ผลของการได้รับยาแก้ปวดพาราเซทตามอลอย่างเรื้อรัง ต่อระบบประสาทเซโรโทนิน

นางเนาวรัตน์ ธาราทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-672-7

EFFECTS OF CHRONIC PARACETAMOL ADMINISTRATION ON SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION

MRS. NAOVARAT TARASUB

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology

Inter-department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-638-672-7

Thesis Title	EFFECTS OF CHRONIC PARACETAMOL ADMINISTRATION ON SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION
By	Mrs. Naovarat Tarasub
Inter-department	Physiology
Thesis Advisor	Associate Prof. Dr. Anan Srikiatkhachorn, M.D.
Thesis Co-advisor	Associate Prof. Dr. Piyarat Klangkalya, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Doctor of Philosophy's Degree.

.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Dr. Ratree Sudsuang, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Dr. Anan Srikiatkhachorn, M.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Dr. Piyarat Klangkalya, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Dr. Boonyong Tantisira, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Dr. Yupin Sangvarinta, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เนาวรัตน์ ธาราทรัพย์ : ผลของการได้รับยาแก้ปวดพาราเซทตามอลอย่างเรื้อรังต่อระบบประสาทเซโรโทนิน (EFFECTS OF CHRONIC PARACETAMOL ADMINISTRATION ON SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. อนันต์ ศรีเกียรติขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ปิยะรัตน์ กลางกัลยา ; 261 หน้า. ISBN 974-638-672-7

พาราเซทตามอล เป็นยาแก้ปวดที่นิยมใช้มากที่สุด กลไกการออกฤทธิ์แก้ปวดยังไม่ทราบแน่ชัด เพียงคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับระบบประสาทเซโรโทนิน ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซทตามอลแบบเฉียบพลันและ เรื้อรัง ผลการทดลอง พบว่า ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาชนิดนี้ทางช่องท้อง 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน และ แบบเฉียบพลัน มีความทนต่อความเจ็บปวดเพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูที่ได้รับยาแบบเดียวกัน เป็นเวลา 30 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ เมื่อใช้เกร็ดเลือดเป็นตัวแทนในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทเซโรโทนิน พบว่า ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา 300 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน มีระดับเซโรโทนิน ในเกร็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (7024.67±905.97, 7342.83±1041.35 และ 3911.32±438.07 ng/10^8 platelets, $p<0.01$) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับยานาน 30 วัน ในขนาดเดียวกัน มีระดับเมตาบอไลท์ของเซโรโทนิน (5-HIAA) เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (13788.65±2373.95, 13816.77±2517.06 และ 7116.84±1199.23 ng/10^8 platelets, $p<0.01$) การศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงค่าความหนาแน่นสูงสุด (B_{max}) และค่าคงที่สมดุลของการแยก (K_d)ของตัวรับ ชนิด 5-HT_{2A} receptor และ ตัวเก็บกลับเซโรโทนิน (5-HT uptake sites) ในสมองส่วน frontal cortex และ brainstem โดยวิธีการจับติดของสารรังสี (radioli-gand binding technique) พบว่า ค่า B_{max} ของ 5-HT_{2A} receptor ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วน frontal cortex ของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา 300 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แต่ค่า K_d ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และ ในสมองส่วน brainstem ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ ผลการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับยานาน 30 วัน มีการปรับตัวเพิ่มค่า B_{max} ของ 5-HT_{2A} receptor สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาเป็นเวลา 15 วัน ในขนาด 400 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (0.94±0.01 และ 1.34±0.13 pmol/mg protein ตามลำดับ)

การเปลี่ยนแปลงค่า B_{max} ของตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ได้ผลตรงกันข้ามกับที่พบในตัวรับ 5-HT_{2A} receptor ผลการทดลอง พบว่าที่สมองส่วน frontal cortex ในหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา 300 และ 400 มิลลิกรัม / กิโลกรัม มีค่า B_{max} ของ ตัวเก็บกลับเซโรโทนิน เพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่า K_d ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และ ในสมองส่วน brainstem ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ ผลการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับยานาน 30 วัน มี ค่า B_{max} ของ ตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา เป็นเวลา 15 วัน ในขนาด 400 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (4.59±0.52 และ 2.71±0.18 pmol/mg protein ตามลำดับ) จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า มีการปรับตัวลดค่า B_{max} ของตัวรับ ชนิด 5-HT_{2A} receptor ที่ postsynaptic membrane และ เพิ่ม ค่า B_{max} ของตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ที่ สมองส่วน frontal cortex ในกลุ่มที่ได้รับยาทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน และแบบเฉียบพลัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเพิ่มสูงขึ้นของระดับเซโรโทนิน และความทนต่อความเจ็บปวด การเปลี่ยนแปลงของตัวรับ 5-HT_{2A} receptor และ ตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับยาเป็นเวลา 15 วัน จะกลับคืนสู่สภาวะปกติได้ เมื่อได้รับยาเป็นระยะเวลานานขึ้นใน 30 วัน ผลการทดลองนี้ทำให้คาดว่า กลไกการออกฤทธิ์แก้ปวดของยาชนิดนี้ อาจมาจาก การปลดปล่อยเซโรโทนินที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ ระดับเซโรโทนิน ที่ synaptic cleft เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นตัวชักนำให้เกิดการลดลงของตัวรับ 5-HT_{2A} receptor และ การเพิ่มขึ้นของตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ในทางตรงกันข้าม การได้รับยาเป็นระยะเวลานานมากขึ้น อาจทำให้เซโรโทนิน ที่ถูกปล่อยออกมาหมดไป ระดับเซโรโทนินจึงลดต่ำลง และมีผลให้เกิดการปรับตัวที่ตัวรับ 5-HT_{2A} receptor และ ตัวเก็บกลับเซโรโทนิน ผลการทดลองนี้ เป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่า กลไกการออกฤทธิ์แก้ปวดของพาราเซทตามอล สามารถผ่านทางระบบประสาทส่วนกลางเซโรโทนิน

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต เนาวรัตน์ ธาราทรัพย์

สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C645723 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD: CHRONIC PARACETAMOL / SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION
NAOVARAT TARASUB : EFFECTS OF CHRONIC PARACETAMOL ADMINISTRATION ON SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. DR. ANAN SRIKIATKHACHORN, M.D. THESIS COADVISION : ASSO. PROF. DR. PIYARAT KLANGKALYA, Ph.D. 261 pp. ISBN 974-638-672-7

Paracetamol is the most widely used analgesic drug . Although the mechanism of analgesic action of paracetamol is still not known, the involvement of central serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) system is one possibilitty. The antinociceptive effect of acute and chronic intraperitoneally (i.p.) administered paracetamol was assessed by tail flick latency measurements in the rat. A significantly increased tail flick latency was observed in acute and 15-day paracetamol-treated rats, but not in 30-day paracetamol-treated rats, at a dose of 400 mg/kg. By using platelets as a neuronal model, our results revealed a significant increase in platelet 5-HT content in 15-day paracetamol treated groups at a dose of 300 and 400 mg/kg compared to control groups (7024.67 ± 905.97, 7342.83 ± 1041.35 and 3911.32 ± 438.07 ng/10^8 platelets, respectively, $p < 0.01$). A significant increase was also observed in platelet 5-HIAA content in 30-day paracetamol-treated groups at a dose of 300 and 400 mg/kg compared to control groups (13788.65 ± 2373.95, 13866.77 ± 2517.06 and 7116.84 ± 1199.23 ng/10^8 platelets, respectively, $p < 0.01$). To investigate the plasticity of receptors at pre- and post synaptic membrane, we conducted a series of experiments by radioligand binding method on frontal cortex and brainstem membrane. The technique involved radioligand binding with [phenyl-4-^{3}H]-spiperone and ketanserin for studying 5-HT_{2A} serotonin receptor characteristics and [^{3}H]-imipramine and fluoxetine for studying 5-HT uptake sites characteristics. A significant decrease in the maximum number of 5-HT_{2A} binding sites (Bmax) was demonstrated in all treatment groups with paracetamol 300 and 400 mg/kg on frontal cortex membrane, whereas the value of dissociation equilibrium constant (Kd) remained unchanged. An increase in the maximum number of 5-HT_{2A} binding sites was observed in 30-day paracetamol-treated rats, compared with 15-day paracetamol-treated rats at a dose of 400 mg/kg (0.94 ± 0.01 and 1.34 ± 0.13 pmol/mg protein, respectively).

In contrast to 5-HT_{2A} receptors, a significant increase in the maximum number of 5-HT uptake sites was demonstrated in all treatment groups with paracetamol 300 and 400 mg/kg on frontal cortex membrane, whereas the value of dissociation equilibrium constant remained unchange. A decrease in the maximum number of 5-HT uptake sites was observed in 30-day paracetamol-treated rats as compared with 15-day paracetamol-treated rats at a dose of 400 mg/kg (4.59 ± 0.52 and 2.71 ± 0.18 pmol/mg protein, respectively). Such changes of 5-HT_{2A} receptors and 5-HT uptake sites was not observed on brainstem membranes. The post synaptic receptors became down-regulated whereas the uptake sites were up-regulated in frontal cortex membranes of acute and 15-day paracetamol treatments. These occured concomitantly with an increase in platelet 5-HT level and antinociceptive activity. These abnormalities of receptors were normalizable after 30-day paracetamol treatments. From these results we suggest that down-regulation of 5-HT_{2A} receptor in response to 5-HT release is a major step in mechanism underlying analgesia produced by this agent. Such increased 5-HT level at the synaptic cleft may induce up-regulation of 5-HT uptake sites. On the contrary, chronic use of paracetamol may result in 5-HT depletion which in turn produces re-adaptation of post-synaptic 5-HT_{2A} receptor and pre-synaptic 5-HT uptake sites. These data provide further evidence for a central 5-HT dependent antinociceptive effect of paracetamol.

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต เนาวรัตน์ ตาราทรัพย์

สาขาวิชา สหสาขาสรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgements

I own a very special debt of gratitude to my advisor, Dr. Anan Srikiatkhachorn, for his kindness, supervision, guidance, thoughtful advice and encouragement which have enabled me to carry on this thesis to a successful study.

I also wish to express my special thanks to my co-advisor, Dr. Piyarat Klangkalya for her thoughtfulness, valuable advice and comments throughout this study.

I am grateful to Dr. Naipinich Kotchabhakdi for his kindness in giving me the opportunity to persue my studies at the laboratory in his Neuro-Behavioural Biology Center.

I wish to give a special vote of thanks Dr. Ratree Sudsuang, Dr. Boonyong Tantisira and Dr. Yupin Sangvarinta for their comments and suggestion on my work.

I am indebted to all staff members of the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their valuable helps. I wish to thank my partner, Miss Unchalee Ruangpattanatawee for her help some parts of my study.

It is my pleasure to thank the staff of Neuro-Behavioural Biology Center, Mahidol University at Salaya for their supporting the equipments and chemicals in this study. My special thanks are also extended to my friends, Miss Tunda Suthitum for her suggestion, helpful and supporting throughout my study.

My deep gratitude and appreciation are extended to my close family, my husband and my son for encouragement and sincere solititude during my study.

Finally, I am greatly indebted to my parents and former teachers who have giving me the knowledge and wisdom. I would like to have special thanks the Asahi Glass Foundation for sponsoring this study.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
ATPase	adenosine triphosphatase
ASA	acetylsalicylic acid
B_{max}	maximum number of binding sites
°C	degree celsius
Ca^{2+}	calcium ion
$CaCl_2$	calcium chloride
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cl^-	chloride ion
CNS	central nervous system
5-CT	5-carboxamidotryptamine
DA	dopamine
DAG	diacylglycerols
DHBA	dihydroxybenzoic acid
DLF	dorsal lateral funiculus
DNA	deoxyribonucleic acid
DOB	4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine
DOI	1(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane
DR	dorsal raphe nucleus
ECD	electrochemical detector
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
e.g.	exampli. gratia
g	gravity unit
G-protein	guanine nucleotide protein
GABA	gamma aminobutyric acid
GI	gastrointestinal
h	hour
[^{3}H]	tritium
5-HIAA	5-hydroxyindolacetic acid
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HTP	5-hydroxytryptophan
HPLC	high performance liquid chromatography
IBS	imipramine binding sites
i.c.v.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitoneal
IP_3	inositol triphosphate
K^+	potassium ion
K_d	dissociation equilibrium constants
K_i	inhibitor constants
KCl	potassium chloride
µl	microliter

LSD	lysergic acid diethylamide
μM	micromole
MAO	monoamine oxidase
Met	methionine
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
MR	median raphe nucleus
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	normal concentration
nM	nanomolar
NaCl	sodium chloride
NA	noradrenaline
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NRM	nucleus raphe magnus
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
NSE	neuron specific enolase
8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline
PAG	periaqueductal gray matter
Para	paracetamol
PCPA	para-chlorophenylalanine
PGE_2	prostaglandins type E_2
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandins type $F_{2\alpha}$
PGs	prostaglandins
PLA_2	phospholipase A_2
pmol	picomole
PRP	platelet rich plasma
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RVM	rostral ventromedial medulla
sec	second
SPA	stimulation produced analgesia
$T_{1/2}$	half life time
Tr-OH	tryptophan hydroxylase
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride
Trp	tryptophan