

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Valproic acid เป็นยาด้านชักที่ใช้กันแพร่หลายมานาน แต่พบว่ามีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง คือ ทำให้เกิดพิษต่อตับจึงได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษต่อตับ และศึกษาค้นคว้าหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ด้านชักได้ดี แต่มีผลข้างเคียงน้อย เอ็น - (2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (VPU) เป็นสารตัวหนึ่งที่มีฤทธิ์ด้านชักได้ดี จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดพิษต่อตับ และกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ในการทำให้เกิดพิษ

การศึกษา in vivo

1. ผลการศึกษาขนาดของ เอ็น - (2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรียที่ทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว

จากการศึกษาของ Lewis และคณะ (1982) พบว่า valproic acid ในขนาดสูง 700-750 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เมื่อให้ครั้งเดียวทางได้มิดหนึ่ง ทำให้หนูขาวตายในเวลา 2 วัน และทำให้เกิด microvesicular steatosis บริเวณ peripheral zone (Rappaport zone 1) แต่ valproic acid ขนาด 350 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่พบ microvesicular steatosis จึงเป็นไปได้ว่าการเกิดพิษต่อตับของ valproic acid น่าจะสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับ

ต่อมา Kesterson และผู้ร่วมงาน (1984) พบว่า เมื่อให้ valproic acid ทางช่องท้องเป็นเวลา 5 วัน ทำให้ activities ของเอนไซม์ transaminases เปลี่ยนแปลง โดยทำให้ activity ของ SGPT ลดลง แต่ไม่มีผล SGOT และทำให้เกิด microvesicular steatosis เช่นกัน

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่า เอ็น - (2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (VPU) ในขนาด 700 และ 1,400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทำให้ activity ของเอนไซม์ SGPT ในซีรัม สูงขึ้นหลังได้รับ VPU 48 และ 72 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ SGOT VPU ขนาด 1,400 มิลลิกรัม

ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับโดยเกิด fat vacuolar degeneration บริเวณ periportal area เช่นเดียวกับ VPA VPU ขนาด 700 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีการทำลายของเซลล์ตับน้อยกว่า และพบว่ามี regeneration ของเซลล์ บริเวณ periportal area อาจเป็นไปได้ว่า VPU ทำให้เกิดพิษต่อตับได้เช่นเดียวกับ VPA โดยการเกิดพิษต่อตับของ VPU น่าจะมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับเช่นเดียวกับ VPA ส่วนกลไกการเกิดพิษต่อตับของ VPU นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด สำหรับ VPA นั้นเชื่อว่าการเกิดพิษต่อตับเกิดจาก reactive metabolites ของ VPA (Zafrani and Berthelot, 1982)

2. การศึกษาผลของเอนไซม์อินดิคเซอร์ที่มีต่อการเกิดพิษของ เอ็น - (2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ในหนูขาว

Phenobarbital (PB) เป็นเอนไซม์อินดิคเซอร์ของ mixed function oxidases และ clofibrate (CF) เป็นเอนไซม์อินดิคเซอร์ที่จำเพาะต่อ cytochrome P-450 dependent fatty acid ω - และ ω -1 hydroxylases ของ fatty acid β - oxidation (Porubek et al., 1988) Phenobarbital และ clofibrate ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลง activity ของเอนไซม์ SGOT และ SGPT แต่เมื่อให้ valproic acid ร่วมกับ clofibrates SGPT activity ลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่า phenobarbital และ clofibrate เมื่อให้รวมกันกับ VPU ไม่สามารถชักนำให้เกิดพิษต่อตับเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับพิษต่อตับที่เกิดจาก VPU เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้คงจะมาจากการที่ phenobarbital และ clofibrate ไปเพิ่ม activity ของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลง VPU เป็น metabolites ที่อาจจะไม่ก่อให้เกิดพิษทันทีในหนูขาว ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่น่าเสนอโดย Powell-Jackson, et al. ในปี 1984 ที่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของพิษต่อตับเมื่อ pretreat หนูขาว ด้วย phenobarbital และ clofibrate ตามด้วยการให้ toxic single dose ของ sodium valproate หรืออาจจะมาจากการที่ phenobarbital และ clofibrate กระตุ้นเอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยนแปลง VPU เป็น reactive metabolites และขณะเดียวกันก็กระตุ้น excretion ของ metabolites ที่เกิดขึ้นด้วย คล้ายกับที่รายงานของ Heinemeyer, et al. ในปี 1985 ที่พบว่า phenobarbital และ clofibrate สามารถกระตุ้น excretion ของ metabolites ที่เกิดจาก VPA ได้

การศึกษา in vitro

1. การศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมของ VPU ที่ทำให้เกิดพิษ

จากการศึกษาของ Vance และผู้ร่วมงาน (1994) ที่ศึกษาใน monolayers culture ใช้ขนาดของ VPA 3 mM ก็ทำให้เกิดพิษต่อตับ โดยทำให้ระดับของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เพิ่มขึ้น

การลดลงของระดับ reduced glutathione (GSH) เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่จะบ่งชี้ถึงการเกิดพิษต่อตับ คือ เมื่อมีสารที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ตับ เช่น bromobenzene จะทำให้ glutathione ลดลง เนื่องจาก GSH จะจับกับสารนั้นๆ หรือ metabolites ที่เป็น electrophilic ของมันได้เป็น glutathione conjugates GSH นอกจากจะทำหน้าที่เป็น adduct ดังตัวอย่างข้างต้นแล้วยังทำหน้าที่เป็น reductant เช่นในกรณีของ t-butylhydroperoxide จะชักนำให้เกิด oxidation ของ reduced glutathione การลดลงของ glutathione เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิด oxidative stress ของเซลล์ตับ ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ตับได้ (Thomas and Jones, 1986)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ VPU ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2, 3 และ 4 mM พบว่ามีข้อจำกัดสำหรับสารนี้ในเรื่องการละลาย จึงเลือกใช้ขนาดที่สูงที่สุด คือ 3 mM ส่วนที่ความเข้มข้น 4 mM ละลายไม่ได้ และการลดระดับของ GSH ก็ใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 3 mM เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป การที่ VPU มีผลเด่นชัดในการไปลด reduced glutathione (GSH) content และทำให้ activities ของ transaminases สูงขึ้น เมื่อให้เวลาสัมผัสกับเซลล์นาน 1 และ 2 ชั่วโมงนั้น แสดงว่า VPU มีผลไปทำอันตรายต่อเซลล์ตับได้เมื่อใช้ในขนาด 3 mM และจากการที่ VPU ทำให้ระดับของ reduced glutathione ลดลง อาจมีความเป็นไปได้ว่า มี metabolic product ของ VPU ที่อาจมีความเป็น electrophilic เกิดขึ้น ทำให้จับกับ GSH ที่มีความเป็น neutrophilic จึงเป็นผลให้ GSH ลดลง

2. การศึกษากลไกการเกิดพิษต่อตับ (ในเซลล์ตับอิสระ)

จากการศึกษาการเกิด covalent binding ของ VPA และ toxic metabolites ใน rat liver homogenate พบว่า 4-pentenoic acid ซึ่งเป็นเอนไซม์อินฮิบิเตอร์ที่จำเพาะต่อ β -oxidation ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถยับยั้งการเกิดของ covalent binding ได้ และ metyrapone 1 mM ซึ่งจำเพาะต่อ ω -oxidation ไม่มีผลในการยับยั้งการเกิดของ covalent binding (Porubek et al., 1988)

การศึกษาถึงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ของ VPU ในการทำให้เกิดพิษต่อตับนั้น ได้เลือกใช้เอนไซม์อินฮิบิเตอร์ที่จำเพาะต่อ β - oxidation คือ 4 - pentenoic acid และ ω - oxidation คือ metyrapone ในความเข้มข้นที่ เท่ากัน คือ 1 mM ซึ่งเท่ากับที่ได้มีผู้รายงานไว้ จากผลการทดลอง 4 - pentenoic acid และ metyrapone ไม่สามารถยับยั้งการเกิดพิษต่อเซลล์ตับจาก VPU ได้นอกจากนี้ยังทำให้เอนไซม์ transaminases สูงขึ้น แสดงว่ายังคงเกิดพิษต่อเซลล์ตับอยู่ ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ว่ากลไกที่ทำให้เกิดพิษต่อตับของ VPU นั้น อาจจะมาจก metabolites ใน pathway ที่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย 4 - pentenoic acid และ metyrapone

สรุปและข้อเสนอแนะ

เอ็น - โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (VPU) ทำให้เกิดพิษต่อตับได้ทั้งในหนูขาวและเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาวซึ่งต้องใช้ในขนาดที่สูง การเกิดพิษของ VPU ทำให้ transaminases activity ที่ปล่อยออกจากเซลล์ตับสูงขึ้น GSH ลดลง การให้ VPU ร่วมกับเอนไซม์อินฮิบิเตอร์ และเอนไซม์อินฮิบิเตอร์ ไม่ทำให้การเกิดพิษต่อตับเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบ เทียบกับการเกิดพิษต่อตับจาก VPU เพียงอย่างเดียว

จากการศึกษายังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษต่อตับของ VPU แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับ metabolic product ของ VPU ซึ่งอาจจะมีความเป็น electrophilic คล้ายกับ VPA ที่เชื่อว่ากลไกที่ทำให้เกิดพิษต่อตับได้นั้นมาจากการได้รับ VPA ในขนาดสูง ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลง β - oxidation จะได้ toxic metabolites ที่ทำให้เกิดพิษขึ้น ดังนั้นในการศึกษาต่อไปน่าจะศึกษาพิษต่อตับของ VPU ในลักษณะของการให้แบบ chronic และน่าจะศึกษาถึง metabolic pathways และ metabolites ของ VPU เพื่อเป็นแนวทางที่จะทำให้เข้าใจกลไกการเกิดพิษต่อตับของ VPU ต่อไปได้