



# Thai Journal of Pharmacology

www.phartherst.or.th

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of  
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

## RESEARCH ARTICLES

## Contents

Subchronic Exposure of *Pueraria Mirifica* in Normal- and High Cholesterol Diet-fed Rats : Influence on Lipid Profile and Toxicity

Chronic Toxicity of *Pueraria mirifica* in Rats

Effects of Valproyl Urea on Neurons of The Cerebral Cortex and Cerebellar Purkinje Cells in Rats

Topical Pimecrolimus 1% Cream in Treatment of Oral Lichen Planus

Subacute Effects of *Coscinium fenestratum* Ethanol Extract on Blood Glucose Level, Lipid Profiles and Blood Chemistry in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

## REVIEWS

Medicinal Plants in Tipitaka

Buprenorphine as an Alternative for Treatment of Opioid Dependence

Koi : Medicinal plant for oral hygiene

## DRUGS

Medroxyprogesterone Acetate and Anticancer Effect

Cytarabine

May-Dec 2005, Vol. 27, No. 2-3

ISSN 0125-3832



# Thai Journal of Pharmacology

is owed and published every four months by the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

---

## Board of Editors

<b>Editor</b>	Supatra Srichairat	
<b>Associate Editors</b>	Pravit Akarasereenont	Laddawal Phivthong-ngam
	Somjai Nakornchai	

## **Editorial Board**

Adisak Wongkajornsilp	Nisamanee Satyapan
Amnuay Thithapandha	Pornpen Pramyothin
Borpit Klangkalya	Prasan Dhumma-Upakorn
Bunkerd Kongyingyoes	Prasert Songkittiguna
Chaichan Sangdee	Sopit Thamaree
Chandhanee Itthipanichpong	Sumana Chompootawee
Chongkol Thiengda	Supeecha Wittayalertpanya
Karnjana Ketsa-ard	Srichan Phornchirasilp
Krongtong Yoovathaworn	Wacharee Limpanasitthikul
Monthira Tankeyoon	Wittaya Tonsuwonnont
Nongluk Sookvanichsilp	Yupin Sanvarinda

**Manager** Supeecha Wittayalertpanya

**Office** Department of Pharmacology  
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,  
Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Bangkok 10330,  
Thailand. Tel/Fax 2511965

**Notice** The opinions expressed here in are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the editors or the publisher.

*Printed at Ruen Kaew Press, 947 Arun-Amarin Road, Bangkok 10700. Tel: 02-4126552*

วารสารเภสัชวิทยา (Thai Journal of Pharmacology) นี้เป็นลิขสิทธิ์ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ไม่อนุญาตให้ส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารฉบับนี้ไปถ่ายเอกสาร ผลิตหรือพิมพ์ซ้ำ หรือนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าโดยปราศจากการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากบรรณาธิการ

# Thai Journal of Pharmacology

Vol 27: No 2-3, May-Dec 2005.

## Contents

### EDITORIAL

### RESEARCH ARTICLES

- 67 Subchronic Exposure of *Pueraria Mirifica* in Normal- and High Cholesterol Diet-fed Rats : Influence on Lipid Profile and Toxicity
- 76 Chronic Toxicity of *Pueraria mirifica* in Rats
- 91 Effects of Valproyl Urea on Neurons of The Cerebral Cortex and Cerebellar Purkinje Cells in Rats
- 102 Topical Pimecrolimus 1% Cream in Treatment of Oral Lichen Planus
- 109 Subacute Effects of *Coscinium fenestratum* Ethanol Extract on Blood Glucose Level, Lipid Profiles and Blood Chemistry in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

### REVIEWS

- 121 Medicinal Plants in Tipitaka
- 127 Buprenorphine as an Alternative for Treatment of Opioid Dependence
- 137 Koi : Medicinal plant for oral hygiene

### DRUGS

- 147 Medroxyprogesterone Acetate and Anticancer Effect
- 157 Cytarabine

## บรรณาธิการแถลง

เรียนท่านผู้อ่านและสมาชิกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วารสารฉบับนี้หนากว่าปกติเล็กน้อยเนื่องจากการรวมเล่ม 2 และ 3 เข้าด้วยกัน และคงแจกจ่ายแก่สมาชิกพร้อมกับเอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 28 ที่จัดให้เป็นวารสารฉบับแรกของปี 2549 (PROCEEDING 2006)

วารสารฉบับนี้เต็มแน่นด้วยเนื้อหางานนิพนธ์ต้นฉบับและบทความวรรณกรรมและที่ขาดไม่ได้คือ บทความของยาที่น่าสนใจ แต่ขาดส่วนของ Letter to editor เหมือนเช่นเคย เพราะไม่มีใครยอมเขียนมา จะเขียนถึงตัวเองก็คงกระไรอยู่ ที่ผ่านมาก็เชิญขอให้คนใกล้ชิดเขียนมาหาบ้าง ท่านอาจแปลกใจว่า ไม่ใช่แค่ยาใหม่เท่านั้นที่เราสนใจ เพราะยาที่นำออกมาจำหน่ายในท้องตลาดมาระยะหนึ่งแล้ว มักจะมีผลการศึกษาทางคลินิกเพิ่มเติมขึ้นมาเรื่อยๆ ไม่ว่าจะเป็นขนาดยา ข้อบ่งใช้ทางคลินิก ผลไม่พึงประสงค์ หรือเทคโนโลยีด้านการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางการรักษา เพื่อเปิดโอกาสให้เราได้รับข้อมูลเหล่านี้เพิ่มเติม ทางกองบรรณาธิการจึงขอปรับเปลี่ยนให้เป็น Drugs

กว่าหนังสือฉบับนี้ถึงมือท่านคงอยู่ในช่วงวันหยุดสงกรานต์พอดี ขอให้สุขสันต์สงกรานต์กันทุกท่านนะคะ อาจมีการเปลี่ยนแปลงคณะกรรมการบริหารปกครองประเทศ โดยเฉพาะผู้อาสาทำหน้าที่ สส.และสว. แต่ที่มีการเปลี่ยนแปลงแน่ๆคือ ทางสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยก็ได้คณะกรรมการบริหารสมาคมชุดใหม่ซึ่งจะทำหน้าที่แทนชุดเก่าที่กำลังหมดวาระไปในเดือนมีค. 2549 นี้ ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงคณะกรรมการไปบ้าง วารสารของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยของเรายังคงออกอย่างน้อยปีละ 2 ฉบับเช่นเคย และสมาชิกของเราก็มียาวขึ้นเรื่อยๆนับจากที่ดิฉันเริ่มรับหน้าที่เป็นบรรณาธิการวารสารนานจนเกือบสิบปีแล้ว ทำให้พบว่าสมาคมฯของเราได้เติบโตขึ้นเรื่อยๆ จากกิจกรรมวิชาการที่ผ่านมาและจำนวนสมาชิกที่มีมากขึ้น ดิฉันเองก็เชื่อว่าวารสารของเราก็น่าจะมีส่วนสำคัญที่ทำให้เรามีสมาชิกเพิ่มขึ้น เพราะท่านจ่ายค่าบำรุงสมาคมตลอดชีพเพียง 1,000 บาท (ราคานี้ตั้งแต่ก่อตั้งสมาคม) ท่านก็ได้รับวารสารฟรีไปเรื่อยๆตลอดชีพหรือเท่าที่โปรดยจัดส่งให้ได้ตามที่อยู่ของท่าน ท่านได้รับวารสารตลอดชีพ แต่กองบรรณาธิการคงไม่ได้อยู่คงกระพันตลอดชีพของท่านแน่นอน เพราะสรรพสิ่งในโลกย่อมมีการเปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา นักเภสัชวิทยารุ่นใหม่ๆที่มีไฟแรงควรจะมีส่วนร่วมในการดำเนินงานด้านวารสารให้มากขึ้น ดิฉันจึงขอเชิญชวนนักเภสัชวิทยาที่มีประสบการณ์ด้านวารสารและสนใจงานด้านนี้ได้โปรดเสนอตัวเข้ามาช่วยงานวารสารได้ ถ้าไม่ว่างลงมือทำ ท่านสามารถเขียนมาถึงบรรณาธิการ จะให้ข้อเสนอแนะ ดี หรือชม ดิฉันยินดีต้อนรับเสมอ

รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

บรรณาธิการ

## RESEARCH ARTICLES

### Subchronic Exposure of *Pueraria Mirifica* in Normal- and High Cholesterol Diet-fed Rats : Influence on Lipid Profile and Toxicity

Kittiya Charoenkul<sup>1</sup>, Laddawal Phivthong-ngam<sup>2</sup>, Supatra Srichairat<sup>3</sup>, Chaiyo Chaichantipyut<sup>1</sup>, Nuansri Niwattisaiwong<sup>1</sup>, Somsong Lawanprasert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University

#### Abstract

*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu, known locally as White Kwao Keur, is a plant in family Leguminosae. In this study, effects of *P.mirifica* on serum lipid profile and subchronic toxicity were investigated in male Wistar rats. Rats were randomly divided into four treatment groups as following: normal diet-fed group; normal diet-fed supplemented with *P.mirifica* group; high cholesterol diet-fed group; high cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group. Each group comprised 10 rats. *P.mirifica* was administered orally at a dosage of 100 mg/kg/day for 90 consecutive days. During the treatment period, body weights of the animals were recorded every two weeks. At the end of the treatment, rats were anesthetized. Blood samples were collected by heart puncture and serum sample were prepared for determination of hematology and clinical blood chemistry, respectively. The results showed that body weight of rats given *P.mirifica* in either normal diet or high cholesterol diet conditions were significantly lower than their corresponding control groups. There was no significant difference of these following hematology and clinical blood chemistry: hemoglobin, hematocrit, RBC morphology, WBC count, % differential WBC, platelet count, glucose, BUN, SCr, total bilirubin, and direct bilirubin in all experimental groups. *P.mirifica* did not affect serum level of AST, ALT, and ALP in normal diet-fed condition. High cholesterol diet-fed condition caused a significant increase of AST, ALT, and ALP but *P.mirifica* attenuated these effects. *P.mirifica* significantly decreased serum total cholesterol and LDL-C in either normal diet-fed or high cholesterol diet-fed rats. Serum triglyceride was increased in normal diet-fed rats but decreased in high cholesterol diet-fed rats. *P.mirifica* caused a significant decrease of HDL-C in both normal and high cholesterol diet-fed rats whereas its improvement in the LDL-C/HDL-C ratio was shown only in high cholesterol diet-fed rats. Although, *P.mirifica* demonstrated a benefit on lipid profile and did not show any toxic effects on liver, kidney, and blood system in this study, an increment of serum triglyceride in normal rat receiving *P.mirifica*, however, is not favorable. Effects of *P.mirifica* at various doses, long term used as well as mechanism of the effects should be further investigated.

**Key words :** *P.mirifica*, lipid profile, subchronic toxicity, normal diet-fed rat, high cholesterol diet-fed rat.

---

Address correspondence and reprint requests to : Somsong Lawanprasert, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND. Tel : 02-2188324-5, e-mail: Lsomsong @ chula.ac.th

## การได้รับกวาวเครือแบบกึ่งเรื้อรังในหนูขาวที่ได้รับอาหารปกติและอาหารคลอเรสเตอรอลสูง : ผลต่อระดับไขมันในเลือด และความเป็นพิษ

กิตติยา เจริญกุล<sup>1</sup>, ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม<sup>2</sup>, สุพัตรา ศรีไชยรัตน์<sup>3</sup>, ชัยโย ชัยชาญพิทยุทธ<sup>1</sup>, นวลศรี นิวัติชัยวงศ์สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2</sup>คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>3</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อ

กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu) เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของการได้รับกวาวเครือขาวแบบกึ่งเรื้อรังต่อระดับไขมันในเลือด และความเป็นพิษในหนูขาวเพศผู้พันธุ์วีสตาร์ที่ได้รับอาหารปกติและอาหารคลอเรสเตอรอลสูง โดยแบ่งหนูขาวแบบสุ่มเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ, กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกวาวเครือขาว, กลุ่มที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูง และกลุ่มที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูงและกวาวเครือขาว ให้กวาวเครือขาวในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยวิธีป้อนทางปาก เป็นเวลา 90 วัน ทำการชั่งน้ำหนักหนูขาวทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบระยะเวลา ทำให้หนูหมดความรู้สึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ เพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยาและแยกซีรัมตรวจค่าเคมีคลินิก ผลการทดลองพบว่ากวาวเครือขาวทำให้การเพิ่มของน้ำหนักหนูขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกดังต่อไปนี้ hemoglobin, hematocrit, RBC morphology, WBC count, %differential WBC, platelet count, glucose, BUN, SCr, total bilirubin และ direct bilirubin กวาวเครือขาวไม่มีผลต่อค่า AST, ALT และ ALP ในซีรัมของหนูที่ได้รับอาหารปกติ อาหารคลอเรสเตอรอลสูงมีผลทำให้ AST, ALT และ ALP สูงแต่ค่าเหล่านี้ลดลงเมื่อให้กวาวเครือขาว กวาวเครือขาวทำให้ค่า total cholesterol และ LDL-C ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและอาหารคลอเรสเตอรอลสูง ในขณะที่ค่าไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ แต่มีค่าลดลงในกลุ่มที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูง กวาวเครือขาวทำให้ค่า HDL-C ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและอาหารคลอเรสเตอรอลสูง ส่วนอัตราส่วนของ LDL-C ต่อ HDL-C มีค่าต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูง ถึงแม้ว่ากวาวเครือขาวจะมีผลที่เป็นประโยชน์ต่อค่าไขมันในเลือดและไม่มีผลพิษใดๆ ต่อตับ ไต และระบบเลือด ผลที่ไม่พึงปรารถนาของกวาวเครือขาวที่พบคือมีผลเพิ่มไตรกลีเซอไรด์ในหนูที่ได้รับอาหารปกติ ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของกวาวเครือขาวที่ขนาดต่างๆ ผลของการใช้สารนี้ในระยะเวลานาน และกลไกที่ใช้อธิบายผลต่างๆที่เกิดขึ้นนี้

**คำสำคัญ :** กวาวเครือขาว, ระดับไขมันในเลือด, พิษกึ่งเรื้อรัง, หนูขาวที่ได้รับอาหารปกติ, หนูขาวที่ได้รับอาหารคลอเรสเตอรอลสูง

## Introduction

*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu, known locally as "White Kwao Keur", is a plant in family Leguminosae. Several indications of this plant were suggested for a traditional purpose such as using for skin enrichment, thickening and blackening hair, a relief of weakness, an increase of appetite, treatment of insomnia, and breast enlargement in women<sup>1</sup>. These uses of *P.mirifica* in traditional medicine may be attributed to its estrogenic properties of the constituents. Several previous studies demonstrated that this plant possessed various compounds including phytoestrogens, the compounds with estrogen-like biological activity. Phytoestrogens found in tuberous roots of *P.mirifica* include miroestrol<sup>2</sup>, kwakhurin<sup>3</sup>, puerarin<sup>4</sup>, coumestrol, daidzin, daidzein, mirificin<sup>5</sup>, genistein, genistin<sup>6</sup> and deoxymiroestrol<sup>7</sup>. Epidemiological studies showed that frequent consumption of phytoestrogen rich diet, as seen in traditional Asian food, is associated with lower risks of many diseases such as breast, prostate, and colon cancers as well as cardiovascular diseases<sup>8,9,10</sup>. Several studies suggested that genistein and daidzein possess cancer chemopreventive effects<sup>11,12,13,14</sup>, of which the specific mechanisms have not been clearly identified. *In vitro* and *in vivo* studies found that genistein exhibited antiproliferative effects in human breast cancer cells<sup>15</sup>. It also inhibited tyrosine specific protein kinases<sup>16</sup>, DNA topoisomerase II<sup>17</sup>, epidermal growth factor induced phosphatidylinositol turnover<sup>18</sup> and angiogenesis<sup>19</sup>. In addition to the chemopreventive effects, isoflavone phytoestrogens, genistein and daidzein, which are found mostly in soy foods, also possess a benefit in reducing risk of cardiovascular diseases by a proposed hypothesis of decreasing of total cholesterol, LDL-C, and triglyceride but an increase of HDL-C in both normal and hypercholesterolemic conditions<sup>8,20</sup>. The cardioprotective effects of these compounds may be attributed to its estrogenic like-activity.

Effect of *P.mirifica* on lipid profile, particularly in hypercholesterolemic condition, which may contribute to its cardioprotective potential have never been investigated. In addition, there are few studies regarding

the subchronic toxicity of *P.mirifica*<sup>21</sup>. Therefore, the objectives of this study were primarily to investigate subchronic effects of *P.mirifica* on rat hematology and clinical blood chemistry so as to preliminarily investigate lipid-lowering effects and subchronic toxicity of this plant in both normal and hypercholesterolemic rats.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male Wistar rats of body weight between 200-250 g were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakompathom. Rats were housed two per cage at the Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University and acclimatized for at least seven days prior to the experimentation. They were maintained at 25 °C on a 12-hour light/dark cycle and had free access to the diet and water throughout the study. High cholesterol rats had high cholesterol diet containing 1% cholesterol plus 2% sodium cholate. All diets were purchased from C.P.company.

### *P.mirifica*

Dried fine powder of *P.mirifica* tuberous root was obtained from Dr. Amphawan Apisariyakul at the department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. *P.mirifica* used in this study was cultivated at Aumpor Ban Tak and Mae Sod, Tak Province and the tuberous roots were collected during March and April, 2000.

The powder was identified for its estrogenic activity by dissolving in water, filtered and analyzed by immunoassay. The result showed that the solution of *P.mirifica* used in this study possessed estrogenic activity in a concentration-related manner (unpublished data).

*P.mirifica* for animal administration was prepared freshly by dissolving 6 g of the powder with 100 ml of double distilled water, mixed well, filtered out any remaining fiber with cloth filter. During the time of drawing the suspension into the gavage tube, the suspension was thoroughly mixing by magnetic stirrer

### Experimental model

Rats were randomly divided into four treatment groups as following: normal diet-fed group; normal diet-fed supplemented with *P.mirifica* group; high cholesterol diet-fed group; high cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group. Each group comprised 10 rats. *P.mirifica* was administered orally at a dosage of 100 mg/kg/day for 90 consecutive days. During the treatment period, body weights of the animals were recorded every two weeks. At the end of the treatment, rats were anesthetized. Blood samples were collected by heart puncture and serum sample were prepared for determination of hematology and clinical blood chemistry, respectively.

Whole blood samples were determined for complete blood count (CBC), white blood cell (WBC) count, %differential WBC, platelet count and red blood cell (RBC) morphology. Serum samples were determined for various blood clinical biochemistry parameters using commercial test kit of bioMerieux company (France) as following: glucose, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), triglyceride, and cholesterol. The assays mentioned above were performed by Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University.

Determination of total bilirubin and direct bilirubin (using commercial test kit of Merieux Vitex, France), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) (using commercial test kit of Roche company, Germany) in serum were performed by Professional Laboratory Management, Bangkok.

### Statistics

All quantitative data were presented as mean  $\pm$  SEM. An independent *t*-test was used for statistical comparisons between two groups (Normal diet-fed group vs Normal diet-fed supplemented with

*P.mirifica* group; High cholesterol diet-fed group vs High cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group) at significant level of  $P < 0.05$ .

## Results

### 1. General effects of *P.mirifica*

During the experimental period, five rats (accounted for 50% of the total rats in the group) from normal diet-fed supplemented with *P.mirifica* group and four rats (account for 40% of the total rats in the group) from high cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group had hair loss. No rats died at the end of the study.

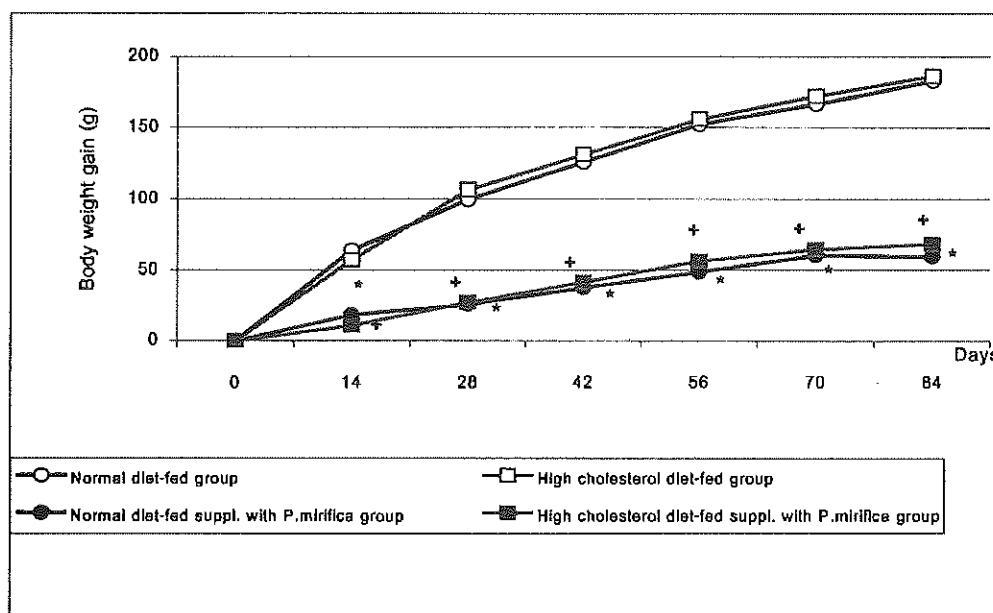
Body weight gain of rats receiving *P.mirifica* fed with either normal diet or high cholesterol diet was significantly lower than their corresponding control groups (Figure 1). High cholesterol diet caused no change of body weight gain as compared to the normal diet condition.

### 2. Effect of *P.mirifica* on clinical blood chemistry and hematology

In both normal diet-fed and high cholesterol diet-fed conditions, *P.mirifica* exhibited no deteriorated effects indicated by these following hematological and clinical blood chemistry parameters: hemoglobin, hematocrit, WBC count, %differential WBC, RBC morphology, platelet count, glucose, BUN, SCr, total bilirubin, direct bilirubin AST, ALT, and ALP. Interestingly, *P.mirifica* even helped attenuating the liver injury-induced by hypercholesterolemic condition as shown by a significant decrease of AST, ALT and ALP in high cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* rats as compared to the corresponding high cholesterol diet-fed rats (Table 1).

Comparing to normal diet-fed rats, high cholesterol diet fed rats demonstrated a significant increase of AST ( $170.60 \pm 10.63$  vs.  $278.30 \pm 24.66$ ;  $P < 0.05$ ), ALT ( $36.10 \pm 1.58$  vs.  $198.9 \pm 39.15$ ;  $P < 0.05$ ), ALP ( $63.40 \pm 3.41$  vs.  $97.10 \pm 6.50$ ;  $P < 0.05$ ).





**Figure 1** Effect of *P.mirifica* on body weigh gain

Data shown were mean

\* $P < 0.05$ ; Normal diet-fed supplemented with *P.mirifica* group vs Normal diet-fed group

+ $P < 0.05$ ; High cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group vs High cholesterol diet-fed group

**Table 1** Effect of *P.mirifica* on hematology and clinical blood chemistry

Hematology	Normal diet-fed group	Normal diet-fed supplemented with <i>P.mirifica</i> group	High cholesterol diet-fed group	High cholesterol diet-fed supplemented with <i>P.mirifica</i> group
Hemoglobin (g/dl)	14.64±0.36	14.10±0.30	13.73±0.27	13.94±0.22
Hematocrit (%)	44.00±1.09	42.38±0.93	41.25±0.82	41.89±0.66
WBC count ( $\times 10^9/l$ )	1.81±0.36	1.39±0.10	2.05±0.32	1.34±0.19
Neutrophil (%)	27.57±1.78	25.13±3.24	25.75±4.20	22.56±2.59
Lymphocyte (%)	69.71±1.82	71.00±3.51	70.88±4.10	74.67±2.30
Monocyte (%)	2.14±0.51	3.00±1.04	3.00±0.58	2.00±0.33
Eosinophil (%)	0.57±0.43	0.86±0.23	0.75±0.25	0.78±0.32
Basophil (%)	0	0	0	0
RBC morphology	Normal	Normal	Normal	Normal
Platelet ( $\times 10^3/ul$ )	339.29±44.61	303.13±34.54	334.38±19.44	322.22±41.76
<b>Clinical blood chemistry</b>				
Glucose (mg/dl)	129.9±8.16	137.4±11.67	147.9±17.10	138.7±20.48
BUN (mg/dl)	22.05±1.27	20.08±0.60	21.27±1.19	21.81±1.47
SCr (mg/dl)	0.71±0.03	0.67±0.03	0.72±0.03	0.70±0.03
Total Bilirubin (mg/dl)	0.11±0.01	0.10±0.00	0.13±0.02	0.10±0.00
Direct bilirubin (mg/dl)	0.018±0.008	0.029±0.005	0.026±0.006	0.027±0.005
AST (U/l)	170.60±10.63	156.30±19.40	278.30±24.66	174.20±22.12 <sup>+</sup>
ALT (U/l)	36.10±1.58	29.00±2.85	198.9±39.15	57.1±17.30 <sup>+</sup>
ALP (U/l)	63.40±3.41	71.40±7.99	97.10±6.50	74.30±3.15 <sup>+</sup>

Data shown were mean  $\pm$  SEM

+ $P < 0.05$ ; High cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group vs. High cholesterol diet-fed group

### 3. Effect of *P.mirifica* on serum lipid profile

*P.mirifica* significantly decreased total cholesterol, LDL-C and HDL-C but significantly increased triglyceride in normal diet-fed rats. It also significantly decreased total cholesterol, triglyceride, LDL-C, HDL-C and LDL-C/HDL-C ratio in high

cholesterol diet-fed rats (Table 2). High cholesterol diet-fed rats showed a significant increase of total cholesterol ( $64.40 \pm 3.18$  vs.  $85.60 \pm 9.47$ ;  $P < 0.05$ ), LDL-C ( $8.00 \pm 0.50$  vs.  $56.40 \pm 9.76$ ;  $P < 0.05$ ) and LDL-C/HDL-C ratio ( $0.10 \pm 0.006$  vs.  $0.78 \pm 0.16$ ;  $P < 0.05$ ) as compared to the normal diet-fed rats.

**Table 2** Effect of *P.mirifica* on serum lipid parameters

Serum lipid parameters	Normal diet-fed group	Normal diet-fed supplemented with <i>P.mirifica</i> group	High cholesterol diet-fed group	High cholesterol diet-fed supplemented with <i>P.mirifica</i> group
Total cholesterol (mg/dl)	$64.40 \pm 3.18$	$32.60 \pm 7.10$ *	$85.60 \pm 9.47$	$39.90 \pm 5.05$ +
Triglyceride (mg/dl)	$72.60 \pm 7.80$	$110.10 \pm 10.53$ *	$54.50 \pm 4.07$	$33.50 \pm 3.28$ +
LDL-C (mg/dl)	$8.00 \pm 0.50$	$5.00 \pm 0.67$ *	$56.40 \pm 9.76$	$17.00 \pm 2.64$ +
HDL-C (mg/dl)	$78.67 \pm 3.76$	$35.50 \pm 9.03$ *	$73.50 \pm 5.56$	$40.50 \pm 4.32$ +
LDL-C/HDL-C ratio	$0.10 \pm 0.006$	$0.18 \pm 0.04$	$0.78 \pm 0.16$	$0.45 \pm 0.06$ +

Data shown were mean  $\pm$  SEM

\*  $P < 0.05$ ; Normal diet-fed supplemented with *P.mirifica* group vs Normal diet-fed group

+  $P < 0.05$ ; High cholesterol diet-fed supplemented with *P.mirifica* group vs High cholesterol diet-fed group

### Discussion and Conclusion

This study primarily investigated subchronic toxicity and effect on serum lipid profile of *P.mirifica* in both normal and hypercholesterolemic rats. This would provide an additional information regarding subchronic effects of *P.mirifica* at the dosage of 100 mg/kg/day, the dosage which was shown to decrease serum cholesterol without any serious toxic effects in a previous study<sup>21</sup>. It has been well-documented that cardiovascular advantage of phytoestrogens is attributed to their lipid lowering effects. Besides studying in normal rats, this study was also performed in hypercholesterolemic rats, the model of which effect of *P.mirifica* had never been investigated.

Body weight gains of rats given *P.mirifica* and fed with either normal diet or high cholesterol diet were significantly lower than their corresponding control-diet fed groups. These were consistent to the results reported by Chivapat and collaborates<sup>21</sup>. In that study, they found that rats receiving *P.mirifica* orally at the doses of 100 and 1,000 mg/kg/day for 90 days had body weight gain and food

consumption less than the control group. This effect was possibly due to the effects of some phytoestrogens containing in *P.mirifica*. Miroestrol was shown to cause nausea and vomiting in human<sup>2</sup>. Genistein and daidzein were found to suppress food intake and body weight gain in rats<sup>22,23</sup>. Inhibition of 21-hydroxylase enzymes in adrenal gland cells by both genistein and daidzein resulted in a decreased synthesis of cortisol, the hormone which acted at CNS to stimulate food appetite<sup>24</sup>. Effects of estrogens on the growth and body weight of rodents are well documented. Both synthetic and natural estrogens decrease growth rate in rats and mice via acting centrally at the hypothalamus to decrease food consumption<sup>25,26,27,28</sup>. Dose-dependent growth retardation and decrease in food consumption have been reported in long-term studies with most estrogens<sup>25,28</sup>.

Hair loss occurred in the *P.mirifica* treated rats. This effect induced by chronic estrogen treatment has been reported<sup>25,28</sup>. Although less studies were performed on estrogens than on androgens, prolonged intraperitoneal, subcutaneous implant or

oral administration of estrogens has been shown to block hair growth in rats and mice<sup>25,28,29</sup>. Topical ICI 182 780, a pure estrogen receptor antagonist, stimulates hair regrowth in male mice<sup>29</sup>. Hair follicle is a complex structure that is influenced by systemic factors including androgens, glucocorticoids and estrogens. The estrogen receptor pathway within dermal papilla regulates the telogen-anagen transition of the hair follicle in CD-mice<sup>30</sup>. Thus, hair loss found in *P.mirifica* treated rats shown in this study was possibly attributed from estrogenic-like effect of *P.mirifica*.

Results from this study showed that *P.mirifica* given orally at the dose of 100 mg/kg/day for 90 days did not cause any toxic effects to the hematopoietic system of male rats. In addition, there were no effects of *P.mirifica* at this dose on serum glucose as well as the functions of liver and kidney. These results were consistent to the result of Chivapat and collaborates<sup>21</sup>. From that study, *P.mirifica* affected blood parameters only when the compound was given at 1,000 mg/kg/day. Toxic effects of estrogens on blood system have been shown in animal studies. Ninety day feeding rats with diet contained 10 and 50 ppm of 17 $\beta$ -estradiol demonstrated mild anemia with the mean value of hematocrit, RBC count and hematocrit lower than the control group<sup>28</sup>. Administration of diethylstilbestrol, a synthetic estrogen, in the diet for two years caused a slight reduction in hemoglobin and hematocrit in both sexes of Sprague-Dawley rats<sup>25</sup>. A favorable effect of *P.mirifica* on the liver was interestingly demonstrated while this compound was given to high cholesterol diet rats. High cholesterol diet-fed condition caused a significant increase of serum hepatic parenchymal enzymes such as AST, ALT as well as the enzyme reflecting cholestasis such as ALP. Accompanying the unpleasant lipid profile with an increase of liver weight in high cholesterol diet rats, it is likely that an accumulation of fat in the liver might be involved in lipid-induced liver injury in this group of animals. *P.mirifica* caused an advantageous effect on serum lipid profile particularly in high cholesterol diet-fed rats as shown by an

attenuation of serum hepatic enzymes which are indicators for liver injury. These findings gave a rational explanation for an attenuating effect of *P.mirifica* on lipid-induced liver injury in high cholesterol diet-fed rats.

In this study, effects of *P.mirifica* on serum lipid profile were investigated in both normal diet-fed rats and high cholesterol diet-fed rats. High cholesterol diet-fed rats in this study possessed a characteristic of type IIa hyperlipoproteinaemia according to Frederickson/WHO classification. This type of hyperlipoproteinaemia exhibits an elevation of LDL-C and total cholesterol in serum whereas serum triglyceride is not elevated. Type IIa hyperlipoproteinaemic patients possess high risk to atherosclerosis<sup>31</sup>. *P.mirifica* demonstrated both favorable and unfavorable effects on serum lipid profile. Advantageous effect of *P.mirifica* on serum lipid was a decrease of serum total cholesterol and LDL-C in either normal diet-fed or high cholesterol diet-fed condition. In contrast, the disadvantageous effect of this plant included an increase of serum triglyceride in normal rats and a decrease of serum HDL-C in both normal and high cholesterol diet-fed rats. This study provided an additional information to a previous study of Chivapat and collaborates<sup>21</sup> that found a decrease of serum total cholesterol and a slight increase of serum triglyceride in normal rats given the same dosage (100 mg/kg/day orally) of *P.mirifica* for 90 days. Eventhough excessive concentration in plasma of LDL-C is most theoretically and epidemiologically associated with atherosclerosis, hypertriglyceridaemia and reduced concentration of HDL-C are also important risk factors for this disease. Thus, precaution should be concerned for long-term administration of *P.mirifica* especially in normal person whereas the hypercholesterolemic person seem to be less affected (*P.mirifica* caused only a decrease of HDL-C, did not affect serum triglyceride, and improved the LDL-C/HDL-C ratio). Effect of *P.mirifica* on human serum lipid profile should be confirmed. Mechanism for explaining the lipid lowering effect of this plant should also be explored.

In conclusion, subchronic (90 days) exposure of *P.mirifica* given orally at 100 mg/kg/day to male Wistar rats did not show any toxic effects on blood system as well as functions of liver and kidney. *P.mirifica* even attenuated the hepatic injury induced by hypercholesterolemic condition probably due to its beneficial effects on lipid profile especially in high cholesterol diet-fed rats. Effects of *P.mirifica* at various doses, long-term uses as well as mechanism of the effects found in the study should be further investigated.

### Acknowledgements

This work was supported by Ratchadapisakesompoch Research Grant from Chulalongkorn University. We wish to thank Dr Amphawan Apisariyakul for providing *P.mirifica* for the study, Associate Professor Dr. Nikom Chaisiri and Assistance Professor Dr. Chanchai Hosanguan for their helps. Thanks are also extended to the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for the laboratorial facilities as well as Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for the animal care facility.

### References

1. หลวงอนุสารสุนทร. ตำรายาหัวกวาวเครือ. เชียงใหม่: โรงพิมพ์อุบัติพงษ์, 2474. อ้างถึงใน ยุทธนา สมิตะสิริ. 2541. ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนากวาวเครือขาวตั้งแต่อดีต (พ.ศ.2524) ถึงปัจจุบัน (พ.ศ.2541). ในเอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่องกวาวเครือ. 1 ธันวาคม 2541 ณ ตึกกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. : 13-27.
2. Cain CJ. Miroestrol: an oestrogen from the plant *Pueraria mirifica*. *Nature* 1960; 188: 774-7.
3. Tahara S, Ingham JL, Dziedzic SZ. Structure elucidation of Kwakhurin, a new prenylated isoflavone from *Pueraria mirifica* roots. *Z. Naturforsch.* 1987; 42c: 510-18.
4. Ingham JL, Markham KR, Dziedzic SZ, et al. Puerain 6"-O- $\beta$ -apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone O-glycoside from *Pueraria mirifica*. *Phytochemistry* 1986a; 25: 1772-5.
5. Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z. Naturforsch.* 1986b; 41c: 403-408.
6. Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. Minor isoflavones from the root of *Pueraria mirifica*. *Z. Naturforsch. SerC.* 1989; 44: 724-6.
7. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, et al. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principal of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J. Natural. Products.* 2000; 63: 173-5.
8. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 297-303.
9. Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68(Suppl): 333S-346S.
10. Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87:897-904.
11. Adlercreutz H. Western diet and western disease: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Suppl. Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1990; 50: 210:3-23.
12. Barnes S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancers. *J. Nutr.* 1995;125: 777S-783S.
13. Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.* 1995; 125: 733S-743S.
14. Steele VE, Pereira MA, Sigman CC, et al. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J. Nutr.* 1995; 125: 713S-716S.
15. Zava DT, Duwe G. Estrogenic and anti-proliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. *Nutr. Cancer.* 1997; 27: 31-40.
16. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 5592-5.
17. Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 39: 737-44.
18. Imoto M., Yamashita T, Sawa T, et al. Inhibition of cellular phosphatidylinositol turnover by psi-tectorigenin. *FREBS Lett.* 1988; 230: 43-6.
19. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90: 2690-4.

20. Cassidy A, Bingham S, Setchell KDR. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 60: 333-40.
21. ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ขวลิตรารัง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, อัญชลี จุฑะพุทธิ, และสมเกียรติ ปัญญาเมือง. 2543. การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของกาวเครือขาว. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 42: 202-3.
22. Magee AC. Biological responses of young rats fed diets containing genistin and genistein. *J. Nutr.* 1963; 80: 151-6.
23. Toda T, Uesugi T, Hirai K, et al. New 6-O acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol. Pharm. Bull.* 1999; 22: 1193-201.
24. Mesiano S, Katz SL, Lee JY. et al. Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 2443-8.
25. Gibson JP, Newbern JW, Kunh WL. et al. Comparative chronic toxicity of three oral estrogens in rats. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1967; 11: 489-510.
26. Heywood R, Wadsworth PF. The experimental toxicology of estrogens. *Pharmacol. Ther.* 1980; 8: 125-42.
27. Hart JE. Endocrine pathology of estrogens: species differences. *Pharmacol. Ther.* 1990; 47: 203-18.
28. Biegel LB, Flaws JA, Hirshfield AN, et al. 90-Day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 $\beta$ -estradiol. *Toxicol. Sci.* 1998; 44: 116-42.
29. Smart RC, Oh H-S, Chanda S, et al.. Effects of 17- $\beta$ -estradiol and ICI 182 780 on hair growth in various strains of mice. *J. Invest. Dermatol. Symposium Proc.* 1999; 4: 285-9.
30. Oh H-S, Smart RC. An estrogen receptor mediated pathway regulates the telogenagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 12525-30.
31. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism. *Pharmacology*, 4<sup>th</sup> ed, Churchill Livingstone, New York, 2000: 301-9.



## RESEARCH ARTICLES

### Chronic Toxicity of *Pueraria mirifica* in Rats

Songpol Chivapat , Pranee Chavalittumrong, Sadudee Rattanajarasroj, Somkiat Punyamung

*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health*

#### Abstract

*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu or White Kwao Keur has been used in folk medicine as a rejuvenating agent for the elderly. To date, toxicological data of this plant are still incomplete and therefore the six-month chronic toxicity study was undertaken. Wistar rats of each sex were orally administered *Pueraria mirifica* powder (PM) at the doses of 10, 50 and 250 mg/kg/day whereas the control group received water at 10 ml/kg/day for 6 months. The significantly decreased body weights were observed in both male and female rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day. Food consumptions were suppressed in PM-treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and also in the highest dose-treated female rats. During the experiment, some rats receiving PM had alopecia for two weeks and then recovered. Hematology revealed that PM at the dose of 250 mg/kg/day produced significant decreases of hematocrit, RBC and hemoglobin in both sexes of rats. Triglyceride levels in the female rats treated with 250 mg/kg/day of PM were significantly increased. Cholesterol levels were significantly decreased in male rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats at the highest dose. The testicular weight of male rats receiving the highest dose of PM was significantly decreased whereas the uterine weight of female rats receiving this dose was significantly increased. Histopathological examinations of visceral organs revealed no changes related to the toxicity of *P. mirifica* except that male rats receiving the highest dose of PM had significantly higher incidence of kidney tubular cysts. Results of the study indicated that prolonged administration of 10 mg/kg/day *P. mirifica* did not cause any hematological and biochemical alterations. Nor did pathology of the internal organs indicating the toxicity at this dose.

**Key words :** *Pueraria mirifica*, toxicity, White Kwao Keur

## พิษเรื้อรังของกวาวเครือขาวในหนูขาว

ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ชาลิตธำรง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, สมเกียรติ ปัญญามัง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

### บทคัดย่อ

กวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้เป็นยาบำรุงสุขภาพในผู้สูงอายุ เนื่องจากข้อมูลด้านพิษวิทยาของสมุนไพรชนิดนี้ยังไม่สมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพิษเรื้อรังของหัวกวาวเครือขาวในหนูขาวพันธุ์สตาร์ เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยป้อนผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำแก่หนูขาวในขนาด 10, 50, และ 250 มก./กก./วันทุกวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้น้ำ 10 มล./กก./วันเป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 50 และ 250 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 50 และ 250 มก./กก./วัน และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน บางตัวมีอาการขนร่วงนานประมาณ 2 สัปดาห์ต่อมาจะดีขึ้นจนปกติ ผลทางโลหิตวิทยาแสดงให้เห็นว่า หนูขาวที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาดสูงทั้งสองเพศมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณฮีโมโกลบินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน ทำให้น้ำหนักอวัยวะของหนูเพศผู้ลดลง แต่น้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมียเพิ่มขึ้น ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของกวาวเครือขาวยกเว้นไตของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาดสูงมีอัตราการเกิด tubular cyst เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากการศึกษาพิษเรื้อรังครั้งนี้ สรุปได้ว่า เมื่อให้กวาวเครือขาวขนาด 10 มก./กก.นานติดต่อกัน 6 เดือน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรัม และพยาธิสภาพของอวัยวะภายในต่างๆ ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติอันเนื่องมาจากกวาวเครือขาว

คำสำคัญ : *Pueraria mirifica*, toxicity, White Kwao Keur

## Introduction

*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu or White Kwao Keur<sup>1</sup> is a Thai indigenous woody climber belonging to the family Leguminosae.<sup>2</sup> Tuberous roots of *P. mirifica* were traditionally used by Thai people as a rejuvenating drug.<sup>3</sup> Phytochemical studies have shown that the tuberous root contains various compounds such as miroestrol,<sup>4</sup> puerarin,<sup>5</sup> coumestrol, daidizin, daidzein, mirificin,<sup>6</sup> mirificoumestan,<sup>7</sup> genistin<sup>8</sup> and kwakurin.<sup>9</sup> Many of these substances are classified as phytoestrogens. Recently, deoxymiroestrol has been isolated from roots of *P. mirifica* and shown to possess stronger estrogenic effect on MCF-7 human breast cancer cells than miroestrol.<sup>10</sup>

Several pharmacological studies of *P. mirifica* mostly concerned with its estrogenic-like activities in animals. *P. mirifica* could inhibit courtship, mating behavior and testicular development in male pigeon whereas in female it suppressed egg laying by inhibition of follicular development.<sup>11</sup> Experiments conducted in female rats have shown that White Kwao Keur suppresses lactation by inhibiting mammary gland growth and milk production.<sup>12</sup> This herb exhibited effective postcoital antifertility in rats and increased the uterine weight as well as fluid content in the uterus of immature ovariectomized rats.<sup>13</sup> In male rats, *P. mirifica* reduced reproductive behavior and caused weight reduction of testis, epididymis, prostate gland and seminal vesicles.<sup>14</sup>

Toxicity of *P. mirifica* tuberous root has been investigated in some experimental animals. In Japanese quail, this herb affected hemopoietic systems i.e. decrease hematocrit, hemoglobin and red blood cells.<sup>15</sup> It also caused suppurative inflammation in some parts of the body.<sup>16</sup> Hepatic lesions and degeneration of testicular leydig cells was reported in rats orally treated with 100 mg/kg of *P. mirifica* for 14 consecutive days.<sup>14</sup> Subchronic toxicity study at the doses range between 10-1,000 mg/kg for a period of ninety days in Wistar rats showed that the highest dose

affected hematological values and no estrogenic effect was observed at the lowest dose.<sup>17</sup> Since the currently available toxicological data of this plant are still incomplete to evaluate the safety of this plant, therefore Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science conducted chronic toxicity study of *P. mirifica* tuberous root so as to provide additional toxicological information in order to ascertain the safety of using this plant.

## Materials and Methods

### Preparation of *Pueraria mirifica* suspensions

Tuberous roots of *P. mirifica* were collected and identified by Associate professor Yudthana Smitasiri, Mae Fah Luang University. The roots, approximately 2 kg each, were sliced and oven-dried at 50°C. The dried roots were pulverized and passed through sieve no 100. Chemical constituents of *P. mirifica* powder (PM) were assayed by the Research and Development Institute, Government Pharmaceutical Organization. The percentage amount of isoflavones : genistin, daidzin, and puerarin were 0.0113, 0.0016 and 0.0152 respectively whereas genistein was not found. Another isoflavone, daidzein, was also qualitatively found by using HPLC/photodiode array (PDA) in our institute. Bioassay of PM using an immature rat uterine weight method was also performed by Associate Professor. Yudthana. It was found that the estrogenic potency of 1 mg of dried powder of PM indicated by uterine weight increase was equal to that of about 1.5-2.0 micrograms of conjugated estrogen (Premarin®). The powders were suspended and diluted to the desired concentrations with water for chronic toxicity study

### Experimental animals

One hundred and fifty Wistar rats (75 of each sex) weighing  $150 \pm 10$  g were purchased from the National Laboratory Animal Center, Salaya, Mahidol University.

The animals were housed in conventional hygienic laboratory animal room at the Institute of Health Science Research, Department of Medical Sciences. Temperature in the room was maintained at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  with 60% relative humidity and 12 hours-light-dark-cycle. The animals were given commercially pelleted diets and clean tap water ad libitum.

### Chronic toxicity study

Seventy five rats of each sex were randomly divided into 5 groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg/day and groups 2-5 were orally administered with the suspensions of PM at the doses of 10, 50, 250 and 250 mg/kg/day respectively for six months. After the six-month period of PM administration, only group 5 (250-R), high recovery group, were further raised for two weeks without PM in order to study recovery or delay effects of PM. During the period of experiment, body weight and food consumption were measured weekly and the rats were closely observed for signs of abnormality. At the end of six-month-treatment period, the animals were fasted for 18 hours and then were dissected under ether anesthesia. Blood was collected from posterior vena cava for hematological and serum biochemical determinations.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer Cell-Dyn<sup>®</sup>3500. These following hematological parameters were measured: % hematocrit, hemoglobin, red blood cell (RBC), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), % neutrophil, % eosinophil, % lymphocyte, % monocyte, % basophil and platelets number. Biochemical values were assayed by using automatic chemistry analyzer Hitachi<sup>®</sup>912. These following parameters were measured: alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood

urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, total bilirubin, glucose, uric acid, triglyceride, total cholesterol, sodium, potassium and chloride ion.

Necropsy was then performed to observe gross pathological changes of various visceral organs. Brain, heart, lung, stomach, liver, kidney, spleen, bladder, testis in male rats, ovary and uterus in female rats were weighed and then calculated in term of % relative organ weight. The visceral organs were preserved in 10% buffered formalin solution and were subsequently subjected to histological preparing process for tissue slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examinations.

### Data analysis

Body weight, organ weight, food consumption, hematological and biochemical values were statistically analyzed by SPSS program. One way ANOVA was performed and the data was tested for homogeneity of variance by Levene test. Bonferroni test was used in case of equal variance whereas Tamhane test was applied for unequal variance in multiple comparison. Histopathological results were evaluated by Fisher's Exact test and statistical significance of all data was set at  $P < 0.05$ .

### Results

#### Effects of *P. mirifica* on body weight, food consumption and physical appearance

Average body weight of male rats treated with *P. mirifica* powder (PM) at the doses of 50 and 250 mg/kg/day were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ) since week 2 and 3 through the end of the experiment, respectively. Female rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day had significantly lower average body weight than their control group ( $P < 0.05$ ) since week 3 and 4, respectively until the end of the experiment (Fig.1).

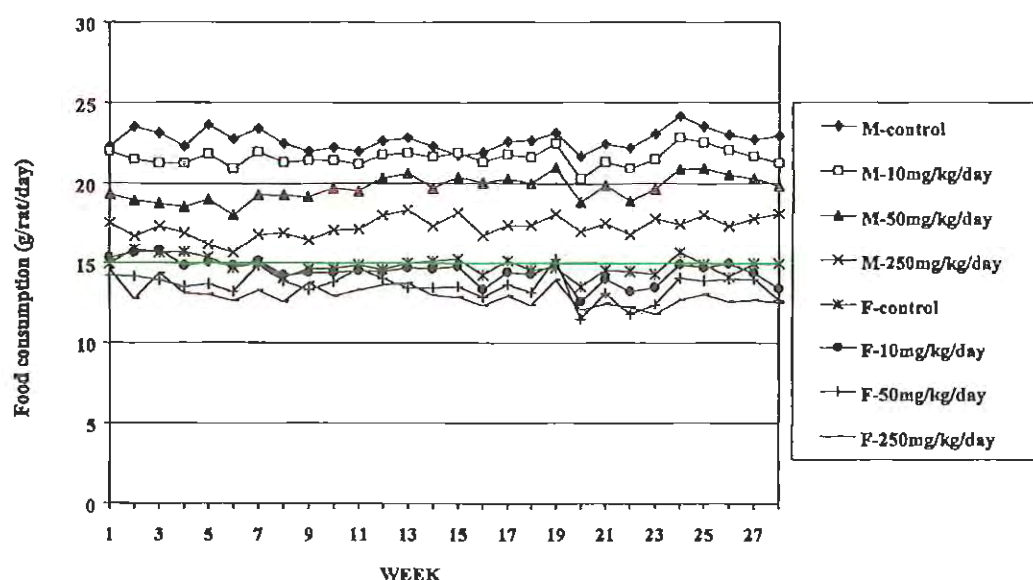


Figure 1 Average body weight of male(M) and female (F) rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Food consumptions of male rats receiving 50 and 250 mg/kg of PM were significantly decreased when compared with that of the control group ( $P < 0.05$ ). Male rats receiving 10 mg/kg of PM had significantly lower food consumption than the control group for several weeks i.e. week 2 to week 8 of the study and after that there was no difference of food consumption until the end of the study (Fig.2). Female rats receiving the highest

dose of PM had significantly lower food consumption than the control group ( $P < 0.05$ ) at each week as shown in Fig. 2. During the experiment, some animals receiving PM had alopecia areata from left or right shoulder to thoracic skin. The lesions were present for two weeks and then recovered. The number of rats showing alopecia was summarized in Table 1.

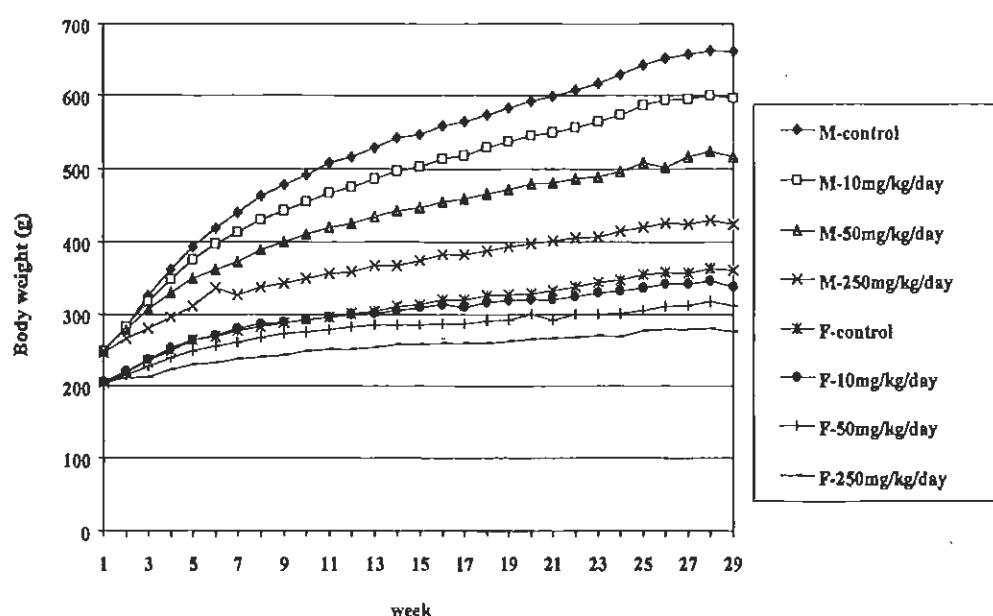


Figure 2 Food consumption of male (M) and female (F) rats treated with *P. mirifica* for 6 months



**Table 1** The number of rats developed alopecia during the chronic toxicity study of *P.mirifica* (n=15/group/sex)

Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)	No. of rats with alopecia		Duration of exposure (day)
	male	female	
0	0	0	-
10	0	1(6.7%)	87
50	1 (6.7 %)	1 (6.7%)	60 - 64
250	4 (26.67)	2 (13.33%)	61-156
250-R	4 (26.67%)	3 (20%)	23 - 54

250-R= high dose recovery group

**Effects of *P. mirifica* on hematological values**

Significant decreases of hematocrit, RBC and hemoglobin were observed in male and female rats treated with 250 mg/kg/day of PM as compared with those of their corresponding control groups ( $P<0.05$ ). Male rats receiving PM at the dose of 50 mg/kg/day and higher as well as female rats receiving PM at 250 mg/kg/day had significantly decreased eosinophil (%) when compared with the corresponding control groups ( $P<0.05$ ). The percentage of lymphocyte in female rats receiving PM at the dose of 250 mg/kg/day was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). Hematological values of male and female rats were shown in Table 2 and 3.

**Effects of *P. mirifica* on clinical chemistry values**

Male rats receiving PM at the dose of 50 and 250 mg/kg/day had significantly lower AST and cholesterol levels than the control group ( $P<0.05$ ). Albumin level was significantly lower in the highest dose of PM-treated group than that of the control group ( $P<0.05$ ). Bilirubin and chloride levels of high dose recovery group were significantly increased as compared to the corresponding control group (Table 4).

Female rats receiving PM at the highest dose had significantly lower levels of AST and cholesterol than the control group ( $P<0.05$ ) whereas triglyceride level was significantly increased ( $P<0.05$ ). The levels of total protein were significantly increased

in female rats treated with PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day as well as in the 250-R group (Table 5).

**Effects of *P. mirifica* on organ weight**

At necropsy, no remarkable gross pathological lesions of the internal organs of all PM-treated and control groups were observed. Male rats treated with PM at the highest dose had significantly decreased weight of brain, lung, liver, testicles, and adrenal gland as compared to the control group ( $P<0.05$ ). The significant increases of cardiac weight were observed in male rats receiving PM at any doses (Table 6). Female rats treated with the highest dose of PM had significantly decreased cardiac weight while uterine and adrenal weight was significantly increased ( $P<0.05$ ) (Table 7).

**Effects of *P. mirifica* on histopathology of internal organs.**

It was demonstrated that the incidence of fatty degeneration in liver and adrenal gland in all groups of PM-treated male rats was significantly decreased as compared to their control group ( $P<0.05$ ). The incidence of kidney tubular cyst was significantly increased in male rats receiving the highest dose of PM and in the high dose recovery group. Additionally, male rats treated with PM at the dose of 10 mg/kg/day onward had significantly higher incidence of tubular cast than their control group (Table 8).

**Table 2** Hematology values of male rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=13	250 n=15	250-R n=14	
Hematocrit (%)	46.65±0.52	46.78±0.68	45.58±0.65	42.88±0.88*	46.48±0.64	42.5-49.4
RBC( x 10 <sup>6</sup> /μL)	9.13±0.09	9.09±0.12	8.85±0.14	8.05±0.18*	8.64±0.14	7.2-9.6
Hb (g/dl)	15.72±0.12	15.77±0.16	15.46±0.12	14.70±0.18*	16.51±0.15*	12-17.5
MCV (fl/red cell)	51.15±0.64	51.51±0.78	51.56±0.52	53.25±0.44	53.83±0.58	57-65
MCH (pg/red cell)	17.24±0.21	17.38±0.18	17.58±0.30	18.38±0.36	19.19±0.31*	14.6-21.3
MCHC (g/dl RBC)	33.76±0.33	33.80±0.35	34.08±0.50	34.61±0.79	35.64±0.39*	26-38
WBC (K/μL)	5.38±0.38	6.37±0.37	5.25±0.32	4.95±0.51	4.31±0.25	5-8.96
Neutrophil (%)	14.68±1.54	13.78±0.93	13.72±1.14	14.62±1.33	16.05±1.17	9-34
Eosinophil (%)	1.54±0.14	1.45±0.10	1.00±0.72*	0.98±0.61*	1.59±0.14	0-2.5
Lymphocyte (%)	81.29±1.70	82.53±1.09	83.72±1.06	82.67±1.37	80.24±1.28	65-84.5
Monocyte (%)	1.10±0.30	1.39±0.35	0.94±0.29	1.07±0.25	1.14±0.36	0-5
Basophil (%)	1.19±0.19	0.78±0.09	0.66±0.06	0.61±0.07	0.97±0.10	0-1.5
Platelet (K/μL)	877.13±21.06	829.00±31.75	844.38±23.15	844.57±39.40	882.79±37.02	662.0-992.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

\*significantly different from the control group at P< 0.05

**Table 3** Hematology values of female rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=14	250 n=15	250-R n=15	
Hematocrit (%)	45.30±0.91	45.23±0.76	45.95±0.36	41.12±0.65*	43.81±0.68	42.5-49.4
RBC( x 10 <sup>6</sup> /μL)	8.36±0.17	8.23±0.12	8.43±0.10	7.58±0.11*	8.02±0.12	7.2-9.6
Hb (g/dl)	15.52±0.27	15.33±0.18	15.34±0.16	14.03±0.17*	15.86±0.12	12-17.5
MCV (fl/red cell)	54.31±0.38	54.95±0.49	54.52±0.48	54.21±0.34	54.61±0.48	57-65
MCH (pg/red cell)	18.63±0.19	18.65±0.17	18.20±0.19	18.54±0.16	19.82±0.26*	14.6-21.3
MCHC (g/dl RBC)	35.32±0.34	33.97±0.35	33.38±0.18	34.20±0.31	36.31±0.46*	26-38
WBC (K/μL)	2.92±0.23	2.56±0.28	2.69±0.27	2.68±0.17	2.43±0.19	5-8.96
Neutrophil (%)	23.44±3.10	20.77±2.47	21.23±2.93	21.37±1.57	21.20±1.92	9-34
Eosinophil (%)	1.93±0.16	2.16±0.16	1.52±0.12	1.21±0.17*	1.86±0.14	0-2.5
Lymphocyte (%)	70.19±3.22	73.81±2.71	73.84±2.92	81.02±2.01*	73.23±2.27	65-84.5
Monocyte (%)	3.64±0.86	2.62±0.74	2.75±0.71	2.14±0.59	2.35±0.56	0-5
Basophil (%)	0.80±0.10	0.64±0.08	0.66±0.12	0.79±0.11	1.37±0.16*	0-1.5
Platelet (K/μL)	847.03±25.03	859.63±21.93	923.42±29.42	826.65±33.01	871.39±27.01	403.0-979.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

\*significantly different from the control group at P< 0.05

**Table 4** Clinical chemistry values of male rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	control	10	50	250	250-R	
	n=15	n=15	n=15	n=13	n=15	
ALP (U/L)	63.00±2.87	62.93±2.66	67.93±4.91	68.73±4.10	72.21±6.94	56.8-128.0
ALT (U/L)	38.00±2.07	37.07±2.50	32.57±2.09	44.73±4.84	38.36±3.01	28.9-47.6
AST (U/L)	72.93±2.89	67.60±3.58	58.07±2.02*	55.80±3.02*	64.29±1.89	45.7-80.8
BUN (mg/dl)	19.25±0.49	19.98±0.75	20.84±0.77	19.56±0.91	21.76±0.94	5-29
Creatinine(mg/dl)	0.70±0.03	0.63±0.05	0.67±0.02	0.64±0.02	0.58±0.01*	0.2-0.8
Total protein (g/dl)	6.77±0.07	6.88±0.08	6.89±0.08	6.81±0.08	7.09±0.07*	4.7-8.15
Albumin (g/dl)	4.16±0.04	4.15±0.04	4.15±0.06	3.83±0.07*	4.26±0.05	2.7-5.1
Bilirubin(mg/dl)	0.07±0.01	0.08±0.02	0.13±0.03	0.08±0.01	0.34±0.01*	0.0-0.55
Glucose (mg/dl)	167.40±5.54	176.62±8.50	154.77±11.35	189.65±9.27	190.84±8.06	130.0-267.0
Uric acid (mg/dl)	1.87±0.21	2.29±0.36	1.72±0.23	2.31±0.43	1.86±0.27	1.2-7.5
Triglyceride (mg/dl)	162.27±10.92	200.63±24.33	201.15±23.44	184.80±38.26	195.05±21.25	53.0-124.8
Cholesterol (mg/dl)	84.75±4.33	96.27±7.81	47.51±4.48*	27.27±4.36*	96.71±6.28	45.0-92.0
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	146.73±0.54	146.20±0.35	147.14±0.36	146.67±0.35	148.43±0.45	143.0-156.0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	5.77±0.16	6.56±0.41	5.93±0.28	6.67±0.25	5.49±0.14	5.4-7.0
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	108.47±0.54	108.53±0.40	108.43±0.40	107.60±0.49	112.57±0.58*	100.0-110.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

\*significantly different from the control group at P<0.05.

**Table 5** Clinical chemistry values of female rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	control	10	50	250	250-R	
	n=15	n=15	n=15	n=13	n=15	
ALP (U/L)	27.53±2.03	26.00±2.39	25.47±1.66	23.92±1.03	25.29±0.87	56.8-128.0
ALT (U/L)	45.13±4.92	39.93±2.55	35.73±2.33	37.92±2.81	31.14±1.99*	28.9-47.6
AST (U/L)	86.67±6.87	76.40±4.06	82.73±10.59	65.08±3.41*	67.29±2.29	45.7-80.8
BUN (mg/dl)	20.27±0.96	21.05±0.77	22.09±0.60	21.90±0.55	21.58±1.02	5-29
Creatinine(mg/dl)	0.72±0.01	0.75±0.01	0.76±0.02	0.71±0.01	0.63±0.01*	0.2-0.8
Total protein (g/dl)	6.98±0.07	7.05±0.05	7.46±0.08*	7.52±0.06*	7.50±0.08*	4.7-8.15
Albumin (g/dl)	4.95±0.05	4.89±0.06	5.04±0.05	4.80±0.05	4.91±0.06	2.7-5.1
Bilirubin(mg/dl)	0.09±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01*	0.0-0.55
Glucose (mg/dl)	149.00±4.83	139.99±5.28	165.56±7.65*	172.25±6.53*	152.81±5.14	96.0-153.0
Uric acid (mg/dl)	2.03±0.25	1.38±0.20	2.28±0.33	2.00±0.29	1.76±0.16	1.2-7.5
Triglyceride (mg/dl)	125.84±9.17	117.01±8.80	143.14±15.86	221.90±26.69*	153.00±14.76	39.1-72.8
Cholesterol (mg/dl)	71.97±4.43	69.87±5.11	67.34±6.49	39.02±3.53*	78.17±4.22	31.0-68.0
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	147.00±0.31	147.20±0.37	147.60±0.25	148.23±0.36*	149.57±0.25*	143.0-156.0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	5.74±0.32	4.93±0.26	5.29±0.31	5.44±0.31	5.48±0.16	5.4-7.0
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	111.27±0.47	111.47±0.46	111.06±0.46	111.15±0.36	117.57±0.34*	100.0-110.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ±SDM

\*significantly different from the control group at P<0.05.



Table 6 Organ weight of male rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)				
	Control	10	50	250	250-R
	n=15	n=15	n=14	n=15	n=15
Brain	2.15±0.02	2.12±0.02	2.12±0.02	2.04±0.02*	2.09±0.02
Heart	1.52±0.04	1.42±0.03*	1.35±0.03*	1.18±0.04*	1.24±0.03*
Lung	1.86±0.04	1.84±0.05	1.74±0.05	1.65±0.05*	1.67±0.03*
Stomach	2.16±0.06	2.40±0.10*	2.21±0.06	2.23±0.07	2.15±0.05
Liver	14.83±0.61	15.49±0.51	14.28±0.44	13.15±0.56*	13.33±0.46
Right kidney	1.42±0.06	1.43±0.02	1.42±0.06	1.39±0.07	1.33±0.05
Left kidney	1.38±0.06	1.36±0.02	1.34±0.05	1.31±0.05	1.29±0.04
Spleen	1.09±0.04	1.14±0.05	1.04±0.03	1.15±0.04	1.08±0.05
Left testis	3.19±0.08	3.10±0.06	3.02±0.06	2.84±0.14*	2.97±0.05
Right testis	3.16±0.08	3.15±0.07	3.07±0.04	2.90±0.11*	2.98±0.05
Bladder	0.15±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

\*significantly different from the control group at P&lt;0.05

Table 7 Organ weight of female rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)				
	Control	10	50	250	250-R
	n=15	n=15	n=14	n=15	n=15
Brain	1.96±0.01	1.97±0.02	1.98±0.02	1.91±0.02	1.93±0.01
Heart	0.94±0.03	0.95±0.03	0.90±0.02	0.86±0.02*	0.91±0.02
Lung	1.30±0.04	1.37±0.03	1.31±0.02	1.22±0.03	1.28±0.03
Stomach	1.62±0.03	1.73±0.05	1.68±0.06	1.72±0.05	1.58±0.04
Liver	7.52±0.19	7.52±0.29	7.46±0.27	8.01±0.18	7.66±0.14
Right kidney	0.86±0.02	0.85±0.02	0.87±0.02	0.83±0.01	0.88±0.02
Left kidney	0.82±0.02	0.82±0.02	0.81±0.02	0.77±0.02	0.82±0.02
Spleen	0.70±0.02	0.80±0.04*	0.70±0.03	0.74±0.02	0.69±0.02
Left ovary	0.08±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.06±0.00
Right ovary	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.06±0.00
Bladder	0.08±0.00	0.09±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00	0.07±0.00
Uterus	0.69±0.04	0.69±0.03	0.86±0.06	1.05±0.08*	0.82±0.08

250-R= high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

**Table 8** Histopathological results of visceral organs in Wistar rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>P.mirifica</i> (mg/kg/day)									
		Male (n =15/group)					Female (n=15/group)				
		0	10	50	250	250-R	0	10	50	250	250-R
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	4/15	11/15*	7/15	7/15	10/15*	8/15	9/15	0/15*	8/15	9/15
Heart	Focal myocardiosis	1/15	1/15	1/15	1/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Liver	Fatty degeneration	7/15	2/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
	Lymphoid aggregated periportal areas	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Kidney	Tubular cast	0/15	9/15*	9/15*	7/15*	2/15	4/15	4/15	4/15	5/15	4/15
	Tubular cyst	2/15	1/15	4/15	10/15*	7/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Intestine	GALT hyperplasia	1/15	1/15	0/15	0/15	2/15	2/15	0/15	3/15	1/15	0/15
Testis	Atrophy	0/15	1/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Uterus	Subendometrial gland hyperplasia						2/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Mammary gland	Glandular hyperplasia						3/15	1/15	1/15	1/15	0/15
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	11/15	4/15*	0/15*	0/15*	0/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	Focal hemorrhage						1/15	0/15	0/15	1/15	0/15

250-R=high-dose recovery group

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated

\*significantly different from the control group at  $P<0.05$

## Discussion

In this six-month chronic toxicity study, the doses of PM were changed to be 10, 50 and 250 mg/kg/day. Since our previous ninety-day subchronic toxicity study revealed that PM at the doses of 100 and 1,000 mg/kg produced some adverse effects in the animals.<sup>17</sup> PM at the doses ranged from 50 to 250 mg/kg/day affected the body weight of the animals. The significantly lower body weight may be due to the decreasing of food intake in the PM-treated groups. It was demonstrated that an estrogen derivative, 17-beta-estradiol, can decrease food consumption and food efficiency in rats.<sup>18</sup> Some phytoestrogens such as miroestrol was reported to produce headache and nausea,<sup>3</sup> genistin and daidzein have been shown to decrease the synthesis of cortisol<sup>19</sup> which has an activity on stimulating appetite. Taken together, the decrease of food consumption may be contributed by the estrogenic-like effects of PM. Alopecia found in some rats receiving PM at the given doses may also be resulted from the estrogenic-like activity of PM since there was a study demonstrating that ethynylestradiol, a synthetic estrogen, produced alopecia in the albino rats.<sup>20</sup> However, alopecia in PM-treated rats existed for about two weeks and then it recovered.

Hematologic results demonstrated that PM at the dose of 250 mg/kg significantly decreased hematocrit, RBC, and hemoglobin in both male and female rats, however these alterations were within normal range<sup>21</sup> and recoverable as shown in 250-R group. The decrease of these parameters may be attributable to the estrogenic-like effect of PM since it was reported that dietary administration of 17 beta-estradiol produced anemia in rats.<sup>18</sup> The significant changes of eosinophil(%) in PM-treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats receiving the highest dose of PM was within normal range<sup>21</sup> i.e., 0-2.5%. In addition, the increase of lymphocyte in female rats receiving the highest dose of PM was also within normal range.<sup>21</sup>

The significant decreases of AST levels in PM-treated male rats at the dose of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats receiving the highest dose were within normal range. However, this alteration did not indicate any damage of the concerning vital organs such as liver and heart. Our findings that triglyceride levels increased in a dose-dependent manner in all groups of female rats receiving PM and the significance effect was observed in the highest dose-treated group, suggest that this phenomenon may be PM related. Moreover, this findings are consistent with our previous subchronic toxicity study showing that high dose of PM (1,000 mg/kg/day) can cause the elevation of triglyceride level in female rats.<sup>17</sup> Cholesterol levels were significantly decreased in PM-treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day as well as in female rats receiving the highest dose of PM, suggesting the hypocholesterolemic effect of PM which was consistent with our previous study<sup>17</sup>. There was also study indicated that phyto- estrogens from soy bean, a plant in the same family as *P. mirifica* (Leguminosae) were capable in decreasing LDL and increase HDL cholesterol levels in monkey.<sup>22</sup>

In this study we found that the body weights in the groups receiving PM at 50 and 250 mg/kg were significantly decreased and this might result in the significant increase of relative weight of many organs. Therefore we present actual organs weight which reveal more actual alterations than relative organ weights. The decreases of some organs weights i.e., heart in PM-treated male rat at each dose and in the highest dose-treated female rats, lung in male receiving highest dose of PM were observed. However histopathology of these organs did not indicate any abnormality The decrease of left and right testicular weight in male rats receiving the highest dose of PM and the increase of uterine weight in female rats at this dose suggest the estrogenic effects of PM as previously reported in some studies.<sup>13,14,17</sup>

Histopathology results showed the alterations in some visceral organs of the

male rats receiving PM. The incidence of hepatocyte fatty degeneration was significantly decreased at the doses ranging from 10 to 250 mg/kg of PM. This phenomenon may be estrogenic effect of PM, since there were some investigations showing that estrogens were able to increase apolipoprotein B (apo-B) production in human hepatocytes<sup>23</sup> and in mice hepatocyte.<sup>24</sup> Hepatocytes assemble triglyceride into VLDL-lipoproteins particles on the backbone of apo B-100 and secrete into plasma.<sup>25</sup> This may explain why the incidence of hepatocyte fatty degeneration in the liver decreased. The significantly higher incidence of tubular cyst in the kidneys of male rats receiving PM at the dose of 250 mg/kg/day and in those of the high dose recovery group suggests that prolonged administration of PM at this dose may cause tubular cells damage. It was demonstrated that metabolites of daidzin and daidzein were excreted in urine and bile<sup>26</sup>; therefore the excretion of these metabolites via kidney may affect the tubular cells. The findings of crystal-like tubular cast in the kidney of PM-treated male rats suggest that there may be the disturbance of some electrolytes reabsorption or transportation of renal epithelium. Some flavones, such as genistein and daidzein activated Cl-channels, genistein and apigenin were reported to possess a stimulatory effect on sodium, potassium and chloride ion-cotransporters in a renal epithelial cell line<sup>27</sup>. In addition, equol, a metabolic compound of daidzein by intestinal bacteria, is also a potent inhibitor of Na-K-Cl cotransporter.<sup>28</sup> However, the incidence of tubular cast decreased after PM discontinuation. The incidence of adrenocortical fatty degeneration of male rats receiving PM at each dose decreased in a dose-response relationship, suggesting the depletion of lipid accumulation. Previously, there was a study showed that daidzein, a phytoestrogen, can suppress cortisol synthesis in the adrenal gland<sup>29</sup>. Therefore, the reduction of cortisol levels might result in the stimulation of ACTH production. Under conditions of acute or

prolonged ACTH stimulation, the lipid stores in the adrenal cortical cells might be used for corticosteroid synthesis<sup>30</sup>. The incidences of other histopathologic findings were not dose dependent; therefore they could not contribute to PM.

In conclusion, the chronic toxicity study of PM at the doses ranging from 10 to 250 mg/kg/day indicated that PM exerted its estrogenic-like activities in many aspects i.e., at the dose of 250 mg/kg/day affect hematology values, testicular and uterine weight. In addition, the incidence of kidney tubular cyst was significantly increased at this dose. Therefore, prolonged use and overdose of PM dose should be avoided.

### Acknowledgement

The authors would like to thank the staff of Laboratory animal center, National Institute of Health, Department of Medical Science, for animal care and facilities. We are grateful to Dr. Anudep Rangsipat, Division of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University for histopathological examination of tissue slides, and Mr. Teerawut Pinthong, head of pharmacokinetic section, Medicinal Plant Research Institute for daidzein assay.

### References

1. Smitinand T. *Thai plant names (Botanical names-Vernacular names)*. 2<sup>nd</sup> ed. Bangkok: Funny Publishing United Partnership, 1980.
2. The Royal Institute, Editors. *Plant taxonomy*. Bangkok: Puaenpim Co., Ltd., 1995.
3. Cain JC. Miroestrol: an estrogen from the plant *Pueraria mirifica*. *Nature* 1960; 188: 774-7.
4. Bounds DG and Pope GS. Light absorption and chemical properties of miroestrol, the oestrogenic substance of *Pueraria mirifica*. *J Chem Soc* 1960; 17:15-6.
5. Nilanidhi T, Kamthong B, Isarasena K and Shiengthong D. Constituents of the tuberous roots of *Pueraria mirifica*. *Proc Pacific Sci Congr Pacific Sci Assoc* 9<sup>th</sup>; Bangkok, 1963.
6. Ingham JL, Tahara S and Dziedzic SZ. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch. Ser C* 1986; 41:403-8.

7. Ingham JL, Tahara S and Dziedzic SZ. Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch*. 43c 1988; 5-10.
8. Ingham JL, Tahara S. and Dziedzic SZ. Minorisoflavones from the roots of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch SerC*. 1989; 44: 724-6.
9. Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, et al. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 2000; 66: 572-5.
10. Chansakaow S, Ishikawa, T, Seki H. et al. Identification of Deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of Kwao Keur. *J. Nat. Pro* 2000; 63(2): 173-5.
11. Smitasiri Y and Sakdarat S. The means of application of *Pueraria mirifica* for pigeon (*Columba sp.*) birth control. *Suranaree J Sci Technol* 1995; 2 : 89-9
12. Smitasiri Y, Pangjit S, Anuntalabhochai S. Inhibition of lactation in lactating rats with *Pueraria mirifica* compared with estrogen. *J Sci Fac CMU* 1989;16:7-11.
13. Smitasiri Y, Junyatum U and Songjitsawad A. Postcoital antifertility effects of *Pueraria mirifica* in rats. *J Sci Fac CMU* 1986;13:19-28.
14. Langkalichan Y. The study of effects of *Pueraria mirifica* on reproductive organs, adrenal glands, liver, reproductive behavior and reproduction. MS Thesis (Biology) Chiang Mai University 1984.
15. Thaiyanan P, Trakulbool P, and Anantapochai S. Effect of White Gwow on Quail II : Red blood cells and white blood cells productions. *J Med Tech CMU* 1992; 25(3):107-114.
16. Chuaychoo A, Junyatum U, Anuntalabhochai S, Smitasiri S. Toxic effects of White Gwow (*Pueraria mirifica*) in Japanese quails. *J Sci Fac CMU* 1984;11: 46-55.
17. Chivapat S, Chavalittumrong P, Rattana-jarasroj S, Chuthaputti A and Punyamong S. Toxicity study of *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatabandhu. *Bull Dept Med Sci*, 2000; 42(3): 201-222.
18. Biegel LB, Flaws JA, Hirshfield AN, et al. 90-day feeding and one generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci* 1998; 44: 116-42.
19. Mesiano S, Katz, SL Lee JY, et al. Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 : 2443-8.
20. Schardein JL. Studies of the components of an oral contraceptive agent in albino rats. 1. Estrogenic component. *J Toxicol Environ Health* 1980; 6(4):6.
21. Gad SC. The Rat: In: Animal Models in Toxicology (Eds. S.C. Gad and C.P. Chengellis). New York: Marcel Dekker, 1992: 81.
22. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgan TM. and Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; 126: 43-50.
23. Kutteh WH, Rainy WE, and Carr BR. Regulatory effects of multifunctional cytokines and steroid hormones on apolipoprotein B production by human fetal hepatocytes. *J Soc Gynecol Investig* 1994; 1(4): 256-63.
24. Srivastava RA, Tang J, Baumann D, Schonfeld G. Hormonal and nutritional stimuli modulate apolipoprotein B mRNA editing in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188(1): 135-41.
25. Dominiczak MH. Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma. In Rifai N, Warnick GR, and Dominiczak MH, editors *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington DC: AACC Press, 1997: 1-17.
26. Yasuda T, Kano, Y, Saito, K. and Ohsawa, K. Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol Pharm Bull* 1994; 17(10): 1369-74.
27. Nisato N, Ito Y, and Marunaka Y. Activation of Cl-channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl-cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254(2): 368-71.
28. Martinez RM, Gimenez I, Lou JM, Mayoral JA and Alda JO. Soy isoflavonoids exhibit in vitro biological activities of loop diuretics. *Am J Clin Nutr* 1998; 68 suppl 6: 1354 -7.
29. Mesiano S, Katz SL, Lee JY, et al. Phytoestrogen alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2443-8.
30. Michael HR, Lynn JR and Gordon IK. *Histology: A text and atlas* 3<sup>rd</sup> ed. Maryland: Willias and Willkins, 1995.



## RESEARCH ARTICLES

### Effects of Valproyl Urea on Neurons of The Cerebral Cortex and Cerebellar Purkinje Cells in Rats

Onrawee Khongsombat<sup>1</sup>, Chamnan Patarapanich<sup>2</sup>, Mayuree H.Tantisira<sup>2</sup>, Boonyong Tantisira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University

<sup>2</sup> Research Unit of Neurophysiology and Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

#### Abstract

Preliminary studies in various animal models have established a greater anticonvulsant activity as well as broader margin of safety with less unwanted effects of N-(2-propylpentanoyl) urea (VPU) than its parent compound, valproic acid. We present herein the effects of VPU on neurons of the cerebral cortex and cerebellar Purkinje cells of anesthetized rats assessed by microiontophoretic technique and micropressure ejection. Similar to micropressure ejection of valproic acid, locally applied VPU depressed spontaneous firing of both neurons of the cerebral cortex and cerebellar Purkinje cells in a dose-dependent manner. Depressant effect on spontaneously firing Purkinje cells of VPU but not that of valproic acid was abolished in the presence of bicuculline given microiontophoretically. However, neither effect of VPU nor valproic acid was affected by strychnine. Further studies to probe interaction between VPU and other well established excitatory amino acid neurotransmitters of the brain given microiontophoretically were carried out on Purkinje cells. VPU exhibited different profile of responses from those of valproic acid which reversibly depressed excitant effect of glutamate and aspartate while had no effect on depressant effect evoked by either GABA or glycine. Virtually no effect of VPU was observed in corresponding environment. In conclusion, the present study demonstrated that VPU *per se* was able to exert anticonvulsant activity by different mechanisms than those exhibited by its parent compound, valproic acid. Interaction with GABA<sub>A</sub> receptor may at least, in part, involved in the anticonvulsant activity of VPU. More experiments are needed to identify other possible mechanisms of action of this compound.

**Key words :** valproyl urea, valproic acid, microiontophoretic technique, neurons of the cerebral cortex, cerebellar Purkinje cells.

## ผลของวาลโปอิลยูเรียต่อเซลล์ประสาทในเปลือกสมองใหญ่และเซลล์ประสาทเปอร์กินเจในเปลือกสมองน้อยของหนูแรท

อรรระวี คงสมบัติ<sup>1</sup>, ชำนาญภัทรพานิช<sup>2</sup>, มยุรี ดันติสิระ<sup>2</sup>, บุญยงค์ ดันติสิระ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

<sup>2</sup>หน่วยปฏิบัติการวิจัยประสาทสรีรวิทยาและประสาทเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านชักในสัตว์ทดลอง พบว่าเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย (วีฟียู) มีประสิทธิภาพในการต้านชักสูงกว่าและมีฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่ากรทวาลโปรอิก (วีพีเอ) ซึ่งเป็นสารต้นแบบ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะใช้เทคนิคไมโครโอออนโดฟอเรซีส์ร่วมกับการใช้ความดันในการปลุกสารออกจากปลายอิเล็กโทรด ในการศึกษาผลของวีฟียูต่อเซลล์ประสาทในเปลือกสมองใหญ่และเซลล์ประสาทเปอร์กินเจในเปลือกสมองน้อยของหนูแรทที่ทำให้สลบ วีฟียูและวีพีเอสามารถออกฤทธิ์ลดอัตราการปลดปล่อยกระแสประสาทที่เกิดขึ้นเองของทั้งเซลล์ประสาทที่เปลือกสมองใหญ่และเซลล์ประสาทเปอร์กินเจในเปลือกสมองน้อย ในลักษณะที่แปรตามขนาดของสารที่ได้รับ ฤทธิ์ในการกดเซลล์ประสาทเปอร์กินเจดังกล่าวของวีฟียูจะไม่เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใดเมื่อให้ร่วมกับสารสตริควินแต่ถูกปิดกั้นได้อย่างสมบูรณ์โดยสารโบคุคูลินซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ปิดกั้นโดยจำเพาะที่ตำแหน่งจับของกาบาเอ ไม่พบว่าสตริควินหรือโบคุคูลินมีผลต่อฤทธิ์ในการกดการส่งกระแสประสาทของวีพีเอ เมื่อศึกษาผลของวีฟียูและวีพีเอที่มีต่อการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทอื่นๆ ต่อเซลล์ประสาทเปอร์กินเจ พบว่าวีฟียูไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น (กลูตาเมตและแอสพาร์เทต) และยับยั้ง (กาบาและกลัยซีน) ซึ่งต่างจากผลของวีพีเอที่มีผลลดการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น (กลูตาเมตและแอสพาร์เทต) แต่ไม่มีผลต่อสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (กาบาและกลัยซีน) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวีฟียูเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ต้านชักด้วยตัวเองและด้วยกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากวีพีเอ ซึ่งส่วนหนึ่งของกลไกการออกฤทธิ์ต้านชักดังกล่าวจะมีความเกี่ยวข้องกับตัวรับของกาบาเอ และควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกอื่นๆ นอกเหนือจากที่รายงานไว้ในงานวิจัยนี้

คำสำคัญ : วาลโปอิลยูเรีย, กรทวาลโปรอิก, เทคนิคไมโครโอออนโดฟอเรซีส์, เซลล์ประสาทในเปลือกสมองใหญ่, เซลล์ประสาทเปอร์กินเจในเปลือกสมองน้อย

## Introduction

N-(2-propylpentanoyl)urea or valproyl urea (VPU), (Fig.1) is a valproic acid analogue which has been reported in various animal models, to possess a higher anticonvulsant activity in parallel with a greater relative margin of safety while offering less unwanted effect than its parent compound, valproic acid or VPA<sup>1</sup>. No effect of VPU and VPA has been observed on total cytochrome P450 or CYP1A1, 1A2 or 2E1 activities of rats. However, VPU has been found to significantly increase CYP 2B1 and 2B2 activities<sup>2</sup>. Preliminary studies of pharmacokinetic as well as embryotoxic of this compound have been reported<sup>3,4</sup>. Many of the conventional antiepileptic drugs as well as those which just have been released into the market or newly discovered have been noted for their depressant effect on either the spontaneously or stimulus-driven firing neurons of the experimental animal's brain and thus may account for the anticonvulsant effect observed<sup>5,6</sup>. In the present study, we used microiontophoretic technique in combination with micropressure application to investigate the effect of VPU, in comparison with VPA, on neurons of the cerebral cortex and Purkinje cells of cerebellum of rats anesthetized with urethane. Interactions between VPU and other well established amino acid neurotransmitters or compounds with well defined mechanism of action were also observed.

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats weighing 200-240 g obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand, were used in this experiment. The rats were housed in groups of four to five rats and maintained on a standard light-dark cycle with a constant humidity and controlled temperature (28-32 °C). The animals had free access to food and tap water ad libitum.

### Experimental protocol

Wistar rats were anesthetized by urethane (1.6 g/kg B.W. i.p.) and placed onto

a stereotaxic apparatus (Narishige). The skull covering area of the frontal cortex and cerebellum were then removed. Recording of extracellular spike potentials was made from neurons of the sensorimotor cortex (AP=0-3 mm, L=1-2 mm, in relation to Bregma and V=0.8-2 mm from the pial surface<sup>7</sup>) and cerebellar Purkinje cells through the central microelectrode filled with a 4 M NaCl solution, of 3-5 barreled microelectrode tip diameter 6-9 µm.

The outer barrels of the electrode contain either  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA, 0.2 M, pH 3.5), glycine HCl (GLY, 0.2 M, pH 3.5), L-glutamate (GLU, 0.5 M, pH 7.5), L-aspartate (ASP, 0.5 M, pH 7.5), strychnine sulfate (STRY, 0.005 M in NaCl, pH 7.0), bicuculline methochloride (BMC, 0.005 M in NaCl, pH 3.5), VPA (0.025 M in 0.1 M hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and VPU (0.005 M in 0.1 M hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin). All standard compounds were injected to the vicinity of neurons using standard microiontophoretic method (Medical System) while the test substances, VPA and VPU, were delivered to neurons by means of micropressure application (Medical System FFM-2). Spike potentials were amplified by a standard set of high input impedance amplifier and monitored on a digital memory oscilloscope (Nikon Kodhen VC10) and were selected by a window slicer. The selected pulses were counted by digital rate meter and were displayed on the McIntosh computer (LC630) with a digital-to-analog converter (MacLab) and software (chart V 3.4.3, MacLab). The records were subsequently converted to neuronal firing rate for data presentation. The neuronal activity before, during and after microiontophoretic or micropressure application of various substances were compared and analysed. In the present study, two groups of neurons which generated spontaneously firing discharge were used. They were neurons in the sensory motor area of the frontal cortex and cerebellar Purkinje cells. The latter were identified by their high firing rates and by the characteristic pattern of simple and complex spike discharges<sup>8</sup> and the neurons were randomly recorded in the vermis of the cerebellum.

## Results

### Effects of VPA and VPU on spontaneously firing neurons of the cerebral cortex and Purkinje cells of the cerebellar cortex

Micropressure application of 0.1 M hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, the solvent used to dissolve VPU or VPA had no effect on neuronal discharge of either neurons of the cerebral cortex ( $n=10$ ) or Purkinje cells of the cerebellum ( $n=20$ ). Micropressure application of VPU ( $n=12$ ) or VPA ( $n=10$ ) induced a dose-dependent and reversible reduction of the spontaneous firing of all neurons tested in the cerebral cortex (Fig. 2A) and cerebellum (Fig. 2B).

### Effects of bicuculline methochloride and strychnine sulfate on the depressant effect of VPU and VPA

As demonstrated in Fig. 3, microiontophoretic application of a convulsant alkaloid, bicuculline (BMC, 20-50 nA), in the amount that produced no excitation *per se* diminished the depressant effect elicited by either GABA or VPU (15-30 psi,  $n=12$ ) on Purkinje cells. On the contrary, inhibition of neuronal discharge resulting from micropressured application of VPA (20-40 psi,  $n=5$ ) was not at all altered by BMC.

Neither the depressant effect, on the neuronal discharge of Purkinje cells, of VPU (20-40 psi,  $n=10$ ) nor VPA (10-30 psi,  $n=5$ ) was altered by microiontophoretic application of STYR (30-60 nA) (Fig. 4) which clearly being able to antagonize the depressant effect of glycine.

### Effects of VPA and VPU on responses evoked by glutamate and aspartate on Purkinje cells

Discrepancy between the depressant effect elicited by VPU and VPA was noted when they were applied on Purkinje cells driven by either glutamate or aspartate. As illustrated in Fig. 5, glutamate (10-40 nA,  $n=15$ ) and aspartate (5-50 nA,  $n=12$ ) consistently increased firing rates of the neuronal discharge which were not affected by concurrent administration of VPU while

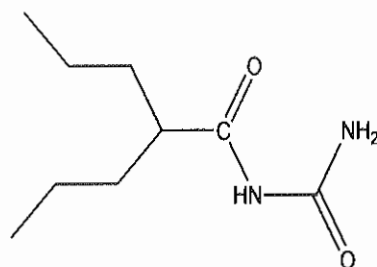
VPA apparently depressed glutamate or aspartate-evoked responses in 10 out of 12 Purkinje cells.

### Effects of VPA and VPU on responses evoked by GABA and glycine on Purkinje cells

Microiontophoretic application of GABA (1-60 nA) and glycine (20-100 nA) consistently depressed neuronal discharge of all Purkinje cells tested ( $n=30$ ) and such depressant effects were not affected by concomitant micropressured application of either VPU (10-35 psi) or VPA (5-30 psi). Typical responses of Purkinje cells under the influence of VPU or VPA to GABA and glycine are illustrated in Fig. 6.

## Discussion and Conclusion

The observation that the parent compound of VPU, VPA, demonstrated depressant effect on both the spontaneously firing neurons of the cerebral cortex and Purkinje cells is in accordance with previous finding of Chapman et al (1982)<sup>9</sup>. Furthermore, VPA, while had no effect on depressant effect elicited by microiontophoretically applied GABA or glycine, antagonized excitant effect induced by the excitatory neurotransmitters, glutamate and aspartate. A body of conflicting results on the effect of VPA that it may potentiate<sup>10,11,12</sup> or have no effect<sup>13,14</sup> on responses to GABA do exist. Differences in methodology as well as region of investigation possibly account for dissociation of the results observed, nevertheless, our observation confines to the latter. Inconsistent effect of microiontophoretically applied VPA on response to glycine and glutamate has been previously reported<sup>9</sup>. However, a suppression of responses to glutamate by VPA has been demonstrated in rat neocortex<sup>15</sup>. Similar result was obtained in our study and it is in line with the finding that VPA is able to reduce NMDA-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -influx<sup>16</sup>. The finding that lack of interaction between VPA and bicuculline as well as strychnine rules out involvement of GABA<sub>A</sub> and strychnine-sensitive glycine receptors as possible site of action of VPA, respectively. Furthermore,



**Figure 1** Structure of N-(2-propylpentanoyl) urea

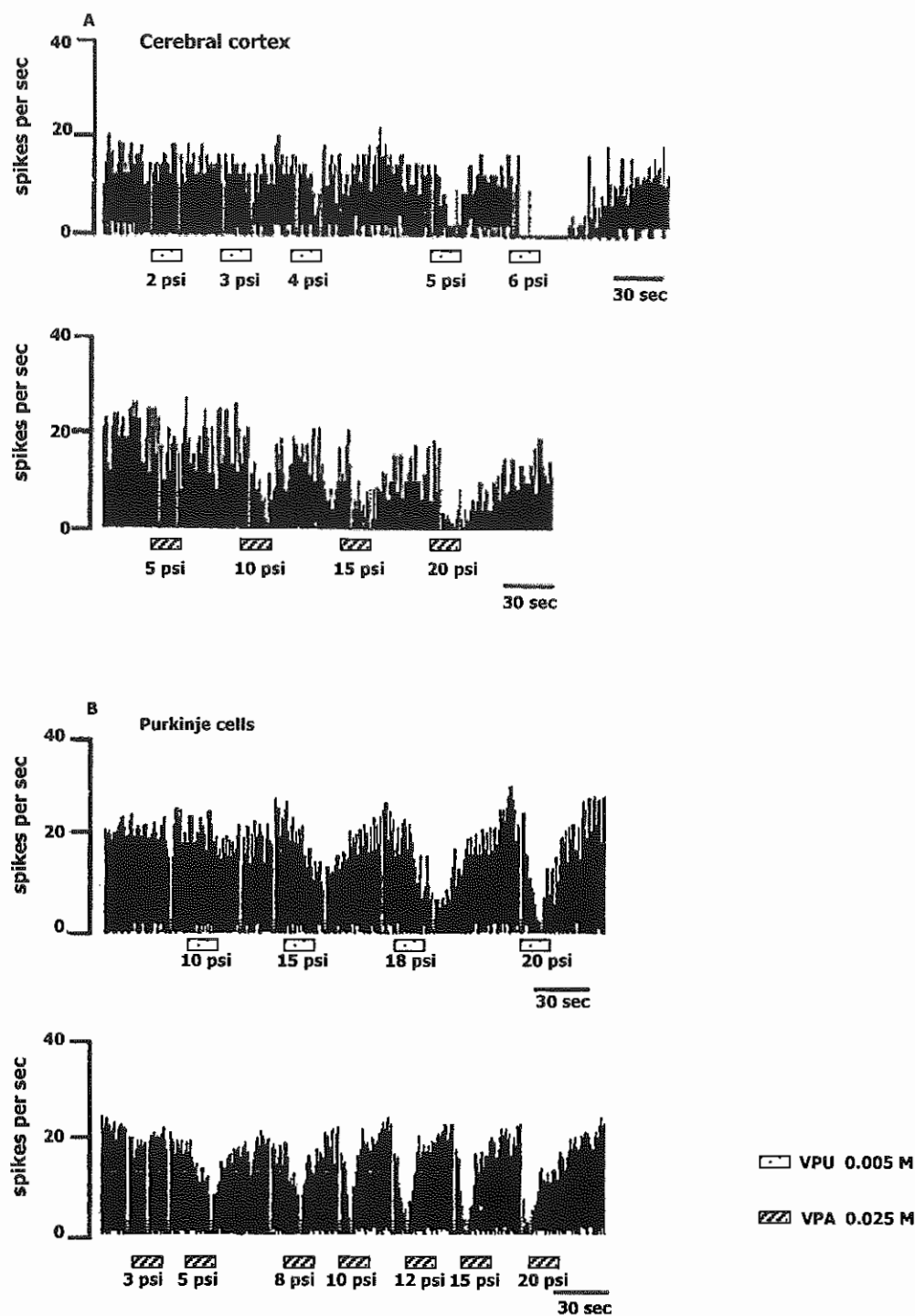
our results demonstrated the ability of locally applied VPA to suppress neuronal discharge of spontaneously firing neurons as well as those evoked by excitatory amino acid neurotransmitter, glutamate and aspartate. These observations could be considered as part of a spectrum of mechanisms underlying anticonvulsant activity of VPA, a broad spectrum of mechanisms known to act through a combination of several mechanisms<sup>17</sup>.

The result that VPU exerted dose-dependent depressant effect on both spontaneously firing neurons of cerebral cortex and Purkinje cells of cerebellum did suggest that VPU *per se* is an active anticonvulsant exerting protection against convulsions observed in various animal models<sup>1</sup>. Alternatively, metabolites of VPU other than being degraded to VPA may be responsible for anticonvulsant effect of VPU. This proposal is further strengthened by dissimilarity in profile of responses between VPU and VPA. Apparently, VPU did not modulate effects of either inhibitory GABA and glycine, or excitatory amino acid neurotransmitters, glutamate and aspartate, on spontaneously firing Purkinje cells. However, the effect of VPU was clearly antagonized by excitant effect of bicuculline, a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist on 12

Purkinje cells indicating a participation of GABA<sub>A</sub> receptor in response to VPU.

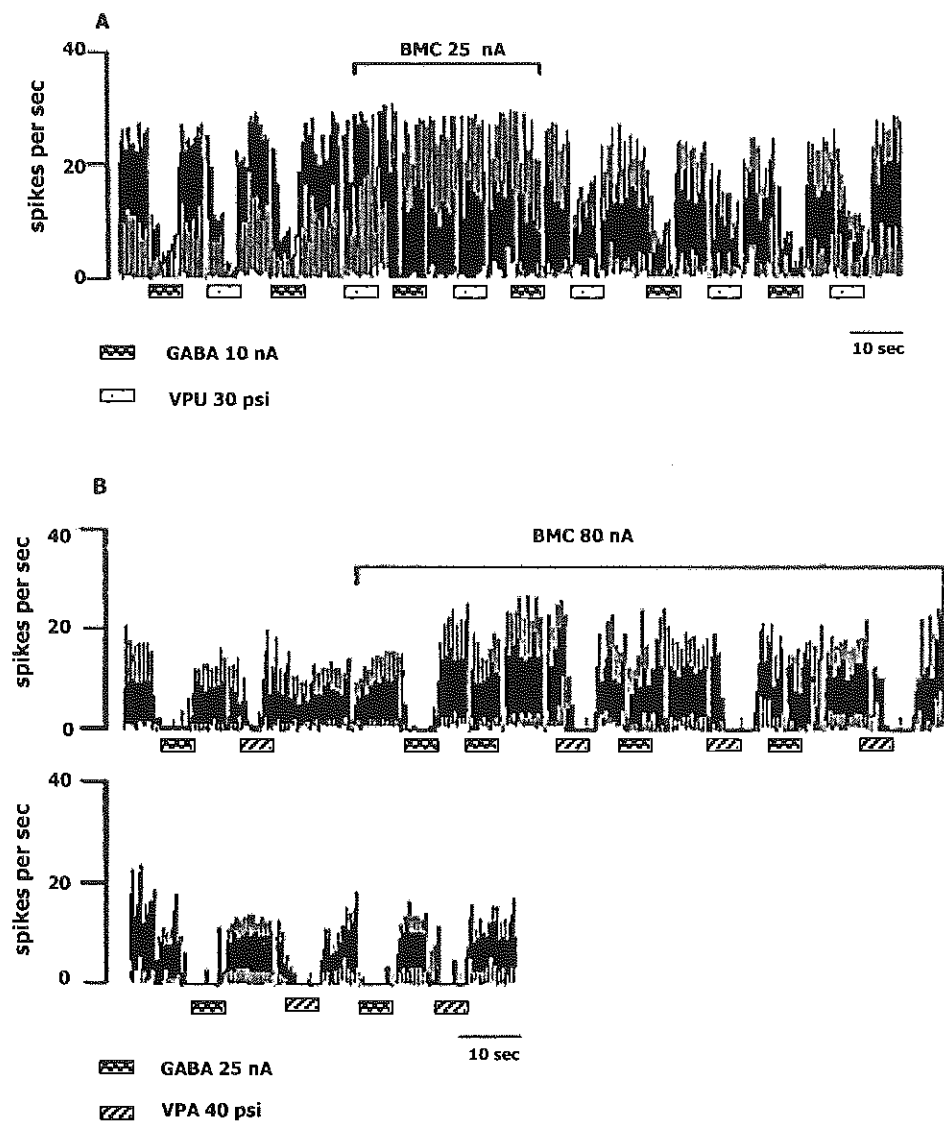
However, when taken into consideration that protective effect of VPU against bicuculline induced convulsion was rather weak<sup>1</sup>, it is highly likely that the anticonvulsant activity of VPU through modulation of GABA<sub>A</sub> receptor should be one among other mechanisms that remain to be elucidated. Like VPA, VPU may possess a wide spectrum of anticonvulsant activity that act in concert to provide protection against convulsions in many animal models<sup>3</sup>.

In conclusion, the present study demonstrated a dose-dependent and reversible depressant effects of locally applied VPU on spontaneously firing neurons. It is thus suggestive that VPU *per se* and/or any metabolites other than VPA is responsible for anticonvulsant activity previously reported in whole animal model. Like VPA, VPU may possess a wide spectrum of anticonvulsant activity, however, VPU seemed to act differently from VPA in terms of interaction with glutamate, aspartate and bicuculline. Questions regarding to the principal anticonvulsant mechanisms of this compound is a subject for further investigation.

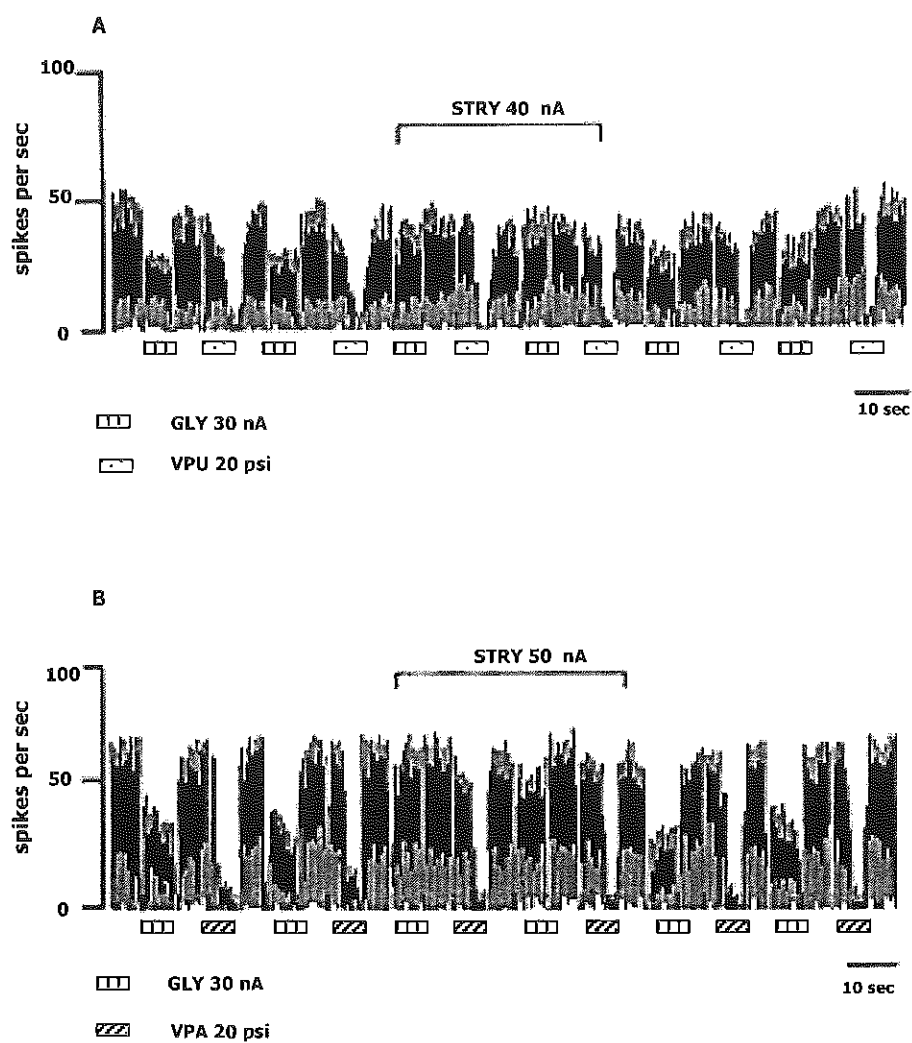


**Figure 2** Effects of VPU (0.005 M) and VPA (0.025 M) in 0.1 M hydroxypropyl- $\beta$  cyclodextrin, being injected by different micropressure (psi) on spontaneously firing rate of neurons of cerebral cortex (A) and cerebellar Purkinje cells (B).

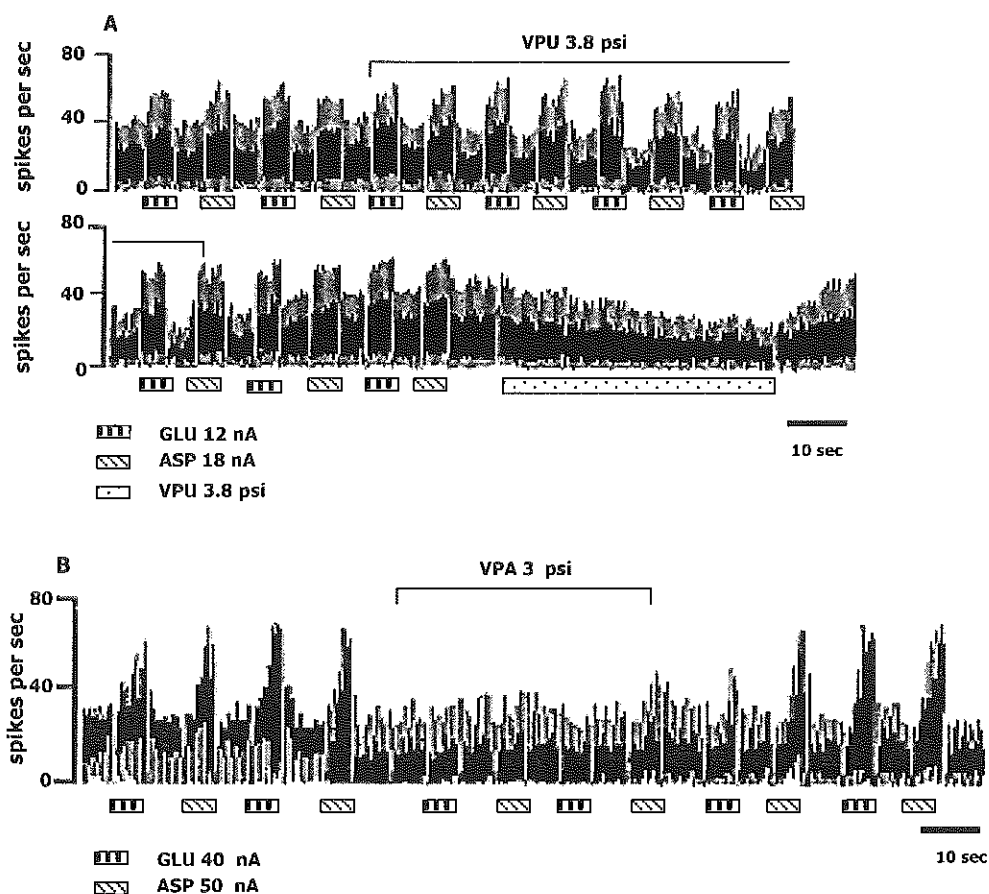




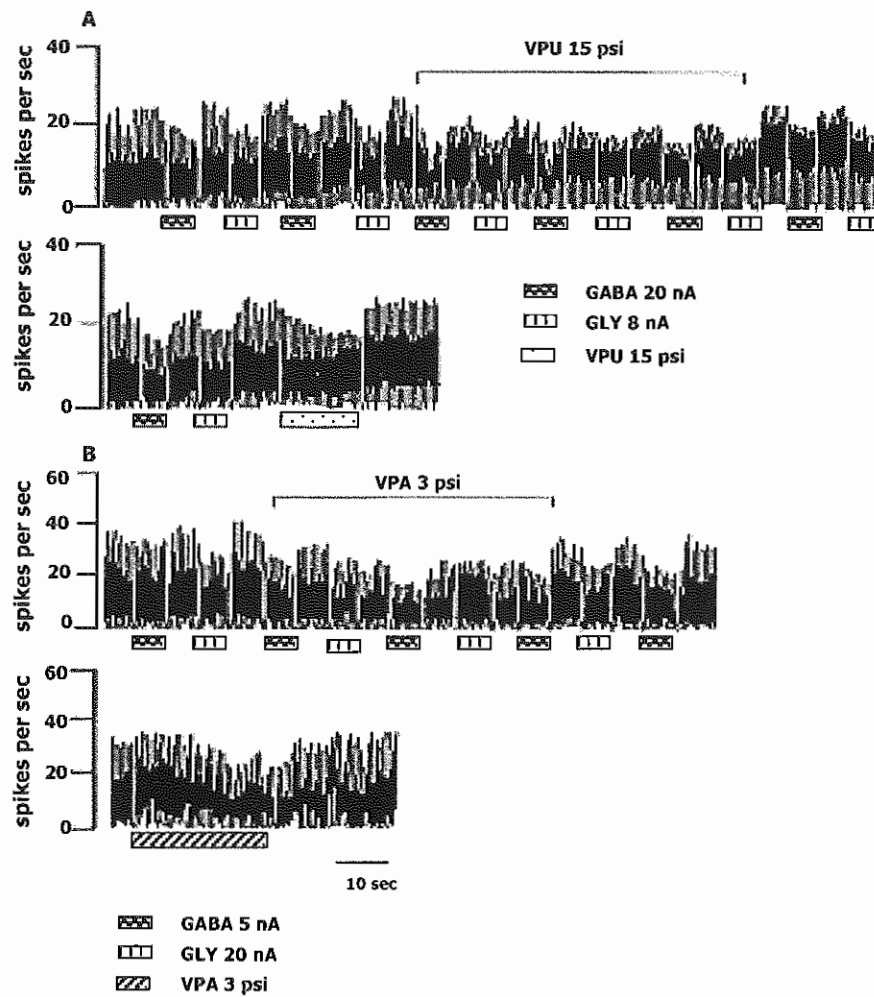
**Figure 3** Effect of continuously microiontophoretic application of bicuculline (BMC) superimposed on the response of Purkinje cells to micropressure application of VPU (0.005 M) (A) and VPA (0.025 M) (B) compared to microiontophoretic application of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).



**Figure 4** Effect of continuously microiontophoretic application of strychnine sulphate (STRY) superimposed on the response of Purkinje cells to micropressure application of VPU (0.005 M) (A) and VPA (0.025 M) (B) compared to microiontophoretic application of glycine (GLY).



**Figure 5** Effect of continuously micropressure application of VPU (0.005 M) (A) and VPA (0.025 M) (B) on excitant action of microiontophoretic application of glutamate (GLU) and aspartate (ASP) on neuronal firing of Purkinje cells.



**Figure 6** Effect of continuously micropressure application of VPU (0.005 M) (A) and VPA (0.025 M) (B) on depressant action of microiontophoretic application of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and glycine (GLY) on neuronal firing of Purkinje cells.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the Rachadapiseksohpoj Research Fund of Chulalongkorn University for financial support.

## References

1. Tantisira B, Tantisira MH, Patarapanich C, et al. Preliminary evaluation of the anticonvulsant activity of a valproic acid analog: N-(2-propylpentanoyl) urea. *Res Commu Mol Pathol Pharmacol*. 1997; 97 (2): 151-64.
2. Lawanprasert S, Kijsanayotin P, Niwat-tisaiwong N, et al. Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on rat hepatic drug metabolizing enzymes. *Thai J Pharmacol*. 2000; 22(1): 23-31.
3. Tantisira MH. Valproyl Urea: A promising Anticonvulsant Candidate. *Proceeding of the fourth joint seminar "Drug Development through Biopharmaceutical Sciences"*; 1998; Nov 24-26; Hat Yai, Songkhla, Thailand: NRCT-JSPS Core University System on Pharmaceutical Sciences, 1998.
4. Meesomboon R, Chongsutgaweewong R, Patarapanich C, et al. In viro embryotoxicity of an anticonvulsant valproic analogue: N-(2-propylpentanoyl) urea. *Proceedings of the Australian Physiological & Pharmacological Society*; 1998; 27 Sep – 1 Oct; Brisbane, Queensland, Australia, 1998.
5. Godfraind JM. Microiontophoretic study with milacemide, a glycine precursor on mammalian central nervous system cells. *Br J Pharmacol*. 1990;100:119-25.
6. Salamoni SD, Costa da Costa J, Palma MS, et al. Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Res*. 2005; 1048(1-2): 170-6.
7. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1986.
8. Eccles JC, Ito M, Szentagothai J. *The cerebellum as a neuronal machine*, Springer-Verlag, Berlin. 1967.
9. Chapman A, Keane PE, Meldrum BS, et al. Mechanisms of anticonvulsant action of valproate. *Prog Neurobiol*. 1982; 19: 315-59.
10. Macdonald RL, Bergey GK. Valproic acid augments GABA-mediated post synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Brain Res*. 1979; 170: 558-62.
11. Harrison NL, Simmond MA. Sodium valproate enhances responses to GABA receptor activation only at high concentrations. *Brain Res*. 1982; 250: 201-4.
12. Olpe HR, Steinman MW, Pozza MF, et al. Valproate enhances GABA<sub>A</sub> mediated inhibition of locus coeruleus neurone in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1988; 338:655-7.
13. McLean MJ, Macdonald RL. Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986; 237: 1001-11.
14. Perreault P, Tancredi V, Avoli M. Failure of the antiepileptic drug valproic acid to modify synaptic and non-synaptic responses of CA1 hippocampal pyramidal cells "in vitro". *Epilepsy Res*. 1989; 3: 227-31.
15. Zeise ML, Kasparow S, Zieglansberger W. Valproate suppress N-methyl-D-aspartate evoked, transient depolarizations in rat neocortex in vitro. *Brain Res*. 1991; 544: 345-8.
16. Franceschetti S, Hamon B, Heineman U. The action of valproate on spontaneous epileptiform activity in the absence of synaptic transmission and on evoked changes in (Ca<sup>++</sup>)<sub>o</sub> and (K<sup>+</sup>)<sub>o</sub> in the hippocampal slice. *Brain Res*. 1986; 386:1-11.
17. Loscher W. Effects of antiepileptic drug valproate on metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acid in the brain. *Neurochem Res*. 1993; 18: 485-502.

## RESEARCH ARTICLES

---

### Topical Pimecrolimus 1% Cream in Treatment of Oral Lichen Planus

Patrayu Taebunpakul<sup>1</sup>, Pantipa Chatchatee<sup>2</sup>, Pornpan Piboonratanakit<sup>3</sup>,  
Kobkan Thongprasom<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Oral Surgery, and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University*

<sup>2</sup>*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University*

<sup>3</sup>*Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University*

#### Abstract

Oral lichen planus (OLP) is a common inflammatory disease of unknown etiology. The immunopathogenesis is T-cell mediated autoimmune disease. Various treatments have been tried to treat OLP but complete cure is difficult to achieve. Pimecrolimus is a new calcineurin inhibitor which can inhibit T-cell and mast-cell activation. We presented three cases of OLP patients treated with pimecrolimus 1% cream 2 times daily for 4 weeks. All of the lesions showed improvement with nearly complete remission. No side effects were observed during 6-12 months follow-up in all cases.

**Key words :** oral lichen planus; pimecrolimus; treatment

## ผลของยาทาครีมโพมีโครลิมัส 1% ในการรักษารอยโรคไลเคนพลาเนียส ในช่องปาก

ภัทรายุ แต่บรรพกุล<sup>1</sup>, พรรณทิพา จัตรชาติ<sup>2</sup>, พรพรรณ พิบูลย์รัตนกิจ<sup>3</sup>, กอบกาญจน์ ทองประสม<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>2</sup>ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>3,4</sup>ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อ

รอยโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปาก เป็นรอยโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่ออ่อนและผิวหนังที่พบได้บ่อย สาเหตุการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันตนเองและที-เซลล์ มีรายงานการรักษารอยโรคไลเคนพลาเนียสในช่องปากด้วยวิธีต่างๆ แต่ยังไม่มียาใดที่สามารถทำให้รอยโรคหายขาดได้ ยาโพมีโครลิมัสเป็นยาตัวใหม่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแคลซินูริน ซึ่งสามารถยับยั้งการกระตุ้นที-เซลล์และมาส-เซลล์ ในรายงานฉบับนี้ได้กล่าวถึงการรักษาผู้ป่วยไลเคนพลาเนียสในช่องปากจำนวน 3 ราย ด้วยยาทาครีมโพมีโครลิมัส 1% วันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยทั้ง 3 รายมีอาการเจ็บลดลงและรอยโรคเกือบหายสนิท รวมทั้งไม่พบผลข้างเคียงจากการรักษาเมื่อติดตามผู้ป่วยไปในระยะเวลา 6-12 เดือน

คำสำคัญ : ไลเคนพลาเนียสในช่องปาก; โพมีโครลิมัส; การรักษา



## Introduction

Oral lichen planus (OLP) is a chronic mucocutaneous inflammatory disease that affects 0.5-2.2% of the population and is mainly found in women in their fifth or sixth decades of life.<sup>1-3</sup> The etiology is still unclear. The immunopathogenesis of OLP is complex, involving T-cells, mast cells, intercellular adhesion molecule-1 and HLA class II antigens<sup>4,6</sup> and may be associated with some drugs and dental materials.<sup>7</sup> Various clinical forms of OLP have been recognized. Reticular and plaque type of OLP are often asymptomatic. Whereas atrophic and erosive forms are often painful, interfere with patients quality of life and require some treatments. Various treatments have been attempted to improve the symptomatic OLP. Corticosteroids in topical form are safe and effective treatments for OLP. The response rate has been reported to range from 30-70%.<sup>8</sup> Pimecrolimus is one of the new class of novel ascomycin immunomodulating macrolactams, and has been developed for the treatment of inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis, psoriasis and contact dermatitis.<sup>9</sup> The mechanism of the drug is inhibiting T-cell and mast-cell activation. Recently, there have been few reports using this medication in the treatment of OLP<sup>10-12</sup> but there were no reports of pimecrolimus in the treatment of Thai patients with OLP. side-effects The aim of the present study was to assess the efficacy and side-effects of pimecrolimus 1% cream in treatment of Thai patients with symptomatic OLP.

## Case report

Three patients with atrophic OLP attending the Oral Medicine clinic, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University were asked to participate in the study. None of patients has systemic disease and taking systemic medication. Each subject gave written informed consent and the study was approved by Committee on Experimental Procedures Involving Human Subjects of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee.

Any topical medications previously prescribed for treatment of OLP were stopped for two weeks and systemic therapy for at least four weeks before starting this study. All the lesions were diagnosed by oral examination and confirmed by histopathology. The patients were instructed to apply pimecrolimus 1% cream (Elidel® , Novartis , Mexico) on dried lesions twice a day for four weeks. Transparent grids<sup>13</sup> were used to measure the size of erythematous lesions of the most severity area in mm<sup>2</sup>, while discomfort scores were assessed using a visual analogue scale (VAS).<sup>14</sup> The OLP lesions were also evaluated before and after treatment to the criteria set by Thongprasom et al.<sup>15,16</sup>

- Score 5 : white striae with erosive area > 1 cm<sup>2</sup>.
- Score 4 : white striae with erosive area < 1 cm<sup>2</sup>.
- Score 3 : white striae with erythematous area > 1 cm<sup>2</sup>.
- Score 2 : white striae with erythematous area < 1 cm<sup>2</sup>.
- Score 1 : mild white striae only.
- Score 0 : no lesions, normal mucosa.

The first patient was a 67-year-old woman with atrophic lesion and white striae at lower lip (Figure 1). Pimecrolimus 1% cream was administered topically twice daily for four weeks. The pain and the size of the lesion were evaluated. After four weeks, the patient reported 78.79% reduction of pain and almost complete absence of OLP (Figure 2). No side-effects were observed (Table1).

The second patient was a 35-year-old woman with an 11-year history of burning atrophic lesion at buccal gingival of all quadrant extended to mucobuccal fold. Pimecrolimus 1% cream was administered twice daily for four weeks. After four weeks of treatment, nearly complete disappearance of OLP lesion was documented and 62.22% reduction of burning sensation was reported. No side-effects were observed except the bad taste of the drug.

The third patient was a 28-year-old man with a history of 8-year burning sensation on the left and right buccal mucosa. Pimecrolimus 1% cream was administered topically twice daily on both buccal mucosa. After four weeks, the symptoms reduced 81.63% and only white hyperkeratotic striae was seen. No side-effects were observed.

## Discussion

Various regimens have been tried to treat OLP but complete cure has been difficult to achieve. Corticosteroids are the first-line drugs for the treatment of OLP and are effective in managing symptomatic OLP. Fluocinolone acetonide 0.1% in orabase (FAO) has been shown to be more effective than triamcinolone acetonide 0.1% in orabase (TAO) with no serious side effects.<sup>15</sup> Moreover, the effectiveness of various forms of topical fluocinolone acetonide applications in patients with OLP in a 2-year treatment resulted in complete remission of 77.3%, 21.4%, and 17.0% of patients in the FAO, fluocinolone acetonide in solution (FAS), and FAS/FAO groups, respectively.<sup>16</sup>

Acute pseudomembranous candidiasis is the only common side-effect from topical corticosteroid which can be prevented or treated with topical antifungal agent.<sup>15,17,18</sup> Although there are some reports of systemic absorption and adrenal suppression from using super-potent topical steroids in treatment of skin disorders, but there has been no report about adrenal suppression from long term oral application of topical corticosteroids.<sup>19-21</sup>

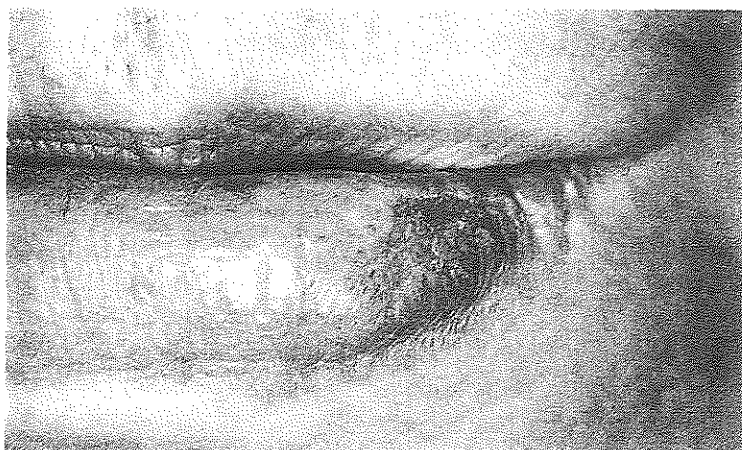
Other immunosuppressive drugs such as cyclosporine and topical tacrolimus has been reported in treatment of OLP.<sup>13,22-26</sup> Cyclosporine is a polypeptide that inhibits the transcription of several cytokine genes, thereby suppressing T-cell cytokine production. Some studies have been reported benefit from applied cyclosporine topically or in form of mouth rinse<sup>13,24</sup> but others have reported little benefit or no significant improvement.<sup>22,23</sup> Cyclosporine may be used as an alternative therapy from conventional treatment of OLP but should not be use as a first drug of choice because of the high

cost of long term treatment and the availability of effective alternatives. Severe side-effects of systemic cyclosporine, such as hypertension and nephrotoxicity, preclude its use for OLP.<sup>7</sup>

Tacrolimus is an immunomodulating agent inhibiting T-cell activation at 10-100 times lower concentration than cyclosporine.<sup>27</sup> This drug used topically to control symptoms and has been shown to be effective in treatment of OLP. However, local irritation is the most common side-effect.<sup>25,26</sup>

Pimecrolimus is a topical immuno-suppressant calcineurin inhibitors that is applied to many skin diseases such as atopic dermatitis, psoriasis and contact dermatitis.<sup>9,28-30</sup> It is related to tacrolimus and shares the same cellular binding targets and mechanism of action.<sup>30</sup> There are some reports about the efficacy of topical pimecrolimus when treating OLP lesions with adhesive ointment two times daily in patients with OLP. After four months, lesions nearly disappear and patients experience only a slight burning sensation immediately following the application of pimecrolimus.<sup>10</sup> Other studies have also been shown partial or complete remission in OLP patients treated with pimecrolimus 1% cream.<sup>11,12</sup>

Consistent to previous reports, in our study, improvement in both subjective and objective assessment occurred in all three patients treated with topical pimecrolimus 1% cream. Following the administration of pimecrolimus for four weeks, nearly complete resolution of OLP together with symptom improvement were documented in all patients. Moreover, there are no serious side-effects in all cases during 6-12 months follow-up. Therefore, pimecrolimus 1% cream has a potential role to be a novel alternative treatment of symptomatic OLP in patients who do not respond to conventional therapy. However, further studies, are also necessary to evaluate the relapse rate of patients with symptomatic OLP upon discontinuation of pimecrolimus therapy. Long term follow-up of topical pimecrolimus treatment in OLP should be considered both beneficial and unwanted effects.



**Figure 1** The first patient with atrophic OLP and white striae at lower lip



**Figure 2** After 4 weeks of treatment with pimecrolimus 1% cream, the lesion was almost complete disappearance

**Table 1** The VAS, clinical score and size of the erythematous lesion in each OLP subject before and after four weeks treatment with pimecrolimus 1% cream

Subject	Before treatment			After 4 weeks treatment		
	VAS (1-10)	Score (0-5)	Size (mm <sup>2</sup> )	VAS (1-10)	Score (0-5)	Size (mm <sup>2</sup> )
1	3.3	2	29	0.7	1	0
2	4.5	2	48	1.7	1	0
3	9.8	3	110	1.8	1	0

## Acknowledgement

The current study was supported by grants from the Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University. We would like to thank Research Unit in Oral Diseases, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for contribution to this study.

## References

1. Pindborg JJ, Mehta FS, Daftary DK, Gupta PC, Bhonsle RB. Prevalence of oral lichen planus among 7639 Indian villagers in Kerala, South India. *Acta Derm Venereol* 1972; 52: 216-20.
2. Silverman SJ, Gorsky M, Lozada-Nur F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 30-4.
3. Axell T, Rundquist L. Oral lichen planus-demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 52-6.
4. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 350-65.
5. Villarroel Dorrego M, Correnti M, Delgado R, Tapia FJ. Oral lichen planus: immunohistology of mucosal lesions. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 410-4.
6. Carrozzo M, Francia Di Celle P, Gandolfo S, et al. Increased frequency of HLA-DR6 allele in Italian patients with hepatitis C virus-associated oral lichen planus. *Br J Dermatol* 2001; 144: 803-8.
7. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 40-51.
8. Eisen D. The clinical manifestations and treatment of oral lichen planus. *Dermatol Clin* 2003; 21: 79-89.
9. Gupta AK, Chow M. Pimecrolimus: A review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17: 493-503.
10. Dissemond J, Schroter S, Franckson T, Herbig S, Goos M. Pimecrolimus in an adhesive ointment as a new treatment option for oral lichen planus. *Br J Dermatol* 2004; 150: 782-4.
11. Esquivel-Pedraza L, Fernandez-Cuevas L, Ortiz-Pedroza G, Reyes-Gutierrez E, Orozco-Topete R. Treatment of oral lichen planus with topical pimecrolimus 1% cream. *Br J Dermatol* 2004; 150: 771-3.
12. Swift JC, Rees TD, Plemons JM, Hallmon WW, Wright JC. The effectiveness of 1% pimecrolimus cream in the treatment of oral erosive lichen planus. *J Periodontol* 2005; 76: 627-35.
13. Harpenau LA, Plemons JM, Rees TD. Effectiveness of a low dose of cyclosporine in the management of patients with oral erosive lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 80: 161-7.
14. Scott J, Huskisson EC. Graphic representation of pain. *Pain* 1976; 2: 175-84.
15. Thongprasom K, Luangjarmekorn L, Sererat T, Taweasap W. Relative efficacy of fluocinolone acetonide compared with triamcinolone acetonide in treatment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 456-8.
16. Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 315-22.
17. Carbone M, Conrotto D, Carrozzo M, Broccoletti R, Gandolfo S, Scully C. Topical corticosteroids in association with miconazole and chlorhexidine in the long-term management of atrophic-erosive oral lichen planus: a placebo-controlled and comparative study between clobetasol and fluocinonide. *Oral Dis* 1999; 5: 44-9.
18. Gonzalez-Moles MA, Morales P, Rodriguez-Archilla A, Isabel IR, Gonzalez-Moles S. Treatment of severe chronic oral erosive lesions with clobetasol propionate in aqueous solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 264-70.
19. Levin C, Maibach HI. Topical corticosteroid-induced adrenocortical insufficiency: clinical implications. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 141-7.
20. Gilbertson EO, Spellman MC, Piacquadio DJ, Mulford MI. Super potent topical corticosteroid use associated with adrenal suppression: clinical considerations. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 318-21.
21. Garden JM, Freinkel RK. Systemic absorption of topical steroids. Metabolic effects as an index of mild hyper-cortisolism. *Arch Dermatol* 1986; 122: 1007-10.
22. Levell NJ, Macleod RI, Marks JM. Lack of effect of cyclosporin mouthwash in oral lichen planus. *Lancet* 1991; 337: 796-7.

23. Jungell P, Malmstrom M. Cyclosporine A mouthwash in the treatment of oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996; 25: 60-2.
24. Eisen D, Ellis CN, Duell EA, Griffiths CE, Voorhees JJ. Effect of topical cyclosporine rinse on oral lichen planus. A double-blind analysis. *N Engl J Med* 1990 2; 323: 290-4.
25. Olivier V, Lacour JP, Mousnier A, Garraffo R, Monteil RA, Ortonne JP. Treatment of chronic erosive oral lichen planus with low concentrations of topical tacrolimus: an open prospective study. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1335-8.
26. Kaliakatsou F, Hodgson TA, Lewsey JD, Hegarty AM, Murphy AG, Porter SR. Management of recalcitrant ulcerative oral lichen planus with topical tacrolimus. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 35-41.
27. Bekersky I, Lilja H, Lawrence I. Tacrolimus pharmacology and nonclinical studies: from FK506 to protopic. *Semin Cutan Med Surg* 2001; 20: 226-32.
28. Kempers S, Boguniewicz M, Carter E, Jarratt M, et al. A randomized investigator-blinded study comparing pimecrolimus cream 1% with tacrolimus ointment 0.03% in the treatment of pediatric patients with moderate atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2004 ; 51: 515-25.
29. Gribetz C, Ling M, Lebwohl M, et al. Pimecrolimus cream 1% in the treatment of intertriginous psoriasis: a double-blind, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2004 ; 51: 731-8.
30. Nghiem P, Pearsen G, Langley RG. Tacrolimus and pimecrolimus : from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 228-41.

## RESEARCH ARTICLES

### Subacute Effects of *Coscinium fenestratum* Ethanol Extract on Blood Glucose Level, Lipid Profiles and Blood Chemistry in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

Wanlaya Jittaprasatsin<sup>1</sup>, Vijit Banlunara<sup>2</sup>, Damrong Sommitr<sup>3</sup>, Maneerat Patanachai<sup>4</sup>, Sirintorn Yibchok-anan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Interdepartment of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University

<sup>2</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahanakorn Technology University

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

#### Abstract

Subacute effects of *Coscinium fenestratum* ethanol extract (CFE) on blood glucose levels and blood chemistry in normal and diabetic rats were studied by feeding CFE 500 mg/kg/day for 30 days. We measured body weight of each rat everyday. In addition, the fasting blood glucose (FBG) levels were measured at day 0, 7, 14, 21 and 28 after CFE feeding using glucose oxidase test. Blood chemistry values were determined before (day 0) and after CFE feeding (day 31). Then, the organs, including liver, pancreas, kidney, heart, spleen and lung were collected for pathology examination at the end of the study. We found that the increment of body weight in normal treated group was significantly lower than that in normal control group ( $P < 0.05$ ), however there was no difference between diabetic-controlled and -treated groups. Interestingly, CFE significantly decreased blood glucose levels in diabetic, but not normal rats. It did not alter serum cholesterol, triglycerides and HDL levels in normal rats. In diabetic treated rats, cholesterol and triglyceride levels were slightly decreased while HDL was significantly increased ( $P < 0.05$ ) after CFE feeding. Although CFE did not affect the levels of AST and ALT in serum of all rats, it elevated both serum BUN and creatinine levels in normal rats. These findings were parallel with histological changes in the kidney of normal CFE fed rats, i.e. tubular cells degeneration and renal cell death. At the end of experiment, serum BUN levels were increased, but serum creatinine levels were not changed in both diabetic-control and -treated groups. In addition, the renal cells of these two groups of rat were normal. In conclusion, *C. fenestratum* ethanol extract decreased blood glucose levels in diabetic rats. The cholesterol and triglyceride levels were slightly decreased while HDL was significantly increased ( $P < 0.05$ ) after CFE feeding. However, its effect on renal function should be concerned and more toxicological data on renal toxicity should be studied to establish the safety of this extract.

**Key words :** *Coscinium fenestratum* ethanol extract, blood glucose levels, blood chemistry

---

Address correspondence and reprint requests to: Sirintorn Yibchok-anan. Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

## ฤทธิ์กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอธานอลจากเห้มต่อระดับน้ำตาล ไขมัน และค่าเคมีในเลือดของหนูปกติและหนูที่เหนียวนำไปเป็นเบาหวานด้วย สเตรปโตโซโตซิน

วัลยา จิตตประสาธสี<sup>1</sup>, วิจิตร บรรลุการ<sup>2</sup>, ดำรงค์ สมมิตร<sup>3</sup>, มณีรัตน์ พัฒนชัย<sup>4</sup>, ศิรินทร หยิบโซคอนันต์<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเภสัชวิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

<sup>4</sup>สาขาวิชาเภสัชวิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอธานอลจากเห้มทำโดยการป้อนทางปากในขนาด 500 มก./กก./วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมทั้งการทำงานของตับและไตในหนูปกติและหนูเบาหวาน ซึ่งน้ำหนักหนูทุกวัน ตรวจระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารหนู 12 ชั่วโมง (fasting blood glucose; FBG) ในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ด้วยวิธี glucose oxidase test เปรียบเทียบค่าเคมีในเลือดก่อนและหลังให้สารทดสอบ และเก็บตัวอย่างตับ ตับอ่อน ไต หัวใจ ม้าม และปอดเพื่อตรวจทางพยาธิวิทยาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าหนูปกติที่ได้รับสารสกัดเห้มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ขณะที่น้ำหนักตัวของหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ระดับโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ HDL ในหนูปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง สำหรับหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้ม ระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ มีแนวโน้มลดลง แต่ HDL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แม้ว่าระดับ AST และ ALT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่ระดับ BUN และ creatinine ของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับผลทางพยาธิวิทยาที่พบในหนูปกติที่ได้รับสารสกัดเห้มในแง่มีการเสื่อมฝ่อของท่อไตฝอย และมีการตายของเซลล์ไต ส่วนระดับ BUN เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่ม แต่ระดับ creatinine ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่พบความผิดปกติของเซลล์ไตในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่ม จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดเอธานอลจากเห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน มีแนวโน้มลดระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งเพิ่มระดับ HDL ในกระแสเลือดได้ แต่อาจมีผลเสียต่อการทำงานของไต จึงควรรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพิษของสารสกัดเห้มต่อไตและพิษเรื้อรัง

**คำสำคัญ :** สารสกัดเอธานอลจากเห้ม ระดับน้ำตาลในเลือด ค่าเคมีในเลือด

## บทนำ

หัตถ์ (*Coscinium fenestratum*) เป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายแถบชายแดนติดต่อกับประเทศลาว มีการอ้างสรรพคุณรักษาโรคความดันโลหิตสูง ถอนพิษตกค้างในร่างกาย รักษาโรคโคเลสเตอรอลในเลือดสูง โรคเบาหวาน และอื่นๆ จากการศึกษาวิจัยพบว่า สารสกัดหัตถ์มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์เบต้า<sup>1,2</sup> ไวรส์<sup>3</sup> พลาสมา<sup>4</sup> ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง<sup>5</sup> กระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์<sup>6</sup> เพิ่มการทำงานของแอนติออกซิแดนท์เอนไซม์<sup>7</sup> ลดความดันโลหิต<sup>8</sup> ลดระดับน้ำตาลโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด<sup>9</sup> และไม่มีพิษเฉียบพลันต่อตับ ไต หัวใจ ปอด อวัยวะและรังไข่<sup>10</sup>

จากการศึกษาของอังคณา เผ่าเผด็จการ<sup>9</sup> พบว่าสารสกัดน้ำจากหัตถ์สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ในหนูปกติและหนูเบาหวาน และเมื่อให้ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วันพบว่าไม่มีผลต่อระดับน้ำตาล และค่าเคมีในเลือดในหนูปกติ แต่สามารถลดระดับโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในหนูที่เป็นเบาหวานได้

เนื่องจากปัจจุบันมีการนำหัตถ์มาใช้รักษาโรคเบาหวานเพิ่มมากขึ้น และโดยทั่วไปแล้วจะมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ในขณะที่รายงานการศึกษาถึงผลในระยะยาวของหัตถ์ยังมีไม่มากพอที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรหัตถ์มาใช้ในการรักษาโรค ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอธานอลจากหัตถ์ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดการทำงานของตับและไตของหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวาน เมื่อให้สารสกัดเอธานอลจากหัตถ์ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน เพื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรหัตถ์มาใช้รักษาโรคเบาหวานได้อย่างปลอดภัยต่อไป

## วัสดุและวิธีการวิจัย

### สัตว์ทดลองและสารเคมี

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม สารสกัดเอธานอลจากหัตถ์

สารเคมีและแหล่งที่มาดังนี้ O-dianisidine (Sigma, USA), PGO enzyme (Sigma, USA), streptozotocin (Sigma, USA), microplate reader (Tecan A-5082), glucose strip (Advantage<sup>®</sup>)

### สมุนไพรและแหล่งที่มา

นำเถาของหัตถ์จากจังหวัดหนองคาย มาสับให้ละเอียด ตากให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ในเอธานอล 95% พอท่วม นำมาต้มเพื่อเร่งปฏิกิริยาด้วยเครื่อง reflux แยกกากและส่วนของเหลวออกจากกัน นำส่วนของเหลวที่ได้มาระเหยเอาเอธานอลออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม คิดเป็น 17.9% ของปริมาณหัตถ์ทั้งหมดที่นำมาสกัด บวรพล สิงหน<sup>11</sup> รายงานว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในหัตถ์คือ berberine ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเอธานอลจากหัตถ์ที่ได้เปรียบเทียบกับ berberine โดยวิธี thin layer chromatography และ nuclear magnetic resonance

### การเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวาน

อดอาหารหนู 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลองฉีด streptozotocin (STZ) ขนาด 50 มก./กก. ที่ละลายใน citrate buffer (pH 4.5) เข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าหนูเบาหวาน) หลังจากฉีด STZ 48 ชั่วโมง ตรวจเลือดหนูโดยใช้ glucose strip เพื่อคัดเลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลมากกว่า 250 มก./มล. สำหรับใช้ในการทดลอง



### วิธีการวิจัย

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้งในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูปกติและหนูเบาหวาน แบ่งหนูปกติและหนูเบาหวานออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 7-8 ตัว

กลุ่มที่ 1 หนูปกติป้อนน้ำกลั่น 0.5 มล./ตัว

กลุ่มที่ 2 หนูปกติ ป้อนสารสกัดแห้งขนาด 500 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 หนูเบาหวาน ป้อนน้ำกลั่น 0.5 มล./ตัว

กลุ่มที่ 4 หนูเบาหวาน ป้อนสารสกัดแห้งขนาด 500 มก./กก.

ป้อนน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวแทนละลายสารสกัดแห้งหรือสารสกัดแห้งให้หนูทุกกลุ่มวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกวัน ทำการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ด้วยวิธี glucose oxidase test<sup>12</sup> และอดอาหารก่อนทำการตรวจเลือดอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

2. การศึกษาผลของสารสกัดแห้งต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไตในหนูปกติและหนูเบาหวาน เมื่อให้วันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน โดยแบ่งกลุ่มหนูเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง เก็บเลือดโดยวิธีตัดปลายหางเพื่อนำไปตรวจ ค่าเคมีในเลือด ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, โคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, high density lipoprotein (HDL), aspartate amino-

transferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) โดยจะทำการตรวจในวันที่ 0 หลังจากนั้น 1 วัน จึงทำการป้อนสารทดสอบวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน และในวันที่ 31 ทำการเก็บเลือดส่งตรวจค่าเคมีในเลือดดังกล่าวอีกครั้ง พร้อมทั้งเก็บอวัยวะภายใน เช่น ตับ ตับอ่อน ปอด ไต และหัวใจ ส่งตรวจทางพยาธิวิทยาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

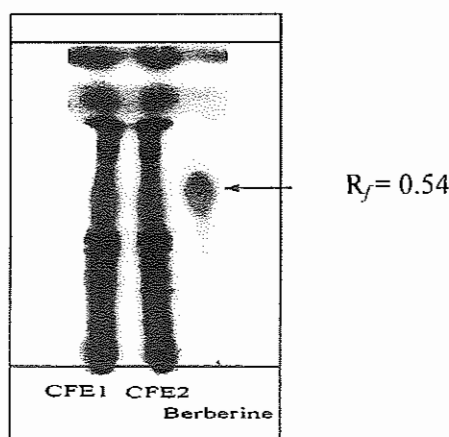
### การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลและค่าเคมีต่าง ๆ ในเลือดของหนูกลุ่มเดียวกันก่อนและหลังให้สารทดสอบด้วย paired t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย unpaired t-test กำหนดให้ค่า  $P < 0.05$  บ่งถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### ผลการวิจัย

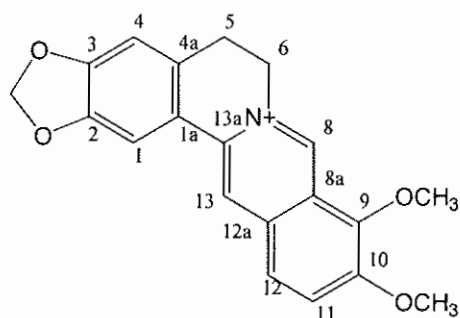
1. ผลการทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเอธานอลจากแห้ง

จากรายงานการศึกษาพบว่า berberine เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดแห้ง<sup>11,13,14</sup> เมื่อทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีโดยวิธี TLC เพื่อยืนยันว่ามี berberine ในสารสกัดแห้งที่ใช้ในการทดลอง พบว่าตำแหน่งของ berberine ที่ปรากฏในสารสกัดแห้งเป็นตำแหน่งเดียวกับ berberine ที่ใช้เป็นตัวอย่าง ( $R_f = 0.54$ ) แสดงว่ามี berberine ปรากฏอยู่ในสารสกัดแห้งที่นำมาใช้ในการทดลอง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ผลจาก TLC ของสารสกัดแห้งเปรียบเทียบกับ berberine ที่ใช้อ้างอิง ( $R_f = 0.54$ ) CFE1 และ CFE2 คือ สารสกัดแห้งที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตามลำดับ

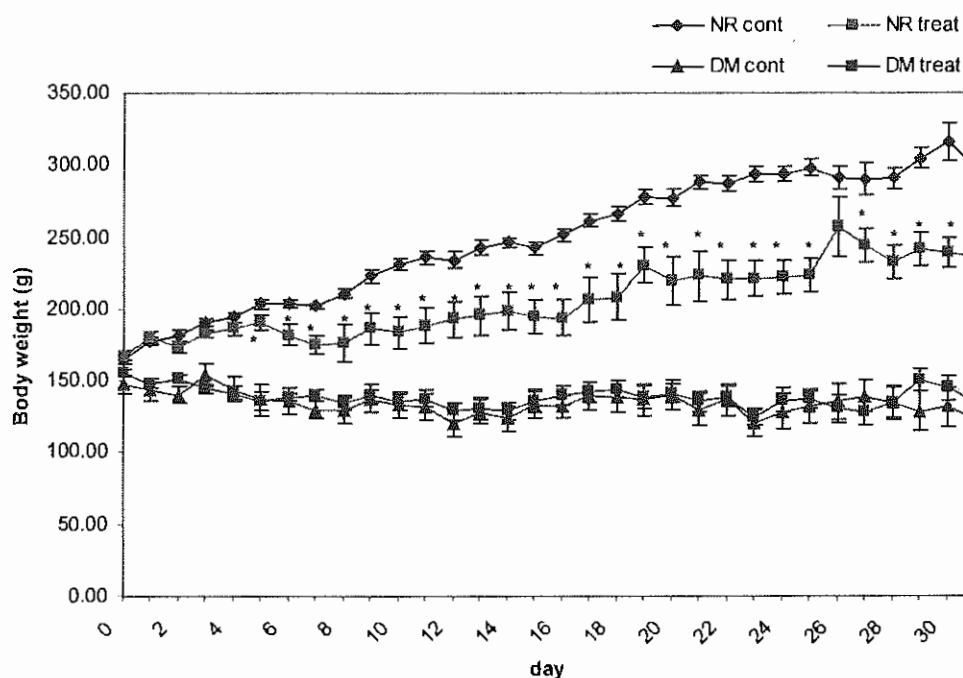
เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  ของ berberine ในสารสกัดแห้งที่ใช้ในการทดลอง ด้วยวิธี NMR พบว่าตำแหน่งของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  ใกล้เคียง berberine ที่ใช้ในการอ้างอิง<sup>14, 15</sup> เช่นกัน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  ของ berberine<sup>11</sup>

2. ผลของสารสกัดเอธานอลจากเห็บต่อน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูเบาหวาน

จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวของหนูปกติที่ได้รับการป้อนสารสกัดเห็บเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตั้งแต่วันที่ 6 ถึง 25 และวันที่ 27 ถึง 31 ในขณะที่สารสกัดเห็บไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูเบาหวาน เมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน กลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าตลอดระยะเวลา 1 เดือนที่ทำการทดลองไม่มีการเพิ่มของน้ำหนักตัวในหนูเบาหวานทั้งสองกลุ่ม ไม่ว่าจะได้รับสารสกัดเห็บหรือไม่ก็ตาม (รูปที่ 3)

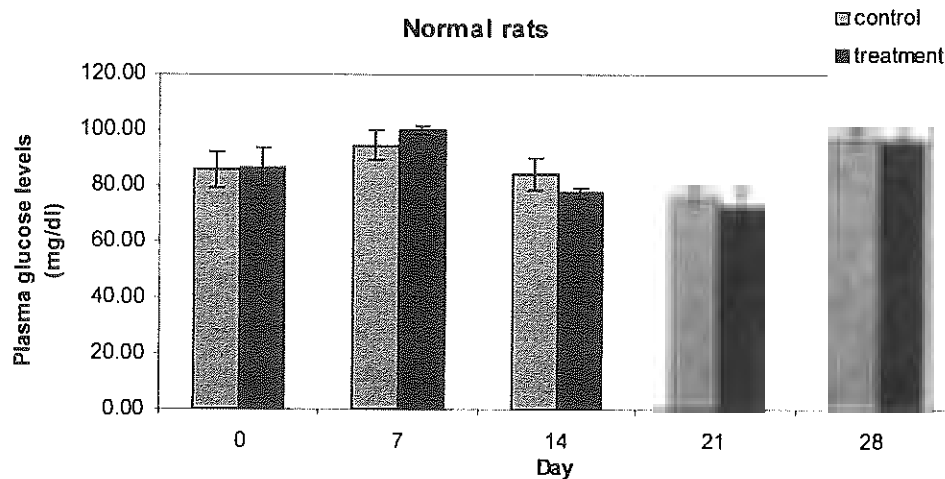


รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็บและ กลุ่มควบคุม (\* แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR=หนูปกติ, DM=หนูเบาหวาน

3.ฤทธิ์ของสารสกัดเอธานอลจากเห็บต่อระดับน้ำตาลในกระแสเลือด

เมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติที่ได้รับการป้อนสารสกัดเห็บกับกลุ่มควบคุมพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลา

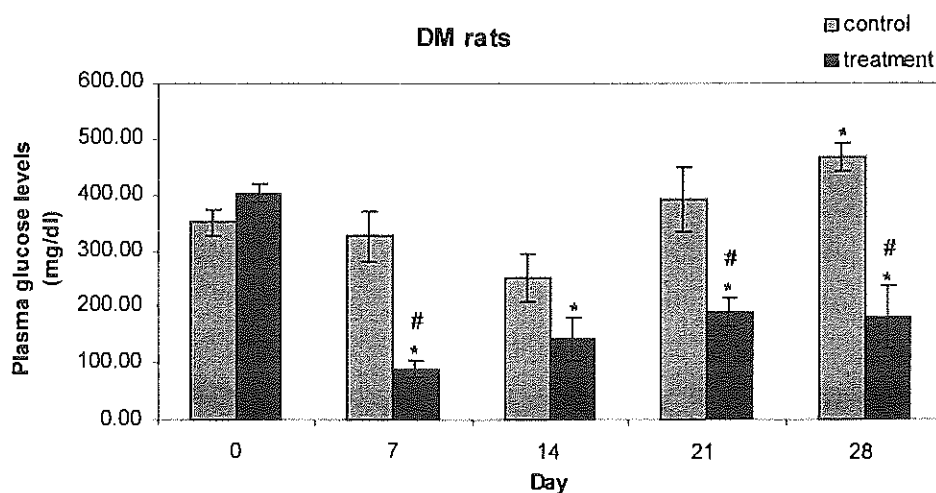
ที่ทำการทดสอบ และเมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทั้งสองกลุ่มข้างต้น ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 หลังป้อนสารทดสอบ กับวันก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่าระดับน้ำตาลของหนูทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งและกลุ่มควบคุม

ผลของสารสกัดแห้งต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกับวันเริ่มทำการทดลอง ยกเว้นวันที่ 28 ของการทดลอง พบว่ามีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) สำหรับหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งมีระดับน้ำตาลในเลือดในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มทำการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 กับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมในวันเดียวกัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตลอดการทดลองเช่นกัน (รูปที่ 5)



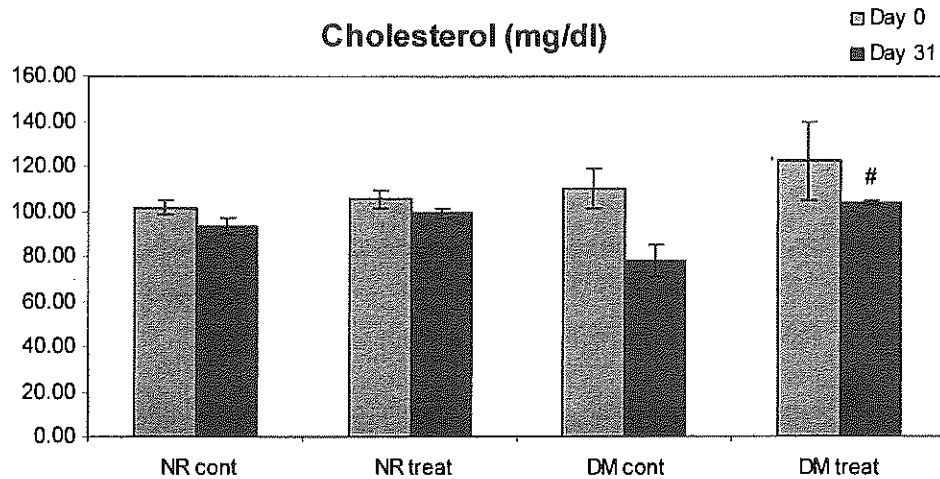
รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ง และหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (\*แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นทำการทดลองในกลุ่มเดียวกัน, # แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันเดียวกัน)

4.ฤทธิ์ของสารสกัดเอธานอลจากห้มต่อ  
ระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไต

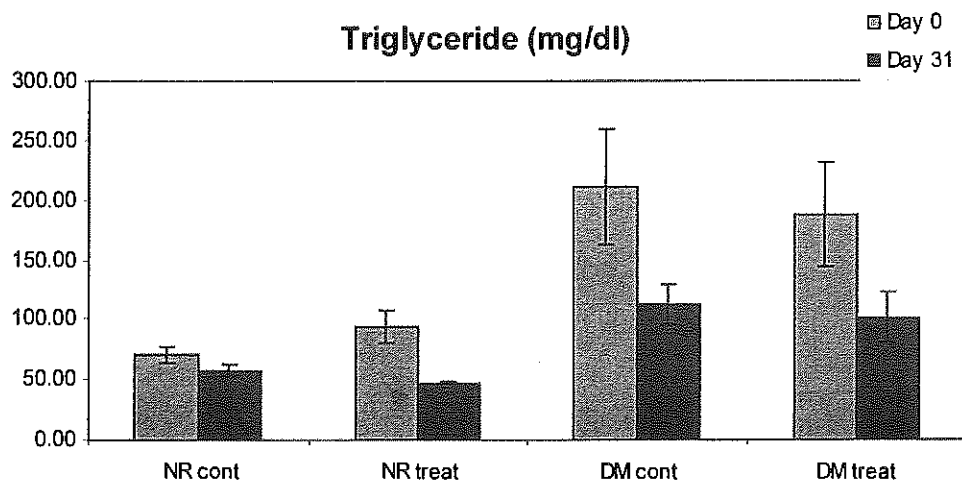
#### 4.1 ระดับไขมันในเลือด

จากการทดลองพบว่า ระดับโคเลสเตอรอล

และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูปกติ และหนูเบาหวาน  
ทั้งก่อนและหลังได้รับสารทดสอบไม่แตกต่างกันอย่าง  
มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6 และ 7)



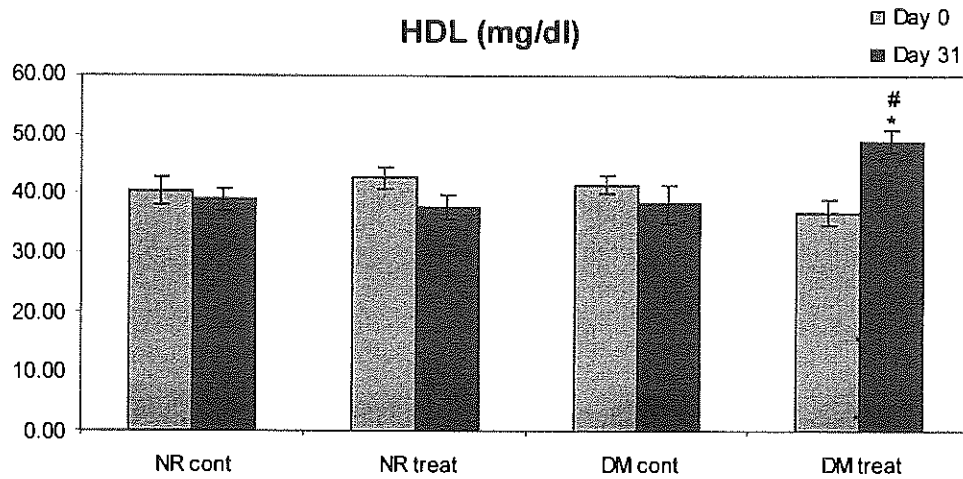
รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับ  
สารสกัดห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม (# แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)  
NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน



รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับ  
สารสกัดห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

ระดับ HDL ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุม  
หนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดห้ม และหนูเบาหวาน  
กลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง

ยกเว้นหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดห้มติดต่อกัน  
30 วัน มีระดับ HDL ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ  
ทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการ  
ทดลองและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 8)

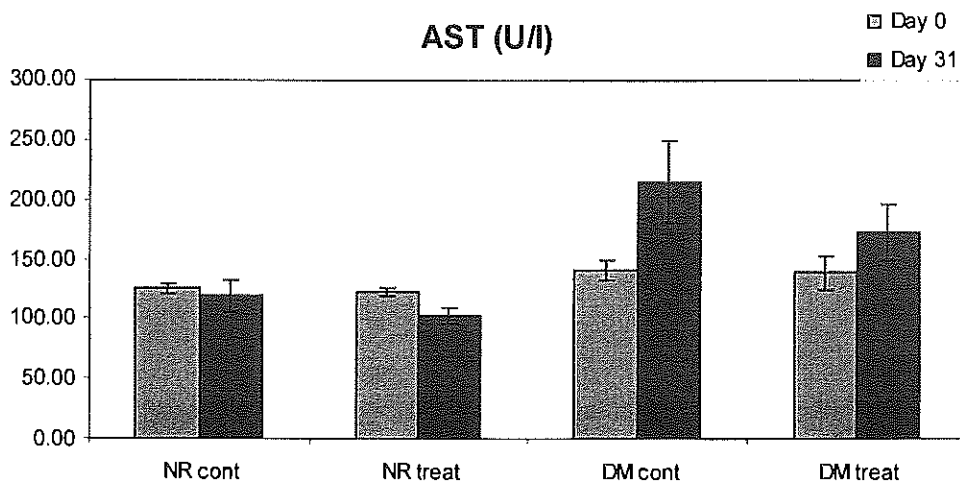


รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับ HDL ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้หม และกลุ่มควบคุม (\* แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง, # แสดงถึงค่า  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

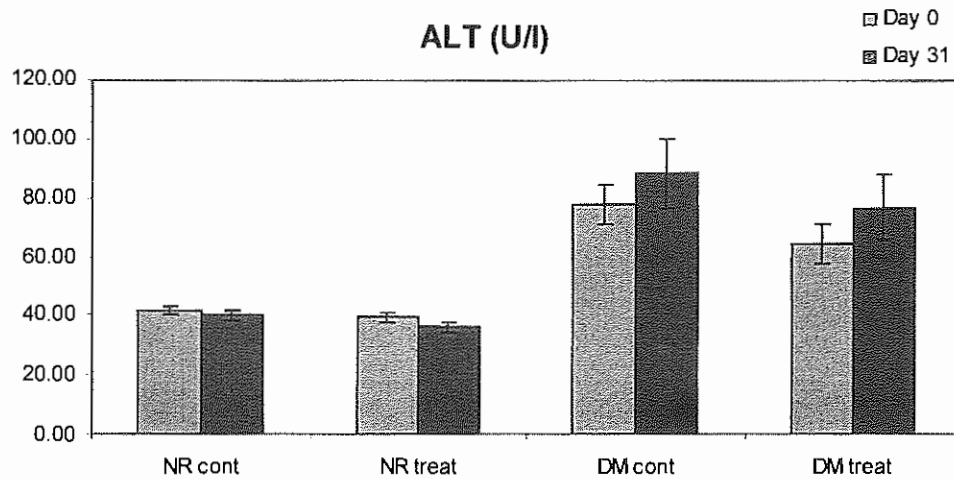
#### 4.2 การทำงานของตับ

ระดับ AST และ ALT ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานหลังได้รับสารสกัดเห้หมไม่แตกต่าง

จากของหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนให้สารทดสอบ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9 และ 10)



รูปที่ 9 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับ AST ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห้หมขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

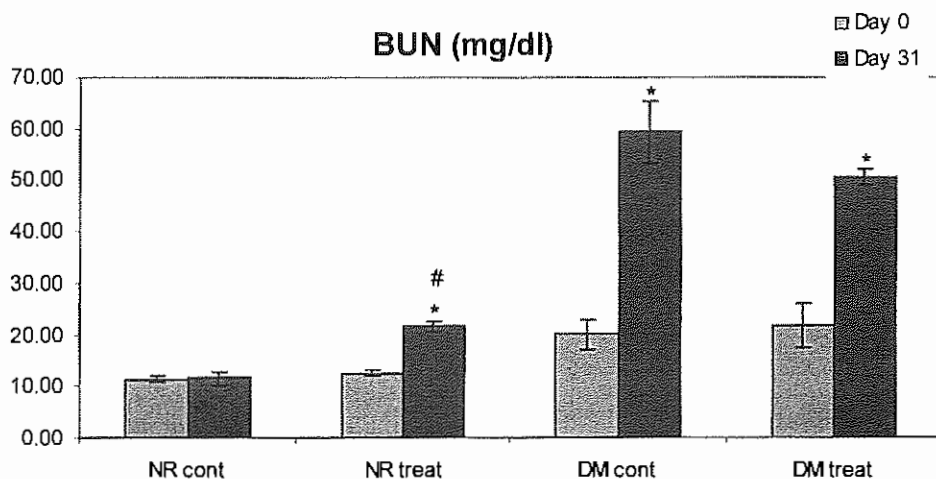


รูปที่ 10 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับ ALT ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ง และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

#### 4.3 การทำงานของไต

หนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้ง หนูเบาหวานกลุ่มควบคุมรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งมีระดับ BUN ในเลือดเมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับ BUN

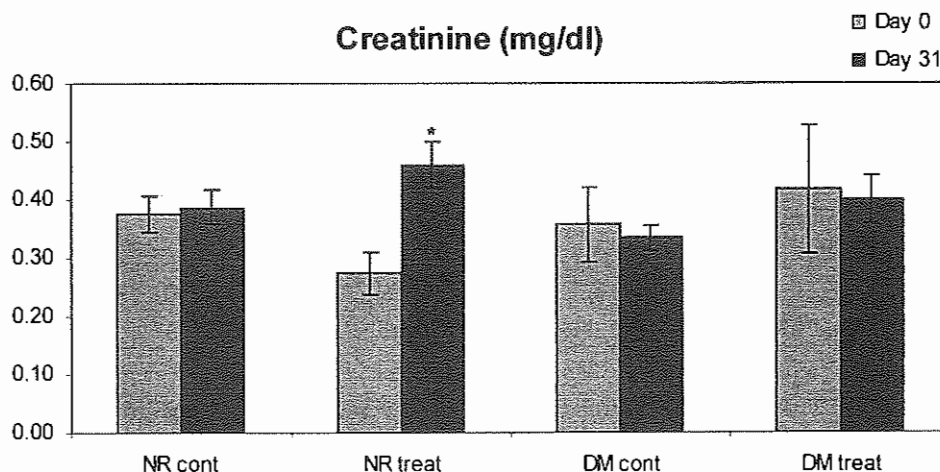
ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) หนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้งมีระดับ BUN ในเลือดสูงกว่าหนูปกติกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับ BUN ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ง และกลุ่มควบคุม (\*  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง, #  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

ระดับ creatinine ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุม และหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม และหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนการทดลอง

ขณะที่หนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้งมีระดับ creatinine ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนการทดลอง (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SEM) ของระดับ creatinine ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดเห็บ และกลุ่มควบคุม (\*  $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง)

NR= หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

#### 5. ผลทางจุลพยาธิวิทยา

ผลจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ คือ ตับ ตับอ่อน ไต หัวใจ ม้าม และปอดไม่พบความผิดปกติใดๆในหนูทุกกลุ่ม ยกเว้นในไตของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็บ พบมีการเสื่อมฝ่อของเซลล์ท่อไตฝ่อในหนู และการตายของเซลล์ไตในหนูทุกตัว

#### อภิปรายผล

เมื่อทำการป้อนสารสกัดเอธานอลจากเห็บขนาด 500 มก./กก./วัน ในหนูปกติและหนูเบาหวานพบว่า การเพิ่มของน้ำหนักตัวในหนูปกติลดลงแต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวในหนูเบาหวาน ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็บ ไม่มีความแตกต่างกันตลอดการทดลอง ขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็บลดลงตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง (day 0) แสดงว่าสารสกัดเอธานอลจากเห็บ สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ แต่ไม่มีผลต่อหนูปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อังคณา เผ่าเผด็จการ<sup>9</sup> ที่ทำการทดลองโดยป้อนสารสกัดน้ำจากเห็บติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน และ

เมื่อทำการตรวจวัดค่าเคมีในเลือดหลังป้อนสารสกัดเอธานอลจากเห็บติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในหนูปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีแนวโน้มลดลงในหนูเบาหวาน ระดับไตรกลีเซอไรด์มีแนวโน้มลดลง ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน ระดับ HDL ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูปกติ แต่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในหนูเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อังคณา เผ่าเผด็จการ<sup>9</sup> ที่ทำการทดลองโดยป้อนสารสกัดน้ำจากเห็บติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน เช่นเดียวกัน

ระดับ AST และ ALT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังป้อนสารสกัดเห็บ ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน เช่นเดียวกับผลทางพยาธิวิทยาที่ไม่พบความผิดปกติของเซลล์ตับ พบการสะสมของไขมันในหนูปกติ ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็บ แต่ไม่มีการสะสมของไขมันในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งแสดงว่าสารสกัดเอธานอลจากเห็บไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับ

สำหรับระดับ BUN และ creatinine ที่เพิ่มสูงขึ้นในหนูปกติที่ได้รับสารสกัดเห็บ จะสอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบว่ามีอาการเสื่อมฝ่อของท่อไตฝ่อ และมีการตายของเซลล์ไตในหนูปกติที่ได้



รับสารสกัดแห้ง แสดงว่าสารสกัดแห้งน่าจะมีผลเสียต่อการทำงานของไตในหนูปกติ เนื่องจากระดับ BUN ในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนที่ร่างกายได้รับความสามารถของตับในการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ และความสามารถในการขับออกของเสียของไต ส่วน creatinine เป็นของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของกล้ามเนื้อและถูกขับออกโดยไต และระดับของ BUN และ creatinine ในเลือดมักจะเพิ่มสูงขึ้นในกรณีที่เกิดความผิดปกติของการทำหน้าที่ของไต<sup>16</sup> อย่างไรก็ตามในหนูเบาหวาน ผลการทดลองที่ได้ไม่แน่ชัด เนื่องจากระดับ BUN ในเลือดหลังสิ้นการทดลองเพิ่มสูงขึ้นในหนูเบาหวานทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ง แต่ระดับ creatinine กลับไม่แตกต่างกันทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งการทำงานของไตที่ลดลงในหนูเบาหวาน อาจเกิดจากพยาธิสภาพของโรคเบาหวานเองที่ส่งผลทำให้ไตทำหน้าที่ได้ลดลงและ/หรือเป็นผลมาจากสารสกัดแห้งร่วมด้วยก็ได้ แต่จากผลทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติของเซลล์ไต ในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่มเช่นกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ มะลิวรรณ นามกิ่ง<sup>10</sup> ที่พบว่าสารสกัดแห้งไม่มีพิษแบบเฉียบพลัน ต่อการทำงานของตับ ไต หัวใจ ปอด อวัยวะ และรังไข่ จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้งน่าจะมีผลทำให้ไตของหนูปกติทำงานได้ลดลง จึงไม่ควรใช้ในหนูปกติ แต่ยังไม่สามารถสรุปผลได้แน่ชัดในหนูเบาหวาน จึงควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดแห้งโดยทำการทดสอบในระยะเวลาที่นานขึ้น เช่น 3 เดือน และ 6 เดือนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบในหนูเบาหวานต่อไป

### สรุปผลการวิจัย

สารสกัดเอธานอลจากแห้ง ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด ระดับไขมัน และการทำงานของตับในหนูปกติ ส่วนในหนูเบาหวานสารสกัดเอธานอลจากแห้ง ไม่มีผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ ลดระดับโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ได้เล็กน้อย แต่เพิ่มระดับ HDL ได้ และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับ

แต่อาจมีอันตรายต่อไตได้โดยเฉพาะในหนูปกติ จึงควรระวังการใช้ในระยะยาว

### เอกสารอ้างอิง

1. Palasuntheram C, Iyer KS, De Silva LB, et al. Antibacterial activity of *Coscinium fenestratum* Colebr against *Clostridium tetani*. *Indian J Med Res* 1982; 76: 71-6.
2. Namba T, Sawa K, Gewali MB, et al. Studies on development of immunomodulating drugs (II) effect of ayurvedic medicines on blastogenesis of lymphocytes from mice. *Shoyakugaku Zasshi* 1989; 43 (3): 250-5.
3. Hattori M, et al. Inhibitory effect of various ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-1 *in vitro* and *in vivo*. *Phytother Res* 1995; 9 (4): 270-6.
4. Tran QL, Tezuka Y, Ueda J, et al. In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 2003; 86(2-3): 249-52.
5. Ueda J, Tezuka Y, Banskota AH, et al. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(6): 753-60.
6. Namba T, Sawa K, Gewali MB, et al. Studies on dental caries prevention by traditional medicines (part VII) screening of ayurvedic medicines for anti-plaque action. *Shoyakugaku Zasshi* 1985; 39(2): 146-53.
7. Venukumar MR, Latha MS. Antioxidant effect of *Coscinium fenestratum* in carbon tetrachloride treated rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; 46(2): 223-8.
8. Singh GB, Singh S, Malhotra S. Hypotensive action of a *Coscinium fenestratum* stem extract. *J Ethnopharmacol* 1990; 30(2): 151-5.
9. Paopadatkarn A. Effect of water extract from *Coscinium fenestratum* on blood glucose in rats. Master Thesis 2002. Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.
10. Namking, M. Acute toxicity of *Coscinium fenestratum* on liver, kidney, heart, lung and testis in rats. Master Thesis 2002. Faculty of Medicine, Khon Kean University.
11. Singhana B. Biological active compounds from *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Degree of Master Thesis 2002. Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University.

12. Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamuraaki can be achieved through the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor action. *J Agric Food Chem* 2002; 50(25): 7244-8.
13. Pinho PMM, Pinto MMM, Kijjoa A, et al. Protoberberine alkaloids from *Coscinium fenestratum*. *Phytochemistry* 1992; 31(4): 1403-7.
14. Kaewpradub S. The alkaloids from the stem of *Coscinium fenestratum* Colebr. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Graduate school, Chulalongkorn university, 1992.
15. Siwon J, Verpoorte R, Van Essen FA, Svendsen AB. Studies on Indonesian medicinal plants. *Planta Med* 1980; 38: 24-32.
16. Daniel R. Delmar's guide to laboratory and diagnostic test. New York: Delmar; a division of Thomson Learning, 2002.

## REVIEWS

---

### Medicinal Plants in Tipitaka

Narumon Laohareungpanya

*Central Instrument facility laboratory, Chulabhorn Research Institute*

#### Abstract

Tipitaka is one of the ancient treatises that researchers can take the advantage for drug development from natural resource. Tipitaka is the fundamental scriptural canon of Buddhism. It is a large set of treatises which can be divided into 3 major parts; namely, Vinaya Pitaka, Sutta Pitaka, and Abhidhamma Pitaka. Medicinal plants are mostly presented in the Vinaya Pitaka (volume of Mahavagga). They are named in the Magadhi language and have about 34 specific species. Mode and medicinal use of the plants are cited in the way of Buddhist life. It seems to be very few in comparison with the Ayurvedic Material Medica. However, it is useful for focusing the research on medicinal plants.

**Key words :** Tipitaka, medicinal plants, drug development, Ayurvedic

## พืชสมุนไพรในพระไตรปิฎก

นฤมล เลหาเรื่องปัญญา

ห้องปฏิบัติการเครื่องมือรวม, สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

### บทคัดย่อ

พระไตรปิฎกเป็นคัมภีร์โบราณที่นักวิจัยอาจใช้ในการสืบค้นหาแนวทางในการศึกษาฤทธิ์และพัฒนาจากสมุนไพรได้อีกคัมภีร์หนึ่ง พระไตรปิฎกเป็นคัมภีร์หลักสำคัญในพระพุทธศาสนา ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ พระวินัยปิฎก พระสุตตันตปิฎก และพระอภิธรรมปิฎก เรื่องของพืชสมุนไพรต่างๆส่วนมากจะปรากฏอยู่ในส่วนของพระวินัยปิฎกเล่มมหาวรรค ซึ่งมีการกล่าวถึงพืชสมุนไพรประมาณ 34 ชนิดในชื่อที่เรียกเป็นภาษามคธ สรรพคุณและวิธีการใช้พืชสมุนไพรต่างๆ จะกล่าวถึงเฉพาะที่พระภิกษุในพระพุทธศาสนาจำเป็นต้องใช้เท่านั้น ดังนั้นข้อมูลของพืชสมุนไพรต่างๆจึงมีไม่มากเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับคัมภีร์อายุรเวชของอินเดียโบราณ แต่ถึงอย่างไรก็ดีข้อมูลของพืชสมุนไพรในพระไตรปิฎกนับว่าเป็นหลักฐานสำคัญในการหาแนวทางวิจัยถึงสรรพคุณที่สำคัญโดยเฉพาะเจาะจงของพืชสมุนไพรนั้นๆ

คำสำคัญ : พระไตรปิฎก, พืชสมุนไพร , พัฒนาฯ, คัมภีร์อายุรเวช

## Introduction

Researches on medicinal plants have been going on intensively during the past two-decades to determine the effective phytochemical compounds with the least toxicity for production of new drugs. For achieving this objective, the ancient medicinal treatise can be used to explore and determine a medicinal value of the plants. Besides the well-known ancient medicinal treatises in Ayurvedic, Siddha, and Unani systems of medicine, Tipitaka is one of the ancient treatises written on medicinal plants in the Buddhist culture for more than 2500 years.

## History of Tipitaka

Tipitaka is a name of the Buddha's teaching used by the Buddhist for conducting their life. It is a large set of treatises that there are 45 treatises in Thai-Tipitaka. All of them can be divided by the subject into 3 major parts; namely, Vinaya Pitaka (volume 1-8), Sutta Pitaka (volume 9-33), and Abhidhamma Pitaka (volume 34-45). The Vinaya Pitaka is the part of treatises established rules and ways that the Buddhist monks should follow, while the Sutta Pitaka contained the Buddha discourses, and the Abhidhamma Pitaka discussed philosophical systematizations of life. At first, the texts in Tipitaka were memorized and learnt as oral traditions by monks for about 433 years after the Buddha's death. Later on, they were rehearsed and inscribed as texts on palmleaves during the reign of King Vaggaminiahpai in Sri Lanka. This revised Tipitaka text has been widely used in most Buddhist countries until the present.

## Medicinal plants named in Tipitaka

Medicinal plants in Tipitaka are mostly presented in a chapter of disciplines for monks to use medicine in the volume 5 of Vinaya Pitaka, the Mahavagga Khandhaka.<sup>1</sup> They are named in Pali or the Magadhi language. Medicinal plants in Tipitaka were classified by parts of plants that can be used in medicine. These are: 1) *mula* means roots, rhizomes, or bulb,

2) *panna* means whole leaves, 3) *phala* means seeds and seedless fruits, 4) *jatu* means balsam, latex, gum resins, or resin, and 5) *kasava* means extracted solution from any parts of plants. Methods for administration of these medicinal plants were as oral consumption and percutaneous application by rubbing, dropping, inhalation, fumigation, or soaking. Pharmaceutical dosages form of the raw and dried of fruits/root/rhizome, decoction, tincture, powder and paste were used in the Buddha's lifetime. Supportive ingredients of the medicine were water, ash water, urine from cows or monks themselves, honey, butter, ghee, oil, and cane juice. There were 34 medicinal plants identified specifically in Tipitaka. It had a few of plants when compared with the Charaka's compendium<sup>2</sup>, since the Tipitaka recorded only the medicinal plants that were used frequently for treating pathological symptoms of Buddhist monks and easy acquirement. The illness of monks that usually occurred at that time was malnutrition due to gastrointestinal disorders, infectious disease that normally occurred in October to November (rainy and cold), and skin diseases. Some of the medicinal plants in Tipitaka are presented in the following table. They are listed in alphabetic order by the Magadhi names<sup>3</sup> in comparison with the botanical names and families of plant species.<sup>2, 4, 5</sup> Mode and medicinal uses of the plants are briefly stated only that were evidenced in Tipitaka<sup>1, 6</sup> including the general uses from literatures of many resources.<sup>2, 5, 7, 8, 9</sup>

## Conclusion

There are about 34 medicinal plant species named specifically in Tipitaka. The names of plants and ways for medicinal preparation in Tipitaka are similar to the Ayurveda, an ancient Indian system of traditional medicine. The medicinal uses of these plants were established by the Buddha, therefore, the Tipitaka does not describe the wide application of medicinal plants as many treatises do. It specifies parts of plants for specific symptoms that occurred to the Buddhist monks at that

## Lists of medicinal plants in Tipitaka

Magadhi name <sup>1</sup>	Botanical name <sup>2,5</sup> Family name	Part of plants: Medicinal uses cited in the TIPITAKA <sup>1,6</sup> (General uses in other ancient treatises) <sup>2,5,7,8,9</sup>
1. Amalaka	<i>Phyllanthus emblica</i> EUPHORBIACEAE	Fruit : jaundice, tonic, purgative (antioxidant, antihepatotoxic, antibacterial, antifungal, purgative, diuretic, aphrodisiac)
2. Ativisa	<i>Aconitum heterophyllum</i> RANUNCULACEAE	Root : malnutrition due to gastrointestinal disorder, fever (antipyretic, antidiarrhoea, leucoderma, dysuria)
3. Bhaddamuttaka	<i>Cyperus rotundus</i> CYPERACEAE	Rhizome: eye drug, malnutrition due to gastrointestinal disorder, skin disease. (stomachic, anthelmintic, wound healing, diuretic, antipyretic, stimulant, tonic )
4. Candana	<i>Santalum album</i> SANTALACEAE	Wood: eye drug, skin disease (antidiarrhoea, wound healing, antiemetic, antipyretic, astringent)
5. Gothaphala	<i>Tribulus terrestris</i> ZYGOPHYLLACEAE	Fruit: jaundice, morbidity (analgesic, diuretic, rejuvenative, tonic)
6. Halidda	<i>Curcuma longa</i> ZINGIBERACEAE	Rhizome: gastrointestinal disorder, jaundice (stomachic, carminative, anti-inflammation, antihepatotoxic, peptic ulcer, anticancer)
7. Haritaka	<i>Terminalia chebula</i> COMBRETACEAE	Fruit: unhealthy due to long time constipation (purgative, tonic, antibiotic, blood purifier)
8. Hingu	<i>Ferula asafoetica</i> UMBELLIFERAE	Gum /resin : indigestion, headache (skin disease, laxative, digestive, dysuria, expectorant)
9. Kalanusariya	<i>Ichnocarpus frutescens</i> APOCYNACEAE	No part identification: eye drug, skin disease (antipyretic, dyspepsia, and eyesight promoter are found in leaf and root )
10. Kappasi	<i>Gossypium herbaceum</i> MALOACEAE	Leaf : fever, muscular and joint pain, vertigo, dyspepsia, nausea, no appetite (dysuria, scabies)
11. Katukarohini	<i>Picrorhiza kurrooa</i> SCROPHULARIACEAE	Rhizome : Gastrointestinal disorder, appetizer (stomachic, carminative, appetizer, antihepatotoxic)
12. Kutaja	<i>Holarrhena antidysenterica</i> APOCYNACEAE	Extract plant: ulcer, boils, abscess Leaf: fever, muscular and joint pain, vertigo, dyspepsia, nausea, vomiting, no appetite (astringent, antidysenteric, purgative, stomachic, antipyretic, tonic)
13. Lasuna	<i>Allium sativum</i> LILIACEAE	Bulb: have a queasy feeling in the stomach (hypolipidemia, flatulence, rubefacient, vermifuge, aphrodisiac)
14. Marica	<i>Piper nigrum</i> PIPERACEAE	Fruit: malnutrition (rhinitis, appetizer, asthma, antibiotic)
15. Mugga	<i>Phaseolus radiatus</i> PAPILIONACEAE	Seeds: malnutrition (nourishing food, urinary disease)
16. Mulalikahi	<i>Nelumbium speciosum</i> NYMPHAEACEAE	Rhizome: fever (anti-inflammation, antihepatotoxicity, cold, debility)
17. Nattamala	<i>Jasminum sambac</i> OLEACEAE	Extracted flower: itch, boils, abscess, deodorant (antipyretic, skin disease, eye lotion)



Magadhi name <sup>1</sup>	Botanical name <sup>2,5</sup> Family name	Part of plants: Medicinal uses cited in the TIPITAKA <sup>1,6</sup> (General uses in other ancient treatises) <sup>2,5,7,8,9</sup>
18. Nimba	<i>Azadirachta indica</i> , or <i>Melia azadirachta</i> MELIACEAE	Extracted plant: itch, boils, abscess, deodorant Leaf: fever, muscular and joint pain, vertigo, dyspepsia, nausea, no appetite (skin disease, antipyretic, tonic, stimulant, gastrointestinal disorder)
19. Paggava	<i>Tinospora crispa</i> MENISPERMACEAE	Extracted plant: itch, boils, abscess, sores, deodorant (anti-inflammation, antipyretic, appetizer, jaundice, stomach complaints, antibiotic, tonic, skin disease)
20. Patola	<i>Trichosanthes dioica</i> CUCURBITACEAE	Extracted plant: itch, boils, abscess, deodorant Leaf: fever, muscular and joint pain, vertigo, dyspepsia, nausea, no appetite (antipyretic, diuretic, galactagogue, hypoglycemic, skin disease)
21. Phanita	<i>Sacharum officinarum</i> GRAMINEAE	Extract plant: vomiting, malnutrition due to fever (antiemetic, morbid thirst, wound healing)
22. Pippali	<i>Piper longum</i> PIPERACEAE	Fruit: malnutrition due to fever, jaundice (carminative, appetizer)
23. Sajjulasa	<i>Styrax benzoin</i> STRYRACACEAE	Gum /resin: skin disease, headache (antiseptic, antiinflammation, expectorant, carminative, anti-depressant, diuretic)
24. Sulasi	<i>Ocimum sanctum</i> LABIATAE	Leaf: fever, muscular and joint pain, vertigo, dyspepsia, nausea, no appetite seed: wound itching (antipyretic, splenic disorder, toxicosis, rheumatism, skin eruption)
25. Singivera	<i>Zingiber officinale</i> Rase ZINGIBERACEAE	Rhizome: fever, gastrointestinal disorder (antibiotic, immunostimulant, antiemetic, analgesic, hypolipidemic)
26. Tagara	<i>Valeriana hardwickii</i> VALERIANACEAE	Root: eye drug, skin disease (antipyretic, poisoned bites, diuretic)
27. Taka	<i>Calotropis gigantea</i> ASCLEPIADACEAE	Latex : purgative, (poisoned bites, nasal ulcer, laxative, rheumatoid arthritis, bronchial asthma, diabetes mellitus, nervous disorders laxative)
28. Talisa	<i>Abies webbiana</i> PINACEAE	No part identification: eye drug (cough, colic pain, dyspepsia)
29. Tilaka	<i>Sesamum indicum</i> PEDALIACEAE	Seed : wound abscess, acute constipation (wound healing, tonic, nourishing food)
30. Usira	<i>Andropogon squarrosus</i> GRAMINEAE	Root: fever, jaundice (antipyretic, toxicosis, skin disease, debility)
31. Vibhitaka	<i>Terminalia belerica</i> COMBRETACEAE	Fruit: purgative (haemorrhoid, dropsy, boils)
32. Vaca	<i>Acorus calamus</i> ARACEAE	Rhizome: gastrointestinal disorder (carminative, stomachic, expectorant, antispasmodic, vermifuge, antiemetic, sedative)
33. Vacattha	<i>Kaempferia galanga</i> ZINGIBERACEAE	Rhizome: gastrointestinal disorder (stimulant, carminative, stomachic, expectorant, anti-inflammation)
34. Vilanga	<i>Embelia ribes</i> MYRSINACEAE	Fruit: jaundice, morbidness (anthelmintic, taeniafuge, purgative, astringent, carminative, tonic)



time. The researchers can use these details to focus their research on drug development from these medicinal plants. Up to now, there are many research papers published on some plants in Tipitaka.<sup>9</sup>

### Acknowledgements

The author is thankful to Pra Wichai Sa-ngiam, Wat Hongrattanaram for his guidance in this work, and Mr. Akradej Wattanasomboon, Department of Mineral Fuels, Ministry of energy for providing necessary facilities.

### References

1. Mahavagga In: *Vinaya Pitaka*. Bangkok: Mahamakut Buddhist University, 1982;5: No. 25-94.
2. Rao AN. Medicinal plants from Charaka's compendium and Burkill's dictionary-a review. *J Trop Med Plants* 2002; 3: 259-302.
3. Budsir/ TT V.2 for Windows (Computer program). Bangkok: The Mahidol University Computing center, 2001.
4. Sa-ngiam W. Herbs analyzed in Vinaya Tripitaka. (M.E. Thesis in education). Thailand: Department of Nonformal Education, Silapakorn University; 2000.
5. Rao AN. Medicinal plants species from Sushruta's compendium -a review. *J Trop Med Plants* 2004; 3: 283-305.
6. Chulavagga (part 2) In: *Vinaya Pitaka*. Bangkok: Mahamakut Buddhist University, 1982; 7: No.33 and 188.
7. de Padua LS, Bunyaphrathatsara N, Lemmens RHMJ. *Prosea12 (1): Plant resources of South-East Asia: Medicinal and poisonous plants 1*. Indonesia: Prosea Bogor, 1999.
8. Deewisage K, Ranglek S, Chaiphasitkul K, Wachungngun K. *Manual of Thai-traditional pharmacopeia* (ISBN 974-7758-55-5). Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand, 1994.
9. Lambert J, Srivastava J, Vietmeyer N. *Medicinal Plants rescuing a global heritage* (World Bank Technical paper No. 355). Washington DC: The World Bank, 1997.

## REVIEWS

---

### **Buprenorphine as an Alternative for Treatment of Opioid Dependence**

Somchai Sinchaisuk

*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubonratchathani University*

#### **Abstract**

Besides its use as an opioid analgesic, buprenorphine is now becoming more favorable, as compared with methadone, to be used as an opioid maintenance agent in the treatment of opioid dependence. Several clinical studies have demonstrated that buprenorphine can be as effective as methadone in opioid maintenance treatment and has some advantages over methadone. With its partial agonist profile, buprenorphine has been proved to have high safety profile, low abuse potential, and low physical dependence. Considering that treatment of opioid dependence will require long-term commitment, all those properties of buprenorphine may determine whether a successful treatment can be achieved. This article will review pharmacology of buprenorphine, including cross-tolerance, physical dependence potential, its clinical efficacy and its safety profile as well as a review of how to use buprenorphine as a maintenance therapy for opioid dependence.

**Key words :** Buprenorphine, opioid dependence

## Buprenorphine ทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาผู้ป่วยติดยาเสพติดชนิดโอปิออยด์

สมชาย ลินชัยสุข

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

### บทคัดย่อ

นอกเหนือจากการใช้เป็นยาแก้ปวดแล้ว ปัจจุบัน buprenorphine กำลังได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับ methadone ในการใช้รักษาผู้ป่วยติดยาเสพติดชนิดโอปิออยด์ (opioid dependence) การศึกษาทางคลินิกได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ buprenorphine ที่เทียบเท่าได้กับการใช้ methadone รวมถึงข้อได้เปรียบบางประการ ด้วยคุณลักษณะที่เป็น partial agonist ของ buprenorphine ทำให้มีความปลอดภัยจากการใช้ยาสูง การใช้ในทางที่ผิดเป็นไปได้น้อย รวมถึงการติดยาก็น้อยด้วย เนื่องจากการรักษาผู้ป่วยติดยาเสพติดจะต้องใช้ระยะเวลานานในการรักษา คุณสมบัติเหล่านี้ของ buprenorphine อาจเป็นตัวกำหนดว่าการรักษาจะได้ผลหรือไม่ บทความนี้จะกล่าวถึงคุณลักษณะทางเภสัชวิทยาของ buprenorphine, การทนยาแบบ cross-tolerance, โอกาสการติดยา (physical dependence potential), ประสิทธิภาพทางคลินิก (clinical efficacy) และความปลอดภัยจากการใช้ยา (safety profile) รวมไปถึงวิธีการใช้ buprenorphine ในการรักษาผู้ป่วยติดยาเสพติดชนิดโอปิออยด์ (buprenorphine maintenance therapy for opioid dependence)

คำสำคัญ : Buprenorphine, opioid dependence

Over the past years, there have been only two types of medications for the treatment of opioid dependence. The first type is agonist substitution therapy (i.e. methadone). The second type is antagonist therapy (i.e. naltrexone), which unlike agonist therapy, naltrexone does not produce morphine-like agonist effects. Instead, it blocks agonistic effects. Both types have been effective in reducing illicit opioid use. However, both therapies have some pitfalls. Methadone, the standard substance in the substitution therapy of opioid dependence, still has high abuse potential and high level of physical dependence, whereas naltrexone has difficulty to retain patients in treatment due to its lack of desired positive agonistic effects.

With the discovery of multiple opioid receptors, newer opioid analgesics (mixed agonist/antagonists) have been developed to take advantage of the pharmacologic effects mediated by these receptors. This development effort has been aimed primarily at reducing the abuse potential and physical dependence property of these medications, while maintaining analgesic efficacy. Buprenorphine is one of those newer opioid analgesics. It has high affinity at both mu and kappa opioid receptors. It is a partial agonist at mu opioid receptor but acts as an antagonist at kappa opioid receptor. This unique pharmacologic profile has provided an opportunity to develop an alternative treatment for opioid dependence.

## Pharmacology of Buprenorphine

### Pharmacokinetics

For the treatment of opioid dependence, it is very important that injectable forms of administration be avoided. Otherwise, this can lead to the spread of infectious diseases such as HIV, hepatitis and other parenterally transferred infections. Since buprenorphine is less well absorbed when taken orally, and is quickly metabolized by the liver, known as the "first pass effect",<sup>1,2</sup> sublingual administration has been the primary route used in studies of clinical

efficacy for treating opioid dependence. When taken sublingually, buprenorphine is well absorbed with 60-70% of the plasma concentration achieved by the parenteral route.<sup>3</sup> The drug is widely distributed throughout the body with a peak plasma concentration at approximately 90 minutes and a half life of 4 to 5 hours. Buprenorphine is highly bound to plasma proteins.<sup>2</sup> It is highly lipophilic and brain tissue levels far exceed serum level. Buprenorphine is metabolized in the liver by the CYP450 3A4 enzyme system.<sup>4,5</sup> It undergoes N-demethylation and conjugation.<sup>2,6,7</sup> Buprenorphine's metabolite, norbuprenorphine, has more potent respiratory depressive effects than the parent drug,<sup>8,9</sup> although the analgesic effect of norbuprenorphine is one-fiftieth that of buprenorphine following intravenous administration.<sup>9</sup> At present, there is no evidence that norbuprenorphine activity is responsible for effects observed in the treatment of opioid dependence.<sup>9</sup> Because of its high lipid solubility, buprenorphine is also expected to be active by intranasal route.<sup>10</sup>

### Pharmacodynamics

Buprenorphine, generally described as a mixed agonist/antagonist opioid,<sup>11</sup> is a semi-synthetic opioid derivative of the thebaine.<sup>12</sup> It acts as a partial agonist at the mu opioid receptor, characterized by a reduced intrinsic activity compared to the pure agonist.<sup>13-19</sup> Buprenorphine also has the properties of a weak kappa opioid receptor antagonist (i.e. it does not show any intrinsic activity on this receptor but can block agonistic effects).<sup>15,17-20</sup> Clinically, the effects of buprenorphine are primarily expressed through the mu opioid receptor and are similar to those of full agonists like morphine and methadone.<sup>16</sup> Because it is a partial agonist, its effects plateau at higher doses, and it begins to behave more like an antagonist. This antagonistic activity in higher doses limits the maximal analgesic effect and respiratory depression.<sup>21,22</sup> This a so-called "ceiling effect" confers a high safety profile, a low level of physical dependence and only mild withdrawal

symptoms upon cessation after prolonged administration. These qualities make it advantageous for the treatment of opioid dependence.<sup>16,22,23</sup> Moreover, slow dissociation from the opioid receptor of buprenorphine provides a long duration of action,<sup>24,25</sup> which allows dosing schedules to be varied from several times daily to several times weekly.

Although buprenorphine alone, taken in the form of a sublingual tablet, is efficacious and possesses other desirable therapeutic characteristics (i.e. high safety profile and low level of physical dependence), a combination containing buprenorphine and naloxone has been developed in order to decrease abuse and misuse. The addition of naloxone, whose sublingual bioavailability is poor,<sup>26,27</sup> results in only buprenorphine effect when the combination tablet is taken by the therapeutic (i.e. sublingual) route.<sup>28</sup> However, if the combination is injected, the naloxone effect precipitates opioid withdrawal, thus deterring intravenous abuse.<sup>28,29</sup> The issue of limiting buprenorphine's abuse liability with naloxone is complicated by the fact that naloxone does have some sublingual bioavailability. Thus, the buprenorphine : naloxone ratio must be chosen carefully in order to avoid naloxone effects when the combination is used as intended. It was determined that the optimum combination is a 4:1 ratio of buprenorphine to naloxone<sup>30</sup> and tablets containing 2/0.5 and 8/2 mg of buprenorphine/naloxone have been developed.

### Cross-tolerance

Tolerance, defined as a decreasing effect of a given drug following chronic administration of that drug, normally is a problem when opioids are used as analgesic agents. When they are used for the treatment of opioid dependence, however, it is an advantage. For example, tolerance to methadone maintenance therapy develops cross-tolerance to other opioid drugs such as heroin,<sup>31</sup> and this helps reduce illicit drug use since heroin abuser will no longer entertain the positive effects, which if not due to methadone cross-tolerance, would occur from the use of heroin. In the

case of buprenorphine, due to its unique pharmacological profile, reducing illicit drug use may be through the development of cross-tolerance or through pharmacological antagonism.<sup>32,33</sup>

### Buprenorphine-induced physical dependence

Although having low intrinsic activity at mu opioid receptor, buprenorphine does produce physical dependence as demonstrated by the ability of pure opioid receptor antagonists (i.e. naloxone and naltrexone) to precipitate an opioid withdrawal in patients maintained on buprenorphine.<sup>34-37</sup> The physical dependence, however, is considered to be low, as when compared to patients maintained on a full mu agonist such as methadone, higher doses of the opioid antagonist naloxone are necessary to precipitate withdrawal in patients maintained on buprenorphine. Clinically, spontaneous buprenorphine withdrawal symptoms can be observed after several days following abrupt cessation of buprenorphine treatment and is usually described as mild to moderate in intensity.<sup>38-41</sup> The symptoms include runny nose, watery eyes, hot flashes, lethargy, nausea, diarrhea, restlessness, and irritability.<sup>16,41</sup> Gradual reduction, rather than abrupt termination of buprenorphine would likely result in no opioid withdrawal symptoms.

### Clinical efficacy of buprenorphine

A series of controlled clinical studies firmly established the clinical efficacy of buprenorphine. Some of the study were designed to compare buprenorphine to placebo, either to "active" or "inactive" placebo, and others compared buprenorphine to methadone. Retention in treatment and abstinence from illicit opiate use (commonly assessed by urine toxicology) were utilized as primary outcome measures of success, but other measures, such as request for dose changes, withdrawal symptoms and reduced heroin craving were also employed.

### Buprenorphine versus placebo

In a double-blind trial designed to assess the early clinical effectiveness (1-2

weeks) of buprenorphine compared with placebo,<sup>42</sup> subjects were randomly assigned to received either 2 mg/day or 8 mg/day buprenorphine or placebo over a period of 14 days. Between day 6 and 13, the subjects were then given the option of receiving an altered dose. A randomization was then carried out to one of the other two treatment groups to which the subjects did not belong. The alternate dose then had to be taken up to and including day 14. The results showed that subjects treated with buprenorphine, irrespective of their dose, requested fewer dose changes, used less illicit opiates and reported higher ratings of medication adequacy than those treated with placebo.

Two other studies that compared the buprenorphine and placebo also showed higher maintenance rates and less illicit opiate use in subjects treated with buprenorphine.<sup>43,44</sup>

In another randomized, double-blind study designed to evaluate the safety and efficacy of 8 mg/day buprenorphine compared with 1 mg/day buprenorphine in maintenance treatment of opioid dependence<sup>45</sup>, subjects were treated with buprenorphine over a period of 16 weeks. Since the administration of placebo to patients who are addicted to drugs is regarded as unethical, a dose of 1 mg/day buprenorphine was regarded as an "active" placebo. The results showed that subjects treated with 8 mg/day buprenorphine had higher maintenance rates and less illicit opiate use than those treated with 1 mg/day buprenorphine.

Similar results were observed in several other studies<sup>46-48</sup>, in which subjects treated with 8 mg buprenorphine showed higher retention rates than those treated with 1 mg or 3 mg buprenorphine.

#### **Buprenorphine versus methadone**

In a double-blind study with a comparison of parallel groups<sup>49</sup>, subjects were randomly assigned to receive 8 mg/day buprenorphine, 20 mg/day methadone, or 60 mg/day methadone. In term of maintenance rates and the percentage of opiate-negative urine, buprenorphine showed significant superiority compared to 20 mg/day methadone and an equivalence

compared to 60 mg/day methadone. The results were similar to that of a further study<sup>50</sup>, in which the subjects could changes their own dose until achieving an optimal dose response following an initial stabilization at buprenorphine 8 mg/day or methadone 50 mg/day. The mean maintenance dose was 8.9 mg/day buprenorphine and 54 mg/day methadone. Both drugs were effective on measures of treatment retention and opiate-free urine. These results were further confirmed by a study with similar flexible dosage protocol.<sup>51</sup> This variable dose study resulted in a mean stabilization buprenorphine dose of 10.5 mg/day and in a mean stabilization methadone dose of 69.8 mg/day. The percentage of opioid-free urine and heroin craving scores were similar in both groups, although retention rate was significantly better in the methadone group.

Similar results could also be observed in several other studies. A 17-week, double-blind study<sup>52</sup> showed that 7-14 mg/day buprenorphine and high dose (60-100 mg/day) methadone were equally effective in term of maintenance rate and the percentage of opioid-free urine. Both high dose methadone and 7-14 mg/day buprenorphine were superior to low dose (20 mg/day) methadone. A recent published study compared the efficacy of buprenorphine and methadone in the treatment of opioid dependence. The results showed that 9.2 mg/day buprenorphine and 81.5 mg/day methadone were equally effective in term of retention in treatment at 12 weeks.

In contrast, better maintenance rates for methadone were demonstrated by other studies.<sup>53,54</sup> This could be due to the relatively low dose (2, 4 and 6 mg/day) of buprenorphine utilized in comparison with appropriate dose (65 mg/day) of methadone. Better maintenance rates for methadone were also observed in a study<sup>55</sup>, in which an appropriate dose of 8 mg/day buprenorphine was compared to relatively high dose (80 mg/day) methadone.

#### **Safety profile**

Because buprenorphine is a partial agonist with relatively low intrinsic activity, it

should limit life-threatening respiratory depression, contributing to a safety profile that is better than that of methadone, a full  $\mu$  opioid agonist currently used in the treatment of opioid dependence. For example, when buprenorphine was administered to non-dependent individuals, respiratory depression was increasingly related to buprenorphine dose over a range of 1-4 mg, but this dose effect began to level out at higher doses; administration of 32 mg buprenorphine produced no greater respiratory depression than that produced from 16 mg buprenorphine.<sup>22</sup> The safety of buprenorphine may be even greater in opioid-tolerant individuals, as supported by studies showing that buprenorphine-dependent subjects can receive substantially higher doses than their usual maintenance doses without signs of toxicity. For example, administration of 16 mg buprenorphine in patients normally getting 8 mg buprenorphine daily produced no adverse effect.<sup>56</sup> The most compelling evidence for the excellent safety of buprenorphine may come from the fact that there is almost no lethal overdose cases associated with respiratory depression produced by buprenorphine alone<sup>57</sup>, despite the extensive use of buprenorphine as an analgesic. Buprenorphine has been approved for the treatment of opioid dependence in France since 1996 (currently, it has also been approved in Australia in 2001 and in the US in 2002), a series of overdose deaths were reported. The vast majority of these cases resulted when buprenorphine and benzodiazepines were concomitantly abused via the parenteral route.<sup>57-61</sup> When compared to methadone, the death rate from buprenorphine overdose is still far less; the estimated risk of overdose death is at least 5 times higher for methadone than for buprenorphine.<sup>62</sup>

### Some considerations before getting start on buprenorphine

Because buprenorphine is a partial  $\mu$  opioid agonist and consequently has low intrinsic activity compared with full  $\mu$  agonist, it can precipitate with-

drawal in opioid-dependent animals and humans.<sup>34-37,63-65</sup> These studies suggested that heroin- or methadone-dependent patients may experience opioid withdrawal when they initially receive buprenorphine, thus potentially hindering induction onto clinically effective maintenance doses. Therefore, prior to administering the initial buprenorphine dose, consideration should be given to three important factors. These factors include

#### 1. *The time since last opioid use.*

The likelihood of buprenorphine-induced precipitated withdrawal increases as the time interval since last opioid use decreases. Because mild withdrawal has been observed at a time interval of 2 hours since last opioid use<sup>66</sup>, the administration of the initial dose of buprenorphine in patients dependent on opioid should be delayed for at least 4 hours after the last ingestion of opioid.

#### 2. *The type of opioid dependence*

(i.e. long or short-acting opioid). Patients dependent on shorter-acting opioid (heroin, morphine) may be less likely to experience buprenorphine-induced precipitated withdrawal than those dependent on long-acting opioid (methadone).<sup>29,67,68</sup> A longer time interval between methadone and subsequent buprenorphine dosing is recommended depending on the dose of methadone. For low dose of methadone, the initial dose of buprenorphine can begin at 24 hours after the last ingestion of methadone.<sup>69,70</sup> For higher doses of methadone, the initiation of buprenorphine can be delayed for more than 24 hours after the last ingestion of methadone.<sup>71</sup>

#### 3. *The degree of opioid dependence.*

The buprenorphine-induced precipitated withdrawal could occur if the degree of opioid dependence is high. For example, patients dependent on >40 mg daily of methadone should reduce their use to 40 mg daily or less of methadone before the first dose of buprenorphine is initiated.<sup>72</sup>

### Buprenorphine maintenance therapy

#### Initial dose of buprenorphine

In most studies, the starting dose of buprenorphine administration on the first

day has been 2 mg of sublingual solution. However, 4 mg of buprenorphine can be administered without causing an opioid withdrawal in opioid-dependent patients. If there is concern for possible precipitation of an opioid withdrawal, the first daily dose can be split with the second half administered 3-4 hours after the first dose. Induction onto a dose as high as 16 mg of buprenorphine has been accomplished by administering 2, 4, 8, and 16 mg of buprenorphine on day 1-4, respectively.<sup>73</sup> However, the objective of induction should be to achieve a maintenance dose (i.e. 16 mg) as quick as possible (i.e. within 2-3 days).

#### **Maintenance dose of buprenorphine**

For most patients, an initial target dose should be 12-16 mg of daily buprenorphine. If illicit opioid use or withdrawal continues, then the dose should be increased. The minimum dose increase possible is increment of 2 mg.

#### **Discontinuing buprenorphine**

Abrupt discontinuation of buprenorphine produced a mild to moderate withdrawal.<sup>38,40,41</sup> Gradual dose reduction is recommended over rapid dose reduction or abrupt cessation since the former has been shown to provide less self-reported withdrawal, increased retention, and less illicit opioid use.

#### **Less-than-daily use with buprenorphine**

Because of buprenorphine's long duration of action,<sup>22,74,75</sup> less-than-daily dosing with buprenorphine has been suggested.<sup>22,38,76-80</sup> Less-than-daily dosing would likely improve buprenorphine's clinical acceptability to patients who are receiving their medication through a clinic by reducing the required number of clinic visits. Currently, it would be best to recommend a thrice-weekly schedule (e.g. Monday, Wednesday, and Friday), although additional studies of twice-weekly (e.g. Monday and Thursday) dosing may show this schedule is equally effective and also liked by patients. For patients on daily buprenorphine who are switching to thrice-

weekly buprenorphine, doses ingested on medication days should be increased to compensate for the longer time period between doses. Because buprenorphine is a partial agonist, maximum agonist effects are below that expected for a full agonist. Thus, increases in the daily doses are safe and well tolerated by patients.

#### **Summary**

Clinical studies provide solid support for the use of buprenorphine in the treatment of opioid dependence and demonstrate an equality in the efficacy of buprenorphine and methadone. This suggests that these two medications can be used in opioid-dependent patients with equal success. However, buprenorphine seems to be a better choice, since, for example, it has better safety profile and more limited physical dependence.

Buprenorphine's partial mu opioid agonist profile is responsible for its high safety profile, decreased abused potential and a low level of physical dependence. Buprenorphine also has the ability to blunt the effects of concurrently administered opioid, either through cross-tolerance or pharmacological antagonism, reducing the risk of illicit drug use. Furthermore, buprenorphine's high receptor affinity and slow dissociation from its receptor help provide its long duration of action and make less-than-daily dosing possible, which may result in higher acceptability in some patients. However, despite its low abuse potential, buprenorphine can produce mu agonist effects, especially with the parenteral use. The likelihood of parenteral abuse can be reduced by using a sublingually administered combination medication containing buprenorphine and naloxone.

In conclusion, buprenorphine can be an effective, safer alternative for methadone in the treatment of opioid dependence.

#### **References**

1. McQuay HJ, Moore RA. Buprenorphine kinetics in humans. In: Cowan A, Lewis, JW. (Eds), *Buprenorphine: Combatting drug abuse with a unique opioid*. New York: Wiley-Liss Inc. 1995:137-147.



2. Walter DS, Inturrisi CE. Absorption, distribution, metabolism and excretion of buprenorphine in animals and humans. In: Cowan A, Lewis JW. (Eds), *Buprenorphine: combatting drug abuse with a unique opioid*. New York: Wiley-Liss Inc. 1995:113-135.
3. Mendelson J, Upton RA, Everhart ET, et al. Bioavailability of sublingual buprenorphine. *J Clin Pharmacol* 1997;37:31-37.
4. Iribarne C, Picart D, Dreano Y, et al. Involvement of P450 3A4 in N-dealkylation of buprenorphine in human liver microsomes. *Life Sci* 1997;60:1953-1964.
5. Kobayashi K, Yamamoto T, Chiba K, et al. Human buprenorphine N-dealkylation is catabolized by cytochrome P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 1998;26:818-821.
6. Mistry M, Houston JB. Glucuronidation in vitro and in vivo. Comparison of intestinal and hepatic conjugation of morphine, naloxone, and buprenorphine. *Drug Metab Dispos* 1987;15:710-717.
7. Ohtani M, Kotaki H, Uchino K, et al. Pharmacokinetic analysis of enterohepatic circulation of buprenorphine and its active metabolite, norbuprenorphine, in rats. *Drug Metab Dispos* 1994;22:2-7.
8. Ohtani M, Kotaki H, Nisitaten K, et al. Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:428-433.
9. Ohtani M, Kotaki H, Sawada Y, et al. Comparative analysis of buprenorphine- and norbuprenorphine-induced analgesic effects based on pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:505-510.
10. Lindhardt K, Ravn C, Gizurarson S, et al. Intranasal absorption of buprenorphine— in vivo bioavailability in sheep. *Int J Pharm* 2000;205:159-163.
11. Cowan A. Buprenorphine: new pharmacological aspects. *Int J Clin Pract* 2003;133:823-824.
12. Heel RC, Brogden RN, Speight TM, et al. Buprenorphine: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1979;17:81-110.
13. Bickel WK, Stitzer ML, Bigelow GE, et al. Buprenorphine: dose-related blockade of opioid challenge effects in opioid dependent humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:47-53.
14. Cowan A, Lewis JW, McFarlane IR. Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Br J Pharmacol* 1977;60:537-545.
15. Huang P, Kehner GB, Cowan A, et al. Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: Norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297: 688-695.
16. Jasinski DR, Pevnick JS, Griffith JD. Human pharmacology and abuse potential of the analgesic buprenorphine. *Arch Gen Psychiatry* 1978;35:501-516.
17. Leander JD. Buprenorphine is a potent kappa-opioid receptor antagonist in pigeon and mice. *Eur J Pharmacol* 1988; 151:457-461.
18. Lutfy K, Eitan S, Bryant CD, et al. Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J Neurosci* 2003;23:10331-10337.
19. Reisine T, Bell GI. Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci* 1993; 16:506-510.
20. Neguss SS, Picker MJ, Dykstra LA. Kappa antagonist properties of buprenorphine in non-tolerant and morphine-tolerant rats. *Psychopharmacology* 1989;98:141-143.
21. Raisch DW, Fye CL, Boardman KD, et al. Opioid dependence treatment, including buprenorphine/naloxone. *Ann Pharmacother* 2002;36:312-321.
22. Walsh SL, Preston KL, Stitzer ML, et al. Clinical pharmacology of buprenorphine: ceiling effects at high doses. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55(5):569-580.
23. Lewis JW. Buprenorphine. *Drug Alcohol Depend* 1985;14:363-372.
24. Boas RA, Villiger JW. Clinical actions of fentanyl and buprenorphine. The significance of receptor binding. *Br J Anaesth* 1985; 57:192-196.
25. Cowan A. Update on the general pharmacology of buprenorphine. In: Cowan A, Lewis JW. (Eds), *Buprenorphine: Combating drug abuse with a unique opioid*. New York: Wiley-Liss Inc. 1995:31-47.
26. Harris DS, Jones RT, Welms, et al. Buprenorphine and naloxone co-administration in opiate-dependent patients stabilized on sublingual buprenorphine. *Drug Alcohol Depend* 2000;61:85-94.
27. Preston KL, Bigelow GE, Liebson IA. Effects of sublingually given naloxone in opioid-dependent human volunteers. *Drug Alcohol Depend* 1990;25:27-34.
28. Stoller KB, Bigelow GE, Walsh SL, et al. Effects of buprenorphine/naloxone in opioid-dependent humans. *Psychopharmacology* 2001;154:230-242.
29. Fudala PJ, Yu E, Macfadden W, et al. Effects of buprenorphine and naloxone in morphine-stabilized opiate addicts. *Drug Alcohol Depend* 1998;50:1-8.

30. Mendelson J, Jones RT. Clinical and pharmacological evaluation of buprenorphine and naloxone combinations: why the 4:1 ratio for treatment?. *Drug Alcohol Depend* 2003;70 Suppl. 1:S29-S37.
31. Walker EA, Richardson TM, Young AM. Tolerance and cross-tolerance to morphine-like stimulus effects of mu opioids in rats. *Psychopharmacology* 1997;133:17-28.
32. Greenwald MK, Johanson CE, Moody DE, et al. Effects of buprenorphine maintenance dose on muopioid receptor availability, plasma concentrations, and antagonist blockade in heroin-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:2000-9.
33. Walker EA, Young AM. Differential tolerance to antinociceptive effects of mu opioids during repeated treatment with etonitazene, morphine, or buprenorphine in rats. *Psychopharmacology* 2001;154:131-42.
34. Clark NC, Lintzeris N, Muhleisen PJ. Severe opiate withdrawal in a heroin user precipitated by a massive buprenorphine dose. *Med J Aust* 2002;176:166-67.
35. Eissenberg T, Greenwald MK, Johnson RE, et al. Buprenorphine's physical dependence potential: antagonist-precipitated withdrawal in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:449-59.
36. Kosten TR, Krystal JH, Charney DS, et al. Opiate antagonist challenges in buprenorphine-maintained patients. *Drug Alcohol Depend* 1990;25:73-8.
37. Walsh SL, June HL, Schuh K, et al. Effects of buprenorphine and methadone in methadone-maintained subjects. *Psychopharmacology* 1995;119:268-6.
38. Fudala PJ, Jaffe JH, Dax EM, et al. Use of buprenorphine in the treatment of opioid addiction. II Physiologic and behavioral effects of daily and alternate-day administration and abrupt withdrawal. *Clin Pharmacol Ther* 1990;47:525-34.
39. Kuhlman JJ, Jr Levine B, Johnson RE, et al. Relationship of plasma buprenorphine and norbuprenorphine to withdrawal symptoms during dose induction, maintenance and withdrawal from sublingual buprenorphine. *Addiction* 1998;93:549-59.
40. San L, Cami J, Fernandez T, et al. Assessment and management of opioid withdrawal symptoms in buprenorphine-dependent subjects. *Br J Addict* 1992;87:55-62.
41. Walsh SL, Eissenberg T. The clinical pharmacology of buprenorphine: extrapolating from the laboratory to the clinic. *Drug Alcohol Depend* 2003;70:S13-S27.
42. Johnson RE, Eissenberg T, Stitzer ML, et al. A placebo controlled clinical trial of buprenorphine as a treatment for opioid dependence. *Drug Alcohol Depend* 1995;40:17-25.
43. Kakko J, Svanborg KD, Kreek MJ, et al. 1-year retention and social function after buprenorphine-assisted relapse prevention treatment for heroin dependence in Sweden: a randomized, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:662-8.
44. Krook AL, Brors O, Dahlberg J, et al. A placebo-controlled study of high dose buprenorphine in opiate dependents waiting for medication-assisted rehabilitation in Oslo, Norway. *Addiction* 2001;97:533-42.
45. Ling W, Charuvastra C, Collins JF, et al. Buprenorphine maintenance treatment of opiate dependence: a multicenter, randomized clinical trial. *Addiction* 1998;93:475-86.
46. Ahmadi J. Methadone versus buprenorphine maintenance for the treatment of heroin-dependent outpatients. *J Subst Abuse Treat* 2003;24:217-20.
47. Ahmadi J, Babaee-Beigi M, Alishahi M, et al. Twelve-month maintenance treatment of opium-dependent patients. *J Subst Abuse Treat* 2004;26:61-4.
48. Ling W, Huber A, Rawson RA. New trends in opiate pharmacotherapy. *Drug and Alcohol review* 2001;20:79-94.
49. Johnson RE, Jaffe JH, Fudala PJ. A controlled trial of buprenorphine treatment for opioid dependence. *J Am Med Assoc* 1992;267:2750-5.
50. Strain EC, Stitzer ML, Liebson IA, et al. Comparison of buprenorphine and methadone in the treatment of opioid dependence. *Am J Psychiatry* 1994;151:1025-30.
51. Petitjean S, Stohler R, Deglon JJ, et al. Double-blind randomized trial of buprenorphine and methadone in opiate dependence. *Drug Alcohol Depend* 2001;62:97-104.
52. Johnson RE, Chutuaape MA, Strain EC, et al. A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med* 2000;343:1290-7.
53. Kosten TR, Schottenfeld RS, Ziedonis D, et al. Buprenorphine versus methadone maintenance for opioid dependence. *J of nerv Ment Dis* 1993;181:358-64.
54. Schottenfeld RS, Pakes JR, Oliveto A, et al. Buprenorphine vs methadone maintenance treatment for concurrent opioid dependence and cocaine abuse. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:713-20.
55. Ling W, Wesson DR, Charuvastra C, et al. A controlled trial comparing buprenorphine and methadone maintenance in opioid

- dependence. *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53:401-7.
56. Strain EC, Walsh SL, Preston KL, et al. The effects of buprenorphine in buprenorphine-maintained volunteers. *Psychopharmacology* 1997;129:329-38.
57. Kintz P. Buprenorphine-related deaths. In: Kintz P, Marquet P (Eds), Buprenorphine therapy of opiate addiction. Humana Press, Totowa, NJ 2002:109-17.
58. Reynaud M, Tracqui A, Petit G, et al. Six deaths linked to misuse of buprenorphine-benzodizepines combinations. *Am J Psychiatry* 1998;155:448-9.
59. Tracqui A, Kintz P, Ludes B. Buprenorphine-related deaths among drug addicts in France: a report on 20 fatalities. *J Anal Toxicol* 1998;22:430-4.
60. Tracqui A, Tournoud C, Flesch F, et al. Buprenorphine poisoning in drug abusers on substitution therapy; 29 non-fatal and 20 fatal cases. *La Presse Medicale* 1998; 27:557-61.
61. Kintz P. Deaths involving buprenorphine: a compendium of French cases. *Forensic Sci Int* 2001;121:65-9.
62. Auriacombe M, Franques P, Tignol J. Deaths attributable to methadone vs buprenorphine in Franc [letter]. *JAMA* 2001;285(1):45.
63. Cowan A, Doxey JC, Harry EJR. The animal pharmacology of buprenorphine, an oripavine analgesic gent. *Br J Pharmacol* 1977;60:547-54.
64. Dm JE, Herz J. In vivo receptor binding of the opiate partial agonist, buprenorphine, correlated with its agonist and antagonistic actions. *Br J Pharmacol* 1981;74:627-33.
65. Fukase H, Fukuzaki K, Koja T, et al. Effects of morphine, naloxone, buprenorphine, butorphanol, haloperidol and imipramine on morphine withdrawal signs in cynomolgus monkeys. *Psychopharmacology* 1994;116: 396-400.
66. Strain EC, Preston KL, Liebson IA, et al. Buprenorphine effects in methadone-maintained volunteers: effects at 2 hr after methadone. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:628-38.
67. Schuh KJ, Walsh SL, Bigelow GE, et al. Buprenorphine, morphine, and naloxone effects during ascending morphine maintenance in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:836-46.
68. Mendelson J, Jones RT, Fernandez I, et al. Buprenorphine and naloxone interactions in opiate-dependent volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:105-14.
69. Law FD, Bailey JE, Allen DS, et al. The feasibility of abrupt methadone-buprenorphine transfer in British opiate addicts in an outpatient setting. *Addict Biol* 1997;2:191-200.
70. Harris DS, Jones RT, Welm S, et al. Buprenorphine and naloxone co-administration in opiate-dependent patients stabilized on sublingual buprenorphine. *Drug Alcohol Depend* 2000;61:85-94.
71. Bouchez J, Beauverie P, Touzeau D. Substitution with buprenorphine in methadone- and morphine sulfate-dependent patients. *Eur Addict Res* 1998;4:8-12.
72. Levin FR, Fischman MW, Connerney I, et al. A protocol to switch high-dose, methadone-maintained subjects to buprenorphine. *Am J Addict* 1997;6:105-16.
73. Ling W, Charuvastra C, Collins JF, et al. Buprenorphine maintenance treatment of opiate dependence: a multicenter, randomized clinical trial. *Addiction* 1998;93:475-86.
74. Roughan JU, Flecknell PA. Buprenorphine: A reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating postoperative pain in animals. *Lab Anim* 2002;36:322-43.
75. Walsh SL, Preston KL, Bigelow GE, et al. Acute administration of buprenorphine in humans: partial agonist and blockade effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274:361-72.
76. Amass L, Bickel WK, Crean JP, et al. Alternate-day buprenorphine dosing is preferred to daily dosing by opioid-dependent humans. *Psychopharmacology* 1998;136:217-25.
77. Amass L, Bickel WK, Higgins ST, et al. Alternate-day dosing during buprenorphine treatment of opioid dependence. *Life Sci* 1994;54:1215-8.
78. Eissenberg TR, Johnson RE, Bigelow GE, et al. Controlled opioid withdrawal evaluation during 72 hr dose omission in buprenorphine-maintained patients. *Drug Alcohol Depend* 1997;45:81-91.
79. Johnson RE, Eissenberg T, Stitzer ML, et al. Buprenorphine treatment of opioid dependence: clinical trial of daily versus alternate-day dosing. *Drug Alcohol Depend* 1995;40:27-35.
80. Petry NM, Bickel WK, Badger GJ. Examining the limits of buprenorphine interdosing interval: daily, every-third-day and every-fifth-day dosing regimens. *Addiction* 2001;96:823-34.

## REVIEWS

---

### Koi : Medicinal plant for oral hygiene

Sopit Wongkham<sup>1</sup>, Suwimol Taweekaisupapong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

<sup>2</sup>Department of Oral diagnosis, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University

#### Abstract

Study of natural products for disease prevention and health promotion is popular in the past decade, including oral hygiene. Koi (*Streblus asper* Lour), a medicinal plant, has been known for long time for its potential activity in oral hygiene, especially tooth and gum. No toxicity of Koi extract was shown in acute and sub-acute toxicity test in experimental animals. Several experimental studies indicate the anti-bacterial activity of Koi extract towards dental caries associated bacteria, endodontic and periodontal pathogens. In addition, Koi extract could inhibit the adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells and acrylic.

Using toothpaste or mouth-rinse containing Koi extract could decrease the total number of oral *Streptococcus. mutans*. Rinse mouth with Koi extract only once for 1 minute, significantly reduced number of oral *S. mutans* within 30 to 60 minutes and returned to the original base line at 3 hours. Moreover, rinses mouth with Koi extract twice a day for 4 days, significantly reduced gingivitis as compared to those rinsed with distilled water.

The evidences from experimental and human studies indicate the potential development of Koi extract as a natural product for oral hygiene.

**Key words :** *Streblus asper*, antimicrobial effect, anti-inflammatory effect, adhesion

---

Address correspondence and reprint requests to : Sopit Wongkham, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, THAILAND Suwimol Taweekaisupapong, Department of Oral diagnosis, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, THAILAND

## ช้อย : สมุนไพรสำหรับสุขภาพช่องปาก

โสพิศ วงศ์คำ<sup>1</sup>, สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีวเคมี, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

<sup>2</sup>ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### บทคัดย่อ

ช้อยเป็นพืชสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ประโยชน์เกี่ยวกับสุขภาพเหงือกและฟันมาช้านาน แต่ได้มีการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ถึงประสิทธิภาพดังกล่าวไม่กี่ปีนี้เอง สารสกัดช้อยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ไม่พบพิษเฉียบพลัน และกึ่งเฉียบพลันเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง การทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าสารสกัดช้อยในเอธานอลสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อก่อโรคฟันผุ เชื้อในโพรงรากฟันและเชื้อก่อโรคปริทันต์ รวมทั้งยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อรากับเซลล์เยื่อ مخاطและกับวัสดุที่ใช้ทำฐานฟันปลอมชนิดอคริลิก

การใช้ยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดช้อยสามารถลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สำคัญในการก่อโรคฟันผุได้อย่างมีนัยสำคัญ การบ้วนน้ำผสมสารสกัดช้อยนาน 1 นาทีเพียงครั้งเดียวสามารถลดปริมาณเชื้อดังกล่าวจากค่าฐาน (baseline) ใน 30 ถึง 60 นาทีแรกและกลับสู่ค่าฐานภายใน 3 ชั่วโมง นอกจากนี้การบ้วนปากด้วยสารสกัดช้อยเช้า-เย็นโดยไม่แปรงฟันเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน สามารถลดการอักเสบของเหงือกได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและในอาสาสมัครแสดงถึงประสิทธิภาพ และแนวโน้มในการใช้สารสกัดช้อยเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สุขอนามัยช่องปากเพื่อดูแลสุขภาพเหงือกและฟันในภาพรวม

คำสำคัญ : ช้อย, สมุนไพร, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

สุขภาพที่ดีของประชากรเป็นปัจจัยที่สำคัญ ปัจจัยหนึ่งควบคู่กับการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โรคฟันผุและโรคปริทันต์ยังเป็นปัญหาสำคัญทางทันตสาธารณสุขของประชาชนมาเป็นเวลานาน แม้ว่าโรคดังกล่าวจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตแต่ก็มีผลกระทบในเชิงลบต่อการดำรงชีวิต ประสิทธิภาพการทำงานและสุขภาพส่วนบุคคลในระยะยาว

ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและแสวงหาสมุนไพรตำรับต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกในการป้องกันและรักษาโรคหลายชนิด ซึ่งรวมถึงสมุนไพรของปาก บทความนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะรวบรวมวรรณกรรมทั้งที่มีรายงานจากต่างประเทศและในประเทศ เพื่อจัดการองค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้ชื่อยกับสมุนไพรของปาก ทั้งที่เป็นการวิจัยปฏิบัติทดลองในห้องปฏิบัติการและการศึกษาทางคลินิก เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดชื่อยให้เป็นผลิตภัณฑ์ชื่อยที่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานและวิทยาศาสตร์คลินิกสนับสนุนเป็นรูปแบบของการใช้ความรู้จากสหสาขาวิชา การเชื่อมโยงความรู้จากห้องทดลองสู่คลินิก (bench to bedside) และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทันตอนามัยสู่ประชาชน

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับชื่อยในฐานข้อมูล Pubmed ตั้งแต่ ค.ศ. 1960-2005 พบเพียง 8 รายงาน เป็นรายงานของนักวิจัยไทย 5 รายงานซึ่งเป็นการวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของชื่อยกับสมุนไพรของปากทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบสารสกัดชื่อยในผลิตภัณฑ์ชื่อยจากวารสารและรายงานวิจัยในประเทศไทยอีกหลายรายงาน ที่บ่งชี้ถึงคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่หลากหลายของสารสกัดชื่อยต่อสุขภาพช่องปาก

ชื่อย (*Streblus asper* Lour) (รูปที่ 1) เป็นพืชสมุนไพรในตระกูล Moraceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอินเดีย จีนตอนใต้ มาเลเซีย ฟิลิปปินส์และไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Bar-Inka, Bernikka, Koi, Rudi Schwri, Serut, Shakhotaka ชื่อพื้นเมืองที่รู้จักกันเช่น ชื่อย ส้มพ้อ (เลย), สะนาย (เขมร), และ

ตองบนแน (กะเหรี่ยง) ประชาชนในหลายประเทศรู้จักและใช้ชื่อยเป็นสมุนไพรมายาวนาน ส่วนต่างๆ ของชื่อยสามารถใช้เป็นยาที่มีสรรพคุณแตกต่างกัน เช่น ใช้น้ำต้มจากเปลือกชื่อยในการรักษาโรคบิดท้องร่วง ไช้นัส แก้วไข แก้วพิษและฆ่าเชื้อโรคที่บาดแผล<sup>1</sup> ใช้รักษาโรคผิวหนัง แก้วพิษผิวหนัง<sup>2</sup> ยางจากต้นชื่อยใช้เป็นยาระบายประสาท แก้วปวดบวม ใช้พอกฝีและแก้วพิษ<sup>3</sup> เมล็ดเป็นยาอายุวัฒนะ แก้วท้องร่วง ริดสีดวงและเลือดกำเดา น้ำสกัดจากชื่อยใช้เป็นยาฆ่าเชื้อช่วยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อและยับยั้งการเกิดมะเร็ง<sup>4</sup> สำหรับภาคเหนือของประเทศไทย ใช้ใบชื่อยอบไฟให้เหลืองกรอบ ชงน้ำต่างใบชาเพื่อใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ เป็นยาระบายท้อง ขับปัสสาวะ และแก้ไอพิการ<sup>5</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารสกัดจากชื่อยในการกำจัดลูกน้ำยุง<sup>6</sup> และแมลงศัตรูพืช<sup>6</sup>

นอกจากสรรพคุณต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ยังมีบันทึกการใช้ชื่อยในการดูแลสุขภาพเหงือกและฟันในหลายประเทศ เช่นในอินเดีย ใช้กิ่งชื่อยอ่อนทุบให้ نرمเป็นไม้สีฟัน ทำให้ฟันแน่นทน ในประเทศอื่นๆ ใช้เปลือกชื่อยต้มน้ำกับเกลืออมแก้เหงือกอักเสบ ประชาชนในชนบทของประเทศไทยรู้จักใช้กิ่งชื่อยสีฟัน ใช้น้ำจากต้นชื่อยผสมเกลือสีฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟัน เหงือกบวมสามารถแก้ด้วยการปวดได้<sup>7</sup>

อุทัยวรรณ กาญจนกมลและคณะ (2526) ได้ทดสอบให้เด็กในโรงเรียนชนบทใช้ไม้ชื่อยสีฟันพบว่ามีประสิทธิภาพดีเท่ากับการใช้แปรงสีฟัน<sup>7</sup> รายงานของเทอดพงษ์ ตรีรัตน์และบุญนิตย์ ทวีบุรณ์ (2530) เป็นรายงานแรกที่แสดงว่าส่วนสกัดจากกิ่งและใบชื่อยในเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) และ *S. salivarius* ในจานเพาะเลี้ยงได้<sup>8</sup>

โสพิศ วงศ์คำและคณะ (2538) ได้ปรับวิธีการสกัดและศึกษาผลของสารสกัดจากใบชื่อยใน 50% เอทานอลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคหลายชนิดพบว่าสารสกัดจากใบชื่อยไม่เพียงแต่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ยังมีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ โดยเฉพาะกลุ่ม Streptococci ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคฟันผุ โรคทางเดินอาหารและทางเดินหายใจส่วนบน (รูปที่ 2 และ 3)<sup>9</sup> การศึกษาเดียวกันนี้ยัง

แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบช่อยดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ไม่พบพิษเฉียบพลันเมื่อทดสอบในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดจากใบช่อยทางปากหรือฉีดเข้าช่องท้อง ในปริมาณ 50 และ 500 มก.ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ไม่มีพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูขาวเมื่อให้สารสกัดจากใบช่อยทางปากในปริมาณ 50 มก.ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม วันละครั้ง ทุกวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์<sup>10</sup>

ด้วยคุณสมบัติที่จำเพาะและความปลอดภัยของสารสกัดจากช่อยดังกล่าวข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยได้ขยายการศึกษาผลของสารสกัดดังกล่าวต่อเชื้อก่อโรคปริทันต์และเชื้อในโพรงรากฟันกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (anaerobe) รวมทั้งเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของ oral candidosis การทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า สารสกัดจากใบช่อยสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อก่อโรคปริทันต์ *Porphyromonas gingivalis* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*<sup>11</sup> และเชื้อในโพรงรากฟันได้<sup>1,12</sup> รวมทั้งสามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *C.albicans* กับเซลล์เยื่อ مخاطแก้ม (buccal epithelium) (รูปที่ 4)<sup>13</sup> และกับวัสดุที่ใช้ทำฐานฟันปลอม<sup>14</sup> อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าไม่พบผลของสารสกัดช่อยต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* กับผิวแก้วในห้องทดลอง<sup>15</sup>

มีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากช่อยต่อสุขภาพช่องปากในอาสาสมัครหลากหลายรูปแบบ การทดสอบเบื้องต้นโดยการผสมสารสกัดช่อยในยาสีฟัน<sup>16</sup> หรือน้ำยาบ้วนปาก<sup>17</sup> พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อ *S.mutans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในการก่อโรคฟันผุในช่องปากของอาสาสมัครได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบช่อยต่อเชื้อ *S. mutans* โดยให้อาสาสมัครบ้วนน้ำผสมสารสกัดจากใบช่อยเพียงครั้งเดียวเป็นเวลา 1 นาที และเก็บน้ำลายติดต่อกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เทียบกับการบ้วนด้วยน้ำกลั่นในกลุ่มประชากรเดียวกันโดยให้มีระยะทดสอบห่างกันหนึ่งสัปดาห์<sup>18</sup> พบว่าการบ้วนน้ำผสมสารสกัดจากใบช่อยไม่มีผลต่อระบบนิเวศในช่องปาก

เมื่อตรวจค่า pH, ค่าความเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) และปริมาณรวมของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก แต่มีผลโดยตรงต่อปริมาณของเชื้อ *S. mutans* โดยสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. mutans* จากระดับค่าฐาน (baseline) ใน 30 ถึง 60 นาทีแรกหลังการบ้วนน้ำผสมสารสกัดจากใบช่อยและกลับสู่ค่าฐานภายใน 3 ชั่วโมง การศึกษานี้บ่งชี้ถึงความจำเพาะและประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบช่อยต่อเชื้อ *S. mutans*

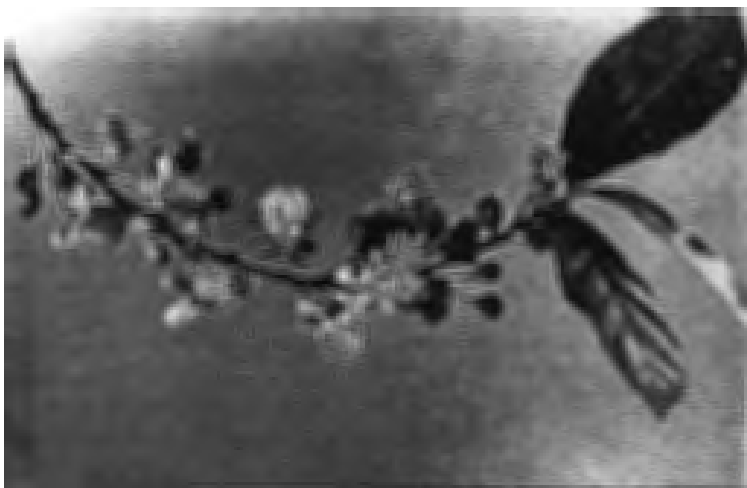
คณะผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันได้ขยายผลการศึกษาการใช้สารสกัดจากใบช่อยต่อการอักเสบของเหงือกและการเกิดคราบจุลินทรีย์ในอาสาสมัครจำนวน 30 คน โดยให้อาสาสมัครบ้วนน้ำผสมสารสกัดใบช่อยวันละ 2 ครั้งๆละ 1 นาที เป็นเวลา 4 วัน ติดต่อกันโดยไม่แปรงฟัน ในวันที่ 5 อาสาสมัครได้รับการตรวจสภาพเหงือก คราบจุลินทรีย์และปริมาณจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับการบ้วนด้วยน้ำกลั่นในประชากรกลุ่มเดียวกัน โดยให้มีระยะทดสอบห่างกัน 10 วัน และอาสาสมัครรับประทานอาหารและใช้ชีวิตประจำวันตามปกติ<sup>11</sup> พบว่าการบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบช่อยสามารถลดการอักเสบของเหงือกได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณเชื้อ *Mutans streptococci* และจุลินทรีย์โดยรวม (total bacteria) ในน้ำลาย แต่มีการลดลงของปริมาณเชื้อ *M.streptococci* ในคราบจุลินทรีย์หลังบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบช่อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นแม้ว่าความแตกต่าง จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบช่อยในการลดการอักเสบของเหงือกนี้อาจเกิดจากผลโดยตรงของสารสกัดใบช่อยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *M.streptococci* ทำให้เชื้อไม่สร้างสารกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการดึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มาเกาะกลุ่ม (coaggregate) กันเป็นคราบจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนประกอบของคราบจุลินทรีย์และมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อน้อยลง ส่งผลให้สุขภาพเหงือกดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การบ้วนปากด้วยน้ำกลั่น หรืออาจเกิดจากองค์ประกอบในสารสกัดใบช่อยที่มีคุณสมบัติลดการอักเสบโดยตรง

ซึ่งคุณสมบัตินี้ยังไม่มีการศึกษาทดสอบในสัตว์ทดลองหรือทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การสอบถามความรู้สึกของอาสาสมัครหลังบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบช่อยพบว่า อาสาสมัคร 24/30 คน (80%) ให้ ข้อมูลว่ารู้สึกปากสะอาดแม้ว่าจะไม่ได้แปรงฟัน นอกจากนี้อาสาสมัครคนหนึ่งซึ่งเกิดแผลร้อนใน (aphthous ulcer) ระหว่างทดสอบให้ข้อมูลว่ารู้สึกได้ว่าการบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบช่อยทำให้รอยโรคหายเร็วกว่าที่เคยเป็นในครั้งก่อนๆ

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสารประกอบของช่อยที่มีประสิทธิภาพต่างๆ ดังรายงานข้างต้นมีเพียงรายงานการตรวจพบไกลโคไซด์ (glycoside) หลายชนิดที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัดจากรากช่อย<sup>19</sup> คณะผู้รายงานเองได้ทดลองแยกส่วนสกัดของใบช่อยด้วยกรรมวิธีต่างๆ พบว่าการแยกส่วนทำให้ฤทธิ์และประสิทธิภาพของสารสกัดใบช่อยลดลง ดังนั้นการใช้ช่อยในรูปสารสกัดรวมและปรับปรุงกลิ่นและสีให้เหมาะกับรสนิยมของผู้ใช้จึงเป็นแนวทางที่ให้ผลดีกว่าการแยกส่วนสกัด

ช่อยมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ดีกว่าสมุนไพรอื่นที่รายงานว่ามียาต่อจุลินทรีย์ในช่องปาก กล่าวคือสามารถแสดงผลได้ทั้งในห้องทดลองและทางคลินิก

Dzink และ Socransky (1985) รายงานว่าสารสกัดจาก *Sanguinarine canadensis* สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในช่องปากหลายชนิด<sup>20</sup> แต่เมื่อนำไปทดสอบทางคลินิกในรูปของยาสีฟันกลับไม่พบผลของสารสกัดดังกล่าวต่อการลดการอักเสบของเหงือกและคราบจุลินทรีย์<sup>21,22</sup> อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สารสกัดดังกล่าวร่วมกันทั้งในรูปยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถลดการอักเสบของเหงือกและคราบจุลินทรีย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ<sup>23,24</sup> ดังนั้นหากมีการพัฒนาใช้สารสกัดจากใบช่อยเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ช่องปากหลากหลายรูปแบบและใช้ร่วมกัน จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารสกัดช่อยในการดูแลและป้องกันโรคฟันผุและเหงือกอักเสบได้ (ตารางที่ 1) ในขณะนี้คณะผู้วิจัยได้ร่วมมือกับศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ช่องปากที่มีสารสกัดจากใบช่อยเป็นองค์ประกอบในรูปแบบต่างๆ ทั้งเพื่อการรักษาและป้องกัน และในอนาคตอันใกล้จะมีผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบช่อยในการดูแลรักษาเหงือกและฟัน เพื่อสุขอนามัยช่องปากที่ดีของประชาชนคนไทยในภาพรวม



รูปที่ 1 ใบ ดอกและผล ช่อย (*Streblus asper*)

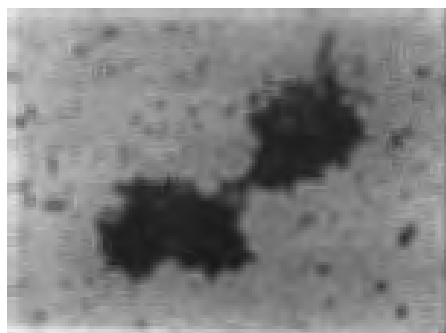




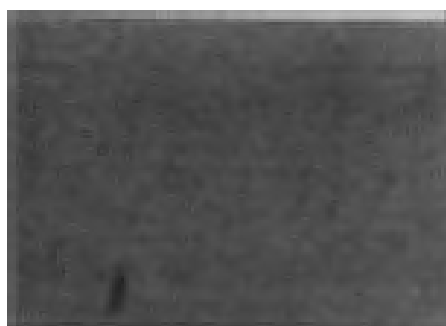
รูปที่ 2 สารสกัดจากไบโพลีเมอร์สามารถทำลายเชื้อ *S. mutans* ได้;

-KE = เชื้อ *S. mutans* เมื่อไม่มีสารสกัดข่อยสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยง  
 +KE = เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. mutans* ในอาหารที่มีสารสกัดข่อย เชื้อถูกทำลายจึงไม่มีโคโลนี  
 ของเชื้อในอาหาร

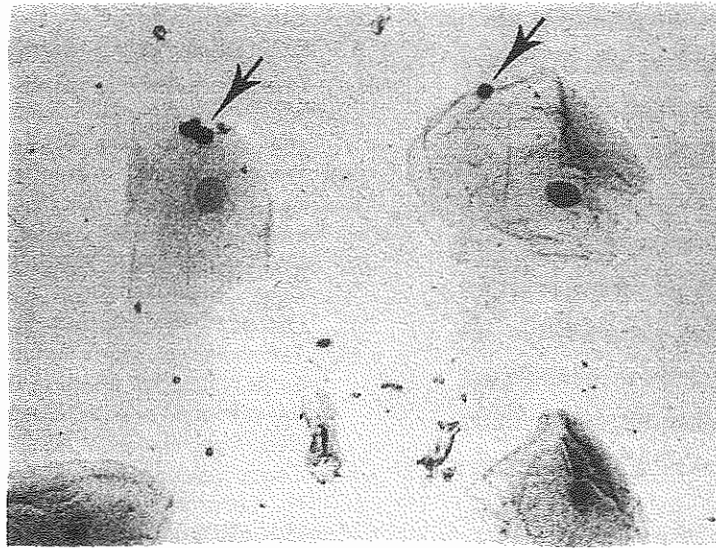
ก



ข



รูปที่ 3 ก. เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. mutans* ในอาหารที่มีสารสกัดข่อย เชื้อจะเกาะกลุ่มกัน ในขณะที่  
 ข. เชื้อ *S. mutans* มีการกระจายตัวเมื่อเลี้ยงในอาหารปกติ



รูปที่ 4 แสดงการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* (ลูกศร) กับเซลล์เยื่อบุช่องปาก (กำลังขยาย x400)

ตารางที่ 1 ปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดใบข่อยที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดลองทางห้องปฏิบัติการและในอาสาสมัคร

ฤทธิ์ชีวภาพ	ปริมาณที่แสดงผล (mg/ml)	เอกสารอ้างอิง
<b>การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ (in vitro)</b>		
ทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i>	1.93	(10)
ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus</i> group A, B	5	(10)
ทำลายเชื้อ <i>Streptococcus</i> group A, B	18-50	(10)
ทำลายเชื้อ <i>Candida albicans</i>	$\geq 250$	(13)
ทำลายและยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปริทันต์ <i>Porphyromonas gingivalis</i> และ <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	3.91-31.25	(11)
ทำลายและยับยั้งการเจริญของเชื้อในโพรงรากฟันได้	100-200	(12)
ยับยั้งการยึดเกาะของ <i>Candida albicans</i> กับเซลล์เยื่อบุช่องปาก	$\geq 15.6$	(13)
ยับยั้งการยึดเกาะของ <i>Candida albicans</i> กับ วัสดุที่ใช้ทำฐานฟันปลอมชนิดอคริลิก	$> 31.2$	(14)
<b>การทดสอบในอาสาสมัคร (in vivo)</b>		
การบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบข่อย 1 นาที ลดปริมาณ <i>Streptococcus mutans</i> ในน้ำลายได้นาน 1-2 ชั่วโมง	80	(18)
การบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบข่อยติดต่อกัน 4 วันสามารถลดการอักเสบของเหงือก	80	(25)

## บทสรุป

สารสกัดจากใบข่อยมีคุณสมบัติที่พิสูจน์ได้ว่าสามารถลดปัจจัยเสี่ยงต่อโรคฟันผุ เสริมสร้างสุขภาพเหงือกและฟัน โดยมีฤทธิ์ยับยั้งและ/หรือทำลายเชื้อก่อโรคฟันผุและโรคปริทันต์อย่างจำเพาะ คุณสมบัติเหล่านี้สามารถแสดงผลให้เห็นได้เมื่อทดสอบกับอาสาสมัคร นอกจากนี้สารสกัดข่อยยังมีฤทธิ์ยับยั้งการยึดจับของเชื้อ *C.albicans* ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากและวัสดุที่ใช้ทำฐานฟันปลอมชนิดอคริลิก ดังนั้นหากมีการพัฒนาใช้สารสกัดจากใบข่อยเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ช่องปากหลากหลายรูปแบบและใช้ร่วมกัน จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารสกัดข่อยในการดูแลและป้องกันโรคฟันผุและเหงือกอักเสบ รวมทั้งโรคติดเชื้อราในช่องปากได้

## เอกสารอ้างอิง

- Mukherjee K, Roy L. Chemical examination of *Streblus asper* leaves. *Int J Crude Drug Res* 1983;21:189-90.
- Wasuwat S. A list of Thai medical plants. ASRCT Research project number 1, 1967.
- Kapoor S, Kapoor L. Medicinal plant wealth of the Karimnaga district of Andhra Pradesh. *Bull Med Ethnobot Res* 1980;1:20-44.
- พิชสมุณีพร. งานสำรวจและวิเคราะห์ข้อมูลข่อย. กรุงเทพฯ: สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาคกลาง; 2528.
- Das MK, Beuria MK. Anti-malarial property of an extract of the plant *Streblus asper* in murine malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85(1):40-1.
- Hashim MS, Devi KS. Insecticidal action of the polyphenolic rich fractions from the stem bark of *Streblus asper* on *Dysdercus cingulatus*. *Fitoterapia* 2003;74(7-8):670-6.
- อุทัยวรรณ กาญจนกมล และคณะ. การศึกษาประสิทธิภาพของไม้ข่อยและไม้สีฟันคนทา. รายงานวิจัยโครงการอนามัยช่องปากเด็กไทยในชนบท พ.ศ. 2526.
- เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และบุญนิตย์ ทวีบุรณ์. การทดสอบประสิทธิภาพส่วนสกัดของข่อยต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และสเตรปโตคอคคัส ซาโลวาเรียส. ว.ทันต 2530; 37(3): 119-24.
- Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, et al. Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. *Phytother Res* 2001;15(2):119-21.
- Wongkham S, Pienthaweechai K, Laupattarakasaem P, et al. Bacterocidal activity of *Streblus asper*. *Proceeding of the Second Thai-French Symposium on Plant Molecular Biology*, 1996; 362-74; October 6-10; Bordeaux: France, 1996.
- Taweekaisupapong S, Singhara S, Choopan T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf extract on selected anaerobic bacteria. *J Dent Assoc Thai* 2002;52:227-34.
- Taweekaisupapong S, Leela-aphiradee N, Laoprom P, et al. Effect of Koi (*Streblus asper*) on root canal bacteria. *Khon Kaen Den J* 2000;3:41-7.
- Taweekaisupapong S, Choopan T, Singhara S, et al. In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *J Ethnopharmacol* 2005;96(1-2):221-6.
- สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์, ปรมารณณ์ กลั่นฤทธิ์, โสพิศ วงศ์คำ, สุภาภรณ์ สิงหราช รายงานการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการเกาะของเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคน บนพื้นผิวอคริลิก. ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2547.
- Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol* 2004;92(2-3):281-9.
- สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์, สุรัตน์ ลินะศิริมากุล. ผลของยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลาย. รายงานวิจัยระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2534.
- Sowiseth C, Thanasarnthavee W, Phantumvanit P. Effectiveness of extract from Koi (*Streblus asper* Lour) to *Streptococcus mutans* in vivo. *Proceeding of the 7th Scientific Meeting of Asia Pacific Dental Student Association Congress*; 1991; April 7-15; Bangkok, 1991.

18. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Chareonsuk S, et al. Selective activity of *Streblus asper* on Mutans streptococci. *J Ethnopharmacol* 2000;70(1):73-9.
19. Gaitonade B, Vaz A, Patel J. Chemical and pharmacological study of root bark of *Streblus asper*. *Indian U Med Sci* 1964;18:191-.
20. Dzink JL, Socransky SS. Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27(4):663-5.
21. Lobene RR, Soparkar PM, Newman MB. The effects of a *sanguinaria* dentifrice on plaque and gingivitis. *Compend Contin Educ Dent* 1986;Suppl 7:S185-8.
22. Mauriello SM, Bader JD. Six-month effects of a sanguinarine dentifrice on plaque and gingivitis. *J Periodontol* 1988;59(4):238-43.
23. Harper DS, Mueller LJ, Fine JB, et al. Clinical efficacy of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride during 6 months of use. *J Periodontol* 1990;61(6):352-8.
24. Kopczyk RA, Abrams H, Brown AT, et al. Clinical and microbiological effects of a sanguinaria-containing mouthrinse and dentifrice with and without fluoride during 6 months of use. *J Periodontol* 1991;62(10):617-22.
25. Taweechaisupapong S, Wongkham S, Rattanathongkom A, et al. Effect of mouthrinse containing *Streblus asper* leaf extract on gingivitis and plaque formation. *J Dental Assoc Thailand* 2002;52:383-91.



# **The 15<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology**

## **(IUPHAR-2006)**

Beijing International Convention Center, China

July 2-7, 2006

THEME

**Pharmacology in the 21<sup>st</sup> Century: a Bridge  
between the Past and the New Molecular Frontiers**

**SPONSORS**

International Union of Pharmacology Chinese Pharmacological Society

**CO-SPONSORS**

Ministry of Health of PRC Chinese Academy of Medical Sciences Peking University Health  
Science Center

**ORGANIZERS**

Chinese Pharmacological Society China Science and Technology Consulting Service Center

## DRUGS

### Medroxyprogesterone Acetate and Anticancer Effect

Nisamanee Satyapan

*Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine*

#### Abstract

Hormone or agents related to hormones are being used in combination with other methods to treat some types of hormone-dependent cancer (e.g. breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer). By which progestational agents are useful as second-line hormonal therapy for metastatic, hormone-dependent breast cancer and in the management of endometrial carcinoma previously treated by surgery and radiotherapy. Progesterone itself is inactive when given orally due to first-pass hepatic metabolism. However, substitutions of such 17-esters at the 6-position of the B ring yield orally active compounds such as medroxyprogesterone acetate (MPA). MPA is one group of progestins contains the 21-carbon skeleton of progesterone. It is highly selective and have a spectrum of activity very similar to that of the endogenous hormone. In many biological systems, progestins enhance differentiation and oppose the actions of estrogens to stimulate cell proliferation. This action of progestins may involve decreases in estrogen receptor levels, increases in local metabolism of estrogens to less active metabolites, or the induction of gene products that blunt cellular responses to estrogenic agents. MPA also has androgenic and anabolic effect without estrogenic effect. The drug is metabolized in liver and excreted in urine so that it is contraindicated in severe hepatic diseases, as metabolism of MPA will be decreased and accumulation of active drug will occur. Uncommon adverse effects are similar to those found in other progestins, included psychic depression (due to increase level of monoamine oxidase). MPA has been reported to cause either no effects or modest reductions in serum HDL levels. In a number of placebo-controlled clinical trials, high-dose medroxyprogesterone acetate (HD-MPA) was shown to be effective in treatment of hormone-dependent cancer when used in combination with chemotherapeutic drugs or irradiation. HD-MPA help reducing hematological toxicity from radiation. It also has myeloprotective effect thus prevent leukopenia in patients on chemotherapy as well as pain relief in bone metastases. Moreover, HD-MPA will improve quality of life, as it will stimulate appetite and gain weight in patients taking the drug. This is due to its anabolic effect.

**Key words :** high-dose medroxyprogesterone acetate, hormone-dependent cancer, anabolic effect.

---

Address correspondence and reprint requests to : Nisamanee Satyapan, B.Sc in Pharm, M.S. (Pharmacology), Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok 10400, THAILAND. Tel. & Fax. 02-354-7752 Email : nsatyapan@yahoo.com

## Medroxyprogesterone Acetate and Anticancer Effect

นิสามณี สัตยาบัน

ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

### บทคัดย่อ

ฮอร์โมนหรือสารที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนถูกนำมาใช้รักษามะเร็งบางอย่างที่มีความเกี่ยวข้องกับความไวต่อฮอร์โมนเพศ ร่วมกับการรักษาด้วยวิธีอื่น ๆ โดยสารที่มีฤทธิ์โปรเจสเตอโรน (progestational agents) จัดเป็นยาเลือกอันดับสองในการรักษามะเร็งเต้านมชนิด hormone-dependent ระยะแพร่กระจาย และมะเร็งเยื่อบุมดลูกที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดและฉายรังสีมาก่อน แต่โปรเจสเตอโรนเมื่อให้ทางปากจะมี first-pass hepatic metabolism จึงใช้ไม่ค่อยได้ผล ปัจจุบันจึงใช้ยาเตรียมที่เป็นสารสังเคราะห์ของโปรเจสเตอโรน เช่น high-dose medroxyprogesterone acetate (HD-MPA) ซึ่งจัดเป็น progestogens หรือ progestins ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาก เป็น 17-esters ที่มีการดัดแปลงโครงสร้างในตำแหน่งที่ 6 ของ ring B จึงให้ทางปากได้ progestins จะไปขัดขวางฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่กระตุ้นให้เกิด cell proliferation หรือเหนี่ยวนำให้มี gene products ที่ไปดำเนินการตอบสนองของเซลล์ต่อเอสโตรเจน และยังมีฤทธิ์ androgenic และ anabolic ด้วย แต่ไม่มี estrogenic activity ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับและขับออกทางปัสสาวะ ในผู้ที่ตับบกพร่อง MPA จึงถูกเปลี่ยนแปลงลดลง ทำให้เกิดการสะสมของยามากขึ้น ดังนั้นจึงห้ามใช้ MPA ในผู้ป่วยโรคตับรุนแรง อาการข้างเคียงที่พบได้ไม่บ่อยมักเป็นอาการข้างเคียงที่คล้ายกับ progestins รวมทั้ง psychic depression (เพราะทำให้ระดับ monoamine oxidase เพิ่มขึ้น) และอาจทำให้ระดับ HDL ลดลง การใช้ MPA ขนาดสูง (HD-MPA) จึงนับเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งชนิด hormone-dependent ช่วยลดอาการพิษต่อระบบโลหิตจากการใช้รังสีรักษา มี myeloprotective effect ช่วยป้องกันการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด บรรเทาอาการปวดกระดูกอันเนื่องมาจากมะเร็งที่แพร่กระจายไปที่กระดูก (bone metastases) นอกจากนี้ฤทธิ์ anabolic effect ยังช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตแก่ผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารได้มากขึ้น มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และผู้ป่วยโรคมะเร็งมีความรู้สึกที่ดีขึ้นหลังจากได้รับยาเคมีบำบัด

คำสำคัญ : high-dose medroxyprogesterone acetate, hormone-dependent cancer, anabolic effect

## ความเป็นมาของยารักษามะเร็ง<sup>1,2</sup>

ยารักษามะเร็งที่ถูกค้นพบประมาณปี ค.ศ. 1950-1970 ส่วนมากจะออกฤทธิ์ที่ DNA หรือสารเริ่มต้น โดยอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของยีนหรือทำลาย DNA ตัวอย่างยาเหล่านี้เช่น paclitaxel และ etoposide ซึ่งมีเป้าหมายการออกฤทธิ์ที่กระบวนการ proliferative แต่เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการค้นพบสารใหม่ที่มีเป็นความรู้ใหม่ด้านมะเร็ง ได้แก่ interleukin-2 ซึ่งควบคุม proliferation ของ tumor-killing T lymphocytes malignant melanoma และ renal cell carcinoma และอีกตัวหนึ่ง ได้แก่ all-trans-retinoic acid ซึ่งใช้ได้ผลใน acute promyelocytic leukemia รวมทั้งการทราบลักษณะสำคัญของ tumor antigens บน melanoma cells เช่น mutated p53 หรือ ras proteins ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนป้องกัน tumor ต่อไป

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะใช้ยาที่กล่าวมา (ซึ่งมักเป็นเคมีบำบัด) ร่วมกับการฉายรังสีหรือผ่าตัด โดยการใช้ยาเคมีบำบัดจะต้องใช้ขนาดสูง จึงทำให้เกิดพิษ หรืออาการข้างเคียงสูง เช่น การเกิด leukopenia ซึ่งในปัจจุบันอาจให้ granulocyte growth factor support (G-CSF) ร่วมเพื่อช่วยให้ระยะเวลาของการเกิด leukopenia สั้นลง

นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังต้องการใช้ยาเคมีบำบัดได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ยาในขนาดต่ำหรือใช้ยาเดี่ยว การดื้อยานี้อาจเกิดจากการไม่สร้างเอ็นไซม์ที่จำเป็นในการเปลี่ยนแปลงยาให้มีฤทธิ์ เช่น deoxycytidine kinase สำหรับ cytosine arabinoside หรือที่พบทั่วไปคือ overexpression ของ drug efflux pump ได้แก่ P-glycoprotein ซึ่งพบได้กับการใช้ยาที่เป็นสารจากธรรมชาติส่วนมาก หรือการขาดหายของ p53 ซึ่งเป็น suppressor oncogene (ยีนที่มีความจำเป็นในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ปกติ ถ้าไม่มียีนนี้ เซลล์จะแบ่งตัวมากเกินไปจนเกิดการเกิด malignant transformation) การกลายพันธุ์หรือการขาดหายของ p53 gene หรือ overexpression ของ bcl-2 gene (พบใน nodular non-Hodgkin's lymphomas) เป็นตัวการสำคัญในการทำให้ programmed cell death (apoptosis) หยุดทำงาน ส่งผล

ให้มี proliferation ของ mutated tumor cells มากขึ้น การค้นคว้ายารักษามะเร็งใหม่ๆ จึงมุ่งเน้นยาที่ออกฤทธิ์รักษาหน้าที่ apoptosis นี้ไว้

แต่ในขณะเดียวกันก็มีมะเร็งที่บางอวัยวะ (เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น) มีความเกี่ยวข้องกับความไวต่อฮอร์โมนเพศ ปัจจุบันจึงมีฮอร์โมนหรือสารที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนที่นำมาใช้รักษามะเร็งบางอย่างร่วมกับการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ โดยฮอร์โมนจะออกฤทธิ์ช้า ต้องใช้เวลารักษาติดต่อกันนาน 8-12 สัปดาห์ จึงจะประเมินประสิทธิภาพได้ชัดเจน ถ้าพบว่าการตอบสนองดีก็ให้ต่อไป ระยะเวลาที่โรคจะเลวร้ายประมาณ 6 เดือนถึง 1 ปี แต่ในบางรายอาจติดอยู่ได้หลายปี

## ฮอร์โมนหรือสารที่เกี่ยวข้อง<sup>1,2</sup>

ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันอาจแบ่งได้เป็น

1. สารที่มีฤทธิ์ต้านเอสโตรเจน (anti-estrogen agents) ได้แก่ tamoxifen และ clomiphene

1.1 Tamoxifen จัดเป็นยาเลือกอันดับแรกในการรักษามะเร็งเต้านม สำหรับรายที่เป็น estrogen receptor (ER) positive ทั้งการให้เสริมกับการรักษาวิธีอื่นและใช้รักษาในระยะแพร่กระจาย (metastatic disease) เพราะ tamoxifen ให้ผลการรักษามะเร็งเต้านมเหมือนการให้เอสโตรเจนและแอนโดรเจน แต่มีอาการข้างเคียงน้อยกว่า นอกจากนี้ยังใช้ป้องกันการกลับเป็นอีกในสตรีวัยทอง แต่มีอาการข้างเคียงที่พบบ่อย คือ หนาวร้อนวูบวาบ คลื่นไส้ อาเจียน ประจำเดือนผิดปกติ เลือดออกหรือคันที่ช่องคลอด ผื่นคันที่ผิวหนัง เป็นต้น ขณะเดียวกันยาอาจมีอาการข้างเคียงคล้ายเอสโตรเจนเพราะมีฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนด้วย เช่น thromboembolic events, retinal deposits, decreased visual acuity และต้อกระจก อีกทั้งยังมีผลเสียที่สำคัญ คือ อาจเกิดมะเร็งเยื่อบุมดลูก (endometrial cancer) การรักษาด้วยยานี้จึงต้องคอยสังเกตความผิดปกติดังกล่าวและรายงานให้แพทย์ทราบ รวมทั้งต้องมีการตรวจเป็นระยะ

อย่างไรก็ตาม estrogenic effect ของ tamoxifen ยังมีข้อดีคือ ช่วยชะลอการเกิดกระดูกพรุนในสตรีวัยทอง ลด total serum cholesterol, LDL



cholesterol, และ lipoproteins เพิ่มระดับ apo-lipoprotein AI ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิด myocardial infarction

ขนาดที่ใช้รักษามะเร็งเต้านม คือ 200 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งเป็นขนาดสูงจนอาจเกิด retinal degeneration ได้

1.2 Clomiphene มีฤทธิ์ต้านเอสโตรเจน เช่นเดียวกับ tamoxifen แต่เชื่อว่าฤทธิ์ส่วนใหญ่อยู่ที่ pituitary มากกว่าที่เซลล์เต้านม จึงใช้สำหรับกระตุ้นการตกไข่มากกว่ารักษาโรคมะเร็ง โดยใช้ในสตรีที่ไม่มีการตกไข่ แต่ยังมีผลสร้างเอสโตรเจนอยู่ เพื่อกระตุ้นการหลั่งของ gonadotropin-releasing hormone ดังนั้นสำหรับเพศชายอาจนำมาใช้กระตุ้นการหลั่งของ gonadotropin เพื่อเพิ่มการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ได้เช่นกัน

2. สารที่มีฤทธิ์ต้านแอนโดรเจน (anti-androgen agents) ได้แก่ flutamide ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแอนโดรเจนที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ใช้รักษามะเร็งต่อมลูกหมากโดยให้ร่วมกับ gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ซึ่งช่วยป้องกัน flare reaction จาก GnRH agonist การให้ antiandrogen agents ร่วมกับ GnRH agonist จะปิดกั้นแอนโดรเจนอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยจะไปยับยั้งฤทธิ์ของแอนโดรเจนที่สร้างจากต่อมอดรีนัลด้วย ส่วนที่ hypothalamus และ ต่อมลูกหมาก flutamide ยับยั้ง translocation ของ androgen receptor จาก cytoplasm ไปยังนิวเคลียส เมื่อใช้ flutamide เพียงอย่างเดียวในขนาดปกติคือ 250 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง ทางปาก จะมีฤทธิ์เป็น antitumor ในมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยที่ประมาณ 50% ของผู้ป่วยยังมีความต้องการทางเพศอยู่ แต่ยังไม่แนะนำให้การใช้เดี่ยวๆ เป็นทางเลือกอันดับแรกในการรักษา เพราะไม่แน่ว่า flutamide จะมีฤทธิ์ต้านแอนโดรเจนเพียงพอที่จะเอาชนะการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่ระดับ tumor cell หรือไม่ อาการข้างเคียงที่พบเป็นบางครั้งคือ ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน ตับทำงานผิดปกติซึ่งจะกลับคืนปกติได้เมื่อหยุดยา รวมทั้งการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ ความต้องการทางเพศลด ร้อนวูบวาบ gynecomastia และ mastodynia ในระดับต่างๆ

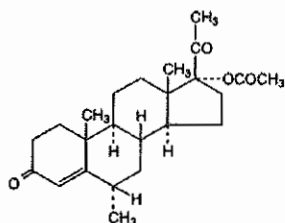
นอกจากนี้ยังมี leuprolide หรือ gonadorelin ซึ่งเป็น GnRH agonist มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอนโดรเจน โดยเฉพาะ testosterone และนำมาใช้รักษามะเร็งต่อมลูกหมากเช่นกัน โดยอาจใช้ร่วมกับ anti-androgen agents หรือไม่ก็ได้ ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเช่นนี้จะรู้สึกว่าคุณภาพชีวิตดีขึ้น ซึ่งปัจจุบันมีหลักฐานแน่นอนแล้วว่าความทุเลาที่เกิดขึ้นเป็นผลจากฤทธิ์ของแอนโดรเจนลดลง จึงช่วยยืดอายุของผู้ป่วยได้ แม้ว่า neoplastic cells ยังไม่หมดไปอย่างสมบูรณ์ อาการข้างเคียงของยาคล้ายกับ antiandrogen agent อื่นๆ

3. สารที่มีฤทธิ์ต้านโปรเจสเตอโรน (anti-progestin agents) ได้แก่ mifepristone ซึ่งพบว่านอกจากใช้กระตุ้นการคลอดแล้ว ยังใช้รักษา endometriosis, leiomyomas, meningiomas และ มะเร็งเต้านมได้ จึงมีการพัฒนานุพันธ์ในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นหลายตัว

4. สารที่มีฤทธิ์โปรเจสเตอโรน (progestational agents) จัดเป็นยาเลือกอันดับสองในการรักษามะเร็งเต้านม ชนิด hormone-dependent ระยะแพร่กระจาย และมะเร็งเยื่อบุมดลูกที่ได้รับการผ่าตัดและฉายรังสีมาก่อน โปรเจสเตอโรนเมื่อให้ทางปากจะมี first-pass hepatic metabolism จึงใช้ไม่ค่อยได้ผล ต้องให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสมกับน้ำมัน ปัจจุบันจึงใช้ยาเตรียมที่เป็นสารสังเคราะห์ของโปรเจสเตอโรน ได้แก่ hydroxyprogesterone caproate ให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขนาด 1,000 มิลลิกรัม สัปดาห์ละครั้งหรือมากกว่า medroxyprogesterone acetate ให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขนาด 400-1,000 มิลลิกรัม สัปดาห์ละครั้ง หรือชนิดเม็ดได้แก่ megestrol acetate ให้ทางปากขนาดวันละ 40-320 มิลลิกรัม โดยแบ่งให้ และ medroxyprogesterone acetate ให้ทางปากขนาดวันละ 100-1,000 มิลลิกรัม โดยแบ่งให้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าใช้ได้ผลในมะเร็งต่อมลูกหมากและไตด้วย ยาเหล่านี้มี อาการข้างเคียงบางอย่างแตกต่างจากอาการข้างเคียงของโปรเจสเตอโรนธรรมชาติ ซึ่งในที่นี้ขอกล่าวถึง medroxyprogesterone acetate โดยละเอียดต่อไป

## Medroxyprogesterone Acetate (MPA)<sup>2-6</sup>

Medroxyprogesterone acetate หรือในชื่ออื่น ๆ ได้แก่ acetoxymethylprogesterone, methyl-acetoxypregesterone<sup>4</sup> มีชื่อทางเคมีว่า 6- $\alpha$ -methyl-17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์จากโปรเจสเตอโรนธรรมชาติ จัดเป็น progestogens หรือ progestins มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ medroxyprogesterone acetate

progestins แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีโครงสร้างประกอบด้วย 21 คาร์บอนอะตอมเช่นเดียวกับโปรเจสเตอโรน ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาก ได้แก่ megestrol acetate, chlormadinone acetate และ MPA เป็นต้น ซึ่งเป็น 17-esters ที่มีการดัดแปลงโครงสร้างในตำแหน่งที่ 6 ของ ring B จึงให้ทางปากได้ และกลุ่มที่มีกำเนิดจาก 19-nortestosterone ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงและยังมี androgenic activity ซึ่งถือเป็นอาการข้างเคียงของยาในกลุ่มนี้

## เภสัชจลนศาสตร์

ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic parameters) ของ MPA โดยประมาณ หลังจากให้ยาครั้งเดียวหรือหลายครั้งมีความแตกต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Mean (SD) Pharmacokinetic Parameters for Medroxyprogesterone Acetate (MPA)

Tablet Strength	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	Auc <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)	Vd/f (L)	CL/f (mL/min)
<b>Single Dose</b>						
2 × 10 mg	1.01 (0.599)	2.65(1.41)	6.95(3.39)	12.1 (3.49)	78,024 (47,220)	64,110 (42,662)
8 × 2.5 mg	0.805 (0.413)	2.22 (1.39)	5.62 (2.79)	11.6 (2.81)	62,748 (40,146)	74,123 (35,126)
<b>Multiple Dose</b>						
10 mg*	0.71 (0.35)	2.83 (1.83)	6.01 (3.16)	16.6 (15.0)	40,564 (38,256)	41,963 (38,402)

\*Following Day 7 dose

**การดูดซึม :** MPA ถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วจากทางเดินอาหาร ให้ความเข้มข้นสูงสุดใน 2-4 ชั่วโมงหลังรับประทานยา เมื่อให้ MPA ร่วมกับอาหารจะมี bioavailability เพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อให้ยาก่อนหรือหลังอาหารทันที จะมีค่า C<sub>max</sub> และ AUC เพิ่มขึ้น 50-70% และ 18-33% ตามลำดับ และค่าครึ่งชีวิตไม่เปลี่ยนแปลง

**การกระจายตัว :** MPA จับกับโปรตีนในเลือดประมาณ 90% โดยจับกับอัลบูมินเป็นส่วนใหญ่ และไม่จับกับ sex-hormone binding globulin

**การเปลี่ยนแปลง :** เมื่อให้ MPA ทางปาก ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ โดยกระบวนการ hydroxylation ตรงตำแหน่งของ ring A และ/หรือ

side chain ก่อน ตามด้วยกระบวนการ conjugation และขับออกทางปัสสาวะ ซึ่งพบ metabolite ได้ 16 ชนิด

**การขับถ่าย :** metabolite ส่วนใหญ่ของ MPA ขับออกทางปัสสาวะในรูป glucuronide conjugation และมีส่วนน้อยขับออกในรูป sulfates ในผู้ป่วยที่มี fatty liver จะมีค่าเฉลี่ยของยาที่ถูกขับออกใน 24 ชั่วโมงเป็น 7.3 และ 6.4% ของขนาดยาที่ให้ คือ 10 มก. และ 100 มก. ตามลำดับ

### กลไกการออกฤทธิ์

Progestins มีคุณสมบัติละลายในไขมัน จึงกระจายเข้าจับกับ progesterone receptor ในเซลล์ต่างๆได้อย่างอิสระ ซึ่ง progesterone receptor จะพบได้ทั้งระบบสืบพันธุ์เพศหญิง เต้านม และในระบบประสาทส่วนกลาง (รวมทั้งบริเวณ hypothalamus) และ pituitary แต่มักจะมีข้อจำกัดในการกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อมากกว่าเอสโตรเจนหรือ steroid hormone อื่นๆ

Progestins จะไปขัดขวางฤทธิ์ของเอสโตรเจน ที่กระตุ้นให้เกิด cell proliferation โดยอาจเกี่ยวข้องกับการทำให้ estrogen receptor ลดลง เพิ่มการเปลี่ยนแปลงเอสโตรเจนเฉพาะที่ทำได้ metabolite ที่มีฤทธิ์อ่อนลง หรือเหนี่ยวนำให้มี gene products ที่ไปต้านการตอบสนองของเซลล์ต่อเอสโตรเจน

ในสตรีที่มีเอสโตรเจนเพียงพอ เมื่อให้ MPA ทางปากหรือการฉีดในขนาดที่แนะนำ จะไปเปลี่ยน proliferative endometrium ให้เป็น secretory endometrium และยังมีฤทธิ์ androgenic และ anabolic ด้วย แต่ไม่มี estrogenic activity เมื่อให้ฉีด MPA จะยับยั้งการสร้าง gonadotropin ซึ่งมีผลป้องกัน follicular maturation และการตกไข่ แต่ไม่พบผลดังกล่าวเมื่อให้โดยการรับประทาน

### Carcinogenesis, Mutagenesis, Impairment of Fertility.

การให้ MPA ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นเวลานาน พบว่าทำให้เกิดเนื้องอกที่เต้านมใน beagle dogs แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าการกิน MPA จะทำให้เกิด carcinogenic

effect และ เมื่อทำการทดสอบ genetic toxicity ใน *in vitro* หรือ *in vivo* ไม่พบว่าเป็น mutagenic

MPA ในขนาดสูง (HD-MPA) จะมีผลให้เป็นหมัน (antifertility)

### ข้อบ่งใช้

สำหรับ HD-MPA มีข้อบ่งใช้เกี่ยวกับการรักษามะเร็ง คือ

1. มะเร็งชนิดที่เป็น hormone dependent เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งรังไข่
2. เพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับเคมีบำบัด ทำให้รับประทานอาหารเพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวและไขมันเพิ่ม สภาพร่างกายและจิตใจของผู้ป่วยดีขึ้น
3. มี myeloprotective effect ช่วยป้องกันการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด
4. บรรเทาอาการปวดกระดูกอันเนื่องมาจากมะเร็งที่แพร่กระจายไปที่กระดูก (bone metastases)

### ขนาดและวิธีการให้ยา<sup>6</sup>

ให้รับประทาน 100–1,000 มิลลิกรัมต่อวัน แล้วแต่ชนิดของโรคที่เป็น ซึ่งปกติจะให้ขนาดต่ำในมะเร็งเยื่อบุมดลูก และขนาดสูงในมะเร็งเต้านม บางครั้งอาจให้ร่วมกับเคมีบำบัด หรือรังสีรักษาก็ได้

### ข้อห้ามใช้

ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่แพ้ยานี้ หรือผู้ป่วยที่มีอาการทางหลอดเลือดและหัวใจ (thrombophlebitis, thromboembolic disorder) ดับกพร่องอย่างรุนแรง การแท้งที่เด็กเสียชีวิตในครรภ์ (missed abortion) ผู้ป่วยมะเร็งกระดูก (bone metastases) ที่มีภาวะแคลเซียมสูง และในผู้ที่ตั้งครรภ์

### คำเตือน

**ในผู้ที่ไตบกพร่อง :** ไม่ค่อยมีผลต่อ renal clearance ของ MPA เพราะยาถูกขับออกทางปัสสาวะ ในรูป glucuronide conjugation เป็นส่วนใหญ่

ในผู้ที่ตับบกพร่อง : MPA จะถูกเปลี่ยนแปลงลดลง ทำให้เกิดการสะสมของยามากขึ้น ดังนั้นจึงห้ามใช้ MPA ในผู้ป่วยโรคตับรุนแรง แต่ในรายที่ตับบกพร่องน้อยถึงปานกลาง อาจพิจารณาใช้ยาในขนาดต่ำหรือให้นานครั้งลงได้

### ปฏิกริยาต่อกันของยา

ระดับยาในเลือดอาจลดลง ถ้าใช้ยาร่วมกับยาปฏิชีวนะบางตัว (เช่น tetracycline, rifampicin) activated charcoal ยาระบายบางชนิด และ amino-glutethimide (ยารักษาเมะเร็ง) ซึ่งจะไปเพิ่ม clearance ของ MPA

### อาการข้างเคียง

ที่พบได้ไม่บ่อยมักเป็นอาการข้างเคียงที่คล้ายกับ progestins ได้แก่ breast tenderness galactorrhea เลือดออกทางช่องคลอด ประจำเดือนผิดปกติ ไม่มีประจำเดือน บวม น้ำหนักเปลี่ยนแปลง เมื่อกลับบริเวณช่องคลอดเปลี่ยนแปลง (อาจขึ้นขึ้น) cholestasis ตีขาน ผื่น และ psychic depression (เพราะทำให้ระดับ monoamine oxidase เพิ่มขึ้น) นอกจากนี้ อาจทำให้ระดับ HDL ลดลง

### ผลการศึกษาทางคลินิกในการใช้ HD-MPA ร่วมรักษาโรคมะเร็งต่าง ๆ

1. ปี ค.ศ.1986 Bonsignori M และคณะ<sup>7</sup> ประเทศอิตาลี ได้ทำการการศึกษาแบบ multicenter, randomised, controlled trial เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อระบบโลหิตจากการฉายรังสี ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด และมะเร็งอื่นๆ จำนวน 227 ราย ที่ได้รับ HD-MPA เปรียบเทียบกับยาหลอก โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 117 รายได้รับยา HD-MPA รับประทานครั้งละ 500 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน กลุ่มที่ 2 จำนวน 110 รายได้รับยาหลอก พบว่าอุบัติการณ์ของ leukopenia ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ได้รับ MPA จะต่ำกว่ากลุ่มยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.02$ )

ในแง่ของการตอบสนองต่อการรักษา พบว่ามะเร็งเต้านมที่ได้รับ HD-MPA จะเป็น 50% ในขณะที่กลุ่มยาหลอกจะเป็น 28% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.02$ ) นอกจากนี้ MPA ยังไม่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิด thrombosis ทั้งยังอาจช่วยยับยั้งการเกิด tumor-induced thrombophilia และมีผลดีในผู้ป่วยที่อ่อนแรง หรือเบื่ออาหารอันเป็นผลมาจากการให้เคมีบำบัด และยังช่วยให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น และระงับอาการปวดได้ด้วย

2. ปี ค.ศ. 1996 สุพัตรา แสงรุจิ<sup>8</sup> ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ได้ทำการการศึกษาแบบ randomised, non-comparative trial เพื่อเปรียบเทียบ myeloprotective effect และการทำให้น้ำหนักเพิ่มของ HD-MPA กับยาหลอก ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 2 และ 3 จำนวน 21 ราย ที่ได้รับการฉายรังสีตั้งแต่ มกราคม - ธันวาคม 1994 ( พ.ศ. 2537) แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 10 ราย ได้รับยา HD-MPA วันละ 1,000 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 2 จำนวน 11 รายได้รับยาหลอก ผู้ป่วยจะได้รับยา 2 สัปดาห์ ก่อนได้รับรังสีรักษา และให้ยาต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนกว่าการรักษาโดยใช้รังสีจะเสร็จสิ้น พบว่า ผู้ป่วยกลุ่ม HD-MPA จะมีน้ำหนักเพิ่ม 2.5 กิโลกรัม ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก จะมีน้ำหนักลด 1.4 มิลลิกรัม ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่า HD-MPA ทำให้ผู้ป่วยมีค่า hematocrit เพิ่มขึ้น 0.8% สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่า hematocrit ลดลง 3.0% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.025$ ) และ HD-MPA ทำให้ผู้ป่วยมี platelet เพิ่ม  $3.5 \times 10^9/L$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมมี platelet ลดลง  $82.9 \times 10^{10}/L$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ส่วนเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันอย่างชัดเจน

3. ปี ค.ศ. 1997 Neri B และคณะ<sup>9</sup> ภาควิชาอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยฟลอเรนซ์ ประเทศอิตาลี ได้ทำการการศึกษาแบบสุ่ม ในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆ หลายชนิด ที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และ/หรือการฉายรังสี จำนวน 279 ราย ระยะเวลาตั้งแต่

กุมภาพันธ์ 1993-มกราคม 1995 ( พ.ศ. 2538) โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับยา MPA ในรูปยาน้ำแขวนตะกอน วันละ 1,000 มิลลิกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับยา MPA พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดที่สามารถนำข้อมูลมาประเมิน ได้มีเพียง 246 ราย (กลุ่มแรกจำนวน 168 ราย และกลุ่มที่ 2 จำนวน 78 ราย) แบ่งเป็นชาย จำนวน 110 ราย และหญิงจำนวน 136 ราย มีอายุตั้งแต่ 30 ถึง 85 ปี (มัธยฐานเป็น 62 ปี) โดยผู้ป่วยในกลุ่มแรกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 3.16% และมีสภาพที่แสดงออกดีขึ้น ในขณะที่ผู้ป่วยในกลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักลดลง 3.12% ผลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็น ชัดว่า การให้ MPA ร่วมด้วยมีบทบาทสำคัญที่จะ ช่วยทุเลาอาการต่างๆ เช่น การเบื่ออาหาร หรือ การขาดสารอาหารต่างๆ ที่ยังกินอาหารได้ในปริมาณ ปกติแต่มีน้ำหนักตัวลดลงในผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะ ปานกลาง และระยะลุกลาม ที่ได้รับการรักษาด้วย เคมีบำบัด และ/หรือการฉายรังสี ทำให้มีคุณภาพ ชีวิตดีขึ้น

4. ปี ค.ศ. 2001 Focan C และคณะ<sup>10</sup> ประเทศเบลเยียม ได้ทำการปรับปรุงข้อมูลการศึกษา เดิมให้ทันสมัย โดยการศึกษาเดิมเมื่อ ปี ค.ศ. 1982 เป็นการศึกษาแบบ multicenter, randomised trial เพื่อเปรียบเทียบการฉายรังสีร่วมกับการใช้ HD-MPA เป็น hormone monotherapy กับการฉายรังสี ร่วมกับยาหลอก ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ระยะแรก จำนวน 516 ราย เป็นเวลา 6 เดือน และติดตามผลการรักษาต่อเป็นเวลาส่วนมาก 13 ปี โดยแยกผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็น node-positive (NP) จำนวน 270 ราย และ node-negative (NN) จำนวน 246 ราย พบว่าข้อที่ปรับปรุงใหม่ยืนยันผลการศึกษาเดิม คือ ผู้ป่วยกลุ่ม NN ที่ได้รับยา HD-MPA มีอัตราการรอดชีวิตโดย อาการไม่ทรุดลง (relapse-free survival : RFS) ดีขึ้นโดยไม่ขึ้นกับอายุของผู้ป่วย ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตรวม (overall survival : OAS) เพิ่มขึ้น ในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม NP ไม่พบความแตกต่างของ RFS และ OAS แต่ใน

ทางตรงข้ามกับผู้ป่วยกลุ่ม NN พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม NP ที่อายุมากกว่า 50 ปี ที่ได้รับยา HD-MPA จะมี RFS ดีกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี

5. ปี ค.ศ. 2004 Focan C และคณะ<sup>11</sup> ประเทศเบลเยียม ได้ทำการศึกษาแบบ randomized adjuvant trial เพื่อเปรียบเทียบการฉายรังสีร่วมกับการใช้ tamoxifen กับการฉายรังสีร่วมกับ HD-MPA ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแรกที่เป็น node-negative (NN) จำนวน 194 ราย โดยติดตามผลการรักษาเป็นเวลา 7 ปี (ตั้งแต่ธันวาคม 1990-ตุลาคม 1996) โดยแยกผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา tamoxifen รับประทานวันละ 20 มิลลิกรัมเป็นเวลา 5 ปี จำนวน 98 ราย และ ผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา HD-MPA รับประทานวันละ 1,000 มิลลิกรัมเป็นเวลา 9 เดือน จำนวน 96 ราย เมื่อติดตามการรักษาไปส่วนใหญ่เป็นเวลา 86 เดือน พบว่ามีผู้ป่วยอาการทรุดลง จำนวน 25 ราย และ เสียชีวิต จำนวน 13 ราย โดยมี RFS ในผู้ป่วยกลุ่ม ที่ได้รับยา tamoxifen และกลุ่มที่ได้รับยา HD-MPA เป็น 93% และ 81% ตามลำดับ ( $P = 0.02$ ) และ OAS น้อยลงในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี ( $P = 0.04$ )

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของ MPA ต่อ Bcl-2 expression ที่เป็น biomarker สำคัญ ใน endometrial precancers ซึ่งจะชี้แยกผู้ที่ตอบสนอง ต่อยาที่ให้ทางปากออกจากผู้ที่ไม่ตอบสนองได้<sup>12</sup>

## สรุป

HD-MPA เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการ รักษา มะเร็งชนิด hormone-dependent เนื่องจาก ยามีความปลอดภัยในการใช้ยา (high safety profile) ช่วยลดอาการพิษต่อระบบโลหิตจากการใช้รังสีรักษา มี myeloprotective effect ช่วยป้องกันการเกิดภาวะ เม็ดเลือดขาวต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด บรรเทา อาการปวดกระดูกอันเนื่องมาจากมะเร็งที่แพร่ กระจายไปที่กระดูก (bone metastases) นอกจากนี้ ยังมี anabolic effect จึงช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตแก่ ผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารได้มากขึ้น มี

น้ำหนักเพิ่มขึ้น และผู้ป่วยโรคมะเร็งมีความรู้สึกที่ดีขึ้นหลังจากได้รับยาเคมีบำบัด

# เอกสารอ้างอิง

1. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th ed., McGraw-Hill, New York, 1994. Chapters 309 to 311 and 317 to 328
2. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, et al. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 th. edition McGraw-Hill, New York. 2001
3. *Physicians' Desk Reference* 2001, 55<sup>th</sup> ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company, Inc., 2001
4. [Http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/print/druginfo/medmaster/a682470.html](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/print/druginfo/medmaster/a682470.html)
5. [Http://www.wdxcyber.com/nmood11.html](http://www.wdxcyber.com/nmood11.html)
6. Farlutal 500 mg. Tablet : Product package insert information
7. Bonsignori M, Rossi G, Sturba F, et al. Protective effect of high-dose medroxyprogesterone Acetate (HD-MPA) on hematological toxicity induced by chemotherapy for advanced solid tumors : a multicentric controlled trial *Chemoterapia* 1986 V(2): 134-9
8. Sangruchi S. The myeloprotective effect of high-dose medroxyprogesterone acetate (HD-MPA) in patients with carcinoma of the uterine cervix (stage II & III) treated by radiation. *J Med Assoc. Thai* 1996; 79 (7): 604-7
9. Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient : a multicentric cooperative study. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8 : 459-65
10. Focan C, Beauduin M, Salamon E, et al. Adjuvant high-dose medroxyprogesterone acetate for early breast cancer : 13 years update in multicentre randomized trial. *Br J Cancer* 2001; 85(1): 1-8
11. Focan C, Beauduin M, Majois F, et al. High-dose oral medroxyprogesterone acetate or tamoxifen as adjuvant hormone therapy for node-negative early-stage breast cancer: randomized trial with 7-year update *Clin breast cancer*. 2004 Jun; 5; (2)
12. Vereide AB, Kaino T, Sager G, et al. Bcl-2, BAX, and apoptosis in endometrial hyperplasia after high dose gestagen therapy. A comparison of responses in patients treated with intrauterine levonorgestrel and systemic medroxyprogesterone. *Gynecol Oncol*. 2005 Jun; 97(3): 740-50.

## MAJOR TOPICS IN IUPHAR-2006

Adverse Drug Reactions  
 Antiviral Agents  
 Behavioral Pharmacology  
 Cancer Chemotherapy  
 Cardiovascular Pharmacology  
 Cellular Pharmacology and Toxicology  
 Clinical Pharmacology  
 Developmental Pharmacology  
 Drug Metabolism and Disposition  
 Environmental Toxicology  
 Gastrointestinal Pharmacology  
 High Throughput Drug Screening  
 Immunopharmacology and Immunotoxicology  
 Integration of Modern and Traditional Medicines  
 Molecular Pharmacology and Toxicology  
 Neuropharmacology  
 New Drug Design and Development  
 Pharmacogenetics, Pharmacogenomics and Proteomics  
 Pharmacokinetics and Toxicokinetics  
 Pharmacology of Aging  
 Pharmacology of Natural Products  
 Potential New Drug Targets  
 Pulmonary Pharmacology  
 Receptor Structure and Function  
 Recombinant-DNA Derived Pharmaceuticals  
 Renal Pharmacology  
 Signal Transduction

### CONGRESS LANGUAGE

The congress working language will be English

### DATE AND VENUE

The congress will be held at Beijing International Convention Center in July 2-7, 2006.

### EXHIBITION AND POSTER DISPLAY

The congress offers excellent opportunities for medicine related enterprises to exhibit their products and achievements in the Convention Center.

### SATELLITE MEETINGS

Two satellite meetings in Shanghai and Xi'an are planned to organize before and after the congress. Details of the meetings will be provided in the second announcement.

### SOCIAL PROGRAM

Various social activities and tours for participants including accompanying persons will be organized during the congress, such as a tour to the Great Wall, the Ming Tombs and other enjoyable entertainment. Post-congress tours will also be arranged.

### HOTEL AND ACCOMMODATION

A block of rooms in the Hotel Kun-lun, the Great Wall Sheraton Hotel, the Continental Grand Hotel, the Cadiz Hotel, the Hua Du Hotel, etc will be reserved for participants.

### CONGRESS SECRETARIAT

1. Contact for academic issues:

Ms. Zhao Xiao-Dan

Chinese Pharmacological Society

1, Xian Nong Tan St.

Beijing 100050, China

Tel: +86(10)63165211

Fax: +86(10)63165211

E-mail: [zhxd@imm.ac.cn](mailto:zhxd@imm.ac.cn) <http://www.cnphars.org>

## DRUGS

---

### Cytarabine

Laddawan Senggunprai

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*

#### Abstract

Cytarabine is an effective chemotherapeutic agent for the treatment various form of leukemias, particularly acute myelogenous leukemia (AML). Action of cytarabine is dependent upon intracellular phosphorylation, via cytidine kinase, to its active metabolite cytosine arabinoside triphosphate (Ara-CTP), the nucleotide responsible for the inhibition of DNA polymerase and can be incorporated in place of normal substrate of DNA synthesis, dCTP. Generally cytarabine is used in combination with an anthracycline in the treatment of AML. These regimens induce high complete response rates in newly diagnosed AML patients. However, clinical outcome is unsatisfactory, as most of the patients will eventually relapse and often with resistant disease and poor response to subsequent therapy. Efforts to improve clinical outcome for refractory or relapsed AML patients have focused on developing more effective combinations of antineoplastic agents. Several studies have shown the achievement of significant progress in the treatment, for instance the combination of topoisomerase-I inhibitor, topotecan or irinotecan, with cytarabine. Moreover high dose cytarabine therapy (HDAC) has represented a major focus of interest in AML clinical research as post-remission treatment. Many studies have demonstrated that repetitive HDAC offers substantial advantage in terms of prolonged disease free survival duration and diminished cumulative incidence of relapse, especially in subtype t(8;21) and inv(16)/t(16;16) AML patients.

**Key words :** cytarabine, acute myelogenous leukemia, high dose cytarabine



## Cytarabine

ลัดดาวัลย์ เล็งกันไพร

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### บทคัดย่อ

ยา cytarabine เป็นยาเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด โดยเฉพาะ acute myelogenous leukemia (AML) การออกฤทธิ์ของ cytarabine ต้องอาศัยกระบวนการ phosphorylation ภายในเซลล์โดยเอนไซม์ cytidine kinase เพื่อให้เกิดเป็น active metabolite คือ cytosine arabinoside triphosphate (Ara-CTP) Ara-CTP สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase และสามารถแทรกตัวเข้าไปสลาย DNA ในกระบวนการสังเคราะห์ DNA แทนที่ dCTP ซึ่งเป็น normal substrate โดยปกติจะใช้ cytarabine ร่วมกับ anthracycline ในการรักษา AML ซึ่งให้ผลการรักษาที่ดีในระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามมักพบการเกิดการกลับเป็นซ้ำของโรคและการดื้อยาเกิดขึ้นในผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะเพิ่มผลสำเร็จในการรักษาผู้ป่วย AML โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (refractory AML) และผู้ที่กลับมามีอาการของโรคอีกภายหลังจากที่ได้รับการรักษาแล้ว (relapsed AML) โดยการนำมียาอื่นมาใช้ร่วมกับยา cytarabine ซึ่งหลายการศึกษาให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เช่นการนำ topotecan หรือ irinotecan ซึ่งออกฤทธิ์เป็น topoisomerase-I inhibitor มาใช้ร่วมกับ cytarabine นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยา cytarabine ในขนาดสูงในการรักษาในระยะ post-remission phase เพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำของโรค ผลการศึกษาพบว่าการใช้ยา cytarabine ในขนาดสูงโดยการให้ยาหลาย ๆ ครั้ง (repetitive) มีผลช่วยลดอัตราการเกิดการกลับเป็นซ้ำของโรคและเพิ่มระยะเวลาการมีชีวิตอยู่แบบปลอดโรค (disease free survival) ในผู้ป่วยได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วย AML subtype t(8;21) และ subtype inv(16)/t(16;16)

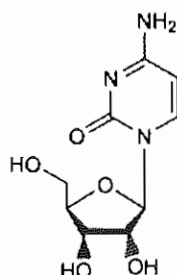
คำสำคัญ : cytarabine, acute myelogenous leukemia, high dose cytarabine

## Cytarabine

**Synonyms** Cytosine arabinoside, Ara-C, Arabinosylcytosine

### โครงสร้างทางเคมี

Cytarabine เป็นยาในกลุ่ม cytidine analogs มีชื่อทางเคมีคือ 4-amino-1- $\beta$ -D-arabino-furanosyl-2(1H)-pyrimidinone molecular formula คือ  $C_9H_{13}N_3O_5$



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ cytarabine

### กลไกการออกฤทธิ์

เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาบอลิซึมซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เกิดเป็นรูปที่สามารถออกฤทธิ์ได้คือ cytosine arabinoside triphosphate (Ara-CTP) โดยขั้นตอนในการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมนี้คือ cytarabine หรือ Ara-C ถูกเปลี่ยนเป็น 5'-monophosphate nucleotide (Ara-CMP) โดยการทำงานของเอนไซม์ deoxycytidine kinase จากนั้น Ara-CMP เกิดปฏิกิริยา phosphorylation โดยการทำงานของ nucleoside monophosphate kinase ได้เป็น Ara-CDP และตามด้วยการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation โดยเอนไซม์ nucleoside diphosphate kinase ได้เป็น Ara-CTP (รูปที่ 2)

Ara-CTP ซึ่งเป็น active form สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DNA โดยผ่านทางหลายกลไก ได้แก่

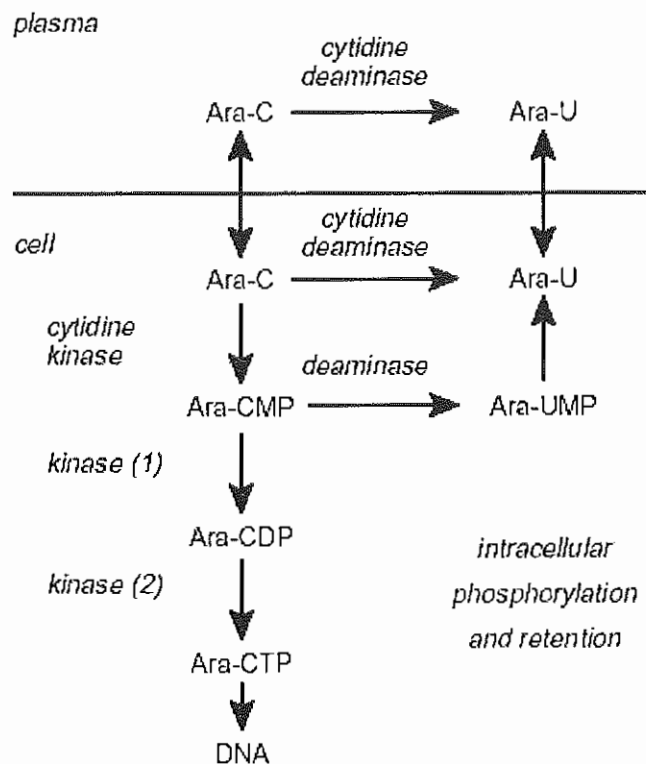
- ยับยั้งการทำงานของ  $\alpha$ -DNA polymerase แบบ competitive inhibition โดยการแย่ง normal substrate ในการสังเคราะห์ DNA ซึ่งคือ deoxycytidine-5'-triphosphate (dCTP) ในการจับกับเอนไซม์

- ยับยั้งกระบวนการซ่อมแซม DNA

- แทรกตัว (incorporate) เข้าไปใน DNA ซึ่งก่อให้เกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์สาย DNA เช่นเกิดการยับยั้งขั้นตอน chain elongation เป็นต้น ซึ่งเชื่อว่ากลไกนี้เป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญที่สุดของยา<sup>1, 2</sup>

### เภสัชจลนศาสตร์

Cytarabine ถูกทำลายได้ในทางเดินอาหาร เมื่อให้ยาแบบรับประทานสามารถดูดซึมได้ประมาณ 20% หรือน้อยกว่า เมื่อให้ยาแบบฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ยาจะมีการกระจายตัวไปทั่วร่างกาย และเกิดปฏิกิริยา deamination อย่างรวดเร็ว ภายในกระแสเลือดเกิดเป็น inactive deaminated product คือ arabinosyl uracil (Ara-U) หลังจากฉีดยาเข้าได้ผิวหนังหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อพบระดับยาสูงสุดในเลือดภายใน 20-60 นาที 80% ของยาถูกขับออกจากร่างกายภายใน 24 ชั่วโมง น้อยกว่า 10% ของยาถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง การให้ยาแบบ continuous infusion พบว่ามีระดับยาอยู่ใน cerebrospinal fluid (CSF) สูงกว่าการให้ยาแบบฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ยา cytarabine มีการกำจัดแบบ biphasic elimination มี initial half-life ประมาณ 10 นาที และมี terminal half-life ประมาณ 1.5-2.5 ชั่วโมง การฉีดยา liposome cytarabine ซึ่งเป็นรูปแบบยาออกฤทธิ์เน้นใช้สำหรับการรักษา lymphomatous meningitis เข้าในช่องเยื่อหุ้มไขสันหลัง (intrathecal) พบว่ามีระดับยาสูงสุดอยู่ใน lumbar sac และ ventricle ต่างๆ ภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากให้ยา และยา มี terminal half-life อยู่ยาวนานหลายวัน<sup>1, 3, 4</sup>



รูปที่ 2 Metabolic pathways of cytarabine<sup>5</sup>

### กลไกการเกิดการดื้อต่อยา cytarabine

มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายถึงกลไกการเกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งต่อยา cytarabine กลไกเหล่านี้ได้แก่

1. เซลล์มะเร็งขาดเอนไซม์ deoxycytidine kinase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน cytarabine ไปเป็น Ara-CMP จึงไม่มีการบวนการเมตาบอลิซึมให้เกิด Ara-CTP ซึ่งเป็น active product เกิดขึ้น

2. เซลล์มะเร็งมีการสร้าง dCTP เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่ม activity ของเอนไซม์ CTP synthase เมื่อมี dCTP เพิ่มมากขึ้นทำให้สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ Ara-CTP ต่อเอนไซม์  $\alpha$ -DNA polymerase ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์ DNA จึงสามารถดำเนินต่อไปได้

3. เซลล์มะเร็งมีการเพิ่ม activity ของเอนไซม์ cytidine deaminase ทำให้ cytarabine ถูก

เปลี่ยนเป็น inactive product Ara-U มากขึ้น

4. มีการลดความสามารถในการจับกับ DNA polymerase ของ Ara-CTP<sup>2,6</sup>

### ข้อบ่งใช้ทางคลินิก

Cytarabine เป็นยาสำหรับใช้ในการรักษาโรคมะเร็งของระบบเลือด (hematologic malignancies) หลายชนิดได้แก่

- Acute myelogenous leukemia
- Meningeal leukemia
- non-Hodgkin's lymphoma
- Acute lymphoblastic leukemia
- Chronic myelogenous leukemia

สำหรับใน solid tumors ต่างๆ พบว่ามักจะใช้ cytarabine ไม่ค่อยได้ผล โดยเฉพาะเมื่อให้ยาเพียงตัวเดียว<sup>4,6</sup>

## วิธีการบริหารยาและขนาดยาในการรักษา

ยา cytarabine injection มักนิยมให้แก่ผู้ป่วยด้วยวิธี IV infusion โดยการเจือจางยาด้วยสารละลาย 5% dextrose หรือ normal saline ปริมาณ 50 มิลลิลิตรหรือมากกว่า และระยะเวลาในการให้ยาคือ 30 นาทีขึ้นไป สำหรับยา cytarabine ในขนาดสูงควรนำยามาละลายในสารละลาย 5% dextrose หรือ normal saline ปริมาณ 250-500 มิลลิลิตร และให้ยาเป็นระยะเวลานาน 1-3 ชั่วโมง นอกจากการให้ยาโดยวิธี IV infusion แล้วยังสามารถให้ยาโดยวิธีการฉีดแบบ SC, intrathecally และ intraperitoneally สำหรับขนาดยาในการรักษาโดยทั่วไปของ cytarabine injection ได้แก่

- 60-200 mg/m<sup>2</sup>/day โดยวิธี continuous IV infusion 5-10 วันติดต่อกัน
- 100 mg/m<sup>2</sup> IV or SC วันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน โดยให้ยาทุก ๆ 28 วัน
- 10-30 mg/m<sup>2</sup> intrathecal 3 ครั้งต่อสัปดาห์
- 1,000-3,000 mg/m<sup>2</sup> IV over a period of 1 to 3 hours ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-6 วัน
- 10 mg/m<sup>2</sup> SC ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 15-21 วัน<sup>4</sup>

## อาการข้างเคียง

Cytarabine ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงในหลายระบบ<sup>2-5</sup> onset ของการเกิดอาการข้างเคียงต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

### 1. ระบบเลือด

Cytarabine มีฤทธิ์เป็น potent myelo-suppressive agent ทำให้เกิดอาการข้างเคียงได้แก่ leucopenia และ thrombocytopenia ซึ่งพบค่อนข้างบ่อย และพบภาวะโลหิตจางเกิดขึ้นบ้าง

พบ myelosuppression เกิดขึ้นภายใน 4-12 วัน หลังจากได้รับยา และสามารถ recovery ได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องติดตามผล blood count ของผู้ป่วยในระหว่างที่ได้รับยา cytarabine เสมอก่อนจะให้ยาใน course ต่อไป

### 2. ระบบทางเดินอาหาร

อาการข้างเคียงเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ซึ่งเป็นอาการที่สัมพันธ์กับขนาดยาที่ได้รับ และสามารถป้องกันได้ด้วยยาแก้ อาเจียน, เบื่ออาหาร, ท้องเสีย, metallic taste, ช่องปากอักเสบและเป็นแผล, กระเพาะอาหารอักเสบ, ตับอ่อนอักเสบ, แผลในช่องทางเดินอาหาร

### 3. ผิวหนัง

พบการเกิดอาการข้างเคียงทางผิวหนังได้บ่อย ซึ่งได้แก่ erythema, skin ulceration, alopecia, pruritis, urticaria และ cellulitis

### 4. ตับ

อาการข้างเคียงเกี่ยวกับตับได้แก่ การทำงานของตับผิดปกติ มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ในตับ และเกิดภาวะ hyperbilirubinemia

### 5. ระบบประสาท

ในผู้ที่ได้รับยา cytarabine ในขนาดสูงพบว่า มีอุบัติการณ์ของการเกิดอาการข้างเคียงทางระบบประสาทประมาณ 16%-40% อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นมักเกิดขึ้นกับสมองส่วน cerebellar ได้แก่ สับสน, ataxia, nystagmus, slurred speech เป็นต้น พบว่าอาการจะเกิดในช่วงวันที่ 4-5 ของการรักษา และจะค่อยๆ พ้นคืนในอีก 4-7 วันต่อมา แต่ในผู้ป่วยบางคนพบว่าอาการทางระบบประสาทไม่สามารถฟื้นคืนกลับมาได้ ความรุนแรงของอาการข้างเคียงทางระบบประสาทมีความสัมพันธ์กับขนาดยาที่ได้รับ อายุของผู้ป่วย เพศ การทำงานของตับและไต อาการข้างเคียงอื่นๆทางระบบประสาทที่พบน้อย ได้แก่ peripheral and sensory neuropathies, brachial plexopathy, bilateral rectus muscle palsy, parkinsonism, dizziness, seizures และ headache

### 6. ระบบหายใจ

อาการข้างเคียงเกี่ยวกับระบบหายใจได้แก่ respiratory distress syndrome, sore throat, esophageal ulceration, esophagitis, pulmonary edema

### 7. ระบบไหลเวียนเลือด

อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นได้แก่ cardiomegaly, pericarditis และ thrombophlebitis

## 8. ไต

อาการข้างเคียงที่พบได้แก่ urinary retention, hyperuricemia

## 9. ตา

ยา cytarabine ทำให้เกิดอาการข้างเคียงเกี่ยวกับตาได้แก่ conjunctivitis, keratitis ซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยการใช้ยาหยอดตา glucocorticoid และทำให้เกิด photophobia

## 10. อื่น ๆ

อาการข้างเคียงอื่นๆที่พบซึ่งเรียกว่า "Ara-C syndrome" ได้แก่ อาการปวดกระดูกและกล้ามเนื้อ, เจ็บหน้าอก, เป็นไข้, อ่อนเพลีย, ตาแดงและผื่นที่ผิวหนัง อาการเหล่านี้มักจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับยา

6-12 ชั่วโมงและตอบสนองต่อการรักษาด้วย corticosteroids

## ปฏิกิริยากับยาอื่น

1. การใช้ยา cytarabine ร่วมกับยาที่เป็นพิษต่อไต (nephrotoxic drugs) มีผลลดการกำจัด Ara-CTP ออกจากร่างกายทำให้เพิ่มโอกาสที่จะเกิดอาการพิษจากการใช้ cytarabine

2. Cytarabine มีผลลดการดูดซึมของ oral quinolones และ digoxin

3. Cytarabine มีผลลดประสิทธิภาพของยา flucytosine เนื่องจากยับยั้งการ uptake ยา flucytosine ของเซลล์<sup>4</sup>

ตารางที่ 1 Onset ของการเกิดอาการข้างเคียงจากการใช้ยา cytarabine<sup>4, 5, 7-14</sup>

Organ site	Side effect	Onset
Hematologic	Myelosuppression	E
Gastrointestinal	Nausea and vomiting	I
	Diarrhea	E
	Stomatitis	E
	Abdominal pain	E
Dermatology / skin	Rash	E
	Alopecia	E
Hepatic	Elevated liver function tests	E
	Hepatotoxicity	E
Central nervous system	Cerebellar toxicity	I to E
	Seizures	I
	Peripheral neuropathy	E
Respiratory	Respiratory distress syndrome	I
	Pulmonary edema	E
Ocular	Conjunctivitis	E
Reproductive	Infertility	L
Others	Ara-C syndrome	I
	Fever	I to E

I: immediate onset (hours to days), E: early onset (days to weeks), L: late onset (months to years)

## ผลการศึกษาทางคลินิก

### 1. การใช้ cytarabine ในผู้ป่วย acute myelogenous leukemia

Acute myelogenous leukemia หรือ acute myeloid leukemia (AML) หรือ acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) คือโรคมะเร็งทางระบบเลือดชนิดหนึ่งซึ่งพบ immature blood-forming cell จำนวนมากอยู่ในเลือดและไขกระดูก เซลล์เหล่านี้จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte และ monocyte ซึ่งจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมายเรียกว่า leukemic blasts แต่เป็นเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และรบกวนกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ที่ปกติ

Cytarabine เป็น first-line chemotherapeutic agent ในการรักษา AML ออกฤทธิ์เป็น S-phase specific drug โดยทั่วไปมักนำมาใช้ร่วมกับ anthracycline (daunorubicin hydrochloride หรือ idarubicin hydrochloride) นอกจากยา cytarabine จะถูกนำมาใช้เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็ง (remission) ซึ่งเป็นการให้ยาในช่วงแรกของการรักษาที่เรียกว่า induction regimen แล้ว ยา cytarabine ยังมีประสิทธิภาพดีในช่วงของ consolidation therapy ซึ่งเป็นการรักษาเพื่อกำจัด leukemic cell ที่ยังหลงเหลืออยู่และเพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำของโรค (relapse) และในช่วง maintenance therapy ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ายา cytarabine จะมีประสิทธิภาพดีแต่ปัญหาที่มักจะพบเสมอในการรักษาผู้ป่วยคือ การเกิด early disease recurrence และปัญหาการเกิดการดื้อต่อยา<sup>15-17</sup> จึงทำให้มีการศึกษาทางคลินิกหลายการศึกษาเกี่ยวกับการนำ cytarabine มาใช้ร่วมกับยาชนิดอื่นๆ ในการรักษา AML โดยเฉพาะ relapsed และ refractory AML ซึ่งมักจะได้ผลในการรักษาค่อนข้างต่ำ relapsed AML หมายถึงผู้ป่วยที่กลับมามีอาการของโรคอีกภายหลังจากการได้รับการรักษาแล้ว ส่วน refractory AML หมายถึงผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา การนำยามาใช้ร่วมกันนี้หวังผลเพื่อ

เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา เพิ่ม complete remission rate และลดอัตราการเกิดการดื้อต่อยาของเซลล์มะเร็ง

มีการศึกษาทางคลินิกในระยะ Phase I/II เสนอรายงานในปี 2004 ว่าได้ทำการศึกษาผลของการใช้ยา topotecan ซึ่งออกฤทธิ์เป็น topoisomerase-I inhibitor ร่วมกับ cytarabine ในผู้ป่วย relapsed or newly diagnosed myelodysplastic syndrome (MDS) และ chronic myelomonocytic leukemia (CMML) และ relapsed AML มีผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษา 21 คน (11 คนเป็น AML และ 10 คนเป็น MDS/CMML) ผู้ป่วยแต่ละคนได้รับการรักษาตาม regimen ดังนี้ 1.25 mg/m<sup>2</sup> topotecan โดยให้แบบ continuous intravenous infusion ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน และ 1.0 g/m<sup>2</sup> cytarabine โดยให้แบบ infusion เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน รอบของการให้ยาซ้ำคือ 28 วัน ผู้ป่วยได้รับการให้ยาซ้ำทั้งหมด 37 รอบ ผลการศึกษาพบว่า non-hematological side effect ที่พบมากที่สุดคือ อาการไอ ซึ่งพบในผู้ป่วย 17 ราย (89%) ไม่พบผู้ป่วยเสียชีวิตเนื่องจากอาการพิษจากยา แต่มีผู้ป่วย 2 รายเสียชีวิตภายใน 1 เดือนหลังเข้าร่วมในการศึกษาเนื่องจากการดำเนินไปของโรค ในการศึกษาพบ complete remission ในผู้ป่วย 7 ราย (33%) ซึ่งเป็นผู้ป่วย AML 4 ราย, พบ partial remission ในผู้ป่วย 8 ราย (38%), ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโรค 2 ราย (10%) และพบว่ามี การดำเนินไปของโรคเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย 4 ราย (19%) ผลสรุปค่า median remission duration ของผู้ป่วย AML อยู่ที่ 11 สัปดาห์ (2-49 สัปดาห์) และ survival time ของผู้ป่วยอยู่ที่ 32 สัปดาห์ (2-119 สัปดาห์) การศึกษานี้สรุปผลว่า topotecan สามารถนำมาใช้ร่วมกับ cytarabine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย AML และสามารถนำมาใช้ได้กับผู้ป่วยอายุ 60 ปีหรือมากกว่าเพราะค่อนข้างปลอดภัย<sup>18</sup>

ในปี 2005 มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยา irinotecan ซึ่งออกฤทธิ์เป็น topoisomerase-I inhibitor เช่นเดียวกับยา topotecan ถึงประสิทธิภาพในการนำมาใช้ร่วมกับ cytarabine ซึ่งก่อนที่จะมี

การศึกษาทางคลินิกคณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาแบบ *in vitro* ถึงผลของการใช้ยา irinotecan ร่วมกับ cytarabine ใน human AML cell line และพบว่ายา ทั้ง 2 ชนิดออกฤทธิ์เสริมกันในการกำจัดเซลล์มะเร็ง ในการศึกษาทางคลินิกได้มีการนำยา irinotecan มาใช้ร่วมกับ cytarabine ในผู้ป่วยที่เกิด refractory or relapsed AML หลังจากได้รับการรักษาด้วย high dose cytarabine และ anthracycline chemotherapy จำนวน 14 ราย ผู้ป่วยจะได้รับ irinotecan ในขนาดยา เริ่มต้นที่ 5 mg/m<sup>2</sup> แบบ intravenous infusion (over 90 min) วันละครึ่งเป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจาก ได้รับ irinotecan เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะได้รับ ยา cytarabine ในขนาด 1 g/m<sup>2</sup> intravenous infusion (over 60 min) ขนาดยาสูงสุดของ irinotecan คือ 30 mg/m<sup>2</sup> ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการ เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเพื่อทำการวิเคราะห์ pharmacokinetics และ pharmacodynamic effects ของยาด้วย ผลการศึกษาพบ complete remission ในผู้ป่วย 2 ราย การศึกษานี้สรุปผลว่า irinotecan สามารถนำมาใช้ร่วมกับ cytarabine ได้อย่างปลอดภัย และช่วยเสริมฤทธิ์กันในการรักษา relapsed or refractory AML<sup>19</sup>

มีอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานการศึกษาออกมา ในปี 2005 ถึงประสิทธิภาพในการนำมาใช้ร่วมกับ cytarabine เพื่อรักษา relapsed และ refractory AML คือ clofarabine หรือ 2-chloro-2'-fluoro-deoxy-9-beta-D-arabinofuranosyladenine ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม second generation nucleoside analog ยา clofarabine ออกฤทธิ์เป็น potent inhibitor of ribonucleotide reductase การศึกษานี้เป็นการศึกษา ทางคลินิกในระยะ phase I/II มีผู้ป่วยเข้าร่วมการ ศึกษา 32 ราย ขนาดยาที่ให้แก่ผู้ป่วยคือ clofarabine 40 mg/m<sup>2</sup> intravenous infusion (over 1 hr) และ หลังจากได้รับยา clofarabine 4 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะได้รับ cytarabine ขนาด 1 g/m<sup>2</sup> intravenous infusion (over 2 hr) ผู้ป่วยได้รับยาทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการศึกษาพบ complete remission ในผู้ป่วย 7 ราย (22%) และพบ complete remission with incomplete platelet recovery ในผู้ป่วย 5 ราย

(16%) ค่า overall response rate คือ 38% มีผู้ป่วย 3 รายที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา การศึกษานี้สรุป ผลว่า clofarabine มีผลช่วยเพิ่มการสะสมของ Ara-CTP ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของ cytarabine จึง มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา และสามารถให้ clofarabine ร่วมกับ cytarabine ได้อย่างปลอดภัย<sup>20</sup>

นอกจากการใช้ยา 2 ชนิดร่วมกันในการรักษา AML ยังมีการศึกษาแบบ multicenter phase III ซึ่ง รายงานในปี 2004 ทำการศึกษาผลของการใช้ยา 3 ชนิดร่วมกันในการรักษา AML ได้แก่ cladribine, daunorubicin และ cytarabine ในการศึกษาแบ่งกลุ่ม ผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 (n=200) ได้รับยา daunorubicin + cytarabine + cladribine และกลุ่มที่ 2 (n=200) ซึ่งได้รับยา daunorubicin + cytarabine ขนาดยาที่ได้รับและเวลาในการให้ยา สำหรับยาแต่ละตัวคือ daunorubicin เท่ากับ 60 mg/m<sup>2</sup>/day วันที่ 1-3, cytarabine เท่ากับ 200 mg/m<sup>2</sup>/day วันที่ 1-7 และ cladribine เท่ากับ 5 mg/m<sup>2</sup>/day ในวันที่ 1-5 ผลการศึกษาพบว่าใน กลุ่มที่ได้รับยา 3 ชนิดมี complete remission rate 64% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยา 2 ชนิดซึ่งมี complete remission เท่ากับ 47% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเกิดพิษจากยาเท่ากันในทั้งสองกลุ่ม ค่าความ น่าจะเป็นของการมีระยะเวลาของ 3-year leukemia-free survival (LFS) สำหรับผู้ป่วยกลุ่มแรกคือ 43% และสำหรับกลุ่มที่สองคือ 34% และในผู้ป่วยที่อายุ มากกว่า 40 ปีพบว่ากลุ่มผู้ได้รับยา 3 ชนิดมี LFS ที่สูงกว่ากลุ่มผู้ได้รับยา 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ การศึกษานี้สรุปว่าการใช้ยา cladribine ร่วมกับยา daunorubicin และ cytarabine ในการรักษา AML มีผลเพิ่ม complete remission rate และเพิ่ม survival ของผู้ป่วยได้<sup>21</sup>

## 2. การใช้ยา cytarabine ขนาดสูง (high dose cytarabine) ในการรักษา AML

การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา cytarabine และ anthracycline ในช่วง induction therapy ของ ผู้ป่วย AML ซึ่งมีอายุน้อยกว่า 60 ปี พบว่ามี complete remission rate 70-80% อย่างไรก็ตาม

ผู้ป่วยจะมีโอกาสเกิดการกลับเป็นซ้ำของโรคสูง ถ้าไม่ได้รับการรักษาต่อเนื่องในช่วง consolidation phase ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า post-remission therapy หรือการรักษาในช่วง consolidation phase มีความสำคัญอย่างมากในการรักษาผู้ป่วย AML<sup>22-24</sup> มีการศึกษาพบว่าการใช้ standard dose chemotherapy สำหรับ consolidation phase ทำให้ผู้ป่วย AML เพียง 25% ที่ยังคงสภาพ complete remission ไว้ได้<sup>25,26</sup> ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามที่จะใช้การรักษาแบบอื่นในช่วง post-remission เช่นการปลูกถ่ายไขกระดูก แต่เนื่องจากวิธีนี้สามารถใช้ได้ผลในผู้ป่วยอายุน้อยและยังมีข้อจำกัดอีกมาก จึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้มากนัก<sup>27,28</sup> อีกทางเลือกหนึ่งซึ่งมีผู้สนใจทำการศึกษาคือการใช้ high dose cytarabine (HDAC) ในการรักษาผู้ป่วย AML ในช่วง consolidation phase<sup>29-31</sup> ซึ่งหลายการศึกษาให้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองในการรักษาด้วย HDAC คือ cytogenetic subtype ของผู้ป่วย AML<sup>32</sup>

สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วย AML ออกเป็น subtype ต่างๆ ตามลักษณะความผิดปกติของยีนของเซลล์มะเร็ง (cytogenetic abnormality) ซึ่งการทราบ cytogenetic subtype ของผู้ป่วยมีประโยชน์ในการนำมาใช้คาดการณ์ในการตอบสนองต่อการรักษาและการดำเนินไปของโรคได้ cytogenetic subtype ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วย AML ได้แก่ subtype t(8;21)(q22;q22) คือกลุ่มผู้ป่วยที่เกิด reciprocal translocation ของยีนใน chromosome 8 และ 21 พบประมาณ 5-12% ของผู้ป่วย AML, subtype inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) คือกลุ่มที่มีการเกิด inversion และ translocation ของ chromosome 16 พบได้ประมาณ 10-12% ของ AML และมักพบในผู้ป่วยอายุน้อย, subtype t(15;17)(q22;q12) คือกลุ่มที่พบการ fusion ของ retinoic acid receptor alpha gene (RARA) บน chromosome 17 กับ PML gene บน chromosome 15 เกิดการฟอร์มเป็น PML/RARA gene และ subtype ที่เกิดความผิดปกติบน chromosome 11q23 พบประมาณ 5-6% ของผู้ป่วย AML<sup>33-37</sup> ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย HDAC คือ

subtype t(8;21)(q22;q22) และ inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)<sup>32</sup>

ในปี 1999 Byrd และคณะได้รายงานผลการศึกษาของ The Cancer and Leukemia Group B (CALGB) (กลุ่มผู้วิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับโรคมะเร็งในระดับนานาชาติ) ถึงผลการรักษาผู้ป่วย AML subtype t(8;21)(q22;q22) ที่อายุน้อยกว่า 60 ปีในช่วง consolidation therapy ด้วย one cycle HDAC เปรียบเทียบกับ repetitive cycle HDAC (3 cycle หรือมากกว่า) โดยในช่วง induction therapy ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาเหมือนกันและมี complete remission เกิดขึ้น ผู้เข้าร่วมในการศึกษามี 50 ราย มีผู้ป่วยที่ได้รับ 1 cycle HDAC จำนวน 29 รายและอีก 21 รายได้รับ  $\geq 3$  cycle HDAC ในกลุ่มที่ได้รับ 1 cycle HDAC จะได้รับยาใน cycle ต่อมาเป็น cyclophosphamide / etoposide และ mitoxantrone / diaziquone with or without filgrastim ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ  $\geq 3$  cycle HDAC มี 5-year disease-free survival และ overall survival แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม ผู้ป่วยที่ได้รับ 1 cycle HDAC ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 2

การศึกษานี้สรุปผลว่าผู้ป่วย AML subtype t(8;21)(q22;q22) ที่ได้รับการรักษาในช่วง post-remission หรือ consolidation therapy ด้วยการให้ยา HDAC ซ้ำในหลายๆ dose (repetitive HDAC) มี disease-free survival และ overall survival ดีกว่ากลุ่มผู้ป่วย subtype เดียวกันที่ได้รับ 1 cycle HDAC<sup>38</sup> นอกจากนี้รูปแบบการศึกษานี้ได้ถูกนำมาทำการศึกษาในผู้ป่วย AML subtype inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) ซึ่งรายงานผลการศึกษาในปี 2004 โดย Byrd และคณะ การศึกษานี้มีผู้เข้าร่วม 48 รายซึ่งมีอายุน้อยกว่า 60 ปี ผู้ป่วย 28 รายได้รับ 3-4 cycle HDAC และอีก 21 รายได้รับ 1 cycle HDAC ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ที่ได้รับ repetitive HDAC มี อัตราการเกิดเป็นซ้ำ (CIR; cumulative incidence of relapse) เท่ากับ 43% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มผู้ที่ได้รับ 1 cycle HDAC



ซึ่งมีค่าเท่ากับ 70% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า relapse-free survival (RFS) ในผู้ที่ได้รับ repetitive HDAC มีแนวโน้มที่จะมีค่าสูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามพบว่า overall survival ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน การวิเคราะห์ข้อมูลของ CIR และ RFS โดยใช้สถิติ survival analysis ตามวิธีของ Kaplan-Meier ได้ผลดังกราฟในรูปที่ 3 และ 4 การศึกษาครั้งนี้สรุปผลว่าการรักษาผู้ป่วย AML ในช่วง consolidation therapy ด้วยการใช้ repetitive HDAC สามารถลดอัตราการเกิดเป็นซ้ำและมีประสิทธิภาพดีกว่า regimen ที่ให้ HDAC เพียง 1 ครั้งและตามด้วย alternative therapy ที่ไม่มี cytarabine<sup>39</sup> ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้อง

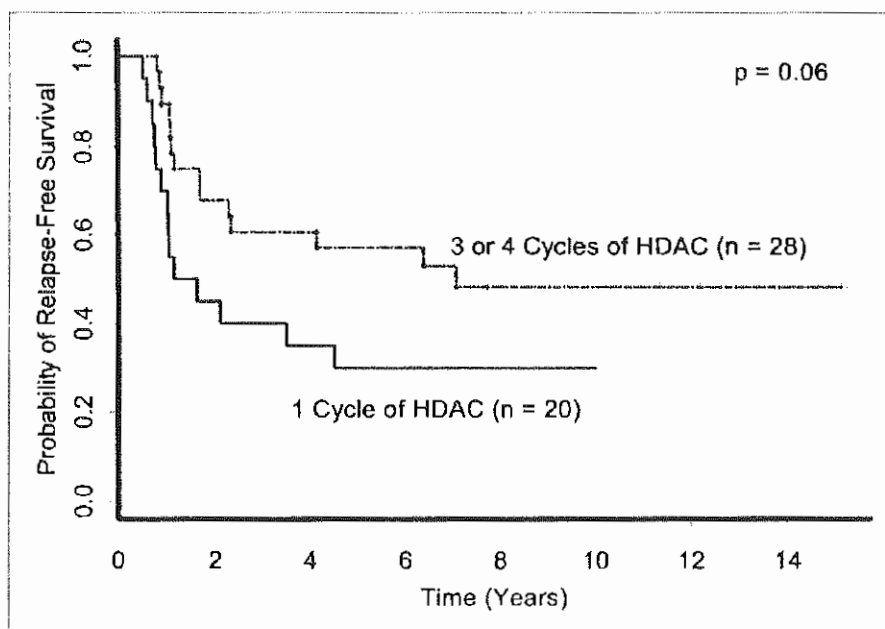
กับรายงานของ Tosi และคณะ<sup>40</sup> ที่กล่าวไว้ว่า inv(16)/t(16;16) blast cell มีความไวต่อ cytarabine เพิ่มมากขึ้นและ cytarabine เข้าสู่ DNA ของ blast cell ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Braess และคณะ<sup>41</sup> พบว่า leukemia blast ในผู้ป่วย inv(16)/t(16;16) AML มี high proliferation rate ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มการ uptake ยา cytarabine เข้าสู่ DNA และเซลล์มีความไวต่อยา cytarabine มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก cytarabine เป็นยาประเภท S-phase specific drug ออกฤทธิ์ได้ดีขณะที่เซลล์มีการสังเคราะห์ DNA เตรียมไว้สำหรับการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ยาชนิดอื่นทดแทน cytarabine ในการรักษาผู้ป่วย inv(16)/t(16;16) AML ได้

ตารางที่ 2 Treatment outcome of t(8;21)(q22;q22) patients by number of high dose cytarabine treatments<sup>38</sup>

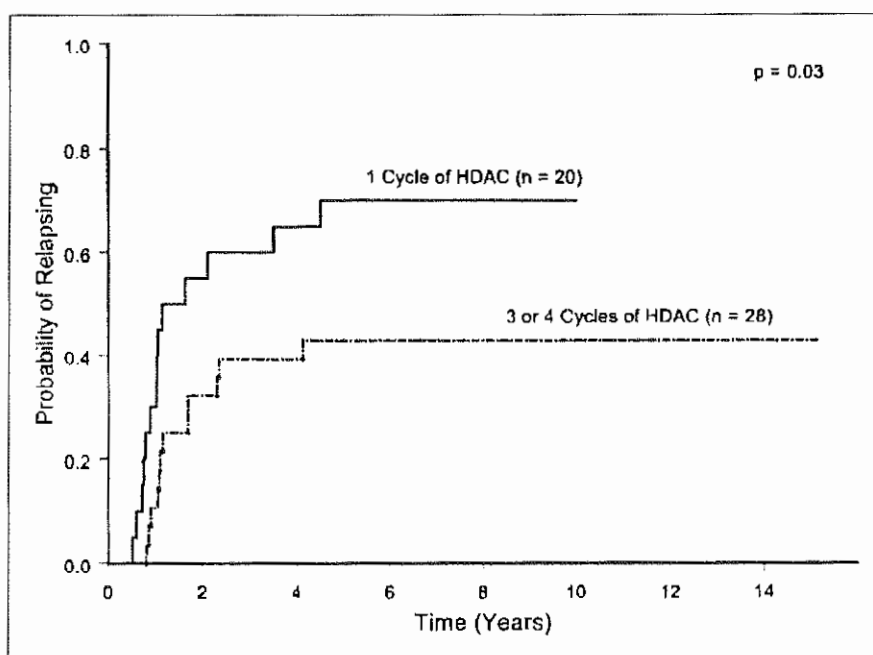
Treatment outcome measure	High dose cytarabine		p
	One cycle	≥ 3 cycles	
Patients with AML relapse			
Number	18	4	0.004
%	62	19	
Median remission duration (months)	10.5	>35	0.03
5-Year disease-free survival (%)	38	71	
95% confidence interval	19-62	44-89	
Median overall survival (months)	24.3	>43	0.04
5-Year overall survival (%)	44	76	
95% confidence interval	23-67	48-92	
Median follow-up (years)	4.7	5.6	

อย่างไรก็ตามการใช้ repetitive HDAC มีข้อจำกัดคือใช้ได้เฉพาะในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 60 ปี เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า การใช้ regimen นี้ในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปีทำให้เกิดอาการพิษต่อระบบประสาทที่รุนแรง<sup>42</sup> ด้วยเหตุนี้จึง

มีผู้รายงานการใช้ intermediate dose cytarabine ( $2 \times 1 \text{ g/m}^2$  IV day 1, 3 และ 5) สำหรับ consolidation therapy ในผู้ป่วยกลุ่มอายุมากกว่า 60 ปี ซึ่งเป็นขนาดยาที่ค่อนข้างปลอดภัยและได้ผลการรักษาที่ดี<sup>43</sup>



รูปที่ 3 ค่าความน่าจะเป็นของการเกิด relapse-free survival ในผู้ป่วยที่ได้รับ 1 cycle HDAC เปรียบเทียบกับ 3-4 cycle HDAC<sup>39</sup>



รูปที่ 4 ค่าความน่าจะเป็นของการเกิดการกลับเป็นซ้ำ (relapse) ในผู้ป่วยที่ได้รับ 1 cycle HDAC เปรียบเทียบกับ 3-4 cycle HDAC<sup>39</sup>

# Thai Journal of Pharmacology

## Instruction for Authors

The Thai Journal of Pharmacology serves as the official journal of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. The journal is designed to contribute to the publication of researches and information exchanges in the field of pharmacology and related fields. The manuscripts should not have been published before. Original full length scientific research papers, short communication, case report, letter to editor, minireviews, pharmacological digest and new drugs profile will be included in this journal.

### Manuscripts

Three copies of manuscripts, diskette(s) and illustration(s) are required. Manuscript of research articles should be written in English, the others can be either English or Thai. The preparation of the manuscript should be in the form of Microsoft Word (font: Times New Roman size 10). Pages should be numbered consecutively, including the title page.

Table and illustration should be numbered with Arabic figures consecutively in the order of first citation in the text and supply a brief title for each. Explain in footnotes all non-standard abbreviation that are used. Illustrations should be professionally drawn and photographed or produced on a laser printer.

Nomenclature should follow the recommendations of the International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), and the International Union for Biochemistry (IUB). All measurements must be in System International (SI) units.

### Research articles

The research papers should contain a) title, b) abstract, c) keywords, d) introduction, e) material and methods, f) result, g) discussion, h) references.

**The title page:** Should contain the title of the article, author(s) name and affiliation (s) laboratory or institute of origin and address. Name and complete address of author responsible for correspondence about the manuscript should be also placed at the foot of the title page. **An abstract** limited to approximately 250 words should be carried in this page. It should be informative and state concisely what was done, results obtained and conclusion. Three to ten **keywords** or short phrases appropriate for subject indexing should be typed at the bottom of abstract.

**Introduction:** State clearly the purpose of article, the rationale for the study or observation. Relevant previous study should be cited and do not review the subject extensively.

**Materials and Methods:** Describe the sufficient detail of the method, experimental subjects ( patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the method, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis). Give references to established method, study design and statistical method.

**Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Only important observations should be summarized and emphasized. Do not repeat in the text all the data in the table or illustrations.

**Discussion:** Comment on the results and integrate them with the existing knowledge and point out the field. Recommendation may also be included.

**Acknowledgment:** Persons, financial or technical helps which have contributed to the paper should be acknowledged in a paragraph.

**References:** Place the number references consecutively in the order in which they are first mention in the text. Use the style of the examples below:

### Examples

#### *Articles in journals*

- (1) Standard journal article (List all authors, but if the number exceeds three give three followed by et al)

You CH, Lee KY, Chen RY, et al. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, blotting and vomitting . *Gastroenterology* 1980; 79:311-4.

- (2) Organisation as author

The Royal Marsden Hospital Bone-marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

- (3) No author given

Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial). *BMJ* 1981;283-628.

- (4) Volume with supplement

Magni F, Borghi S, Berti F. BN-52021 protects guinea-pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 suppl 5:75-8.

- (5) Books and other monographs

#### 5.1 Personal author(s)

Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2<sup>nd</sup> rev ed. London: S Paul, 1986.

#### 5.2 Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York Springer-Verlag, 1988.

#### 5.3 Chapter in a book

Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, editors. *The Pharmacological basic of therapeutics*. 6<sup>th</sup> ed. New York: MacMillan Publishing, 1980:494-543.

#### 5.4 Conference proceedings

Vivian VL, editor. Child abuse and neglect: a medical community response. *Proceeding of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect*; 1984; Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association, 1985.

(6) Dissertation

Youseff NM. *School adjustment of children with congenital heart disease* (dissertation). Pittsburg (PA): Univ of Pittsburg, 1988.

(7) In press

Lillywhite HB, Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science*. In press.

## **Reviews**

All reviews are usually peer-reviewed. If the manuscript is written in Thai, English title and abstract are also required.

## **Short communication**

Short communication should contain new and unpublished results in a short form. It should not exceed 2 print pages and may contain one table and one illustration.

## **Manuscript submission**

All manuscripts are to be submitted to editor or associate editors, Thai Journal of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Chulalongkorn Hospital, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand. All paper are critically reviewed by the invited referees. Reviewers' comments are usually returned to the authors. The editorial board will decide upon the time of publication and retain the right to modify the style of contribution. However, major changes will be agreed with the authors. Authors will receive 25 reprints free.

## **Copyright**

The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand holds the copyright on all material appearing in the journal.



## สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

### ใบสมัครเข้าเป็นสมาชิก

เขียนที่ .....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

นาย

ข้าพเจ้า นาง ..... ชื่อสกุล.....

นางสาว

อาชีพ ..... ขอสมัครเข้าเป็นสมาชิกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย  
และขอรับรองว่า จะปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับของสมาคมทุกประการ

ข้าพเจ้ายินดีจะชำระค่าบำรุงสมาคมโดย

☐ เป็นรายปี ปีละ 200 บาทถ้วน

☐ ครั้งเดียว 1,000 บาทถ้วนสำหรับสมาชิกตลอดชีพ

ลงชื่อ .....

( )

---

เรียน

รศ.สมใจ นครชัย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนศรีอยุธยา

กทม. 10400

## ทะเบียนประวัติ

นาย

1. ชื่อ ..... นามสกุล.....

นางสาว

ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์ใหญ่) .....

2. เกิดวันที่ ..... เดือน..... พศ.....

3. ตำแหน่งหน้าที่หรือตำแหน่งทางวิชาการในปัจจุบัน .....

4. สถานที่ทำงาน

.....

.....

..... โทรศัพท์/ แฟกซ์ .....

e-mail address .....

5. ที่อยู่ปัจจุบัน

.....

.....

6. ประวัติการศึกษาชั้นอุดมศึกษา (เรียงลำดับจากวุฒิสูงสุด)

ปี พ.ศ.

ชื่อสถานศึกษา

วุฒิที่ได้รับ

.....

.....

.....

7. สาขาหรือแขนงวิชาที่สนใจหรือเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ

.....

.....

.....

.....

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วาระประจำปี พ.ศ. 2547-2549

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ภก.พลตรี สุนันท์ โรจนวิภาต  
ศ.ดร.อำนวย ถิฐาพันธ์  
รศ. พลตรี ดร.ทัศนัย สุริยจันทร์  
รศ.พญ.สุนา ชมพูทวีป  
รศ.น.สพ.พีระพล อยู่สวัสดิ์  
ผศ. นพ.ดร.วิทยา ตันสุวรรณนนท์

คณะกรรมการบริหาร

นายกสมาคม

ภก.รศ.ดร.ชัยชาญ แสงดี

อุปนายก

ภญ.รศ.ดร.ไชแสง โรจนสถาพร

ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม

ดร.อุดม จันทารักษ์ศรี

เลขาธิการ

ภญ.รศ.สุพัสชา วิทยเลิศปัญญา

ฝ่ายวิชาการ

ภญ.รศ.ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์

เหรียญก

ภญ.รศ.ดร.จงกล เทียงดาห์

ปฎิคม

รศ.พ.อ.ดร.บพิตร กลางกัลยา

นายทะเบียน

ภญ.รศ.สมใจ นครชัย

บรรณาธิการวารสาร

ภญ.รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

กรรมการกลาง

รศ.นพ.ประวิทย์ อัครเสรีนนท์

ผศ.ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม

ภญ.ผศ.ดร.ชวณี ทองโรจน์

ภญ.ผศ.ประภาวดี พัวไพโรจน์

ภญ.รศ.ดร.มยุรี ตันติสิระ

ผศ.นพ. วีรวัฒน์ มหัทธนะตระกูล

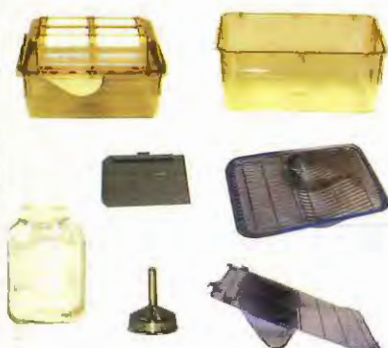


**HELP FROM SCIENTIFIC LEADERS FOR DRUG EARLY RESEARCH, PRECLINICAL DEVELOPMENT TO CLINICAL TRIALS**

- |  |  |
|--|--|
| <p><b>1. ANIMAL FORM</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CHARLES RIVER LABORATORIES</li> <li>- THE JACKSON LABORATORY</li> <li>- BIOLASCO TAIWAN CO., LTD.</li> </ul> | <p><b>2. TRANSGENIC MODELS</b></p> <p><b>3. PATHOLOGY SERVICE</b></p> <p><b>4. BIOANALYSIS SERVICE</b></p> |
|--|--|



**BioLASCO Taiwan Co., Ltd.**



**M.I.C.E.**  
Caging System for Rodent



**Allentown Caging Equipment Company**

Allentown Caging Equipment offers the finest in animal housing systems and accessories for the biomedical research industry.



**PLAS LABS™**  
Apparatus for Animal Research



**Laboratory Animal Bedding**  
Multiple Product for all Laboratory Applications

- Alpha Chip
- Aspen Chip
- Aspen & Shredded Aspen Shavings
- Beta Chip
- Coarse Grade Beta Chip
- Laboratory Grade Pine Shavings
- Irradiated Bedding
- Certified Bedding
- Corn Cob Shavings
- SoftZorb



**Animal Environmental**

**pharmaceutical** Control Products  
RESEARCH LABORATORIES, INC.

Pharmaceutical Research Laboratories has been the leading manufacturer and supplier of high quality sanitation products developed exclusively for the Laboratory Animal Science field. Our extensive chemical research and field testing offers the professional responsible for the animal environment, products that exceed industry standards for efficacy and safety.



**CLIDOX-S**

**COMPOUND : Chlorine dioxide based**

- |                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| - Urine Scale Removers | - Disinfectants           |
| - Specialty Chemicals  | - Antimicrobial Skin Care |
| - Monitoring Products  | - Alkaline Detergents     |

**Scientek™**  
Hospital and Laboratory Equipment

**Animal Research**

- Rack Washers
- Tunnel Washers Cage and Bottle Washers
- Bottle Filters
- Rack and Transfer Accessories



**KENT SCIENTIFIC**  
World Leader in Rat Tail Blood Pressure

**BRAINTREE SCIENTIFIC, INC.**

**popper®**

**HARVARD APPARATUS**  
A Harvard Bioscience Company

**Identification of Laboratory Animals**



**BioLASCO CO., LTD.**

2154/75 RUANGSIRI VILLAGE, BANGCHAK, PHRAKANONG, BANGKOK 10260 THAILAND

TEL. 66 (0) 2741-5031 (Rep.) FAX. 66 (0) 2741-5035

E-MAIL ADDRESS : <bio@lascothai.com>