

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย
ผลของ (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide ต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูขาว

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ	
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสนาโยธิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัตศิ์ยวงศ์
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี	ต้นตีสระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ	ภัทรพานิช

317/1

มกราคม 2545

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย

ผลของ (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide ต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูขาว

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวณิชย์ประเสริฐ	
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสนาโยธิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัตศิ์วงศ์
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี	ต้นติสิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ	ภัทรพานิช

มกราคม 2545

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้อง ดังนี้

- ฝ่ายวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปีการเงิน 2548
- กรรมการติดตามผลและประเมินผลโครงการวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันตีสระ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร และรองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์ สำหรับการให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานผลการวิจัย
- ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชเคมี ภาควิชาจุลชีววิทยา และศูนย์เครื่องมือวิจัยเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย
- รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ รองศาสตราจารย์ ดร. นิคม ชัยศิริ อาจารย์ ทันตแพทย์ ชาญชัย ให้อสงวน เภสัชกรหญิงนารีรัตน์ รักสุนทร และนายณรงค์ฤทธิ์ กล่อมจิตร ในความช่วยเหลือต่างๆ จนทำให้การวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี

โครงการวิจัย ผลของ (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide ต่อเอนไซม์ไซโตโครม
พี 450 ในตับหนูขาว

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล กิจสนาโยธิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี นีวัตศิษฎ์วงศ์
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2545

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของ(เอน-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพนทามายด์ (เอชพีพี) ต่อเอนไซม์
ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูขาว โดยการฉีดเอชพีพี ในขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัม/
กิโลกรัม/วัน เข้าทางหน้าท้องแก่หนูขาวเพศผู้พันธุ์วีสตาร์ วันละครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ในทำนอง
เดียวกัน ได้ให้วัลโปรอิด แอซิด (วีพีเอ) ซึ่งเป็นสารต้นแบบของเอชพีพี ในขนาด 250 มิลลิกรัม/
กิโลกรัม/วัน แก่สัตว์ทดลองอีกกลุ่มหนึ่งในลักษณะเดียวกัน ในวันถัดมา ฆ่าหนู แล้วเตรียม
ไมโครโซมจากตับ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไซโตโครม พี 450 รวม และสมรรถนะของ
ไซโตโครม พี 450 (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2 และ CYP 2E1) จาก
ไมโครโซม ผลการวิจัยพบว่า วีพีเอในขนาดที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่มีผลใดๆ ต่อปริมาณไซโตโครม
พี 450 รวม และสมรรถนะของไซโตโครม พี 450 ทุกชนิดที่ทำการศึกษา เอชพีพีทั้งขนาด
100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มสมรรถนะของ CYP 1A1, CYP 2B1 และ
CYP 2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณไซโตโครม พี 450 รวม และ
สมรรถนะของ CYP 1A2 และ CYP 2E1 ตรงข้ามกับผลของการศึกษาแบบ *ex vivo* เมื่อทำ
การศึกษาแบบ *in vitro* พบว่า เอชพีพีที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้ง
สมรรถนะของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการยับยั้ง CYP 2B
ของเอชพีพี ส่วนหนึ่งอาจช่วยอธิบายผลของเอชพีพีในการเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูที่
ได้รับบาร์บิทูเรต ทั้งนี้เนื่องจาก CYP 2B มีบทบาทสำคัญในการทำลายฤทธิ์ของบาร์บิทูเรตในหนู
ควรทำการศึกษาดูไปถึงผลของเอชพีพีต่อ CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 1A1 ในระดับ
โปรตีน และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสโปรตีนนี้ รวมทั้งผลของเอชพีพีต่อ CYP isoforms
อื่นๆ ที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ ในคน และที่ยังไม่ได้ทำการศึกษ
ในการวิจัยนี้

Project Title Effect of (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide on rat hepatic cytochrome P450

Name of the Investigators

Assistant Professor Pol. Col. Lt. Somsong Lawanprasert, Ph.D

Assistant Professor Pornpimol Kijsanayotin

Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong

Associate Professor Mayuree H. Tantisira, Ph.D.

Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.

Year January, 2002

Abstract

Effect of (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HPP) on rat hepatic cytochrome P450 (CYP) was investigated. HPP at doses of 100, 200 mg/kg/day were given intraperitoneally to male Wistar rats once daily for 7 days. Valproic acid (VPA), the prototype of HPP, at 250 mg/kg/day was also given to another group of animals in the same manner. At the end of the treatment, animals were sacrificed and hepatic microsomal subfractions were isolated. Microsomal total CYP contents and CYP (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2 and CYP 2E1) activities were determined. The results showed that VPA at the dose studied did not have any effects on either total CYP contents or the CYP activities. HPP 100 and 200 mg/kg/day significantly induced CYP 1A1, CYP 2B1 and CYP 2B2 activities. No effects of HPP were observed on total CYP contents as well as the activities of CYP 1A2 and CYP 2E1. In contrast with the *ex vivo* study, HPP significantly demonstrated an *in vitro* inhibition effect on CYP 2B1 and CYP 2B2 activities at concentrations of 100 and 1000 μ M. Due to the fact that CYPs 2B are responsible to the detoxification of barbiturates in rats, the inhibition effect of HPP on these enzymes may be, in part, explained the prolongation of barbiturate sleeping time after single dose administration of HPP. Effects of HPP on other isoforms of CYP, involving in human drug metabolism, should be explored. Further study to clarify the effect of this compound on the expression of specific CYP 1A1, CYP 2B1 and CYP 2B2 as well as the corresponding mRNAs that encode them should also be proceeded.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	vii
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	9
การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	13
เอกสารอ้างอิง	17
ภาคผนวก	20

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1 ผลของ HPP ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว	9
2 ผลของ HPP ต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว	10
3 ผลของ HPP ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว	10
4 ผลของ HPP ต่อ CYP 2E1 activity ใน microsomes ของตับหนูขาว	11
5 ผลของ HPP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ในการศึกษาแบบ <i>in vitro</i>	12
6 ความเข้มข้นของโปรตีน* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	21
7 ปริมาณ total CYP* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	21
8 อัตราเร็วของปฏิกิริยา ethoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A1 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	22
9 อัตราเร็วของปฏิกิริยา methoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	22
10 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	23
11 อัตราเร็วของปฏิกิริยา pentoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	23
12 อัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation* (CYP 2E1 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	24
13 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวที่ได้รับ phenobarbital 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 3 วัน	24

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ HPP (a) และ VPA (b)	1
2	โครงสร้างทางเคมีของ valproic acid และเมแทบอลิต์ของ valproic acid ตรวจวัดโดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry.	2

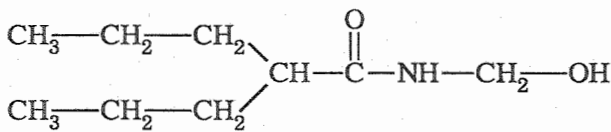
รายการสัญลักษณ์

ANOVA	=	Analysis of variance
β	=	beta
BROD	=	benzyloxyresorufin o-dealkylation
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
CYP	=	cytochrome P450
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
ED_{50}	=	median effective dose
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EROD	=	ethoxyresorufin o-dealkylation
g	=	gravity
G6P	=	glucose 6-phosphate
G6PD	=	glucose 6-phosphate dehydrogenase
HPLC	=	high performance liquid chromatography
HPP	=	(N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide
LD_{50}	=	median lethal dose
MES	=	maximal electroshock
MgCl_2	=	magnesium chloride
MROD	=	methoxyresorufin o-dealkylation
NADP	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
PEG 400	=	polyethylene glycol 400
PROD	=	pentoxyresorufin o-dealkylation
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
TD_{50}	=	median toxic dose
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UDPGT	=	uridine- 5'-diphospho-glucuronosyltransferase

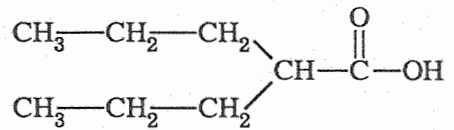
VPA	=	valproic acid
VPM	=	valproyl morpholine
VPU	=	N-(2-propylpentanoyl) urea
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume

1. บทนำ

(N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HPP) เป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของ valproic acid (VPA) ถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2541 โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และคณะ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Lomlim L., 1998) HPP เป็น hydroxymethylamide ของ VPA มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1



(a) HPP



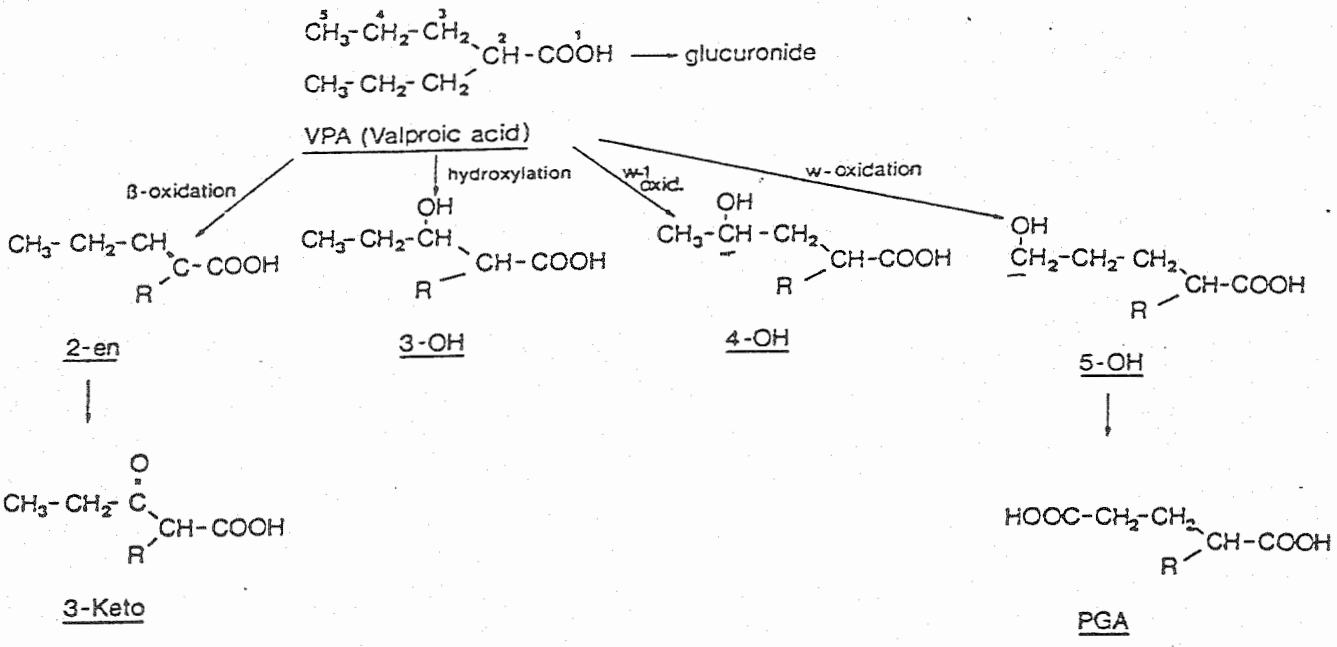
(b) VPA

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ HPP (a) และ VPA (b)

ผู้วิจัยหลายกลุ่มพยายามสังเคราะห์อนุพันธ์ของ VPA เพื่อให้ได้ยาต้านชักที่มีฤทธิ์สูงขึ้น รวมทั้งมีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์น้อยลง (Bialer M. et al., 1994) ทั้งนี้เพราะ VPA แม้จะเป็นยาต้านชักที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถรักษาอาการชักได้หลายชนิด ทั้ง generalized seizure และ partial seizure (Alber G.W. and Peroutka S.J., 1992) แต่ VPA มีฤทธิ์ในการต้านชักปานกลาง และมีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์หลายอย่าง ได้แก่ พิษต่อดับ (Lewis J.H. et al., 1982; Zimmerman H.J. and Ishak K.G., 1982; Powell-Jackson P.R. et al., 1984; Siemes H. et al., 1993) พิษต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ (Dalen B. et al., 1980; Gomez M.R., 1981) ผลต่อระบบทางเดินอาหาร (เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เบื่ออาหาร) ผลต่อระบบประสาท (เช่น ปวดศีรษะ มึนงง อ่อนเพลีย) และผลต่อผิวหนัง (เช่น ผื่นคัน) เป็นต้น (Davis R. et al., 1994)

เมื่อพิจารณาวิถีเมแทบอลิซึมของ VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบของ HPP พบว่า เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกาย VPA ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนแปลงในตับด้วยกระบวนการ glucuronidation ก่อนถูกขับออกจากร่างกาย VPA ส่วนน้อยถูกขับออกจากร่างกายในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง และถูกเปลี่ยนแปลงโดยการผ่านกระบวนการ β -oxidation ได้เมแทบอลิต์ คือ 2-en-VPA และ 3-keto-VPA รวมทั้งปฏิกิริยา oxidation ที่ใช้เอนไซม์ cytochrome P 450 (CYP) ในการเร่งปฏิกิริยา (Heinemeyer G. et al., 1985) ได้เมแทบอลิต์ 3 ตัว ได้แก่ 3-OH VPA, 4-OH VPA และ 5-OH VPA (รูปที่ 2) (Nau H. and Loscher W., 1984) สำหรับ 2-n-propyl-4-pentenoic acid (4-ene-VPA, Δ^4 -VPA) นั้นเป็น unsaturated compound ซึ่งเข้าใจว่าเกิดขึ้นในระหว่าง

ปฏิกิริยาการเกิด 4-OH VPA และ 5-OH VPA (Rettie A.E. et al., 1987) การศึกษาต่อมาได้สนับสนุนว่า 4-ene-VPA เป็นเมแทบอลิটที่มีพิษ เป็นสาเหตุของผลพิษต่อตับของ VPA (Zimmerman H.J. and Ishak, K.G., 1982) และจากการศึกษาต่อมาในภายหลังพบว่า CYP 2C9, CYP 2A6 ในคน (Sadeque A.J.M. et al., 1997) และ CYP 2B ในหนู (Baillie T.A., 1988) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการเกิด 4-ene-VPA ดังกล่าว นอกจากนี้ VPA ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในตับ เช่น CYP 2C9, Uridine-5'-diphosphoglucuronosyl transferase (UDPGT) และ epoxide hydrolase (Anderson G.D., 1998) และจากการศึกษาของ Rogiers V. และคณะ (1995) พบว่า VPA มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในตับหนูขาว การที่ VPA มีผลต่อเอนไซม์ในตับ รวมทั้ง VPA เองถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์หลายชนิดในตับดังกล่าวมาข้างต้น เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้อธิบายการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเมื่อใช้ VPA ร่วมกับยาอื่น



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ valproic acid และเมแทบอลิটของ valproic acid ตรวจวัดโดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry. [2-en, 2-propyl-2-pentenoic acid; 3-keto, 2-propyl-3-keto-pentanoic acid; 3-OH, 2-propyl-3-hydroxypentanoic acid; 4-OH, 2-propyl-4-hydroxypentanoic acid; 5-OH, 2-propyl-5-hydroxypentanoic acid; PGA, 2-propyl-glutaric acid] (Nau H. And Loscher W., 1984)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านชัก ฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ และความเป็นพิษเฉียบพลันของ HPP (Patarapanich C. et al, 1998, Supatchaipisit P., 1995) พบว่า HPP มีฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้า (maximal electroshock, MES) และที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย pentylenetetrazole ได้เช่นเดียวกับ VPA โดย HPP จะมีความแรงของการออกฤทธิ์สูงกว่า กล่าวคือ median effective dose (ED_{50}) ของ HPP และ VPA เมื่อฉีดเข้าทางหน้าท้อง ในการต้านชักในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย MES เท่ากับ 77 และ 214 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย pentylenetetrazole จะมีค่า ED_{50} เมื่อฉีดเข้าทางหน้าท้อง เท่ากับ 35 และ 108 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แม้ว่า HPP จะมีฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (ทดสอบโดยวิธี Rotorod test) สูงกว่า VPA (median toxic dose, TD_{50} ของ HPP : VPA เท่ากับ 89 : 274) แต่ค่า relative safety margin (LD_{50} / ED_{50}) ของ HPP สูงกว่า VPA ประมาณ 3 เท่า ส่วนความเป็นพิษเฉียบพลันเมื่อพิจารณาจากค่า median lethal dose (LD_{50}) พบว่า HPP มีค่า LD_{50} ใกล้เคียงกับ VPA (LD_{50} ของ HPP และ VPA เมื่อฉีดเข้าทางหน้าท้องในหนูถีบจักรเท่ากับ 722 และ 717 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อให้ HPP ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แก่หนูถีบจักรเพียงครั้งเดียว HPP มีฤทธิ์เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับ barbiturates (barbiturate sleeping time) การที่ HPP มีฤทธิ์เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับ barbiturates นี้ เป็นการบ่งชี้ว่าสารนี้อาจจะเสริมฤทธิ์การกดระบบประสาทส่วนกลางของ barbiturates หรืออาจมีผลต่อ CYP ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง barbiturates (Lewis D.F.V. and Lake B.G., 1997) และเป็นระบบเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีต่างๆ จำนวนมาก การที่ยาไปมีผลต่อการทำงานของ CYP อาจโดยการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งเป็นข้อมูลอย่างหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนายาใหม่ เนื่องจากจะบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ที่ยาจะไปมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาอื่นที่ใช้ร่วมกัน

อนึ่ง CYP เป็นระบบเอนไซม์ที่สำคัญของ phase I metabolism ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมต่างๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดย phase II metabolism แล้วถูกกำจัดออกจากร่างกาย มี CYP หลาย isoforms ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี และมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม ได้เป็น reactive metabolites ที่เป็นพิษ มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ และ/หรือก่อมะเร็ง ได้แก่ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 CYP 2B2 CYP 2E1 และ CYP 3A4 เป็นต้น (Soucek P. and Gut I., 1992) ดังนั้นถ้าเอนไซม์เหล่านี้ถูกเหนี่ยวนำโดยสารใด ๆ ย่อมบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ที่สารเหนี่ยวนำนั้นจะมีผลเพิ่มความเสียหายของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์และ/หรือการก่อมะเร็งจากสารแปลกปลอมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาผลของ HPP ต่อ

การทำงานของ CYP ได้แก่ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 2E1
ในตับหนูขาว โดยทำการศึกษาแบบ *ex vivo*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาผลของ HPP ต่อ CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

เป็นข้อมูลเบื้องต้นของ HPP ว่ามีผลเหนี่ยวนำและ/หรือยับยั้ง CYP หรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYP isoforms ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี หรือมลพิษหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม แล้วได้เมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์สูงขึ้น ทำให้ได้รับข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาว่า HPP มีผลเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์ และ/หรือการก่อมะเร็งจากสารแปลกปลอมเหล่านั้นหรือไม่ รวมทั้งเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาการใช้ HPP ร่วมกับยาอื่น

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์วีสตาร์ (Wistar albino rats) เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยง ณ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.1.2 สารเคมี

4-aminophenol, aniline hydrochloride, bovine serum albumin, cupric sulfate, dimethylsulfoxide (DMSO), ethylenediamine tetraacetic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, glucose 6-phosphate (G6P), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), potassium phosphate, potassium phosphate monobasic anhydrous, sodium carbonate, sodium citrate, sodium phosphate dibasic anhydrous, Trisma[®] base, valproic acid, benzyloxyresorufin, ethoxyresorufin, methoxyresorufin, pentoxyresorufin และ resorufin ของ Sigma, U.S.A.

Magnesium chloride, phenol, potassium chloride, sodium chloride, sodium hydroxide และ trichloroacetic acid ของ E. Merck, Germany

Ethanol absolute และ glycerol ของ Carlo Erba, U.S.A.

Methanol (HPLC grade) ของ BDH Laboratory Supplies, England

Sodium dithionite ของ Fluka Chemic, Japan

Polyethylene glycol 400 (PEG 400) ของบริษัทวิทยาศาสตร์ จำกัด ประเทศไทย

2.1.3 เครื่องมือ

Autopipets ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร

Centrifuge

Fluorescence spectrophotometer

Metabolic shaker bath

pH meter

Potter - Elvehjem homogenizer with teflon pestle and glass homogenizer

Refrigerated highspeed centrifuge

Ultracentrifuge

Spectrophotometer

Tank of carbon monoxide gas

Ultra-low temperature freezer

Vortex mixer

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูขาว 6 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 (control group) ให้ PEG 400 (เป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลาย VPA และ HPP) ฉีดเข้าทางหน้าท้อง (intraperitoneal) วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน
2. กลุ่มที่ 2 (VPA treatment group) ให้ VPA ฉีดเข้าทางหน้าท้อง ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน
3. กลุ่มที่ 3 (HPP treatment group 1) ให้ HPP ฉีดเข้าทางหน้าท้อง ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน
4. กลุ่มที่ 4 (HPP treatment group 2) ให้ HPP ฉีดเข้าทางหน้าท้อง ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

ในแต่ละครั้งของการทดลอง ใช้หนูครั้งละ 4 ตัว (กลุ่มการทดลองละ 1 ตัว) ซึ่งได้รับยาหรือสารเป็นเวลา 7 วัน ตามที่กล่าวข้างต้น ฆ่าหนูในวันที่ 8 โดยวิธีดึงคอ (cervical dislocation) เปิดหน้าท้อง และฉีคน้ำเกลือ (0.9 % w/v sodium chloride) ที่เย็บจัดเข้าทางเส้นเลือด portal vein จนดับชีวิต ตัดตับออกอย่างรวดเร็ว ล้างด้วยน้ำเกลือ ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก นำมาเตรียม hepatic microsomal subfractions โดยวิธี differential centrifugation

2.2.2 เตรียม hepatic microsomal subfractions

ชั่งน้ำหนักตับ เติม phosphate buffer pH 7.4 ในปริมาณเป็น 3 เท่าของน้ำหนักตับ นำไปบดปั่น (homogenize) ให้ละเอียด จากนั้นนำไปปั่นแยก (centrifuge) ที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้งส่วนที่เป็นตะกอน นำส่วนที่ใส (supernatant) มาปั่นแยกอีกครั้งที่ 100,000 g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกเก็บส่วนที่ใส (cytosolic subfractions) และส่วนที่เป็นตะกอน (microsomal subfractions) โดยนำส่วนที่เป็นตะกอนไปแขวนลอยใน phosphate buffer pH 7.4 ซึ่งมี glycerol อยู่ 20 % v/v เก็บ microsomes ที่เตรียมได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.3 วิเคราะห์ drug-metabolizing enzymes

2.2.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน microsomes โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry O.H. และคณะ (1951) ดังนี้ เติมสารละลายของ cupric sulfate และ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีอยู่ใน microsomes ได้สารประกอบ

เชิงซ้อนสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร โดยใช้ sodium hydroxide 0.5 โมลาร์ แทน microsomes เป็นแบล็ก ค่าความหนาแน่นของโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน [สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (ปริมาณ 0 - 300 ไมโครกรัม) ทำปฏิกิริยากับ cupric sulfate และ Folin-Ciocalteu's phenol reagent เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง]

2.2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณ total CYP ใน microsomes โดยวิธีของ Omura T. และ Sato R. (1964) ดังนี้ เตรียมหลอด 2 หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่าง (หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก) ทั้งสองหลอด ใส่ microsomes (ที่ได้เจือจางให้ได้อ่าความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วย Tris buffer pH 7.4) เติม sodium dithionite ผสมให้เข้ากัน แล้วบันทึก baseline ด้วย spectrophotometer ในช่วง 400 - 500 นาโนเมตร นำหลอดตัวอย่างมาผ่านแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ บันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วง 400 - 500 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ total CYP (นาโนโมล/มิลลิกรัมของโปรตีน) จากค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 490 นาโนเมตร โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ $91 \text{ มิลลิโมลาร์}^{-1} \text{ เซนติเมตร}^{-1}$

2.2.3.3 วิเคราะห์หา CYP activities จาก microsomes ดังนี้

a. ปฏิกิริยา alkoxyresorufin o-dealkylation โดยใช้ alkoxyresorufins 4 ชนิด เป็นสับสเตรต ได้แก่ benzyloxyresorufin, pentoxyresorufin (เป็นสับสเตรตของ CYP 2B1 และ CYP 2B2) ethoxyresorufin (เป็นสับสเตรตของ CYP 1A1) และ methoxyresorufin (เป็นสับสเตรตของ CYP 1A2) โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Burke M.D. และ Mayer R.T. (1974) ร่วมกับวิธีของ Lubet R.A. และคณะ (1985) ดังนี้

ในสารผสมที่ทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ Tris buffer pH 7.4 alkoxyresorufin (5 ไมโครโมลาร์) NADPH regenerating system [ซึ่งประกอบด้วย NADP (1 มิลลิโมลาร์) G6P (5 มิลลิโมลาร์) และ MgCl_2 (3 มิลลิโมลาร์)] microsomes จากข้อ 2.2.2 (มีปริมาณของโปรตีนเท่ากับ 100 ไมโครกรัม) เตรียมสารผสม 3 หลอด สำหรับแต่ละตัวอย่าง (สองหลอดเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก) นำหลอดทดลองทั้งหมดไปอุ่นใน metabolic shaker bath ที่ 37°C เป็นเวลา 2 นาที เติม G6PD (100 ยูนิต/มิลลิลิตร ใน 20 มิลลิโมลาร์ potassium phosphate buffer pH 7.4) 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด ส่วนหลอดที่เป็นแบล็ก เติม 20 มิลลิโมลาร์ potassium phosphate buffer pH 7.4 10 ไมโครลิตร จับเวลา 5 นาที แล้วเติม methanol (HPLC grade) 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด วัดปริมาณ resorufin ที่เกิดขึ้นด้วย fluorescence

spectrophotometer (excitation wavelength เท่ากับ 556 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 589 นาโนเมตร) คำนวณหาปริมาณ resorufin ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ resorufin เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 1.5 นาโนโมล/มิลลิลิตร) จากนั้นคำนวณหา activities ของเอนไซม์ (พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)

b. ปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation ใช้ aniline hydrochloride ซึ่งเป็นสับสเตรตของ CYP 2E1 โดยวิธีของ Schenkman J.B. และคณะ (1967) ดังนี้

ในสารผสมที่ทำปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ Tris buffer pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ aniline HCl 0.5 มิลลิลิตร NADPH regenerating system [ซึ่งประกอบด้วย NADP (1 มิลลิโมลาร์) G6P (5 มิลลิโมลาร์) และ $MgCl_2$ (3 มิลลิโมลาร์)] microsomes จากข้อ 2.2.2 (มีปริมาณโปรตีนอยู่ 5 มิลลิกรัม) เตรียมสารผสม 2 หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่าง นำหลอดทดลองทั้งหมดไปอุ่นใน metabolic shaker bath ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 นาที เติม G6PD (100 ยูนิต/มิลลิลิตร ใน 20 มิลลิโมลาร์ potassium phosphate buffer pH 7.4) 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด จับเวลา 30 นาที แล้วเติม 20 %w/v trichloroacetic acid ที่แช่เย็นจัด 1 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองทั้งหมดในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนที่ใสใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อไป

ในแต่ละครั้งของการวัดค่าการดูดกลืนแสง เตรียมหลอด 2 หลอด (หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก) ในหลอดตัวอย่าง ใส่ส่วนที่ใสซึ่งเตรียมได้ข้างต้น 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่เป็นแบล็ก ใส่ 20 มิลลิโมลาร์ potassium phosphate buffer pH 7.4 1 มิลลิลิตร เติม 1% w/v phenol 1 มิลลิลิตร และ 1 โมลาร์ sodium carbonate 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 630 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ 4-aminophenol ที่เกิดขึ้น จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ 4-aminophenol เป็นสารมาตรฐาน [สารละลายมาตรฐาน 4-aminophenol (ความเข้มข้น 0-0.01 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) ทำปฏิกิริยากับ phenol และ sodium carbonate เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง] จากนั้นคำนวณหา activities ของเอนไซม์ (นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)

2.2.4 ทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลองทั้ง 4 กลุ่ม โดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) จากนั้นใช้ Student-Newman-Keuls test ทดสอบความแตกต่างของแต่ละคู่ โดยการทดสอบทั้งสองนี้ใช้ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลของ HPP ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

เมื่อให้ HPP ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แก่หนูขาว เป็นเวลา 7 วัน พบว่า HPP ไม่มีผลต่อปริมาณ total CYP เทียบกับกลุ่มที่ให้ PEG 400 ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของ HPP และ VPA ในทำนองเดียวกัน VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบของ HPP เมื่อให้ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน ก็ไม่มีผลต่อปริมาณ total CYP เช่นกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ HPP ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	ปริมาณ total CYP ^(a, b)
1. Control group	0.504 ± 0.060
2. VPA treatment group	0.455 ± 0.065
3. HPP treatment group 1	0.568 ± 0.111
4. HPP treatment group 2	0.454 ± 0.136

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน

(b) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

3.2 ผลของ HPP ต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว

HPP ทั้งขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา methoxyresorufin o-dealkylation (MROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 1A2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้าม HPP ทั้ง 2 ขนาดมีผลเพิ่ม (ประมาณ 2 เท่า) อัตราเร็วของปฏิกิริยา ethoxyresorufin o-dealkylation (EROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 1A1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน VPA ในขนาดที่ให้ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities (ตารางที่ 2)

3.3 ผลของ HPP ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว

HPP ทั้งขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation (BROD) (ประมาณ 8 เท่า)

และ pentoxyresorufin o-dealkylation (PROD) (ประมาณ 11-15 เท่า) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 2B1 และ CYP 2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้าม VPA ในขนาดที่ให้ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของ HPP ต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	CYP 1A1 activities ^(a, b)	CYP 1A2 activities ^(a, b)
	EROD	MROD
1. Control group	34.67 ± 14.24	8.67 ± 2.73
2. VPA treatment group	45.00 ± 17.10	9.00 ± 1.67
3. HPP treatment group 1	64.00 ± 22.73*	11.67 ± 3.20
4. HPP treatment group 2	68.67 ± 13.25*	14.00 ± 8.00

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

(b) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

* p < 0.05 HPP treatment group 1 & 2 vs Control group

ตารางที่ 3 ผลของ HPP ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	CYP 2B1, CYP 2B2 activities ^(a, b)	
	BROD	PROD
1. Control group	20.67 ± 6.02	1.67 ± 2.66
2. VPA treatment group	21.33 ± 9.77	4.67 ± 3.01
3. HPP treatment group 1	160.00 ± 60.94*	18.67 ± 8.26*
4. HPP treatment group 2	167.33 ± 70.02*	25.67 ± 9.91*

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

(b) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

* p < 0.05 HPP treatment group 1 & 2 vs Control group

3.4 ผลของ HPP ต่อ CYP 2E1 activity ใน microsomes ของตับหนูขาว

HPP เมื่อให้ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation ซึ่งใช้วัด activity ของ CYP 2E1 เช่นเดียวกัน VPA ก็ไม่มีผลต่อ CYP 2E1 activity เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของ HPP ต่อ CYP 2E1 activity ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	CYP 2E1 activity ^(a, b)
1. Control group	0.388 ± 0.126
2. VPA treatment group	0.275 ± 0.144
3. HPP treatment group 1	0.348 ± 0.106
4. HPP treatment group 2	0.430 ± 0.130

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

(b) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

การวิจัยเพิ่มเติม

ผลการทดลองที่พบว่า HPP มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities (ข้อ 3.3, ตารางที่ 3) ไม่สามารถนำมาใช้อธิบายการที่ HPP มีผลเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูที่ได้รับ pentobarbital ที่ได้รับทันที หลังจากให้ HPP เพียงครั้งเดียว ในขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่รายงานโดย Patarapanich C. และคณะ (1998) และ Supatchaipisit P. (1995) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยการศึกษาแบบ *in vitro* ดังนี้ คือ

1. ให้ phenobarbital แก่หนูขาว จำนวน 4 ตัว ในขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยฉีดเข้าทางหน้าท้อง วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 วันที่ 4 ซ่าหนู และนำตับมาเตรียม microsomes เช่นเดียวกับที่กล่าวมาในบทที่ 2 (ข้อ 2.2.2)

2. ละลาย HPP ในสารละลายของ benzyloxyresorufin (ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO) ในความเข้มข้นต่างๆ โดยที่เมื่อเปิดสารละลายของ benzyloxyresorufin มาใช้ในปฏิกิริยา alkoxyresorufin o-dealkylation จะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ HPP (ในสารผสมที่ทำปฏิกิริยา)

ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยา alkoxyresorufin o- dealkylation ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 [ข้อ 2.2.3.3 (a)] โดยใช้ microsomes ที่เตรียมได้จากข้อ 1 และ alkoxyresorufin ที่เป็น benzyloxyresorufin ผสมกับ HPP ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลอง พบว่า HPP ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD ในขณะที่ HPP ความเข้มข้น 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี HPP (ความเข้มข้น HPP เท่ากับ 0 ไมโครโมลาร์) และ HPP ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ค่อนข้างจะมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD มากกว่ากลุ่มที่มี HPP ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ HPP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ในการศึกษาแบบ *in vitro*

ความเข้มข้นของ HPP (ไมโครโมลาร์)	CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ^(a, b) (BROD activities)
1. 0	814.20 ± 88.75
2. 0.1	808.00 ± 85.65
3. 1.0	756.50 ± 76.30
4. 10	790.50 ± 98.55
5. 100	489.50 ± 68.10*
6. 1000	355.50 ± 26.45*

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

(b) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=4)

* $p < 0.05$ HPP (100, 1000 ไมโครโมลาร์) vs HPP (0 ไมโครโมลาร์)

4. การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลจากการวิจัยนี้พบว่า การให้ HPP ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาด ED_{50} ของการต้านชักในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้า และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน มีผลในการเหนี่ยวนำ CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 1A1 โดยมีผลในการเหนี่ยวนำ CYP 2B มากกว่า CYP 1A1 ในทางตรงกันข้าม HPP ทั้งสองขนาดไม่มีผลเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP 1A2 และ CYP 2E1 โดยเหตุที่ในการศึกษาที่ผ่านมา (Kiatkosolkul T., 1999; Lawanprasert S., 2000) พบว่า PEG 400 ซึ่งใช้ในการละลาย HPP ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP เหล่านี้ ดังนั้นผลของ HPP ต่อ CYP activities ที่พบในการศึกษานี้จึงเป็นผลที่เกิดจาก HPP ไม่ใช่ผลของ PEG 400 ที่ใช้ในการละลาย HPP

แม้ว่า HPP มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B และ CYP1A1 แต่เมื่อวัดปริมาณ total CYP ไม่พบว่า HPP ทั้งสองขนาดที่ใช้ในการวิจัยนี้มีผลใดๆ ต่อปริมาณ total CYP อาจเป็นไปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณ total CYP ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมานานนี้มีความไวไม่สูงนัก จึงไม่สามารถตรวจพบผลของ HPP ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเล็กน้อยต่อ CYP 2B และ CYP1A1 HPP มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B ต่ำกว่า phenobarbital มาก เช่นเดียวกับ HPP ก็มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 1A1 ต่ำกว่า β -naphthoflavone มาก เมื่อให้ phenobarbital (เป็นเวลา 3 วัน) หรือ β -naphthoflavone (เป็นเวลา 2 วัน) โดยการฉีดทางหน้าท้องแก่หนูขาว ในขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่า phenobarbital มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2B activities ประมาณ 30 เท่า β -naphthoflavone มีผลเหนี่ยวนำ CYP 1A1 activity ประมาณ 14 เท่า และพบว่าสารทั้งสองทำให้ปริมาณ total CYP สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yana K., 2000)

เมื่อให้ VPA ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกันขนาด ED_{50} ของการต้านชักในหนูที่หนูเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้า) แก่หนูขาวโดยการฉีดทางหน้าท้องเป็นเวลา 7 วัน ในลักษณะเช่นเดียวกับ HPP ไม่พบว่า VPA มีผลใดๆ ต่อปริมาณ total CYP และ activities ของ CYP isoforms ต่างๆ ที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ (Kiatkosolkul T., 1999; Lawanprasert S., 2000; Yana K., 2000) การตรวจไม่พบฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B ของ VPA ในการศึกษาแบบ *ex vivo* ครั้งนี้ และการศึกษาอื่นๆ ที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ ดังกล่าว สอดคล้องกับการทดลองแบบ *in vivo* ของ Rogiers V. และคณะ (1995) ซึ่งพบว่าเมื่อให้ VPA โดยฉีดทางหน้าท้องแก่หนูขาวในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 10 วัน ไม่พบผลเหนี่ยวนำของ VPA ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities อย่างไรก็ตามเมื่อ Rogiers V. และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาแบบ *in vitro*

โดยใช้ rat hepatocyte cell culture หรือทำการศึกษาแบบ *in vivo* แต่ให้ VPA แก่หนูขาวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยการฝัง osmotic minipump ได้ผิวหนังที่หลังของหนูขาว เพื่อรักษาระดับของ VPA ในเลือด พบว่า VPA มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ผลการทดลองที่ขัดแย้งกันนี้อาจอธิบายได้จากการที่ VPA มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) สั้นมาก (ประมาณ 10-20 นาที) ในหนูขาว (Dickinson R.G. et al., 1979)

การที่พบว่า HPP มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2B เมื่อให้ HPP ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน แก่หนูขาว ไม่สามารถอธิบายการที่ HPP มีผลเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูขาวที่ได้รับ barbiturate ในการทดลองของ Patarapanich C. และคณะ (1998) และ Supatchaipisit P. (1995) ซึ่งฉีด pentobarbital ทางหน้าท้องแก่หนูขาวทันทีหลังจากได้รับ HPP ทางหน้าท้องเพียงครั้งเดียว ด้วยเหตุที่ pentobarbital ถูกเมแทบอลิซึมโดย CYP 2B ได้เป็นเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์การที่ให้ HPP ในเวลาใกล้เคียงกับ pentobarbital และทำให้ pentobarbital ถูกเมแทบอลิซึมน้อยลง มีผลให้ฤทธิ์ในการทำให้นอนหลับของ pentobarbital ยาวนานขึ้น แสดงให้เห็นว่า HPP น่าจะมีผลยับยั้ง CYP 2B คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยการทำ *in vitro* inhibition study พบว่า HPP ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 1000 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้ง CYP 2B activities (ตารางที่ 5) ดังนั้น HPP มีฤทธิ์ทั้งเหนี่ยวนำ (ตารางที่ 3) และยับยั้ง CYP 2B ขึ้นกับลักษณะการให้สาร (dosage regimen) แก่สัตว์ทดลอง กล่าวคือ มีผลยับยั้งถ้าให้แบบครั้งเดียว แต่มีผลเหนี่ยวนำถ้าให้สารแก่สัตว์ทดลองเป็นเวลาหลายวัน มีสารยับยั้ง CYP (CYP inhibitors) หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันนี้ ได้แก่ isosafrol, troleandomycin, erythromycin และ SKF-525A เป็นต้น (Lin J.H and Lu A.Y.H., 1998)

CYP 2B1 และ CYP 2B2 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลง VPA ในหนูขาวแล้วได้เมแทบอลิต์ที่เป็นพิษ คือ 4-ene-VPA (Baillie T.A., 1988) การที่ phenobarbital มีฤทธิ์อย่างมากในการเหนี่ยวนำ CYP ทั้งสอง isoforms เป็นเหตุผลหนึ่งที่ใช้อธิบายผลการศึกษาของ Lewis J.H. และคณะ (1982) ซึ่งพบว่า ความเป็นพิษต่อดับของ VPA เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับ phenobarbital การที่ VPA ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B เช่นกัน เป็นข้อมูลหนึ่งที่น่าจะอธิบายผลพิษต่อดับของ VPA เมื่อได้รับในระยะเวลาสั้น (Rogiers V. et al, 1995) อนุพันธ์อื่นๆ ของ VPA ได้แก่ N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU) (Kiatkosolkul T., 1999; Lawanprasert S., 2000) และ valproyl morpholine (VPM) (Yana K., 2000) ก็มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B เช่นเดียวกับ HPP ควรทำการศึกษาต่อไปว่า CYP 2B เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการเมแทบอลิซึม หรือในทางตรงกันข้าม CYP 2B มีบทบาทในการสร้างเมแทบอลิต์ที่มีพิษของ HPP และอนุพันธ์อื่นๆ ของ VPA (เช่น VPU, VPM เป็นต้น) หรือไม่ เพราะถ้าเป็นเช่นนั้น การเหนี่ยวนำ CYP 2B ของ HPP และอนุพันธ์อื่นๆ เหล่านี้จะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการกำจัดตัวมันเอง หรือในทางตรงข้ามมีผลในการเพิ่มความเป็นพิษของ

สารเหล่านั้นได้ แม้ว่า CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในหนูจะเป็น CYP isoforms ที่มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนสูงมากกับ CYP 2B6 ในมนุษย์ (Soucek P. and Gut I., 1992) ความแตกต่างในสมรรถนะของเอนไซม์ (catalytic activity) และการควบคุม (regulation) การแสดงออก (expression) ของ CYP ระหว่างชนิดของสัตว์ ทำให้มีข้อจำกัดของการแปลผลฤทธิ์เหนี่ยวนำของ HPP ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในหนูขาว ไปยัง CYP 2B6 ในมนุษย์ นอกจากนี้ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับความสำคัญของ CYP 2B6 ในการเมแทบอลิซึมสารแปลกปลอมต่าง ๆ ในมนุษย์ยังมีน้อยมาก

การวิจัยครั้งนี้ไม่พบผลในการเหนี่ยวนำและยับยั้งของ HPP ต่อ activities ของ CYP 2E1 (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation) และ CYP 1A2 (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยา MROD) เมื่อให้ HPP ทั้งขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน นับว่าเป็นข้อดีของ HPP ที่ไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2E1 และ CYP 1A2 ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ทั้งสอง isoforms เป็นเอนไซม์ที่มีทั้งในหนูขาวและในมนุษย์ และมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี และสารแปลกปลอมหลายชนิด ได้เมแทบอลิต์ที่มีพิษ ก่อการกลายพันธุ์และ/หรือก่อมะเร็ง เช่น CYP 2E1 มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาของ acetaminophen, benzene, carbon tetrachloride, chloroform, nitrosamines และ aromatic amines เป็นต้น ส่วน CYP 1A2 มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาของ acetaminophen, สารประกอบกลุ่ม aromatic amines และ heterocyclic amines เป็นต้น (Soucek P. and Gut I., 1992; Gonzalez F.J. and Gelboin H.V., 1994) อย่างไรก็ตามพบว่า HPP ทั้งสองขนาดที่ให้แก่หนูขาวในการทดลองนี้ มีผลเหนี่ยวนำ CYP 1A1 activity แม้ว่าผลเพิ่มจะไม่สูงนัก เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บ่งชี้ให้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงผลของ HPP ต่อปริมาณโปรตีนจำเพาะของ CYP 1A1 เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาความเป็นไปได้ว่าการได้รับ HPP ติดต่อกันอาจมีผลเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์และ/หรือก่อมะเร็ง จากสารปนเปื้อนหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ สารประกอบกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons สารกลุ่มนี้ เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดย CYP 1A1 ได้เมแทบอลิต์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลูกอัณฑะ เป็นต้น (Hodgson E. and Levi P., 1987)

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในขั้นนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า การให้ HPP ในขนาด ED₅₀ ของการต้านชัก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แก่หนูขาวเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ หรือ ยับยั้ง CYP 1A2 และ CYP 2E1 แต่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำต่อ CYP 2B1 CYP 2B2 รวมทั้งมีฤทธิ์เหนี่ยวนำเล็กน้อยต่อ CYP 1A1 ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของ HPP ต่อ CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 1A1 ในระดับโปรตีน

และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสของโปรตีนนี้ อีกทั้งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ในการประเมินความเสี่ยงของ HPP ต่อสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและการประเมินศักยภาพของ HPP ในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ HPP ต่อ CYP isoforms อื่นๆ ที่พบในคน และยังไม่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Alber, G.W. and Peroutka, S.J. Neurologic disorders : Antiepileptic drugs. In : K.L. Melmon, H.F. Morrelli, B.B. Hoffman, D.W. Nierenberg (eds.), Melmon and Morrel's Clinical Pharmacology. 3rd ed., pp 318-323. Elsevier Science Publishers, 1992.
- Anderson, G.D. Drug interactions : A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. The Annals of Pharmacotherapy, 32 (1998) : 554-563.
- Baillie, T.A. Metabolic activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity : Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid. Chem. Res. Toxicol., 1(1988) : 195-199.
- Bialer, M., Haj-Yehia, A., Badir, K., and Hadad, S., Can we develop improved derivatives of valproic acid? Pharmacy World & Science. 16 (1994) : 2-6.
- Burke, M.D, and Mayer, R.T. Ethoxyresorufin : Direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab. Dispos. 2(1974) : 583-588.
- Dalens, B., Raynaud, E.J., and Gaulme, J. Teratogenicity of valproic acid. J. Pediatr. 97 (1980) : 332-333.
- Davis, R., Peter, D.H., and McTavish, D. Valproic acid: A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. Drug. 47 (2) (1994): 332-372.
- Dickinson, R.G., Harland, R.C., and Llian, A.M. Disposition of valproic acid in the rat, dose-dependent metabolism, distribution, enterohepatic recirculation and choleric effect. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211 (1979) : 583-595.
- Gomez, M.R. Possible teratogenicity of valproic acid. Pediatr. Res. 98 (1981) : 508-509.
- Gonzalez, F.J. and Gelboin, H.V. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. Drug metab. Rev. 26 (142) (1994) : 165-183.
- Heinemeyer, G., Nau, H., Hildebrandt, A.G. and Roots, J. Oxidation and glucuronidation of valproic acid in male rats : Influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene, β -naphthoflavone and clofibrate. Biochem. Pharmacol. 34 (1985) : 133-139.

Hodgson, E. and Levi, P. A textbook of Modern Toxicology Elsevier Science Publishers, NY, 1987

Kiatkosolkul, T., Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on rat hepatic cytochrome P450 and Glutathione s-transferase. Master's Thesis, Department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University. 1999.

Lawanprasert, S., Kijsanayotin, P., Niwattisaiwong, N., Kiatkosolkul, T., Tantisira, M., and Patarapanich, C. Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on rat hepatic drug metabolizing enzymes. Thai J. Pharmacol. 22(1) (2000) : 23-31.

Lewis, D.F.V. and Lake, B.G. Molecular modeling of mammalian CYP 2B isoforms and their interaction with substrates, inhibitors and redox partners. Xenobiotica. 27(5) (1997) : 443-478.

Lewis, J.H., Zimmerman, H.J., Garrett, C.T. and Rosenberg, E. Valproate-induced hepatic steatogenesis in rats. Hepatology. 2 (1982) : 870-873.

Lin, J.H. and Lu, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin. Pharmacokinet. 35(1998) : 361-390.

Lomlim, L. Synthesis of amide derivatives of valproic acid. Master's Thesis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Graduate School, Chulalongkorn University. 1998.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193(1951) : 265-275.

Lubet, R.A., Mayer, R.T., Cameron, J.W., Nims, R.W., Burke, M.D., Wolff, T. and Guengerich, F.P. Dealkylation of pentoxyresorufin : A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. Arch. Biochem. Biophys. 238(1985) : 43-48.

Nau, H. And Loscher, W. Valproic acid and metabolites: Pharmacological and toxicological studies. Epilepsia 25 (suppl. 1) (1984) : S14-S22.

Omura, T and Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239 (1964) : 2370-2378.

- Patarapanich, C., Tantisira, M.H. and Tantisira, B. Pharmacological evaluation of anticonvulsant activity of (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide. Final report to the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. 1998.
- Powell-Jackson, P.R., Tredger, J.M. and Williams, R. Hepatotoxicity to sodium valproate: A review. Gut 25 (1984) : 673-681.
- Rettie, A.E., Rettenmeier, A.W., Howald, W.N., and Baillie, T.A. Cytochrome P-450-catalyzed formation of Δ^4 -VPA, a toxic metabolite of valproic acid. Sciences 235 (1987) : 890-893.
- Rogiers, V., Akrawi M., Vercruyssen, A., Phillips, I.R. and Shephard. E.A. Effects of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of the cytochrome P450 mediated monooxygenase system and glutathione S-transferase. Eur. J. Biochem. 231(1995) : 337-343.
- Sadeque, A.J.M., Fisher, M.B., Korzekwa, K.R., Gonzalez, F.J. and Rettie, A.E. Human CYP 2C9 and CYP 2A6 mediated formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 283 (1997) : 698-703.
- Schenkman, J.B., Remmer, H. and Estabrook, R.W. Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome P-450. Mol. Pharmacol. 3(1967): 113-123.
- Siemes, H., Nau, H., Schultze, K., Wittfoht, W., Drews, E., Penzien, J. and Seidel, U. Valproate (VPA) metabolites in various clinical conditions of probable VPA-associated hepatotoxicity. Epilepsia 34 (2) (1993) : 332-346.
- Soucek, P. And Gut, I. Review Cytochrome P-450 in rats : Structures, functions, properties and relevant human forms. Xenobiotica 22 (1992) : 83-103.
- Supatchaipisit, P. Anticonvulsant activity and effects of (N-hydroxymethyl)-2-propyl pentamide on the central nervous system. Master's Thesis, Inter-Department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University. 1995.
- Yana, K., Effects of valproyl morpholine on rat hepatic cytochrome P 450. Master's Thesis, Department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University. 2000.
- Zimmerman, H.J. and Ishak, K.G. Valproate-induced hepatic injury : Analysis of 23 fetal cases. Hepatology 2 (1982) : 591-597.

ภาคผนวก

ตารางที่ 8 อัตราเร็วของปฏิกิริยา ethoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A1 activity) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	12	46	22	40	46	42
2. VPA treatment group	54	14	48	64	50	40
3. HPP treatment group 1	62	54	80	100	52	36
4. HPP treatment group 2	54	64	82	70	56	86

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 9 อัตราเร็วของปฏิกิริยา methoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A2 activity) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	4	8	8	10	10	12
2. VPA treatment group	8	8	10	8	12	8
3. HPP treatment group 1	14	12	8	16	8	12
4. HPP treatment group 2	12	14	26	20	4	8

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 10 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	16	16	14	26	28	24
2. VPA treatment group	18	6	36	24	24	20
3. HPP treatment group 1	74	176	228	222	112	148
4. HPP treatment group 2	86	174	272	180	92	200

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 11 อัตราเร็วของปฏิกิริยา pentoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	0	6	0	4	0	0
2. VPA treatment group	6	2	8	2	8	2
3. HPP treatment group 1	14	20	30	24	18	6
4. HPP treatment group 2	14	30	40	18	20	32

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 12 อัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation* (CYP 2E1 activity)
ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	0.303	0.602	0.248	0.326	0.445	0.402
2. VPA treatment group	0.340	0.061	0.488	0.316	0.243	0.202
3. HPP treatment group 1	0.310	0.423	0.484	0.392	0.294	0.187
4. HPP treatment group 2	0.412	0.581	0.576	0.239	0.402	0.372

* หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 13 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation * (CYP 2B1
และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวที่ได้รับ
phenobarbital 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 3 วัน

ความเข้มข้นของ HPP (ไมโครโมลาร์)	หนูขาวตัวที่			
	1	2	3	4
0	910	829.2	822.4	695.2
0.1	708	888	766	870
1.0	768	718	682	858
10	678	766	916	802
100	396	484	550	528
1000	318	376	356	372

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที