Thai Journal of Pharmacology

www.phartherst.or.th

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Contents

Editorial

Letter to editors

Research articles

The effects of exogenous arachidonic acid on cyclooxygenase activity and isoforms expressed in endothelial cells

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

Reviews

Ascorbic acid and atherosclerosis

Return of the spironolactone

New drugs

Orlistat: A new antiobesity drug

Rilmenidine: The imidazoline-1 receptor agonist

Vitamin K_2 (Menatetrenone): A new drug for the treatment of osteoporosis

Pharmacological digest

Jan-Apr 2000, Vol. 22, No. 1 ISSN 0125-3832

Thai Journal of Pharmacology

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

Board of Editors

Editor Supatra Srichairat

Associate Editors Laddawal Phivthong-ngam

Pravit Akarasereenont

Suwat Wimolwattanapun

Website correspondent Nisamanee Satyapan

Editorial Board

Adisak Wongkajornsilp
Amnuay Thithapandha
Borpit Klangkalya
Chaicharn Sangdee
Chandhanee Itthipanichpong
Dhasanai Suriyachan
Kittima Sriwatanakul
Krongtong Yoovathaworn
Monthira Tankeyoon
Nisamanee Satyapan
Oranee Tangphao
Panya Khunawat
Pornpen Pramyothin
Prasan Dhumma-Upakorn
Prasert Songkittiguna
Sopit Thamaree
Srichan Pornjirasilp
Sumana Chompootaweep
Supeecha Wittayalertpanya
Surachai Unchern
Wittaya Tonsuwonnont
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 herein 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, Thailand.*

Thai Journal of Pharmacology

Vol. 22, No. 1, Jan- Apr 2000

CONTENTS

3 EDITORIAL

5 LETTER TO EDITORS

RESEARCH ARTICLES

11 The effects of exogenous arachidonic acid on cyclooxygenase activity and isoforms expressed in endothelial cells
D Plasen, P Akarasereenont, K Techatrisak, A Thaworn, S Chotewuttakorn

23 Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on rat hepatic drug metabolizing enzymes
S Lawanprasert1, P Kijsanayotin1, N Niwattisaiwong, T Kiatkosolkul1, M Tantisira, C Patarapanic

REVIEWS

33 Ascorbic acid and atherosclerosis
U Ketsawatsakul, P Akarasereenont

47 Return of the spironolactone
O Tangphao

NEW DRUGS

57 Orlistat: A new antiobesity drug
O Tangphao

67 Rilmenidine: The imidazoline-I receptor agonist
S Unchern

77 Vitamin K_2 (Menatetrenone): A new drug for the treatment of osteoporosis
S Jatupoomdecha and C Suthisisang

85 PHARMACOLOGICAL DIGEST

Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand
Executive Committee
2000-2001

Advisory Executive Committee	Amnuay Thithapandha
	Chavanee Tongroach
	Dhasanai Suriyachan
	Kanchana Ketsa-ard
	Methi Sanpanich
	Orapan Matungkasombat
	Pakdee Pothisiri
	Peerapol Euswas
	Prasan Dhumma-Upakorn
	Sumana Chompoothaweep
	Sunan Rojanavipat
	Udom Chantraraksri
	Wanee Taweesap
President	Borpit Klangkalya
Pre-president	Srichan Pornjirasilp
Vice president	Surachai Unchern
Secretary General	Orapin Ratanachan
Academy	Kittima Sriwattanakul
Treasurer	Nisamanee Sayapan
Hospitality	Pornthip Supavilai
Editors	Supatra Srichairat
Register	Supeecha Wittayalertpanya
Committee	Chaicharn Sangdee
	Laddawal Phivthong-ngam
	Mathirut Mungthin
	Prapawadee Puapairoj
	Pravit Akarasereenont
	Warungkana Chidchuangchai

Editorial

This issue should not certainly be published on time. I have no excuse for being late. As usual, every 2 years, change in the society executive committee had been set. The list of the new committee is customarily on the inside of the back cover. In the next 2 years, the Thai Journal of Pharmacology is still in our responsibility. Despite of a lot of duty, my energetic staffs are still very supportive and devoted their time for the journal. To be a media of our society's members and readers who are interesting in pharmacology. Although, the mission is so hard, your appreciation encourage us so much. That make us have to continue our task. We are keeping in creation of such new thing. Until now, you will see that our website (www.phartherst.or.th) looks more attractive. We would like to appreciate Col. Nisamanee Satyapan who has been the major role of this appearance. Much more attractive should be in the future. Any suggestion for extended service to our readers, whatever in the journal, website, and newsletter shall be valuable. Our main purpose is to be a marketplace of idea and research findings of our readers that are particular important.

Thanks for all questionaire that you sent back. Although not so many, with your compliment make us so happy. Many readers like the new drugs series. Conflicts of the likelihood of bias to the products were also mentioned. I wish to make it clear that these features were not be written without cited references. Such information is for professional only. Consideration, thinking and decision were their own business. Drug is not such a kind of normal consumer product. We want to see that drug presentation should be in academic manner and more details of them should be obtained. Drug monograph are written and cited from many research articles or clinical studies which were previously published. Changes in drug knowledge can be also happened all the time, however, it is our great pleasure to be a media of such information for you.

Supatra Srichairat

Editor

บรรณาธิการแถลง

ฉบับนี้คงออกล่ากว่ากำหนดเล็กน้อย ไม่มีข้อแก้ตัวอันใด แต่หวังว่าคงได้รับการให้อภัยจากผู้อ่าน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงคณะกรรมการบริหารสมาคมตามวาระทุก 2 ปี ขอให้ท่านดูรายนามคณะกรรมการได้จากปกหลังด้านในเหมือนเช่นเคย อย่างไรก็ตามในอีกสองปีข้างหน้าวารสารเภสัชวิทยาซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อกลางของสมาชิกสมาคมและผู้อ่านหลายท่านที่สนใจด้านเภสัชวิทยายังคงอยู่ในความรับผิดชอบของดิฉันและทีมงานที่ได้กรุณาสละเวลามาช่วยงานด้านวารสารเหมือนดั่งเคย ภาระนี้ออกจะหนักเนื่องจากแต่ละท่านก็มีภาระกิจกันมากมาย คำชมที่ได้มาเปรียบเสมือนเป็นกำลังใจและเป็นความผูกพันให้เราจำต้องกัดฟันทำกันต่อไป เราพยายามให้มีอะไรใหม่ๆออกมาอยู่เรื่อยๆ ขณะนี้จะเห็นได้ว่าเวบไซต์ของสมาคม (www.pharthers.or.th) มีหน้าตาและสีสรรสวยงามขึ้น ต้องขอขอบคุณ พอ.หญิง นิสามณี สัตยาบัน ที่มีส่วนอย่างมากในการช่วยให้ออกมาได้อย่างที่เห็น และคงจะดีขึ้นอีกต่อไป ถ้าท่านมีข้อเสนอแนะอย่างไรที่จะให้สื่อสัมพันธ์ของสมาคมที่มีต่อสมาชิก และผู้อ่านทุกท่าน ไม่ว่าจะเป็น วารสาร เวปไซท์ และจดหมายข่าวของสมาคมในอนาคตได้มีโอกาสรับใช้ท่านได้มากยิ่งขึ้น เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสนามให้นักวิชาการรุ่นใหม่ได้มีโอกาสแลกเปลี่ยนความรู้และอะไรก็ได้ที่ท่านสนใจ เรายินดีรับฟังและนำข้อเสนอแนะเข้าสู่คณะกรรมการบริหารสมาคม หรือผ่านมาทาง letter to editor

ขอขอบคุณทุกท่านที่ส่งแบบสอบถามกันกลับมา แม้จะไม่มากเท่าที่ควร แต่ก็เป็นคำชมชะส่วนใหญ่ ทำให้เราแอบดีใจ ส่วนใหญ่ชอบอ่านเรื่องยาใหม่ ที่เราเองก็ถูกประเมินด้านลบกลับมาด้วยว่าจะเอาใจบริษัทผู้มีส่วนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการจัดพิมพ์ด้วยหรือไม่ ขอแถลง ณ. ที่นี้เลยว่าทางกองบรรณาธิการจะเน้นเสมอกับผู้เขียนว่า สิ่งที่เราเขียนลงนั้นต้องมีรายงานการวิจัยสนับสนุนด้วย มิได้เขียนตามบริษัทกำหนดและที่สำคัญบทความนี้สำหรับผู้ประกอบวิชาชีพศิลปะเท่านั้น ท่านเหล่านี้พึงมีวิจารณญาณในการอ่านและคิดมิใช่สำหรับประชาชนทั่วไป เราอยากจะเห็นว่าการนำเสนอยาต้องมีวิชาการร่วมด้วยเสมอ ยามิใช่สินค้าทั่วๆไป ข้อมูลที่นำเสนอทุกด้านควรมีการอ้างอิงทางวิชาการซึ่งได้จากผลงานวิจัยที่ผ่านการตีพิมพ์แล้วให้มากที่สุด แน่นอนว่าจะยังคงมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เรายินดีเป็นสื่อกลางให้กับทุกหน่วยงานในการนำเสนอข้อเท็จ-จริงและการเปลี่ยนแปลงนั้น

สุพัตรา ศรีไชยรัตน์
บรรณาธิการ

LETTER TO EDITORS

Drug on electronic commercial, a new considerable aspect in pharmacology

To the editor,

Due to the advancement of information technology in the present day, internet takes an important part in all vocations, including Pharmacology. Internet supports the development of pharmacological knowledge in several aspects such as the source of electronic journal, questionnaire and telecommunication.

Many interesting Web Sites are produced to be the facility for the user. This information is valuable for development of pharmacological science in the present day. For the physicians, they can use the information via the internet to improve their new knowledge to meet the changing world.

But like all technology, advantage and limitation of the system can be described. Many applications of internet technology are widely discussed for their side effects. In this letter, the electronic commercial (E-commerce) is in discussion.

Electronic commercial is the new application of internet technology. Based on the Web site, consumers and providers can easily contact one another. The electronic code and password is only requirement for joining the system. Bussiness via the E-commerce system is the newest and world-wide group presently.

A lot of products are broadcast in the Web site for sale. Drug is also a product appeared on the Web Sites. This is one interesting senario for discussion. How proper about it ?

Although this method can provide much advantage especially for the drug manufacturer but the process is still in doubt.

Some problems can be expected for drug on the E-commerce system. Firstly, many control drugs such as Viagra can be found for sale on the Web Site. Due to the freedom in accessing the Web site, control is very difficult. Secondly, the process omits the important of the prescription, therefore, irrational use of drugs can be expected. Furthermore, privacy and security of the data is another point to be considered.

Although the drug on E-commerce is not widely presented in Thailand but it is expected recently due to globalization. Therefore, proper strategy to cope with this on going technology is necessary. Specific Act for control of drugs and other medical supplies on E-commerce must be set.

REFERENCES

1. Agthong S, Wiwanitkit V. Cyberspace and medical information. Chula Med J 1999 Jan; 43: 5-14.
2. Wiwanitkit V, Agthong S, Mongkolprasit N. Side effects of computer in medicine. Chula Med J 2000 (in press)

Viroj Wiwanitkit, M.D.
Department of Laboratory
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University

The impact factor for scientific journal

เรียน บรรณาธิการ

สืบเนื่องจากมีคำถามเข้ามายังผมว่า impact factor ของวารสารทางวิชาการนั้นคิดคำนวนมาได้อย่างไร ผมจึงขอให้ความกระจ่างดังต่อไปนี้

Impact factor ของวารสารเป็นตัวบ่งชี้ถึงความถี่ที่บทความในวารสารนั้นได้รับการนำไปอ้างอิงในปีนั้นๆ ดังนั้น Impact factor จึงอาจจะเปลี่ยนไปได้ในแต่ละปี ขึ้น

อยู่กับว่ามีผู้อ่านและนำเอาไปอ้างอิงมากน้อยเพียงใด วารสารที่มีค่า impact factor สูงๆ ก็ชี้ให้เห็นว่าเป็นวารสารที่มีคนนิยมอ่านและเป็นที่เชื่อถือมาก และที่สำคัญที่สุดของ impact factor ก็คือ ช่วยให้ผู้อ่านสามารถเปรียบเทียบวารสารทั้งหลายในสาขาวิชาเดียวกันได้ว่า อันไหนเป็นที่นิยมของคนอ่านในปีนั้นๆมากกว่ากัน

วารสารที่มี impact factor ต่ำก็ไม่ได้หมายความว่าเป็นวารสารที่ไม่ดี เป็นแต่เพียงว่ามีคนที่อ่านและนำเอาไปอ้างอิงในปีนั้นๆ น้อยเท่านั้น ก็คงจะคล้ายกันกับผลงานในวิทยานิพนธ์ที่ไม่ได้นำลงตีพิมพ์นั่นเอง ซึ่งจะมี impact factor เป็น "0" (ศูนย์)

Impact factor คำนวณหามาได้อย่างไร? ขอให้ดูตัวอย่างการคิด Impact factor ของ New England Journal of Medicine สำหรับของปี 1998 ดังต่อไปนี้

Example: New England Journal of Medicine

อ้างอิงในปี 1998 ของบทความที่ลงตีพิมพ์ใน

ปี 1997 = 9850 ครั้ง

ปี 1996 = 12648 ครั้ง

จำนวนบทความที่ลงตีพิมพ์ในวารสารนี้

ปี 1997 = 379 ครั้ง

ปี 1996 = 406 ครั้ง

ดังนั้น Impact factor (1998)

$$= \frac{9850 + 12648}{379 + 406}$$

$$= \frac{22498}{785}$$

$$= \underline{28.66}$$

ศ.ดร.อำนวย ถิฐาพันธ์
ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

เรื่อง คำเตือนและสถานการณ์ Prepulsid

เรียน บรรณาธิการ

บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก จำกัด ขออนุญาตเรียนชี้แจงให้ท่านทราบถึงเรื่องคำเตือนการใช้ Prepulsid (cisapride) และสถานการณ์ในสหรัฐอเมริกา ดังนี้

1) การจำกัดการใช้ Cisapride (Prepulsid) ในสหรัฐอเมริกา จาก FDA Talk Paper 23 มีนาคม 2543

มีการประกาศในสหรัฐอเมริกาว่า ยา Propulsid (ชื่อการค้าในประเทศไทยคือ Prepulsid) ชนิดเม็ดและยาน้ำแขวนตะกอน ซึ่งเป็นยาที่ต้องจ่ายโดยใบสั่งแพทย์ สำหรับ

รักษาผู้ใหญ่ที่มีอาการแสบหน้าอกตอนกลางคืนที่เกิดจากการที่อาหารและกรดไหลย้อนกลับขึ้นไปในหลอดอาหาร จะมีให้ใช้โดยผ่านโครงการ "การจำกัดการใช้ยา" เท่านั้น ยา Prepulsid ยังมีใช้ต่อไปในผู้ป่วยชาวสหรัฐผู้ซึ่งใช้ยาอื่นไม่ได้ผลและผู้ป่วยมีภาวะร่างกายตรงตามเงื่อนไขที่กำหนด

ทั้ง ๆ ที่มีความพยายามรณรงค์ให้ความรู้ความเข้าใจในการจ่ายยา Prepulsid ตามเอกสารกำกับยาฉบับล่าสุดให้ถูกต้องในสหรัฐ ก็ยังพบการใช้ยาที่ไม่ถูกต้องอยู่ ดังนั้น บริษัท แจนเซ่น ฟาร์มาซูติกา และองค์การอาหารและยาของสหรัฐ จึงออกมาตรการจำกัดการใช้ยา Prepulsid ในผู้ป่วย โดยผู้ป่วยที่มีสิทธิจะใช้ยาทุกคน จะต้องเข้าโครงการที่ชื่อว่า Limited access program ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการใช้ยาอย่างเหมาะสมเกิดขึ้นจริง

จากการประกาศดังกล่าวในสหรัฐ บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก ยังยืนยันต่อเจ้าหน้าที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, บุคลากรทางการแพทย์, และผู้ป่วยทั่วโลกว่าเมื่อใช้ยาตามคำแนะนำในเอกสารกำกับยา Prepulsid ยังมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพดีในการรักษาผู้ป่วยที่มีปัญหาทางเดินอาหารเคลื่อนไหวผิดปกติ มาตรการที่ใช้ในสหรัฐ ณ ขณะนี้ เป็นมาตรการที่ใช้แก้ไขภาวะการที่เกิดขึ้นเฉพาะในประเทศสหรัฐเท่านั้น ในขณะที่ประเทศอื่นทั่วโลก มีข้อบ่งใช้, วิธีการรักษา, และรูปแบบการใช้ยาที่แตกต่างกันออกไป

บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก ยังคงดำเนินการติดตามการใช้ยา Prepulsid ในประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก, แก้ไขเปลี่ยนแปลงเอกสารกำกับยาเมื่อได้รับข้อมูลใหม่ที่จำเป็นเข้ามา และยังรณรงค์ให้ความรู้ความเข้าใจการใช้ยาอย่างถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารกำกับยา แก่แพทย์, เภสัชกร, และผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง

อนึ่ง โครงการให้ความรู้การใช้ยาอาจแตกต่างกันในแต่ละประเทศ เนื่องจากต้องปรับเปลี่ยนให้สอดคล้องกับระเบียบอนุมัติของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ความแตกต่างในด้านข้อบ่งใช้ วิธีการรักษา และรูปแบบการใช้ อย่างไรก็ตาม ทุกโครงการจะมีวัตถุประสงค์เดียวกันคือจะทำให้แน่ใจว่ามีการใช้ยาอย่างถูกต้องเหมาะสม

ในช่วงระยะเวลากว่า 12 ปีที่ผ่านมา มีการใช้ยา Prepulsid มากกว่า 190 ล้านใบสั่งยา ในกว่า 90 ประเทศทั่วโลก ข้อบ่งใช้ทั่วไปคือ gastroesophageal reflux ทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก, functional dyspepsia, gastroparesis, intestinal pseudo-obstruction และ chronic constipation ผู้ป่วย GI Motility disorder จำนวนมาก ยังคงรับการรักษาด้วย Prepulsid ได้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิผลดี เมื่อใช้ตามคำแนะนำในเอกสารกำกับยา

2) สรุปคำเตือนการใช้ยา Prepulsid (cisapride) จากการแก้ไขเอกสารกำกับยา เมื่อ 24 มกราคม 2543

รายละเอียดทั้งหมดมีอยู่ในเอกสารกำกับยาที่แนบมานี้แล้ว แต่เพื่อให้ง่ายในการจดจำ ขอสรุปสั้น ๆ ดังต่อไปนี้

ก) ข้อห้ามใช้

- ห้ามในรายที่แพ้ยา
- ห้ามใช้ร่วมกับยาที่ยับยั้ง Cyt. P450 3A4 อย่างแรง
- ห้ามในผู้ป่วยที่มีประวัติ prolong QT
- ห้ามใช้ในเด็กที่คลอดก่อนกำหนด (< 36 สัปดาห์) โดยเฉพาะช่วง 3 เดือนแรกหลังคลอด

ข) คำเตือนและข้อควรระวัง

ผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงต่อไปนี้ควรตรวจ ECG, สารอิเล็คโตรไลท์ และการทำงานของไต ก่อนที่จะใช้ยา ได้แก่

- ผู้ป่วยโรคหัวใจที่มีโอกาสเกิดภาวะหัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ เช่น 2-3 AV block, Sinus node dysfunction, CHF, IHD, ผู้ป่วยที่มีประวัติญาติเกิด sudden death
- ผู้ป่วยโรคไตวาย (โดยเฉพาะกรณี on dialysis)
- ผู้ป่วยโรคปอด ได้แก่ COPD, respiratory failure
- ผู้ป่วยที่ขาดสมดุลย์อิเล็คโตรไลท์ เช่น ผู้ที่ใช้ K. wasting diuretics, insulin user in acute setting, ผู้ป่วยท้องเสียหรืออาเจียนเรื้อรังต่อเนื่องเป็นเวลานาน

ค) ปฏิกิริยาต่อกันของยาที่สำคัญ

กลุ่มยาที่ยับยั้ง CYP450 3A4 อย่างแรง ได้แก่

- Macrolide : erythromycin, clarithromycin
- Azole antifungal : fluconazole, itraconazole, ketoconazole
- HIV protease inhibitor : ritonavir, indinavir
- Nefazodone

กลุ่มยาที่ยืด QT interval ได้แก่

- Antiarrhythmic : quinidine, procainamide, amiodarone
- Antidepressant : amitriptyline, maprotilline
- Antipsychotic : pimozide, chropromazine
- Sparfloxacin

3. การรณรงค์การใช้ยาให้ถูกต้อง ของบริษัทฯ ที่กำลังดำเนินการหรือดำเนินการไปแล้วในขณะนี้

- การแก้ไขคำเตือนในเอกสารกำกับยาในเดือนมกราคม 2543
- จัดพิมพ์เอกสารกำกับยาตามที่ได้รับอนุญาตและนำบรรจุในกล่องยาภายในเดือนมีนาคม 2543
- จัดส่งจดหมายข่าวเรื่องคำเตือนการใช้ยา Prepulsid ให้แพทย์ 22,000 ฉบับ (ผ่านแพทยสภาฯ) และเภสัชกร 13,000 ฉบับ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม ที่ผ่านมา
- การอบรมผู้แทนขายทั้งในกรุงเทพและต่างจังหวัด ให้มีความรู้เรื่องคำเตือนการใช้ยา และกระตุ้นให้ออกพบแพทย์ผู้สั่งใช้ยาเพื่อแจ้งเรื่องคำเตือนดังกล่าว

- จัดทำ Slide เรื่องคำเตือนมอบให้
- ประกอบการสอนการบรรยายในหัวข้อที่เกี่ยวข้อง
- จัดทำ Reminding Card เรื่องคำเตือน เพื่อแจกจ่ายให้แพทย์ผู้สั่งใช้ยาติดไว้ในห้องตรวจโรคหรือเภสัชกรในห้องจ่ายยา
- กำลังติดต่อบรรณาธิการวารสารทางการแพทย์ให้ช่วยประชาสัมพันธ์เรื่องคำเตือนในวารสารทางการแพทย์ทั่วไป
- กำลังติดต่อประสานงานกับเจ้าของ website ในวงการแพทย์-เภสัชกร ให้มีการประชาสัมพันธ์เรื่องคำเตือนใน website ในทางการแพทย์ต่อไป
- ถึงแม้ว่าจากประสบการณ์การใช้ยา Prepulsid ในประเทศไทยกว่า 10 ปี จะไม่ได้พบรายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาขั้นรุนแรงเกิดขึ้นเลย และอุบัติการณ์รายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาขั้นรุนแรงที่รวบรวมไว้ที่สำนักงานใหญ่ขณะนี้ คิดเป็นอัตราที่อาจารย์แพทย์หรืออาจารย์เภสัช เพื่อใช้น้อยมาก บริษัทฯ เองก็ไม่ได้นิ่งนอนใจ แต่มีเจตนารมณ์แน่วแน่ที่จะสนับสนุนการรณรงค์การใช้ยา Prepulsid ให้ถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

1. FDA Talk Paper March 23, 2000 (http://www.fda.gov/bbs/topics/answers/ans01007.html)
2. บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก จำกัด จดหมายข่าวคำเตือนการใช้ Prepulsid 24 มกราคม 2543
3. บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก จำกัด เอกสารกำกับยา prepulsid

ภก. โอสถ เนระพูสี
ผู้จัดการเวชภัณฑ์อาวุโส
บริษัท แจนเซ่น-ซีแลก จำกัด

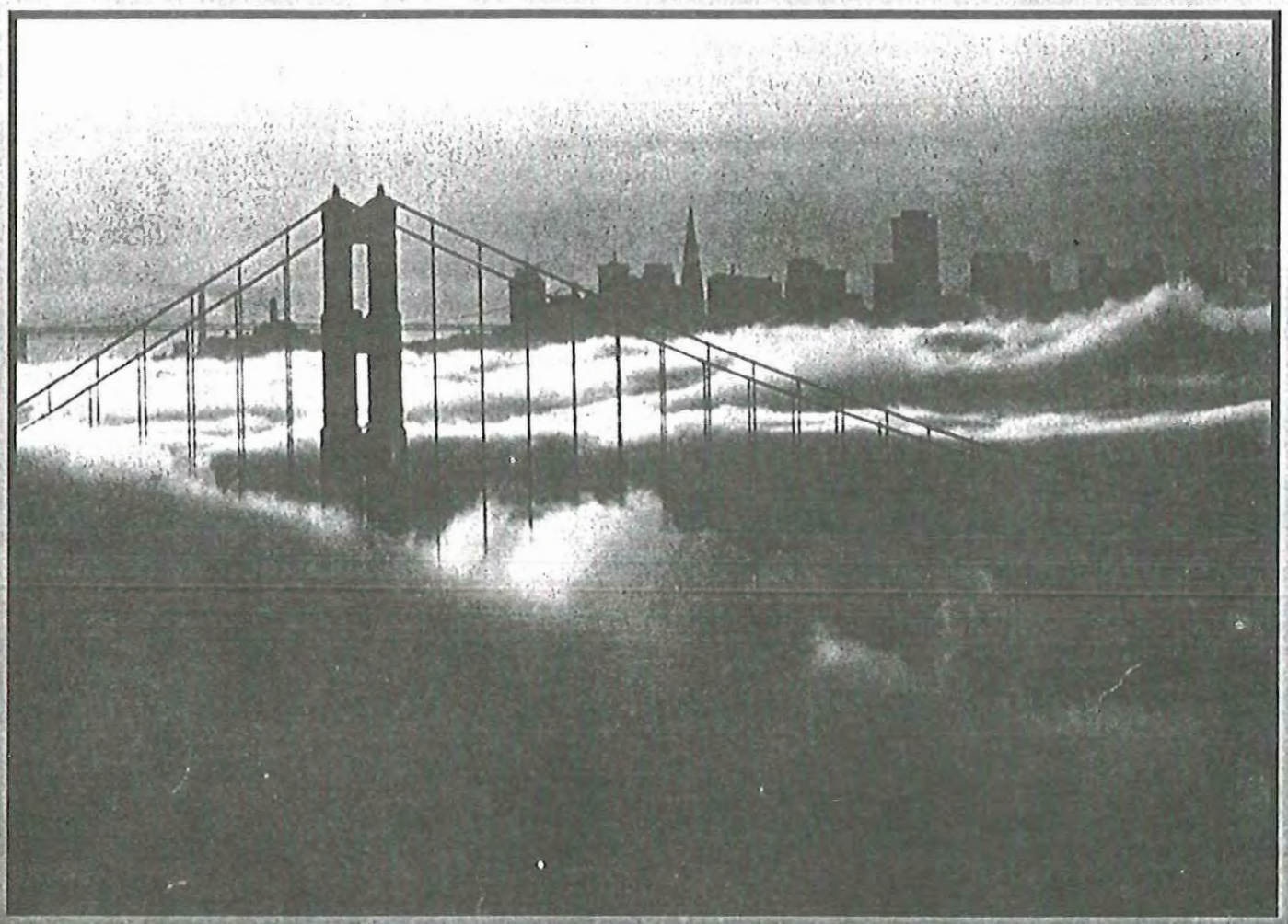
WORLD CONGRESS
IUPHAR 2002 SAN FRANCISCO

XIVth World Congress of Pharmacology

July 7-12, 2002

San Francisco, California USA

First Announcement



IUPHAR

AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS
1908-1998
ASPET
90th ANNIVERSARY

THE EFFECTS OF EXOGENOUS ARACHIDONIC ACID ON CYCLOOXYGENASE ACTIVITY AND ISOFORMS EXPRESSED IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

Duangporn Plasen[1], Pravit Akarasereenont[1], Kitirat Techatrisak[2], Athiwat Thaworn[1], Sirikul Chotewuttakorn[1]

[1]*Department of Pharmacology and* [2]*Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Bangkok 10700, THAILAND*

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) which exist as COX-1 and COX-2 isoform, is the first enzyme in the pathway in which arachidonic acid (AA) is converted to several prostaglandins (PGs) such as prostacyclin (PGI_2), PGE_2 and thromboxane (TX) A_2. AA is released from cell membrane (endogenous AA) by several agonists such as histamine, bradykinins, angiotensin, cytokines and growth factors, including shear stress. However, exogenous AA can directly activate PG synthesis via COX enzyme (COX activity). Here, we have investigated the effects of AA on COX activity and isoform expression in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). HUVEC was obtained from babies born to normal pregnancy and grown as standard technique. The cells were grown to confluent and replaced with fresh medium containing AA (0.1, 1, 10 and 20 μM). Cells were then incubated at 37°C under 5 % CO_2 concentration in the CO_2-incubator for variable periods of times (5, 10, 20, and 30 minutes). After which time, the release of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (a stable metabolite of PGI_2) in supernatant medium was measured by using enzyme immunoassay (EIA). The remained cells were extracted to detect COX protein expression using specific antibody to COX-1 and COX-2. The effects of AA on cell viability were also investigated using MTT assay. Neither various concentrations (0.1-20 μM) nor variable periods of times (5-30 min) of AA had any effects on cell viability. Control HUVEC without AA released undetectable amount of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (< 3 pg/ml). The incubation of exogenous AA (0.1-20 μM) in HUVEC can release significantly higher amount of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ which could be referred to activity of the COX enzyme. However, the release of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in AA activated HUVEC did not depend on incubation of AA when cells were incubated with AA up to 24 h. In our model study we found that the incubation of AA 10 μM for 10 min is the most appropriate concentration and time to determine COX activity in HUVEC. Moreover, AA did not effect on COX-1 protein which was constitutively expressed in HUVEC while COX-2 protein was undetectable in AA (10 μM) treated HUVEC for up to 24 h. Thus the increase release of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ from exogenous AA (10μM) was presumably due to the increase in COX activity but not from the increase amount of COX-1 or the induction of COX-2.

Key words: COX, PGs, endothelium, arachidonic acid

Address correspondence and reprint requests to: Duangporn Plasen, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, THAILAND. Tel: 4197569, 4115026

INTRODUCTION

Prostaglandins (PGs) have numerous cardiovascular and inflammatory effects[1-3]. They are not stored by cells but are rapidly synthesized prior to release by a variety of physiological and pharmacological stimuli[4]. Prostaglandin H synthase (PGHS) or cyclooxygenase (COX) is the key enzyme in the synthesis of PGs from arachidonic acid (AA)[5]. It is a membrane-bound, bifunctional enzyme that exhibits both cyclooxygenase and peroxidase activity[6]. AA is released from cell membrane (endogenous AA) by several agonists such as histamine[7], bradykinins[8], cytokines[9-10], and growth factors[11-12],.including shear stress[13]. However, exogenous AA can directly activate PG synthesis via COX enzyme (COX activity). Recently, two isoforms of COX that is encoded by different genes have been identified[14-16]. Type 1 PGHS (PGHS-1) or COX-1 is constitutively expressed in various mammalian cells and tissues[18], whereas type 2 is an immediate-early gene induced by a wide variety of stimuli including hormones, growth factors and cytokines[19-21]. PGI_2 is the major COX metabolite released from endothelial cells which participating in inflammation, atherosclerosis, thrombosis, etc.[22-23]. Endothelial cells can be activated by AA and its metabolites resulting in changed PGI_2 released[24-25]. PGI_2 inhibits platelet aggregation and thrombus formation as well as a potent vasodilator by causing relaxation in vascular smooth muscle cells[26]. It was shown that PGI_2 is mainly regulated by the activity of cyclooxygenase[27]. However, it is not known whether AA can regulate the isoforms of COX and their function in endothelial cells. The study of the effect of AA on COX isoform expression and function will be tool to study the regulation and signaling pathway of COX enzyme. This study will show such effect of AA on cultured endothelial cell by using human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)

MATERIALS AND METHODS

Materials

Unless otherwise indicated, all chemical reagents were obtained from Sigma. Human endothelium SFM medium and heat-activated fetal bovine serum (FBS) were purchased from GibCo (USA). COX-1 (ovine) electrophoresis standard, COX-2 (ovine) electrophoresis standard, COX-1 polyclonal antibody (rabbit antibody raised to purified sheep seminal vesicular COX 1), COX 2 (human) monoclonal antibody developed in mouse, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ acetylcholinesterase tracer, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ rabbit antiserum, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ standard, pre-coated mouse anti-rabbit microtiter plate and Ellman's reagent were obtained from Cayman Chemical (Australia). Phosphatase-label antibody to mouse IgG was from Kirkegaard & Perry Laboratories. Bio-Rad protein assay reagent, and nitrocellulose were purchased from Bio-Rad Laboratories.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) culture

Human umbilical vain endothelial cells were harvest from umbilical cords obtained at normal vaginal deliveries or Caesarian sections. The method originally described by Jeffe et al [28] with some modifications. Briefly, a sterile technique was utilized in all manipulations of the cord. Firstly, untraumatized umbilical cord was severed from placenta at least 20 cm length presently after birth, placed in a sterile container filled with normal saline and kept at 4°C. Within 24 h after storage, the umbilical vein was cannulated and perfused with phosphate buffer saline (PBS) (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 and 1.46 mM KH_2PO_4) pH 7.4 until all traces of blood was removed. The vein was then filled with trypsin-EDTA (0.5 % trypsin, 5.3 mM EDTA in PBS). After 10 min incubation at 37 °C, the content of the vein were gently flushed out with an equal volume of M199 (Sigma) and collected in a 50 ml falcon tube filled with FBS (1 ml of FBS for 10 ml of trypsin-EDTA). The tube was centrifuged at 1400 g for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in EC medium (Human endothelial SFM supplemented with 15 % FBS in addition of 100 μg / ml streptomycin and 100 IU of penicillin G). Cells were grown in T75 plastic flasks (Sarstedt), fed twice a weak and maintained at 37°C in a water-saturated atmosphere at 95 % air/5 % CO_2 until confluence. The confluent cells, then, were subcultured and grown in EC medium supplemented with 10 % FBS, 100 μg/ml streptomycin and 100 IU of penicillin G. Cells used in the studies were uniformly in the third passage.

Measurement of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ released in HUVEC

The second passage of cells was subcultured into 96-well culture plate (Falcon) and fed with the EC medium supplemented with 10 % FBS, 100 µg / ml streptomycin and 100 IU of penicillin G every 2-3 days until confluence. After removal of the growth medium, the monolayers of intact confluent EC (4 x 10^4 cells/well) were washed once with PBS, pH 7.4. Each well was then incubated with 200 µl of fresh EC medium containing 0.02 % vehicle (ethanol) as a control or AA at a concentration of 0.1, 1, 10 or 20 µM. The cells were incubated at 37°C in a water-saturated atmosphere under 95 % air/5 % CO_2 condition for 5, 10, 20, and 30 min. After selected incubation periods, the supernatant in 96 well were collected to measure 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (a stable metabolite of PGI_2 using EIA). Firstly, a microtiter plate pre-coated with mouse anti-rabbit monoclonal antibody was washed once with wash buffer (0.01 M phosphate buffer pH 7.4, 0.05% Tween 20). Then 100 µl of EIA buffer (1.0 M phosphate buffer, 133 g K_2HPO_4, 32.15 g KH_2PO_4 in 1 liter of ultra pure water containing 0.1 g % NaN_3, 23.4 g % NaCl, 0.37 g % tetrasodium EDTA and 1 g % bovine serum albumin) were added to non-specific-binding wells (NSB), and 50 µl to maximum-binding wells (B_0). Afterthat 50 µl of standard or sample were added to the assigned wells followed the 50 µl of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ acetylcholinesterase tracer in all wells except the blank (B) and the total-activity (TA). Finally, 50 µl of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ rabbit antiserum were added to all wells except B, TA and NSB. The plate was then incubated overnight at 4°C. After which time, the plate was washed with wash buffer. Then, 200 µl of Ellman's reagent and 5 µl of tracers were added to all wells and the TA wells, respectively. The plate was left standing at room temperature to develop color for 1 h and the absorbance was read at 415 nm by a microplate reader (BIO-RAD). The amount of % bound was calculated from OD of each well according to the formula: % BOUND = (S – aver NSB)/(aver B_0 – aver NSB). S, aver NSB, aver B_0 were referred to OD sample or standard, average of OD in NSB wells, average of OD in B_0 wells, respectively. The standards of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ used were 3.9-500 pg / ml. The amount of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in samples was calculated from fixed standard curve.

Measurement of the isoform of COX protein expressed in HUVEC

The third passage of confluent monolayer HUVEC in 6-well culture plate (1.2 x 10^6 cells/well) was used in this experiment. The cells were incubated with 1.5 ml of EC medium containing 0.02 % ethanol (vehicle) or 10 µM of AA at 37°C in water-saturated, 95 % air/ 5 % CO_2 incubation for 10 min, 3, 6, 12, 18 and 24 hrs. After which time the medium was discarded and cells were washed once with 2 ml of PBS, pH 7.4. Then 100 µl of extraction buffer (50mM Tris base; 10 mM EDTA; 1 % (V/V) TritonX-100; 0.57 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF); 1.5µ M pepstatin A and 2 µM leupeptin) was added to each well with gentle shaking. The crude cell lysate from each well was then pooled and kept in an Eppendorf tube at -40°C until further analysis for total protein and COX protein. The protein concentration in the cell lysate was measured using Bio-Rad protein assay reagent. Bovine serum albumin at concentration of 10-100 µg / ml in distilled water was used as standard. Ten µl of standard, diluted sample, or distilled water (blank) were pipetted into 96-well plate. Then, 200 µl of Bradford reagent diluted with distilled water at 1:4 were added. The plate was kept at room temperature for 5 min and measured for OD at 595 nm. All samples or standards were determined in triplicate and the average values were used for calculation. After protein concentration of cell were calculated, immuno blotting for COX protein was done by some modification of original method[29]. The crude cell lysate was boiled for 10 min in a ratio of 1:1 with gel loading buffer (Tris, 123.9 mM; SDS 4 % w/v, glycerol 20 % V/V; 2-mercaptoethanol, 10 % v/v and bromphenol blue, 0.2 %). Samples were centrifuged at 3,200 g for 1 min before being loaded at equal amount of total proteins on SDS-PAGE (separating gel, 7.5 %; stacking gel, 4 %) and subjected to electrophoresis (1.5 h at 70 V) with separating buffer (Tris base, 0.25 M; glycine, 0.192 M; SDS, 0.1 %). Following electrophoresis, the separated proteins were transformed to a nitrocellulose membrane (1 h at 408 A) using a transfer buffer consisting of 0.025 M Tris base, 0.192 M glycine and 20 % (V/V) methanol. After transferring to nitrocellulose, the blots were washed 6 times with wash buffer (10 mM Tris base, 100 mM NaCl and 0.1 % Tween 20) and blocked in blocking solution (5 % low-fat dry milk in wash buffer) for 1.5 h. After washing with the

wash buffer for 6 times, the blots were primed (1.5 h) with a selective antibody raised to ovine COX-1 developed in rabbits (primary antibody, dilution 1:1000 in wash buffer) or monoclonal antibody raised to COX-2 developed in mouse (primary antibody, dilution 1:1000 in wash buffer). The membranes were then washed 6 times with blocking solution and alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit antibody (secondary antibody for COX-1 detection; dilution 1:1000 in blocking solution) or phosphatase conjugated goat anti-mouse antibody (secondary antibody for COX-2 detection; dilution 1:5000 in blocking solution) were added. After 1.5h incubation at room temperature, the blots were washed 4 times with the wash buffer. Blots were visualizes using premixed solution containing 5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate (BCIP), 0.89 mM; nitro blue tetrazolium (NBT), 0.4 mM; Tris base, 100 mM; NaCl, 100 mM; and $MgCl_2$, 5 mM; (pH 9.5). The relative enzyme mass was estimated by densitometry using Image Master 1D software (Pharmacia Biotech) and expressed as densitometry unit per equal total loading proteins.

Measurement of cell viability

Cell respiration in mitochondria is one of indication of cell viability[30-31].To evaluate viability of cells 200 µl of 0.2 mg/ml 3-(4, 5 dimethylthiazol-2yl)2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) in EC medium was added to each well and incubated at 37°C for 1 h under water-saturated atmosphere with 95 % air/5 % CO_2. The medium was then removed and 100 µl of DMSO was added at each well to solubilize the cells. The extent of reduction of MTT to formazan in cells was quantitated by measurement of optical density at 595 nm using a microplate reader (BIO-RAD).

Statistical analysis

Triplicate wells were done at each experiment and at least three experiments were performed in the same manner on consecutive days. Statistical significance was determined by ANOVA or unpaired t-test. A p value of less than 0.05 was selected to denote statistical significance.

RESULTS

Effect of exogenous AA on 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ release from HUVEC

Incubation of HUVEC with EC medium up to 30 min produced slight release of PGI_2 (<3 pg/ml) which could not be precisely detected by EIA technique in this method. When AA at various concentrations were exogenous given and incubated at 37 °C for variable periods of time from 5 min to 30 min, it was found that the lowest concentration of AA used (0.1 µM) could increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ significantly from the control (Figure 1). However, 0.1 and 1 µM of AA could not produce significant difference in the release of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ($p>0.05$; Figure 1). 10 µM AA could increase the release of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ significantly from 1 µM AA ($p<0.05$; Figure 1), and further increased concentration of AA to 20 µM could augment the release of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ which was only significantly at 5min and 30-min incubation period ($p<0.05$; Figure 1A and 1D). Moreover, 10 min or 20 min incubation of AA did not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ level between the 10 µM AA and 20 µM AA groups ($p>0.1$; Figure 1B and 1C).

The incubation times were also compared with each other at the equal dose of AA. It appears that the incubation periods for 5 min up to 30 min could not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ release at 0.1 and 1 µM AA ($p>0.05$; Figure 2A and 2B). At 10 µM AA, 10 and 20 min incubation period gave higher release of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ which were significant difference from 5 min ($p<0.05$; Figure 2C). However, when the time was increased to 30 min the release was significantly decreased ($p<0.01$; Figure 2C). At 20 µM AA, 10 min incubation period increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ not quite significantly when compare with the 5-min group ($p = 0.05$; Figure 2D). Further increase the incubation time to 20 min or 30 min did not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ level from 10 min ($p>0.05$; Figure 2D).

Effect of exogenous AA on isoform of COX protein expressed in HUVEC

Untreated control HUVEC contained COX-1 protein but not COX-2 protein (Figure 3 and 4). However, very small amount of COX-2 protein could be detected in some batch of untreated HUVEC when compared to

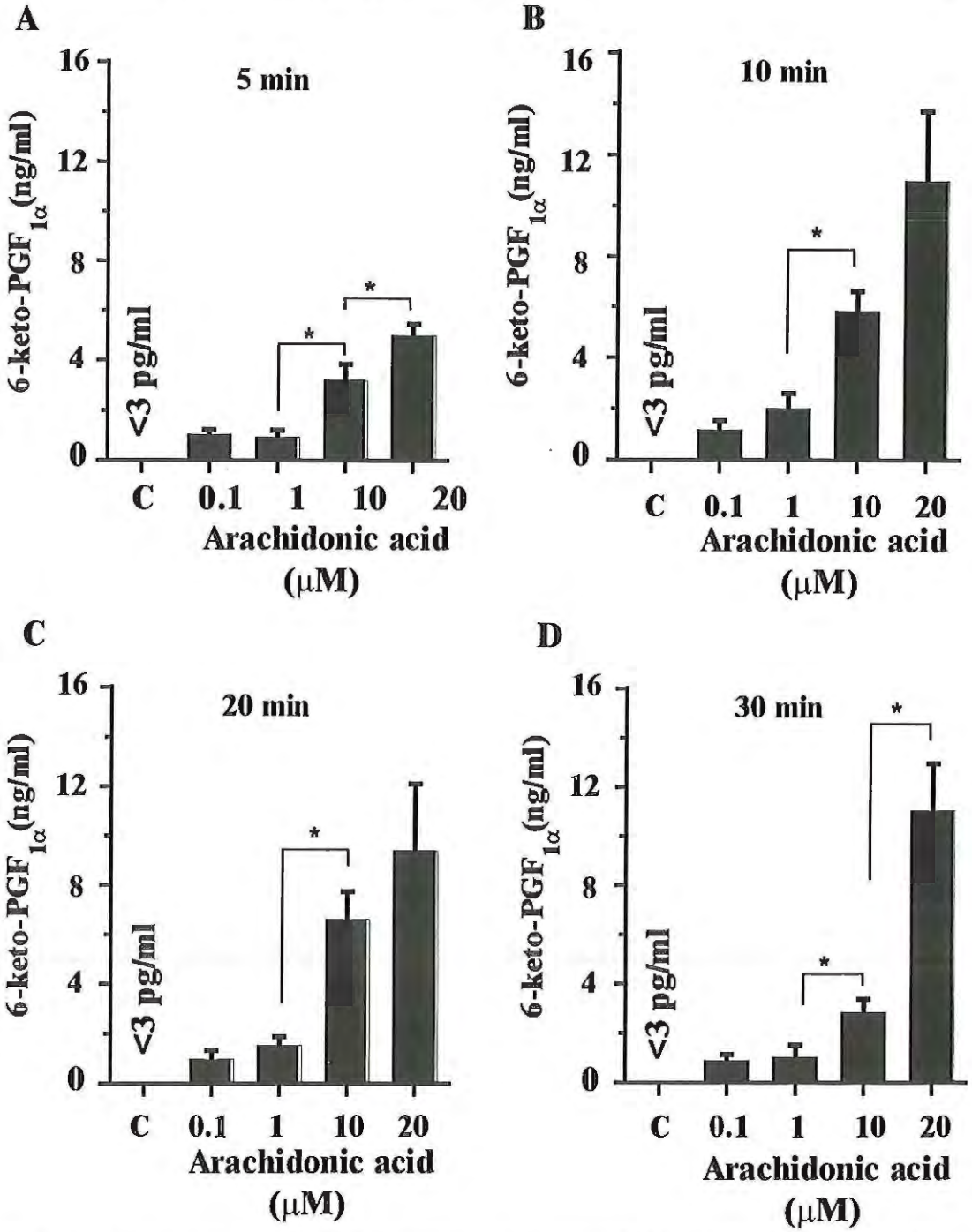


Figure 1 Dose dependent effects of exogenous arachidonic acid (AA; 0.1, 1, 10, 20 μM) on 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production in HUVEC after 5, 10, 20, or 30 min incubation of AA (panel A, B, C and D, respectively). A) The release was significant increase in dose dependent manner from 1-20 μM AA . 0.1 and 1 μM AA could not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production B) The release was significant increase in dose dependent manner from 1-10 μM AA 0.1 and 1 μM AA or 10 and 20 μM AA could not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$. C) The release was significant increase in dose dependent manner from 1-10 μM AA. 0.1 and 1 μM AA or 10 and 20 μM AA could not produce significant difference in 6-keto-PGF$_{1\alpha}$ production. D) The release was significant increase in dose dependent manner from 1-20 μM AA . 0.1 and 1 μM AA could not produce significant difference in 6-keto-PGF$_{1\alpha}$. Data are expressed as Mean ± SEM of triplicate wells from 3 separate experiments performed on different days. * $p < 0.05$ when compared to control untreated cells (C)

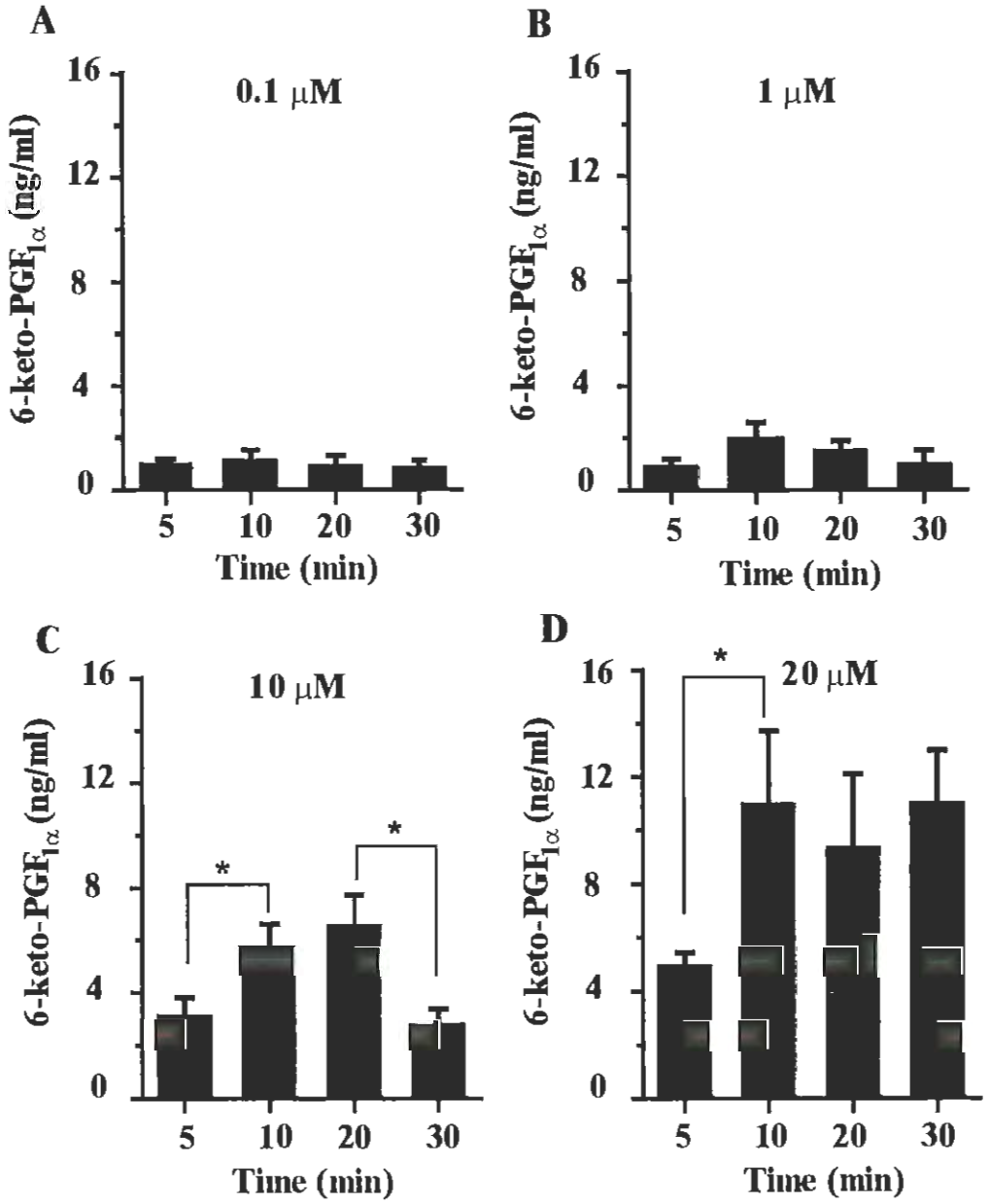


Figure 2 The effects of incubation times (5, 10, 20 or 30 min) of arachidonic acid (AA) on 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production in HUVEC after treatment with 0.1, 1, 10 or 20 μM AA (panel A, B, C and D respectively). A) Incubation of AA 0.1 μM for 5 min up to 30 min could not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ release. B) Incubation of AA 1 μM for 5 min up to 30 min could not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ release. C) 10 min incubation of AA 10 μM increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ significantly from 5 min. 20 min incubation of AA 10 μM did not produce significant difference in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production from 10 min incubation of AA 10 μM. 30 min incubation of AA 10 μM significantly decrease 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production from 20 min incubation of AA 10 μM. D) 10 min incubation of AA 20 μM increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ which was not quite significantly from 5 min incubation of AA 20 μM ($p=0.05$). 20 min or 30 min incubation of AA 20 μM could not increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ production from 10 min. Data are expressed as Mean ± SEM of triplicate wells from 3 separate experiments performed on different days. * $p < 0.05$ when compared to control untreated cells (C).

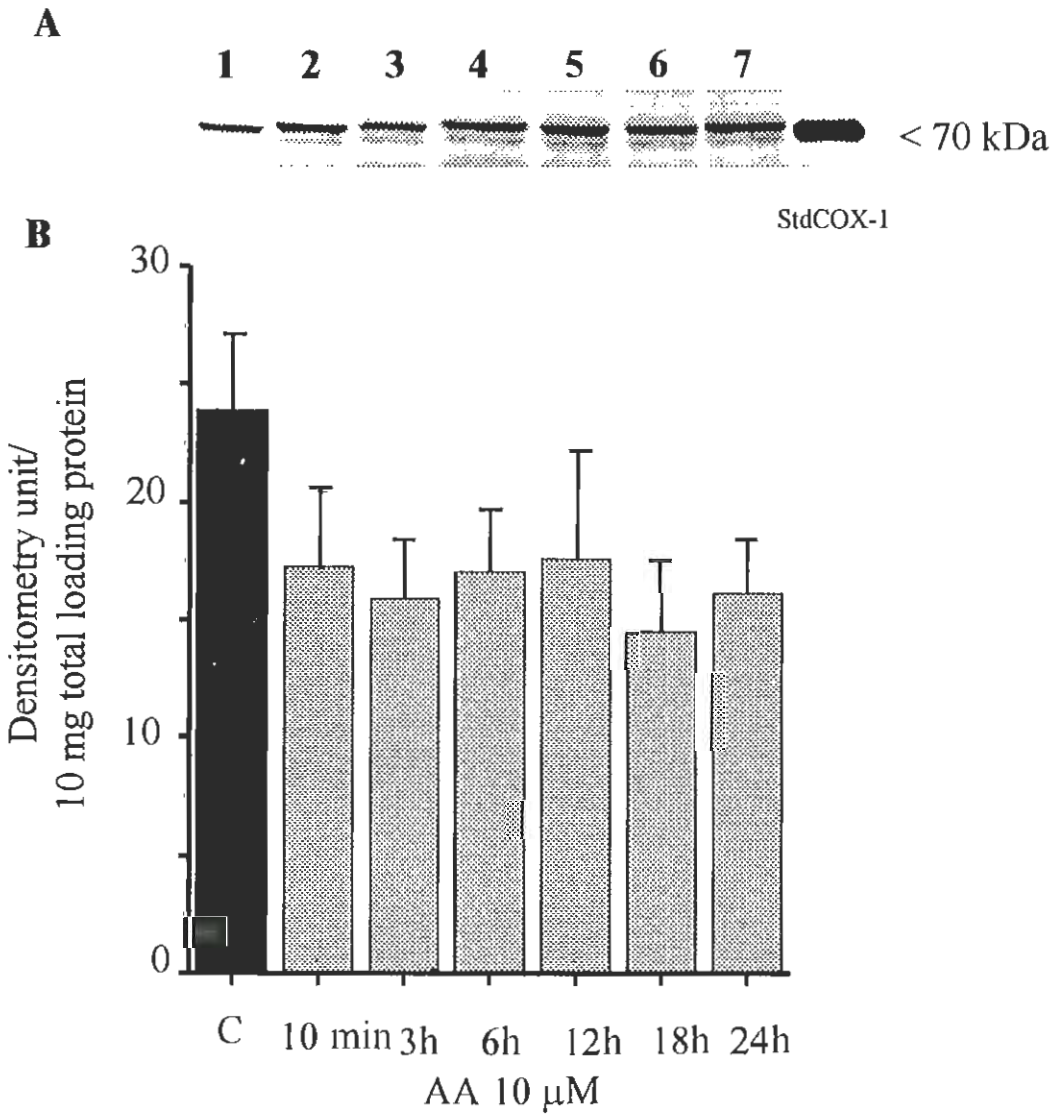


Figure 3 The effects of AA (10 μM) on COX-1 protein expressed in HUVEC at 10 min up to 24h incubation. A) shows representative Western blot from three independent experiments (lane1 to 7). B) shows Mean ± SEM of COX-1 protein amount estimated by densitometry from three separate experiments. Equal amounts of protein (10 μg/lane) were loaded in all lanes. Untreated control HUVEC (C); lan1 expressed COX-1 protein at 23.9 ± 3.2 densitometry unit/10 μg total loading protein. The amounts of COX-1 protein were not change significantly in 10 μM AA treatment for 10 min, 3, 6, 12, 18 or 24h (lane 2 to 7).

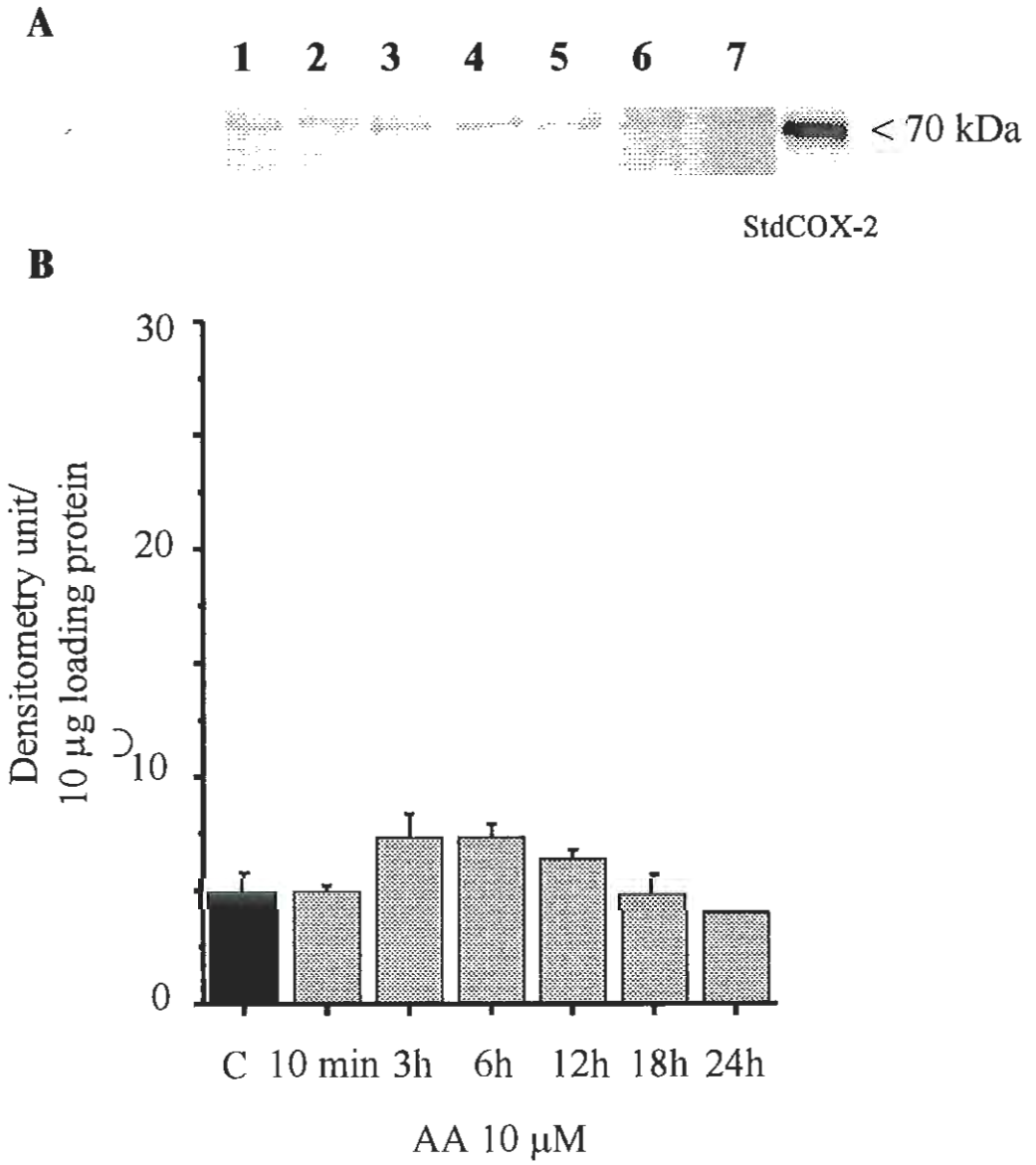


Figure 4 The effect of AA (10 µM) on COX-2 protein expressed in HUVEC at 10 min up to 24 h A) shows representative Western blot from three independent experiments (lane 1 to 7). B) shows Mean ± SEM of COX-2 protein amount estimated by densitometry from the three separate experiments. Equal amounts of protein (10 µg/lane) were loaded in all lanes. Untreated control HUVEC (C); lane 7 contained no COX-2 protein but could be detected very small amount of COX-2 protein in some batch (lane1) which was very low when compared to COX-1 in Figure 3 (4.97 ± 0.78 and 23.88 ± 3.2 densitometry unit/10 µg total loading protein respectively). Although COX-2 expression trend to increase after 3 h treatment (lane3 and 4) and decline to control level within 24 h (lane5 to 7), the difference between the control group and all of the treatment groups as shown were not significant difference ($p > 0.05$).

COX-1 protein (4.97 ± 0.78 and 23.88 ± 3.2 densitometry unit/10 μg total loading protein). The expression of COX-2 protein in small amount of untreated HUVEC was not changed when compared to the batch of undetectable COX-2 protein in untreated HUVEC. In AA (10 μM) treated HUVEC for up to 24 h, the amount of COX-1 protein was not changed significantly when compared to untreated HUVEC (Figure 3). For the batch of detectable small amount of COX-2 in untreated HUVEC, the amount of COX-2 protein was also not changed significantly when compared to untreated HUVEC (4.97 ± 0.78 densitometry unit/10 μg total loading protein in untreated HUVEC and 4.85 ± 0.15, 9.45 ± 2.22, 9.15 ± 1.84, 6.81 ± 0.47, 5.65 ± 0.88, 4.94 ± 0.91 densitometry unit/10 μg total loading protein at times 10 min, 3, 6, 12, 18 and 24 h respectively).

Effect of exogenous AA on cell viability

To assess whether AA was toxic to cell, cell respiration, which was an indicator of cell viability, was determined by mitochondrial dependent reduction of 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan[30-31]. The incubation of AA in HUVEC up to 20 μM for 30 min and up to 24h for 10 μM gave the high percentage of MTT reduction, which was not statistical difference from untreated control HUVEC (Table1 and 2).

Table 1 Cell viability of HUVEC when cells were treated with up to 20 μM and 30 min assessed by the ability of cells to reduce MTT to formazan. Data are expressed as MEAN ± SEM from triplicate wells performed on 3 separate experimental days (n = 9)

Time (mins)	% reduction				
	Control (medium only)	Arachidonic acid (μM)			
		0.1	1.0	10	20
5	100.0 ± 2.9	97.9 ± 4.6	96.1 ± 3.3	91.4 ± 3.4	93.4 ± 3.2
10	100.0 ± 2.2	99.7 ± 3.5	96.7 ± 2.6	95.0 ± 1.9	97.3 ± 3.0
20	100.0 ± 2.1	98.7 ± 2.6	94.7 ± 2.9	95.1 ± 2.0	98.1 ± 4.6
30	100.0 ± 2.7	99.6 ± 3.3	106.6± 6.7	95.4 ± 4.2	96.0 ± 4.5

Table 2 Cell viability of HUVEC assessed by the ability of cells to reduce MTT to formazan when cells were treated with AA 10 μM at times 10 mins, 3, 6, 12, 18, and 24 hrs. Data are expressed as MEAN ± SEM from tripicate wells performed on 3 separate experimental days (n=9)

Time	Control (%)	AA treated (%)
10 min	100.0 ± 1.9	92.4 ± 3.0
3 hrs	100.1 ± .2.4	92.0 ± 2.6
6 hrs	100.0 ± 1.2	107.0 ± 2.5
12 hrs	100.1 ± 1.0	93.4 ± 2.9
18 hrs	99.9 ± 1.0	95.8 ± 1.7
24 hrs	99.9 ± 2.0	100.4 ± 2.0

DISCUSSION

PGI_2 synthesis in human vascular tissue is mainly regulated by the cyclooxygenase enzyme[32]. Here we show that HUVEC in growth medium expresses COX-1, which is the constitutive isoform, while COX-2 protein was undetectable. However, very small amount of COX-2 can also be detected in some batches of the control group by this specific antibody. There is similar to previous reports which Wohlfeil E.R. and Campbell W.B.[33] and Barry O.P. et.al.[34] also found that untreated bovine coronary artery endothelial cells (BCAECs) and HUVEC can express small amount of COX-2 protein. Although COX-2 expression appeared in some batch of control HUVEC, the amount of protein was very low when compared to the COX-1 protein (4.97 ± 0.78 vs 23.89 ± 3.20 densitometry unit/10 μg total loading protein). Moreover, COX activity was not significantly different between the batch of undetectable and detectable small amount of COX-2 protein.

Incubation of HUVEC with EC medium up to 30 min released undetectable amount of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (< 3 pg/ml). From our results shown in Figure 1 and Figure 2 we found that exogenous AA at the concentration of 10 μM with 10 min incubation time is the most appropriate to study COX activity in HUVEC because (i) 10 μM AA produced adequate amount of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ which could be precisely detected by this EIA technique and the increased concentration of AA to 20 μM did not produce significant difference in 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ for all periods of incubation time except at 30 min (Figure 1). (ii) At lower level of AA (0.1 and 1 μM), incubation of AA for 5, 10, 20 or 30 min did not produce significant difference in 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ release (Figure 2A and Figure 2B) while incubation of 10 μM AA for 10 min could significantly increase 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ production from 5 min. Moreover at 10 μM AA, further increase in time (20 and 30 min) could not augment 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ production and appear to decrease at 30 min which was the reason why 10 μM AA produced significant difference in 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ level from 20 μM AA at 30 min (Figure 2C). (iii) At 20 μM AA, 10 min there was significantly increased 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ production from 5 min but further increase in time also produced significant difference in 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ level (Figure 2D).

Metabolism of AA in the vascular wall proceeds mainly by the cyclooxygenase pathway to PGs which a major product is PGI_2 (6-keto-$PGF_{1\alpha}$ is a stable hydrolyzed form of PGI_2). It was shown that activators, e.g. IL-1, histamine, thrombin, calcium ionophore or phorbol myristic acetate (PMA) can increase PGI_2 synthesis in endothelial cells[35-38]. Histamine, thrombin and calcium ionophore rapidly initiate PGI_2 production by stimulating release of AA, whereas, IL-1 and PMA is accompanied by elevated AA concentration and increased the expression of cyclooxygenase[35, 39]. It is unclear that elevated AA can contribute to the expression of COX-2 protein in HUVEC. Barry OP. et al [34] also found that AA in platelet microparticle can induce expression of COX-2 and prostacyclin production in HUVEC. Therefore, we have examined whether arachidonic acid (10 μM) altered COX protein expression when cells were incubated for up to 24 h. Figure 3 and 4 shows that AA (10 μM) treated HUVEC for up to 24 h neither changed COX-1 protein nor induced COX-2 protein expression. These suggested that elevated endogenous AA in some states could not contributed to the expression of either COX-1 or COX-2 protein. Thus, the increase in 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ production after incubation of HUVEC with 10 μM AA for 10 min was due to stimulation of COX activity (especially COX-1) without upregulation of either COX-1 or COX-2 protein.

The experiment was also evaluated the effect of AA at various concentrations and times of incubation on the viability of HUVEC. It was shown that AA at concentration up to 20 μM for 30 min and up to 24 h for 10 μM did not influence on respiration of cell when compared to the control. Thus, our study showed that incubation of HUVEC with AA 10 μM for 10 min was the most appropriate concentration and time to study COX activity in this cell type when EIA was used as measurable method.

REFERENCES

1. Vane JR. Prostaglandins and the cardiovascular system. *Br Heart J* 1983; 49: 405-409.
2. Peterson MB. Cardiovascular disease. In: Watkin WD, Peterson MB, Fletcher Jr, editors. *Prostaglandin in clinical practice*. New York: Raven Press, 1989: 21-24.
3. Zurier RB. Inframmatory diseases. In: Watkin WD, Peterson MB, Fletcher Jr, editors. *Prostaglandin in clinical practice*. New York: Raven Press, 1989: 79-96.
4. Bills TK, Smith JB, Silver MJ. Selective release of archidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. *J Clin Invest* 1977; 60:1-6.
5. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, et al. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:69-102.
6. Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1083:1-17.
7. Murayama T, Kajiyama Y, Nomura Y. Histamine-stimulated and GTP-binding proteins-mediated phospholipase A2 activation in rabbit platelets. *J Biol Chem* 1990; 265:4290-4295.
8. Hong SL, Levine L. Stimulation of prostaglandin synthesis by bradykinin and thrombin and their mechanisms of action on MC5-5 fibroblasts. *J Biol Chem* 1976; 251:5814-5816.
9. Burch RM, Connor JR, Axelrod J. Interleukin 1 amplifies receptor-mediated activation of phospholipase A2 in 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6306-6309.
10. Breviario F, Proserpio P, Bertocchi F, et al. Interleukin-1 stimulates prostacyclin production by cultured human endothelial cells by increasing arachidonic acid mobilization and conversion. *Arteriosclerosis* 1990; 10:129-134.
11. Shier WT, Durkin JP. Role of stimulation of arachidonic acid release in the proliferative response of 3T3 mouse fibroblasts to platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol* 1982; 112:171-181.
12. Nolan RD, Danilowicz RM, Eling TE. Role of arachidonic acid metabolism in the mitogenic response of BALB/c 3T3 fibroblasts to epidermal growth factor. *Mol Pharmacol* 1988; 33:650-656.
13. Bhagyalakshmi A, Frangos JA. Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:31-37.
14. Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165:888-894.
15. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7384-7388.
16. Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, et al. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem J* 1995; 305(Pt 2): 479-484.
17. Hla T. Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins* 1996; 51:81-85.
18. Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991; 49:153-179.
19. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 1993; 268:9049-9054.
20. Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 1995; 33:179-207.
21. Hla T, Ristimaki A, Appleby S, et al. Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 696:197-204.
22. Rolland PH, Jouve R, Pellegrin E, et al. Alteration in prostaglandin E_2 production correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis* 1984; 4:70-78.
23. Wu KK. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J Formos Med Assoc* 1996; 95:661-666.
24. Lagarde M, Gualde N, Rigaud M. Metabolic interactions between eicosanoids in blood and vascular cells. *Biochem J* 1989; 257:313-320.
25. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989; 259:315-324.
26. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin

endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978; 30:293-331.
27. Brotherton AF, Hoak JC. Prostacyclin biosynthesis in cultured vascular endothelium is limited by deactivation of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 1983; 72:1255-1261.
28. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-2756.
29. Akarasereenont P, Mitchell JA, Bakhle YS, et al. Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. *Eur J Pharmacol* 1995; 273:121-128.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
31. Basha G, Yap P, Penninckx F. Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining methods for the assessment of tumor cell viability. *Tumour Biol* 1996; 17:354-361.
32. Weksler BB. Regulation of prostaglandin synthesis in human vascular cells. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 509:142-148.
33. Wohlfeil ER, Campbell WB. 25-Hydroxycholesterol enhances eicosanoid production in cultured bovine coronary artery endothelial cells by increasing prostaglandin G/H synthase-2. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345:109-120.
34. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, et al. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99:2118-2127.
35. Maier JA, Hla T, Maciag T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265:10805-10808.
36. Baenziger NL, Force LE, Becherer PR. Histamine stimulate prostacyclin synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92(4): 1435-1440.
37. Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J Clin Invest* 1978; 62:923-930.
38. Wu KK, Hatzakis H, Lo SS, et al. Stimulation of de novo synthesis of prostaglandin G/H synthase in human endothelial cells by phorbol ester. *J Biol Chem* 1988; 263:19043-19047.
39. DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1083:121-134.

EFFECT OF N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA ON RAT HEPATIC DRUG METABOLIZING ENZYMES

Somsong Lawanprasert[1], Pornpimol Kijsanayotin[1], Nuansri Niwattisaiwong[2], Teeraporn Kiatkosolkul[1], Mayuree Tantisira[1], Chamnan Patarapanich[2]

[1] Department of Pharmacology, [2] Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND

ABSTRACT

Effect of N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU) on rat hepatic drug metabolizing enzymes was investigated. Median effective dose of VPU as well as that of valproic acid (VPA, the prototype of VPU) were given intraperitoneally to male Wistar rats for 7 days. On the day after, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Hepatic microsomal and cytosolic subfractions were isolated. Microsomal total cytochrome P450 contents, microsomal cytochrome P450 enzyme-substrate activities, cytosolic glutathione S-transferase activities and hepatic total glutathione were determined. No effects of VPU and VPA were observed on total cytochrome P450 contents, ethoxy- and methoxyresorufin O-dealkylase activities (representing CYP 1A1 & 1A2 activities), aniline 4-hydroxylase activities (representing CYP 2E1 activities), glutathione S-transferase activities and hepatic total glutathione. However, pentoxy- and benzyloxyresorufin O-dealkylase activities (representing CYP 2B1 & 2B2 activities) were significantly increased by VPU. Correspondingly, CYP 2B1 & 2B2 proteins detected by Western blotting were slightly increased following VPU treatment. Further study on the effect of VPU on other isoforms of CYP, involving in human drug metabolism, was suggested.

Key words: N-(2-propylpentanoyl) urea, valproic acid, cytochrome P450, glutathione S-transferase, total glutathione

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

INTRODUCTION

Valproic acid (VPA) (Figure 1), a conventional widely used anticonvulsant drug, has been known for its moderate efficacy as well as a number of side effects[1-3]. Hepatotoxicity and teratogenicity are two major drawbacks of this drug reported in both experimental animals and humans[2-4]. Therefore, several laboratories have attempted to develop improved derivatives so as to reduce these unwanted effects but improve the efficacy[5]. N-(2-propylpentanoyl) urea or valproyl urea (VPU) (Figure 2) is a monoureide analogue of VPA which was synthesized in 1992 in the laboratory of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University[6].

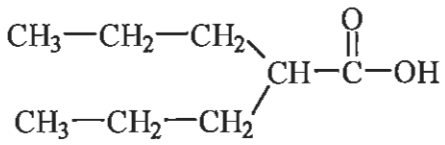


Figure 1 Valproic acid (VPA)

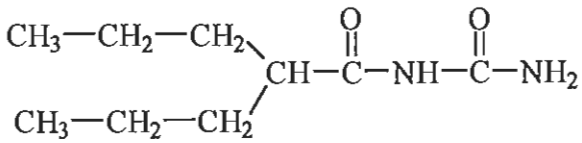


Figure 2 N-(2-propylpentanoyl) urea or valproyl urea (VPU)

VPU possessed a greater anticonvulsant activity compared with its parent compound, VPA, in different animal models tested either in protection against maximal electroshock seizure or pentylenetetrazol-induced convulsion. In addition, VPU demonstrated a greater margin of safety while produced less neurological impairment than did VPA[7]. Developmental toxicity, regarding effects on axial rotation and embryonic growth, was lower in VPU-treated animals compared with those of VPA-treated[8]. Hepatotoxic effects were observed *in vivo* and *in vitro* only at large dose of VPU administration[9]. Pharmacokinetic studies utilizing ^{14}C-VPU and autoradiographic technique demonstrated a rapid distribution characteristic of VPU into various organ tissues. In addition, *in vitro* studies using carboxylesterase from human liver and phenobarbital-treated mice liver showed that VPU was negligibly hydrolysed into VPA. Therefore, it was postulated that VPU *per se* and/or any metabolites other than VPA was responsible for the anticonvulsant activity[10].

Anticonvulsant drugs are associated with a wide range of drug interactions, including hepatic enzyme induction and inhibition. Phenobabital, primidone, phenytoin and carbamazepines are reported to be hepatic enzyme inducers whereas valproic acid is an enzyme inhibitor[11]. Preliminary study of the effect of VPU on hepatic drug metabolizing enzymes demonstrated a prolong barbiturate sleeping time[7].

In addition, *in vitro* study using human liver microsome, VPU demonstrated an inhibitory effect on CYP 2C9 & CYP 1A2[10]. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of VPU on phase I metabolizing enzymes, cytochrome P450 (CYP) including CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2 and CYP 2E1. Effect of VPU on glutathione S-transferase (GST), an important phase II metabolizing enzymes, as well as its effect on hepatic total glutathione (GSH) were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (USA): 4-aminophenol, aniline hydrochloride, bovine serum albumin, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, cupric sulfate, 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), ethylenediamine tetraacetic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, glucose 6-phosphate (G6P), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione (reduced form), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), potassium phosphate, potassium phosphate monobasic anhydrous, sodium carbonate, sodium citrate, sodium phosphate dibasic anhydrous, Trisma® base, valproic acid, benzyloxyresorufin, ethoxyresorufin, methoxyresorufin, pentoxyresorufin and resorufin. Magnesium

chloride, phenol, potassium chloride, sodium chloride, sodium hydroxide and trichloroacetic acid were purchased from E. Merck (Germany). Absolute ethanol and glycerol were obtained from Carlo Erba (USA). Methanol (HPLC grade) was obtained from BDH Laboratory Supplies (England). Sodium dithionite was purchased from Fluka Chemic (Japan). Polyethylene glycol (PEG) 400 was purchased from T. Chemical Ltd. Partnership (Thailand). VPU was obtained from Dr. Chamnan Patarapanich. All materials used in Western blot analysis were generously obtained from Prof. Kan Chiba.

Animals

Adult male Wistar rats, weighing 250-300 gm, were obtained from National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom. The animals were housed in animal care facilities at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and acclimatized for at least 1 week before the experimentation.

Experimental model

Twenty-four male Wistar albino rats composed 4 treatment groups: control group 1, control group 2, VPA treatment group and VPU treatment group. Four animals were studied simultaneously during each experimental period (1 animal/each treatment group). Animals in control group 1 were given sterile water for injection, ip, for 7 days whereas PEG 400 was given to animals in control group 2 in the same manner. Animals in VPA treatment group received VPA at a dosage of 250 mg/kg/day, ip, for 7 days. VPU, suspended in PEG 400, were given to animals in VPU treatment group at a dosage of 80 mg/kg/day in the same manner.

On the day after the dosing, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Livers were perfused *in situ* with ice-cold 0.9 % sodium chloride via portal vein. Small portion of livers were stored at – 80°C for total GSH assay. Microsomal and cytosolic subfractions were prepared by homogenizing the remaining portion of livers in 3 volume of phosphate buffer, pH 7.4. After the homogenate were centrifuged at 4°C for 30 minutes at 10,000 g, the obtained supernatants were further centrifuged at 4°C for 60 minutes at 100,000 g. The microsomal pellets were resuspended in 5 ml of phosphate buffer pH 7.4 containing 20% v/v glycerol. Microsomal and cytosolic subfractions were stored at – 80°C. Liver microsomal and cytosolic protein concentrations were determined by the method of Lowry et al.[12].

Total CYP content determination

Total CYP contents in microsomal subfractions were determined spectrophotometrically by the method of Omura and Sato[13]. The quantity of CYP was calculated from the absorbance difference (450-490 nm) after reduced by sodium dithionite and bubbled with carbon monoxide. The extinction coefficient of 91 mM^{-1} cm^{-1} was used for a calculation.

Alkoxyresorufin O-dealkylation assay

The O-dealkylations of ethoxy-, methoxy, benzyloxy- and pentoxyresorufin by liver microsomes were determined according to the method of Burke and Mayer[14] and Lubet et al.[15] with slight modifications. Each 1 ml of reaction mixture contained 0.1 M Tris buffer, pH 7.4, alkoxyresorufin (5 µM), NADPH regenerating system [comprising NADP (1 mM), G6P (5mM), and magnesium chloride (3 mM)], and microsomal sample (containing 100 µg of protein). Three tubes of 1 ml of reaction mixture were prepared for each sample (1 tube for a blank and the remaining 2 tubes for a sample). The reaction was started by the addition of 10 µl of G6PD (100 units/ml) in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 after a 2 minutes preincubation. Ten microlitre of 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 was used in placed of G6PD in the blank. After 5 minutes of incubation at 37°C, the reaction was terminated by adding 1 ml of methanol (HPLC grade).

The O-dealkylations of alkoxyresorufins were determined by measuring the amount of resorufin formed by fluorescence spectrophotometer (excitation λ = 556 nm and emission λ = 589 nm) and expressed as a function of time and amount of protein.

Aniline 4-hydroxylation assay

The 4-hydroxylation of aniline by liver microsomes was determined according to the method of Schenkman et al.[16], utilizing aniline hydrochloride as a substrate. The reaction was determined by measuring the amount of a metabolite, 4-aminophenol, by

spectrophotometer at 630 nm and expressed as a function of time and amount of protein.

Glutathione S-transferase assay

Liver cytosolic GST activities were determined spectrophotometrically at 340 nm according to the method of Warholm et al.[17], utilizing 1-chloro-2,4-dinitrobenzyene (CDNB) as a substrate. The extinction coefficient of 9.6 mM^{-1} cm^{-1} was used for a calculation of enzyme activities which were expressed as a function of time and amount of protein.

Total glutathione determination

Total GSH concentrations were determined by homogenizing the liver samples with 0.1 M Tris buffer, pH 7.4 and precipitating protein with 10% trichloroacetic acid. After centrifugation at 5,000 g for 10 minutes, the supernatants were then examined for total GSH according to the method of Sedlak and Lindsey[18], utilizing 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as a substrate. Total GSH was determined by measuring amount of a product, 2-nitro-5-thiobenzoic acid, by spectrophotometer at 412 nm and expressed as a function of liver protein or weight of liver.

Western blot analysis

Liver microsomes (15 µg of protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli[19] and the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane according to the method of Towbin et al.[20] with a minor modifications[21]. Rabbit antibody to rat CYP 2B1 & 2B2 was used as the first antibody whereas goat anti-rabbit IgG with rabbit peroxidase-antiperoxidase complex was used as the second antibody. The visualized stain was developed by adding a fresh solution of 3,3' diaminobenzidine and hydrogen peroxide. The intensities of the immunoblot were measured with an Epson GT-9600 scanner equipped with NIH Image/Gel Analysis Program adapted for Macintosh computers.

Statistics

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the mean differences among 4 treatment groups. If the differences were significant, Student-Newman-Keuls tests were used for pairwise comparisons. In all cases, the criteria for statistical significance were $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of VPU on hepatic microsomal total CYP content

PEG 400, which was used as a solvent of VPU, exhibited no effects on total CYP content. No significant effects of both VPU and VPA on total CYP content were found as compared to those in the control group 1 & 2 (Table 1).

Table 1 Effect of VPU on hepatic microsomal total CYP content (mean ± SE)

Treatment group	Total CYP content [a] (n =6)
1. Control group 1	0.620 ± 0.031
2. Control group 2	0.639 ± 0.031
3. VPA treatment group	0.534 ± 0.026
4. VPU treatment group	0.621 ± 0.031

[a] Unit expressed as nmole/mg protein

Effect of VPU on hepatic microsomal alkoxyresorufin O-dealkylase activities

No effects of PEG 400 were observed on the O-dealkylation of all alkoxyresorufins used in this study. Both ethoxy- and methoxyresorufin O-dealkylase (EROD and MROD, respectively) activities which represented CYP 1 A1 & 1 A2 activities, demonstrated no change following VPU and VPA treatments as compared to those in control group 1 & 2. Benzyloxy- and pentoxyresorufin O-dealkylase (BROD and PROD, respectively) activities, which represented CYP 2B1 & 2B2 activities, showed no change after VPA treatment. Significant increases of BROD and PROD activities were observed following VPU treatment as compared to those in control group 1 & 2 (Table 2). Corresponding to the activity data, CYP 2B1 & 2B2 proteins detected by Western blotting were slightly increased following VPU treatment (Figure 3).

Table 2 Effect of VPU on hepatic microsomal alkoxyresorufin O-dealkylase activities (mean ± SE)

Treatment group	Alkoxyresorufin O-dealkylase activities [(a)]			
	EROD (n =6)	MROD (n =6)	BROD (n =6)	PROD (n =6)
1. Control group 1	60.67 ± 8.27	22.00 ± 3.76	28.67 ± 4.81	5.00 ± 0.86
2. Control group 2	58.33 ± 8.07	14.33 ± 2.80	27.00 ± 4.73	2.33 ± 1.31
3. VPA treatment group	57.33 ± 10.46	19.33 ± 3.68	28.67 ± 8.89	3.00 ± 1.44
4. VPU treatment group	70.33 ± 7.14	20.00 ± 3.58	68.33 ± 10.20*	9.67 ± 0.95*

[(a)] Unit expressed as pmole/mg protein/min
* $p < 0.05$; VPU vs Control group 1 & 2

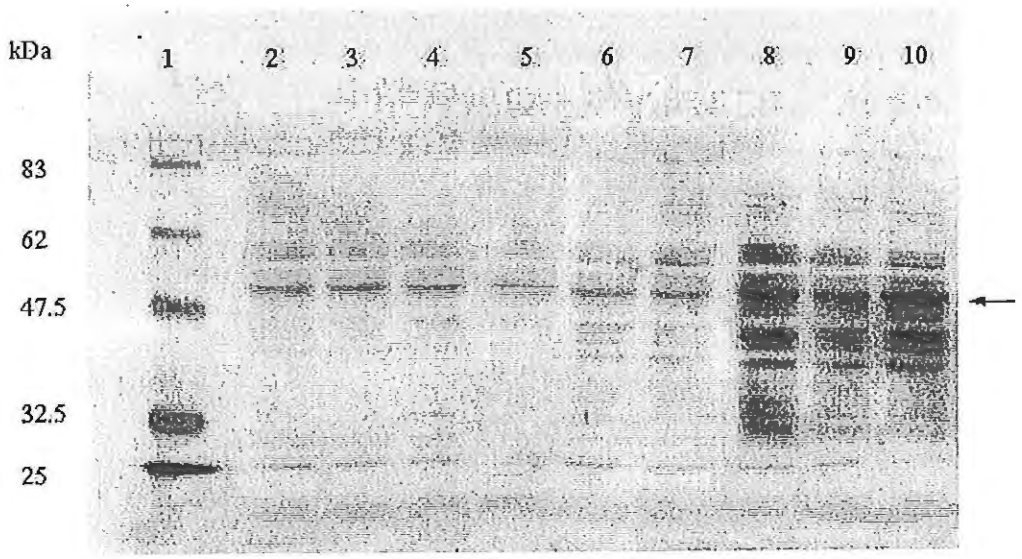


Figure 3 Western immunoblot of liver microsomes isolated from rats treated with PEG400 (lane 2-4), VPA (lane 5-7) and VPU (lane 8-10) as described under materials and methods. Protein marker was shown in lane 1. The arrow indicated CYP 2B1 and 2B2

Effect of VPU on hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity

No effect of PEG 400 was observed on hepatic microsomal aniline 4-hydrolase activity, which represented CYP 2E1 activity. Likewise, both VPU and VPA exhibited no effect on this enzyme activity as compared to those in control group 1 & 2 (Table 3).

Effect of VPU on hepatic cytosolic GST activities

No effect of PEG 400 was observed on hepatic cytosolic GST activities. Likewise, both VPU and VPA treatments exhibited no effect on these enzyme activities as compared to control group 1 & 2 (Table 4).

Effect of VPU on hepatic total GSH concentration

PEG 400 exhibited no effect on total GSH concentration. Similarly, both VPU and VPA treatments demonstrated no effect on total GSH concentration as compared to those in control group 1 & 2 (Table 5).

Table 3 Effect of VPU on hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity (mean ± SE)

Treatment group	Aniline 4-hydroxylase activity [a] (n =6)
1. Control group 1	0.259 ± 0.017
2. Control group 2	0.295 ± 0.029
3. VPA treatment group	0.210 ± 0.015
4. VPU treatment group	0.272 ± 0.028

[a] Unit expressed as nmole/mg protein/min

Table 4 Effect of VPU on hepatic cytosolic GST activities (mean ± SE)

Treatment group	GST activities [a] (n =6)
1. Control group 1	919.08 ± 111.84
2. Control group 2	996.00 ± 97.06
3. VPA treatment group	969.20 ± 95.27
4. VPU treatment group	889.24 ± 74.89

[a] Unit expressed as nmole/mg protein/min

Table 5 Effect of VPU on hepatic total GSH concentration (mean ± SE)

Treatment group	total GSH concentration	
	nmole/mg protein (n =6)	μmole/g liver (n =6)
1. Control group 1	30.25 ± 2.02	6.62 ± 0.43
2. Control group 2	30.17 ± 0.69	6.52 ± 0.31
3. VPA treatment group	34.77 ± 1.45	7.01 ± 0.20
4. VPU treatment group	34.19 ± 1.78	7.14 ± 0.24

DISCUSSION

Therapy with antiepileptic drugs has been known to be associated with a wide range of drug interactions, including hepatic enzyme induction and inhibition as well as protein-binding displacement. Phenobarbital, primidone, phenytoin and carbamazepine are inducers of CYP 2C and CYP 3A whereas valproic acid is inhibitors of CYP 2C, UDPGT and epoxide hydroxylase[11]. Therefore, in the drug development process of a new antiepileptic drug, preclinical testing involving effect of that compound on hepatic drug metabolizing enzymes is recommended[22]. In this study, we followed the protocol of the Anticonvulsant Screening Project (ASP) of the Antiepileptic Drug Development (ADD) program that suggested several hepatic parameter measurements following 7 days of a compound dosing. Dosages of both VPU and VPA used in this study were median effective doses (ED_{50}) protected rats against maximal electroshock convulsion which were 80 mg/kg and 250 mg/kg, respectively[7].

In this study, we evaluated the effect of VPU on the activities of four alkoxyresorufin O-dealkylase, including EROD and MROD which represented activities of CYP 1A1 & 1A2, as well as BROD and PROD which represented activities of CYP 2B1 & 2B2. Besides these major inducible isoforms of CYP, we examined the effect of VPU on aniline 4-hydroxylase activity which represented another important inducible isoform of CYP, CYP 2E1. No effect of PEG 400, which used as a solvent of VPU, was observed on any parameters measured in the study. VPU and VPA treatments did not affect hepatic microsomal total CYP content. However, significant increases in BROD and PROD activities were observed following VPU treatment. Because the induction of CYP 2B1 & 2B2 activities by VPU was much less than that by phenobarbital, the corresponding CYP 2B1 & 2B2 proteins detected by Western blotting were shown slightly increased. This was probably due to the rapid excretion of VPU from the body[10]. Even though the induction effect of VPU on CYP 2B1 & 2B2 existed, the effect might be too subtle to affect total CYP content which was detected by the moderate sensitive method. *In vitro* study utilizing rat hepatocyte cell culture, VPA demonstrated an induction effect on CYP 2B1 & 2B2[23]. However, the effect was not shown in the *in vivo* study when multiple dosing of VPA were administered to the animals[23] possibly due to the short half-life of this drug in rats (10-20 minutes)[24]. Similarly, VPA did not show an induction effect on CYP 2B1 & 2B2 in our *in vivo* study.

The induction effect of VPU on CYP 2B1 & 2B2 found in this study could not explain the prolong barbiturate sleeping time after simultaneously single administration of VPU and pentobarbital reported previously[7]. In this regard, VPU might act as an enzyme inhibitor of CYP 2B1 & 2B2 by competitively competing with pentobarbital binding to the same binding site on these isoforms. Dual effects of VPU on CYP 2B1 & 2B2 might be possible; an induction effect following multiple doses but an inhibition effect following a single dose of this compound. Further study on the latter effect should be elucidated.

CYP 1A1 & 1A2, presenting both in humans and rats at low level, are toxicologically important because they generally convert environmental chemicals (e.g. aromatic and heterocyclic hydrocarbons) and natural compounds (e.g. aflatoxin B_1) to toxic metabolites. Such metabolic activation is thus the most frequent mechanism of transformation of procarcinogen to ultimate carcinogen or carcinogenic intermediates. Therefore, these enzymes normally play a key role in carcinogen activation. Likewise, CYP 2E1 also bioactivates a number of compounds (e.g. acetaminophen), to yield cytotoxic or carcinogenic intermediates[25-26]. Thus the induction of CYP 1A1 & 1A2 and CYP 2E1 isoforms generally increase the risk of toxicological consequences following exposure to environmental chemicals or other xenobiotics which are bioactivated by these enzymes. The present results demonstrated that both VPU and VPA, at a median effective dose, did not have any effects on CYP 1A1 & 1A2 and CYP 2E1 activities. This should be an advantage feature of both VPU and VPA regarding a potential increase risk of toxicity of other xenobiotics.

Our results did not show any effects of VPU on hepatic cytosolic GST activities and total GSH. Large dose of VPU was reported to produce a depletion of hepatic total GSH and hepatotoxic effects[9]. This indicated that VPU, administered at a median effective dose using in this study, was safe regarding the reactive metabolites as well as hepatotoxicity (data was not shown).

In summary, median effective dose of VPU administered to male Wistar rats for 7 days demonstrated no effects on hepatic

microsomal CYP 1A1 & 1A2, CYP 2E1 activities, hepatic cytosolic GST activities and hepatic total GSH CYP 2B1 & 2B2 activities were significantly increased following VPU treatment, correspondingly to a slight increase of CYP 2B1 & 2B2 proteins detected by Western blotting. Effect of VPU on other isoforms of CYP, involving in human drug metabolisms, was suggested for a further study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. We wish to thank Prof. Kan Chiba, Laboratory of Biochemical Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan for the assistance on Western blot analysis. Thanks are also extended to the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University as well as Dr. Supatra Srichairat for the laboratorial facilities.

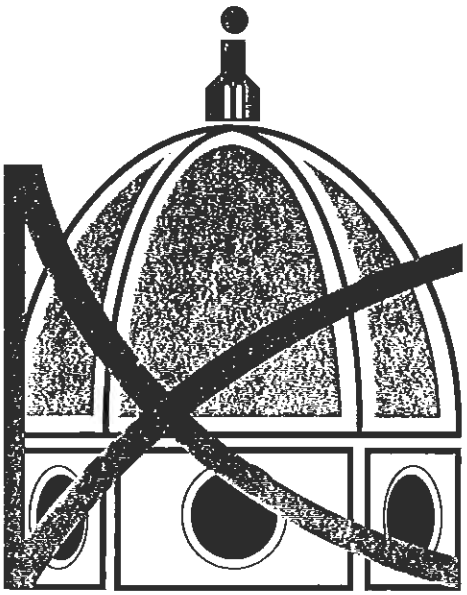
REFERENCES

1. Davis R, Peters DH, McTavish D. Valproic acid : A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 1994; 47: 332-372.
2. Jeavons PM. Valproate : Toxicity. In: Woodbury DM, Penry JK, and Pippenger CE, editors. *Antiepileptic Drugs*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1982: 601-610.
3. Sugimoto T, Woo M, Nishida N, et al. Hepatotoxicity in rat following administration of valproic acid. *Epilepsia* 1987; 28: 142-146.
4. Dalens B, Raynaud EJ, Gaulme J. Teratogenicity of valproic acid. *J. Pediatr.* 1980; 97: 332-333.
5. Bialer M, Haj-Yehia A, Badir K, et al. Can we develop improved derivatives of valproic acid? *Pharmacy World & Science*. 1994; 16: 2-6.
6. Saisorn B, Patarapanich C, Janwitayanuchit W. Synthesis of monoureide analogues of valproic acid. *Thai J. Pharm. Sci.* 1992; 16(2): 145-150.
7. Tantisira B, Tantisira MH, Patarapanich C, et al. Preliminary evaluation of anticonvalsant activity of a valproic analogues : N-(2-propylpentanoyl) urea. *Res. Comm. Molec. Pathol. Pharmacol.* 1997; 97: 51-62.
8. Meesomboon R, Chongsutkaweewong R, Tantisira MH, et al. Investigation of embryotoxicity of N-(2-propylpentanoyl) urea in developing rat embryos *in vitro*. Final report to the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 1997.
9. Patchamart W. *Hepatotoxicity of N-(2-propylpentanoyl) urea in rats* (Thesis for the Master degree of Science). Inter-Department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, 1996.
10. Kijsanayotin P, Hayama E, Nanbo T, et al. Preclinical pharmacokinetic evaluation of N-(2-propylpentanoyl) urea : a new anticonvulsant analogue of valproic acid. *Proceeding of the Annual Meeting of American Society of Whole Body Autoradiography*; 1997; Sept 21-23; Ann Arbor, Michigan: American Society of Whole Body Autoradiography, 1997.
11. Anderson GD. Drug interactions: A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Annuals of Pharmacotherapy*, 1998; 32: 554-563.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
13. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 2370-2378.
14. Burke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 1974; 2: 583-588.
15. Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, et al. Dealkylation of pentoxyresorufin : A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985; 238: 43-48.
16. Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* 1967; 3: 113-123.

17. Warholm M, Guthenberg C, von Bahr C, et al. Glutathione transferases from human liver. *Method_in Enzymology.* 1985; 113: 499-504.
18. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Chem.* 1968; 25: 192-205.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophase T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4350-4354.
21. Guengerich FP, Wang P, Davidson NK. Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry.* 1982; 21: 1698-1706.
22. Cereghino JJ, Kupferberg HJ. Preclinical testing. In: French JA, Dichter MA, Leppik IE, editors. *New Antiepileptic Drug Development: Preclinical and Clinical Aspect.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993: 19-30.
23. Rogiers V, Akrawi M, Vercruysse A, et al. Effect of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of cytochrome P450 mediated monooxygenase system and glutathione s-transferase. *Eur. J. Biochem.* 1995; 231: 337-343.
24. Dickinson RG, Harland RC, Illias AM. Disposition of valproic acid in the rat, dose-dependent metabolism, distribution, enterohepatic recirculation and choleretic effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979; 211: 583-595.
25. Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogenesis and toxin. *Drug Metab. Rev.* 1994; 26: 165-183.
26. Redic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 1997; 29: 413-580.

VII WORLD CONFERENCE
ON CLINICAL PHARMACOLOGY
AND THERAPEUTICS

IUPHAR - Division of Clinical Pharmacology



CPT 2000

JULY 15-20, 2000
Florence - Italy

Third Announcement and Call for Abstracts

4TH CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION
FOR CLINICAL PHARMACOLOGY
AND THERAPEUTICS

ASCORBIC ACID AND ATHEROSCLEROSIS

Uraiwan Ketsawatsakul, Pravit Akarasereenont

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, THAILAND

ABSTRACT

The role of ascorbic acid or vitamin C has been proposed in the prevention of atherosclerosis. The possibility is discussed that the antioxidant effect of ascorbic acid might be protective against and possibly propitious to atherosclerosis. Growing evidence suggests that oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) may be of particular importance in the pathogenesis of atherosclerosis because oxidized LDL exhibits proatherogenic effects. In addition to oxidative modification of LDL hypothesis, inflammatory process potentiated by cytokines also importantly contributes to the pathogenesis. These complex mechanisms presumably participate in endothelial injury resulting in impaired releasing factors, such as nitric oxide (NO) and prostanoids, taking part in abnormal vascular tone. Therefore, vasoactive substances produced from endothelium and their pathways may be modulated by both cytokines-and oxidized LDL-induced oxidative stress. Recently, antioxidants have been determined that can prevent LDL oxidation beneficial to the inhibition of atherosclerotic process. There are accumulating experimental, epidemiological, and clinical evidences of an association between antioxidant vitamin intake and reduced risk of coronary heart disease. In animal models, ascorbic acid has been shown to attenuate the oxidation of LDL and atherosclerotic lesions. Population studies suggest an inverse relationship between ascorbic intake and the development of atherosclerosis, although the effect has not yet been proven in clinical trials. A possible mechanism for the anti-atherogenic effect of ascorbic acid is the prevention of oxidation of LDL. Furthermore, the potential effects of ascorbic acid on the metabolism of NO and prostanoids as well as in the defense on monocyte adherence might particularly improve endothelial function in atherosclerosis. These finding should be pursued in basic research studies to elucidate its molecular biological mechanisms, additionally in clinical epidemiological studies of ascorbic supplementation in populations in order to verify a role of ascorbic acid for the practical use in clinical medicine.

Key words: vitamin, oxidized LDL, oxidative stress, antioxidants, free radicals, endothelial dysfunction.

Address correspondence and reprint requests to: Uraiwan Ketsawatsakul, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, THAILAND. Tel: 4197569, 4115026

INTRODUCTION

Atherosclerotic development has been very likely multifactorial in the pathogenesis attributed to oxidative stress as well as cellular hyperadhesiveness, hyperaggregation and im paired formation of vasoactive substances, particularly prostacyclin (PGI_2), nitric oxide (NO) and endothelin (ET-1). Vascular endothe lium, responsive to a variety of pathophysiolo gic stimuli, plays a crucial role in maintaining vascular integrity in part by the synthesis and release of vasoactive mediators influencing vascular relaxation and contraction. Hence, dysfunction of endothelial cells is strongly pointed to be a pathogenetic role in the initia tion of atherosclerotic vascular disease and its clinical complications.[1-6]

The mechanisms account for initia ting atherosclerotic lesion have not been completely elucidated, however the oxidative modification of LDL hypothesis has been implicated as a significant cause. Resulting from the imbalance of subendothelial lipo proteins and oxidation potential, oxidation products, especially oxidized LDL (ox-LDL), set into motion the cascading of oxidative stress-related vicious cycles initiating foam cell formation and subsequently atherosclerotic plaque or atheroma formation. The precise mechanism of oxidative stress, which occurs when free radical formation exceeds the ability to protect them, within the vasculature is not well understood but is probably due to multi contributors.[7-10] Free radical-mediated oxida tion has been proposed as a mechanism by which LDL becomes modified in the vascular wall, leading to increased uptake by macro phages via the scavenger receptor pathways. Ox-LDL may promote atherosclerosis by addi tional mechanisms, including chemoattraction of monocytes and smooth muscle cells, cyto toxicity to endothelial and smooth muscle cells, inhibition of NO, and stimulation of smooth muscle cell proliferation.[10] Moreover, the damaging free radicals may cause either direct arterial wall injury or more may accele rate secondary processes including depletion of antioxidants (such as ascorbic acid or α-tocopherol), protein peroxidation, and activa tion of phagocyte-platelet-endothelial cell inter actions. Ox-LDL and free radicals probably both can inactivate NO.[11-12] Interestingly, adhe sion molecular gene expression and consequent mononuclear leukocyte recruitment may be induced by oxidative stress as an important intracellular signal in the pathogenesis.[13]

The inflammatory process, mediated by adhesion molecules, cytokines such as IL-1β and TNFα, and eicosanoids, also accounts for the observed endothelial damage leading to endothelial vasodilator dysfunction in athero sclerosis. Therefore, abnormal endothelial func tion has been caused by various mechanisms, including oxidative stress and cytokine-induced the expression of adhesion molecules on the endothelial cell surface[13-15], adhesion and migration of monocytes into the subendothelial space, platelet aggregation, additionally the impaired formation of NO and prostanoids, produced via the L-arginine and the cyclooxy genase (COX) pathway, respectively.[13-16]

Ascorbic acid or vitamin C, a water-soluble antioxidant has been shown as anti atherogen that can prevent LDL oxidation and help to preserve α-tocopherol (vitamin E) in lipoproteins. This strong reducing agent very effectively protects lipids in human plasma against peroxidative damage by scavenging oxygen-derived free radicals.[12,17-19] Also, the lower production rate of reactive oxygen species and regulation of intracellular redox state by ascorbic acid are probably effective not only in preventing oxidation of LDL but also by blocking intracellular redox-sensitive signal mediating adhesion molecule expression and presumably COX-2 pathway, additionally inhibitng free radicals-inactivated NO involved in atherosclerosis. Thus, ascorbic acid may improve endothelial vascular function in part by promoting NO[11,12,20] and prostanoid actions. Hence, in addition to the effect on cytotoxic ox-LDL, ascorbic acid presumably have the possibility to retard damaged endothelium by protecting against inflammatory mediators including cytokines, such as IL-1β, TNFα, and prostanoids.[21]

However, previous studies provide limited support for the hypothesis that the dietary antioxidants vitamin C may slow the progression of atherosclerosis. Thus, the anti atherogenic benefits of antioxidant ascorbic acid in human atherosclerosis remain unproved by clinical trials, and the long-term effects of mega-dose ascorbic acid are yet undefined.[22,23] An important clinical question is the extent to whether ascorbic acid could prevent or treat the detrimental effects of atherosclerosis. Standards of proof should be clarified since these will definitely provide valuable informa tion about optimal nutritional intakes as well as this antioxidant may become an additional treatment modality against atherosclerosis.

Pathogenesis of atherosclerosis

At the inner vascular surface in early atherosclerotic lesion, the endothelial cells are abnormal shape and function. Beneath the endothelium lies the fibrous caps composed mainly of extracellular collagen, fibrin, elastin, and proteoglycans, occasional lipid-laden macro phages (foam cells), and modified smooth muscle cells. Deeper within the vessel wall and beneath the fibrous cap are several layers of smooth muscle cells interspersed with macro phages and foam cells. Macrophages that process and internalize extracellular lipids, the LDL, are activated and changed to be foam cells, avidly accumulated and then initiating the fatty streak, the first atherosclerotic lesions and the probable precursor of atherosclerotic plaque.[4-8,24]

In vitro studies show that native (un modified) LDL is unlikely to contribute to the development of atherosclerotic lesions. The lipoprotein may be transformed into an athero genic agent through several mechanisms, inclu ding acetylation, nonenzymatic glycation, and oxidation. This suggests that the oxidative modification of LDL may be of particular significance[7,8] and much more atherogenic than native LDL in many ways because it is taken up rapidly by macrophages.[24,25]

Atheroma, a chronic inflammation process, teams with cells including vascular wall cells, such as endothelium and smooth muscle, as well as infiltrating leukocytes.[5,34,25] It contains ceroid pigment, a complex of oxidized lipids and protein. Transformation of the fatty streak into the mature plaque occurs with foam cell necrosis. Necrosis occurs when the influx of ox-LDL exceeds the capacity of the macrophage scavenger receptor to take up LDL. Thus, the ox-LDL concentration in the subendothelial space increases rapidly. Ox-LDL is cytotoxic to macrophages[5,8], smooth muscle cells[8,34], and endothelial cells[2,3,12]. As it poisons foam cells, cell necrosis releases intracellular ox-LDL plus lysosomal enzymes and free radicals that further injure adjacent cells and interstitial components, both directly and inducing an inflammatory response.[3,17-19] (Figure 1)

Ox-LDL can cause endothelial damage and platelet aggregation, adherence and activa tion. Platelet degranulation releases platelet-derived growth factor (PGRF) and secretory products that augment oxidative modification of LDL and its subsequent uptake by macro phages.

The abnormal functions of cells within atherosclerotic lesions account for the impaired endothelial vasodilator dysfunction.[20] The exact mechanisms mediated in the cellular regulation remain ill-defined. It has been shown the specific adhesion molecules on the surface of endothelial cells that may induce the adhesive interactions significant to the athero sclerotic initiation. Vascular cell adhesion mole cule-1 (VCAM-1), a mononuclear leukocyte-selective adhesion molecule cells during early atherosclerotic lesion development in certain animal models[16], expressed by endothelium precedes monocyte recruitment.[5,13-16] Addi tionally, cytokines, the protein mediators of inflammation and immunity may have parti cular relevance in regulation of many aspects of vascular pathology in atherosclerosis. Exam ples of cytokines known to localise in human atheroma are TNF-α[5,43] and IL-1β[5,13,14]. IL-1β derived from vascular smooth muscle and endothelial cells may initiate local immune and inflammatory responses as well as potentiate the expression of adhesion molecules and chemoattractant cytokines, e.g. IL-8 or IL-1 itself, that can then recruit the phagocytes.[14] Thus, both ox-LDL and inflammatory media tors may evoke the expression by endothelial cells of the adhesive proteins that capture leukocytes and recruit them to the sites of lesion initiation.[5]

Moreover, a significant role in the atherogenesis is the inflammatory components that involve prostanoids, especially PGI_2, the major product in the endothelial cell, that also crucially modulates vascular tone in part by acting on endothelial and smooth muscle cells, platelet and leukocytes. Since PGI_2 is a potent inhibitor of platelet aggregation, leukocyte activation and adhesion, vascular smooth muscle contraction, migration and growth, and cholesterol ester accumulation in vascular cells, participating in hypersensitivity and suggested to be agonists for pro-thrombotic and pro-atherosclerotic process. Consequently, COXs which exist as COX-1 and COX-2, the central enzymes regulating the prostanoid synthesis from membrane-derived arachidonic acid, are also substantial in the pathogenesis. Particularly, COX-2, the inducible enzyme that can be rapidly up-regulated by a variety of biochemical stimuli, such as LPS[2,3], cyto kines[40], growth factor[36,37], and possibly ox-LDL.[15,16]

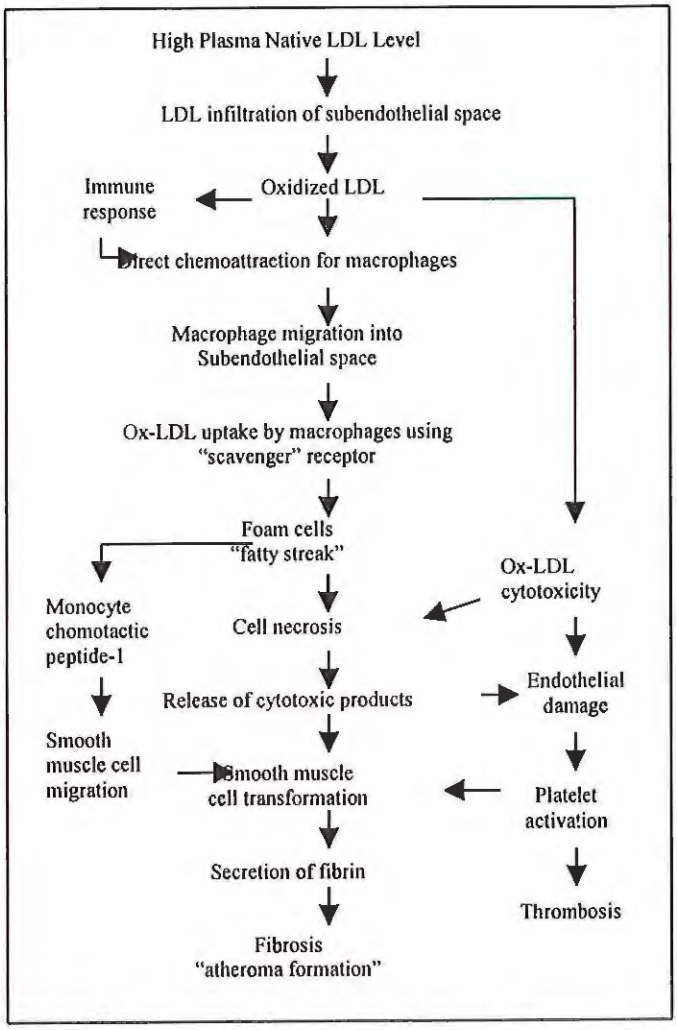


Figure 1 Postulated pathway of atherogenesis

Hence, changes in the endothelial function are particularly important since the endothelium regulates vascular tone by releasing the major vasoactive mediators including PGI_2, ET-1 and NO involved in relaxation and contraction, in coagulation and thrombus formation and in growth inhibition and stimulation.[2,3,26] This suggests that the damaged endothelial cells and subsequently impaired formation of vasoactive mediators deteriorate the regulation of vasomotor tone in coronary artery disease.

Oxidation and atherosclerosis

Reactive oxygen species: origins and consequences

It is now well-established that free radicals, such as superoxide ($O_2^{\bullet -}$), peroxyl radical ($HOO^{\bullet}$), lipid oxyl and peroxyl radicals derived from polyunsaturated fatty acids (PUFAs), hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), and other reactive oxygen species (such as H_2O_2) are continuously produced in vivo.[7,27] The term reactive oxygen species (ROS) is a collective one that includes not only oxygen-centered radicals such as $O_2^{\bullet -}$ and $OH^{\bullet}$ but also some nonradical derivatives of oxygen, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen Δg, and hypochlorous acid (HOCL).[24] $OH^{\bullet}$ is a very reactive species that can attack all biologi cal molecules and membrane proteins, usually setting off free-radical chain reaction by abstracting hydrogen from adjacent fatty acid side chains and so propagating the chain

reaction of lipid peroxidation.[19,28-30] Both $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 are less harmful than $OH^{\bullet}$ because of far less reactive but can cause cellular damage if they are produced in excess.

The human body has a multipli city of different antioxidant defenses. However, anti oxidant defenses are not 100% effective. Consequently, depletion of antioxidant defenses and/or rises in ROS production can tip the ROS-antioxidant balance and cause oxidative stress, which may result in tissue injury, including damage to DNA, lipids and proteins in the human body.[30]

The relative importance of damage to different molecular targets in producing cell injury or death by imposing oxidative stress also depends on what degree of stress occurs, by what mechanism it is imposed, for how long, and the nature of the system stressed. For example, lipid peroxidation appears to be a highly significant consequence of oxidative stress in injured human arterial walls. How ever, most cells can tolerate mild oxidative stress, which often leads to increased synthesis of antioxidant defense systems.[24]

Oxidative modification of lipoproteins

The free radical chain reaction of LDL oxidation plays an important role in the progression of atherosclerosis.[29] (Table 1) Although, the oxidation hypothesis of athero sclerosis has not yet been definitely proved, evidence that oxidation is critical to athero sclerosis is substantial. Ox-LDL has been found in human atherosclerotic lesions, and increased titers of autoantibodies against ox-LDL are presented in plasma of patients with atherosclerosis. Studies using the antioxidants give further evidence of its support.[30,31]

In vitro studies, LDL can be oxidative ly modified by incubation with endothelial cells, smooth muscle cells or monocytes-macrophages in the presence of trace amounts of transition metal ions such as copper or iron as it is completely inhibited by metal chela tors.[18]

Lipid peroxidation is a chain reaction that proceeds in three stages. (Figure 2) Firstly, in the initiation phase, an oxygen free radical generated elsewhere (macrophage, polymorpho nucleocyte, etc.) reacts with a PUFA to produce a lipid radical ($L^{\bullet}$).[10-12,32] Secondly, in the pro pagation phase, the lipid radical reacts rapidly with molecular oxygen to form a peroxyl radical ($LOO^{\bullet}$), a chain reaction that is able to attack another PUFA molecule. Although the initial peroxyl radical is converted to a hydroperoxide (LOOH), this process produces a new carbon-centered peroxyl radical. Lastly, the propagation process continues and accele rates, consuming PUFAs and producing a corresponding quantity of hydro-peroxide. The chain reaction does not stop until the chain-carrying peroxyl meets and combines with another peroxyl radical to form inactive products.[1,27]

Stage 1. $L\text{-}H + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O + L^{\bullet}$

2. $L^{\bullet} + O_2^{\bullet} \rightarrow LOO^{\bullet}$

3. $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow$ inactive products

Figure 2 Lipid peroxidation stage.

It is postulated that ox-LDL can inhibit endothelium relaxations and promote endothelium contractions; the consequences are alteration in vascular tone leading to vasospasm and thrombus formation, generally found in patients with coronary artery disease.

Interestingly, peroxides and oxidized LDL might accelerate cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase-catalyzed reactions in endo thelium, leading to enhanced formation of eicosanoids.[16,29,36] Eicosanoids, especially the cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid, are also thought to play a role in the pathogenesis of atherosclerosis. The studies have demonstrated that the expression of COX-2 mRNA in cultured endothelial cells could be induced by ox-LDL possibly through the action of lipid hydroperoxides[37-39], addition ally the increase in COX-2 expression, known to occur under pathological conditions[2,40], was correlated with an increase in free radical catalyzed products of arachidonic acid, 8-epi prostaglandin $F_{2\alpha}$[38,39], the isoeicosanoids which may be formed by either COX-1 or COX-2.[39] Thus, oxidative stress caused by ox-LDL could have profound effects on vascular function by a variety of mechanisms including the imba lance of prostaglandins.[36-38]

Inactive Nitric Oxide (NO)

It is documented that NO is formed in endothelial cells, phagocytes and many other cell types, from a guanidino nitrogen of L-arginine by an oxidation reaction which can be catalyzed by NO synthase. Since NO has ability to relax vascular smooth muscle and inhibit aggregation and adhesion of platelets[1-3], therefore it is thought to play a central role in vascular homeostasis. Specifically in the role of atherogenesis, NO possibly inhibits throm bosis, cytokine-induced VCAM-1 expression, leukocyte adhesion to endothelium, and smooth muscle proliferation and migration. The ineffective action of NO has been found in atherosclerotic patients.[41]

Table 1 The potential atherogenic properties of ox-LDL.

1. Foam cell formation.[33]	The accumulated ox-LDL in macrophages that express abundant scavenger receptors for modified LDL results in foam cell formation.[33]
2. The exertion of chemotactic and cytotoxic activities.[18]	Ox-LDL stimulates the monocyte to penetrate into the subendothelial space of the arterial wall by directly itself and by indirectly mediating the expression of the VCAM-1 expressed on endothelial cells.[5,13] Thus, ox-LDL-induced the intimal accumulation of monocytes and smooth muscle cells as well as itself cytotoxicity can cause endothelial and smooth muscle cell damage.[33-35]
3. The production of damaging free radicals.[7]	Ox-LDL could involve releasing extracellular $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 by endothelial cells, which then interact with transition metal ions, to form damaging species such as $OH^{\bullet}$, significantly starting off lipid peroxidation.[25-27]
4. The impaired production and inactivation of NO.[2,3,6]	Ox-LDL can interfere with the intracellular availability of L-arginine and inactivate NO that result in altering the endothelium response to NO, thus potentially inhibiting arterial relaxation.[2,35]
5. The stimulation of ET-1 secretion.[1,26]	ET-1 is a potent vasoconstrictor possibly involved in a variety of cardiovascular diseases.[1,2] The expression of ET-1 mRNA can be induced by ox-LDL in cultured aortic endothelial cells.[1,2,26]

In endothelial vascular dysfunction, inactive NO has been attributed in part to vascular oxidative stress since NO is readily inactivated by superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), mostly produced by phagocytes, subsequently genera ting peroxynitrite anion ($ONOO^-$)[10-12,42] :

$$O_2^{\bullet-} + NO \rightarrow ONOO^-$$

Additionally, $O_2^{\bullet-}$ can act as a vaso constrictor and $ONOO^-$ might not only be toxic itself but also it might decompose to give $OH^{\bullet}$.

Consequently, the decreased bioavai lability of NO may be due to either decreased production by damaged endothelium or increased degradation by oxygen-derived free radicals (especially $O_2^{\bullet-}$).[20]

Additonal effects of oxidation

In the previous studies, in addition to ox-LDL, cytokines, e.g. IL-1β and TNFα, have been shown to exert oxidative stress, probably by inducing the synthesis of oxygen radicals in both lymphoid and nonlymphoid cells[43], consequent leading to oxygen radical induced injury of the vascular endothelium. It has been established that cytokines-induced oxidative stress may modulate intracellular regulatory signal by redox-sensitive signal

transduction pathways involved in athero sclerosis. Hence, an increase in the endothelial cell oxidative state may sensitize the vascula ture to otherwise physiologic signals resulting in abnormally elevated expression of adhesion molecules such as VCAM-1 and other gene products involved in the inflammatory response including COX-2 and iNOS expres sion.[16,37,43]

The role of antioxidant defense in endothelial vascular dysfunction

The endogenous oxygen species produced by the cells present in the arterial wall may cause oxidative damage to cellular components altering endothelial cell function as a crucial role in atherogenesis. Recent findings have suggested a possibility for pharmacological and nutritional antioxidants in the prevention of atherosclerosis.[23,24,44,45]

Antioxidants can be defined as sub stances whose presence in relatively low concentrations significantly inhibits the rate of oxidation of that substrate. The available for therapeutic use can be conveniently divided into natural (physiological) antioxidants nor mally present in the body, and synthetic compounds with antioxidant activity.[44]

Some antioxidants are synthesized in the human body including enzymes (such as superoxide dismutase, catalase, and glutathi one peroxidase) and nonenzymatic antioxidant free radical scavengers (such as α-tocopherol, ascorbic acid, β-carotene). These native tissue antioxidants form a synergistic, multilevel defense system against free radical injury.[7] Removal of excess $O_2^{\bullet-}$ by intracellular super oxide dismutase (SOD) enzymes is an im portant physiological antioxidant defense mechanism.[26] In endothelial cells, both catalase and glutathione peroxidase enzymes are involved in removal of hydrogen peroxide (H_2O_2). Large amounts of H_2O_2 are cytotoxic to cell types, and endothelial cells are no exception because endothelial cells can be killed by high concentrations of H_2O_2 by mechanisms that involve damage to DNA and proteins caused by free radicals and an increased concentration of intracellular free calcium ions.[25] However, low concentrations of H_2O_2 are efficiently dealth with by catalase and glutathione peroxidase, the enzymes that metabolise H_2O_2 in the endothelium.

As a result of superoxide that can be generated by endothelial and phagocytic cells, whether endothelial cells release superoxide all the time in vivo, or whether only after an insult (such as ischemia and reperfusion) is unknown. Because of the damaging superoxide that reacts quickly with NO to form $ONOO^-$, consequently superoxide antagonises the vaso dilatory action of NO as well as superoxide dismutase, an intracellular antioxidant enzyme that scavenges superoxide, prolongs the life of NO.[11,12,20]

Moreover, oxidative stress-modulated intracellular redox sensitive regulatory mecha nisms in the endothelial cell may play a crucial role in differentially modulating the expression of the genes participated in the inflammatory responses such as VCAM-1, affecting mono nuclear leukocyte accumulation, including COX-2 , the inducible enzyme that produces prostanoids and iNOS, regulating NO synthe sis.

Therefore, both generally and locally in tissue, the balance between free radical production and the multilevel defense system may be critical. In according to the evidence that endogenous antioxidants do not complete ly prevent ROS-induced oxidative stress in the human body, consequently efficient repair systems are needed and supplementing natural antioxidant defenses may retard oxidative damage.[27,30]

It is hypothesized that dietary antioxi dants may prevent development and slow progression of atherosclerosis by several species. LDL oxidation has been established to be an important step in the atherogenesis, it may be beneficial that enhancing the endoge nous antioxidant defense systems within the LDL particle might decrease oxidation of LDL and slow the atherogenic process without producing undesirable effects.[22,23] Additional role of antioxidants has been expanded on the notion of its effect as a potential intracellular regulatory signal that modulates the expression of significant inflammatory genes, such as IL-1β and TNFα.[16,37] In according to a therapeu tically important feature of antioxidants in atherosclerosis that may be due to direct alterations in the metabolism and function of endothelial, smooth muscle, and inflammatory cells[43], consequently, in particular, the endo genous defense systems may be improved by micronutrient supplementation with lipophilic antioxidants such as α-tocopherol and β-carotene, or by supplementing the aqueous phase antioxidant capacity with ascorbic acid. In several animal species, the dietary admini stration of various antioxidant compounds reduces the susceptibility of LDL to oxidation

and retards the development of atherosclero sis.[45-48] Epidemiologic data also suggests that decreased levels of micronutrient antioxidants are associated with an increased frequency of cardiovascular disease.

Ascorbic acid (vitamin c) as antioxidant defense

Ascorbic acid is the main water-soluble chain-breaking antioxidant in human plasma, reacts with superoxide, hydroxyl radi cals, and singlet oxygen, additionally sparing other endogenous antioxidants (especially α-tocopherol) from comsumption.[48] It is the only endogenous antioxidant in plasma capable of completely inhibiting oxidative modification of LDL by aqueous peroxyl radicals. Indeed, it has been shown that the antioxidant capacity of the LDL particle can be accounted for by α-tocopherol. There is, however, a synergistic interaction between ascorbic acid and α-toco pherol, and α-tocopherol can be regenerated from the corresponding radical ($T^{\bullet}$) by ascor bic acid.[27-30]:

$$T^{\bullet} + \text{ascorbate} \rightarrow TH + \text{ascorbate}^{\bullet}$$

The ascorbate free radical, semi dehydro-ascorbate, is a rather stable and almost unreactive metabolic intermediate between ascorbic and dehydroascorbic acid. Two molecules of ascorbate free radical can be converted by disproportion into ascorbate and dehydroascorbate. Thus, propagation of free radical reaction is stopped without any toxic free radical remainder.[17] In the previous studies, ascorbic acid can compensate for reduced level of lipophilic antioxidants.[10,11,17,35]

The current evidence suggests that ascorbic acid more effectively prevents lipid peroxidation than any other endogenous antioxidant in plasma and LDL, including α-tocopherol, the major lipid-soluble antioxidant in humans.[18-20] The effect of ascorbic acid may be due to interference with either LDL oxida tion or a process that is induced by ox-LDL.

It is possible that low levels of ascor bic acid in the arterial wall may predispose LDL to oxidation, which could promote athero sclerosis. Also, the results of several epidemio logic studies support a role for low plasma ascorbic acid levels in atherosclerosis. A significant inverse relationship was found between plasma ascorbic acid and coronary artery disease mortality[3] as well as human subjects with low ascorbic levels have been reported to have higher amounts of lipid peroxides in plasma than do subjects with high ascorbic acid levels. Moreover, previous studies have suggested that ascorbic acid could be improve endothelial vasomotor dysfunction in hypercholesterolemic patients.[27]

Interestingly, in human endothelial cells stimulated to generate radicals, ascorbic acid recently has been shown to inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) induction. VCAM-1, which can be stimulated by ox-LDL and inflammatory mediators including IL-1β, lipopolysaccharide (LPS), and TNFα[5,14,37], can enhance monocyte adhesiveness to endothelium and subsequently induces inflammatory responses in the vessel wall involved in atherosclerosis.

Furthermore, one crucial pathogenesis responsible for atherosclerosis is the inducible COX-2 exerting abnormal prostanoid produc tion.[16,21,36] It has been documented that the antioxidant scavenger may modulate in the signaling pathway, induced by IL-1β and TNFα, that influences, either directly or indirectly, on some eukaryotic initiation factors regulating COX-2 and iNOS expres sion in rat mesangial cells.[37] This also has been supported by our recently work showing that ascorbic acid could inhibit IL-1β-induced COX-2 expression in cultured human umbili cal vein endothelial cell (HUVEC)[21]. There fore, the endothelial vascular dysfunction mediated by the imbalance prostanoids would be ameliorated by ascorbic acid. It is possible that ascorbic acid may be a novel approach for intervention in cytokine-induced inflammatory processes in atherosclerosis.[16,37]

How ascorbic acid might impact on athero-sclerosis.

<u>On LDL oxidation:</u>

Ascorbic acid has an inhibitory effect on LDL oxidation by either scavenging peroxy radicals directly or acting synergistically with the α-tocopherol endogenous to the particle, additionally by regenerating the reduced form of α-tocopherol back to the active tocopherol form. The LDL protected by ascorbic acid was not taken up and degraded by macrophages via the scavenger receptor mechanism.[18]

Ascorbic acid treatment has been found to increase LDL resistance to oxidation in vitro in rats that have an iron overload because ascorbic acid has a significant inhibitory effect on LDL oxidation mediated

by metal ion, such as coppper ion.[9-11,18] Ascorbic acid also preserved the endogenous lipophilic antioxidants within the LDL particles (α- and γ-tocopherol, and β-carotene) during oxidation with copper.[2]

On endothelium-derived relaxing factor (or NO) action:

Ascorbic acid has been shown to be an efficient scavenger of $O_2^{\bullet-}$, including HOCL and $ONOO^-$.[17,19,22-24] This ability provides one possible explanation for the beneficial effects of ascorbic acid on endothe lial function since superoxide anion has ability to react rapidly with NO and limit the biologi cal activity of NO.[11,12,20,25]

Ascorbic acid may also improve endothelial function by the role in the regula tion of intracellular redox state, by sparing intracellular glutathione from oxidative degradation. Glutathione is an important source of intracellular reduced thiols and can be degraded by oxidation to glutathione disulfide. Under conditions of increased oxidative stress, depletion of reduced thiol leads to decreased synthesis of NO in cultured endothelial cells. Thus, prevention of glutathione oxidation and therefore increase of the availability of reduced thiol by intracellular ascorbic acid could improve NO action.[27,43]

On additional actions:

In according to a significant initiating mechanism in atherosclerosis is the increased interaction of monocytes with endothelial cells activated to synthesize adhesion molecules, interestingly, ascorbic acid may have ability to inhibit VCAM-I induction and monocyte adhesion in damaged human endothelium in the mechanism by which ascorbic acid interferes with P-selectin translocation to the endothelial cell surface in response to radicals.[35] Additionally, it has been established in the activated endothelial cell that VCAM-1 gene expression by cytokine and noncytokine inducers is regulated by a redox-sensitive signal transduction pathway sensitive to inhibition by antioxidant, potentially regula ting intracellular redox state[43], possibly as ascorbic acid.

Furthermore, COX pathway evidently is also a source of free radical $O_2^{\bullet-}$, which can potentiate endothelium-dependent contractions either by inactivating NO or by direct effects on vascular smooth muscle[3]. Additionally, the effect of free radicals initiating lipid hydropero xide on membrane-derived arachinodic acid is relevant to impaired prostanoid synthesis. In another important evidence, reactive oxidative intermediates (ROI)-mediated intracellular redox state has also influenced COX-2 expres sion.[35] These suggest that vascular oxidative stress can modulate COX-2 pathway. Since ROI produced by the mitochondrion, a site where excessive production of radicals apparently occur during oxidative stress, may mediate TNF and IL-1 signaling and up-regulate the proinflammatory genes of COX-2 and iNOS, therefore the scavenging antioxi dants may involve in redox-sensitive inhibition of cytokine-induced COX-2 and iNOS expres sion.[37] In according to the beneficial effects of ascorbic acid to detoxify reactive oxygen species and to regulate endothelium intracellular redox state, hence ascorbic acid may interfere COX-2 pathway by inhibiting ox-LDL-induced lipid hydroperoxide and by interfering with ROI-modulated intracellular redox state resulting in COX-2 expression.[35,37]

Considering oxidative stress, elicited by ROI releasing from damaged endothelium, that can be induced by cytokine and ox-LDL, therefore ascorbic acid may be prospective to atherosclerosis not only in the role of ox-LDL-induced but also in cytokines-stimulated endo thelial injury. Thus, it has been postulated that a potential molecular linkage between the redox state-modulated signaling pathways of the vascular endothelial cell and abnormal expression of the genes responsible for inflam matory process, e.g. VCAM-1, COX-2 and iNOS[35], is possibly notable for oxidation as a significant intracellular regulatory signal observed in damaged endothelium early in the pathogenesis of atherosclerosis. In particular, ascorbic acid would be specific regulatory factors that tranduce metabolic signals (i.e., oxidation) into nuclear regulatory signals (i.e., expression of adhesion molecule genes) that may have significant therapeutic implications in atherosclerosis.[43]

Recommended intakes of ascorbic acid

Worldwide recommended intakes for ascorbic acid are 30-100 mg/day[7,8,24], which can achieve plasma ascorbic acid levels approximately 30-150 μmol/L[28,45], based on maintenance of adequate body reserves that preclude classical scorbutic symptoms.[7,8,24] In smokers receiving up to 1.5 g/day of supple mental ascorbic acid, serum lipids were protected from oxidation.[7] Several epidemio

logic studies concluded that plasma concentra tions of ascorbic acid approximately 50 μ mol/L are associated with decreased risk of cardiovascular disease.[10,19,46] At such concen trations, easily achievable by diet alone, can strongly inhibit LDL modification.[10] Similar to the other antioxidants, There is little evidence of toxicity for even multigram daily doses of ascorbic acid.[19,29] However, large doses of 1-5 g/day may cause diarrhea, nausea and vomiting. Large doses may also result in precipitation of oxalate, cysteine, or urate renal stones if the urine becomes acidic during therapy. Oxalate also accumulates in patients with chronic renal failure and those receiving long-term hemodia lysis, and these individuals should be cautioned against taking large doses of ascorbic acid.[8] Ascorbic acid can be prooxidant in vitro rather than antioxidant in the presence of transition metal ions, mixing ascorbic acid with iron ions can cause $OH^{\bullet}$ generation and lipid peroxida tion.[18,30,31] Thus, ascorbic acid is contra indicated in patients with hemochromatosis and other conditions characterized by iron overload.[8]

Although higher ascorbic acid intakes may be recommended for certain groups such as smokers and those under a variety of stresses, the present data suggests that antioxidant protection is best served by the variety of antioxidant substances found primarily in fruit and vegetables[24], additionally dietary guide lines are better for a public health strategy than recommendation of specific nutrients intakes.[22,48]

CONCLUSION

Since various mechanisms evidently contribute to atherogenesis, in studying isolated human plaque, one has access only to a single time point in what is a complicated disease process with ongoing, stage-dependent events. It has been establishd that endothelium, a crucial vascular structure, produces mediators and vasoactive substances regulating vascular tone apparently impaired in atherosclerotic patients, consequently endothelial damage is strongly thought to initiate atherosclerotic lesion.[1-3] Oxidative modification of LDL hypo thesis as well as cytokines-modulated inflam matory process account for endothelial injury in the pathogenesis.[7-12] The reactions involving free radicals, particularly the oxidation of LDL in vessel walls, seem to be an important early step in atherogenesis because ox-LDL promotes the development of foam cells and endothelial injury before the establishment of organized arterial plaque.[4-8,46,47] The several mechanisms have been shown that ox-LDL and inflamma tory mediators, such as IL-1β and TNFα, are major contributors to the adherence of mono cytes to endothelium.[6,13-16] Moreover, both monocytes and macrophages within the vessel wall can generate superoxide and hydrogen peroxide. Peroxynitrite is formed by the interaction of superoxide and NO resulting in inactive NO and consequent endothelial vasodilator dysfunction.[11,20,41,42] Also, the imbalance prostanoids, regulated by COX-2, crucially participating in vascular tone dysfunction, can be induced by inflammatory mediators. Apparently, in addition to cytokines, ox-LDL-stimulated oxidative stress presumably mediates COX-2 pathway leading to abnormal prostanoid synthesis detected in atherosclerotic patients.[16,36-39] Thus, it is very difficult to discern the possible sequence of factors contributing to oxidative stress, inflammatory processes and endothelial damage. However, if oxidative LDL hypothe sis is true, antioxidant substances are likely to exert their effects at the earliest stages of the atherogenic process. Theoretically, the role of antioxidants should be evaluated with benefit to the development of preclinical disease.[22-24,27] A large body of experimental and epidemio logical data indicates that antioxidant vitamins may be able to reduce atherosclerosis.[45-48] For the most part, three antioxidants have been studied: ascorbic acid, α-tocopherol, and β-carotene. All three have been shown to diminish the susceptibility of LDL to oxidation in vitro. However, the role of dietary antioxidants in human atherosclerotic disease remains inconclusive, additionally epidemio logical data concerning the role that these substances may play in atherosclerotic disease are in-consistent with regard to both plasma levels and dietary intake.[7,8]

Ascorbic acid, an outstanding antioxi dant in human plasma, effectively protects against oxidative stress, caused by ox-LDL and possibly cytokines, e.g. IL-1β.[17-20] On account of its actions in scavenging free radicals, ascorbic acid can increase LDL resistance to oxidation, potentially preventing lipid peroxidation as well as regulate intra cellular redox state, possibly improving NO activity.[20,28] Furthermore, it may also inhibit ox-LDL and cytokines-stimulated monocyte adhesion.[35,41] In additional interesting effect of ascorbic acid is that it may modulate in the signaling pathway induced by cytokines that

up-regulate COX-2 expression[16,37], supported by the evidence of decreased COX-2 expres sion inhibited by ascorbic acid in IL-1β-treated HUVEC.[21] Thus, this suggests that ascorbic acid not only prevents the oxidation of LDL but itself alone may maintain the function of endothelial cells by other mechanisms, including inhibiting inflammatory process responsive to cytokines and COX-2, that should be explored for further advantage. However, how much is optimal is another unanswered question. Laboratory findings may not have relevance to free-living humans. Observational epidemiologic studies can not exclude the possibility that people who consume antioxidant-rich diets or who take vitamin supplements also share other lifestyle or dietary practises that actually justify their lower disease rates.[25] The only way to determine reliably whether antioxidants play any role in reducing the risk of cardiovascular disease is to conduct large-scale[22,44,45], randomized controlled clinical trials in asymp tomatic and symptomatic individuals before public health recommendations concerning the use of ascorbic acid supplementation for coronary heart disease prevention can be made.

REFERENCES

1. Haller H. Endothelial function: general considerations. *Drugs* 1997; 53 (suppl.): S1-S10.
2. Luescher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *A J H* 1993; 6: 283S-293S.
3. Vane JR, Botting RM. Regulatory mecha nisms of the vascular endothelium: an update. *Pol J Pharmacol* 1994; 46: 499-521.
4. Henderson A. Coronary heart disease: over view. *Lancet* 1996; 348 (suppl.): S1-S4.
5. Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet* 1996; 348 (suppl.): S4-S7.
6. Zeither AM. Endothelial vasodilator dys function: pathogenic link to myocardial ischaemia or phenomenon? *Lancet* 1996; 348 (suppl.): S10-S12.
7. Meyers DG, Maloley PA. *Pharmaco-therapy* 1993; 13(6): 574-582.
8. Odeh RM, Cornish LA. *Pharmaco-therapy* 1995; 15(5): 648-659.
9. Suarna C, Dean TR, May J, et al. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of α-tocopherol and ascorbate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1616-1624.
10. Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atheroge nic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1583-1590.
11. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunc tion in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94: 6-9.
12. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 1997; 278: 1682-1686.
13. Dinarello CA. Biologic basis for interleu kin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
14. Schoenbeck U, Mach F, Bonnefoy J, et al. Ligation of CD40 activates interleukin 1β-converting enzyme (caspase-1) activi ty in vascular smooth muscle and endo thelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1β. *J Biol Chem* 1997; 272: 19569-19574.
15. Maier JAM, Barenghi M, Bradamante S, et al. Modulators of oxidized LDL-induced hyperadhesiveness in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 673-677.
16. Topper JN, Cai J, Falb D, et al. Identifi cation of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 10417-10422.
17. Freyschuss A, Xiu R, Zhang J, et al Vitamin C reduces cholesterol-induced microcirculatory changes in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1178-1184.
18. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascor bic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification: anti-rather than prooxidant activity of vitamin C in the

presence of transition metal ions. *J Biol Chem* 1993; 1304-1309.
19. Halliwell B. Ascorbic acid: hype, hoax, or healer? *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1891-1892.
20. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, et al. Vitamin C improves endothelium-depen dent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterole mia. *Circulation* 1997; 95: 2617-2622.
21. Ketsawatsakul U, Akarasereenont P, Techatraisak K, et al. Effects of ascorbic acid on the expression of cyclooxygenase isoforms in interleukin-1β treated human umbilical vein endothelial cells. Abstract book, 38th Siriraj Scientific Congress, Siriraj Hospital, 2nd –6th March 1998; p162-163.
22. Hennekens CH, Gaziano JM, Manson JE, et al. Antioxidant vitamin-cardiovascular disease hypothesis is still promising, but still unproven: the need for randomized trials. *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl.): S1377-S1380.
23. Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS, et al. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness: the ARIC study. *Circulation* 1995; 92: 2142-2150.
24. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defence. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: S985-S990.
25. Halliwell B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? *BMJ* 1993; 307: 885-886.
26. Chen T, Tseng H, Yang J, et al. Effect of antioxidant in endothelial cells exposed to oxidized low density lipoproteins. Life science 1998; 62: 277-282.
27. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33-50.
28. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, et al. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93: 1107-1113.
29. Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceu tical Research* 1996; 13: 649-657.
30. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxida tion: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57 (suppl.): S15-S25.
31. Halliwell B. Antioxidant characteriza tion: methodology and mechanism. *Biochem Pharmcol* 1995; 49: 1341-1348.
32. Iuliano L, Colavita AR, Camastra C, et al. Protection of low density lipoprotein oxidation at chemical and cellular level by the antioxidant drug dipyridamole. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1438-1446.
33. Halliwell B. Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propa gation, and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 61 (suppl.): S670-S677.
34. Naito M, Hayashi T, Iguchi A. New approaches to the prevention of athero sclerosis. *Drugs* 1995; 50: 440-453.
35. Weber C, Erl W, Weber K, et al. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 1996; 93: 1488-1492.
36. Wohlfeil ER, Campbell WB. 25-hydroxy cholesterol enhances eicosanoid produc tion in cultured bovine coronary artery endothelial cells by increasing prosta glandin G/H synthase-2. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345: 109-120.
37. Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 11689-11693.
38. Klein T, Reutter F, Schweer H, et al. Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$ in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1658-1665.
39. Delanty N, Reilly M, Pratico D, et al. 8-Epi $PGF_{2\alpha}$: specific analysis of an isoeico sanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42: 15-19.
40. Akarasereenont P. The inducible isoform of cyclo-oxygenase (COX-2): new target for antiinflammatory therapy. *Thai J Pharmacol* 1997; 19: 33-42.
41. Vita JA, Frei B, Holbrook M, et al. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 1998; 101: 1408-1414.
42. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxi dase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.

43. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an anti oxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1866-1874.
44. Eiserich JP, Vliet A, Handelman GJ, et al. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl.); s1490-s1500.
45. Azen SP, Qian D, Mack WJ, et al. Effect of supplementary antioxidant vitamin intake on carotid arterial wall intima-media thickness in a controlled clinical trial of cholesterol lowering. *Circulation* 1996; 94: 2369-2372.
46. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361.
47. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and anti oxidant. *Clin Cardiol* 1993; 16 (suppl.): S6-S9.
48. Duell PB. Prevention of atherosclerosis with dietary antioxidants: fact or fiction? *J Nutr* 1996; 126: 1067-1071.

เรื่องของยา

การค้นพบยารักษาโรคจิตเภทคลอร์โปรมาซีน

รศ.พ.อ.ดร.บพิตร กลางกัลยา

ถ้าจะนับว่ายาตัวใดมีส่วนสำคัญที่สุดในการจุดพลุให้เกิดวิชาจิตเภสัชวิทยา (psychopharmacology) คงต้องยกให้คลอร์โปรมาซีน แน่ละ ก่อนหน้านั้นมีการใช้ยาหลายชนิดที่มีผลต่อจิตประสาท เช่นการใช้ มอร์ฟีนแอมเฟตามีน ลิเธี่ยม และการพบฤทธิ์ของ LSD เป็นต้น แต่ข้อบ่งใช้ของยาเหล่านี้ในผู้ป่วยจิตเวชก็ยังไม่ชัดเจน และในยุค ค.ศ.1940-1950 นั้น ก็มีแนวความคิดที่ขัดแย้งกันอยู่มาก มีกระแสต่อต้านว่าวัตถุหรือยามิได้มีผลต่อจิต พวกที่ริเริ่มใช้ยาเพื่อมีผลต่อจิตจึงกลายเป็นพวกนอกรีตไป เมื่อพิสูจน์ได้ว่าคลอร์โปรมาซีนมีผลต่อผู้ป่วยโรคจิตจริง จึงเป็นหลักฐานชิ้นสำคัญที่ทำให้มีการศึกษาผลของยาอื่นๆ ทางจิตเวชตามมา และขยายความรู้ทางจิตเภสัชวิทยาอย่างมากมายในเวลาเพียงไม่ถึง 50 ปี ถึงปัจจุบัน

ดังนั้นประวัติศาสตร์ของคลอร์โปรมาซีนจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจ เพราะการจะให้เครดิตว่าใครบ้างเป็นผู้ที่ค้นพบยานี้จะต้องมีการตรวจสอบลำดับขั้นตอนให้ถูกต้อง

ยึดตามข้อเขียนของปรมาจารย์ทางจิตเภสัชวิทยา 2 ท่านตามที่อ้างไว้ท้ายนี้ (1, 2) สามารถลำดับเหตุการณ์สำคัญได้ดังนี้

- **ระหว่าง ค.ศ.1940-1950** มีการใช้ยากลุ่ม phenothiazines เป็นยาฆ่าพยาธิ และเป็นยาต้านฮิสตามีน
- 1950 H. Laborit ศัลยแพทย์ ชาวฝรั่งเศส ใช้ยากลุ่มนี้คือ promethazine เป็นยาต้านฮิสตามีนเพื่อเสริมฤทธิ์กับยาสลบในการเตรียมผ่าตัดผู้ป่วย และได้เสนอไปยังบริษัทผู้ผลิตยา (Rhone- Poulenc) เพื่อขอให้สังเคราะห์ยากลุ่มนี้ที่มีผลกดสมองมากขึ้น
- 1950 P. Charpentier แห่งบริษัท Rhone-Poulenc สังเคราะห์ chlorpromazine (CPZ) (บางข้อมูลว่าสังเคราะห์หลายๆตัวไว้อยู่แล้วบางข้อมูลว่าสังเคราะห์ตามคำขอของ Laborit)
- 1951 ยาถูกส่งให้ Laborit ทดสอบผล ในขณะเดียวกันก็ถูกส่งให้แพทย์และจิตแพทย์อีกหลายกลุ่มทดสอบผลด้วย
- 1951 (ปลายปี) Sigwald & Bouttier รายงานผลทางจิตเวชของ CPZ P. Koetschet, S. Courvoisier ศึกษาพบผลทางจิตเวชของ CPZ แต่รายงานผลในปี 1953
- 13 ก.พ.1952 H. Laborit รายงานผลของ CPZ ว่ามีผล "detachment" พร้อมกับเสนอแนะว่าน่าจะมีที่ใช้ในผู้ป่วยจิตเวช ตีพิมพ์ใน Press Med. 60:206-208.

(ต่อหน้า 66)

RETURN OF THE SPIRONOLACTONE

Oranee Tangphao

Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA 94305-5130, USA

ABSTRACT

Spironolactone has been a well-known diuretic of choice in treatment of ascites. It has also been used in the treatment of edema and hypertension. Recent data supported the evidence of aldosterone escape in patients with heart failure after treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. This partial escape of renin angiotensin aldosterone blockade leads to the additional potential therapeutic effect of spironolactone. As an aldosterone receptor blocker, spironolactone may exhibit a therapeutic effect in patients with aldosterone escape phenomenon. Several clinical studies have been conducted to explore this new approach in patients with congestive heart failure and other cardiovascular diseases/disorders. Preliminary data supported the possible benefit in several groups of patients including heart failure, hypertension, acute myocardial infarction. At the present time, these data are limited to certain clinical conditions and may not be able to apply in all general clinical settings. The available publications are extensively reviewed in this paper. Further clinical efficacy evaluation should be conducted to support the use of spironolactone for its new indications. In conclusion, spironolactone, as an aldosterone blocker, is being investigated as an adjunctive drug of choice in patients with aldosterone escape phenomenon.

Key words: aldosterone, aldosterone escape, spironolactone, heart failure

Address correspondence and reprint requests to: Oranee Tangphao, MD. Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA 94305-5130, USA

บทนำ

เมื่อกล่าวถึง spironolactone นอกจากจะเป็นยาที่รู้จักและใช้กันมานาน ยานี้ยังเป็น ยาต้นแบบ ของยาขับปัสสาวะ ในกลุ่ม potassium sparing spironolactone ออกฤทธิ์เป็น aldosterone antagonist (หรือเรียกอีกชื่อในปัจจุบันว่า mineralocorticoid antagonist หรือ MR) spironolactone ออกฤทธิ์โดยแย่งจับกับ mineralocorticoid receptor แบบ competitive โดยที่ไม่กระตุ้นให้เกิด signal transduction ดังนั้น spironolactone จึงออกฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ endogenous aldosterone นั่นเอง

ฤทธิ์ที่สำคัญและรู้จักกันดีของ aldosterone คือฤทธิ์ที่ไต โดยที่นี่ aldosterone จะถูกนำเข้าสู่ เซลล์เยื่อบุ โดยผ่านทาง basolateral membrane และจะเข้าไปจับที่ MR และเกิดเป็น MR-aldosterone complex ซึ่งจะเข้าสู่ นิวเคลียสของเซลล์และออกฤทธิ์ที่ DNA ชนิดที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ และควบคุม expression ของ aldosterone-induced proteins (AIPs)[1] aldosterone receptor จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ steroid hormones, thyroid hormones, vitamin D และ retinoids[1]

AIPs มีหน้าที่หลายอย่างในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกฤทธิ์ต่อ Na^+ channel ผลของการมี AIPs เพิ่มขึ้นนั้นจะทำให้มีการเคลื่อนไหวของ Na^+ มากขึ้นที่เยื่อบุผิวของท่อไต (luminal membrane) และเพิ่มการทำงานของ Na^+ pump ซึ่งทำให้มีการส่งผ่าน NaCl ผ่านเซลล์เยื่อบุมากขึ้น ผลโดยรวมทางคลินิกของ aldosterone จะทำให้เกิดการคั่งของโซเดียม โปแตสเซียมในเลือดต่ำ และความดันโลหิตสูงได้ ระยะหลังมีการศึกษาฤทธิ์อื่นๆของ aldosterone อีกหลายอย่าง และพบว่า aldosterone เกี่ยวข้องกับการเกิด ventricular arrhythmia โดยอาจเกี่ยวข้องกับการสูญเสียแมกนีเซียม หรือ เกี่ยวข้องกับการควบคุมระบบประสาทอัตโนมัติ หรืออาจเกิดมาจากการที่ aldosterone ทำให้เกิด myocardial ischemia หรือ fibrosis[2,3] และเป็นที่ยอมรับกันว่าการเกิด ventricular arrhythmia อาจมีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราตายของผู้ป่วย ดังนั้นการที่มี aldosterone มากกว่าปรกติจึงไม่น่าจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วยที่มีโรคของหัวใจและหลอดเลือดอยู่ก่อน การที่ aldosterone มีฤทธิ์เป็น arrhythmogenic substance[4] จึงเป็นที่มาของแนวทางการรักษาที่ว่า การหาวิธียับยั้งฤทธิ์ของ aldosterone น่าจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วยหัวใจวายหรือความดันโลหิตสูง

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของ aldosterone มากขึ้นเรื่อยๆและพบว่า ฤทธิ์ของ aldosterone ที่อวัยวะอื่นๆนอกเหนือจากไตอาจมีบทบาทในการควบคุมภาวะปรกติของร่างกายและอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ การศึกษาวิจัยระยะหลังพบว่า MR ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะที่ไตแต่กระจายอยู่ในหลายระบบรวมทั้งระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบประสาทส่วนกลางซึ่งเป็นที่สนใจกันมากขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางคลินิกในระบบอื่นๆนอกจากไตก็ยังมีไม่มากนัก ในการทดลองทางห้องปฏิบัติการพบว่า หลอดเลือดสามารถสร้าง aldosterone ได้ และ aldosterone ที่สร้างขึ้นก็สามารถออกฤทธิ์ได้ที่หลอดเลือดและหัวใจ[5] ฤทธิ์ของ aldosterone ที่หัวใจและหลอดเลือดเป็นที่

สนใจกันมากในแง่การเกิดความดันโลหิตสูง ภาวะหัวใจวาย และการทำงานผิดปรกติของหัวใจทั้งในแง่การบีบตัวและจังหวะการเต้น ข้อมูลในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับฤทธิ์ของ aldosterone ต่อทั้ง เซลล์บุหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ การที่ เซลล์บุหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ[5,6] สามารถสร้าง aldosterone ได้นั้นได้รับความสนใจเป็นอันมากและมีข้อมูลสนับสนุนหลักฐานดังกล่าวมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในแง่ฤทธิ์ของ aldosterone เอง และการที่ aldosterone ทำให้ angiotensin II มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้น[7] ผลสรุปโดยรวมในแง่ฤทธิ์ของ aldosterone ไม่เป็นผลดีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยเฉพาะในผู้ป่วยหัวใจวาย นอกจากนั้นยังพบว่า ระดับ aldosterone มีความสัมพันธ์กับ left ventricular mass เช่นเดียวกับหน้าที่โดยรวมของ angiotensin converting enzyme[8] ในการศึกษานี้ได้ศึกษาในอาสาสมัครปรกติทั้งที่มีและไม่มีความดันโลหิตสูง

ในแง่ของการสร้าง aldosterone ปัจจุบันพบว่า angiotensin เป็นเพียงหนึ่งในปัจจัยหลายประการที่สามารถกระตุ้นการหลั่ง aldosterone ได้ ปัจจัยอื่นๆได้แก่ ระดับโปแตสเซียมในเลือด endothelin, cathecholamine, histamine, acetylcholine และ prostaglandin เป็นต้น[9,10] นอกจากนั้นยังมีปัจจัยบางประการที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างและการหลั่ง aldosterone ได้แก่ heparin, atrial natriuretic peptide (ANP) เป็นต้น[9,10] ปัจจัยต่างๆเหล่านี้ทำงานร่วมกันในการรักษาสมดุลย์ของระดับ aldosterone ในร่างกายทั้งที่สร้างจากต่อมหมวกไตและที่อื่นๆ

Aldosterone escape phenomenon

ตั้งแต่ปี 1981 Staessen et al. ได้ติดตามศึกษาระดับของ angiotensin II, renin และ aldosterone ในพลาสมาของผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ได้รับการรักษาด้วย angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) เป็นเวลานานถึง 1 ปี[11] พบว่าระดับ angiotensin II ลดลงหลังจากได้รับยา ACEI ในขณะที่ระดับ renin เพิ่มขึ้น แต่สิ่งที่เป็นที่น่าสังเกต คือ ระดับของ aldosterone ในเลือดลดลงอย่างชัดเจนในระยะแรกแต่กลับสู่ระดับปรกติหรือสูงกว่าปรกติในเวลาต่อมา ปรากฏการณ์ rebound นี้เกิดขึ้นหลังได้รับ ACEI แม้ว่าจะเพิ่มขนาด ACEI ขึ้นก็ตาม ต่อมาได้มีการศึกษาอีกหลายครั้งในกลุ่มที่แตกต่างกันไป พบว่าปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นจริงในผู้ป่วยที่ได้รับ ACEI ระยะเวลานานและเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า aldosterone escape[11] ปรากฏการณ์นี้พบทั้งในผู้ป่วยหัวใจวาย[12-14] ผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน[15] และผู้ป่วยที่กล้ามเนื้อหัวใจทำงานไม่ปรกติ (left ventricular dysfunction)[16]

ตามที่ได้อธิบายมาแล้วว่า aldosterone ไม่ได้ให้ผลที่ดีต่อผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด และจากฤทธิ์ที่เป็น arrhythmogenic อาจเกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการป่วยและตายของผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด เมื่อเกิด aldosterone escape phenomenon ขึ้นจึงไม่น่าจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วย แนวทางการรักษาจึงมุ่งเน้นไปที่

aldosterone antagonist เพื่อขัดขวางฤทธิ์ของ aldosterone โดยตรง นอกจากฤทธิ์ที่กระตุ้นให้การเต้นของหัวใจผิดปรกติแล้ว aldosterone ยังเกี่ยวข้องกับการสร้าง collagen และการเกิด remodeling ของหัวใจอีกด้วย[17,18] ซึ่งก็ไม่น่าจะเป็นผลดีในผู้ป่วยหัวใจวายหรือผู้ป่วยที่มีการทำงานของหัวใจไม่ปรกติอยู่ก่อน

กลไกการเกิด aldosterone escape มีสมมติฐานหลายประการที่พยายามอธิบายการที่ aldosterone กลับเพิ่มขึ้นอีกหลังจากที่ลดลงเมื่อได้รับ ACEI อาจเกิดเนื่องจากการสร้าง aldosterone ถูกกระตุ้นโดยปัจจัยหลายประการ ได้แก่ adrenocorticotropic hormone, hyperkalemia, hypermagnesemia, angiotensin II, และ endothelin หรืออาจเกิดเนื่องมาจากการที่ clearance ของ aldosterone ลดลงเมื่อผู้ป่วยอยู่ในภาวะหัวใจวายซึ่งทำให้มีเลือดไปเลี้ยงที่ตับลดลง[11,19,20]

คำถามต่อมาคงเป็นว่า แม้ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นจริง และมักเกิดเมื่อผู้ป่วยได้รับยาไปแล้วระยะหนึ่ง บางรายงานกล่าวว่า อาจเกิดขึ้นหลังได้รับยาไปแล้วเพียง 12 สัปดาห์ ปรากฏการณ์นี้มีความสำคัญทางคลินิกมากน้อยเพียงไร และการที่ aldosterone เพิ่มขึ้นเป็นผลเนื่องจากการที่ระดับโปแตสเซียมในเลือดลดลงทำให้ร่างกายตอบสนองโดยการกระตุ้นให้ aldosterone หลั่งมากขึ้น หรือเป็นปรากฏการณ์ที่ยาไม่สามารถกด renin-angiotensin-aldosterone ได้อย่างสมบูรณ์แบบทำให้มี aldosterone ออกมาในระยะหลังและมีผลต่อการเกิดหรือการดำเนินโรคในระยะต่อมา

อะไรคือบทบาทใหม่ของ spironolactone?

จากการศึกษาในระยะหลังสนับสนุนว่า aldosterone มีบทบาทในการควบคุมสมดุลย์โซเดียมทั้งในภาวะปรกติและการเกิดโรคหัวใจวาย โดยทั่วไปการรักษาสมดุลย์ของน้ำและโซเดียมนั้นต้องอาศัยระบบ neurohormonal หลายระบบร่วมกัน การที่ระบบ angiotensin II และ aldosterone ถูกกระตุ้นเป็นระยะเวลานานอาจมีส่วนทำให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานล้มเหลวได้[9,16,20,21]

จากฤทธิ์ของ aldosterone เองและตลอดจนหลักฐานทางคลินิกที่สนับสนุนว่าการที่มี aldosterone สูงโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีหัวใจวายอยู่ด้วยนั้นเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคและเป็นเหตุให้มีอัตราตายสูงขึ้น จึงทำให้มีแนวทางในการรักษาภาวะหัวใจวายที่เกิดขึ้นโดยเฉพาะในกรณีที่ได้รับ ACEI ไประยะหนึ่งแล้วอาการกลับเลวลงหรือไม่ดีขึ้น โดยการนำ spironolactone มาใช้ร่วมไปกับการรักษาที่ให้อยู่ก่อนก็อาจเป็นทางออกสำหรับผู้ป่วยที่มี aldosterone สูงกว่าปรกติ ซึ่ง spironolactone หรือยาที่ออกฤทธิ์ขัดขวาง aldosterone จะช่วยรักษาระดับโปแตสเซียมและแมกนีเซียม ขณะเดียวกันจะช่วยลดการกระตุ้นให้เกิดการเต้นผิดปกติของหัวใจ และน่าจะมีฤทธิ์ cardioprotective effect ร่วมด้วย เนื่องจากสามารถป้องกัน myocardial fibrosis ได้[2,3,18] ฤทธิ์ของ spironolactone ที่ยับยั้งการเกิด myocardial fibrosis[22,23] นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการที่ spironolactone ยับยั้งฤทธิ์ของ aldosterone

ที่ไปกระตุ้นให้เกิด upregulation ของ angiotensin II receptor subtype 1 ที่หัวใจ [7]

การศึกษาทางคลินิกจนถึงปัจจุบัน

โรคหัวใจวาย เป็นปัญหาที่สำคัญทางคลินิกที่ทำให้ผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดมีอัตราตายและอัตราการป่วยสูงและเป็นปัญหาทางการรักษา ปัจจุบันนี้เชื่อกันว่า renin angiotensin aldosterone system มีบทบาทอย่างมากในการเกิดหัวใจวาย และยังมีผลเกี่ยวเนื่องกับการรักษาด้วยยาหลายชนิด โดยในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า ACEI เป็นยาที่สำคัญที่สุดในการรักษา เนื่องจากสามารถลดและป้องกันหัวใจห้องล่างซ้ายโต[24] ช่วยให้หัวใจทำงานมีประสิทธิภาพดีขึ้นและลดระยะเวลาการรักษาในโรงพยาบาล และที่สำคัญที่สุดคือเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของผู้ป่วย (CONSENSUS)[24-26] โดยทั่วไปการใช้ยาขับปัสสาวะในผู้ป่วยโรคหัวใจวายมักใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการบวมน้ำร่วมด้วย อย่างไรก็ดีพบว่ายาขับปัสสาวะจะกระตุ้นระบบ renin angiotensin system เป็นผลให้ renin และ angiotensin เพิ่มขึ้น[19] ทำให้หลอดเลือดตีบตัว (vasoconstriction) และมีการคั่งของน้ำซึ่งไม่เป็นผลดีกับภาวะต่าง ๆที่ทำให้เกิดหัวใจวาย โดยทั่วไปจึงไม่ให้ยาขับปัสสาวะเพียงตัวเดียวแต่จะให้ยาขับปัสสาวะคู่ไปกับ ACEI เพื่อลดการกระตุ้นของ renin angiotensin system อย่างไรก็ดี ACEI ก็ไม่สามารถจะยับยั้งการกระตุ้นของ renin angiotensin ได้ทั้งหมดตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ aldosterone escape

จากการศึกษาในผู้ป่วยหัวใจวายที่ไม่สามารถควบคุมได้ด้วยยาขับปัสสาวะและ digoxin พบว่าในกลุ่มที่มีระดับ aldosterone สูงจะมีโอกาสรอดชีวิตได้ต่ำที่สุด[13] ถึงแม้ข้อมูลส่วนมากที่มีในปัจจุบันจะได้มาจากผู้ป่วยที่ได้รับ ACEI อยู่ด้วยเนื่องจาก ACEI เป็นการรักษามาตรฐานในผู้ป่วยหัวใจวาย ข้อมูลระยะหลัง ๆเริ่มสนับสนุนฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ของ aldosterone ในผู้ป่วยหัวใจวาย แม้จะไม่ได้รับการรักษาด้วย ACEI ก็ตาม การยับยั้งฤทธิ์ของ aldosterone ในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดจึงอาจเป็นผลดีไม่ว่าในกรณีที่ได้รับ ACEI ร่วมด้วยหรือไม่ก็ตาม ในทางคลินิกผู้ป่วยหัวใจวายที่มี aldosterone มากกว่าปรกติมักมีอาการแสดงหรือผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่บ่งชี้ไปถึงฤทธิ์ของ aldosterone ได้แก่ การที่มีโซเดียมและน้ำคั่งในขณะที่มีแมกนีเซียมและโปแตสเซียมต่ำร่วมไปกับการที่มี myocardial hypertrophy หรือ fibrosis มีหลอดเลือดตีบตัวโดยที่ baroreflex ถูกยับยั้ง[20]

มีข้อมูลที่สนับสนุนผลดีของการให้ spironolactone ในผู้ป่วยหัวใจวายคือ Berdellou et al ได้ทำการศึกษาผลการรักษาผู้ป่วยด้วย spironolactone เปรียบเทียบกับ captopril ซึ่งเป็น ACEI ที่ได้รับการศึกษายืนยันว่าใช้ได้ผล การศึกษาในประเทศฝรั่งเศสทำในผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจวายจำนวน 676 คน[27] และเป็นการศึกษาแบบสหสถาบัน (multicenter trial) ที่มีการสุ่มแต่เป็น open study ที่มี parallel group โดยเปรียบเทียบการให้ spironolactone 75 มก./วัน กับ captopril 67.5 มก./วัน พบว่าในผู้ป่วยหัวใจวายที่มีความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง เมื่อได้รับยาทั้ง 2 ขนานในระยะสั้นผลการรักษาไม่มีความแตกต่างกัน จึงพอ

สรุปได้ว่า spironolactone ให้ผลการรักษากับผู้ป่วยหัวใจวายในระยะสั้นไม่ด้อยไปกว่า captopril นอกจากนั้นการใช้ spironolactone ยังมีข้อดีกว่า captopril ในแง่ความดันโลหิต เนื่องจาก captopril ทำให้ความดันโลหิตลดลงจนอาจเป็นอันตรายในผู้ป่วยหัวใจวายได้ ซึ่งอาการข้างเคียงนี้ไม่พบในผู้ป่วยที่ได้รับ spironolactone การวิจัยในระยะต้นจะใช้ spironolactone ในขนาดที่ค่อนข้างสูง โดยมากจะอยู่ในระหว่าง 100-120 มก./วัน อย่างไรก็ดีในเวลาต่อมาได้มีการปรับขนาดที่แนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยหัวใจวายของ spironolactone ลงเหลือ 25 มก./วัน ตามผลงานการศึกษาวิจัยของ RALES[28] นอกจากนั้นยังแนะนำให้ใช้ ACEI ร่วมกับ spironolactone เพื่อให้ผลการรักษาดีขึ้นโดยมีอาการข้างเคียงน้อยลง[29-30] การให้ spironolactone นอกจากจะมีผลดีต่อภาวะหัวใจวายแล้วยังมีผลดีในแง่การเต้นของหัวใจ พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ spironolactone มี premature ventricular contraction ลดลง และก็น่าจะเป็นผลดีที่จะทำให้อัตราตายลดลง[4,30]

ในการวิจัยสำหรับภาวะที่มีความดันโลหิตสูงพบว่า spironolactone สามารถลดความดันโลหิตได้แต่ต้องใช้ขนาดสูง (100-150 มก./วัน) โดยเฉพาะเมื่อใช้ตัวเดียว[31] นอกจากจะลดความดันโลหิตแล้ว spironolactone ยังมีผลดีอื่น ๆในแง่ของการทำงานของหัวใจ และการเกิดหัวใจโตหรือ fibrosis สำหรับในกรณีที่ผู้ป่วยมีหัวใจห้องล่างทำงานผิดปรกติไปแล้วก็พบว่า การให้ spironolactone สามารถแก้ไขภาวะดังกล่าวได้ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงในระยะแรก[22,29,30] โดย spironolactone จะช่วยทั้งในแง่ การทำงานของหัวใจห้องล่าง, ลดการเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ (เป็นผลเนื่องจากการรักษาสมดุลย์ของแมกนีเซียมร่วมกับลดการกระตุ้นจาก cathecholamine) และยังช่วยลดอาการแทรกซ้อนที่เกิดจาก myocardial fibrosis[22] นอกจากนั้นการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่าการให้ spironolactone ในหนูที่มีความดันโลหิตสูงยังช่วยป้องกันการเกิด aortic fibrosis ได้อีกด้วย[23] และผลการป้องกันนี้ดีกว่าการให้ ACEI เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาที่เป็นที่อ้างอิงมากในเรื่องของ spironolactone กับภาวะหัวใจวายก็คงจะไม่พ้นโครงการวิจัยที่เรียกย่อ ๆว่า RALES หรือ The Randomized Aldactone Evaluation Study[27] การศึกษานี้เป็นการศึกษา cardioprotective effect ของ spironolactone ในผู้ป่วยหัวใจวายจำนวน 1,663 ราย โดยให้ยาในขนาดต่าง ๆกัน เริ่มต้นที่ 12.5 มก./วัน ร่วมกับการรักษาตามปรกติ ผลปรากฏว่าฤทธิ์ของ spironolactone ให้ผลดีแม้ในขนาดที่ต่ำที่สุด อย่างไรก็ดีการศึกษาถึงอัตราตายในระยะยาวใช้ยาขนาด 25 มก./วัน เป็นหลัก พบว่า มีผลดีต่อหัวใจโดยมี cardioprotective effect และมีอาการข้างเคียงน้อยมาก[32] และในขนาดที่ใช้นี้สามารถให้ร่วมไปกับ ACEI ได้อย่างปลอดภัยในผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปรกติ ผลการลดอัตราตายของผู้ป่วยหัวใจวายนี้เสริมกับผลการลดอัตราตายของ ACEI

แนวทางการใช้ spironolactone ในโรคหัวใจวายในปัจจุบัน

แนวทางการรักษาโรคหัวใจวายแบบเรื้อรัง (chronic heart failure) โดยเฉพาะกรณีที่รุนแรง ซึ่งจัดทำขึ้นโดยกลุ่มผู้เชี่ยวชาญเมื่อปี 1999 นั้น แนะนำให้พิจารณาใช้ spironolactone ขนาดต่ำ 25 มก./วัน[24] ร่วมด้วยในผู้ป่วยที่มีอาการหนักมาก แม้จะไม่ได้จัด spironolactone ไว้ในกลุ่มที่แนะนำให้ใช้ทั่วไปก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจาก spironolactone ลดอัตราตายในผู้ป่วยหัวใจวายเรื้อรังอย่างชัดเจน

อภิปราย

จากข้อมูลทางห้องปฏิบัติการและผลการศึกษาทางคลินิกสนับสนุนว่า aldosterone เป็น neurohormonal mediator อีกตัวหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับการเกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด การควบคุมการสร้างและการหลั่ง Aldosterone อาจเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับระบบ renin angiotensin system Aldosterone สามารถสร้างจากหลายอวัยวะนอกจากต่อมหมวกไตและสามารถออกฤทธิ์ทั้งที่ไตและที่ระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยตรง อย่างไรก็ดีฤทธิ์ของ aldosterone ในภาวะที่ผู้ป่วยมีโรคหัวใจและหลอดเลือดอยู่นั้นไม่เป็นผลดีต่อการดำเนินโรคของผู้ป่วย เนื่องจาก aldosterone ทำให้เกิดการทำลายของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardium) และเกิดพังผืดตามมา นอกจากนั้นยังเป็นผลให้เกิดความดันโลหิตสูงและเกลือแร่ไม่สมดุลย์ ซึ่งนำไปสู่ภาวะหัวใจเต้นผิดปรกติได้

aldosterone escape phenomenon เป็นปรากฏการณ์ที่ยอมรับกันดีในปัจจุบันว่าการใช้ ACEI ไม่สามารถยับยั้ง aldosterone ได้ตลอดไป การยับยั้งฤทธิ์ของ aldosterone จึงน่าจะมีผลดีในการรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะในกรณีของหัวใจวายและความดันโลหิตสูง ไม่ว่าผู้ป่วยจะได้รับ ACEI ร่วมอยู่ด้วยหรือไม่ spironolactone ออกฤทธิ์เป็น aldosterone antagonist จึงน่าจะมีบทบาทในการรักษา อย่างไรก็ดีผลการรักษาทางคลินิกยังขึ้นกับปัจจัยอีกหลายประการ เช่น อาการข้างเคียงของยา และภาวะของ endogenous aldosterone ในผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งอาจขึ้นกับความรุนแรงและภาวะโรคหัวใจของผู้ป่วย

ในกลุ่มผู้ป่วยความดันโลหิตสูง การใช้ spironolactone ยังไม่มีหลักฐานว่าทำให้อัตราตายลดลงเมื่อเทียบกับการให้ยาขับปัสสาวะอื่นๆหรือการให้ ACEI ดังนั้นจึงไม่ได้แนะนำให้ใช้กับผู้ป่วยทุกราย ในการใช้เป็นยาตัวเดียวในการรักษามักต้องให้ในขนาดสูงจึงมีโอกาสเกิดอาการข้างเคียงได้มาก ในกรณีที่ใช้ร่วมกับยาอื่น อาจมีผลดีจากการยับยั้งฤทธิ์ของ aldosterone ทำให้ลดอาการข้างเคียงของความดันโลหิตสูงที่เกี่ยวข้องกับ aldosterone

สำหรับในกลุ่มของผู้ป่วยหัวใจวายคงต้องแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง การให้ spironolactone เสริมเข้าไปจากการรักษาที่ให้อยู่ หรือแม้แต่ให้ spironolactone เพียงตัวเดียวในกลุ่มที่อาการไม่มากมีแนวโน้มว่าน่าจะได้ประโยชน์ทางคลินิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการแสดงของการที่มี

aldosterone มากเกินไปแม้จะยังไม่มีหลักฐานการศึกษาในระยะยาวมายืนยันก็ตาม การศึกษาที่สนับสนุนการใช้ spironolactone ในกลุ่มแรกนี้มักเป็นการศึกษาทางคลินิกที่เป็น open trial สำหรับกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มีอาการมากควรให้ spironolactone ร่วมไปกับการรักษาที่ได้รับอยู่เนื่องจากมีหลักฐานชัดเจนว่าช่วยลดอัตราตายในผู้ป่วยกลุ่มนี้จาก RALES study

บทสรุป

โดยสรุป บทบาทของ spironolactone ในการรักษาโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือดในฐานะที่เป็น aldosterone antagonist เป็นที่น่าจะจับตาดู แนวโน้มของผลงานวิจัยบ่งชี้ไปในทางเดียวกันว่า aldosterone เป็น neurohormonal mediator อีกตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด การให้ ACEI เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการควบคุม aldosterone เนื่องจาก aldosterone สามารถถูกกระตุ้นจากปัจจัยอื่นนอกเหนือจาก renin angiotensin system การยับยั้ง aldosterone ให้ผลดีในทางคลินิกในภาวะความดันโลหิตสูงและหัวใจวาย อย่างไรก็ตีในผู้ป่วยที่หัวใจวายรุนแรงแบบเรื้อรัง การให้ spironolactone เสริมกับการรักษาที่ได้รับอยู่น่าจะเป็นทางออกอีกทางในการรักษา โดยมีการศึกษายืนยันว่า การให้ spironolactone เสริมไปนี้จะช่วยลดอัตราตายของผู้ป่วยในกลุ่มนี้

นอกจากนี้การศึกษาการให้ spironolactone ร่วมกับ ACEI ในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจวายเรื้อรังร่วมกับ diabetic nephropathy ก็เป็นเรื่องหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะการใช้ยาขับปัสสาวะกลุ่ม potassium sparing ร่วมกับ ACEI รักษาผู้ป่วยความดันโลหิตสูงร่วมกับ diabetic nephropathy จะทำให้มีระดับโปตัสเซียมในเลือดสูงได้

เอกสารอ้างอิง

1. Jackson EK. Diuretics in: Goodman & Gilmam's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th edition. 1996 by Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. McGraw-Hill, New York (USA), pp706-709
2. Sun Y, Ramires FJA, Weber KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 138-147.
3. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac intersititium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; 83: 1849-1865.
4. Kohya T, Suzuki , Kaji T, et al. Effects of the aldosterone antagonist spironolactone on ventricular arrhythmias and serum electrolyte levels in congestive heart failure. *Clin Drug Invest* 1995; 10: 264-275.
5. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, et al. Vascular aldosterone: biosynthesis and a link to angiotensin II induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 24316-24320.
6. Silvestre J-S, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. *J Biol Chem* 1998; 273: 4883-4891.
7. Robert V, Heymes C, Silvestre J-S, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-986.
8. Schunkert H, Hense H-W, Muscholl M, et al. Association between circulating components of the renin-angiotensin-aldosterone system and left ventricular mass. *Heart* 1997; 77: 24-31.

9. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, et al. for the CONSENSUS Trial Study Group. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. *Circulation* 1990; 82: 1730-1736.
10. Swedberg K, Eneroth P,Kjekshus J, et al. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82: 1730-1736.
11. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, et al. Rise in plasma concentration of aldosterone during long term angiotensin II suppression. *J Endocrinol* 1981; 91: 457-465.
12. Cleland JGF, Dargie HJ, Hodsman GP, et al. Captopril in heart failure: a double blind controlled trial. *Br Heart J* 1984; 52: 530-535.
13. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, et al. Effect of enalapril and neuroendocrine activation on prognosis in severe congestive heart failure (follow up of the CONSENSUS trial). CONSENSUS study group. *Am J Cardiol* 1990; 66: 40D-44D.
14. Struthers AD. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in Chronic Heart Failure. *J Cardiac Failure* 1996; 2: 47-54.
15. Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E, et al Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockage in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol* 1993; 33: 40-55.
16. Pitt B "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 145-149.
17. Robert V, Thiem NV, Cheav SL, et al. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 30-36.
18. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 30-34.
19. Bayliss J, Norell M, Canepa-Anson R, et al. Untreated heart failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics. *Br Heart J* 1987; 57: 17-22.
20. Zannad F. Aldosterone and heart failure. *Eur Heart J* 1995; 16(suppl N): 98-102.
21. Swedberg K, Kjekshus J. Effect of enalapril on mortality in congestive heart failure. Survival data from the CONSENSUS trial. *Drugs* 1990; 39: 49-52.
22. Robledo GA and Charria DJ. Role of spironolactone in the management of hypertension: its impact on diastolic left ventricular function and cardiac structure. *Realites Cardiologiques* 1996; 99: 1-5.
23. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneous hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1152-1156.
24. Packer M, Cohn JN, Abraham WT, et al. Consensus Recommendations for the Management of Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol* 1999; 83: 26A.
25. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-1435.
26. The SOLVD Investigators. Effects of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 1991: 293-302.
27. Berdellou T, Guirchowski A, Thomas MF, et al. Comparative study of the effectiveness and tolerance of captopril and spironolactone in the outpatient treatment of cardiac insufficiency. *L'Information Cardiologique* 1990; 19: 207-211.
28. The RALES Investigators. Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure. (The Randomized Aldactone Evaluation Study). *Am J Cardiol* 1996; 78: 902-907.
29. Han Y-L, Tong M, Jing Q-M, et al. Combined therapy of captopril and spironolactone for refractory congestive heart failure. *Chinese Med J* 1994; 107: 688-692.
30. Barr CS, Lang CC, Hanson J, et al Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 1259-1265.

31. Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 753-755.
32. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-717.

NEW DRUGS

ORLISTAT: A NEW ANTIOBESITY DRUG

Oranee Tangphao

Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA 94305-5130, USA

ABSTRACT

Obesity is increasingly being recognized as a chronic disease associated with significant morbidity and mortality worldwide. Orlistat, the first lipase inhibitor, was recently introduced to the Thai market as well as other international markets. This pharmacological breakthrough compound may lead to a very promising future for obesity treatment in both initial and maintenance therapy. Fundamentally, orlistat acts as a reversible inhibitor of lipase by forming a covalent bond with lipase. Oral orlistat acts specifically on gastro-intestinal lipase to prevent dietary fat from being digested and diminishes fat absorption. The reduction of fat absorption leads to calorie deficits (compared to the same environment without orlistat) and may have a positive effect on weight management as well as serum cholesterol level and other risk factors including hypertension. Pre-clinical data of orlistat are very encouraging. Several clinical trials have been conducted to prove both the efficacy and toxicity of the compound. Efficacy on potentiating weight reduction was demonstrated on several occasions. The most common side effects noticed were gastro-intestinal symptoms. As other new and chemically breakthrough compounds, long-term side effects and efficacy need to be monitored. In conclusion, orlistat has a unique mechanism of action and can be used as an effective adjunctive therapy in obesity management.

Address correspondence and reprint requests to: Oranee Tangphao, MD. Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA 94305-5130, USA

บทนำ

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า การที่มีน้ำหนักตัวเกินหรือความอ้วนนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิด รวมทั้งเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคนิ่วในถุงน้ำดี และที่สำคัญโรคอ้วนสัมพันธ์กับอัตราการตายที่สูงขึ้น โรคอ้วนเป็นปัญหาที่พบมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากความเป็นอยู่และพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบัน อย่างไรก็ดีโรคอ้วนทางการแพทย์มี criteria ในการวินิจฉัยอย่างชัดเจนโดยพิจารณาถึงความเสี่ยงของความอ้วนในการเกิดโรคต่างๆที่มีผลกับสุขภาพ ดัชนีบ่งชี้ที่ใช้กันโดยทั่วไปมักนิยมใช้ดัชนีมวลร่างกายหรือ body mass index (BMI) เป็นตัวตัดสิน โดยที่เคยใช้ค่ามาตรฐานว่า ถ้า BMI มากกว่า 30 จัดว่าเป็นโรคอ้วน แต่ถ้าดัชนีอยู่ระหว่าง 25-30 จัดว่าน้ำหนักเกิน (over-weight)[1] อย่างไรก็ดีเมื่อไม่นานมานี้ National Institute of Health ของสหรัฐอเมริกาให้ข้อมูลว่า คนที่มี BMI เกิน 25 มีโอกาสเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจสูงกว่าคนปกติ ค่าที่ใช้ในการตัดสินใจในการเริ่มรักษาหรือควบคุมน้ำหนักจึงลดลงมาจาก 30 เป็น 25[2]

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า การที่มีน้ำหนักเกินหรือเป็นโรคอ้วนนั้นเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆตามมาได้มากขึ้น และโรคเหล่านี้นำไปสู่อัตราการตายหรืออัตราการพิการ (mortality and morbidity rate) ที่สูงกว่าประชากรที่มีน้ำหนักปกติ [1] อย่างไรก็ดี การลดน้ำหนักจะมีผลต่อการลดอัตราตายหรือพิการได้หรือไม่มากน้อยเพียงไรนั้นเป็นอีกเรื่องหนึ่ง จากการศึกษาในหลายโครงการวิจัยพบว่า การลดน้ำหนักในกลุ่มประชากรที่อ้วนหรือน้ำหนักเกินลงเพียง 5-10 % ของน้ำหนักตั้งต้นก็สามารถลดอัตราการพิการและอัตราการตายได้ในระดับหนึ่งโดยไม่จำเป็นต้องลดน้ำหนักลงจนถึง ideal body weight[2] ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีน้ำหนักเกินนั้นไม่ใช่การลดน้ำหนักให้เข้าสู่ ideal body weight เพราะเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยาก แต่การลดน้ำหนักลงเพียงบางส่วนก็มีผลดีต่อสุขภาพของผู้ป่วยแล้ว อย่างไรก็ดีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำหนักที่ลดลงกับอัตราการตายและพิการในการศึกษาต่างๆได้มาจากการศึกษาที่เป็น observational หรือ non-randomized trial ทั้งสิ้น[3] การนำข้อมูลมาใช้จึงจำเป็นต้องพิจารณาเป็นกรณีไป

ในการลดน้ำหนักตัวนั้นมีจุดประสงค์ใหญ่ๆอยู่ 2 ประการ คือ เพื่อประโยชน์ทางสุขภาพ และเพื่อความสวยงาม ในการนำยามาใช้ในการลดความอ้วนหรือควบคุมน้ำหนักนั้นควรต้องพิจารณาให้ดีว่าจุดประสงค์เพื่ออะไร ยาหรือผลิตภัณฑ์ตลอดจนโปรแกรมที่นำมาใช้นั้นน่าเชื่อถือมากน้อยเพียงไรในแง่ efficacy และ side effect นอกจากนั้นการใช้ยาหรือสารต่างๆอาจมีผลหรืออาการข้างเคียงทำให้ต้องคำนึงถึง risk-benefit ratio และในหลายกรณีที่ยาหรือผลิตภัณฑ์มีราคาสูงต้องพิจารณาถึงความคุ้มค่าร่วมด้วยเสมอ[4] สำหรับ criteria ในการประเมินโปรแกรมหรือแผนการควบคุมน้ำหนักในปัจจุบันมักอิงตาม American

programme "Weighing the Options" ซึ่งจะไม่กล่าวรายละเอียดในที่นี้

แนวทางการรักษาและควบคุมโรคอ้วนทางการแพทย์ในปัจจุบัน

ยังเป็นที่ยอมรับกันในวงการแพทย์ความอ้วนเกิดจากความไม่สมดุลย์ระหว่างปริมาณอาหารหรือพลังงานที่ได้รับกับปริมาณพลังงานที่ร่างกายเผาผลาญออกไป ในปัจจุบันวิทยาศาสตร์ได้เจริญก้าวหน้าไปมากในแง่ของ molecular biology ทำให้เราทราบว่ามีโมเลกุลหลายอย่างในร่างกายที่อาจเกี่ยวข้องหรือเป็นผลของการที่มีน้ำหนักเกิน ได้แก่ insulin, glucagon, eicosanoids, leptin และอื่น ๆ[1] อย่างไรก็ดีเมื่อมาถึงการรักษาที่เป็นที่ยอมรับก็ยังไม่พ้นการควบคุมปริมาณพลังงานที่ได้รับจากอาหารประกอบกับการเพิ่มการใช้พลังงานในกิจกรรมต่าง ๆรวมไปถึงการออกกำลังกาย[2] การรักษาที่จะเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมหรือสารที่เกี่ยวข้องในร่างกายยังไม่เป็นที่น่าพอใจและยังอยู่ในระหว่างการศึกษาค้นคว้าวิจัยเป็นส่วนมาก

ในแง่การควบคุมอาหาร และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการลดน้ำหนัก เป็นที่ยอมรับว่าการลดปริมาณพลังงานจากอาหารที่ได้รับเป็นคำตอบในการลดน้ำหนักโดยเฉพาะในระยะแรก อย่างไรก็ดีการใช้ยาในการลดปริมาณพลังงานที่ได้รับอาจออกฤทธิ์ได้หลายตำแหน่ง ได้แก่ ยาที่กดความอยากอาหารโดยออกฤทธิ์ที่สมอง (appetite suppressant) ซึ่งมักมีฤทธิ์เป็น CNS stimulant ในสมองส่วนต่าง ๆที่แตกต่างไปขึ้นกับ neurotransmittor ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่ CNS จึงอาจมีผลข้างเคียงทาง CNS ได้บ่อยและมักไม่สามารถใช้ยาได้ในระยะยาว ซึ่งทำให้ผลการลดหรือควบคุมน้ำหนักเป็นไปในระยะเวลาสั้น ๆและผู้ป่วยอาจมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอีกหลังจากหยุดยา (rebound) ถ้าไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมร่วมไปด้วย[5]

สำหรับในแง่อาหารที่แนะนำในระหว่างควบคุมน้ำหนักมีการถกเถียงกันมาก แต่สามารถแบ่งออกเป็น 2 จำพวกใหญ่ ๆคือ พวกที่ anticarbohydrate กับพวกที่ antifat[6] การบริโภคอาหารทั้งสองแบบนี้มีข้อมูลสนับสนุนที่แตกต่างกันไป การจำกัดอาหารจำพวก carbohydrate อย่างมากจะเป็นสาเหตุให้ร่างกายเกิด ketosis และทำให้ไม่อยากอาหาร แต่การเกิด ketosis อาจเป็นอันตรายร้ายแรงกับสุขภาพได้โดยเฉพาะในกรณีที่มีโรคประจำตัวร่วมอยู่ด้วย[6] ความพยายามที่จะใช้อาหารที่ให้พลังงานต่ำและมีไขมันต่ำจึงเป็นที่แนะนำมากกว่าในวงการแพทย์โดยทั่วไป[2] โดยที่ตระหนักดีว่า การจำกัดแต่ไขมันเพียงอย่างเดียวไม่ใช่การแก้ไขปัญหาทั้งหมด แต่เป็นการลดปริมาณพลังงานที่ได้รับทางหนึ่ง เนื่องจากไขมันเป็นสารอาหารที่ให้พลังงานสูงหรือที่เรียกว่า เปี่ยมไปด้วยพลังงาน (energy dense) อย่างไรก็ดีไขมันก็ยังมีความจำเป็นต่อร่างกายในระดับหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของวิตามินหลายตัวที่จำเป็นต่อร่างกายละลายได้ในไขมัน ถ้าไม่ได้รับไขมันหรือได้รับไม่เพียงพอก็อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้

ได้ [7-8] ในทางการแพทย์จึงมักยอมรับให้แนะนำคำว่า "Low fat diet" ไม่ใช่ "No fat diet" การลดน้ำหนักโดยการควบคุมอาหารให้อ่อนไขมันเพียงอย่างเดียวมักลดน้ำหนักได้เพียง 1-3 กิโลกรัม[7]

การประเมินประสิทธิภาพของยาที่นำมาใช้ในการลดหรือควบคุมน้ำหนักทางคลินิกควรมีลักษณะดังต่อไปนี้ คือ มีประสิทธิภาพในการลดน้ำหนักได้จริงทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ($\geq$ 1 ปี) [7-8] ต้องมีความปลอดภัยที่ยอมรับได้และมีข้อมูลทางการวิจัยที่สนับสนุนเพียงพอ สำหรับผลในระยะยาวนั้นถ้ามีหลักฐานสนับสนุนว่า นอกจากสามารถลดน้ำหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วก็ยังสามารถลดหรือบรรเทาโรคที่เป็นผลจากการที่มีน้ำหนักเกินเช่น เบาหวาน ไขมันในโลหิตสูง หรือความดันโลหิตสูงได้ก็จะเป็นข้อเด่นของยาตัวนั้นๆ สำหรับประสิทธิภาพในข้อนี้ต้องเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยาแต่ได้รับการดูแลอื่นๆ เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นแล้วยาควรมีความปลอดภัยในแง่การใช้ระยะยาวโดยไม่มีฤทธิ์เสพติดและไม่ทำให้เกิด rebound weight gain เมื่อหยุดยาด้วยสาเหตุใดก็ตาม[5]

Orlistat คืออะไร

สำหรับยาใหม่ที่แนะนำในฉบับนี้ เป็นยาที่จัดว่า chemical และ pharmacological breakthrough จากหลักฐานทั้งในห้องปฏิบัติการและข้อมูลทางคลินิกสนับสนุนว่า ไขมันในอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเผาผลาญพลังงานของร่างกายและน้ำหนักตัว Orlistat เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง lipase ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถถูกดูดซึมไปใช้ได้ จึงเป็นสาเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านั้น

Orlistat มีสูตรทางเคมีเป็น $C_{29}H_{53}NO_5$ มีมวลโมเลกุล 495 โดยเป็นโมเลกุลเดี่ยวที่มีลักษณะเป็น diastereomeric และมี chiral center อยู่ 4 บริเวณ Orlistat ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในน้ำ

เภสัชจลนศาสตร์

เมื่อรับประทาน orlistat จะออกฤทธิ์ที่ในทางเดินอาหาร ฤทธิ์ของยาจึงไม่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย ในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อให้ orlistat ในขนาดค่อนข้างสูง (150-1000 mg/kg/day)ในหนูและสุนัข สามารถตรวจพบยาในกระแสเลือดแม้จะมี bioavailability อยู่ในช่วงที่ค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า 1-2 %) ในการวิจัยในมนุษย์ โดยทดลองให้ radiolabelled orlistat ในขนาด 360 mg พบว่าสามารถตรวจสอบปริมาณ orlistat ได้เล็กน้อยในเลือดโดยจะมีระดับยาสูงสุดในเลือดประมาณ 8 ชั่วโมงหลังรับประทาน อย่างไรก็ดีขนาดของยาที่พบในเลือดอยู่ในระดับต่ำมากจึงไม่น่าจะออกฤทธิ์ในร่างกาย ในการรักษาผู้ป่วยบางรายก็สามารถตรวจพบระดับยาในขนาดต่ำเป็นครั้งคราว แสดงถึงว่ายาสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้แม้จะมีปริมาณต่ำ

ในส่วนของยาที่เข้าสู่ร่างกาย ยานี้จะจับกับโปรตีนในเลือดได้แก่ albumin, lipoprotein เป็นปริมาณสูงมากกว่า 99 % จากข้อมูลในสัตว์ทดลอง ยานี้จะถูกทำลายส่วนใหญ่ที่ผนังทางเดินอาหาร ในมนุษย์พบว่า มี metabolite อย่างน้อย 2 ชนิดเกิดขึ้นที่ทางเดินอาหาร โดยที่ metabolite ทั้งสองชนิดนี้ค่อนข้าง inactive และตรวจพบได้บ้างในเลือด ยาส่วนมาก (ประมาณ 97%) ถูกขับออกทางอุจจาระ ทั้งที่ไม่ถูกดูดซึมและยังอยู่ในรูปแบบที่ไม่เปลี่ยนแปลง (83 %)และที่ถูกดูดซึมบางส่วนจะถูก metabolize และขับออกทางน้ำดี ยาถูกขับออกทางไตน้อยกว่า 2 % โดยมี half life อยู่ที่ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ไม่พบว่ามีความแตกต่างของการทำลายยาในกลุ่มประชากรที่มีน้ำหนักปกติกับกลุ่มประชากรที่มีน้ำหนักเกิน อย่างไรก็ดียังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนสำหรับประชากรในกลุ่มที่เป็นเด็ก กลุ่มผู้สูงอายุ หรือในผู้ป่วยที่มีโรคอื่นร่วมด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคตับและโรคไต

ปฏิกริยาสัมพันธ์กับยาอื่น

ในแง่ปฏิกริยาสัมพันธ์กับยาอื่น พบว่ามีปฏิกริยาสัมพันธ์ได้บ้างกับยาบางตัวที่ละลายได้ดีในไขมัน (รวมทั้งวิตามิน) จึงจำเป็นต้องได้รับการเฝ้าระวังเมื่อให้ร่วมกับยานี้ อย่างไรก็ดีไม่พบว่ายานี้มีปฏิกริยาสัมพันธ์กับยาอื่นที่สำคัญทางคลินิกต่อยาหลายชนิดที่มักใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ digoxin, phenytoin, oral contraceptive pill, nifedipine, glyburide, furosemide, captopril, atenolol และไม่พบว่ามีปฏิกิริยากับ alcohol สำหรับในกรณีของ pravastatin พบว่ายานี้จะเพิ่มการดูดซึมและฤทธิ์ของยา pravastatin

เภสัชพลศาสตร์

Orlistat ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสแบบย้อนกลับได้ (reversible lipase inhibitor) ที่ค่อนข้างแรง (potent) และจำเพาะ เมื่อเข้าไปในทางเดินอาหารยาจะจับกับเอนไซม์ไลเปสที่สร้างมาจากกระเพาะอาหารและตับอ่อน โดยที่ยาจะ form covalent bond กับ serine residue ในโมเลกุลของไลเปส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถออกฤทธิ์ย่อยไขมันโดยการ hydrolyze ได้ ไขมัน triglyceride ที่ยังไม่ถูกย่อยสลายจะไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจึงเปรียบเสมือนร่างกายได้รับประทานไขมันแต่ไม่ได้รับพลังงานจากไขมันดังกล่าว ในขนาดที่ใช้ในการรักษาคือ 120 mg วันละ 3 ครั้ง ยานี้จะยับยั้งการดูดซึมไขมันได้ประมาณ 30 % อย่างไรก็ดีการที่ไขมันถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยลงนั้นก็อาจเป็นเหตุให้ร่างกายหลั่ง cholecystokinin น้อยลง cholescystokinin เป็นสารที่ช่วยให้ถุงน้ำดีบีบตัวเพื่อหลั่งน้ำดีเข้าสู่ทางเดินอาหารและยังมีผลต่อการบีบตัวของกะเพาะอาหาร การใช้ยาที่ยับยั้งการดูดซึมของไขมันเป็นเวลานานจึงต้องเฝ้าระวังฤทธิ์นี้ด้วย

ในการทดลองในสัตว์ทดลอง ทั้งในหนูและสุนัขพบว่า orlistat ออกฤทธิ์แบบ dose dependent effect และไม่พบว่ามีต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) หรือ กลายพันธ์

(mutagenicity) สำหรับในมนุษย์ การศึกษาฤทธิ์ของยานี้มักใช้ค่าปริมาณไขมันที่ขับออกทางอุจจาระเป็นตัวบ่งชี้ โดยทั่วไปยาจะยับยั้งการดูดซึมของไขมันได้ประมาณ 30 % ในแง่ของ dose response curve relationship พบว่า ขนาดของยาที่ได้รับในแต่ละวันสัมพันธ์กับปริมาณไขมันที่ขับถ่ายออกมาทางอุจจาระ (dose dependent) โดยที่ขนาดของยาเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง 360-400 mg ต่อวัน หลังจากนั้นผลของยาไม่ได้เพิ่มขึ้นมากนักแม้จะเพิ่มขนาดยาขึ้น ดังนั้นขนาดที่แนะนำให้ใช้ต่อวันคือ 360 mg โดยแบ่งให้เป็นวันละ 3 ครั้ง

เนื่องจาก systemic plasma concentration ของยาอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ (น้อยกว่า 1 % ของขนาดที่ได้รับในการรักษาทั่วไป) ยานี้จึงไม่น่าจะมีผลต่อ systemic lipoprotein หรือ lipase ที่ตับ

ประสิทธิผลของยาทางคลินิก

ในผลการวิจัยทางคลินิกในด้านการลดน้ำหนักหรือควบคุมน้ำหนัก orlistat เป็นยาที่ใช้ร่วมไปกับการดูแลวิถีชีวิตและการควบคุมอาหาร[9-12] ผลการวิจัยในด้านประสิทธิผลในหลายข้อกำหนด ที่เปรียบเทียบโดย randomized controlled trial สนับสนุนอย่างชัดเจนว่า orlistat ให้ผลการลดน้ำหนักในผู้ป่วยที่น้ำหนักเกินได้ดีกว่ากลุ่มที่ใช้ยาหลอก (placebo) แต่ได้รับการดูแลแนะนำเรื่องอาหารและพฤติกรรมในลักษณะเดียวกัน[9-12] และผลการวิจัยนี้ได้ศึกษาติดตามผู้ป่วยเป็นเวลานานถึง 1-2 ปี ผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับยาสามารถลดน้ำหนักไปได้ถึง 12.4 ปอนด์ ใน 6 เดือน และ 13.4 ปอนด์ใน 12 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มยาหลอกซึ่งลดได้เพียง 6.2 ปอนด์และ 5.8 ปอนด์ที่ 6 และ 12 เดือน นอกจากผลการรักษาที่แตกต่างกันจากกลุ่มที่ได้รับยาหลอกแล้ว จำนวนผู้ป่วยที่ยังมารับการติดตามการรักษาก็ยังสูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับยาหลอก

ในการศึกษาทางคลินิก ผู้ป่วยส่วนมากทนต่อยาได้ดี [10] ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งถอนตัวจากการวิจัยเนื่องจากอาการข้างเคียง (8.8 % เมื่อเทียบกับ 5 % ในกลุ่มที่ได้ยาหลอก)

นอกจากผลในการลดน้ำหนักแล้วยังมีการศึกษาผลของยาในการป้องกันการเพิ่มน้ำหนัก (weight regain)[9] ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญหลังการลดน้ำหนักโดยวิธีต่างๆ พบว่า orlistat สามารถช่วยลดปริมาณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นได้อย่างชัดเจน

นอกจากผลต่อน้ำหนักตัวโดยตรงแล้วมีการศึกษาผลของการลดน้ำหนักต่อโรคอื่นๆ ที่พบร่วมด้วย พบว่า ภายหลังจากได้รับยาไปเป็นเวลา 1 ปี ปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดตลอดจนความดันโลหิตลดลงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก[11-12]

สำหรับในประชากรกลุ่มที่มีโรคอื่นร่วมด้วยโดยเฉพาะเบาหวาน เป็นที่สนใจกันมากเนื่องจากการลดน้ำหนักอาจมีผลโดยตรงในการรักษาโรคดังกล่าว พบว่า orlistat มีผลดีต่อผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน หรือ ผู้ป่วยที่มี abnormal glucose tolerance test และแม้แต่ผู้ป่วยที่มีน้ำหนักเกินแต่ยังไม่ถึงขั้นเป็นเบาหวาน โดยที่ orlistat ช่วยในควบคุมเบาหวาน

ได้ดีขึ้น โดยที่ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดและระดับน้ำตาลสะสมต่ำลง หรือมีความจำเป็นในการใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ในผู้ป่วยที่มี glucose tolerance test ผิดปกติก็มีโอกาสที่จะกลับมาสู่ปกติ และในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานมีโอกาสที่จะเป็นเบาหวานน้อยลงจากการศึกษาในระยะเวลา 2 ปี [11-12] อย่างไรก็ตียังไม่มีผลการวิจัยการใช้ยานี้ในระยะยาวว่าจะมีผลต่ออัตราการป่วยหรืออัตราการตายของประชากรที่น้ำหนักเกินนี้มากน้อยเพียงไร ซึ่งคงต้องติดตามกันต่อไป

ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นได้

อาการข้างเคียงที่พบบ่อยเป็นอาการข้างเคียงทางระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ท้องอืด ถ่ายอุจจาระมีไขมันหรือน้ำมันปน ผู้ป่วยบางรายมีอาการถ่ายอุจจาระบ่อยขึ้นและกลั้นอุจจาระไม่ได้ อาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นเหตุให้ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งตัดสินใจหยุดยา อาการข้างเคียงดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการที่มีไขมันไม่ย่อยผ่านไปในทางเดินอาหารจำนวนมากเกินไป อาการเหล่านี้จะหายไปเมื่อหยุดยาได้ 48-72 ชั่วโมงและพบว่าปริมาณไขมันในอุจจาระกลับคืนสู่ปกติเหมือนก่อนได้รับยา โดยทั่วไปผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องหยุดยาเพราะเมื่อผู้ป่วยเข้าใจว่าอาการเหล่านี้เกิดจากการที่มีไขมันในอาหารมากเกินไปและควบคุมปริมาณไขมันในอาหาร อาการเหล่านี้ก็จะหายไป อาการข้างเคียงอื่นที่อาจพบได้ ได้แก่ ผื่นแพ้ยา (พบน้อย)

เนื่องจากยานี้มีผลกับไขมันในทางเดินอาหาร ยาจึงอาจมีผลกับยาอื่น ๆรวมทั้งวิตามินที่ละลายในไขมันในแง่การดูดซึม ที่พบว่าต้องมีการปรับขนาดยาทางคลินิก ได้แก่ cyclosporin ในระหว่างที่ได้รับยานี้อย่างสม่ำเสมอควรได้รับวิตามินรวมโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินที่ละลายในไขมันเสริมอยู่ตลอด การรับประทานวิตามินควรรับประทานอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนได้รับยา orlistat เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนการดูดซึมของวิตามิน

เช่นเดียวกับยาใหม่ทั้งหลายผลการรักษาและอาการข้างเคียงของยาเป็นสิ่งที่ต้องติดตามกันต่อไป ผลการวิจัยทั้งหลายที่นำมาอ้างอิงเป็นการวิจัยในทางการแพทย์ที่มีการเลือกสรรผู้ป่วยที่เหมาะสม ข้อมูลเฉพาะในประชากรบางกลุ่มยังคงต้องติดตามต่อไป สำหรับในแง่อาการข้างเคียงนั้นในข้อมูลเบื้องต้นไม่พบอาการข้างเคียงที่รุนแรงในกลุ่มประชากรที่ศึกษา สำหรับในประชากรทั่วไปคงต้องรอผลระยะยาว

ข้อบ่งใช้

เนื่องจากปัญหาเรื่องความอ้วนหรือน้ำหนักตัวที่เกินนั้น เป็นปัญหาที่มีผู้สนใจกันมาก การศึกษาทั้งหลายที่ทำการวิจัย ได้ทำในผู้ป่วยที่มีน้ำหนักเกินอย่างชัดเจนในทางการแพทย์และมีข้อบ่งชี้ในการลดน้ำหนักด้วยยา ไม่ได้มุ่งเน้นถึงประชากรกลุ่มที่ต้องการลดน้ำหนักเพื่อความสวยงาม รวมทั้งข้อมูลผลการรักษาที่วัดก็มาจากประชากรกลุ่มที่น้ำหนักเกิน การนำยามาใช้ในประชากรทั่วไปควรพิจารณา

ถึง risk benefit ratio รวมไปถึงความคุ้มค่า วัตถุประสงค์ของการรักษาก็ไม่ได้มุ่งเน้นให้น้ำหนักกลับเข้าสู่ ideal body weight แต่เป็นการลดน้ำหนักบางส่วนเพื่อสุขภาพที่ดีขึ้น

ยานี้ควรนำมาใช้ในกรณีของผู้ป่วยที่อ้วนทางการแพทย์ และต้องได้รับการดูแลเรื่องการปฏิบัติตัวคู่ไปกับการควบคุมอาหารอย่างต่อเนื่อง นอกจากนั้นยานี้ยังอาจมีประโยชน์อย่างมากในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 โดยเฉพาะผู้ป่วยที่น้ำหนักเกินทั้งในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นเบาหวานแล้ว หรือมีความเสี่ยงในการเป็นเบาหวาน

ผลการวิจัยทางคลินิกเป็นการนำยานี้มาใช้ร่วมไปกับการควบคุมอาหารและปรับปรุงวิถีการดำรงชีวิตซึ่งพบว่าได้ผลดี การนำยานี้มาใช้ในทางคลินิกให้ได้ผลในผู้ป่วยนั้นก็ควรคำนึงถึงปัจจัยทางด้านการปรับอาหารและวิถีชีวิตร่วมด้วยเสมอ

ข้อห้ามใช้

ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องการดูดซึมในทางเดินอาหาร (chronic mal-absorption) หรือในผู้ป่วยที่ทราบว่าแพ้ยานี้ สำหรับในผู้ป่วยที่อ้วนเนื่องจากสาเหตุแฝงอื่นๆ เช่น hypothyroid ควรรักษาที่ต้นเหตุก่อนที่จะพิจารณาใช้ยานี้

รูปแบบยา

Orlistat มีจำหน่ายในหลายประเทศในปัจจุบัน ในชื่อการค้าว่า Xenical ® ในขนาด 120 mg ต่อแคปซูล ผลิตโดยบริษัท Roche ขนาดที่แนะนำให้ใช้คือ 120 mg วันละ 3 ครั้งพร้อมอาหาร (ในมื้อที่มีไขมัน) หรือภายใน 1 ชั่วโมงหลังอาหาร

เอกสารอ้างอิง

1. Dalton S. Overweight and Weight Management. The Health Professional's guide to Understanding and Practice. 1st edition 1997 : Aspen Publishers Inc. Maryland (USA).
2. Clinical Guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults. Executive summary. National Institute of Health (NIH) and National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLB), USA June 1998.
3. Williamson DF. Intentional weight loss: patterns in the general population and its association with morbidity and mortality. *Int J Obes* 1997; 21(Suppl 1): S14-S19.
4. Rossner S. Defining success in obesity management. *Int J Obes* 1997; 21(Suppl 1): S2-S4.
5. Guy-Grand B. Pharmacological approaches to intervention. *Int J Obes* 1997; 21(Suppl 1): S22-S24.
6. Riley RE. Popular weight loss diets: health and exercise implications. *Cli Sports Med* 1999; 18: 691-701.
7. Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, et al. Dietary fat consumption and health. *Nut Rev* 1998; 56(5 Pt 2): S3-19; discussion S19-28.
8. Roberts SB, Pi-Sunyer FX, Dreher, M, et. al. Physiology of fat replacement and fat reduction: effects of dietary fat and fat substitutes on energy regulation. *Nut Rev* 1998; 56(5 Pt 2): S29-49.
9. Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, et al. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of

weight regain in obese patients. *Lancet* 1998; 352: 167-172.
10. Van Gaal LF, Broom JI, Enzi G, et al. Efficacy and tolerability of orlistat in the treatment of obesity: a 6-month dose-ranging study. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 125-132.
11. Hollander PA, Elbein SC, Hirsch IB, et al. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes: a 1-year randomized double-blind study. *Diab Care* 1998; 21: 1288-1294.
12. Davidson MH, Hauptman J, DiGirolamo M, et al. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 281: 235-242.

(ต่อจากหน้า 46)

- 25 ก.พ.1952 Hamon J, Paraire J and Velluz J ศึกษาใน รพ.ทหาร ที่ Valde-Grace รายงานผลของ CPZ ในผู้ป่วย mania ซึ่งรักษาด้วยยาอื่นๆ ด้วย ตีพิมพ์ใน Ann Med Psychol 110(1):331-335.
- 8 มี.ค.1952 Pocidalo JJ, Cathala HP, Himbert J and Tardieu M. รายงานผลใน CR. Soc Biol 146:368-370.
- 26 พ.ค.1952 Delay J, Deniker P and Harl JM. รายงานใน Ann Med Psychol 110(2):112-117. รายงานนี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยโรคจิตเภทโดยตรง จึงได้รับการอ้างถึงมากในตำราต่างๆ ว่าเป็นรายงานแรกที่แสดงผลของ CPZ ในผู้ป่วยจิตเภท
- พ.ค.-ก.ค.1952 Delay & Deniker รายงานผลของ CPZ ในการประชุมและในวารสารต่างๆ อีก 5 ครั้ง เป็นการยืนยันผลของ CPZ ตัวเดียว (monotherapy) รวมจำนวนผู้ป่วยถึง 40 ราย
- 1954 H. Lehman รายงานผลการศึกษาในผู้ป่วยในสหรัฐอเมริกา
- 1957 H. Laborit , H. Lehmann และ P. Deniker ได้รับ Lasker Award ในฐานะ " for his introduction of chlorpromazine into psychiatry and for his demonstration that a medication can influence the clinical course of the major psychoses"

เรื่องนี้เป็นตัวอย่างของการค้นพบผลของยาทางจิตเวช จากการสังเกตผลในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด และได้รับยานี้ เพื่อฤทธิ์ต้านฮิสตามีน ต่อจากนั้นจึงนำไปทดสอบในผู้ป่วยทางจิตเวช จนพิสูจน์ผลได้จริง และนำไปสู่การใช้ยาอย่างกว้างขวางมาจนถึงปัจจุบัน เครดิตในเรื่องนี้ตกอยู่กับผู้ที่ศึกษาอย่างจริงจัง และต้องรายงานผลด่วนด้วย ผู้ที่ค้นพบก่อนแต่มัวโอ้เอ้ไม่รีบรายงานผลก็อาจสูญโอกาสไปได้ เป็นอุทาหรณ์สำหรับการวิจัยสมัยนี้ว่าจะต้องเป็นเสือปืนไว ยิ่งมีโอกาสจดลิขสิทธิ์ทรัพย์สินทางปัญญา ก็ยิ่งต้องชิงดีชิงเด่นกันมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม หวังว่านักวิจัยทางเภสัชวิทยาคงไม่ทิ้งจริยธรรมทางวิชาการ และคงรายงานผลตรงไปตรงมาตามข้อมูลที่พบ

เอกสารอ้างอิง

1. Hollister LE. Antipsychotic medications and the treatment of schizophrenia. In : Psychopharmacology: From Theory to Practice. Ed. Barchas JD et al. Oxford University Press, New York 1977 pp.121-150.
2. Deniker P. Discovery of the clinical use of neuroleptics. In: Discoveries in Pharmacology. Ed: Parnham MJ & Bruinvels J. Elsevier Science Publishers B.V. 1983 pp.163-180.

RILMENIDINE: THE IMIDAZOLINE-1 RECEPTOR AGONIST

Supeenun Unchern

Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University Bankok, 10700 Thailand

ยาที่ใช้ทางคลินิคเพื่อรักษาความดันโลหิตสูงนั้น ประกอบด้วยยาที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลากหลาย ได้แก่ ยาขับปัสสาวะเช่น chlorothiazides flurosemide ฯลฯ ยาในกลุ่ม angiotensin converting enzyme inhibitor เช่น captopril, enalapril ฯลฯ ยาขยายหลอดเลือดกลุ่ม calcium channel blockers เช่น nifedipine nicardipine ฯลฯ และยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง adrenergic ได้แก่ ยากลุ่ม β-adrenoceptor antagonist เช่น propranolol, atenolol ฯลฯ เพื่อยับยั้งผลของ adrenergic ที่หัวใจ ยากลุ่ม α-adrenoceptor antagonists เช่น prasozin ยับยั้งผลของ adrenergic ที่หลอดเลือด และ ยากลุ่ม centrally acting α_2-adrenoceptor agonists เช่น clonidine, methyldopa, guanfacine, guanabenz ฯลฯ ซึ่งมีผลลด sympathetic outflow จากสมองไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย

จากการประเมินการทำงานของระบบประสาท sympathetic ที่อวัยวะต่างๆ ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง โดยวัด firing rate ของเส้นประสาท sympathetic และวัดปริมาณ norepinephrine ที่เข้าสู่กระแสเลือดในบริเวณอวัยวะต่างๆ พบว่ามีการเพิ่มการทำงานของระบบประสาท sympathetic ที่หัวใจ ไต และหลอดเลือดที่กล้ามเนื้อลาย โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย ทั้งนี้ชี้ว่ามีการกระตุ้นของระบบประสาท sympathetic ในภาวะความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ (primary hypertension) สาเหตุที่ทำให้การทำงานของระบบประสาท sympathetic เพิ่มขึ้นนั้นยังไม่ทราบ แต่จากการตรวจวัดการ turn over ของ norepinephrine ในสมอง และจากการวัดปริมาณ norepinephrine และ lipophillic metabolites ของ norepinephrine ใน internal jugular vein แสดงว่าการกระตุ้น pressor noradrenergic nuclei ใน forebrain น่าจะเป็นกลไกที่ทำให้การทำงานของ peripheral sympathetic เพิ่มขึ้น

การเพิ่มการทำงานของระบบประสาท sympathetic นอกจากจะเพิ่มความดันโลหิตแล้วยังมีผลเสียอื่นๆ อีก เช่นมีผลต่อ metabolism มีผลลดการนำ glucose ไปยังกล้ามเนื้อทำให้เกิดภาวะ insulin resistance และ hyperinsulinemia มีผลลดการกำจัดไขมันที่ตับทำให้ระดับไขมันในเลือดสูง และอาจเป็นผลให้เกิดภาวะหัวใจเต้นเสียจังหวะได้ นอกจากนี้ tropic effect ของ adrenergic neurotransmitter มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หัวใจทำให้เกิดภาวะ left ventricular hypertrophy (LVH) ได้ ดังนั้นยาที่มีผลลดการทำงานของระบบประสาท sympathetic จึงนิยมใช้เป็นยาลดความดันโลหิตเพราะ นอกจากยาจะมีผลลดความดันโลหิตได้ดีแล้วยังมีผลยับยั้งผลข้างเคียงอื่นๆ ที่เกิดเนื่องจากการเพิ่มการทำงานของระบบประสาท sympathetic ได้

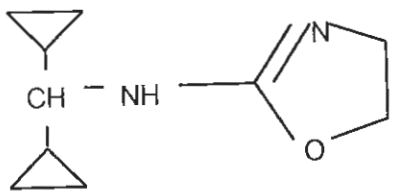
อีกด้วย จะเห็นได้ว่ายาในกลุ่ม centrally acting α_2-adrenoceptor agonists เช่น clonidine นอกจากจะให้ผลดีในการรักษา mild hypertension หรือ moderate hypertension แล้ว ยังมีผลลด severe hypertension และ hypertensive crisis อีกด้วย[1-3] แต่อย่างไรก็ดียาในกลุ่มนี้มักใช้เป็น second-line หรือ third-line drugs ในการรักษาความดันโลหิตสูง เพราะมีผลข้างเคียงที่สำคัญคือ มีนงง (drowsiness) และ ปากแห้ง (dry mouth)[4-5] ซึ่งเป็นฤทธิ์ของยาต่อสมองเช่นกัน ได้มีการพัฒนายาที่เป็น centrally acting α_2- adrenoceptor agonists ตัวใหม่ๆขึ้นมา เช่น rilmenidine และยาอื่นๆซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้าย clonidine ซึ่งเรียกรวมๆ ว่า clonidine-like drugs และเมื่อมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ในการลดความดันโลหิต โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของยาแต่ละตัว และผลลดความดันโลหิตที่เกิดขึ้น ข้อมูลชี้ให้เห็นว่ามี receptor อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้าย imidazoline ซึ่งขนานนาม receptor นั้นว่า imidazoline receptors (IR) ซึ่ง receptors นี้แตกต่างจาก α_2-adrenoceptor, clonidine สามารถกระตุ้นได้ทั้ง α_2-adrenoceptor และ imidazoline receptors ดังนั้น clonidine-like drug เหล่านี้ ไม่น่าจะออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตโดยผลที่มีต่อ α_2-adrenoceptor เพียงประการเดียว[6-7]

จากการศึกษาโดยใช้ selective antagonist พบว่า ฤทธิ์ลดความดันโลหิตของ clonidine-like drugs ผ่านผลของยาต่อ imidazoline receptors ในขณะที่ผลข้างเคียงโดยเฉพาะอาการมึนงงนั้นเกี่ยวเนื่องกับ α_2- adrenoceptor ในสมองบริเวณ locus caeruleus[8-10] และจากการศึกษาโดยใช้ binding studies พบว่าสมองบริเวณ ventrolateral medulla สามารถจับกับ radiolabelled imidazoline[11-12] แต่ไม่จับกับ catecholamines[12] ซึ่งในส่วนของก้านสมองบริเวณนี้ (NRL/RVLM : nucleus reticularis lateralis / rostroventrolateral medulla) เป็นส่วนของสมองที่เมื่อกระตุ้นแล้วทำให้ความดันโลหิตลดลง[13]

Rilmenidine เป็นยาลดความดันโลหิตที่ออกฤทธิ์เจาะจงต่อ vasomotor center ในสมอง มีผลลดความดันเลือดได้ดีเท่ากับ clonidine แต่มีผลข้างเคียงทางสมองส่วนกลางน้อยกว่า[14-15] จึงจัดได้ว่า rilmenidine เป็น centrally acting drugs ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดความดันโลหิตและมีฤทธิ์ข้างเคียงน้อย สามารถใช้เป็น first-line drug ในการรักษาความดันโลหิตสูงประเภทต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับยาลดความดันเลือดในกลุ่มอื่นที่มีใช้อยู่ในท้องตลาด

ลักษณะทางเคมี

Rilmenidine (HYPERDIX®) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น 2-(N-dicyclopropylmethyl)-amino-2-oxazoline ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมี Rilmenidine

กลไกการออกฤทธิ์

Rilmenidine ลดความดันโลหิตโดยกระตุ้นสมองส่วนกลางซึ่งมีผลให้ sympathetic outflow ลดลง จากการทดลองพบว่าเมื่อฉีด rilmenidine เข้า 4th ventricle โดยตรงมีผลลดความดันโลหิตได้มากกว่าการให้ยานี้ทางหลอดเลือด ถ้าให้ยาในสมองบริเวณ rostroventrolateral medulla (RVLM) จะลดความดันโลหิตได้ดีกว่าให้ในบริเวณ nucleus of the solitary tract (NTS) อย่างไรก็ดีการให้ rilmenidine ทาง 4th ventricle, ทาง RVLM และหลอดเลือดดำจะมีผลต่อ renal sympathetic baroreflex เหมือนกัน แสดงว่า RVLM น่าจะเป็นส่วนของสมองที่ rilmenidine ไปออกฤทธิ์[16]

ในกระต่ายที่รู้สึกตัว การฉีด rilmenidine เข้า 4th ventricle หรือ หลอดเลือดดำจะทำให้เกิด renal sympathoinhibition ซึ่งผลดังกล่าวยับยั้งได้โดย idazoxan หรือ efaroxan ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งทั้ง imidazoline receptors และ α_2-adrenoceptors, idazoxan ยับยั้งผลของ rilmenidine ได้ดีกว่า 2-methoxyidazoxan ซึ่งมีผลยับยั้งเฉพาะ α_2-adrenoceptors ส่วนในกระต่ายที่ทำให้สลบด้วยยาสลบ การให้ idazoxan ในบริเวณ RVLM ยับยั้งผล renal sympathoinhibition ที่เกิดจากการให้ rilmenidine บริเวณ RVLM ได้ แต่ idazoxan ไม่สามารถยับยั้งหรือแก้ไขผลของ α-methyl norepinephrine ซึ่งเป็น α_2-adrenoceptors agonist ข้อมูลนี้ชี้ชัดว่า rilmenidine ออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตโดยการกระตุ้น imidazoline receptor ที่ RVLM ในสมองส่วนกลาง[16]

จากการศึกษาโดยใช้ (^{14}C)2-deglucose autoradiography พบว่าถ้าให้ rilmenidine แก่สัตว์ทดลอง การใช้ glucose ของเซลล์สมองในส่วนต่างๆ ได้แก่ thoracic spinal cord ของ intermediolateral cell column, ส่วน area postrema, ventrolatteral medulla, nucleus tractus solitarious และ cutaneous nucleus ลดลงการใช้ vehicle ไม่มีผลเหล่านี้ ผลของ rilmenidine นี้ไม่สามารถยับยั้งได้โดย BHT933 ซึ่งเป็น α_2-adrenoceptors antagonist[17] ข้อมูลนี้สนับสนุนข้อมูลเดิมที่ชี้ว่า rilmenidine ออกฤทธิ์ในสมองส่วนกลางโดยกระตุ้น imidazoline receptors มากกว่า α_2-adrenoceptors และการที่พบว่า rilmenidine มี affinity ต่อ imidazoline receptors มากกว่า α_2-adrenoceptors ทำให้มีผู้เสนอว่าการที่ rilmenidine ลดความดันโลหิตโดยมีผลข้างเคียงทางสมองน้อย เพราะฤทธิ์ลดความดันโลหิตของ rilmenidine เป็นผลจากการกระตุ้น imidazoline receptors และ rilmenidine ไม่มีผลต่อ α_2-adrenoceptors ในสมองซึ่ง α_2-adrenoceptors นี้เชื่อกันว่าเป็น receptors ที่ถูกกระตุ้นโดย clonidine แล้วทำให้เกิดผลข้างเคียงทางสมอง เช่น มึนงง ปากแห้ง ฯลฯ[18]

เภสัชจลนศาสตร์

rilmenidine ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารอย่างรวดเร็ว มีค่า absolute bioavailability ประมาณ 1 ระดับยาในเลือดขึ้นสูงสุด 2 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา[19] ถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว มีค่า total body plasma clearance ประมาณ 450 มล. ต่อนาที และมีค่า elimination half-life ประมาณ 8 ชั่วโมง จับกับโปรตีนในเลือดน้อย (<10%) มีความชอบพอกับเนื้อเยื่อสูง ยาไม่ถูกเปลี่ยนในร่างกาย (<95%) ถูกขับถ่ายทางปัสสาวะ 65% ทางอุจจาระ 1%

ค่าต่าง ๆทางเภสัชจลนศาสตร์ของ rilmenidine จะไม่เปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง จากการศึกษาพบว่าภาวะความดันโลหิตสูงไม่มีผลต่อการดูดซึม การกระจายตัว ตลอดจนกระบวนการในการกำจัดยาจากร่างกาย[19] นอกจากนี้จากการศึกษาของ Beau และคณะ[20] สนับสนุนข้อมูลที่ว่าการใช้ rilmenidine เป็นเวลานานไม่มีการสะสมของยาในร่างกาย

ในผู้ป่วยสูงอายุ การดูดซึมของ rilmenidine จะช้าลง และค่า elimination half-life จะนานขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่มีค่า apparent volume of distribution ลดลง (-12%) ในผู้ที่ไตล้มเหลวมีการลดลงอย่างชัดเจนของ apparent total clearance (-50%) และมีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างความเสื่อมของการทำงานของไตและความสามารถในการกำจัดยา ดังนั้นต้องมีการปรับลดขนาดในการรักษาของ rilmenidine ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่มีไตล้มเหลวอย่างรุนแรง (ค่า creatinine clearance น้อยกว่า 15 มล.ต่อนาที)[19]

ผลของ rilmenidine ในผู้ป่วย mild และ moderate hypertension

การศึกษาผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่จัดเป็น placebo resistance hypertension (ค่า diastolic blood pressure : DBP ≥ 95-115 mmHg) จำนวน 269 คน[20] ใช้ rilmenidine monotherapy (n=150) เป็นเวลา 1 ปี ขนาดยาที่ใช้เท่ากับ 1 หรือ 2 mg เมื่อได้รับยาครบ 1 ปี ค่า systolic blood pressure (SBP) และ ค่า DBP ลดลง 25 และ 17 mmHg ในกลุ่มที่ rilmenidine monotherapy ไม่ได้ผล มีการใช้ยาขับปัสสาวะร่วมด้วย (n=90) เมื่อครบ 1 ปี SBP และ DBP ลดลง 26 และ 17 mmHg ตามลำดับ ในกลุ่มสุดท้ายต้องเพิ่มยาตัวที่สามร่วมกับ rilmenidine และยาขับปัสสาวะ (n=29) จึงสามารถทำให้ DBP ลดเหลือ 90 mmHg ใน 6 เดือน (80%) ใน 12 เดือน (84%) ผู้ป่วยที่ได้รับ rilmenidine monotherapy และความดันโลหิตลดลงเป็นปกติจะเท่ากับ 66-60% ของผู้ป่วย และ 2 ใน 3 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้รับ rilmenidine ในขนาด 1 mg[20]

การศึกษาแบบ double blind multi center trial เปรียบเทียบ rilmenidine กับ placebo ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงเล็กน้อยและสูงปานกลาง จำนวน 126 คน โดยผู้ป่วยทั้งหมดได้รับ placebo ก่อน 4 สัปดาห์ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีค่า mean blood pressure (supine) 95-104 mmHg ผู้ป่วยได้รับ rilmenidine 1 mg (n=30), และ placebo (n=35) นาน 4 สัปดาห์ กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่มีค่า mean blood pressure (supine) 105-115 mmHg ผู้ป่วยได้รับ

rilmenidine 1 mg วันละ 2 ครั้ง (n=30), และ placebo (n=30) นาน 4 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ rilmenidine ทั้งหมด (n=61) นั้นความดันโลหิตลดลงมากกว่า placebo คือ ค่า SBP<160 และ DBP เท่ากับหรือน้อยกว่า 90 mmHg พบในผู้ป่วยที่ได้รับ rilmenidine = 61%, และในผู้ป่วยที่ได้รับ placebo =23%[21]

การศึกษาเปรียบเทียบผลของ rilmenidine กับ clonidine โดยวิธี double-blind-clonidine controlled multicenter trial โดยผู้ป่วยได้รับ placebo ล่วงหน้า 4 สัปดาห์ก่อนได้รับยา ค่า DBP ของผู้ป่วยเท่ากับ 95-115 mmHg รักษาด้วย rilmenidine 1 mg หรือ clonidine 0.15 mg ถ้า ค่าของ DBP ยังคงมากกว่า 90 mmHg ให้เพิ่มขนาดของยาที่ใช้เป็น 2 เท่า พบว่าความดันโลหิตของผู้ป่วยลดลงโดยยาทั้ง 2 ตัวเท่าๆ กัน คือ ค่า SBP ลดลง 19 mmHg และค่า DBP ลดลง 12 mmHg เมื่อได้รับยานาน 6 สัปดาห์ แต่ rilmenidine มีผลข้างเคียงน้อยกว่า clonidine[22]

การศึกษาทางคลินิคในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงเปรียบเทียบระหว่าง rilmenidine กับยาอื่น 4 กลุ่มซึ่งทาง U.S. Joint National Committee ยอมรับให้ใช้เป็น first-line drug ในการรักษาความดันโลหิตสูงอันได้แก่ ยาขับปัสสาวะ ยากลุ่ม β-adrenoceptor antagonist ยากลุ่ม calcium channel blockers และยากลุ่ม angiotensin converting enzyme inhibitor พบว่า rilmenidine มีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตสูง มีความปลอดภัยในการใช้ และได้รับการยอมรับเท่าเทียมกับยาทั้ง 4 กลุ่ม และจากการศึกษานี้พบว่า rilmenidine ลดความดันโลหิต โดยมีผลขยายหลอดเลือด เพราะยายับยั้งระบบประสาท sympathetic หรือ adrenergic ที่หลอดเลือด ผลนี้เกิดแม้ในเวลาที่มีการเปลี่ยนความดันโลหิตเมื่อยืนหรือออกกำลังกาย ความดันโลหิตลดลงใน 60% ของผู้ป่วยที่ได้รับยา rilmenidine (ซึ่งจะเท่ากับผลที่พบในยาอื่นๆ อีก 4 กลุ่ม)[23]

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ rilmenidine ที่ใช้ต่อผลลดความดันโลหิตสูงของยา โดยศึกษาในผู้ป่วย 60 คนที่เป็น mild หรือ moderate hypertension พบว่าผลลดความดันโลหิตของ rilmenidine เมื่อได้รับยาวันละครั้ง เทียบกับ placebo (4 สัปดาห์) ขึ้นกับขนาดของของ rilmenidine ที่ใช้ แต่ ในขนาด 1 mg ยาลดความดันโลหิตได้ดีโดยมีผลข้างเคียงน้อยกว่าเมื่อใช้ยาในขนาด 2 mg[24]

ผลของ rilmenidine ต่อ cardiac hypertrophy

Left ventricular hypertrophy (LVH) เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลง hemodynamic ที่เป็นผลจากความดันโลหิตสูง จัดเป็นพยาธิสภาพที่พบบ่อยในผู้ป่วย essential hypertension (13.4-50% ของผู้ป่วย วัดโดย ecthcardiography) จากข้อมูลในปัจจุบันจะเห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ LVH กับ อัตราเสี่ยงในการเสียชีวิตเฉียบพลัน, อัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจ, อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย, การเกิด stroke, การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ, และการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว ถึงแม้ยังไม่มีข้อมูลว่าการลดขนาดของหัวใจลงสามารถลด

cardiovascular risk ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงได้หรือไม่ แต่ในปัจจุบันผลของยารักษาความดันเลือดสูงต่อ LVH นับเป็น intermediate end point ในการรักษาความดันโลหิตสูงที่สำคัญนอกเหนือจากการที่ยาสามารถลดความดันโลหิตแล้ว

การศึกษาทางคลินิคถึงผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงซึ่งมีภาวะ LVH ร่วมด้วย 11 คน เป็นเวลา 1 ปี[25,26] พบว่า rilmenidine ลดความดันโลหิตในผู้ป่วยจาก 148± 3/102± 1 mmHg ไปเป็น 131± 2/84± 2 mmHg ($p<0.01$) และสามารถรักษาระดับความดันโลหิตให้ปกติตลอดเวลา 1 ปีที่ได้รับยา ขนาดของหัวใจห้องล่างซ้ายลดลงจาก 152± 5 เหลือ 131± 4 g/m^2 body surface area ($p<0.05$) ระดับฮอร์โมน atrial natriuretic factor (ANF) ไม่เปลี่ยนแปลงแม้ว่าความดันโลหิตลดลงเท่าค่าปกติ แต่จะลดลงเมื่อขนาดของหัวใจห้องล่างซ้ายลดลง โดยระดับของ ANF ลดจาก 48.4±6.2 pg/mL เป็น 28.6±3.4 pg/ml ($p<0.05$) และคงอยู่ในระดับนี้แม้จะหยุด rilmenidine นาน 1 เดือนแล้วก็ตาม

ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบผลจาก sympathectomy ร่วมกับการใช้ α_2-adrenoceptor antagonist ในหนูที่มีความดันโลหิตสูงพบว่าสามารถป้องกันการเกิด cardiac และ vascular hypertrophy ได้ ถ้าให้ rilmenidine ในหนูอายุ 9 สัปดาห์ สามารถลด cardiac hypertrophy, และขัดขวาง perivascular fibrosis ใน intramyocardial vessels และแก้ความผิดปกติในหลอดเลือดในบริเวณที่มีเส้นประสาท sympathetic ไปเลี้ยงมากๆ ได้เช่นเดียวกัน[27] ดังนั้นผลของ rilmenidine ต่อภาวะหัวใจห้องล่างซ้ายโตน่าจะเป็นผลจากการที่ยาลด sympathetic activity เช่นกัน

ในการทดสอบผลของ rilmenidine ในผู้ป่วย mild และmoderate hypertension ซึ่งมีภาวะ LVH โดยเปรียบเทียบกับผลของ nifedipine ในผู้ป่วย 73 คน เป็นระยะเวลานาน 1 ปี การศึกษาเป็นแบบ double blind, randomized control trial, ผู้ป่วย 35 คน ได้รับ rilmenidine 1 mg และอาจเพิ่มขนาดได้ถึง 2 mg ต่อวัน เปรียบเทียบกับผู้ป่วย 38 คนที่ได้รับ nifedipine 40 mg ต่อวัน ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ยาแต่ละตัวควบคุมความดันโลหิตของผู้ป่วยได้ โดย rilmenidine group ลดลงจาก 102.7±4.6 เหลือ 88.5 ± 7.1 mmHg สำหรับ nifedipine group ลดลงจาก 102.7± 5.1 เหลือ 85.6± 7.9 mmHg ถึงแม้ก่อนได้รับยา ผู้ป่วยกลุ่ม rilmenidine มี left ventricular mass index (LVMI) 176.9±41.3 g/m^2 ซึ่งสูงกว่าค่าในกลุ่ม nifedipine 172.6± 35.1 g/m^2 เมื่อได้รับยานาน 12 เดือน ค่า LVMI เหลือ 154.8±40.2 g/m^2 ลดลง 22.1± 23.3 g/m^2, ($p<0.001$) และสำหรับกลุ่ม nifedipine ค่า LVMI เหลือ 145.6± 36.4 g/m^2 ลดลง 26.9± 29.5 g/m^2, ($p<0.001$) ไม่พบความแตกต่างระหว่างผลจากการใช้ยา 2 กลุ่มนี้[28]

ผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยเบาหวาน

เป็นที่ทราบกันดีว่าผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานเกิดความดันโลหิตสูงมากกว่าผู้ไม่เป็นเบาหวาน ซึ่งทั้งความดันโลหิตสูงและเบาหวานต่างก็เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการ

แทรกซ้อนทางระบบหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้ความดันโลหิตสูงเพิ่มโอกาสเกิด diabetic microangiophathy ดังนั้นการใช้ยาลดความดันโลหิตที่เหมาะสมกับผู้ป่วยเบาหวานไม่ควรมีผลรบกวน glucose tolerance และ/ หรือ lipid metabolism ฯลฯ และในระยะยาว ยาควรให้ผลในการรักษาที่ดี

จากการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานที่มีความดันโลหิตสูงเล็กน้อยและที่มีความดันโลหิตสูงปานกลาง 29 คน (ชาย 17คน, หญิง 12 คน) ซึ่งระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยควบคุมด้วย insulin ผู้ป่วยได้รับ rilmenidine 1 mg หรือ 2 mg นาน 16 สัปดาห์ ยาสามารถลดความดันโลหิตจาก 165 ± 3/ 97 ± 0.5 mmHg เหลือ 159 ± 4/88 ± 1 mmHg ภายใน 2 สัปดาห์ และเหลือ 149 ± 3/ 85 ± 1 mmHg เมื่อได้รับยานาน 12 สัปดาห์ ($p<0.01$) และผู้ป่วย 17 คน (59%) มีความดันโลหิตปกติ (SBP <160; DBP <90 mmHg, supine) ในผู้ที่ความดันโลหิตไม่ลดลงหลังจากใช้ rilmenidine การเพิ่มยาขับปัสสาวะให้แก่ผู้ป่วยทำให้ความดันโลหิตกลับเป็นปกติใน 90% ของผู้ป่วย การใช้ rilmenidine ไม่มีผลรบกวนระดับน้ำตาลในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหาร และระดับ glycosylated hemoglobin นอกจากนี้ยาไม่มีผลต่อระดับ LDL, HDL, TGs ของผู้ป่วย[29]

ผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของ lipid metabolism

ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่มีความผิดปกติของ lipid metabolism ยาที่ใช้ควรลดความดันโลหิตโดยไม่มีผลรบกวน lipid metabolism จากการศึกษาในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง (65.5± 2.0/99.1 ±0.6 mmHg) ที่เป็น hyperlipidemia type 2a/2b จำนวน 51 คน โดยเปรียบเทียบระหว่าง captopril 25-50 mg วันละ 2 ครั้ง (25คน) และ rilmenidine 1 mg วันละครั้งหรือ 2 ครั้ง (26คน) ค่าของ DBP ลดลงไม่แตกต่างกัน และผลต่อระดับ LDL cholesterol, HDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides (TGs), apo AI, apo B, Lipoprotein A, และ uric acid ไม่แตกต่างกัน สรุปว่า rilminidine สามารถใช้รักษาความดันโลหิตสูงที่มีความผิดปกติของ lipid metabolism ได้ดีเท่ากับ captopril[30] และในการศึกษาในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงจำนวน 2,635 คน (DBP > 90 mmHg) ซึ่งมีอัตราเสี่ยงของ cardiovascular disease หลายชนิดได้แก่ ผู้สูงอายุ (>60ปี), dyslipidemia, เบาหวาน, โรคไตเรื้อรัง, ภาวะปวดเค้นอก, ภาวะหัวใจล้มเหลว โดยใช้ rilmenidine 1 mg/วัน ภายใน 3 เดือนความดันโลหิตของผู้ป่วยกลับสู่ค่าปกติ ใน 73-82% ของผู้ป่วยทั้งหมด ในกลุ่มนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ urea, creatinine, glucose, potassium, uric acid, ปริมาณ total clearance[31], rilmenidine ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด แม้ได้รับยานี้นาน 2 ปี[32] นอกจากนี้ rilmenidine ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของ uric acid ในพลาสมา ระดับของ total cholesterol, ระดับของ potassium ไม่เพิ่มระดับของ urea และ creatinine ในเลือด ตลอดจนไม่มีผลทำให้การขับถ่ายของ electrolytes เปลี่ยนแปลง[33]

ผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยโรคไต

ประมาณ 75-80% ของผู้ป่วยโรคไตขั้นท้ายๆ มักมีความดันโลหิตสูงร่วมด้วย จากการศึกษาผลของ rilmenidine ในผู้ป่วยโรคไตจากศูนย์ทางโรคไต 4 ศูนย์ ในผู้ป่วย 17 คน (DBP=104± 3 mmHg) มีค่า creatinine clearance 35± 4 ml/min^{-1}1.73m^2 เมื่อได้รับ rilmenidine 1 mg วันละครั้งหรือวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 6 เดือน ผู้ป่วย 12 คน ค่า SBP ลดลง 12 mmHg, และค่า DBP ลดลง 8 mmHg[30]

มีข้อมูลที่พบว่ามี imidazoline receptor ในบริเวณ proximal tubule ของไต ซึ่งผลของ rilmenidine หรือผลของยาในกลุ่ม imidazoline ซึ่งกระตุ้น imidazoline receptor ในบริเวณนี้ มีผลยับยั้ง Na^+/H^+ antiporter ที่ proximal tubule ซึ่งมีผลดีคือ ลด sodium retention ซึ่งน่าจะเป็นผลดีของ rilmenidine ในการควบคุมความดันโลหิตสูงในระยะยาว[34]

อาการข้างเคียง

Rilmenidine ในขนาด 1 mg ทำให้มีอาการปากแห้ง 4.3-6.7%, มึนงง 3.0-3.7%[30-31] ในการเปรียบเทียบ rilmenidine กับ atenolol การใช้ rilmenidine ไม่พบอาการข้างเคียงที่พบเมื่อใช้ยา atenolol ซึ่งได้แก่ asthenia, fatique on effort, acrosyndrome[35] เมื่อเปรียบเทียบกับ clonidine นาน 6 สัปดาห์ ยาทั้งสองให้ผลลดความดันโลหิตเท่ากัน แต่ rilmenidine มีผลข้างเคียงน้อยกว่า clonidine[36]

สรุป

Rilmenidine เป็นยาลดความดันโลหิตสูงตัวใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น imidazoline-1 receptor agonist ที่ออกฤทธิ์โดยกระตุ้น imidazoline-1 receptor ในสมองส่วนกลาง มีผลทำให้ความดันโลหิตลดลงเนื่องจากยาลด sympathetic outflow จากสมอง rilmenidine ลดความดันโลหิตได้ดีในผู้ป่วย mild และ moderate hypertension เทียบเท่ายาลดความดันโลหิตสูงในกลุ่มต่างๆ ที่ใช้เป็น first-line drugs เช่น captopril, hydrochlorothiazide, nifedipine และ propranolol และลดความดันโลหิตได้เท่ากับ clonidine ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อสมองเช่นเดียวกัน แต่มีผลข้างเคียงน้อยกว่า clonidine มาก นอกจากนี้ rilmenidine ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด ระดับไขมันในเลือด ระดับของ electrolytes ต่างๆ และจากข้อมูลทางคลินิค rilmenidine ใช้ลดความดันโลหิดในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่มีภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น เบาหวาน ระดับไขมันในเลือดสูง โรคไต หรือในผู้ป่วยที่สูงอายุได้ดีและไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง ดังนั้น rilmenidine น่าจะเป็น first-line drug ในการรักษาความดันโลหิตสูงอีกตัวหนึ่ง ทำให้มีตัวเลือกในการใช้ยารักษาความดันโลหิตสูงให้เหมาะกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยได้หลากหลายขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Thananopavarn C, Golub MS, Eggena B, et al. Clonidine a centrally acting sympathetic inhibitor as monotherapy for mild to moderate hypertension. *Am J Cardiol* 1982; 42: 153-158.
2. Hansen J. Alphamethyl-dopa in the treatment of hypertension. *Acta Med Scand* 1968; 183: 323-327.
3. Jerie P. Long-term evaluations of therapeutic efficacy and safety of guanfacine. *Am J Cardiol* 1986; 57: 55E-59E.
4. Reid JL. Clonidine and Imidazolines as antihypertensive agents. In Amery A, Fagard R, Lijnen P, Stoessen J-eds.: *Hypertensive Cardiovascalar Disease. Pathophysiology and Treatment* : The Hogue. *Martinus Nijhofl* 1982; 814-827.
5. Williams CH. Quality of life and its impact on hypertensive patients. *Am J Med* 1987; 82: 98-105.
6. Bousquet P, Feldman J, Schwatz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230: 232-236.
7. Emsberger P, Guiliano R, Willette RN, et al. Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostal ventrolateral medulla *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 408-418.
8. Feldman J, Tibirica E, Bricca G, et al. Evidence for the involvement of imidazoline receptors in the central hypotensive effect of rilmenidine in the rabbit. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 600-604.
9. Tibirica E, Mermet C, Felclman J, et al. Correlaton between the inhibitory effect on catecholaminergic ventrolateral medullary neurons and the hypotension evoked by clonidine : a voltametric approach. *J Pharm Exp ther* 1982; 50: 642-647.
10. Tibrica E, Feldman J, Mermett C, et al. Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline preferring receptors. *Exp J Pharmacol* 1991; 209: 213-221.
11. Meeley MP, Emsberger PR, Granata AR, et al. An endogenous clonidine displacing substance from bovine brain : receptor binding and hypotensive actions in the ventrolateral medulla. *Life Sci* 1986; 38: 1119-1126.
12. Emsberger PR, Meeley MP, Mann JJ, et al. Clonidine binds to imidazole bindng site as well as α2-adrenoceptor in the ventrolateral medulla. *Eur J Phamacol* 1987; 134: 1-13.
13. Bousquet P, Feldman J, Bloch R, et al. The nucleus reticularis a region highly sensitive to clonidine. *Eur J Pharmacol* 1981; 69: 389-392.
14. Laubie M, Poignant JC, Scuvee-Moreau J, et al. Pharmacological propertics of (N-dicyclo propylmethyl) amino-2-oxazoline (S-3341) on alpha-2 adrenoceptor agonist. *J Pharmacol* 1985; 16: 259-278.
15. Van Zwieten PA, Thozolen MJMC, Janleman FAM, et al. Central and peripheral effects of S3341(N-dicyclopropylmethyl) amino-2-oxominozoline in animal models. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 279: 130-148.
16. Head GA, Bruke SL, Chan CKS. Sites and receptors involved in the sympathoinhibitory actions of rilmenidine. *J Hypertens* 1998; 15(suppl 3): S7-S12.
17. Macial M, Susna E, Browne SE. Brain structures involved in the hypotensive effects of rilmenidine: evaluation by 14 C 2- deoxyglucose autoradiography. *J Cardio Pharmacol* 1995; 26(Suppl): S55-S58.
18. Bousquet P, Dontenwill M, Grency H, et al. I1-Imidazoline receptors: an apdate. *J Hypertens* 1998; 16(Suppl 2): S1–S4.
19. Genissel P, Bronet N. Pharmacokinetics of Rilmenidine. *Am J Med* 1989; 87(suppl 3C): 18S-23S.
20. Beau B, Mahieux F, Pqraire M, et al. Efficacy and safety of Rilmenidine for arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1988; 61: 95D-102D.
21. Ostemann B, Brisgarid J, Schmitt I. Fillastre: Efficacy and acceptability of Rilmenidine for mild to moderate Systemic Hypertension. *Am J Cardiol* 1988; 61: 76D-80D.
22. Fellestre J, Letac B, Galinier F, et al. A multicenter double-blind comparative Study of Rilmenidine and Clonidine in 333 Hypertensire Patents. *Am J Cardio* 1988; 61: 81D-85D.
23. Laurent S, Salfa M. Rilmenidine: A novel approach to first-line treatment of

hypertension. *Am J Hypertens* 1995; 5 (Part 2): 99S-105S.
24. Luccioni R, Lambert M, Ambrosi P, et al. Dose-effect relationship of rilmenidine after chronic administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 45: 157-160.
25. Trimaco B, Rosiello G, Sarno D, et al. Effects of One –Year Treatment with Rilmenidine on Systemic Hypertension-Induced Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensire Patients. *Am J Cardio* 1994; 74: 36A-42A.
26. Trimarco B, Morisco C, Sarno D, et al. Rilmenidine in patients with left ventricular mass. *J Cardio Pharmacol* 1995; 26(Suppl 2): S29- S33.
27. Bobile A, Dilley K, Kanellakis P. Sympatho-adrenal mechanisms regulating cardiovascular hypertrophy in primary hypertension: a role of rilmenidine. *J Hypertens* 1998; 16(Suppl 3): S51- S55.
28. Sadowski Z, Szwed H, Kuch-Wocial A, et al. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients after 1 year of treatment with rilmenidine: a double blind, randomized, controlled (versus nifedipine) study. *J Hypertens* 1998; 16(Suppl 3): S55- S62.
29. Mpoy M, Vandeleene B, Ketelsilegers J, et al. Treatment of systemic hypertension in muscle-Treated diabetes mellitus with Rilmenidine. *Am J Cardiol* 1998; 61: 91D- 94D.
30. Scemama M, Fervier B, Beucler I, et al. Lipid profile and antihypertensive efficacy in Hyperlipidemic -Hypertensive Patients Comparisons of Rilmenidine & Captopril. *J Cardio Pharmajcol* 1995; 26(Suppl 2): S34 – S39.
31. Pillion G, Fevriers B, Codis P, et al. Long-Term Control of Blood Pressure by Rilmenidine in High-Risk Population. *Am J Cardiol* 1994; 74: 58A- 65A.
32. Scau B, Mahieux F, Paraire M. Efficacy and safety of rilmenidine for arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1988; 61: 95D–102D.
33. Fiorentini C, Gruillet C, Guzzai M. Etude multicentrique en double avengle comparant la rilminidine 1 mg et hydrochlorothiazide 25 mg chez 224 patients. *Arch Mal Ceaur* 1989; 82: 39-46.
34. La chaud V, Limon I, Tesson F, et al. Characterization of imidazoline-guanidiniun receptive site in renal medulla From Human Kidney. *Am J Hypertens* 1992; 5: S69-S71.
35. Dollochio M, Gosse P, Fillastre JP. La rilmenidine un novel antihypertenseur dans Le traitement de prenier intention de hypertension arterielle essentielle. Etude muticentrique en double avengle contre ate nolol. *Presse Med* 1991; 30: 1265-1271.

VITAMIN K_2 (MENATETRENONE) : A NEW DRUG FOR THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

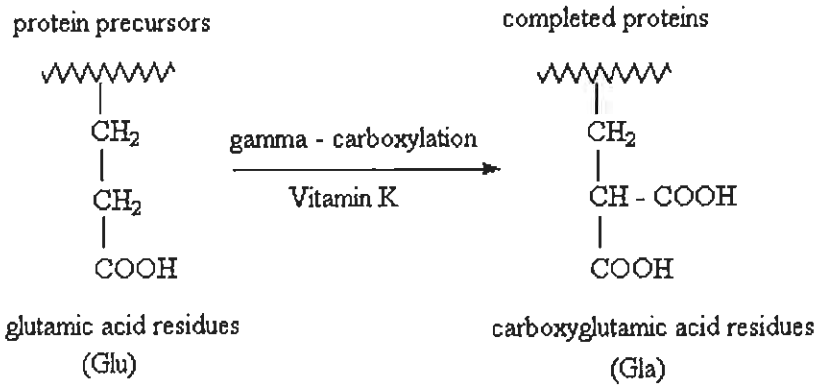
Suwimon Jatupoomdecha[1], Chuthamanee Suthisisang[2]

[1]*Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhonnayok 26120, Thailand*
[2]*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

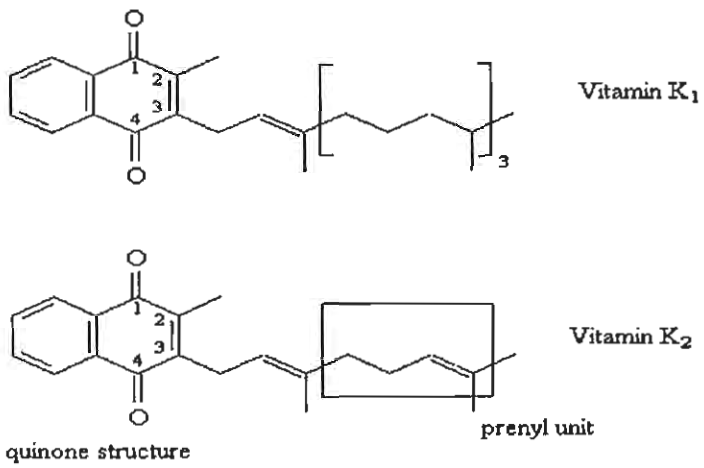
Vitamin K เป็น cofactor ที่สำคัญในปฏิกิริยา γ-carboxylation ซึ่งจะเปลี่ยน glutamic acid residues (Glu) ในโปรตีนบางชนิดให้เป็น γ-carboxyglutamic acid residues (Gla) ดังแสดงในรูปที่ 1[1,2]

Osteocalcin หรือ Bone Gla Protein (BGP) ซึ่งสร้างจาก osteoblast เป็นโปรตีนสำคัญของกระดูกที่ต้องอาศัยปฏิกิริยาข้างต้นในการเปลี่ยนให้มาอยู่ในรูปที่มี Gla ในโมเลกุล โดย Gla ในโมเลกุลนี้จะมี affinity สูงในการจับกับ calcium และ hydroxyapatite ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของกระดูก จึงช่วยในกระบวนการสร้างกระดูกได้ ดังนั้น vitamin K จึงมีความจำเป็นต่อการทำหน้าที่ของ osteocalcin เพราะช่วยให้เกิด Gla residues ดังกล่าว[2-6]

Vitamin K ที่ได้จากธรรมชาติมี 2 รูปแบบ คือ vitamin K_1 (phylloquinone) และ vitamin K_2 (menaquinone หรือ MK) มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2 vitamin K_2 มีหลายชนิดโดยแต่ละชนิดแตกต่างกันที่จำนวน prenyl unit ของ side chain ตรงตำแหน่งที่ 3 ของ quinone structure vitamin K_2 แต่ละชนิดอาจเรียกว่า MK-n เมื่อ n เป็นจำนวน prenyl unit ยา menatetrenone หรือ MK-4 เป็น vitamin K_2



รูปที่ 1 ปฏิกิริยา γ-carboxylation ที่ต้องอาศัย vitamin K เป็น cofactor



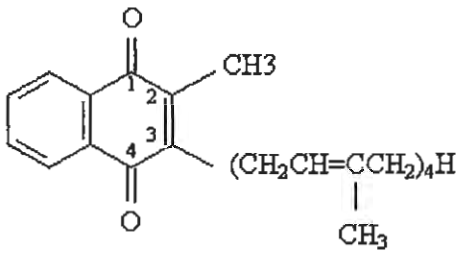
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ Vitamin K_1 และ Vitamin K_2

ที่มี prenyl unit ตรง side chain อยู่ 4 unit (ดูรายละเอียดในหัวข้อลักษณะทางเคมี)

ทั้ง vitamin K_1 และ vitamin K_2 สามารถช่วยในการเกิดปฏิกิริยา γ-carboxylation ได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า vitamin K_2 (menatetrenone) มีความแตกต่างจาก vitamin K_1 ตรงที่นอกจากจะช่วยในกระบวนการสร้างกระดูกดังกล่าวแล้วยังสามารถยับยั้งกระบวนการสลายกระดูกได้อีกด้วย[7-9] ชนิดของ vitamin K ที่นำมาใช้เป็นยาในการรักษาโรคกระดูกพรุนได้แก่ vitamin K_2 (menatetrenone)

ลักษณะทางเคมี[1,10]

Menatetrenone (menaquinone-4 หรือ MK-4) มีชื่อทางเคมีคือ 2-methyl-3-tetraprenyl-1,4-naphthoquinone โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 3



$C_{31}H_{40}O_2$, MW = 444.66

รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ menatetrenone

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

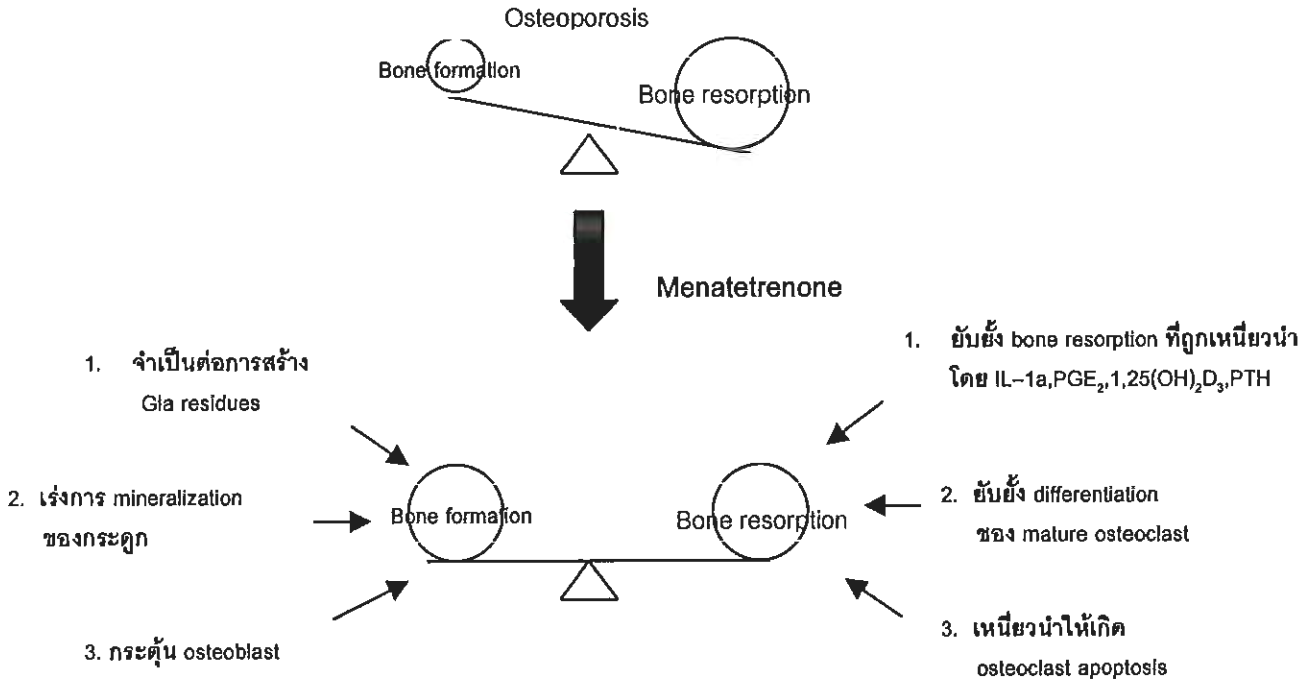
ลักษณะสำคัญของโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) คือ มีการลดลงของเนื้อกระดูก ทำให้กระดูกเปราะบางและหักได้ง่าย เกิดเนื่องจากการเสียสมดุลของกระบวนการสร้างและสลายกระดูกคือมีกระบวนการสร้างน้อยกว่ากระบวนการสลาย[6,10] ยา menatetrenone ออกฤทธิ์โดยช่วยเร่งการสร้างกระดูกและยับยั้งการสลายกระดูก ทำ

ให้เกิดความสมดุลของทั้งสองกระบวนการ ดังแสดงในรูปที่ 4

1. *ฤทธิ์เร่งการสร้างกระดูก (acceleration of bone formation)*

- จากการศึกษาในหนูที่ถูกตัดรังไข่ พบว่า กลุ่มที่มีการให้ยา menatetrenone นาน 6 เดือน มีปริมาณ ของ Gla ใน femur สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ[11] และผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของ human osteoblasts แสดงให้เห็นว่า menatetrenone สามารถเพิ่มการสะสมของ Gla-osteocalcin ได้ นอกจากนี้ยังช่วยเร่งการ mineralization และเพิ่มปริมาณ osteocalcin ทั้งเมื่อให้ menatetrenone เดี่ยวๆ หรือให้ร่วมกับ $1,25(OH)_2D_3$ โดยพบว่า การให้ menatetrenone ร่วมกับ $1,25(OH)_2D_3$ จะช่วยเร่งการ mineralization และเพิ่มปริมาณ osteocalcin ได้ดีกว่าการให้ menatetrenone เดี่ยวๆ[12,13]

- จาก clinical trial phase III พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับ menatetrenone มีค่า serum osteocalcin สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า ยานี้สามารถกระตุ้น osteoblast ซึ่งเป็นตัวสร้าง osteocalcin ได้[14]



รูปที่ 4 สรุปฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Menatetrenone

2. *ฤทธิ์ยับยั้งการสลายกระดูก (Inhibition of bone resorption)*

- เมื่อศึกษาผลของ menatetrenone ในเซลล์เพาะเลี้ยง (mice calvaria culture system) ที่มีการเติมสารเหนี่ยวนำให้เกิด bone resoprtion ลงไป ซึ่งได้แก่ interleukin-1a (IL-1a), prostaglandin E_2 (PGE_2), $1,25(OH)_2D_3$ และ parathyroid hormone (PTH) พบว่า menatetrenone สามารถยับยั้ง bone resorption ที่เกิดจากสารเหล่านี้ได้[15]

- นอกจากนี้ จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงอื่นๆ พบว่า menatetrenone ช่วยยับยั้งการเกิด bone resorption ได้จากการที่ยาสามารถยับยั้ง differentiation ของ mature osteoclast ซึ่งเป็นตัวทำลายกระดูก[8] และมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ osteoclast (osteoclast apoptosis)[16]

เภสัชจลนศาสตร์

จากการให้อาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานยา menatetrenone (15 mg) แบบ single dose หลังอาหาร พบว่าระดับยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) เท่ากับ 253.2 ± 82.4 ng/ml, เวลาที่ให้ระดับยาสูงสุดในพลาสมา (T_{max}) เท่ากับ 4.72 ± 1.52 ชั่วโมง และค่า area under the plasma concentration-time curve (AUC) เท่ากับ 870.7 ± 149.6 ng.hr/ml[17] อาหารมีผลอย่างมากต่อการดูดซึมของยา โดยพบว่า C_{max} ของการรับประทานยาในขณะท้องว่าง (อดอาหารมา 1 คืน) มีค่าเพียง 9% ของ C_{max} จากการรับประทานยาหลังอาหาร และ $AUC_{0-12\ hr}$ ของการรับประทานยาในขณะท้องว่าง (อดอาหารมา 1 คืน) มีค่าเพียง 15% ของ $AUC_{0-12\ hr}$ จากรับประทานยาหลังอาหาร[18] นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปริมาณไขมันในอาหารมากขึ้นจะทำให้ยาถูกดูดซึมได้มากขึ้นด้วย[19] มีการศึกษาผลของอายุต่อการดูดซึมของยาหลังให้ยา 7 วันติดต่อกัน โดยพบว่า ในอาสาสมัครวัยหนุ่มสาว ค่า C_{max} และ $AUC_{0-12\ hr}$ หลังจากให้ยาครั้งสุดท้ายจะใกล้เคียงกับหลังให้ยาครั้งแรก แต่ในผู้สูงอายุ พบว่า ค่า C_{max} และ $AUC_{0-12\ hr}$ หลังให้ยาครั้งสุดท้ายสูงกว่าหลังให้ยาครั้งแรกประมาณ 1.3 และ 1.5 เท่าตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจาก non-linear pharmacokinetics ในผู้สูงอายุ[20]

จากการศึกษาในหนูหลังจากให้ยา menatetrenone โดยการรับประทาน พบว่ายามีการกระจายไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดี เช่น ตับ, ม้าม, ต่อมหมวกไต และ adipose tissue นอกจากนี้ยายังกระจายไปสู่เนื้อกระดูกที่ bone marrow และ calcellous tissue ของ femur ได้ดีโดยมีความเข้มข้นของยาสูงกว่าในพลาสมา และความเข้มข้นของยาในเนื้อกระดูกนี้จะสูงขึ้นเรื่อยๆ หลังจากมีการให้ยาซ้ำ (repeated administration)[21] ในส่วนของการกำจัดยานั้นพบว่าเมื่อให้ยาแบบ single dose ทางปากแก่หนู และวัดปริมาณยาที่ถูกกำจัดออกจากร่างกายตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงวันที่ 7 หลังให้ยา พบว่า 7.8% ถูกกำจัดทางปัสสาวะ และ 88.2% ถูกกำจัดทางอุจจาระ รวมทั้งสิ้น 96.0% ที่ถูกกำจัด[22] เมื่อทดลองในลักษณะเดียวกันในสุนัขพบว่าทางกำจัดยาหลักคือทางอุจจาระเช่นเดียวกัน โดย 2.3% ถูก

ตารางที่ 1 Final global improvement แยกตามสาเหตุโรค

Osteoporosis	ดีขึ้นถึงดีขึ้นอย่างชัดเจน	ค่อนข้างดีขึ้นถึงดีขึ้นอย่างชัดเจน
primary	164/316 (51.9%)	267/316 (84.5%)
secondary	17/55 (30.9%)	33/55 (60.0%)

กำจัดทางปัสสาวะ และ 78.1% ถูกกำจัดทางอุจจาระ รวมทั้งสิ้น 80.4% ที่ถูกกำจัด[10]

การศึกษาทางคลินิก

- ผลของการให้ยา menatetrenone วันละ 45 mg ต่อการคงสภาพของเนื้อกระดูกและการลดอาการปวดกระดูก (รวมเป็น final global improvement) ใน primary osteoporosis (ผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุจากการหมดประจำเดือนหรือเข้าสู่วัยชรา) และใน secondary osteoporosis (renal osteodystrophy, alcoholic and steroid osteopenia) แสดงดังตารางที่ 1[10]

- ในการศึกษาทางคลินิก (phase III controlled study) แบบ double blind พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ใช้ยา menatetrenone เดี่ยวๆ มีอาการปวดหลังลดลง 57.2% (87/152 ราย) ส่วนผู้ป่วยกลุ่มที่ใช้ยา menatetrenone ร่วมกับยาแก้ปวด มีอาการปวดหลังลดลง 61.1% (66/108 ราย)[23]

- ผลของศึกษาแบบ double blind เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ menatetrenone 45 mg/วัน กับ alfacalcidol 1.0 μg/วัน ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุจากการหมดประจำเดือนหรือเข้าสู่วัยชรา แสดงให้เห็นว่าในด้านการบรรเทาอาการเจ็บปวดนั้นยาทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน แต่ในด้านการแก้ไขปรับปรุงมวลกระดูก (bone density improvement) พบว่า menatetrenone ให้ผลดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อรวมผลทั้งสองเข้าด้วยกันเป็น final global improvement พบว่า menatetrenone มี final global improvement rate ที่สูงกว่า alfacalcidol[14]

- เมื่อศึกษาผลของ menatetrenone ต่อ metabolism ของกระดูกและ calcium ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน พบว่า menatetrenone สามารถลดปริมาณ calcium ในปัสสาวะเมื่อเทียบกับก่อนให้ยา ซึ่งอาจเป็นผลจากการลด bone resorption นอกจากนี้ยังพบว่า menatetrenone มีผลทำให้ปริมาณ Gla ในปัสสาวะสูงขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนให้ยา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า menatetrenone สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา γ-carboxylation ของโปรตีนได้[24]

- พบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งการลดลงของ bone mineral density (BMD) ของกระดูกสันหลังในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้ยา แต่ไม่ดีเท่ากลุ่มที่ได้รับ hormone replacement therapy[25]

ข้อบ่งใช้, ขนาดและวิธีใช้[10,23]

ช่วยยับยั้งการลดลงของเนื้อกระดูก และมีผลช่วยลดอาการปวดหลังอันเนื่องจากโรคกระดูกพรุน (osteoporosis)

ขนาดสำหรับผู้ใหญ่ ให้ menatetrenone วันละ 45 mg โดยแบ่งให้ 3 เวลาหลังอาหาร

ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์[17,18,20,23,24]

ผู้ป่วยหรืออาสาสมัครสุขภาพดีส่วนใหญ่ทนต่อยาได้ดี ไม่พบอาการอันไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงจากการใช้ยา อาการอันไม่พึงประสงค์ที่พบได้แก่ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย มีผื่นแพ้ขึ้นที่ผิวหนัง ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ ซึ่งพบได้ไม่บ่อย ส่วนค่าทางห้องปฏิบัติการที่อาจผิดปกติได้แก่ อาจมีการเพิ่มขึ้นของ glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (Al-P), γ-glutamyl transferase (γ-GTP), blood urea nitrogen (BUN)

ปฏิกิริยาสัมพันธ์กับยาอื่น[1,2]

ห้ามใช้ menatetrenone ร่วมกับ warfarin ซึ่งเป็น vitamin K antagonist เนื่องจากทำให้ฤทธิ์ในการเป็น anticoagulant ของ warfarin ลดลง

ข้อควรระวังในการใช้ยา

1. ควรใช้ยานี้ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกระดูกพรุน
2. หากเกิดอาการผื่นแดง หรือคัน ให้หยุดใช้ยา
3. เนื่องจากยานี้มักใช้ในผู้สูงอายุเป็นระยะเวลานาน จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวังและดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิดระหว่างที่ได้รับยา
4. ความปลอดภัยของการใช้ยานี้ในเด็ก สตรีมีครรภ์ หรือให้นมบุตรยังไม่ได้รับการยืนยันและยังไม่มีประสบการณ์ในการใช้ทางคลินิก

รูปแบบยา

ยาเม็ดแคปซูลนิ่ม (soft capsule) ขนาด 15 mg

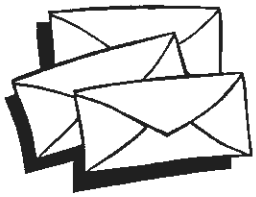
เอกสารอ้างอิง

1. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995; 345: 229-34.
2. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 1989; 69: 990-1003.
3. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid γ-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3925-9.
4. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, et al. Characterization of a γ-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1447-51.
5. Hauschka PV, Reid ML. Timed appearance of calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in developing chick bone. *Dev Biol* 1978; 65: 426-34.
6. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 1995; 125: 1812-21.

7. Hara K, Akiyama Y, Nakamura T, et al. The inhibitory effect of vitamin K (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain. *Bone* 1995; 16: 179-84.
8. Akiyama K, Hara K, Tajima T, et al. Effect of vitamin K_2 (menatetrenone) on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures. *Eur J Pharmacol* 1994; 263: 181-5.
9. Kumegawa M, Kameda T. Vitamin K_2 inhibits osteoclast mediated bone resorption *in vitro*. In: Orimo H, editor. *Vitamin K and osteoporosis*. Tokyo: Intermedd inc; 1998. P21-32.
10. Glakay® product manual.
11. Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, et al. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62: 145-53.
12. Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, et al. Vitamin K_2 promotes $1\alpha,25(OH)_2$ vitamin D_3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 466-73.
13. Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K_2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 431-8.
14. Orimo H, Fugita T, Onomura T, et al. Clinical Evaluation of Ea-0167 (Menatetrenone) in the treatment of osteoporosis. *Clin Eval* 1992; 20: 45-100.
15. Hara K, Akiyama Y, Tajima T, et al. Menatetrenone inhibits bone resorption partly through inhibition of PGE_2 synthesis *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 535-42.
16. Kameda T, Miyazawa K, Mori Y, et al. Vitamin K_2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 515-9.
17. Ishii M, Shimomura M, Hasegawa J, et al. Studies on pharmacokinetics and bioequivalence of soft capsules of menatetre-none. *Clinical Drugs* 1992; 8(3 suppl.).
18. Ishii M, Shimomura M, Hasegawa J, et al. Study on the metabolism and excretion of menatetrenone (Ea-0167) and the effect of food on menatetrenone absorption. *Jpn Pharmacol Ther* 1995; 23: October 20.
19. Uematsu T, Nagashima S, Niwa M, et al. Effect of dietary fat content on oral bioavailability of menatetrenone in humans. *J Pharmaceu Sciences* 1996; 85: 1012-6.
20. Ishii M, Shimomura M, Hasegawa J, et al. Multiple-dose pharmacokinetic study of soft gelatin capsule of menatetrenone (Ea-0167) in elderly and young volunteers. *Jpn Pharmacol Ther* 1995; 23, October 20.
21. Sano Y, Tadano K, Kaneko K, et al. Distribution of menaquinone-4, a therapeutic agent for osteoporosis, in bone and other tissues of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; 41: 499-514.
22. Sano Y. Metabolic fate of menatetrenone – absorption, distribution, metabolism, and elimination of ^{14}-menatetrenone after single-dose oral administration to rats. *Jpn Pharmacol Ther* 1995; 23: 2659.
23. Product Profile of GLAKAY Capsules 15 mg.
24. Orimo H, Shiraki M, Tomita A, et al. Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: A double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 1998; 16: 106-12.
25. Iwamoto I, Kosha S, Noguchi S, et al. A longitudinal study of the effect of vitamin K_2 on bone mineral density in postmenopausal women a comparative study with vitamin D_3 and estrogen-progestin therapy. *Maturitas* 1999; 31: 161-4.

ประกาศ

สมาชิกท่านใดยังไม่ได้ส่ง



แบบสอบถามประเมินวารสารเภสัชวิทยา

กรุณาส่งกลับมาคืนมายังกองบรรณาธิการโดยด่วน

ข้อคิดเห็นของท่านเป็นกำลังใจและมีส่วนอย่างมาก
ต่อการเจริญก้าวหน้าของวารสารเภสัชวิทยา

<u>ขอเรียนเชิญส่งผลงานของท่านมาตีพิมพ์</u>
ใน *Thai Journal of Pharmacology*

- เราออก 3 ฉบับต่อปีแน่นอน
- มีการทบทวนผลงานจากผู้ทรงคุณวุฒิ
- และวารสารเป็นของท่าน.....

PHARMACOLOGICAL DIGEST

Laddawal Phivthong-ngam

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand

High-dose estrogen prevents stroke damage in laboratory animals

Estrogen likely produces its beneficial effects by enhancing the blood flow to the brain after arterial occlusion and by somehow rescuing damaged neurons. The study of the time-line of estrogen's effects on brain injury in an experimental model of stroke in rats show that the volume of the experimentally induced ischemic lesions was significantly reduced by intravenous administration of a high dose of estrogen (100 mcg/kg) as late as 3 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The lesion volume of 20.9% to 21.8% in untreated rats was reduced to 6.3%, 10.3%, 11.8%, and 13.5% when estrogen was given 0.5 hour, 1 hour, 2 hours, and 3 hours, respectively, after occlusion. In a separate experiment, cerebral blood flow in ovariectomized rats was confirmed to be decreased at 5 minutes after MCAO. In rats that received estrogen, blood flow rebounded within 2 days, and the rate was significantly greater than that in rats that did not receive estrogen. This study raises the possibility that estrogen compounds could be a useful therapy in preserving brain tissue, even if administered after the ischemic insult. In the second report, the investigators show that mice bred to lack estrogen receptor-alpha showed the same amount of neurologic disability and ischemic tissue damage as normal mice after experimentally induced stroke. There was no difference in blood flow in the brain during and after stroke between the two groups of mice. The researchers interpret these results to mean that estrogen inhibits brain injury by mechanisms that do not depend on activation of [the estrogen receptor-alpha] subtype. They add that the findings argue against targeting estrogen receptor agonists with selective estrogen receptor-alpha activity in the brain. They are just beginning to do the same experiments in mice lacking the beta subtype. These experiments will be helpful in designing estrogens that act at the right receptor in brain.

[Stroke 2000; 31:738-744, 745-750]

Genetic info may lead to meningitis vaccine

Researchers have not only mapped the complete genetic code of a bacterium that causes some cases of meningitis, but also identified several proteins on its surface that might lead to a vaccine against the infection. There are five types of bacteria that can cause meningitis -- a potentially fatal inflammation of membranes that surround the brain and spinal cord -- and septicemia. There are vaccines that protect against two types of meningitis bacteria, but there is no vaccine against serotype B, the strain that most often causes illness in the United States and Europe. The reseacheres report on the successful identification of all genes found in this strain of meningitis bacteria. This process helped the researchers identify which genes appear to allow the bug to defeat the body's immune system. Using the genetic information and cloned proteins found on the surface of meningitis bacteria. After testing several hundred of these proteins in mice, the researchers identified seven proteins that hold promise as vaccines against meningitis. The hope is that vaccination with one or more of these proteins will trigger the immune system to produce antibodies, which will protect against infection with meningitis bacteria. Even though developing vaccines is a lengthy, difficult process, the research shows the enormous potential of using genetic information to battle infectious diseases.

[Science 2000; 287: 1767-1768, 1809-1820]

Pamidronate prevents skeletal complications in breast cancer patients

Pamidronate therapy reduces the risk of skeletal fractures in breast cancer patients with osteolytic bone metastases for at least 2 years, follow-up data from two trials show. In fact, the treatment reduces the number of skeletal complications in this population by 35%, and the number of patients who experience this

complication by 20%. The team combined data from two multicenter randomized studies of pamidronate versus placebo. The participants had stage IV breast cancer with osteolytic bone metastases and were receiving either hormonal therapy or cytotoxic therapy at study initiation. Patients in both cohorts were randomized to 90-mg infusions of pamidronate or placebo every 3 to 4 weeks. Approximately one third of the 367 women randomized to pamidronate and one quarter of the 384 patients receiving placebo completed the 2-year follow-up. Pamidronate significantly reduced the skeletal morbidity rate, from 3.7 to 2.4, the investigators report. The drug also significantly reduced the number of patients who had skeletal complications, from 64% to 51%, and nearly doubled the median time to the first skeletal complication, from 7 months to 12.7 months. The results in the current report confirm that skeletal complications and the proportion of patients with such complications...are lower for at least 2 years in a [broad] population of patients with advanced breast carcinoma receiving either hormonal or cytotoxic chemotherapy. Moreover, results from this and other trials suggest that it is likely that pamidronate would be effective in the treatment of osteolytic metastases associated with a broad range of tumors. While additional, larger studies are needed to confirm their results, they conclude that 90-mg pamidronate infusions can be recommended as an addition to standard hormonal or chemotherapy regimens for the treatment of bone metastases in patients with breast carcinoma.

[Cancer 2000; 88: 1082-1090]

HIV infection accelerates onset of smoking-induced emphysema

As survival rates of patients with HIV infection increase with improved therapies, the rate of emphysema related to smoking in these patients is also likely to increase. Specifically, they found that HIV infection accelerates the onset of smoking-induced emphysema. The reseacheres conducted a cross-sectional study with 114 consecutive HIV-seropositive subjects without AIDS-related pulmonary complications. These subjects were matched to 44 HIV-seronegative controls for smoking history and age. Along with pulmonary function measurements, the subjects underwent bronchoalveolar lavage and high-resolution computer tomography of the chest. Emphysema was identified in 17 of 114 HIV-seropositive participants compared with 1 of 44 HIV-seronegative controls. The incidence of emphysema in participants with a smoking history of 12 pack-years or greater was 37% (14 of 38 persons) in the HIV-seropositive group compared with 0% (0 of 14 persons) in the HIV-seronegative group. When lymphocyte subtypes of the subjects were evaluated, the researchers found that HIV-seropositive persons with emphysema [had] the highest percentage of lavage lymphocytes bearing the cytotoxic phenotype. Given the relatively young age of the patients in the study (the median age was 33 years), they believes that the percentage of HIV-seropositive smokers who developed emphysema is striking. They therefore suggest that smoking-related respiratory symptoms and impairment may assume increasing importance as part of the natural history of HIV, particularly in light of the prevalence of cigarette smoking in this population. The study findings also support a role for cytotoxic lymphocytes in the pathogenesis of emphysema.

[Ann Intern Med 2000: 132: 369-372]

Janssen to pull propulsid from US market

Janssen Pharmaceutica will stop marketing the prescription heartburn drug Propulsid (cisapride) in the United States as of July 14, 2000. A Food and Drug Administration (FDA) statement notes that the drug has been associated with 341 reports of heart rhythm abnormalities including 80 reports of deaths. Most of these adverse events occurred in patients who were taking other medications or suffering from underlying conditions known to increase risk of cardiac arrhythmia associated with cisapride. The move to withdraw the drug is voluntary and the effective date is intended to provide time for patients and physicians to make treatment decisions. Patients who are currently prescribed Propulsid are urged to promptly contact their healthcare providers to discuss alternatives. The drug is used to treat severe nighttime heartburn in adult patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) that does not adequately respond to other therapies. Its labeling has been revised several times since it was approved in 1993, to point out its risks. Despite these risk management efforts, the firm decided in consultation with the Food and Drug Administration that

continued general US prescription access to the drug poses unacceptable risks. The FDA advises physicians who are treating patients with severely debilitating conditions for whom they believe the benefits of cisapride outweigh its risks to contact Janssen. The Titusville, New Jersey company will continue to make the drug available to patients who meet specific clinical eligibility criteria for a limited-access protocol. In light of the decision to withdraw the drug, the FDA has canceled a public advisory meeting scheduled for April 12, in which ways to reduce adverse effects associated with Propulsid were to be discussed.

[http://www.reutershealth.com/cgi-bin/ssi/framethis?catalog=eline&file=200003 2419.html]

Gene variation may increase drug potency

About 8% of the Caucasian population in the US has a gene variation that could increase the risk of serious complications associated with certain medications, including the clot-preventing drug warfarin. Only 2% of African Americans have the same gene version, but they are more likely to possess another altered gene that may also cause problems. It has been found that 8% of white Americans have a certain version of the gene for a liver enzyme -- known as cytochrome P450 2C9 -- that metabolizes certain drugs. The altered gene causes some people to process particular drugs more slowly. They need a lower dose. They have a higher level of the drug with the same dose (as other people). In cases of people taking warfarin, an anticoagulant often given to people to prevent stroke, the gene variation could increase the risk of excessive bleeding. The gene, known as CYP29C*3, may also affect the drugs tolbutamide (used by diabetics to lower blood sugar), and phenytoin (an anti-seizure medication). People with the gene variation who take tolbutamide could end up with excessively low blood sugar, and people with the altered gene taking phenytoin could end up with toxic levels of the drug in their blood. The same gene could cause problems with the metabolism of other drugs, but these appear to be the main ones. While searching for gene variations known to be common in certain populations, another altered gene was found in about 3% of African Americans, but not present in Caucasians. This new variation needs to be studied further, but may cause problems with the same drugs as CYP29C*3. The test for CYP29C*3 is not widely available because it is expensive. As yet, there is no option for patients in a regular practice to get this test. People concerned about having an extra sensitivity for these drugs should ask their doctor about participating in clinical trials, she suggested. People taking warfarin who experience excessive bleeding should definitely be tested for the gene variant, she added.

[http://www.reutershealth.com/cgi-bin/ssi/framethis?catalog=eline&file=200003 2419.html]

C-reactive protein levels improve prediction of cardiovascular risk in women

C-reactive protein (CRP) measurement adds to the predictive value of other risk factors for cardiovascular disease in women. The finding is reported in the March 23rd issue of the New England Journal of Medicine by Dr. Paul Ridker and colleagues from Harvard Medical School in Boston, Massachusetts. They used a commercial assay to measure hs-CRP (high-sensitivity CRP) and 11 other serum markers in 122 women (cases) who subsequently experienced a fatal or nonfatal myocardial infarction, stroke, or coronary revascularization procedure and in 244 women (controls) matched for age and smoking status. Cases had significantly higher baseline levels of four markers of inflammation--hs-CRP, serum amyloid A, sICAM-1, and interleukin-6 - and higher baseline measures of total and LDL cholesterol, apolipoprotein B-100, homocysteine, and total cholesterol:HDL cholesterol ratio than did controls, the authors report. Cases also had significantly lower HDL cholesterol levels than did controls. Of the 12 measures, the level of hs-CRP was the most powerful predictor of risk in the univariate analysis (relative risk for women in the highest quartile as compared with the lowest quartile, 4.4). Apolipoprotein B-100 and total cholesterol:HDL cholesterol ratio were less powerful risk predictors (relative risk of 3.4 for each). In logistic-regression analyses, only hs-CRP level and total cholesterol:HDL cholesterol ratio independently predicted subsequent cardiovascular events after adjustment for other significant risk factors such as obesity, hypertension, diabetes, and parental history of premature coronary artery disease. [E]ven among women with 'safe' levels of LDL cholesterol, the adjusted relative risk

of cardiovascular events increased approximately 39% with each increasing quartile for hs-CRP. Half of strokes and myocardial infarctions occur in people without any lipidemia. This study, along with at least seven others like it, show that cardiovascular risk can be predict in individuals with and without elevated lipid levels. Physicians need to recognize a fundamental issue, that atherosclerosis is an inflammatory disease. Whereas high cholesterol might foster the development of atherosclerosis, plaque instability and adverse cardiovascular outcomes result from inflammation. By identifying these people at risk--through measuring CRP levels, for example—we can determine which individuals might benefit most from statin therapy, which can reduce the inflammation beyond the anti-inflammatory effects provided by aspirin.

[N Engl J Med 2000; 342: 836-843]

Vitamin C, E may protect the aging brain

Taking vitamin C and vitamin E supplements may help protect memory and mental decline as you age, researchers report. A new study has found that elderly men who took vitamin E and C supplements at least once a week over a number of years were protected from dementia and actually showed improvements in cognitive function – a catch-all term including memory, creativity and mental acuity. Although a protective effect was seen for two different types of dementia in men who took both vitamins, the supplements did not appear to prevent dementia due to Alzheimer's disease. In the study, the researcheres looked at supplement use among 3,385 Japanese-American men in 1988, and for a subset of the men, data was collected from 1982 as well. The amount of each vitamin the men took was unknown. The men, who ranged in age from 71 to 93 years, were tested 4 years later in 1993. At that time, most men were not experiencing any memory problems, although 47 of the men had Alzheimer's dementia, 35 had vascular dementia (a dementia associated with artery-clogging and stroke), 50 had mixed/other types of dementia, and 254 performed poorly on the cognitive tests without diagnosed dementia. Men who took either vitamin C or E alone in 1988 scored better on the 1993 memory tests than men who took no supplements, the investigators report. Men who took both vitamins exhibited only a small improvement over those taking no supplements. However, that men who took both vitamin E and C supplements together for many years showed a substantially greater improvement, suggesting that long-term use is required to improve cognitive function in late life. The researchers believe that vitamin C and E may protect from brain damage because they are antioxidants and can mop up brain-damaging free radical particles.

[Neurology 2000; 54: 1265-1272]

New drug reduces pain of prostate cancer

Prostate cancer patients who are in severe pain because cancer has spread to their bones may be able reduce their need for morphine-based painkillers with a new anti-cancer drug called suramin, which is not yet on the market. In a study, suramin, also slowed the progression of the cancer. In the clinical trial, 460 patients received either suramin plus hydrocortisone or an inactive placebo plus hydrocortisone. All the patients had prostate cancer that had spread to their bones, and required a very strong painkiller, such as morphine, to control their pain. The patients who were taking suramin experienced greater reduction in pain and morphine intake than patients on placebo, the researchers report. Forty-three percent of the suramin group achieved a reduction in pain that lasted about 240 days compared with only a 28% of the placebo group who had a reduction in pain that lasted for 69 days. The cancer also spread more slowly in the suramin group and more patients in this group had a decrease in prostate specific antigen level, which is a marker that indicates the progression of prostate cancer. Overall survival was similar in the two groups, the researchers report. Small noted that the survival advantage of suramin might have been reduced in this study because patients on placebo were allowed to cross over and begin taking suramin late in the trial.

[Journal of Clinical Oncology 2000; 18: 1440-1450]

Rezulin to be withdrawn from the market

The US Food and Drug Administration (FDA) has asked the manufacturer of Rezulin (troglitazone) a drug used to treat type 2 diabetes mellitus to remove the product from the market. The drug's manufacturer, Parke-Davis/Warner-Lambert, has agreed to the

FDA's request. The FDA took this action after its review of recent safety data on Rezulin and 2 similar drugs, rosiglitazone (Avandia) and pioglitazone (Actos), showed that Rezulin is more toxic to the liver than the other 2 drugs. Data to date show that Avandia and Actos, both approved in the past year, offer the same benefits as Rezulin without the same risk. When considered as a whole, the premarketing clinical data and postmarketing safety data from Rezulin as compared to similar, alternative diabetes drugs indicate that continued use of Rezulin now poses an unacceptable risk to patients. Severe liver toxicity has been known to occur with Rezulin since 1997. In consultation with the FDA, Parke-Davis has strengthened the drugs labeling several times and has recommended close monitoring of liver function in patients taking Rezulin. In March 1999, the FDA's Endocrine and Metabolic Drugs Advisory Committee reviewed the status of Rezulin and its risk of liver toxicity and recommended continued availability of this drug in a select group of patients ? patients not well-controlled on other diabetes drugs. Since then, the FDA has continued to actively monitor adverse events associated with Rezulin, as well as those associated with Avandia and Actos. After up to 9 months of marketing experience with these 2 newer drugs, it has become clear that these newer drugs have less risk of severe liver toxicity than Rezulin. Patients using Rezulin are urged to contact their physicians for information about alternative treatments. Patients should not discontinue taking Rezulin or other treatments for diabetes without discussing alternative therapies with their physicians.

[http://pharmacotherapy.medscape.com/MedscapeWire/2000/0300/medwire0322.rezulin.html]

Use of NSAIDs increases the risk of hospitalization for CHF in elderly

Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by elderly patients doubles the risk of being hospitalized for congestive heart failure (CHF), and for those with a history of heart disease it increases the risk by more than 10 times. Dr. David Henry and Dr. John Page, both of The University of Newcastle in Australia, interviewed 365 patients with a mean age of 76.6 who were admitted to hospitals with a primary diagnosis of congestive heart failure. Controls were 658 age- and sex-matched patients without CHF admitted to the same hospitals. Apart from the use of low-dose aspirin, NSAID use during the week before admission to the hospital was associated with a 2.1 odds ratio for hospital admission with CHF, compared with patients who had not used NSAIDs. Patients with a history of heart disease who used NSAIDs had an odds ratio of 10.5 for first admission with heart failure compared with 1.6 for those without such a history. The odds ratio for a first admission to a hospital with CHF rose with increasing dose of NSAIDs taken the previous week, the researchers report. Furthermore, the risk of hospitalization for CHF was greater for NSAIDs with a long half-life. Guidelines should discourage the use of NSAIDs in individuals with a damaged but compensated left ventricle. These drugs should be used with caution in such individuals, in the lowest possible dose, and drugs with a long plasma half-life should be avoided. The investigators say that it is possible that drugs that are selective inhibitors of the inducible cyclo-oxygenase 2 will have a lower rate of adverse effects on the kidney and cardiovascular system, but this remains to be established in well-designed pharmaco-epidemiological studies.

[Arch Intern Med 2000; 160: 777-784]

Low folate levels linked to Alzheimer's disease

Women who have low levels of folate, the by-product of folic acid found in the blood, appear to be at greater risk of Alzheimer's disease. In the study of 30 nuns who participated in a long-term study of Alzheimer's disease, half had brain changes consistent with the memory-robbing illness at autopsy. The women, aged 78 to 101 when they died, had lived at the same convent for most of their lives. Those women with Alzheimer's disease were more likely to have low blood levels of folate than women without the illness. None of the other nutritional markers analyzed in the blood samples was related to brain degeneration or Alzheimer's disease, according to the report in the April issue of the American Journal of Clinical Nutrition. The authors note that the study could not determine whether low levels of folate actually cause Alzheimer's. And the findings do not provide any evidence that taking folic acid supplements can prevent the

disease or slow it down. It is possible that the women had low blood levels of folate due to problems absorbing or metabolizing the nutrient. The women all ate in the same kitchen and, presumably, had similar intakes of folic acid. The researchers call for further research in this area, noting that there are several possible explanations for the relationship between the nutrient and this disease. Folic acid, a nutrient found in green leafy vegetables, liver, kidney, whole grains and nuts, is important in the development of the central nervous system and in the maintenance of blood vessels. Lack of this nutrient can cause birth defects in the developing fetus.

[American Journal of Clinical Nutrition 2000; 71: 993-998]

Vaccine recharges chickenpox immunity

The vaccine that protects against chickenpox appears to reactivate itself and boost the immune system when the body's immunity to the virus diminishes, new study findings suggest. While this boost can cause mild illness, or even a few red spots, it may mean that the vaccine provides more protection to people as they age -- rather than less, as has been feared, researchers report. Chickenpox is caused by the varicella zoster virus, which also causes shingles --a painful outbreak of blisters on the body trunk. Since the Food and Drug Administration (FDA) approved a chickenpox vaccine in 1995, more than 10 million Americans have been vaccinated against the virus. It was feared that the protection offered by the vaccine might wane with age, leaving adults vulnerable to infection. While chickenpox tends to be mild in children, it can be potentially life threatening in adults who have never had the disease. In a new study, the reseacheres of the FDA's Center for Biologics Evaluation and Research in Bethesda, Maryland, followed nearly 5,000 children who had received the chickenpox vaccine. In children who initially had a strong immune response to the vaccine, immunity tended to decline during the 4 years of the study. But in children whose initial response to the vaccine was weaker, immunity increased over time. The investigators discovered that about 500 children experienced substantial increases, or boosts, in their chickenpox immunity. The vaccine, which contains a live, but weakened, form of the chickenpox virus, appears to cause a latent (or dormant) infection. Most of the time, the virus is quiet, but as immunity declines, the latent virus wakes up. Most likely, the boost won't make a child sick, but will strengthen the immune system. Still, the authors note that children who have been vaccinated against the chickenpox should continue to be monitored to keep track of the long-term effects of the vaccine. While the vaccine appears to boost itself in many cases, some people may need to be revaccinated if their immunity drops too low. It may seem like bad news that the latent chickenpox virus wakes up from time to time, but it really shows that the vaccine can provide life-long protection against the illness. For people who do get sick during these boosts, antiviral medication should help. The vaccine was studied extensively before being approved, but how long its protection lasts is unknown.

[Nature Medicine 2000; 6: 381-382, 451-454]

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 (front: 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 footnote 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, and 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.

Keywords: 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 tables or illustrations.

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

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

References: Place the numbered 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; 79:311-314.

(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;2:742-744.

(3) No author given

Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial). *BMJ* 1981;283-286.

(4) Volume with supplement

Magni F, Borglu S, Berti F. BN-52021 protects guinea-pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 suppl 5:75-78.

(5) Books and other monographs

5.1 Personal author(s)
Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev ed. London: St. 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 Basis of Therapeutics*. 6th 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 papers will be critically reviewed by 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.

ใบบอกรับวารสารเภสัชวิทยา

วันที่ .....

เรียน ผู้จัดการวารสารเภสัชวิทยา

ข้าพเจ้า .....
ที่อยู่ .....
..... โทรศัพท์ .....
e-mail: .....

มีความประสงค์จะรับ วารสารเภสัชวิทยา ปีที่ ..... ฉบับที่ ..... เป็นต้นไป เป็นเวลา ..... ปี
พร้อมกันนี้ได้แนบเช็คไปรษณีย์หรือธนาณัติในนาม "ผู้จัดการวารสารเภสัชวิทยา"
สั่งจ่าย ป.ณ. ปทุมวัน เป็นจำนวนเงิน ..... บาท มาเป็นค่าสนับสนุนการจัดทำวารสารด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....
( )

หมายเหตุ อัตราค่าบอกรับวารสาร เภสัชวิทยา

1. สมาชิกสมาคมเภสัชวิทยา	ไม่ต้องชำระค่าวารสาร
2. สมาชิกวารสารเภสัชวิทยา	อัตราบอกรับปีละ 200 บาท (3 ฉบับ)
3. นิสิต/นักศึกษา (แสดงสำเนาบัตรประจำตัวนักศึกษา)	อัตราบอกรับปีละ 100 บาท (3 ฉบับ)

ทะเบียนประวัติ

1. ชื่อ นาย / นาง / นางสาว ..... ชื่อสกุล .....

   ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์ใหญ่) .....

2. เกิดวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

3. ตำแหน่งหน้าที่หรือตำแหน่งทางวิชาการในปัจจุบัน

   .....

4. สถานที่ทำงาน

   .....

   ..... โทรศัพท์/แฟกซ์ .....

   e-mail: .....

5. ที่อยู่ปัจจุบัน

   .....

   ..... โทรศัพท์/แฟกซ์ .....

6. ประวัติการศึกษาขั้นอุดมศึกษา (เรียงลำดับจากวุฒิสูงสุด)

ปี พ.ศ.	ชื่อสถานศึกษา	วุฒิที่ได้รับ

7. สาขาหรือแขนงวิชาที่สนใจหรือเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ

   .....

   .....

   .....

   .....

สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
ใบสมัครเข้าเป็นสมาชิก

เขียนที่ .....
วันที่ ..... เดือน .....พ.ศ. .....

ข้าพเจ้า นาย / นาง / นางสาว ..... ชื่อสกุล .....

อาชีพ .....ขอสมัครเข้าเป็นสมาชิกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยและขอรับรองว่าจะปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับของสมาคมทุกประการ

ข้าพเจ้ายินดีที่จะชำระค่าบำรุงสมาคมโดย

- ☐ เป็นรายปี ปีละ 200 บาทถ้วน สำหรับสมาชิกรายปี
- ☐ ครั้งเดียว 1,000 บาทถ้วน สำหรับสมาชิกตลอดชีพ
  (ผ่อนชำระได้ 2 งวด งวดละ 500 บาท)

ลงชื่อผู้สมัคร .....
( )

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
วาระประจำปี พ.ศ. 2543-2545

คณะกรรมการที่ปรึกษา	พล.ต.สุนันท์ โรจนวิภาต
	รศ.พญ.กาญจนา เกษสอาด
	ศ.ดร.อำนวย ถิฐาพันธ์
	รศ.ดร.อรพรรณ มาตังคสมบัติ
	รศ.ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์
	รศ.พ.อ.ดร.ทัศนัย สุริยจันทร์
	รศ.พญ.สุมนา ชมพูทวีป
	รศ.นสพ.พีระพล อยู่สวัสดิ์
	รศ.ดร.เมธี สรรพานิช
	รศ.วณี ทวีทรัพย์
	รศ.ดร.ชวนี ทองโรจน์
	ดร.อุดม จันทรารักษ์ศรี
คณะกรรมการบริหาร	
นายกสมาคม	รศ.พ.อ.ดร.บพิตร กลางกัลยา
อุปนายก	ผศ.ดร.สุรชัย อัญเชิญ
ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม	รศ.ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์
เลขาธิการ	พ.อ.หญิงอรพินท์ รัตนจันทร์
ฝ่ายวิชาการ	รศ.ดร.กิตติมา ศรีวัฒนกุล
เหรัญญิก	ผศ.พ.อ.หญิงนิสามณี สัตยาบัน
ปฏิคม	รศ.ดร.พรทิพย์ ศุภวิไล
บรรณาธิการวารสาร	รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์
นายทะเบียน	รศ.สุพีชา วิทยเลิศปัญญา
กรรมการกลาง	รศ.ดร.ชัยชาญ แสงดี
	ผศ.ประภาวดี พัวไพโรจน์
	ผศ.ดร.นพ.ประวิทย์ อัครเสรีนนท์
	ผศ.ทญ.วรางคณา ชิดช่วงชัย
	ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม
	ผศ.พ.ท.ดร.มทิรุทธ มุ่งถิ่น

BREAKTHROUGH THERAPY FOR BOTH OA AND RA

INTRODUCING

CELEBREX
(CELECOXIB)

COX-2 SPECIFIC INHIBITOR

CELEBREX is contraindicated in patients with known hypersensitivity to any ingredient of the product or who have had allergictype reactions to sulfonamides, aspirin, or other NSAIDs.

Among the 5285 patients on CELEBREX at ≥ 200 mg/d, only 2 (0.04%) experienced significant upper GI bleeding.[1]

Most common side effects included dyspepsia, diarrhea, and abdominal pain, and were generally mild to moderate.

*GI safety profile defined as endoscopic ulcers, GI bleeding, perforation, and gastric outlet obstruction.
†Diclofenac SR (up to 150 mg/d), ibuprofen (2400 mg/d), and naproxen (1000 mg/d).

Reference:
1. U.S.labelling for CELEBREX™ (celecoxib capsules) as of December 31, 1998.

SO IN ACTION...

- At full therapeutic doses, CELEBREX inhibits only COX-2

SO SAFE...

- GI safety profile to widely prescribed NSAIDs at full therapeutic doses*†
- Fewer gastroduodenal ulcers seen in placebo-controlled endoscopy studies vs the most widely prescribed NSAIDs†
- No effect on platelet aggregation and bleeding time

SO EFFECTIVE...

- Powerful relief of the pain and inflammation of osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA)—as effective as diclofenac (50-75 mg bid), ibuprofen (800 mg tid), and naproxen (500 mg bid)

SO CONVENIENT IN DOSING...

- OA - 100 mg b.i.d. or to 200 mg once daily
- RA - 200 mg b.i.d

CELEBREX™
(CELECOXIB)
FOR STRENGTH, FOR LIVING

SEARLE Pfizer

ใบอนุญาตโฆษณาเลขที่ ฆศ. 219/2542