

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย
ผลของ N-(2-propylpentanoyl)urea ต่อเลนโซมที่ใช้ในเมแทบอลิซึมยาหรือสาร
ในตับหนูขาว

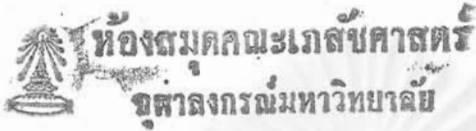
โดย

พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง	กาวินทร์ประเสริฐ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสภาโชลิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัติชัยวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณีรี	ต้นลิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ	ภัทรพานิช

พฤศจิกายน 2542

241ด.3

คณะเภสัชศาสตร์
ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์



รายงานผลการวิจัย

ผลของ N-(2-propylpentanoyl)urea ต่อเอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมยาหรือสาร
ในตับหนูขาว

โดย

พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง	ลาวัณย์ประเสริฐ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสนาโยธิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัตศิวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี	ตันติสิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชานาญ	ภัทรพานิช

พฤศจิกายน 2542

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้อง ดังนี้

- ฝ่ายวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปีการเงิน 2541
- กรรมการติดตามผลและประเมินผลโครงการวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. ประสานธรรมอุปกรณ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ และอาจารย์ ดร. วรางคณา วารีสน้อยเจริญ สำหรับการให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานผลการวิจัย
- ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชเคมี ภาควิชาจุลชีววิทยา และศูนย์เครื่องมือวิจัยเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย
- รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ เภสัชกรหญิงธีรภรณ์ เกียรติโกศลกุล นางสาวปิยดา คุณมาศ นางสาวกัลยา เทิดภูวดล และนายณรงค์ฤทธิ์ กลุ่มมจิตร ในความช่วยเหลือต่าง ๆ จนทำให้การวิจัยดำเนินลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัย

ผลของ N-(2-propylpentanoyl) urea ต่อเอนไซม์ที่ใช้ใน
เมแทบอลิซึมของยาหรือสาร ในตับหนูขาว

ผู้วิจัย

พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง	ลาวัณย์ประเสริฐ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล	กิจสนาโยธิน
รองศาสตราจารย์นวลศรี	นิวัตติ์ยวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี	ตันติลิระ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชานาญ	ภัทรพานิช

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤศจิกายน 2542

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของ เอ็น - (2 - โพรพิลเพนตาโนอิล) ยูเรีย (วีพียู) ต่อเอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของยาหรือสารในตับหนูขาว โดยการฉีควีพียู และวัลโปรอิค แอซิด (วีพีเอ) ในขนาดที่ต้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง แก่หนูขาวเพศผู้ ทางหน้าท้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นฆ่าหนูโดยวิธีดิงคอค แล้วเตรียมไมโครโซม และไซโตซอล จากตับ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไซโตโครมพี 450 รวม และแอกติวิตีของไซโตโครมพี 450 จากไมโครโซม แอคติวิตีของกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส จากไซโตซอล และปริมาณกลูตาไทโอนรวม จากตับ ผลการวิจัยพบว่า ทั้งวีพียูและวีพีเอไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ เหล่านี้ : ปริมาณไซโตโครมพี 450 รวม แอคติวิตีของเอทอกซิ- และ เมทอกซีซีโซลูฟิน โอ-ดีแอลคิเลส (แสดงถึงแอคติวิตีของ CYP 1A1 และ CYP 1A2) แอคติวิตีของอะนิลีน 4-ไฮดรอกซิเลส (แสดงถึงแอคติวิตีของ CYP 2E1) แอคติวิตีของกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส และปริมาณกลูตาไทโอนรวม อย่างไรก็ตามพบว่า วีพียูมีผลเพิ่มแอคติวิตีของเพนทอกซิ-และเบนซิลอซีซีโซลูฟิน โอ-ดีแอลคิเลส (แสดงถึงแอคติวิตีของ CYP 2B1 และ CYP 2B2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของวีพียูต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในระดับโปรตีน และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสของโปรตีนนี้ รวมทั้งผลของวีพียูต่อ CYP isoforms อื่นๆที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของยาในคน และยังไม่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on rat hepatic drug
metabolizing enzymes

Name of the Investigators

Pol. Col. Lt.	Somsong	Lawanprasert, Ph.D
Assistant Professor	Pompimol	Kijsanayotin
Associate Professor	Nuansri	Niwattisaiwong
Assistant Professor	Mayuree	H Tantisira, Ph.D.
Assistant Professor	Chamnan	Patarapanich, Ph.D.

Year November, 1999

Abstract

Effect of N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU) on rat hepatic drug metabolizing enzymes was investigated. Median effective dose of VPU as well as of valproic acid (VPA, the prototype of VPU) were given intraperitoneally to male Wistar albino rats for 7 days. On the day after, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Hepatic microsomal and cytosolic subfractions were isolated. Microsomal total cytochrome P450 contents, microsomal cytochrome P450 enzyme - substrate activities, cytosolic glutathione s-transferase activities and hepatic total glutathione were determined. No effects of VPU and VPA were observed on total cytochrome P450 contents, ethoxy- and methoxyresorufin o-dealkylase activities (representing CYP 1A1 & CYP 1A2 activities), aniline 4-hydroxylase activities (representing CYP 2E1 activities), glutathione s-transferase activities and hepatic total glutathione. However, pentoxy- and benzyloxyresorufin o-dealkylase activities (representing CYP 2B1 & CYP 2B2 activities) were significantly increased by VPU. Effect of VPU 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 2B1 & CYP 2B2 and 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	4
ผลการวิจัย	9
การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	12
เอกสารอ้างอิง	15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total cytochrome P450 ใน rat liver microsomes	9
2 ผลของ VPU ต่อ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน rat liver microsomes	10
3 ผลของ VPU ต่อ CYP 2E1 activity ใน rat liver microsomes	10
4 ผลของ VPU ต่อ GST activities ใน rat liver cytosols	11
5 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total GSH ในตับหนูขาว	11



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ VPA (ซึ่งเป็นสารต้นแบบของ VPU) และ VPU	2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

BROD	=	benzyloxyresorufin o-dealkylation
CDNB	=	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CYP	=	cytochrome P450
DTNB	=	5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EROD	=	ethoxyresorufin o-dealkylation
G6P	=	glucose 6-phosphate
G6PD	=	glucose 6-phosphate dehydrogenase
GSH	=	glutathione (reduced form)
total GSH	=	total glutathione (GSH+GSSG)
GST	=	glutathione s-transferase
HPLC	=	High performance liquid chromatography
MROD	=	methoxyresorufin o-dealkylation
NADP	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
PEG400	=	polyethylene glycol 400
PROD	=	pentoxyresorufin o-dealkylation
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UDPGT	=	uridine- 5'-diphospho-glucuronyltransferase
VPA, วีพีเอ	=	valproic acid
VPU, วีพียู	=	N-(2-propylpentanoyl) urea
4-en VPA	=	2-n-propyl-4-pentenoate
2,4-dien VPA	=	2-n-propyl-2,4-pentadienoate

1. บทนำ

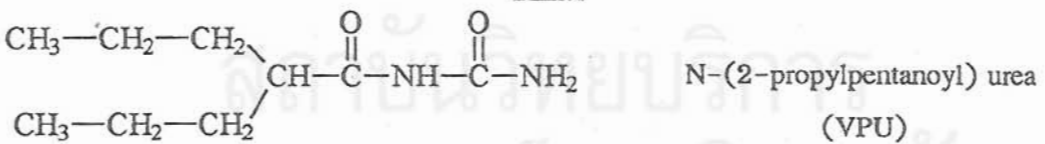
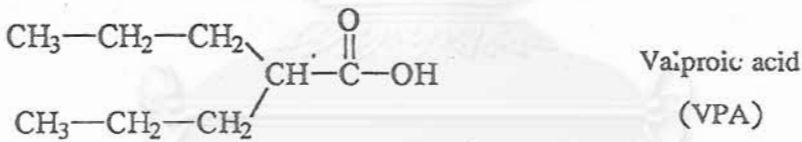
Valproic acid (2-propylpentanoic acid, VPA) (รูปที่ 1) เป็นยาต้านชักตัวหนึ่งที่ใช้ในการรักษาภาวะชักได้หลายลักษณะ ได้แก่ absence, myoclonic, partial และ generalized tonic-clonic seizure (Alldredge, 1992) ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน จะมีการใช้ VPA กันอย่างกว้างขวาง แต่ยานี้ถูกจัดไว้ในกลุ่มยาที่มีฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง และมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์หลายอย่าง ที่สำคัญ ได้แก่ พิษต่อตับ (hepatotoxicity) ทั้งในคนและสัตว์ทดลอง พิษต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ (teratogenicity) (Davis และคณะ, 1994; Jeavons, 1982 ; Sugimoto และคณะ, 1987) ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้พยายามปรับปรุงสูตรโครงสร้างของ VPA เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น และมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์น้อยลง (Bialer และคณะ, 1994)

N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU) (รูปที่ 1) เป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของ VPA ซึ่งสังเคราะห์ขึ้น โดยคณาจารย์ในภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Saisorn และคณะ, 1992) จากการศึกษาต่อมาพบว่า VPU มีความแรงในการต้านชักซึ่งเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้า (maximal electroshock) และด้วย pentylenetetrazol อีกทั้งมีค่าดัชนีความปลอดภัย (therapeutic index, TI) ในสัตว์ทดลองสูงกว่า VPA (Tantisira และคณะ, 1997) เนื่องจาก VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงได้มีการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินการเกิดฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของ VPU และพบว่า VPU มีแนวโน้มที่จะเกิดพิษต่อระบบประสาท (Tantisira และคณะ, 1997) พิษต่อการเจริญเติบโตและพัฒนา (developmental toxicity) ของตัวอ่อน (Meesomboon และคณะ, 1997) ในสัตว์ทดลองต่ำกว่า VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบทั้งสิ้น

จากข้อมูลการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในสัตว์ทดลองของ ^{14}C -VPU โดยใช้เทคนิคการทำ autoradiography พบว่า VPU จะถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารและบริเวณที่ฉีดได้อย่างรวดเร็ว มีการกระจายไปยังสมอง และอวัยวะอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น ตับ ไต หัวใจ ปอด ตลอดจนกล้ามเนื้อในปริมาณสูงและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่า VPU จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น VPA โดยเอนไซม์ carboxylesterase จากตับหนูขาว และตับคนได้น้อยมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านชักของ VPU น่าจะเกิดจากตัว VPU เอง หรือเมแทบอลิต์อื่นๆ ของ VPU ไม่ได้เกิดจาก VPA (Kijsanayotin และคณะ, 1997)

เนื่องจากยาด้านชักหลายชนิด เช่น phenytoin, phenobarbital และ carbamazepine มีฤทธิ์เหนียวน้ำ ในขณะที่ VPA มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในตับ และผลการศึกษาของ Tantisira และคณะ (1997) ที่พบว่า VPU เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของ barbiturate (barbiturate sleeping time) ประกอบกับการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ถึงผลของ VPU ต่อระบบเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) ที่พบว่า VPU มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP 2C9 และ CYP 2A6 ใน microsome จากตับคน (Kijisanayotin และคณะ, 1997) แสดงให้เห็นว่า VPU อาจไปมีผลต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของ barbiturate และเป็นระบบเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและสารเคมีต่าง ๆ จำนวนมาก

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของ VPU ต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญในตับ ได้แก่ เอนไซม์ cytochrome P450 ซึ่งเป็นระบบเอนไซม์ที่สำคัญของเมแทบอลิซึมเฟสหนึ่ง (Phase I metabolism) และผลต่อการทำงานของเอนไซม์ glutathione s-transferase (GST) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งในเมแทบอลิซึมเฟสสอง (Phase II metabolism) โดยการให้ VPU แก่สัตว์ทดลองมากกว่า 1 ครั้ง (multiple dosing) แล้วตรวจวัดผลของยาต่อการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ โดยการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (*ex vivo* study)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ VPA (ซึ่งเป็นสารต้นแบบของ VPU) และ VPU

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาผลของ VPU ในขนาดที่ต้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (median effective dose, ED₅₀) ที่มีต่อ

1. เอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของยาหรือสารในระดับหนูขาว
 - 1.1 เอนไซม์ใน microsomes : ได้แก่ เอนไซม์ cytochrome P 450
 - 1.2 เอนไซม์ใน cytosols : ได้แก่ เอนไซม์ glutathione s-transferase
2. ปริมาณ total glutathione (total GSH) ในระดับหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้ข้อมูลเบื้องต้นว่า VPU ในขนาดที่ต้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง

1. มีคุณสมบัติเป็นสารเหนี่ยวนำ (inducer) หรือสารยับยั้ง (inhibitor) เอนไซม์ที่สำคัญที่มักใช้ในเมแทบอลิซึมของยา หรือสารต่างๆ ทั้งที่อยู่ใน microsomes ได้แก่ CYP และที่อยู่ใน cytosols ได้แก่ GST หรือไม่ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาการใช้ยาร่วมกันระหว่าง VPU กับยาอื่นๆ เพื่อป้องกันการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (drug-drug interaction) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของฤทธิ์ยา
2. มีความปลอดภัยจากพิษที่อาจเกิดขึ้นจากเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ (reactive metabolites)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Albumin bovine, 4-aminophenol, aniline hydrochloride, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, cupric sulfate, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), ethylenediamine tetraacetic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase, glutathione (reduced form), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 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 ของ T. Chemical Ltd. partnership, Thailand

2.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

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

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 (แต่ละกลุ่มใช้หนูขาวกลุ่มละ 6 ตัว) ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม 1 (control group 1) ให้น้ำบริสุทธิ์ผ่านการฆ่าเชื้อสำหรับฉีด (sterile water for injection) ฉีดทางหน้าท้อง (intraperitoneal) เป็นเวลา 7 วัน

2. กลุ่มควบคุม 2 (control group 2) ให้ polyethylene glycol (PEG 400) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลาย VPU ฉีดทางหน้าท้อง เป็นเวลา 7 วัน

3. กลุ่ม VPA (valproic acid treatment group) ให้ VPA ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ฉีดทางหน้าท้อง เป็นเวลา 7 วัน

4. กลุ่ม VPU [N-(2-propylpentanoyl) urea treatment group] ให้ VPU ในขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ฉีดทางหน้าท้อง เป็นเวลา 7 วัน

ในแต่ละครั้งของการทดลอง ใช้หนูครั้งละ 4 ตัว (กลุ่มการทดลองละ 1 ตัว) ซึ่งได้รับยาหรือสารเป็นเวลา 7 วัน ตามที่กล่าวข้างต้น ฆ่าหนูในวันที่ 8 โดยวิธีดึงคอ (cervical dislocation) เปิดหน้าท้อง และฉีดน้ำเกลือ (0.9 % w/v sodium chloride) ที่เย็นจัดเข้าทางเส้นเลือด portal vein จนดับชีวิต ตัดตับออกอย่างรวดเร็ว ล้างด้วยน้ำเกลือ ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก แบ่งตับออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ total GSH อีกส่วนหนึ่งนำมาใช้ในการเตรียม hepatic microsomal และ cytosolic subfractions โดยวิธี differential centrifugation

2.2.2 เตรียม hepatic microsomal และ cytosolic 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 ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน 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 และ cytosols ที่เตรียมได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.3 วิเคราะห์ drug-metabolizing enzymes

2.2.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน microsomal และ cytosolic subfractions โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ดังนี้ เติมสารละลายของ cupric sulfate และ Folin-Ciocalteu's reagent ให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีอยู่ใน microsomes หรือ cytosols ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร โดยใช้ 0.5 โมลาร์ sodium hydroxide แทน microsomes หรือ cytosols เป็นแบล็ก กำหนดหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน [สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (ปริมาณ 0 - 300 ไมโครกรัม) ทำปฏิกิริยากับ cupric sulfate และ Folin-Ciocalteu 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 กำหนดหาปริมาณ 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 methoxyresorufin, ethoxyresorufin, pentoxyresorufin และ benzyloxyresorufin 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) G6P (5 มิลลิโมลาร์) และ MgCl_2 (3 มิลลิโมลาร์)] microsome (มีปริมาณของโปรตีนเท่ากับ 100 ไมโครกรัม) เตรียมสารผสม 3 หลอด สำหรับแต่ละตัวอย่าง (สองหลอดเป็นหลอดตัวอย่าง ส่วนอีกหนึ่งหลอดเป็นแบล็ก)

นำหลอดทดลองทั้งหมดไปอุ่นใน metabolic shaker bath ที่ 37°C เป็นเวลา 2 นาที เติม G6PD (100 หน่วย/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) จากนั้น คำนวณหา activities ของเอนไซม์ (พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)

b. ปฏิกริยา Aniline 4-hydroxylation ใช้ aniline hydrochloride เป็น substrate 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)] microsome (มีปริมาณโปรตีนอยู่ 5 มิลลิกรัม) เตรียมสารผสม 2 หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่าง นำหลอดทดลองทั้งหมดไปอุ่นใน metabolic shaker bath ที่ 37°C เป็นเวลา 2 นาที เติม G6PD (100 หน่วย/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 เก็บส่วนที่ใสมาใช้ในการทำปฏิกริยาต่อไป

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) ทำปฏิกริยากับ phenol และ sodium carbonate เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง] จากนั้นคำนวณหา activities ของเอนไซม์ (นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที)

2.2.3.4 วิเคราะห์ GST activities จาก cytosolic subfractions โดยวิธีของ Warholm และคณะ (1985) ดังนี้

ในแต่ละครั้งของการวัดค่าการดูดกลืนแสง เตรียมเซลล์ (cuvette) 2 เซลล์ เซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ตัวอย่าง อีกเซลล์หนึ่งเป็นแบล็ก ใส่สารผสมที่ทำปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร [ประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 6.5 890 ไมโครลิตร (มี EDTA อยู่ 1 มิลลิโมลาร์) 20 มิลลิโมลาร์ GSH 50 ไมโครลิตร และ 20 มิลลิโมลาร์ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) .50 ไมโครลิตร] ลงในเซลล์ทั้งสอง เติม sodium phosphate buffer pH 6.5 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์แบล็ก ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม cytosolic subfractions 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยเร็ว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหา activities ของเอนไซม์ (นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที) โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ $9.6 \text{ มิลลิโมลาร์}^{-1} \text{ เซนติเมตร}^{-1}$

2.2.4 วิเคราะห์ total GSH ในตับ โดยใช้วิธีของ Sedlak และ Lindsay (1968) ดังนี้

บดป่นตับให้ละเอียดใน 0.1 โมลาร์ Tris buffer pH 7.4 ให้ได้สารแขวนลอยของตับในความเข้มข้น 20 % w/v นำสารแขวนลอยของตับมา 1 มิลลิลิตร เติม 10 % w/v trichloroacetic acid 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปปั่นแยกที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่ใสมาใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อไป

ในแต่ละครั้งของการวัดค่าการดูดกลืนแสง เตรียมเซลล์ 2 เซลล์ เซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ตัวอย่าง อีกเซลล์หนึ่งเป็นแบล็ก ใส่ 0.4 โมลาร์ Tris buffer pH 8.9 3 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิโมลาร์ DTNB [5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)] ใน absolute methanol 100 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ทั้งสอง เติม 0.4 โมลาร์ Tris buffer pH 7.4 200 ไมโครลิตร ลงในเซลล์แบล็ก ผสมให้เข้ากัน แต่เติมส่วนที่ใสของตับที่เตรียมไว้ข้างต้น 200 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน วัดปริมาณ 2-nitro-5-thiobenzoic acid ที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer ที่ 412 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ GSH (นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน, ไมโครโมล/กรัมของตับ) จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้ GSH เป็นสารมาตรฐาน [สารละลายมาตรฐาน GSH (ความเข้มข้น 0 - 1 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) ทำปฏิกิริยากับ DTNB เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง]

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

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total cytochrome P450 ใน rat liver microsome

เมื่อให้ PEG 400 (กลุ่มควบคุม 2) ซึ่งเป็นตัวทำลายของ VPU แก่หนูขาว พบว่า PEG 400 ไม่มีผลต่อปริมาณ total cytochrome P450 เทียบกับเมื่อให้น้ำบริสุทธิ์ผ่านการฆ่าเชื้อ สำหรับฉีด(กลุ่มควบคุม 1) ในทำนองเดียวกันทั้ง VPU และ VPA (เมื่อให้ในขนาด ED₅₀ ของการต้านชัก เป็นเวลา 7 วัน) ไม่มีผลต่อปริมาณ total cytochrome P450 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total cytochrome P450 ใน rat liver microsomes

กลุ่มการทดลอง	ปริมาณ total cytochrome P450 ^(a, b)
1. กลุ่มควบคุม 1	0.620 ± 0.031
2. กลุ่มควบคุม 2	0.639 ± 0.031
3. กลุ่ม VPA	0.534 ± 0.026
4. กลุ่ม VPU	0.621 ± 0.031

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล / มิลลิกรัมโปรตีน

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

3.2 ผลของ VPU ต่อ CYP 1A1 และ CYP1A2 activities ใน rat liver microsomes

PEG 400 ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา o-dealkylation ของ ethoxyresorufin (EROD) และ methoxyresorufin (MROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 1A1 และ CYP 1A2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 เช่นเดียวกัน VPA และ VPU ก็ไม่มีผลต่อ CYP 1A1 และ CYP 1A2 activities เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 (ตารางที่ 2)

3.3 ผลของ VPU ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน rat liver microsomes

PEG 400 ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา o-dealkylation ของ benzyloxyresorufin (BROD) และ pentoxyresorufin (PROD) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย CYP 2B1 และ CYP 2B2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และพบว่า VPU มีผลเพิ่ม activities ของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 ต่างกับ VPA ซึ่งไม่พบผลการเปลี่ยนแปลงต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของ VPU ต่อ CYP 1A1 CYP 1A2 CYP 2B1 และ CYP 2B2 activities ใน rat liver microsomes

กลุ่มการทดลอง	CYP 1A1, CYP 1A2 activities ^(a, b)		CYP 2B1, CYP 2B2 activities ^(a, b)	
	EROD	MROD	BROD	PROD
1. กลุ่มควบคุม 1	60.67 ± 8.27	22.00 ± 3.76	28.67 ± 4.81	5.00 ± 0.86
2. กลุ่มควบคุม 2	58.33 ± 8.07	14.33 ± 2.80	27.00 ± 4.73	2.33 ± 1.31
3. กลุ่ม VPA	57.33 ± 10.46	19.33 ± 3.68	28.67 ± 8.89	3.00 ± 1.44
4. กลุ่ม VPU	70.33 ± 7.14	20.00 ± 3.58	68.33 ± 10.20*	9.67 ± 0.95*

(a) หน่วยที่แสดงเป็น พิโคโมล / มิลลิกรัมโปรตีน / นาที

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

* $p < 0.05$ VPU vs กลุ่มควบคุม 1 และ 2

3.4 ผลของ VPU ต่อ CYP 2E1 activity ใน rat liver microsomes

PEG 400 ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา aniline 4-hydroxylation ซึ่งใช้วัด activity ของ CYP 2E1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 เช่นเดียวกัน VPU และ VPA ก็ไม่มีผลต่อ CYP 2E1 activity เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของ VPU ต่อ CYP 2E1 activity ใน rat liver microsomes

กลุ่มการทดลอง	CYP 2E1 activity ^(a, b)
1. กลุ่มควบคุม 1	0.259 ± 0.017
2. กลุ่มควบคุม 2	0.295 ± 0.029
3. กลุ่ม VPA	0.210 ± 0.015
4. กลุ่ม VPU	0.272 ± 0.028

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล / มิลลิกรัมโปรตีน / นาที

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

3.5 ผลของ VPU ต่อ GST activities ใน rat liver cytosols

PEG 400 ไม่มีผลต่อ GST activities ใน cytosolic subfractions เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 เช่นเดียวกันทั้ง VPU และ VPA ก็ไม่มีผลต่อ GST activities เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของ VPU ต่อ GST activities ใน rat liver cytosols

กลุ่มการทดลอง	GST activities ^(a, b)
1. กลุ่มควบคุม 1	919.08 ± 111.84
2. กลุ่มควบคุม 2	996.00 ± 97.06
3. กลุ่ม VPA	969.20 ± 95.27
4. กลุ่ม VPU	889.24 ± 74.89

(a) หน่วยที่แสดงเป็น นาโนโมล / มิลลิกรัมโปรตีน / นาที

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

3.6 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total GSH ในตับหนูขาว

PEG 400 ไม่มีผลต่อปริมาณ total GSH ในตับหนูขาว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 เช่นเดียวกันทั้ง VPU และ VPA ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อปริมาณ total GSH ในตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 1 และ 2 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ VPU ต่อปริมาณ total GSH ในตับหนูขาว

กลุ่มการทดลอง	total GSH ^(a)	
	นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน	ไมโครโมล/กรัมของตับ
1. กลุ่มควบคุม 1	30.25 ± 2.02	6.62 ± 0.43
2. กลุ่มควบคุม 2	30.17 ± 0.69	6.52 ± 0.31
3. กลุ่ม VPA	34.77 ± 1.45	7.01 ± 0.20
4. กลุ่ม VPU	34.19 ± 1.78	7.14 ± 0.24

(a) ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (n=6)

4. การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ยาด้านชักส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมักมีปฏิกิริยาเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ไม่ว่าจะเกิดกับยาในกลุ่มยาด้านชักด้วยกันหรือกับยากลุ่มอื่น สาเหตุของปฏิกิริยาระหว่างกันมักเกิดในกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ เช่น การเกิดการเหนี่ยวนำหรือการยับยั้งของเอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของยาหรือสารในตับ และการแย่งกันจับกับพลาสมาโปรตีน (plasma protein-binding displacement) ในกรณีของการเหนี่ยวนำเอนไซม์ จะมีผลเพิ่มอัตราเมแทบอลิซึมของยาอื่น ทำให้นั้นมีฤทธิ์ในการรักษาลดลง ในทางตรงกันข้าม ถ้ายาอื่นถูกเปลี่ยนแปลงแล้วได้เมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ ผลที่เกิดคือทำให้ยานั้นมีฤทธิ์มากขึ้นหรือเกิดพิษขึ้นจากยานั้น ตัวอย่างของยาด้านชักที่เป็นสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ ได้แก่ phenobarbital, primidone และ phenytoin เป็นสารเหนี่ยวนำของ CYP 2C CYP 3A และ uridine-5'-diphospho-glucuronyltransferase (UDPGT) เป็นต้น ในกรณีของการยับยั้งเอนไซม์มักเกิดจากการที่ยาไปแย่งกับยาอื่นในการจับที่ตำแหน่งเดียวกันบนเอนไซม์ (enzyme substrate binding site) มีผลทำให้ยาอื่นถูกเปลี่ยนแปลงช้าลง ฤทธิ์ของยาอื่นจึงเพิ่มขึ้นหรือลดลงแล้วแต่กรณี ตัวอย่างของยาด้านชักที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ได้แก่ VPA เป็นสารยับยั้ง CYP 2C9 UDPGT และ epoxide hydrolase เป็นต้น (Anderson, 1998) โดยมีข้อมูลรายงานปฏิกิริยาระหว่างกันของการใช้ VPA ทางคลินิกและการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่า VPA มีฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมของยาที่เป็นสับสเตรตของ CYP 2C9 ได้แก่ phenobarbital และ phenytoin (Hurst และคณะ, 1997 ; Scheyer และ Mattson, 1995)

การที่ VPU ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของ VPA มีฤทธิ์เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของ babilurate เป็นเครื่องบ่งชี้ว่า VPU อาจเสริมฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางของ babilurate หรืออาจมีผลเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP เพื่อตอบคำถามนี้ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโดยการให้ยาแก่หนูชุกร เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทำการตรวจวัดผลของยาต่อ activities ของ CYP ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งของการวิจัยและพัฒนายาใหม่ในกลุ่มยาด้านชักที่แนะนำโดย The Anticonvulsant Screening Project (ASP) ของ Antiepileptic Drug Development Program (Cereghino และ Kupferberg, 1993) ขนาดของ VPU และ VPA ที่ให้ คือ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาด ED₅₀ ของการต้านชักเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้า (Tantisira และคณะ, 1997)

สับสเตรตจำเพาะ (specific substrates) ที่ใช้ในปฏิกิริยาเพื่อตรวจวัด activities ของ CYP แต่ละ isoform ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ alkoxyresorufins ต่าง ๆ เช่น ethoxyresorufin และ methoxyresorufin เป็นสับสเตรตจำเพาะสำหรับ CYP 1A1 และ CYP 1A2 (Rodrigues และ

Prough, 1991) pentoxy- และ benzyloxyresorufin เป็นสับสเตรตจำเพาะสำหรับ CYP 2B1 และ CYP 2B2 (Burke และคณะ, 1985) และ aniline hydrochloride เป็นสับสเตรตจำเพาะของ CYP 2E1 (Yang และคณะ, 1991)

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า การให้ VPU แก่หนูขาว ในขนาด ED_{50} ของการต้านชัก ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ total CYP ใน microsomes แต่เมื่อวัด activities ของ CYP isoform ต่าง ๆ ด้วยการให้สับสเตรตจำเพาะ พบว่า VPU เพิ่มอัตราเร็วของ pentoxy- และ benzyloxyresorufin o-dealkylation ซึ่งใช้ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในการเร่งปฏิกิริยา แม้ว่าจะเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การเหนี่ยวนำที่เกิดขึ้นไม่มากนัก เมื่อเทียบกับ phenobarbital ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 (ข้อมูลไม่ได้แสดงในการศึกษานี้) การที่ VPU มีฤทธิ์อ่อนในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ VPU ถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วหลังการดูดซึม (Kijisanayotin และคณะ, 1997) การเหนี่ยวนำที่เกิดขึ้นเล็กน้อยเช่นนี้อาจไม่สูงพอให้เห็นความแตกต่างเมื่อพิจารณาในภาพรวมของปริมาณ total CYP ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีที่มีความไวไม่สูงนัก เนื่องจากการเหนี่ยวนำเอนไซม์ นั้นมักเกิดจากการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ โดยกลไกในการเหนี่ยวนำ CYP อาจเกิดจากการกระตุ้น transcription ของเอนไซม์ (transcription activation) ซึ่งจะพบการเพิ่มปริมาณ mRNA หรืออาจเกิดจากการลดอัตราเร็วในการสลายโปรตีนในเอนไซม์ หรือทั้งสองกลไกร่วมกัน (Lin และ Lu, 1998) การตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ CYP 2B1 และ CYP2B2 activities เมื่อให้ VPU ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน แก่หนูขาวนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การศึกษาต่อไปถึงผลของ VPU ต่อปริมาณโปรตีนจำเพาะของ CYP 2B1 และ CYP 2B2 โดยการตรวจด้วยวิธี Western blot analysis และตรวจวัด mRNA ที่ใช้ในการถอดรหัส (encode) ของโปรตีนทั้งสองนี้ ด้วยวิธี Northern/Slot blot analysis ในการวิจัยนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ CYP 2B activities เมื่อให้ VPA แก่หนูขาว ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Rogiers และคณะ (1995) ที่ไม่พบฤทธิ์ของ VPA ในการเหนี่ยวนำ CYP 2B เมื่อทำการศึกษาแบบ *in vivo* เนื่องจาก VPA มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในหนูขาวสั้นมาก (ประมาณ 10-20 นาที) แต่เมื่อทำการศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้ rat hepatocyte cell culture พบว่า VPA มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ CYP 2B1 และ CYP 2B2 (Rogiers และคณะ, 1995) การที่พบว่า VPU เหนี่ยวนำ CYP 2B เป็นไปได้ว่า VPU อาจถูกเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์นี้ (ทั้งนี้เพราะโดยทั่วไปสารใด ๆ มักจะเหนี่ยวนำ CYP isoform ชนิดที่จำเพาะที่ใช้ในเมแทบอลิซึมตัวมันเอง) อาจนำไปใช้ในการอธิบายการเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของ barbiturate โดย VPU ในการทดลองของ Tantisira และคณะ (1997) ซึ่งฉีด pentobarbital ทางหน้าท้องแก่หนูทันทีหลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับ VPU ทางหน้าท้องเพียงครั้งเดียว ทั้ง VPU และ pentobarbital อาจแข่งขันกันแย่งตำแหน่งที่จับตำแหน่งเดียวกันบนเอนไซม์ CYP 2B มีผลลดอัตราเมแทบอลิซึมของ pentobarbital (ในสัตว์ทดลอง ยากลุ่ม barbiturate ถูกเมแทบอลิซึมเป็นเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์โดย CYP 2B1 และ CYP 2B2) ทำให้ pentobarbital มีฤทธิ์ยาวนานขึ้น

ความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งที่อาจใช้อธิบายว่า การที่ VPU เพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับของ barbiturate ก็คือการที่ VPU ยับยั้ง CYP 2C9 (Kijsanayothin และคณะ, 1997) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเมแทบอลิซึม barbiturate (Anderson, 1998) VPU และ barbiturate อาจแข่งขันกันในการจับที่ตำแหน่งเดียวกันบนเอนไซม์ CYP 2C9 หรืออีกนัยหนึ่งคือ CYP 2C9 อาจเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในเมแทบอลิซึมของ VPU คล้ายๆ กับ VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบ มีรายงานว่า VPA ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่มีฤทธิ์ (bioactivated) โดย CYP 2B (Baillie, 1988) CYP 2C9 และ CYP 2A6 (Sadeque และคณะ, 1997) ได้ 4-en-VPA และ 2,4-dien-VPA ที่เข้าใจว่าเป็นเมแทบอลิต์ที่มีพิษต่อดับ (Granneman และคณะ, 1984 ; Kesterson และคณะ, 1984)

การวิจัยนี้ไม่พบผลในการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งของ VPU ต่อ activities ของเอนไซม์เหล่านี้ใน microsomes : CYP 1A1 และ CYP 1A2 (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ ethoxy- และ methoxyresorufin o-dealkylation) CYP 2E1 (ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ aniline 4-hydroxylation) เช่นเดียวกัน ไม่พบผลของ VPU ต่อ glutathione s-transferase activities ใน cytosols และปริมาณ total GSH ในตับ เนื่องจาก GST ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งในเมแทบอลิซึมเฟสสอง ที่อาจถูกเหนี่ยวนำ หรือถูกยับยั้งได้ มีผลทำให้ความเป็นพิษต่อดับจากเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์อาจลดลง หรือเพิ่มขึ้น ตามลำดับ ผลการวิจัยครั้งนี้ VPU ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง GST activity และ total GSH ในตับ แสดงให้เห็นว่า VPU ในขนาด ED₅₀ ของการต้านชักน่าจะมีความปลอดภัย จากความเป็นพิษต่อดับที่อาจเกิดขึ้นจากเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ของ VPU ซึ่งเคยมีรายงานว่า เมื่อให้ VPU ในขนาดสูง พบการลดลงของปริมาณ total GSH ในตับ และมีพยาธิสภาพของตับเกิดขึ้น (Patchamart, 1996)

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในขั้นนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า การให้ VPU ในขนาด ED₅₀ ของการต้านชักแก่หนูขาวเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำ หรือ ยับยั้ง CYP 1A1 CYP 1A2 และ CYP 2E1 แต่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเล็กน้อยต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของ VPU ต่อ CYP 2B1 และ CYP 2B2 ในระดับโปรตีน และ mRNAs ที่ใช้ในการถอดรหัสของโปรตีนนี้ อีกทั้งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ในการประเมินศักยภาพของ VPU ในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ VPU ต่อ CYP isoforms อื่นๆ ที่พบในคนและยังไม่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Allredge, K.B. Seizure disorders. In T. Herfindal, E.D. Gourley and L.Lloyd Hart (eds.), Clinical Pharmacy and Therapeutics, 5th ed., Baltimore : William & Wilkins, 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-pentanoic 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.
- Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T. and Mayer, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues : A series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450 Biochem. Pharmacol. 34 (1985) : 3337-3345.
- Cereghino, J.J. and Kupferberg, H.J. Preclinical testing, In J.A. French, M.A. Dichter and I.E. Leppik. (eds.) New Antiepileptic Drug Development : Preclinical and Clinical Aspect. pp. 19-30. Elsevier Science Publishers, 1993.
- Davis, R., Peters, D.H., and McTavish, D., Valproic acid : A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. Drugs 47(1994): 332-372.
- Granneman, G.R., Wang, S., Kesterson, J.W. and Machinist, J.M. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. II. Intermediary and valproic acid metabolism. Hepatology 4(1984) : 1153-1158.

- Hurst, S.I., Labroo, R., Carlson, S.P., Mather, G.G. and Levy, R.H. In vitro inhibition profile of valproic acid for cytochrome P-450 (abstract). Int. Soc. Stud. Xenobiotics Proc. (1997) : 12-64.
- Jeavons, P.M. Valproate : Toxicity, In D.M. Woodbury, J.K. Penry, and C.E. Pippenger (eds.) Antiepileptic drugs 2nd ed., pp. 601-610. New York : Raven Press, 1982.
- Kesterson, J.W., Granneman, G.R. and Machinist, J.M. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. I. Toxicologic, biochemical and histopathologic studies. Hepatology 4(1984) : 1143-1152.
- Kijsanayotin, P., Hayama, E., Nanbo, T., Patarapanich, C., Satoh, T. and Shigematsu, A., Preclinical pharmacokinetic evaluation of N-(2-propylpentanoyl) urea : a new anticonvulsant analogue of valproic acid. Presentation in Annual Meeting of American Society of Whole body Autoradiography, Ann Arbor, Michigan, U.S.A., 21-23 September 1997.
- 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.
- Meesomboon, R., Chongsutkawee Wong, R., Tantisira, M.H., Patarapanich, C. and Rodesitisuk, P. (1997). Investigation of embryotoxicity of N-(2-propylpentanoyl) urea in developing rat embryos in vitro. Final report to the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.
- 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.

- Patchamart, W. Hepatotoxicity of N-(2-propylpentanoyl)urea in rats. Thesis for the Master degree of Science, Inter-Department of Pharmacology, Graduate School, Chulakongkorn University, 1996.
- Rodrigues, A.D. and Prough, R.A. Induction of cytochrome P450 1A1 and P450 1A2 and measurement of catalytic activities. *Method in Enzymology* 206(1991) : 423-431.
- Rogiers, V., Akrawi M., Vercruyse, A., Phillips, I.R. and Shephard. E.A. Effect of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of 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 CYP2C9 and CYP2A6 mediated formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (1997) : 698-703.
- Saisorn, B., Patarapanich, C., and Janwitayanuchit, W. (1992). Synthesis of monoureide analogues of valproic acid. *Thai J. Pharm. Sci.* 16(2) : 145-150.
- 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.
- Scheyer, R.D. and Mattson, R.H. Valproate : Interactions with other drugs. In : R.H. Levy, R.H. Mattson, B.S. Meldrum (eds.) *Antiepileptic drugs* 4thed., pp 621-631. New york : Raven Press, 1995.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Chem.* 25(1968): 192-205.
- Sugimoto T., Woo, M., Nishida, N., Takeuchi, T., Sakane, Y., and Kobayashi, Y. Hepatotoxicity in rat following administration of valproic acid. *Epilepsia* 28(1987): 142-146.

Tantisira, B., Tantisira, M.H., Patarapanich, C. Sooksawate, T. and Chunggam, T.
Preliminary evaluation of anticonvulsant activity of a valproic analogues :
N-(2- propylpentanoyl) urea. Res. Comm. Molec. Pathol. Pharmacol.
97 (1997) : 51-62.

Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C. and Mannervik , B. Glutathione transferases
from human liver. Method in Enzymology. 113(1985): 499-504.

Yang, C.S., Patten, C.J., Ishizaki, H. and Yoo, J.S.H Induction, purification, and
characterization of cytochrome P450IIE. Method in Enzymology 26 (1991) :
595-603.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย