

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย
ผลของวัลโปรอิล มอร์โฟลีนต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูขาว

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง	ถาวรรัตน์ประเสริฐ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสนาโกลิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัตต์ชัยวงศ์
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี	ตันติสิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนานูญ	ภัทรพานิช

มิถุนายน 2544

304/2

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย
ผลของวัลโปรลิล มอร์โฟลีนต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูขาว

โดย

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

มิถุนายน 2544

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้อง ดังนี้

- ฝ่ายวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปีการเงิน 2542
- กรรมการติดตามผลและประเมินผลโครงการวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วินิจ วินิจวัจนะ สำหรับการให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานผลการวิจัย
- ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชเคมี ภาควิชาจุลชีววิทยา และศูนย์เครื่องมือวิจัยเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย
- รองศาสตราจารย์ ดร. สุปัตรา ศรีไชยรัตน์ รองศาสตราจารย์ ดร. นิคม ชัยศิริ เภสัชกรหญิงกัลยาณี ยานะ และ นายณรงค์ฤทธิ์ กล่อมจิตร ในความช่วยเหลือต่างๆ จนทำให้การวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัย ผลของวัลโปรอิล มอร์โฟลีนต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูขาว

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล กิจสนาโยธิน
 รองศาสตราจารย์นวลศรี นิวัตศิ์วงศ์
 รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันตสิระ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชานาญ ภัทรพานิช

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน 2544

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของวัลโปรอิล มอร์โฟลีน (วีพีเอ็ม) ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูขาว โดยการฉีดวีพีเอ็ม และวัลโปรอิล แอซิด (วีพีเอ) ซึ่งเป็นสารต้นแบบของวีพีเอ็ม ในขนาดที่ต้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน สำหรับวีพีเอ็ม และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน สำหรับวีพีเอ) และวีพีเอ็ม ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แก่หนูขาวเพศผู้ ทางหน้าท้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นฆ่าหนู แล้วเตรียมไมโครโซมจากตับ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไซโตโครม พี 450 รวม และแอกติวิตีของไซโตโครม พี 450 จากไมโครโซม ผลการวิจัยพบว่า ทั้งวีพีเอ็มและวีพีเอไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ เหล่านี้ : ปริมาณไซโตโครม พี 450 รวม แอกติวิตีของ CYP 1A1 CYP 1A2 และ CYP 2E1 ยกเว้นเฉพาะวีพีเอ็ม ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ที่มีผลเพิ่มแอกติวิตีของ CYP 1A1 ในขณะที่วีพีเอไม่มีผลต่อแอกติวิตีของ CYP2B1และ CYP2B2 วีพีเอ็มทั้งสองขนาดมีผลเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่วีพีเอ็มในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มแอกติวิตีของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ได้มากกว่าเมื่อให้ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของวีพีเอ็มต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในระดับโปรตีน และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสของโปรตีนนี้ รวมทั้งผลของวีพีเอ็มต่อ CYP isoforms อื่นๆที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ ในคน และที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยนี้

Project Title Effect of valproyl morpholine 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 June, 2001

Abstract

Effect of valproyl morpholine (VPM) on rat hepatic cytochrome P450 was investigated. Median effective anticonvulsant dose of VPM (100 mg/kg/day) as well as of valproic acid (VPA, the prototype of VPM) (250 mg/kg/day) were given intraperitoneally to male Wistar rats for 7 days. VPM at a dose of 200 mg/kg/day was also given to another group of animals in the same manner. On the day after, the animals were sacrificed and hepatic microsomal subfractions were isolated. Microsomal total cytochrome P450 contents and cytochrome P450 activities were determined. No effects of VPM and VPA were observed on total cytochrome P450 contents as well as the activities of CYP 1A1, CYP 1A2 and CYP 2E1. However VPM at a dosage of 200 mg/kg/day showed significant induction effect on CYP 1A1 activity. While VPA had no effect on CYP2B1 and CYP2B2, both dosages of VPM significantly induced CYP 2B1 and CYP 2B2 of which the activities were more enhanced by 200 mg/kg/day of VPM than the dosage regimen of 100 mg/kg/day. Effect of VPM on other isoforms of CYP, involving human drug metabolism, was suggested exploring. 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	16
ภาคผนวก	19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1 ผลของ VPM ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว	9
2 ผลของ VPM ต่อ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว	10
3 ผลของ VPM ต่อ CYP 2E1 activity ใน microsomes ของตับหนูขาว	11
4 ผลของ VPM ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ในการศึกษาแบบ <i>in vitro</i>	12
5 ความเข้มข้นของโปรตีน* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	20
6 ปริมาณ total CYP* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	20
7 อัตราเร็วของปฏิกิริยา ethoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A1 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	21
8 อัตราเร็วของปฏิกิริยา methoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 1A2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	21
9 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	22
10 อัตราเร็วของปฏิกิริยา pentoxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	22
11 อัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation* (CYP 2E1 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว	23
12 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation* (CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวที่ได้รับ phenobarbital 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 3 วัน	23

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid (VPA)	1
2	โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid และเมแทบอลไลต์ของ Valproic acid ตรวจวัดโดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry.	2
3	โครงสร้างทางเคมีของ Valproyl morpholine (VPM)	2



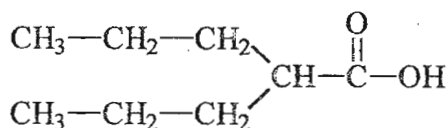
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
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-glucuronyltransferase
VPA	=	valproic acid
VPM	=	valproyl morpholine
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume

1. บทนำ

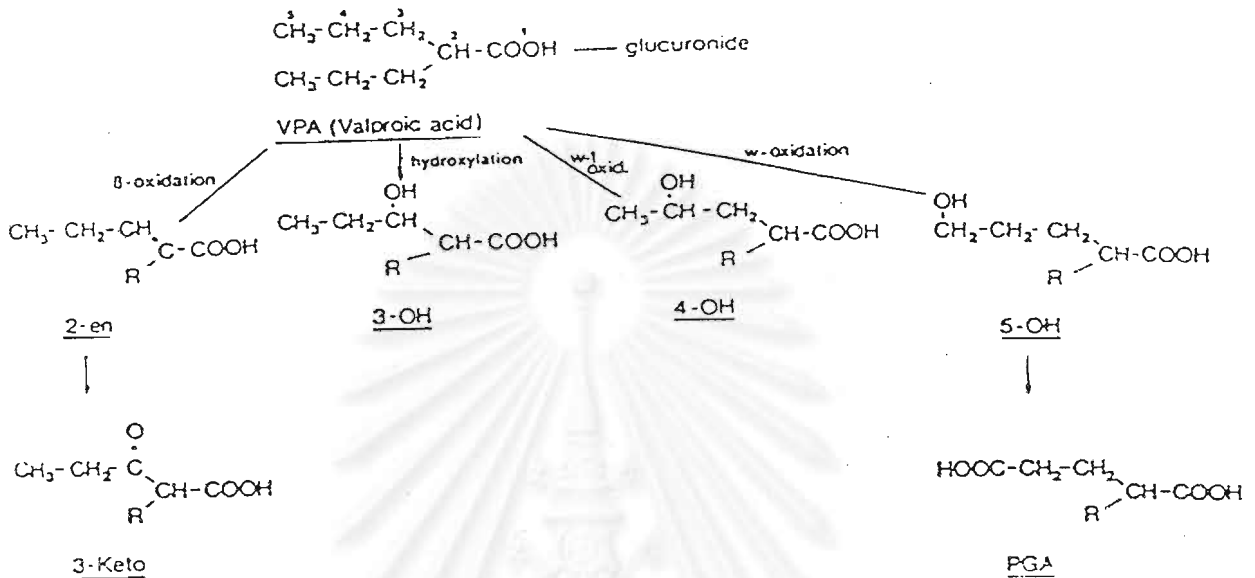
Valproic acid (VPA) เป็นยาด้านชักตัวหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถรักษาอาการชักได้หลายชนิด ทั้ง generalized seizure และ partial seizure (Alber G.W. and Peroutka S.J., 1992) VPA มีโครงสร้างทางเคมีเป็น simple, branched-chain fatty acid (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid (VPA)

เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกาย VPA ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนแปลงในระดับด้วยกระบวนการ glucuronidation ก่อนถูกขับออกจากร่างกาย VPA ส่วนน้อยถูกขับออกจากร่างกายในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง และถูกเปลี่ยนแปลงโดยการผ่านกระบวนการ β -oxidation ได้ metabolites คือ 2-ene-VPA และ 3-keto-VPA รวมทั้งปฏิกิริยา oxidation ที่ไซโทโครม cytochrome P 450 (CYP) ในการเร่งปฏิกิริยา (Heinemeyer G. et al., 1985) ได้ metabolites 3 ตัว ได้แก่ 3-OH, 4-OH 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 ซึ่งเข้าใจว่าเกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการเกิด 4-OH และ 5-OH VPA (Rettie A.E. et al., 1987) การศึกษาต่อมาได้สนับสนุนว่า 4-ene-VPA เป็น reactive metabolite ที่มีพิษ เป็นสาเหตุของผลพิษต่อตับของ VPA (Gerber N. et al., 1979; 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 ผลพิษต่อตับ VPA ยังมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์หลายอย่าง ที่พบบ่อย ได้แก่ ผลต่อระบบทางเดินอาหาร (เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เบื่ออาหาร) ผลต่อระบบประสาท (เช่น ปวดศีรษะ มึนงง อ่อนเพลีย) ผลต่อผิวหนัง (เช่น ผื่นคัน) รวมทั้งพบว่า VPA มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ด้วย (Dalens B. et al., 1980; Gomez, M.R., 1981) นอกจากนี้ VPA ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในตับ เช่น CYP 2C9, Uridine-5'-diphospho-glucuronyl 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

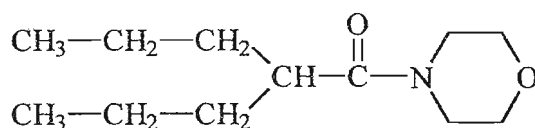
รวมทั้ง VPA เองถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์หลายชนิดในตับดังกล่าวมาข้างต้น เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้อธิบายการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเมื่อใช้ VPA ร่วมกับยาอื่น



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid และเมแทบอลไลต์ของ Valproic acid ตรวจวัดโดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry. [2-en, 2-propyl-2-pentanoic 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)

โดยเหตุที่ VPA มีฤทธิ์ในการต้านชักปานกลาง และมีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์หลายอย่างดังกล่าว จึงมีผู้วิจัยหลายกลุ่มพยายามสังเคราะห์อนุพันธ์ของ VPA เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านชักที่ดีกว่าสารต้นแบบและมีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์น้อยลง (Bialer M. et al., 1994)

Valproyl morpholine (VPM) เป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของ VPA ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดย ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และคณะ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Valproyl morpholine (VPM)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านชักของ VPM ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้า (maximal electroshock, MES) และกระตุ้นให้เกิดการชักด้วยสาร pentylenetetrazole พบว่า VPM มีฤทธิ์ในการต้านชักในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้าเพียงอย่างเดียว โดย VPM สามารถต้านชักได้ดีกว่า VPA ประมาณ 2 เท่า กล่าวคือ ค่า median effective dose (ED_{50}) ของการต้านชักจาก MES ของ VPM และ VPA เท่ากับ 107 และ 230 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันพบว่าทั้ง VPM และ VPA มีความเป็นพิษเฉียบพลันใกล้เคียงกัน แต่ค่า relative safety margin (LD_{50}/ED_{50}) ของ VPM สูงกว่า VPA ประมาณ 2 เท่า (5.87 และ 2.97 สำหรับ VPM และ VPA ตามลำดับ) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยวิธี Rotorod test พบว่าค่า median neurotoxic dose (TD_{50}) ของ VPM และ VPA เท่ากับ 151 และ 307 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาคำนวณหาค่า protective index (TD_{50}/ED_{50}) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน (1.41 และ 1.34 สำหรับ VPM และ VPA ตามลำดับ) แม้ว่า VPM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนไหว (locomotor activity test) ในหนูถีบจักร ทั้งขนาดต่ำและขนาดสูง แต่ก็พบว่า VPM มีฤทธิ์เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับ barbiturates (barbiturate sleeping time) อย่างมาก (Namthongsakun T., 2000) การที่ VPM มีฤทธิ์เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับ barbiturates นี้ เป็นการบ่งชี้ว่าสารนี้อาจจะเสริมฤทธิ์การกดระบบประสาทส่วนกลางของ barbiturates หรืออาจมีผลต่อ CYP ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง barbiturates และเป็นระบบเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีต่าง ๆ จำนวนมาก การที่ยาไปมีผลต่อการทำงานของ CYP อาจโดยการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งเป็นข้อมูลอย่างหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนายาใหม่ เนื่องจากจะบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ที่ยาจะไปมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาอื่นที่ใช้ร่วมกัน

อนึ่ง CYP เป็นระบบเอนไซม์ที่สำคัญของ phase I metabolism ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมต่าง ๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดย phase II metabolism แล้วถูกกำจัดออกจากร่างกาย มี CYP หลาย isozymes ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี และมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม ได้เป็น reactive metabolites ที่เป็นพิษก่อการกลายพันธุ์ และ/หรือก่อมะเร็ง ได้แก่ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 CYP 2B2 CYP 2E1 และ CYP 3A4 เป็นต้น (Soucek P. and Gut I., 1992) ดังนั้นถ้าเอนไซม์เหล่านี้ถูกเหนี่ยวนำโดยสารใดๆ ย่อมบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ที่สารเหนี่ยวนำนั้นจะมีผลเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์ และ/หรือการก่อมะเร็งจากสารแปลกปลอมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมลพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาผลของ VPM ต่อการทำงานของ CYP ได้แก่ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 2E1 ในตับหนูขาว โดยทำการศึกษาแบบ *ex vivo*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาผลของ VPM ต่อ CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

เป็นข้อมูลเบื้องต้นของ VPM ว่ามีผลเหนี่ยวนำและ/หรือยับยั้ง CYP หรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYPs isozymes ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี หรือมลพิษหลายชนิด ในสิ่งแวดล้อม แล้วได้ reactive metabolites ที่มีฤทธิ์สูงขึ้น ทำให้ได้รับข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาว่า VPM มีผลเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์ และ/หรือ การก่อมะเร็ง จากสารแปลกปลอมเหล่านั้นหรือไม่ รวมทั้งเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาการใช้ VPM ร่วมกับยาอื่น

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (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) ของบริษัทวิทยาศรม 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 superspeed centrifuge

Refrigerated 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 VPM) 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 (VPM treatment group 1) ให้ VPM ฉีดเข้าทางหน้าท้อง ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน
4. กลุ่มที่ 4 (VPM treatment group 2) ให้ VPM 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 และฉีดยาน้ำเกลือ (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 microsomal subfractions โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ดังนี้ เติมสารละลายของ cupric sulfate และ Folin-Ciocalteu's phenol reagent ให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีอยู่ใน microsomes ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน

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

2.2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณ total cytochrome P450 ใน microsomes โดยวิธีของ Omura และ Sato (1964) ดังนี้ เตรียมหลอด 2 หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่าง (หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก) ทั้งสองหลอด ใส่ microsomal subfractions (ที่ได้เจือจางให้ได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 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 cytochrome P450 (นาโนโมล/มิลลิกรัมของโปรตีน) จากค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 490 นาโนเมตร โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ $91 \text{ มิลลิโมลาร์}^{-1} \text{ เซนติเมตร}^{-1}$

2.2.3.3 วิเคราะห์หา cytochrome P450 enzyme-substrate 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) โดยใช้วิธีของ Burke และ Mayer (1974) ร่วมกับวิธีของ Lubet 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) UU G6P (5 มิลลิโมลาร์) และ MgCl_2 (3 มิลลิโมลาร์)] microsomal subfractions 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 ที่เกิดขึ้น ด้วย fluorescence spectrophotometer (excitation wavelength เท่ากับ 556 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 589 นาโนเมตร) คำนวณหาปริมาณ resorufin ที่เกิดขึ้นจาก กราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ resorufin เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 1.5 นาโนโมล/ มิลลิลิตร) จากนั้นคำนวณหา activities ของเอนไซม์ (พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)

b. ปฏิกริยา Aniline 4-hydroxylation ใช้ aniline hydrochloride ซึ่งเป็นสับสเตรต ของ CYP 2E1 โดยวิธีของ Schenkman และคณะ (1967) ดังนี้

ในสารผสมที่ทำปฏิกริยา 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)] microsomal subfractions 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 เก็บส่วนที่สมำใช้ในการทำ ปฏิกริยาต่อไป

ในแต่ละครั้งของการวัดค่าการดูดกลืนแสง เตรียมหลอด 2 หลอด (หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก) ในหลอดตัวอย่าง ใส่ส่วนที่ใส่ซึ่งเตรียมได้ข้างต้น 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) ทำปฏิกริยากับ 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 VPM ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

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

ตารางที่ 1 ผลของ VPM ต่อปริมาณ total CYP ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	ปริมาณ total CYP ^(a, b)
1. Control group	0.504 ± 0.060
2. VPA treatment group	0.445 ± 0.065
3. VPM treatment group 1	0.489 ± 0.085
4. VPM treatment group 2	0.556 ± 0.054

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน

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

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

VPM ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา o-dealkylation ของ ethoxyresorufin (EROD) และ methoxyresorufin (MROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 1A1 และ CYP 1A2 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม VPM ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา MROD แต่มีผลเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา EROD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน VPA ในขนาดที่ให้ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities (ตารางที่ 2)

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

VPM ทั้งขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา o-dealkylation ของ benzyloxyresorufin (BROD) และ

pentoxyresorufin (PROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP. 2B1 และ CYP. 2B2. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อัตราเร็วของปฏิกิริยาทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อให้ VPM ในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เทียบกับเมื่อให้ VPM ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในทางตรงกันข้าม VPA ในขนาดที่ให้ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของ VPM ต่อ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน microsomes ของตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	CYP 1A1 activities ^(a, b)	CYP 1A2 activities ^(a, b)	CYP 2B1, CYP 2B2 activities ^(a, b)	
	EROD	MROD	BROD	PROD
1. Control group	34.67 ± 14.24	8.67 ± 2.73	20.67 ± 6.02	1.67 ± 2.66
2. VPA treatment group	45.00 ± 17.10	9.00 ± 1.67	21.33 ± 9.77	4.67 ± 3.01
3. VPM treatment group 1	55.67 ± 16.85	11.67 ± 2.94	225.00 ± 82.93*	34.33 ± 15.92*
4. VPM treatment group 2	62.33 ± 11.62*	8.00 ± 4.90	426.33 ± 138.16*†	81.67 ± 30.71*†

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

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

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

† p < 0.05 VPM treatment group 2 vs VPM treatment group 1

3.4 ผลของ VPM ต่อ CYP 2E1 activity ใน microsomes ของตับหนูขาว

VPM 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 3)

ตารางที่ 3 ผลของ VPM 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. VPM treatment group 1	0.351 ± 0.099
4. VPM treatment group 2	0.438 ± 0.137

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

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

การวิจัยเพิ่มเติม

ผลการทดลองที่พบว่า VPM มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities (ข้อ 3.3, ตารางที่ 2) ไม่สามารถนำมาใช้อธิบายการที่ VPM มีผลเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของหนูที่ได้รับ pentobarbital ที่ได้รับทันที หลังจากให้ VPM เพียง 2 ครั้ง ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่รายงานโดย Namthongsakun T. (2000) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยการศึกษาระบบ *in vitro* ดังนี้ คือ

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

2. เตรียม VPM ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยละลายในสารละลายของ benzyloxyresorufin (ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO อยู่แล้ว) 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 VPM ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลอง พบว่า VPM ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลลดอัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD ในขณะที่ VPM ความเข้มข้น 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ มีผลลดอัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี VPM (ความเข้มข้น VPM เท่ากับ 0 ไมโครโมลาร์) นอกจากนี้ VPM ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ มี

ผลดัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา BROD มากกว่ากลุ่มที่มี VPM ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของ VPM ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ในการศึกษาแบบ *in vitro*

ความเข้มข้นของ VPM (ไมโครโมลาร์)	CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ^(a, b)
1. 0	814.00 ± 88.82
2. 0.1	775.50 ± 85.98
3. 1.0	820.00 ± 64.42
4. 10	746.50 ± 175.05
5. 100	439.00 ± 49.87*
6. 1000	80.00 ± 14.24*†

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

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

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

† $p < 0.05$ VPM (1000 ไมโครโมลาร์) vs VPM (100 ไมโครโมลาร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า การให้ VPM แก่หนูขาวในขนาด ED_{50} ของการต้านชัก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ total CYP ใน microsomes แต่เมื่อวัด activities ของ CYP isoform ต่าง ๆ ด้วยการใส่สับสเตรตจำเพาะ พบว่า VPM มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities และเมื่อเพิ่มขนาดของ VPM แก่หนูขาวเป็น 2 เท่า (200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) พบว่าผลการเหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 สูงขึ้นประมาณ 2 เท่าด้วย แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำเอนไซม์ทั้งสองโดย VPM ขึ้นกับขนาดของสาร (dose-related) อย่างไรก็ตาม VPM ในขนาดที่สูงขึ้นนี้ก็ยังไม่มียผลต่อปริมาณ total CYP วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ total CYP ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมใช้กันมานานนี้ อาจมีความไวไม่สูงนัก หรือ VPM อาจมีผลยับยั้ง CYP บาง isoforms ที่ไม่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ด้วย ทำให้ผลรวมของปริมาณ total CYP ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากการเหนี่ยวนำเอนไซม์นั้นมักเกิดจากการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ โดยกลไกในการเหนี่ยวนำ CYP อาจเกิดจากการกระตุ้น transcription ของเอนไซม์ (transcription activation) ซึ่งจะพบการเพิ่มปริมาณ mRNA หรืออาจเกิดจากการลดอัตราเร็วในการสลายโปรตีนในเอนไซม์ หรือทั้งสองกลไกร่วมกัน (Lin J.H. and Lu A.Y.H., 1998) การตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities เมื่อให้ VPM ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วันแก่หนูขาวนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การศึกษาต่อไปถึงผลของ VPM ต่อปริมาณโปรตีนจำเพาะของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 โดยการตรวจวัดด้วยวิธี Western blot analysis และ ตรวจวัด mRNA ที่ใช้ในการถอดรหัส (encode) ของโปรตีนทั้งสองนี้ การที่พบว่า VPM เหนี่ยวนำ CYP 2B เมื่อให้ VPM ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วันแก่หนูขาว ไม่สามารถอธิบายผลการเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของ barbiturate โดย VPM ในการทดลองของ Namthongsakun T. (2000) ซึ่งฉีด pentobarbital ทางหน้าท้องแก่หนูทันทีหลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับ VPM ทางหน้าท้องเพียงครั้งเดียว ด้วยเหตุที่ pentobarbital ถูกเมแทบอลิซึมโดย CYP 2B ได้เป็นเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์ การที่ให้ VPM พร้อมๆ กับ pentobarbital แล้วทำให้ pentobarbital ถูกเมแทบอลิซึมน้อยลง มีผลให้ฤทธิ์ในการทำให้นอนหลับของ pentobarbital ยาวนานขึ้น แสดงให้เห็นว่า VPM น่าจะมีผลยับยั้ง CYP 2B คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติม โดยการทำ *in vitro* inhibition study พบว่า VPM ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 1000 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้ง CYP 2B activities ควรมีการศึกษาต่อไปในส่วนของการยับยั้งแบบใด (competitive, noncompetitive หรือ uncompetitive inhibition) VPM มีผลเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP 2B ขึ้นกับลักษณะการให้สาร (dosage regimen) แก่สัตว์ทดลองคือ มีผลยับยั้งถ้าให้แบบครั้งเดียว แต่มีผลเหนี่ยวนำถ้าให้สารแก่สัตว์ทดลองเป็นเวลาหลายวัน

มีสารยับยั้ง CYP (CYP inhibitors) หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันนี้ ได้แก่ isosafrol, troleandomycin, erythromycin และ SKF-525A เป็นต้น (Lin J.H. and Lu A.Y.H., 1998)

ในการวิจัยนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ CYP 2B activities เมื่อให้ VPA แก่หนูขาว ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Rogiers V. และคณะ (1995) ที่ไม่พบผลของ VPA ในการเหนี่ยวนำ CYP 2B เมื่อทำการศึกษาแบบ *in vivo* เนื่องจาก VPA มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในหนูขาว สั้นมาก (ประมาณ 10 - 20 นาที) แต่เมื่อทำการศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้ rat hepatocyte cell culture หรือทำการศึกษาแบบ *in vivo* แต่ให้ VPM แก่สัตว์ทดลองโดยการฝัง osmotic minipump ได้ผิวหนังที่หลังของหนูขาว เพื่อรักษาระดับของ VPA ในเลือด พบว่า VPA มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 (Rogiers V. et. al., 1995)

การวิจัยครั้งนี้ไม่พบผลในการเหนี่ยวนำและยับยั้งของ VPM ต่อ activities ของ CYP 2E1 (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation) เมื่อให้ VPM ทั้งขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน เป็นข้อดีของ VPM ที่ไม่มีผลเหนี่ยวนำ CYP 2E1 ทั้งนี้เพราะ CYP 2E1 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงยา สารเคมี และสารแปลกปลอมหลายชนิดได้เมแทบอลิต์ที่มีพิษ ก่อการกลายพันธุ์และ/หรือก่อมะเร็ง ได้แก่ acetaminophen, benzene, carbon tetrachloride, chloroform, nitrosamines และ aromatic amines เป็นต้น (Soucek P. and Gut I., 1992; Gonzalez F.J. and Gelboin H.V., 1994)

เมื่อให้ VPM ในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน แก่หนูขาว ไม่พบฤทธิ์ของ VPM ในการเหนี่ยวนำ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยา ethoxy- และ methoxyresorufin o-dealkylation ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม เมื่อให้ VPM ในขนาดสูงขึ้น คือ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน แก่หนูขาว พบว่า VPM มีผลเหนี่ยวนำ CYP 1A1 activity แต่ยังคงไม่มีผลต่อ CYP 1A2 activity เป็นข้อดีของ VPM ที่ไม่มีผลเหนี่ยวนำ CYP 1A2 ทั้งนี้เพราะ CYP 1A2 เป็น CYP isoform ที่มีทั้งในหนูขาว และในมนุษย์ ในมนุษย์ พบเอนไซม์นี้ในตับถึงประมาณ 13 % ของปริมาณ CYP ทั้งหมด และมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยา และสารแปลกปลอมหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม ได้เป็นเมแทบอลิต์ที่มีพิษ ก่อการกลายพันธุ์และ/หรือก่อมะเร็ง ได้แก่ acetaminophen, สารประกอบกลุ่ม aromatic amines และ heterocyclic amines (Soucek P. and Gut I., 1992; Gonzalez F.J. and Gelboin H.V., 1994) การที่ VPM มีผลเหนี่ยวนำ CYP 1A1 activity แม้ว่าผลเพิ่มจะไม่สูงนัก และต้องให้ VPM ในขนาดสูง เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บ่งชี้ให้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงผลของ VPM ต่อปริมาณโปรตีนจำเพาะของ CYP 1A1 เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาความเป็นไปได้ว่า VPM ในขนาดสูง และให้ติดต่อกันอาจมีผลเพิ่มความเสียหายของการเกิดพิษ การก่อการกลายพันธุ์และ/หรือก่อมะเร็ง จากสารปนเปื้อนหลายชนิดใน

สิ่งแวดลอม ได้แก่ สารประกอบกลุม polycyclic aromatic hydrocarbons สารกลุมนี้ เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดย CYP 1A1 epoxide hydrolase และ CYP 3A4 ตามลำดับ ไดเมแทบอลไลต์สุดท้ายที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลูกอณฑะ เป็นต้น (Hodgson E. and Levi P., 1987)

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในชั้นนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า การให้ VPM ในขนาด ED₅₀ ของการต้านชัก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) แก่หนูขาวเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ หรือ ยับยั้ง CYP 1A1 CYP 1A2 และ CYP 2E1 แต่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 รวมทั้งมีฤทธิ์เหนี่ยวนำเล็กน้อยต่อ CYP 1A1 เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 2 เท่า (200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของ VPM ต่อ CYP 2B1 CYP 2B2 และ CYP 1A1 ในระดับโปรตีน และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสของโปรตีนนี้ อีกทั้งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ในการประเมินความเสี่ยงของ VPM ต่อสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และการประเมินศักยภาพของ VPM ในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ VPM ต่อ CYP isoforms อื่นๆ ที่พบในคนและยังไม่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.
- Gerber, N., Dickinson, R.G., Harland, R.C., Lynn, R.K., Houghton, D., Antonias, J.I. and Schimschock, J.C. Reye-like syndrome associated with valproic acid therapy. J. Pediatr. 95 (1979) : 142-144.
- 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 (1&2) (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

- Lin, J.H. and Lu, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35(1998): 361-390.
- 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.
- Numthongsakun, T. Anticonvulsant activity and CNS effects of Valproyl morpholine. *Master Thesis* Department of physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 2000.
- 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.
- 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., Vercruyse, 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.

Soucek, P. And Gut, I. Review Cytochrome P-450 in rats : Structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22 (1992) : 83-103.

Zimmerman, H.J. and Ishak, K.G. Valproate-induced hepatic injury : Analysis of 23 fetal cases. *Hepatology* 2 (1982) : 591-597.



สถาบันวิทยบริการ
วาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีน* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	33.18	25.78	31.53	25.65	25.15	29.19
2. VPA treatment group	26.12	30.76	20.22	23.29	27.09	25.99
3. VPM treatment group 1	38.42	37.50	24.64	42.13	26.43	26.60
4. VPM treatment group 2	17.27	38.76	32.84	38.84	22.53	37.19

* หน่วยที่แสดงเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ปริมาณ total CYP* ใน microsomes ของตับหนูขาวแต่ละตัว

กลุ่มการทดลอง	หนูขาวตัวที่					
	1	2	3	4	5	6
1. Control group	0.484	0.566	0.544	0.500	0.533	0.398
2. VPA treatment group	0.489	0.361	0.547	0.487	0.406	0.450
3. VPM treatment group 1	0.533	0.462	0.549	0.527	0.484	0.382
4. VPM treatment group 2	0.494	0.505	0.645	0.571	0.549	0.571

* หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน

ตารางที่ 7 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. VPM treatment group 1	60	44	50	46	88	46
4. VPM treatment group 2	62	42	66	58	72	74

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 8 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. VPM treatment group 1	10	8	16	12	14	10
4. VPM treatment group 2	8	4	8	10	2	16

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 9 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. VPM treatment group 1	246	208	260	354	170	112
4. VPM treatment group 2	310	448	526	232	430	610

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 10 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. VPM treatment group 1	16	38	54	50	30	18
4. VPM treatment group 2	60	84	60	50	110	126

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 11 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. VPM treatment group 1	0.467	0.376	0.340	0.373	0.382	0.168
4. VPM treatment group 2	0.188	0.426	0.526	0.410	0.500	0.576

* หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ตารางที่ 12 อัตราเร็วของปฏิกิริยา benzyloxyresorufin o-dealkylation * (CYP 2B1
และ CYP 2B2 activities) ใน microsomes ของตับหนูขาวที่ได้รับ
phenobarbital 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 3 วัน

ความเข้มข้นของ VPM (ไมโครโมลาร์)	หนูขาวตัวที่			
	1	2	3	4
0	695	829	822	910
0.1	662	812	764	864
1.0	728	828	876	848
10	550	652	860	924
100	376	440	442	498
1000	72	68	80	100

* หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที