aflatoxin (Polychronaki, 2007)

1. การดูดซึม aflatoxins (absorption) โดยส่วนมากแล้วการได้รับสาร aflatoxins จะมาจากการรับประทาน และจากคุณสมบัติของ AFB₁ ที่มีโมเลกุลเล็ก ละลายในไขมันได้ จึงทำให้มี aflatoxins นั้นสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้หลังจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารนี้เข้าไป จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าในสถานะปกติ aflatoxins ถูกดูดซึมได้ถึง 50 % ของอาหารที่มีการปนเปื้อน aflatoxins โดยเฉพาะในส่วนของ duodenal ที่ลำไส้เล็กพบว่าการดูดซึมที่รวดเร็วมาก โดยที่ aflatoxins จะผ่านเยื่อผนังกระเพาะและลำไส้ก่อนด้วยการดูดซึมแบบ passive diffusion ก่อนจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด นอกจากจะมีการดูดซึมแล้ว aflatoxins ยังก่อให้เกิด enterohepatic circulation ได้อีกด้วย

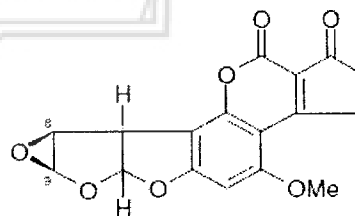
2. การกระจายตัวภายในร่างกาย (distribution) เกิดหลังจากที่ร่างกายดูดซึมสาร aflatoxins เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดแล้ว พบว่า aflatoxins นั้นมีความสามารถสูงมากในการผ่านเข้าสู่เซลล์นำไปสู่การ metabolism และการจับตัวกับ macromolecules ด้วยพันธะ covalent นอกจากเซลล์ตับแล้ว aflatoxins ยังพบการกระจายตัวของสารที่ไตเล็กน้อย ส่วนระบบไหลเวียนเลือดนั้นพบว่า aflatoxins สามารถจับกับพลาสมาโปรตีน (serum albumin) ในกระแสเลือดได้

3. การเปลี่ยนแปลงสารของ aflatoxins (biotransformation) เหมือนกับการเปลี่ยนแปลงสารชนิดอื่น ๆ ก็จะต้องผ่านกระบวนการใน phase I metabolism และ phase II detoxification

Phase I metabolism AFB₁ จะถูกเอนไซม์ cytochrome P450 isoform ที่ 3A4 และ 1A2 เข้าทำปฏิกิริยา oxidation ที่ตำแหน่งพันธะคู่ที่ 8,9 ใน furan ring ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนภาพของสารเป็น 8,9-AFB₁ epoxide โดยส่วนที่เป็น epoxide จะมีด้วยกัน 2 แบบคือ exo และ endo-epoxide ดังภาพที่ 3 เป็น AFB₁-8,9-exo-epoxide และ AFB₁-8,9-endo-epoxide



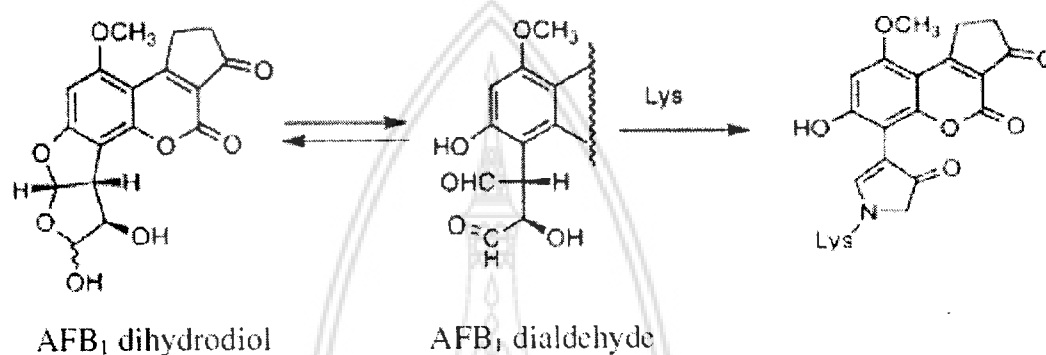
Aflatoxin B₁-8,9-exo-epoxide



Aflatoxin B₁-8,9-endo-epoxide

ภาพที่ 3 Exo และ endo-epoxides ของ AFB₁-8,9-epoxide (Polychronaki, 2007)

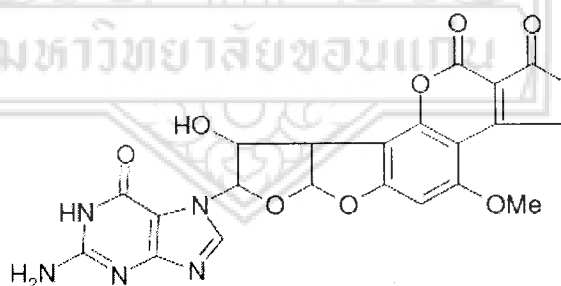
AFB₁ epoxides ไม่มีความคงทนเมื่ออยู่ในน้ำ โดยมีค่าครึ่งชีวิตน้อยกว่า 1 วินาที ที่อุณหภูมิปกติ ค่า pH เป็นกลาง และ non-enzymatically hydrolyse ทำให้มีความคงตัวมากกว่า AFB₁-8,9 dihydrodiol เนื่องจาก AFB₁-8,9 dihydrodiol นั้นมีการเปิดวงแหวนส่งผลต่อการรวมตัวของ dialdehyde phenolate ion ซึ่งช่องว่างนั้นก็จะรวมตัวกับ lysine ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงการทำปฏิกิริยาของ aflatoxin dialdehyde กับ lysine โดยการรวมตัวเป็น

AFB₁-lysine adduct (Polychronaki, 2007)

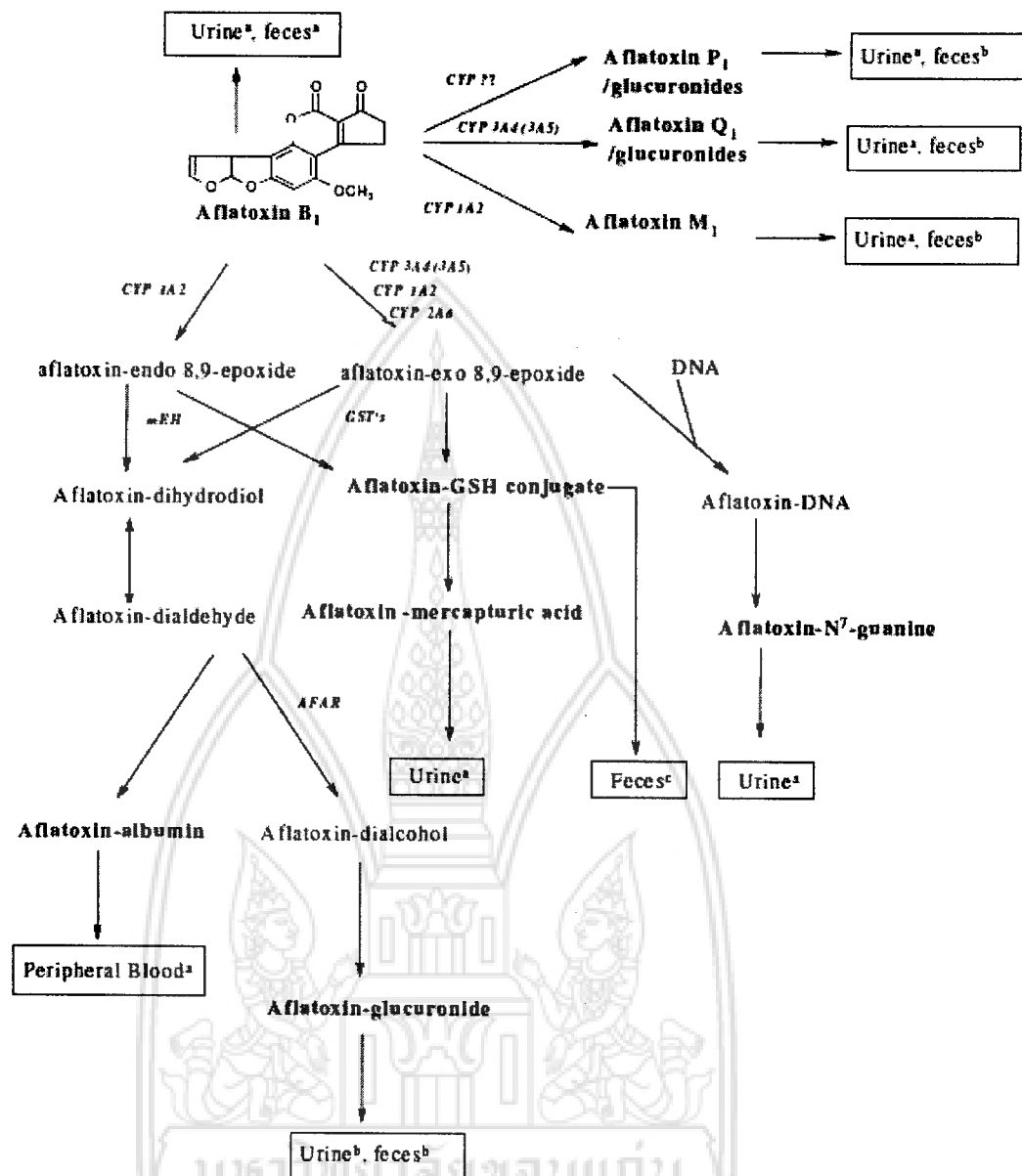
AFB₁ exo-epoxide สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA หรือ guanosine ในบริเวณ double-stranded oligodeoxynucleotides ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA หรือ guanosine ในตำแหน่งที่ N⁷ ของ guanine โดยการจัดกันด้วยพันธะ covalent กับ C8 ของ AFB₁ exo-epoxide ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันเป็น AFB₁-DNA adduct หรือ AFB₁-N⁷-guanine ขึ้น ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดง AFB₁-N⁷-guanine (Polychronaki, 2007)

Phase II detoxification เอนไซม์จะเข้าร่วมตัวกับ hydroxylated metabolites ด้วยกรด glucuronic จึงทำให้อยู่ในภาพของ glucuronide esters ที่สามารถละลายน้ำได้และพร้อมที่จะถูกขับออกมากับปัสสาวะหรือน้ำดีโดย AFB₁ ในตำแหน่ง epoxide นั้นจะเข้าร่วมตัวกับ glutathione (GSH) และถูกขับออกมาทางน้ำดี การเข้าร่วมตัวกันของเอนไซม์กับ AFB₁ นั้นจะถูก catalyze โดย cytosolic glutathione-S transferases (GST) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการลดพิษของ AFB₁ นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation ของ hydroxylated AFB₁ โดย UDP-glucuronyl transferases ก็เป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยในการลดพิษของ AFB₁ และขับออกจากร่างกาย ดังภาพที่ 6 แสดงช่องทางที่ก่อให้เกิดการเมแทบอลิซึมของ AFB₁





a หมายถึง มีหลักฐานการทดลองในมนุษย์ต่อการขับออกของ AFB₁

b หมายถึง หลักฐานการทดลองมีไม่เพียงพอ

c หมายถึง ไม่มีหลักฐานการทดลองในมนุษย์

GST หมายถึง glutathione S-transferases

mEH หมายถึง microsomal epoxide hydrolase

AFAR หมายถึง AFB₁-aldehyde reductase

ภาพที่ 6 กระบวนการเมแทบอลิซึมของ AFB₁ (Polychronaki, 2007)

4. การขับสาร AFB₁ (elimination) ช่องทางการขับสารออกจากร่างกาย มี 3 ช่องทาง ดังนี้ ช่องทางที่หนึ่งการขับออกทางอุจจาระมี 2 แบบ คือ โดยที่สารไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารและอีกแบบคือสารที่ถูกรวมตัวกับเอนไซม์ใน Phase II จะออกมาพร้อมกับน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็กแล้วขับสารออกทางอุจจาระ ช่องทางที่ 2 คือ การขับทางปัสสาวะ โดยพบว่า AFB₁ และสาร metabolites เช่น AFM₁, AFQ₁, AFP₁, AFB₁-N⁷-guanine จะถูกขับออกทางปัสสาวะ ช่องทางสุดท้ายคือ การขับสาร AFB₁ ออกทางน้ำนมในรูปของ AFM₁

ความเป็นพิษของ aflatoxin

การทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลองด้วยวิธี Ames' test โดยใช้ *Salmonella typhimurium* และ เอนไซม์มิกฟังก์ชันออกซิเดสจากตับหนู หรือ supernatant 9,000 g fraction (S-9 fraction) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเลียนแบบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในตัวของสัตว์ที่เสี่ยงถูกด้วยน้ำนม ซึ่งเชื้อ *S. typhimurium* ที่นำมาใช้นั้นคือ สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งจำเป็นต้องมีฮิสติดีนสำหรับการเจริญเติบโต เนื่องจากตัวเชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ฮิสติดีนได้ และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มี aflatoxins พบว่าเชื้อบางส่วนจะกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดิมที่ไม่ต้องการฮิสติดีน คือสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีฮิสติดีน โดยจำนวนโคโลนีของเชื้อที่กลายพันธุ์นั้นจะแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ aflatoxins ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ นอกจากวิธีนี้แล้วยังมีการทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxins โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ อีกเช่น *E. coli*, *Flavobacterium aurantiacum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* และ *Neurospora crassa* มีรายงานว่าเมล็ดพืชที่ชอบขึ้นในน้ำ *Lepidium sativum* จะหยุดการงอกและหยุดการสร้างคลอโรฟิลล์เมื่อให้สาร aflatoxins เซลล์จากรากถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) จะมีภาพร่างโครโมโซมที่ผิดปกติถ้าแช่ในสารละลายที่มี aflatoxin ในฤทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิกต่อเมล็ดฝ้ายต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์ α -amylase จะลดลงเมื่อมี aflatoxin การสังเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อใบเลี้ยงเตงกวาจะถูกยับยั้งโดย aflatoxin

นอกจากนี้เซลล์จากสัตว์เสี่ยงถูกด้วยน้ำนมก็ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxins ด้วยเช่นกัน โดยใช้เซลล์จากไตวัว, เซลล์ตับ, HeLa cells, เซลล์จากตัวอ่อนของไก่หรือเป็ด เซลล์จากไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ของหนู และเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) จากคน พบว่า aflatoxins สามารถยับยั้งการตอบสนองของ lymphocyte ของคนต่อ phytohemagglutinin แสดงว่า aflatoxins สามารถลดการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (ไมตรี สุทธิจิตต์, 2543)

การทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxins ในสัตว์ทดลองนั้นมีทั้งการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง จากตารางที่ 2 เป็นการทดสอบความเป็นพิษของ aflatoxins โดยใช้ลูกเป็ดเป็นสัตว์ทดลอง โดยการวัดระดับความป็นพิษในครั้งนี้ใช้ค่า LD₅₀ ที่เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันโดยนับจากจำนวนของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารพิษในปริมาณหนึ่งแล้วทำ

ให้จำนวนของสัตว์ทดลองลดลงร้อยละ 50 จากจำนวนเริ่มต้น ซึ่งจะบอกถึงปริมาณของ aflatoxins ที่สัตว์ได้รับ จากตารางแสดงให้เห็นว่า ค่า LD_{50} ของลูกเป็ดที่ได้รับ AFB_1 นั้นมีปริมาณสารที่ให้ต่อน้ำหนักตัวน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ AFB_2 , AFG_1 และ AFG_2

ตารางที่ 2 ระดับความเป็นพิษของ aflatoxin

อะฟลาทอกซิน	LD_{50} ลูกเป็ดอายุ (mg/kg น้ำหนักตัว)
B_1	0.36
G_1	0.78
B_2	1.17
G_2	3.45

(ศรีสิทธิ การุณยะวนิช, 2540)

หนูพุก หนูตะเภา หนูแฮมสเตอร์ หมู แกะ วัว และลิง เมื่อได้รับ aflatoxins เข้าไปส่งผลต่อดับ โดยพบว่าเกิดตับอักเสบ เกิดการคั่งของไขมันในเซลล์ตับ มีสภาวะตับแข็ง ท่อน้ำดีมีขนาดใหญ่ผิดปกติ มีเลือดออกในเซลล์ตับและนำไปสู่การตายในที่สุด (ไมตรี สุทนต์, 2543) ในไก่ที่ได้รับ aflatoxins จะมีอาการบวม น้ำ พบจุดไขมันในเซลล์ตับ ตับมีขนาดใหญ่ เซลล์ตับถูกทำลาย เกิดโรคกระดูกอ่อน ผิวหนังถลอก เส้นเลือดฝอยเปราะส่งผลให้เกิดเลือดออกตามอวัยวะภายใน ส่วนในสุกรพบว่าเกิดการแท้ง ดีซ่าน โลหิตจาง ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง และมะเร็งตับ เมื่อศึกษาในโคจะพบ fibrosis ในตับ เส้นเลือดฝอยเปราะ

จากผลการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทำให้สามารถจัดให้ AFB_1 เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (มาลินี ลิ้มโกศา, 2527) โดยพบว่า aflatoxins นั้นจะมีความเป็นพิษต่อดับทำให้เกิดโรคตับอักเสบรุนแรงในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งคนและยังทำให้เกิดมะเร็งตับได้ พบว่าในสัตว์แต่ละชนิดนั้นจะแสดงอาการที่บ่งบอกการได้รับ aflatoxins และความไวต่อ aflatoxins ที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ อายุของสัตว์ รวมทั้งสภาพแวดล้อมและปริมาณของ aflatoxins ที่ได้รับ ความไวต่อการเกิดพิษของ aflatoxins ในสัตว์เรียงจากมากไปน้อย พบว่าในสัตว์ปีก เช่น เป็ด ไก่ ไก่วง มีความไวต่อ aflatoxins มากที่สุด รองลงมาคือ สุกร สุนัข ปลาเรนโบว์เทราท์ หนู และคน ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นจะมีความไวต่อการเกิดพิษของ aflatoxins น้อยกว่าสัตว์อื่น ยกเว้นในลูกสัตว์ซึ่งจะมีความไวต่อสารพิษ aflatoxins มากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัย (เบญจมาศ มโหสถนันท์, 2539)

การเกิดพิษของ aflatoxins ในคน International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้ AFB₁ อยู่ใน Class 1 ที่ถือว่าเป็นสารที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ในคน หากมีการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน aflatoxins อย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดการสะสมของไขมันในตับ ลักษณะของตับจะเปลี่ยนไปจากเดิม คือ จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองแดง เกิดภาวะตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ และมะเร็งตับซึ่งจะนำไปสู่การตายในที่สุด (อรุณศรี วงษ์อุไร, 2540; สุรสิทธิ์ รอดทอง, 2538) นอกจากนี้จะมีความเป็นพิษต่อดับแล้ว aflatoxins ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย aflatoxins สามารถผ่านจากมารดาสู่ทารกในครรภ์ได้ผ่านทางรกพบทั้งคนและสัตว์ ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อตัวอ่อนในครรภ์เนื่องจาก aflatoxins ได้ เช่น การตายในครรภ์ การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ การเกิดทารกวิรูป และการเกิดเนื้องอกในตัวอ่อน (มุกดา ศรีสกุล, 2536) อาการพิษเฉียบพลันเนื่องจาก aflatoxins มักจะเกิดขึ้นในเด็ก อาการพิษเรื้อรังนั้นจะพบการคั่งของไขมันในตับ ตับอักเสบและเกิด fibrosis ในตับ ตับแข็งและมะเร็งตับ ซึ่งการเกิดพิษแบบเรื้อรังนั้นจะเกิดจากการสะสมพิษของ aflatoxins เป็นระยะเวลานาน (ไมตรี สุทธจิตต์, 2543; Sutabhaha, Suttajit และ Niyomca, 1992)

มีรายงานการเกิดพิษจาก aflatoxins ในประเทศไทยโดยส่วนมากแล้วมักจะพบในเด็ก ซึ่งมีรายงานการตายของเด็กทุกปีเนื่องจากผลของสารพิษ aflatoxins (Hayes, 1992) ตัวอย่างการเกิดพิษของ aflatoxins เมื่อปี พ.ศ. 2511 มีรายงานการป่วยของเด็กอายุ 1-7 ปี ที่จังหวัดอุดรธานี พบว่าเด็กที่มีร่างกายแข็งแรงมีอาการป่วยอย่างเฉียบพลัน เริ่มจากการมีไข้ ชักและไม่รู้สีกตัว อาการทรุดลงอย่างรวดเร็วและถึงแก่ความตายภายใน 48-72 ชั่วโมง จากการชันสูตรเด็กที่เสียชีวิตพบว่าสมองบวม ตับโต ต่อม้ำเหลืองบวม ไตและกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ พบ aflatoxins และ metabolite ของ aflatoxins ในอวัยวะต่างๆ ของเด็ก (สุรสิทธิ์ รอดทอง, 2538) ซึ่งมีอาการคล้ายกับอาการของโรคไรย์ (Reye's syndrome) ซึ่งโรคไรย์นั้นเป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดขึ้นในเด็กก่อนวัยรุ่น คือ จะมีอาการปวดท้อง ตัวร้อน อาเจียน มักถึงแก่ชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง จากการชันสูตรศพพบว่ามีลักษณะสมองบวม ไขมันแทรกระหว่างเซลล์ของอวัยวะต่างๆ มีเลือดออกเป็นจุด มีรายงานครั้งแรกในจังหวัดอุดรธานี จึงเรียกโรคนี้ว่า Udom encephalopathy ซึ่งคล้ายกับอาการโรคไรย์ จากการตรวจสอบหาสาเหตุพบว่าเด็กรับประทานข้าวเหนียวหนึ่งที่ค้างหลายวันและมีเชื้อราหลายสายพันธุ์ปนเปื้อน เมื่อนำอวัยวะของเด็กมาตรวจก็พบ aflatoxins ในปริมาณที่สูง (ทิพยา ปาณะโตะชะ, ศิริวรรณ เอี่ยมรุ่งโรจน์, วารุณี แสนสุภา และทรงพล รัตนพันธุ์, 2530) นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดมะเร็งตับและตายเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของ aflatoxins ในจังหวัดราชบุรี และนครปฐม (Shank, Bhamarapravati, Gordon และ Wogan, 1972) นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับ AFB₁ ในขณะที่เป็นโรคไวรัสตับอักเสบจะทำให้มีความเสี่ยงจากการเป็นมะเร็งตับมากขึ้น ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Groopman และ Kensler (2005)

การลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจาก aflatoxins

1. วิธีการทางกายภาพ

- การคัดเลือกเมล็ดพืช
- การให้ความร้อน พบว่าการให้ความร้อนนั้นสามารถลดการปนเปื้อนจาก aflatoxins ได้มากถึง 70% เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนในความดันปกติที่ลดการปนเปื้อนได้เพียง 50% และการใช้ความร้อนที่ 260 °C ในระยะเวลาที่นานนั้นสามารถทำลาย aflatoxins ได้แต่ก็ทำลายสารอาหารต่างๆ ในอาหารนั้นด้วย
- การใช้แสงอัลตราไวโอเลต จากคุณสมบัติการเรืองแสงของ aflatoxins จึงนำวิธีนี้มาใช้เพื่อตรวจหา aflatoxins ในผลิตภัณฑ์โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตบนเมล็ดและคัดเลือกเมล็ดที่เรืองแสงสีเขียวหรือสีฟ้าออก
- การฉายรังสี gamma-rays ที่ความเข้ม 5-10 Mrad สามารถลดการปนเปื้อน aflatoxins ได้
- แสงแดด พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของ aflatoxins ได้ โดยให้ผลิตภัณฑ์สัมผัสกับแสงแดดที่ความเข้มของแสงประมาณ 50000 lux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะสามารถทำลาย aflatoxins ได้หมด (Shantha และ Murthy, 1981)

2. วิธีการทางชีววิทยาโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์

- การใช้ steroid-hydroxylating fungi และ *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถลดพิษของ aflatoxins และ ochratoxin A โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษได้ (Erber และ Roxas, 1995; Devegowda, Raju, Afzali และ Swamy, 1998)
- การใช้ *Rhizopus oligosporus* คุยฉี ณะะบริพัฒน์, พนอ รวยสูงเนิน และ สายชล นุชน้อง (2539) พบว่าถั่วเหลืองหนึ่งที่เติมสปอร์ของ *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งการสร้าง aflatoxins ของรา *A. parasiticus* ได้ กนิษฐา สังคะหะ (2536) พบว่าราสายพันธุ์ *Rhizopus* sp.-F135, *Rhycomycetes* group-F135 และ *Trichoderma* sp.-ES 136 มีประสิทธิภาพในการลดและสลาย aflatoxins
- การใช้ *Flavobacterium aurantiacum* 7.0×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรสามารถดูดซับ AFM₁ ที่ปนเปื้อนในน้ำมัน 9.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Lillehoj, Stubblefield, Shannon และ Shotwell, 1971; Doyle, Applebaum, Brackett และ Marth, 1982)

- การใช้ lactic acid bacteria สามารถดูดซับ AFM₁ ที่ปนเปื้อนใน phosphate buffered saline (PBS) ได้ (Pierides, El-Nezami, Peltonen, Salminen และ Ahokas, 2000)

3. วิธีทางเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการลดการปนเปื้อน aflatoxins มีดังนี้ acetic acid, ammonia gas หรือ ammonium salts 3-5%, calcium hydroxide, formaldehyde, hydrogen peroxide, methylamine, ozone gas, phosphoric acid, phosphine gas, sodium bicarbonate, sodium bisulfate, sodium bisulfate, sodium hypochlorite สารเคมีเหล่านี้สามารถลดหรือทำลาย aflatoxins ได้โดยการเพิ่มพันธะคู่เข้าไปในส่วนที่เป็น furan ring เดิมออกซิเจนเข้าไปเพื่อเปลี่ยนเป็น phenol และเปิด lactone ring ออก สำหรับสารที่เป็นกรดนั้นจะเปลี่ยน aflatoxins B และ G ให้เป็นอนุพันธ์ 2-hydroxy

4. การใช้ผลิตภัณฑ์ดูดซับสาร aflatoxins

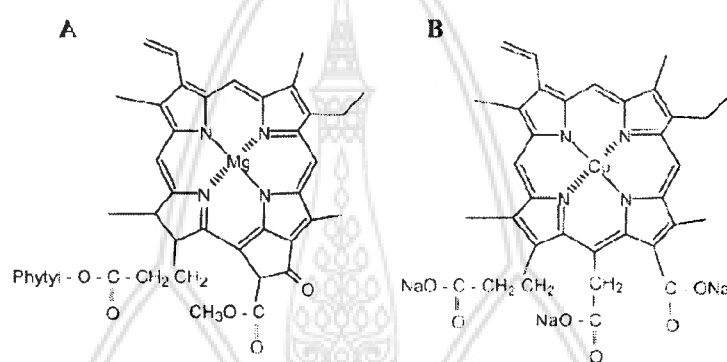
- aluminosilicate หรือ hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) สารกลุ่มนี้มีผิวหน้าที่ดูดซับสารโมเลกุลอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่ได้และสามารถแลกเปลี่ยนประจุบวกกับสารอื่นๆ ที่ตำแหน่ง active site โดยการสร้างพันธะโคเวเลนต์ สามารถขับออกมากับระบบขับถ่ายได้

- Mannan oligosaccharide (MOS) เป็นสารสกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannan oligosaccharide) ได้แก่ กลูโคแมนแนน (glucomannan) มีคุณสมบัติในการจับตัวกับสารพิษจากรา สารดังกล่าวได้แก่ Mycosorb หรือ Bio-Mos ซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Devegowda, Raju, Afzali และ Swamy, 1998)

- activated charcoal เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสูงและมีช่องว่างภายในพองถ่านอยู่จำนวนมาก ซึ่งมีมากถึง 500-3500 ตารางเมตรต่อกรัม จึงทำให้มีความสามารถในการดูดซับ aflatoxins สูงด้วยเช่นกัน นอกจากจะดูดซับสารพิษแล้ว activated charcoal ยังดูดซับเอาสารอาหารที่มีประโยชน์ไปด้วย (Huwig, Freimund, Käppeli และ Dutler, 2001)

2.2 คลอโรฟิลลิน (chlorophyllin)

คลอโรฟิลลินเป็นสารอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์แบบ semi-synthetic ของ sodium copper salts จากคลอโรฟิลล์โดยในระหว่างการสังเคราะห์อนุพันธ์ อะตอมของแมกนีเซียมที่อยู่ตรงกลางของวงแหวน porphyrin จะถูกแทนที่ด้วยทองแดงและในส่วน phytol tail ที่ปกติจะพบในสูตรโครงสร้างของคลอโรฟิลล์จะหายไปดังภาพที่ 7 จึงทำให้คลอโรฟิลลินมีคุณสมบัติของการละลายน้ำได้



ภาพที่ 7 โครงสร้างของ (A) คลอโรฟิลล์และ (B) คลอโรฟิลลิน (De Vogel, Jonker-Termont, Katan และ Van der Meer 2005)

ส่วนประกอบของคลอโรฟิลลินพบว่ามียังประกอบ 3 ส่วนด้วยกัน คือ Cu(II) chlorin e₆, Cu(II) chlorin e₄ และ Cu(II) chlorin ethyl ester derivatives ซึ่งในแพทย์ทางเลือกได้มีการนำคลอโรฟิลล์และคลอโรฟิลลินมาใช้ในการรักษาโรค ดังนี้ (พรทิพย์ ประสงค์หอม, 2007)

1. กำจัดกลิ่นที่เกิดจากอวัยวะภายในร่างกาย มีการใช้คลอโรฟิลลินชนิดทาบานแผลเพื่อกลบกลิ่นเหม็นจากบาดแผลมาตั้งแต่ช่วงค.ศ.1940-1950 และต่อมาก็มีการนำมารับประทานในผู้ป่วยที่ทำ colostomies และ ileostomies เพื่อกลบกลิ่นอุจจาระมี case report ถึงการใช้ในอาการแสดงออกของโรคนี้ โดยขนาดของคลอโรฟิลลินที่ใช้เพื่อกลบกลิ่นอุจจาระในผู้ป่วย ostomy คือ 100-200 มิลลิกรัมต่อวัน นอกจากนี้ยังมีการใช้คลอโรฟิลลินในผู้ป่วยที่มีภาวะ trimethylaminuria (ผู้ป่วยที่มีการขับ trimethylamine ซึ่งมีกลิ่นคาวปลาออกจากร่างกาย) ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น 7 คน ที่มีภาวะดังกล่าว พบว่า การให้คลอโรฟิลลิน 60 มิลลิกรัมรับประทาน 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถลดระดับ trimethylamine ในปัสสาวะได้อย่างมีนัยสำคัญ (Yamazaki และคณะ, 2004)

2. ช่วยในการรักษาบาดแผล มีการวิจัยพบว่าสารละลายคลอโรฟิลลินสามารถชะลอการเจริญของ anaerobic bacteria ในหลอดทดลองได้ และสามารถเร่งการหายของแผลในสัตว์ทดลองได้ จึงมีการนำคลอโรฟิลลินไปใช้เป็นยาภายนอกในรูปแบบสารละลายและครีมในผู้ป่วยที่มีแผลเปิดเป็นระยะเวลานาน ในผู้ป่วยที่มีแผลหายช้า เช่น มี vascular ulcers และ pressure (decubitus) ulcers พบว่า การทาคลอโรฟิลลินสามารถช่วยให้แผลหายได้ดีกว่าการรักษาปกติ ต่อมาได้มีการเติมคลอโรฟิลลินลงไปใน papain และครีมที่มี urea เป็นส่วนประกอบในการลดการอักเสบเฉพาะที่ ช่วยให้แผลหายเร็วและกลบกลิ่นที่เกิดจากบาดแผล

3. รักษาอาการท้องผูก มีการใช้คลอโรฟิลลินในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น อาการท้องผูก ทำให้ระบบขับถ่ายดีขึ้นด้วย โดยการศึกษาในผู้ป่วยสูงอายุ 62 คนที่อยู่ในสถานพักฟื้น พบว่าคลอโรฟิลลินมีประสิทธิภาพในการช่วยควบคุมกลืนอุจจาระและระบบขับถ่ายของร่างกายให้ดีขึ้นในภาวะท้องผูกเรื้อรัง และยังช่วยลดอาการแน่นท้องได้ด้วย ซึ่งในการศึกษานี้ไม่พบความเป็นพิษหรือภาวะความเจ็บป่วยอื่นใด

4. ช่วยลดพิษหรืออาการข้างเคียงจากยาบางชนิดได้ ยารักษามะเร็งเป็นอีกแหล่งหนึ่งของอนุมูลอิสระที่จะไปทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายและก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เกิดจากยาได้ และจากฤทธิ์ในด้าน antimutagenic ของคลอโรฟิลลินจึงได้มีการนำมาใช้เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากยา cyclophosphamide โดยมีการศึกษาในหนูถีบจักรถึงประสิทธิภาพของคลอโรฟิลลินในการลดผลข้างเคียงของ cyclophosphamide และศึกษาว่าคลอโรฟิลลินรบกวนประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของ cyclophosphamide หรือไม่ โดยให้คลอโรฟิลลินผสมในน้ำดื่ม (1%) 2 วัน หรือให้โดยการป้อน (200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) 2 ชั่วโมงก่อนการรักษาด้วย cyclophosphamide (220 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ผลพบว่าผลข้างเคียงของ cyclophosphamide ที่เกี่ยวกับระบบทางเดินปัสสาวะและการกดไขกระดูกนั้นลดลงในทั้ง 2 กลุ่ม ในขณะที่ประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านมะเร็งไม่ได้ลดลงเมื่อใช้คลอโรฟิลลิน ดังนั้นคลอโรฟิลลินจึงให้ผลดีเมื่อใช้ร่วมกับการรักษาด้วย cyclophosphamide

5. รักษาภาวะนิ่วชนิด calcium oxalate stone ได้มีการศึกษาใน *in vitro* เกี่ยวกับคลอโรฟิลลินในรูปสารละลายความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในปัสสาวะปกติจะยับยั้งการเกิดผลึกและยับยั้งการโตของผลึก calcium oxalate dehydrate ได้เมื่อเปรียบเทียบกับผลก่อนการทดลอง จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าอาหารและยาที่มีส่วนประกอบของคลอโรฟิลลินอาจช่วยในการรักษา calcium oxalate stone disease ได้

6. ลดอาการของ rhinitis, otitis externa และ otitis media ได้ คลอโรฟิลลินสามารถยับยั้งเชื้อในระบบ otolaryngology ได้ โดยมีการศึกษาในผู้ป่วยที่มีอาการหวัด หรือ acute rhinitis

และ rhinosinusitis 100 คน พบว่าคลอโรฟิลล์สามารถใช้รักษาการติดเชื้อและการอักเสบบริเวณหูชั้นในแบบเรื้อรังได้

7. กระตุ้นการสร้างเลือดในผู้ป่วยโลหิตจางได้ คลอโรฟิลล์ช่วยกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินที่มีออกซิเจนอยู่และสามารถนำไปสร้างพลังงานให้ร่างกายได้ นักวิทยาศาสตร์ได้พบข้อมูลจากการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ iron-deficiency anemia ว่าถ้าหากผู้ป่วยได้รับธาตุเหล็กและคลอโรฟิลล์ในการรักษาร่วมกัน ซึ่งจะทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงและระดับฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นเร็วกว่าการใช้อย่างใดอย่างหนึ่งและในการศึกษาในสัตว์ทดลองทำให้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ตั้งสมมติฐานว่าคลอโรฟิลล์สามารถสร้างเลือดได้โดยเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นไขกระดูก

8. ใช้ในการรักษาผู้ป่วย leucopenia โดยให้ผลการรักษาและมีความปลอดภัยในการใช้แต่การศึกษานี้เป็นการทดลองในระยะสั้นใช้เวลาการทดลอง 1 เดือน อาจต้องมีการทำการศึกษาในระยะยาวเพิ่มเติมเพื่อดูความปลอดภัยจากการใช้ในระยะยาว (Gao และ Hu, 2005)

จากการศึกษาถึงประโยชน์ของคลอโรฟิลลินนอกจากนำมาใช้ในแพทย์ทางเลือกแล้ว พบว่ามีการนำคลอโรฟิลลินมาใช้เพื่อเป็นสารต่อต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) ต่อต้านการเป็นพิษต่อยีน (antigenotoxic) และต่อต้านการเกิดมะเร็ง (anticarcinogenic) โดย Warner, Nath และ Ong (1991) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ ด้วยวิธี arabinose-resistant Salmonella forward mutation assay โดยใช้ AFB₁, 2-aminoanthracene (2AA), benzo[a]pyrene (BaP), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และสารละลายที่ใช้ในการสกัดฝุ่นถ่านหิน (solvent extracts of coal dust, CD), อนุภาคของน้ำมันดีเซลที่ถูกปล่อยออกมา (diesel emission particles, DE), อนุภาคในอากาศ (airborne particles, AP), ควันบุหรี่ (tobacco snuff, TS), พริกไทยดำ (black pepper, BP) และไวน์แดง (red wine, RW) เป็นสารทดสอบ จากผลการศึกษาพบว่าถ้าใช้คลอโรฟิลลินที่ความเข้มข้น 1.25-5 มิลลิกรัมต่อเพลท สามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารเหล่านี้ได้มากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

มีการศึกษาพบกลไกการทำงานของคลอโรฟิลลินมี 4 กลไก (Ferruzzi และ Blakeslee, 2007) ได้แก่

1. Antioxidant จากสารประกอบ Cu(II) chlorin e4 ที่มีในคลอโรฟิลลิน โดยให้อิเลคตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Lanfer-Marquez, Barros และ Sinnecker, 2005) ช่วยป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ในไมโทคอนเดรียและไมโครโซม

2. ดักจับสารก่อกลายพันธุ์ โดยการรวมตัวกับสารก่อกลายพันธุ์ ในส่วนที่เป็น porphyrin carboxyl groups และผิวหน้าสัมผัส (Dashwood และคณะ, 1998; Pietrzak, Wieczorek, Wieczorek และ Darzynkiewicz, 2006)

3. ลดกระบวนการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 และเพิ่มการทำงานของ Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) ที่เป็นเอนไซม์ใน phase II (Fahey และคณะ, 2005)

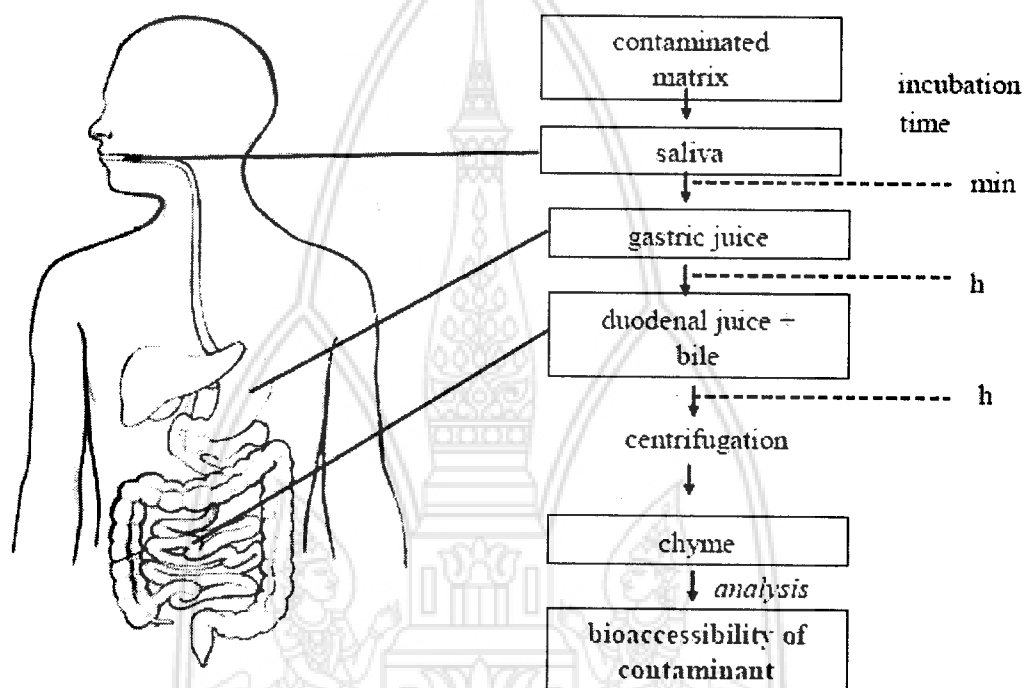
4. เหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง โดยใช้กลไกที่คล้ายคลึงกับ caspase-8, caspase-3 และ poly(ADP-ribose) polymerase (Díaz, Li และ Dashwood, 2003)

การศึกษาถึงประสิทธิภาพของคลอโรฟิลลินที่มีต่อสารพิษ AFB₁ นั้นได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาของ Breinholt และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงการใช้คลอโรฟิลลินเพื่อป้องกันจากการได้รับ AFB₁ ในปลาเทราท์ โดยให้ปลาเทราท์ที่ได้รับ AFB₁ จากการเติมลงในอ่างเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 0.1 ppm พบว่าปลาเทราท์ที่ได้รับ AFB₁ ร่วมกับคลอโรฟิลลิน 500 ppm นั้นสามารถลดการรวมตัวของ AFB₁ กับ DNA ได้ถึงร้อยละ 95 และยังลดการเกิดมะเร็งตับจากร้อยละ 20.5 เหลือร้อยละ 2 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ AFB₁ อย่างเดียว นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าเมื่อให้คลอโรฟิลลินที่มีความเข้มข้น 4000 ppm ก่อนได้รับ AFB₁ 7 วัน นั้นไม่มีผลต่อการรวมตัวของ AFB₁ กับ DNA และการเกิดมะเร็ง มีการศึกษาถึงการฉีดคลอโรฟิลลินร่วมกับ AFB₁ ในเอ็มบริโอปลาเทราท์ของ Dashwood และคณะ (1998) พบว่าคลอโรฟิลลินสามารถลดการรวมตัวของ AFB₁ กับ DNA ได้หลังจากการฉีด 2 สัปดาห์ และลดการเกิดมะเร็งตับได้หลังฉีด 1 ปี

จากการศึกษาของ Mata และคณะ (2004) ที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพของคลอโรฟิลลินต่อการเคลื่อนที่ของ dibenzo(a,l) pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, และ AFB₁ ผ่าน Caco-2 cell monolayers พบว่ากลไกการทำงานของคลอโรฟิลลินนั้นเหมือนกับ interceptor molecule โดยจะเข้าไปลดการดูดซึมของ AFB₁ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Egner และคณะ (2001; 2003) ที่ศึกษาประชากรในประเทศจีน โดยทำการทดลองแบบปิดสองทางกับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีกลุ่มหนึ่งในประเทศจีน โดยอาสาสมัครกลุ่มนี้มีสภาวะแวดล้อมของการกินอยู่ตามแบบปกติ ซึ่งพบว่ามีอัตราการตายในวัยผู้ใหญ่ 1 ใน 10 คนเกิดจากโรคมะเร็งตับโดยน่าจะสัมพันธ์กับอาหารที่ได้รับประจำวัน จึงทำการทดลองให้อาสาสมัครได้รับประทานคลอโรฟิลลินในขนาด 100 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 4 เดือน ผลพบว่ามีการทำลายของ DNA จากการวัด AFB₁-DNA adduct หรือ AFB₁-N⁷-guanine ลดลงมากกว่าร้อยละ 50 จากการตรวจความเสียหายที่เกิดจาก AFB₁ นั้นสัมพันธ์กับการได้รับสาร AFB₁ เมื่อเทียบกับกลุ่มยาหลอก โดยคณะผู้วิจัยคาดว่าคลอโรฟิลลินน่าจะมีผลยับยั้งการดูดซึม AFB₁ โดยน่าจะเกิดการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารก่อมะเร็งกับบริเวณ planar unsaturated cyclic ring ของคลอโรฟิลลิน

2.3 แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro digestion*)

แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองนั้นได้ถูกประยุกต์ขึ้นเพื่อเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ทั้งในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อย อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะให้ความสำคัญกับส่วนที่เป็นของเหลวต่างๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น น้ำลาย น้ำย่อย ค่าความเป็นกรด-เบส และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหาร

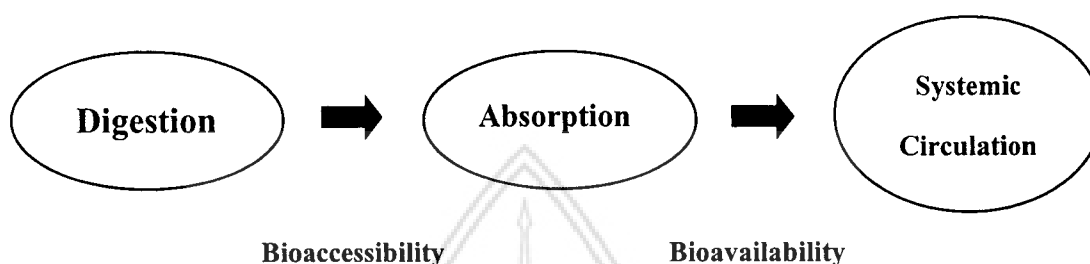


ภาพที่ 8 การเปรียบเทียบขั้นตอนที่เกิดขึ้นในทางเดินอาหารของมนุษย์และแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง

เนื่องจากการประยุกต์ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เพื่อใช้ในการทดลองจึงสามารถนำแบบจำลองนี้มาศึกษาเพื่อคาดการณ์ถึงปริมาณของสารต่าง ๆ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก matrix ใดๆ เช่น อาหาร ดิน ฯลฯ (bioaccessibility) ในทางเดินอาหารมนุษย์ โดยสารที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้นมีระยะการเกิดก่อนที่ลำไส้จะดูดซึมสารเข้าสู่ร่างกาย หรือ การเกิดชีวอนุเคราะห์ (bioavailability) ซึ่งการเกิดชีวอนุเคราะห์ นั้นจะต้องประกอบไปด้วย 3 ส่วนที่สำคัญด้วยกัน คือ

1. การปลดปล่อยสารต่าง ๆ จาก matrix ใดๆ เช่น อาหาร ดิน ฯลฯ สู่ลำไส้ในระบบทางเดินอาหารหรือ bioaccessibility

2. การเคลื่อนที่ของสารผ่านผนังลำไส้เล็ก และเข้าสู่เส้นเลือด *vena Portae*
3. การเกิดเมทาบอลิซึม

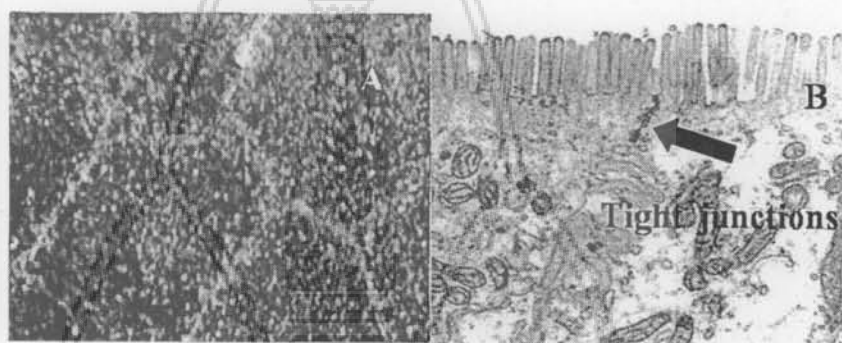


ภาพที่ 9 ระยะของการเกิด bioaccessibility และ bioavailability

จากที่การปลดปล่อยสารต่างๆ นั้นสามารถนำไปคาดการณ์ถึงการเกิดชีวอนุเคราะห์ของสารเหล่านั้นได้ จึงทำให้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่ทำการศึกษาถึงการปลดปล่อยของสารอันตรายต่างๆ ที่มีอยู่ในดิน เช่น การศึกษาของ Oomen และคณะ (2003) ถึงการพัฒนาแบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองสำหรับการประเมินการปลดปล่อยของสารปนเปื้อนในดิน ส่วน Chan และคณะ(2007) ทำการศึกษาถึงชีวอนุเคราะห์และการปลดปล่อยแคดเมียม โดยการใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองและการเคลื่อนที่ของสารผ่านผนังลำไส้เล็ก (intestinal epithelial monolayers) เปรียบเทียบกับข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลอง เป็นต้น นอกจากการศึกษาถึงการปลดปล่อยสารต่างๆ ในดินแล้วมีการนำแบบจำลองนี้ไปศึกษาถึงการปลดปล่อยสารต่างๆ ทั้งที่มีประโยชน์และมีอันตรายต่อร่างกายในอาหาร เช่น Xing และคณะ (2008) ถึงการปลดปล่อยของ polychlorinated biphenyls จากปลาน้ำจืดและผัก Liu และคณะ (2004) ศึกษาถึงการประเมินชีวอนุเคราะห์ของ carotenoid ในอาหาร โดยประยุกต์แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลองร่วมกับแบบจำลองการเคลื่อนที่ของสารผ่านผนังลำไส้เล็ก (Caco-2 cell)

2.4 แบบจำลองการเคลื่อนที่ของสารผ่านผนังลำไส้เล็ก (Caco-2)

Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human epithelial colorectal adenocarcinoma cell) พบว่ามีการทำงานและมีลักษณะพื้นฐานวิทยาเหมือนกับเซลล์ผนังลำไส้เล็ก กล่าวคือ เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองให้มีลักษณะเหมือนเซลล์ผนังลำไส้เล็กที่มี brush border หรือ microvilli ในด้าน apical มี tight junction เชื่อมระหว่างเซลล์ มีการแสดงออกถึงลักษณะการทำงานของเอนไซม์ hydrolase, sucrase-isomaltase, lactase, aminopeptidases, เอนไซม์ใน phase 1 และ phase 2 รวมทั้งมีตัวช่วยเคลื่อนย้ายสาร (transporter) ที่เหมือนกับผนังลำไส้เล็กในด้าน apical ซึ่งลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ได้แสดงไว้ดังภาพที่ 10 และตารางที่ 3



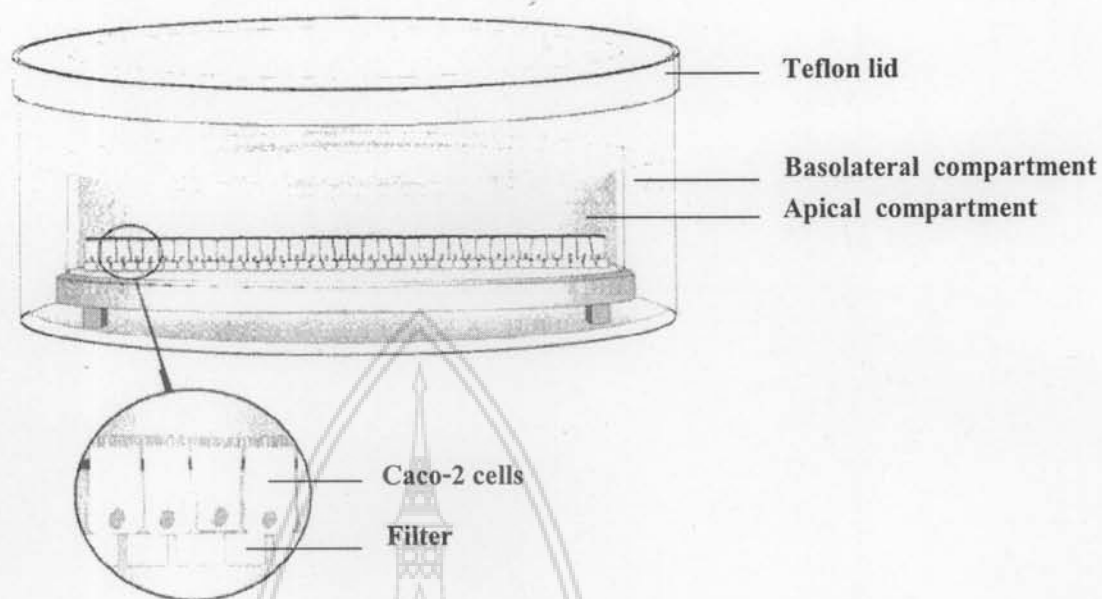
ภาพที่ 10 ลักษณะพื้นฐานของเซลล์ Caco-2 (A) ภาพถ่ายด้านบน (B) ภาพถ่ายด้านตัดขวาง พร้อมแสดงตำแหน่งของ tight junction (Sun, Zhao, Wang, Li, N. และ Li, J.S. 2003; Hubatsch, Ragnarsson และ Artursson, 2007)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเซลล์ Caco-2

เซลล์ต้นกำเนิด	Human colorectal adenocarcinoma
ลักษณะการเติบโต	Monolayer epithelial cells
การเปลี่ยนแปลง (Differentiation)	14-21 วันหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology)	Polarised cells, tight junctions และ apical brush border
Active transport	Amino acids, sugars, vitamins, hormones
Membrane ionic transport	Na^+/K^+ ATPase, H^+/K^+ ATPase, Na^+/H^+ exchange, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transport, apical Cl^- channels
Membrane non-ionic transporters	Permeability-glycoprotein, multidrug resistant associated protein, lung cancer associated resistance protein
Receptors	Vitamin B12, vitamin D3, epidermal growth factor, sugar transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT5, GLUT2, SGLT1)
เอนไซม์	Typical membranous peptidases and disaccharidases of the small intestine

(Le Ferrec และคณะ, 2001)

จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้นักวิจัยหลายท่านนำเซลล์ Caco-2 มาศึกษาถึงกลไกการเคลื่อนที่เข้า - ออกของสารและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของสาร หากต้องการทราบถึงความสามารถของสารนั้นๆ จะถูกดูดซึมเข้าได้มากเพียงใด ให้นำสารนั้นใส่ลงไปในด้านที่เป็น apical สารจะถูกดูดซึมผ่านจากด้าน apical ไปสู่ basolateral ทาง microporous filter จากนั้นนำสารละลายที่อยู่ในด้าน basolateral ไปวัดเพื่อหาระดับปริมาณของสาร นอกจากจะวัดถึงการดูดซึมเข้าของสารแล้วยังสามารถวัดถึงระดับของสารที่มีการถูกดูดซึมออกได้อีกด้วยโดยใช้วิธีการที่คล้ายคลึงกับเพียงเปลี่ยนจากด้านที่เป็น apical มาเป็นด้าน basolateral แทน



ภาพที่ 11 การเลี้ยงเซลล์ Caco-2 บนเฟลท แบบ transwell แสดงด้าน apical และ basolateral (Oomen และคณะ, 2001)

เนื่องจากเป็นรูปแบบการทดลองที่ใช้เพื่อการคาดการณ์ถึงปริมาณสารที่ร่างกายได้รับ จึงต้องมีสูตรในการคำนวณเพื่อหาความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารผ่านผนังลำไส้เล็ก หรือ การวัด Permeability coefficient

การคำนวณค่า Permeability coefficient (P, เซนติเมตรต่อวินาที)

$$P = J / (C_0 * A)$$

เมื่อ J = อัตราที่สารเคลื่อนผ่าน Caco-2 monolayer ไปสู่ basolateral (นาโนกรัมต่อวินาที)

C_0 = ค่าความเข้มข้นของสารในชั้น apical (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)

A = พื้นผิวหน้าของ filter ที่เลี้ยง Caco-2 cells (ตารางเซนติเมตร)