

ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อตัวขนส่งยาและเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 3เอ ในลำไส้เล็กหนูเมาส์



นางสาววรัมพร สุขคำมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE ON INTESTINAL DRUG TRANSPORTERS AND CYP
3A IN A MOUSE MODEL

Miss Varumporn Sukkumee



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อตัวขนส่งยาและเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 3เอ ในลำไส้เล็กหนูเมาส์
โดย	นางสาววรัมพร สุขคำมี
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์
	อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อัจฉา ศีฬหวนิชกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. รท.หญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัฒนาถพงษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อัจฉา ศีฬหวนิชกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พ.ต.ท.หญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรรา วัฒนพิทยกุล)

วรัณพร สุขคำมี : ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อตัวขนส่งยาและเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 3เอ ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ (EFFECTS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE ON INTESTINAL DRUG TRANSPORTERS AND CYP3A IN A MOUSE MODEL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สุพิชา วิทยเลิศปัญญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์, อ. นพ. ดร. อัจฉภาศ ลิฬหวนิชกุล, 75 หน้า.

โรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยมักประสบปัญหาด้านการใช้ยา และการเกิดปฏิกิริยาระหว่างยา ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งยา และเปลี่ยนแปลงยาที่เปลี่ยนแปลงในลำไส้เล็ก การศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3*, *cyp3a11* และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กของหนูเมาส์ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion ในหนูเมาส์ โดยการแบ่งหนูเมาส์ออกเป็นกลุ่ม 2 และ 4 สัปดาห์ เก็บซีรัมเพื่อตรวจวัดระดับ serum creatinine, serum urea ศึกษาแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3*, *cyp3a11* ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้พบว่าระดับ serum creatinine ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำเกิดไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ (0.78 ± 0.02 mg/dL ต่อ 0.31 ± 0.08 mg/dL ที่ 2 สัปดาห์ $p < 0.01$, 0.47 ± 0.03 mg/dL ต่อ 0.29 ± 0.03 mg/dL ที่ 4 สัปดาห์ $p < 0.01$ ตามลำดับ) ระดับ serum urea ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำเกิดไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ (31.92 ± 1.05 mg/dL ต่อ 16.70 ± 1.02 mg/dL ที่ 2 สัปดาห์ $p < 0.01$, 45.57 ± 3.12 mg/dL ต่อ 25.77 ± 1.02 mg/dL ที่ 4 สัปดาห์ $p < 0.01$ ตามลำดับ) และพบว่าหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีแสดงออกของยีน *mdr1a* ลดลง 48.80 % และ 73.15 % ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ในขณะที่หนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังทั้ง 2 และ 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน *mrp2* และ *oatp3* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ และยังพบว่าในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดไตวายเรื้อรัง 4 สัปดาห์ มียีน *cyp3a11* ลดลง 66.68 % เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ เมื่อใช้ testosterone เป็นสับสเตรท พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และกลุ่ม 4 สัปดาห์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ เมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรทพบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์ลดลง 19.40% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าโรคไตวายเรื้อรังมีผลลดการแสดงออกของตัวขนส่งยาคือ *mdr1a* การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ลำไส้เล็ก ซึ่งอาจมีผลทำให้ค่า bioavailability ของยาเพิ่มขึ้น

สาขาวิชา เกษษัตริยา

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5587168020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: CHRONIC KIDNEY DISEASE (CKD), P-GLYCOPROTEIN (P-GP), MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN (MRP), ORGANIC ANION-TRANSPORTING POLYPEPTIDE (OATP), CYTOCHROME P450 3A (CYP3A), INTESTINE, METABOLISM

VARUMPORN SUKKUMMEE: EFFECTS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE ON INTESTINAL DRUG TRANSPORTERS AND CYP3A IN A MOUSE MODEL. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPEECHA WITTAYALERTPANYA, CO-ADVISOR: PH.D. PIYANUCH WONGANAN, M.D. PH.D. ASADA LEELAHAVANICHKUL, 75 pp.

Chronic kidney disease (CKD) is an important problem of public health in Thailand. Patients with CKD have been reported to be at risk of adverse drug reactions and drug-drug interaction since CKD may be associated with alteration of drug transporters and drug metabolism in the intestines. The aim of this study was to investigate the effect of CKD on drug transporters and drug metabolism in the intestine. Two groups of mice were studied: CKD and control. CKD 2 weeks group and CKD 4 weeks group was induced by a chronic ischemic reperfusion (I/R) in a mouse model. Serum samples were collected to measure serum creatinine and serum urea. *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3*, *cyp3a11* mRNA levels were measured using the quantitative real time RT-PCR and CYP3A activity using HPLC. Serum creatinine levels were significantly higher in the 2 and 4 weeks CKD groups compared with control groups (0.78 ± 0.02 compared to 0.31 ± 0.08 mg/dL, respectively, $p < 0.01$; 0.47 ± 0.03 compared to 0.29 ± 0.03 mg/dL, respectively, $p < 0.01$). Serum urea levels were significantly higher in the 2 and 4 weeks CKD groups compared with control groups (31.92 ± 1.05 compared to 16.70 ± 1.02 mg/dL, respectively, $p < 0.01$; 45.57 ± 3.12 compared to 25.77 ± 1.025 mg/dL, respectively, $p < 0.01$). When compared the effect of 2 and 4 weeks CKD on intestinal transporters to control group, *mdr1a* mRNA levels was reduced by 48.80 % and 73%, respectively ($p < 0.05$) in mice with CKD. However, *mrp2* and *oatp3* mRNA level remained unchanged. Additionally, *cyp3a11* gene expression of 4 weeks CKD groups were reduced by 66.68 % compared with controls ($p < 0.05$). Using testosterone as a CYP3A substrate, intestinal CYP3A activity of 2 and 4 weeks CKD groups were remained unchanged compared with controls. Using midazolam as a CYP3A substrate, intestinal CYP3A activity of 2 and 4 weeks CKD groups were reduced by 19.40% compared with controls ($p < 0.05$). In conclusion, CKD was able to down-regulated *mdr1a* and *cyp3a11* mRNA and decreased CYP3A activity in CKD-mouse intestinal model. This reduction could explain the increased bioavailability of drugs in CKD.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูง จาก รศ.สุพิชา วิทโยเลิศปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, อาจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์ และ อาจารย์ นายแพทย์ ดร.อัษฎาศักดิ์ สิวหนิชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม โดยให้คำปรึกษา แนะนำวิธีการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นปัญหาทางการศึกษาหรือ ปัญหาด้านการทำงานวิจัย ตลอดจนให้กำลังใจผู้เขียนด้วยความเมตตา ขอกราบพระคุณเป็นอย่าง สูง

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่เมตตาให้คำปรึกษางานวิจัย ข้อคิดเห็น และได้ชี้แนะแนวคิดอันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรเภสัชวิทยา สหสาขา ทุกท่านที่ได้ ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนจรรยาบรรณให้แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณทุนวิจัย " Asahi Glass Foundation " ซึ่งเป็นแหล่งเงินทุนอุดหนุนสำหรับ งานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ Chula Pharmacokinetics Research Center และ บุคลากรในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอย ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดจนแนวทางการแก้ปัญหาในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา ทุกคนที่คอยให้ ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีให้ผู้เขียนเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยช่วยเหลือ ให้ กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ผู้เขียนศึกษาทำงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	4
บทที่ 1 บทนำ.....	6
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)	6
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	7
1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	8
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
1.5 แบบแผนงานวิจัย (Experimental Design)	9
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.1 Drug transporters	15
2.2 เอนไซม์ cytochrome P450	19
2.3 เอนไซม์ cytochrome P4503A.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	31
3.2 การเหนี่ยวนำให้หนูเมาส์เกิดโรคไตวายเรื้อรัง.....	31
3.3 การเก็บตัวอย่างเลือด.....	32
3.4 การเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กหนู.....	32

3.5 รูปแบบการวิจัย (Research design).....	33
3.6 วิธีวิจัย.....	33
3.6.1 การทดสอบภาวะไตวายเรื้อรังด้วยระดับ serum creatinine.....	33
3.6.2 การทดสอบภาวะไตวายเรื้อรังด้วยระดับ serum urea.....	33
3.6.3 การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน mdr1a, mrp2, oatp2 และ cyp3a11 ในลำไส้เล็กหนูเมาส์.....	34
3.6.4 การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์.....	35
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ.....	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	42
4.1 ผลค่าระดับ serum creatinine, serum urea และ น้ำหนักตัวหนูเมาส์ในกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูกลุ่มปกติ.....	42
4.2 ผลการแสดงออกของยีน mdr1a, mrp2, oatp3, cyp3a11 ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง.....	43
4.3 ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยใช้ testosterone เป็นสับสเตรท.....	46
4.4 ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท.....	47
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	48
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	52
รายการอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก ก.....	61
ภาคผนวก ข.....	74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	75

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	คำจำกัดความและการแบ่งระยะของโรคไตวายเรื้อรัง	12
ตารางที่ 2	แสดงค่า correlation coefficients ของ mdr1 gene ในคน, หนูเมาส์ และหนูแรท ...	17
ตารางที่ 3	แสดงการเปรียบเทียบไอโซฟอร์มที่สำคัญของเอนไซม์ CYP ในการเปลี่ยนแปลงยาที่เข้าสู่.....	26
ตารางที่ 4	แสดง gene expression assays	34
ตารางที่ 5	แสดงผลโรคไตวายเรื้อรังต่อน้ำหนักตัวหนู ค่า serum creatinine และค่า serum urea.....	43
ตารางที่ 6	แสดงค่า serum creatinine หนูเมาส์กลุ่ม 2 สัปดาห์.....	61
ตารางที่ 7	แสดงค่า serum creatinine หนูเมาส์กลุ่ม 4 สัปดาห์.....	61
ตารางที่ 8	แสดงค่า serum urea หนูเมาส์กลุ่ม 2 สัปดาห์.....	61
ตารางที่ 9	แสดงค่า serum urea หนูเมาส์กลุ่ม 4 สัปดาห์.....	61
ตารางที่ 10	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6 β -OH-TST	67
ตารางที่ 11	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ	73

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ P-glycoprotein transporter.....	16
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของ ATP-binding cassette (ABC) transporters.....	17
ภาพที่ 3 แสดงกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ของ ABC transporters	18
ภาพที่ 4 แสดง transporters ที่พบในลำไส้.....	19
ภาพที่ 5 เอนไซม์ cytochrome P4503A ในลำไส้และตับ	20
ภาพที่ 6 เอนไซม์ cytochrome P450.....	21
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของไต วงกลมสีดำแสดงตำแหน่ง micro-clamp ที่ปิดหลอดเลือด.....	32
ภาพที่ 8 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน mdr1a ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR.....	44
ภาพที่ 9 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน mrp2 ด้วยเทคนิค real time RT-PCR.....	44
ภาพที่ 10 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน oatp3 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR.....	45
ภาพที่ 11 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน cyp3a11 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR.....	46
ภาพที่ 12 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นสับสเตรทด้วยเทคนิค HPLC	46
ภาพที่ 13 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam สับสเตรท ด้วยเทคนิค HPLC	47
ภาพที่ 14 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐาน บริสุทธิ์ 6 β -OH-TST และ internal standard.....	65
ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของ 6 β -OH-TST.....	66
ภาพที่ 16 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐาน บริสุทธิ์ 1'-OH-MDZ และ internal standard.....	71

ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ.....	72
---	----



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ng/ml	Nanogram per milliliter
mg/dl	Milligram per deciliter
M	Micromolar
µg/ml	Microgram per milliliter
g	Gram
kg	Kilogram
L	Liter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>K_m</i>	Michaelis constant
V _{max}	Maximal velocity of reaction
R ²	Coefficient of determination
Fe ²⁺	Ferrous
Fe ³⁺	Ferric
O ₂	Oxygen
CO	Carbon monoxide
BSA	Bovine serum albumin
PBS	Phosphate buffer saline PBS
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
MgCl ₂	Magnesium chloride
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate
K ₂ HPO ₄	Di-potassium hydrogen phosphate
HPLC	High performance liquid chromatography
RSD	Relative standard deviation
DEV	Deviation

CKD	Chronic kidney disease
CYP	Cytochrome P450
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
OD	Optical density
6 β -OH-TST	6 β -hydroxytestosterone
11 α -OH-PGT	11alpha-hydroxyprogesterone
LLOQ	Lower limit of quantification
1'-OH-MDZ	1'-hydroxymidazolam
DZP	Dizepam
MDZ	Midazolam
K/DOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
GFR	Glomerular filtration rate
ESRD	End stage kidney disease
ตร.ม.	ตารางเมตร
มล.	มิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

โรคไตวายเรื้อรัง (chronic kidney disease, CKD) เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขของประเทศ ไทย ซึ่งมีอุบัติการณ์ของโรคไตวายเรื้อรังและโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก (Ingsathit et al. 2010) โรคไตวายเรื้อรังเป็นภาวะที่ไตถูกทำลายเป็นเวลานานจนไม่สามารถกลับฟื้นคืนสภาพได้ โดยหน่วยไตที่เหลือไม่สามารถทำงานชดเชยส่วนที่เสียไปได้ ทำให้มีการเสื่อมของ โครงสร้างและหน้าที่ของไตซึ่งได้แก่ การกรอง การดูดกลับ และการสร้างฮอร์โมนลดลง จนกระทั่ง กลายเป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (กันตชูเวสศิริ. 2555)

นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีโอกาสดำเนินโรคอื่นร่วมได้หลายประการ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น ดังนั้นผู้ป่วยจึงมีโอกาสดำเนินโรคหลายชนิดเพื่อรักษาโรค ของไต โรคที่พบร่วมด้วย และภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เมื่อไตเสียหายที่ในการขจัดของเสียออกจาก ร่างกาย ทำให้เกิดการคั่งของยูเรีย เสียการควบคุมสมดุลน้ำ กรดต่างในร่างกาย และการสร้างฮอร์โมน ที่จำเป็นต่อร่างกาย ทำให้มีผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งสภาวะไตวาย เรื้อรังจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการขนส่งยา (drug transporters) และเปลี่ยนแปลงยา (drug metabolism) ที่ต่างไปจาก ผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติ

กระบวนการขนส่งยาโดยเฉพาะในลำไส้เล็กซึ่งส่วนใหญ่อาศัย transporters ที่มีอยู่ด้วยกัน หลายชนิด ทั้งชนิดที่เป็นตัวขนส่งยาออกจากเซลล์ (efflux transporters) เช่น P-glycoprotein (P-gp) และ multidrug resistance associated proteins (Mrps) และชนิดที่เป็นตัวขนส่งยาเข้าเซลล์ (uptake transporters) เช่น transporter ที่เป็นสมาชิกใน solute-linked carrier (SLC/SLCO) superfamily ตัวอย่างเช่น organic anion-transporting polypeptides (Oatps gene) ซึ่งเป็น transporters ที่มีบทบาทสำคัญในลำไส้เล็ก โดยในลำไส้เล็กสามารถพบได้ทั้ง efflux transporters และ uptake transporters ในการขนส่ง endogenous substrate และ exogenous substrate จากรายงานก่อนหน้านี้นี้แสดงให้เห็นว่าโรคไตวายเรื้อรังนั้นมีผลต่อการทำงานของตัวขนส่งยาดับและ ลำไส้หนูแรท (Leblond et al. 2001, Veau et al. 2001) โดยได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Huang

และคณะ (Huang et al. 2000) พบว่า Caco-2 cells ที่บ่มด้วยซีรัมของหนูแรท ที่เกิดโรคไตวายเฉียบพลันมีการขนส่ง Rho-123 ซึ่งเป็นสับสเตรทของ P-gp ลดลง

นอกจากกระบวนการขนส่งยาแล้ว ขบวนการดูดซึมและขบวนการเปลี่ยนแปลงยา โดยเฉพาะในขบวนการดูดซึมยาบริเวณของทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นบริเวณที่ยาถูกดูดซึมมากที่สุดคือ ส่วนของลำไส้เล็ก มีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงยา โดยเฉพาะเอนไซม์ cytochrome P4503A (CYP3A) ซึ่งเป็นแฟมิลีย่อยของเอนไซม์ CYP450 โดย CYP3A เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในขบวนการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากยาประมาณร้อยละ 50 ของยาที่มีใช้ทางคลินิกมักถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ชนิดนี้ (Brunton L. et al. 2010, Martignoni et al. 2006) จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าขบวนการเปลี่ยนแปลงยาในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง อาจลดลง เพิ่มขึ้น หรือคงเดิมได้ขึ้นอยู่กับชนิดของยาที่ได้รับ สภาพของโรคไตวายเรื้อรัง และเอนไซม์ในร่างกายผู้ป่วย (ตั้งสง่า. 2554) นอกจากนี้แล้วตัวขนส่งยาเช่น P-gp, Oatps และเอนไซม์ CYP3A ยังมีความเชื่อมโยงกัน เนื่องจากการที่ยาหลายชนิดที่เป็นสารตั้งต้น และสารยับยั้ง P-gp, Oatps และเอนไซม์ CYP3A มักเป็นยาในกลุ่มเดียวกัน (จุฬาวัดทนทล. 2546) ดังนั้น ในการใช้ยาเหล่านี้ร่วมกันในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังซึ่งมีโอกาสได้รับยาหลายชนิดเพื่อรักษาโรคของไต จึงอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างยาได้

ดังนั้นควรทำความเข้าใจเกี่ยวกับตัวขนส่งยาและเอนไซม์ CYP3A ในภาวะที่ไตทำงานบกพร่อง เพื่อป้องกันเกิดปฏิกิริยาระหว่างยา เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ จากยา และเพื่อให้ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังได้รับผลการรักษาตามที่คาดหวัง งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของตัวขนส่งยาได้แก่ mdr1a, mrp2, oatp3 และ cyp3a11 ยีน และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรัง โดยใช้การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion ในหนูเมาส์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยวิธีนี้ในหนูเมาส์มาก่อนหน้านี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

- เพื่อศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน mdr1a, mrp2, oatp3, cyp3a11 ในลำไส้เล็กหนูเมาส์
- เพื่อศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์

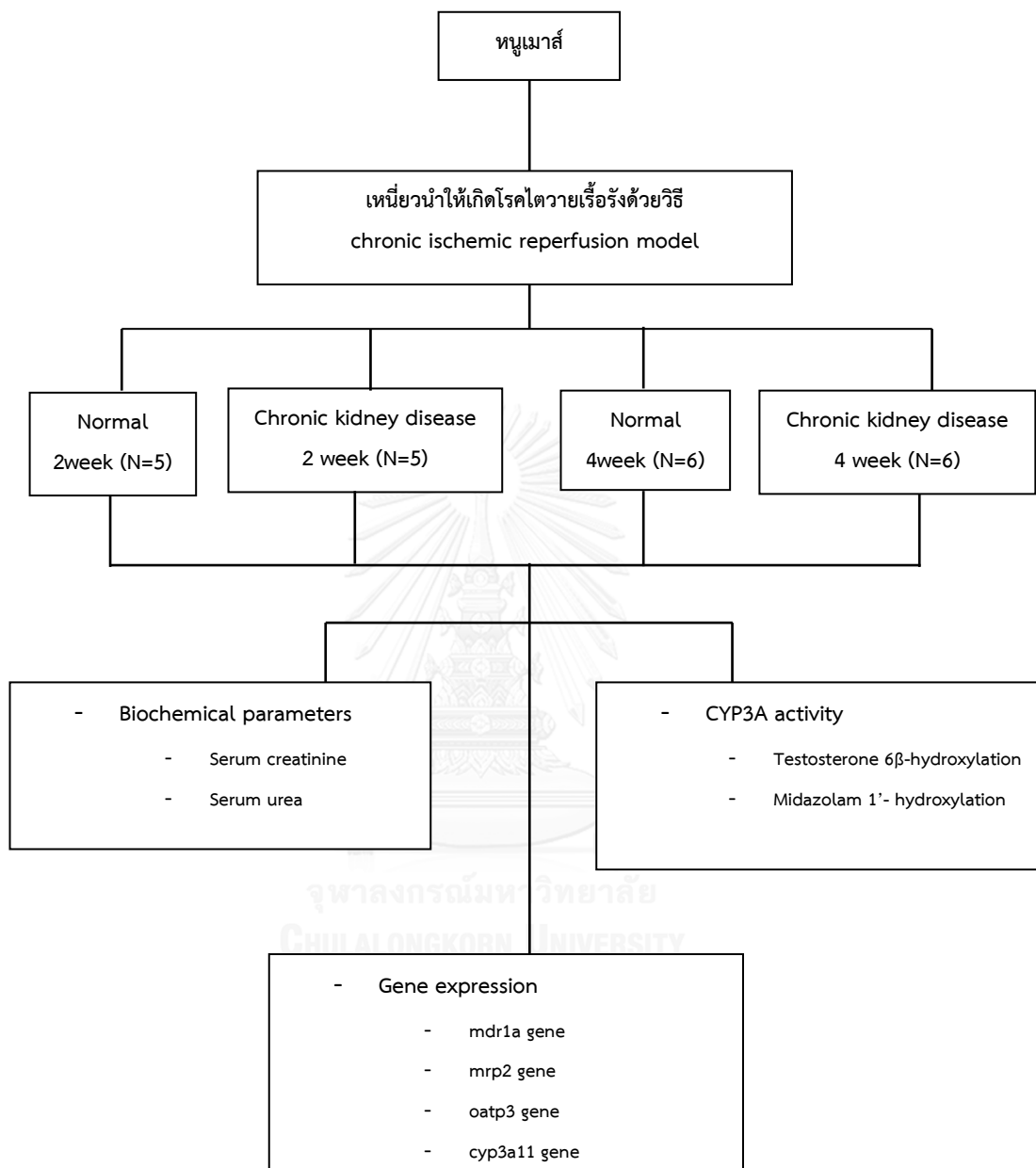
1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

- การแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3*, *cyp3a11* ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ที่มีภาวะไตวายเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเทียบกับหนูเมาส์ที่มีการทำงานของไตปกติ
- การทำงานของ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ที่มีภาวะไตวายเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเทียบกับหนูเมาส์ที่มีการทำงานของไตปกติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3*, *cyp3a11* และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูเมาส์ที่มีการทำงานของไตปกติ เพื่อทำนายความเป็นไปได้เบื้องต้นของการดูดซึม การเมแทบอลิซึมของยาที่เข้าสู่ร่างกายในภาวะไตวายเรื้อรัง และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาเกี่ยวกับการปรับขนาดยาให้เหมาะสมแก่ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังต่อไป

1.5 แบบแผนงานวิจัย (Experimental Design)



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไตวายเรื้อรังหมายถึงภาวะที่ไตถูกทำลายเป็นเวลา 3 เดือนหรือมากกว่า 3 เดือนมีความผิดปกติทางพยาธิสภาพหรือมีตัวบ่งชี้ว่าไตถูกทำลายจากความผิดปกติของเลือด ปัสสาวะ หรือการตรวจทางรังสีหรืออัตราการกรองของไตลดลงน้อยกว่า 60 มิลลิลิตร/ นาที/ พื้นผิวร่างกาย 1.73 ตารางเมตรเป็นเวลา 3 เดือนหรือมากกว่า 3 เดือน (National Kidney Foundation. 2002)

สาเหตุของโรคไตวายเรื้อรัง

- 1.) ความดันโลหิตสูง
- 2.) โรคเบาหวาน
- 3.) โรคไตอักเสบ (chronic glomerulonephritis)
- 4.) โรคถุงน้ำที่ไต (polycystic kidney disease)
- 5.) โรคไตอื่นๆที่ผู้ป่วยเคยมีมาก่อนหรือกำลังมีอยู่เช่น autoimmune disease
- 6.) โรคนี้่วไตและนี้่วระบบทางเดินปัสสาวะส่วนบนปัญหานี้้อาจทำให้เกิดการอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะ (obstructive nephropathy) นำไปสู่การทำลายเนื้อไตและ/หรือการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
- 7.) โรค renal tubular acidosis (RTA) ทำให้เกิดนี้่วในทางเดินปัสสาวะหรือภาวะ nephrocalcinosis
- 8.) พิษจากโลหะหนักบางชนิดจากสภาพแวดล้อมที่ได้รับเช่น ธาตุแคดเมียม เมื่อได้รับต่อเนื่องเป็นเวลานานจะทำให้เกิดภาวะโรคไตวายเรื้อรังได้
- 9.) ยาสมุนไพรยาสมุนไพรจีนบางชนิดอาจมีการปนเปื้อนของสารที่มีพิษต่อไตหากรับประทานต่อเนื่องอาจทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังได้

การวินิจฉัยโรคไตวายเรื้อรังการวินิจฉัยโรคไตเรื้อรังประกอบด้วยดังนี้

- 1.) การประเมินอัตราการกรองของไตโดยใช้สูตร Cockcroft-gault หรือสูตร Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)

$$\text{- Cockcroft-Gault; Creatinine Clearance} = \frac{(140-\text{อายุ}) \times \text{น้ำหนัก (ก.ก)}}{7 \times \text{serum creatinine}}$$

(คูณด้วย 0.85 ในกรณีที่เป็นผู้หญิง)

- MDRD; GFR (ml/min/1.73 m²) = 170 x (serum creatinine)^{-0.999} x (อายุ)^{-0.176} x (ผู้หญิง)^{0.762} x (1.129 ถ้าเป็นชาย) x (BUN)^{-0.17} x (serum albumin)^{+0.318}

2.) การประเมินปริมาณโปรตีนในปัสสาวะโดยใช้แถบตรวจปัสสาวะ (dipstick test) เมื่อแถบตรวจวัดผลได้ 1 บวกขึ้นไปควรตรวจปัสสาวะยืนยันปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าสัดส่วนของโปรตีนต่อครีเอตินิน

3.) การตรวจอื่น ๆ ด้วยการตรวจตะกอนปัสสาวะ (urine sediment) หรือใช้แถบตรวจวัดหาเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวการตรวจทางรังสีการตรวจอัลตราซาวด์เพื่อดูว่ามี การอุดตันมี นิ่วและมี polycystic kidney disease

ระยะของโรคไตวายเรื้อรัง

Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K/DOQI) ได้แบ่งระยะของโรคไตวายเรื้อรังออกเป็น 5 ระยะเพื่อความสะดวกในการพิจารณาความเหมาะสมในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังตามระดับความรุนแรงของการดำเนินโรคดังตารางที่ 1 (National Kidney Foundation. 2002)

ระยะที่ 1: ไตมีพยาธิสภาพหรือมีตัวบ่งชี้การทำลายของไตเช่นตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือนแต่ยังมีการทำงานของไตปกติมีอัตราการกรองของไต (GFR) มากกว่าหรือเท่ากับ 90 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

ระยะที่ 2: ไตมีพยาธิสภาพหรือมีตัวบ่งชี้การทำลายของไตเช่นตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือนหรือมีการทำงานของไตลดลงโดยพบค่าอัตราการกรองของไต (GFR) อยู่ระหว่าง 60-89 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

ระยะที่ 3: ไตมีพยาธิสภาพหรือมีตัวบ่งชี้การทำลายของไตเช่นตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือนหรือมีการทำงานของไตลดลงปานกลางโดยมีอัตราการกรองของไต (GFR) อยู่ระหว่าง 30-59 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

ระยะที่ 4: ไตมีพยาธิสภาพหรือมีตัวบ่งชี้การทำลายของไตเช่นตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือนหรือมีการทำงานของไตลดลงอย่างรุนแรงโดยมีอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) อยู่ระหว่าง 15-29 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

ระยะที่ 5: เป็นภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage kidney disease, ESRD) เป็นภาวะที่ไตสูญเสียการทำงานอย่างถาวรจนผู้ป่วยไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้จะต้องได้รับการบำบัดทดแทนไตเช่นการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม, การล้างไตทางช่องท้องแบบต่อเนื่องหรือการปลูกถ่ายไตโดยมีอัตราการกรองของไต (GFR) น้อยกว่า 15 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

ตารางที่ 1 คำจำกัดความและการแบ่งระยะของโรคไตวายเรื้อรัง (National Kidney Foundation. 2002)

ระยะ	คำจำกัดความ	GFR (มล./นาที/1.73 ตารางเมตร)
1	ไตผิดปกติและ GFR ปกติหรือเพิ่มขึ้น	≥ 90
2	ไตผิดปกติและ GFR ลดลงเล็กน้อย	60 – 89
3	GFR ลดลงปานกลาง	30 – 59
4	GFR ลดลงมาก	15 – 29
5	ไตวายระยะสุดท้าย	< 15 (หรือต้องบำบัดทดแทนไต)

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

เมื่อไตเสียหายที่ในการขจัดของเสียออกจากร่างกายทำให้เกิดการคั่งของยูเรียเสียการควบคุมสมดุลน้ำกรดต่างในร่างกายและการสร้างฮอร์โมนที่จำเป็นต่อร่างกายทำให้มีผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่างๆในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (ตั้งสง่า. 2554)

1.) ผลต่อการกำจัด creatinine และ urea

Creatinine เป็นสารในร่างกายที่สร้างจากกล้ามเนื้อ creatinine จะถูกกรองผ่าน glomerulus โดยไม่มีการดูดกลับอีก ในภาวะปกติการกำจัดและการสร้าง creatinine จะสมดุลกัน แต่ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังซึ่งมี GFR ลดลง จะมีการคั่งของ creatinine ส่วน urea จะเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของอาหารประเภทโปรตีน โดย urea จะถูกกรองและบางส่วนจะถูกดูดกลับ ดังนั้นเมื่อการทำงานของไตลดลงจะเกิดการคั่งของ urea

2.) ความไม่สมดุลของโซเดียมและน้ำ

ในสภาวะที่ไตทำงานปกติ ไตจะทำหน้าที่รักษาสมดุลน้ำและโซเดียม แต่ในสภาวะที่การทำงานของไตลดลง กลไกการปรับตัวจะทำให้ไตส่วนที่เหลือเพิ่มการทำงานมากขึ้นเพื่อควบคุมสมดุลน้ำและโซเดียม แต่อย่างไรก็ตาม โซเดียมในร่างกายจะยังสูงกว่าปกติ

โดยเฉพาะเมื่อมี GFR ลดลงเหลือ 25% จะทำให้การทำงานของ nephron และ tubules ต่างๆ เสีย

3.) ความไม่สมดุลของ potassium

โดยทั่วไปปริมาณ potassium จะถูกควบคุมโดย aldosterone และ Na-K ATPase ซึ่งจะมีผลที่ distal tubules โรคไตวายเรื้อรังในภาวะที่ยังมีปัสสาวะอยู่พอสมควรจะสามารถควบคุมระดับ potassium ได้ แต่ภาวะไตวายเรื้อรังปริมาณ potassium ในร่างกายจะสูงขึ้น

4.) ความไม่สมดุลของภาวะกรด-ด่าง

โดยทั่วไปอาหารที่รับประทานเข้าไป จะให้ hydrogen ซึ่งร่างกายจะขจัดออกทางปัสสาวะพร้อม phosphate และ ammonia buffer ในภาวะที่ไตเริ่มทำงานลดลง ค่า pH ในร่างกายยังคงที่ แต่เมื่อการทำงานของไตลดลง GRF ลดลงเหลือ 30-40% ของค่าปกติ จะมีโอกาสเกิด metabolic acidosis ได้

5.) ความไม่สมดุลของ phosphate และ calcium

ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังการที่เนื้อไตถูกทำลายไปทำให้ phosphate ถูกขับออกน้อยลง เกิดการคั่งของ phosphate ซึ่งมีผลกีดขวางการสร้าง 1,25 dihydroxyvitamin D₃ ที่ไต ซึ่งเป็น active form ของ vitamin D ส่งผลให้ระดับของ calcium ในเลือดลดลง นอกจากนี้ยังลดการดูดซึม calcium จากทางเดินอาหารด้วย เมื่อระดับ serum calcium ลดลงจะกระตุ้นการหลั่ง parathyroid hormone (PTH) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ PTH จะเพิ่มการขจัด phosphate ที่ไต เพิ่ม calcium reabsorption จากกระดูกและเพิ่มการดูดกลับ calcium ที่ไตผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือเกิด hypocalcemia และ hyperparathyroidism นอกจากเหตุผลดังกล่าวแล้ว ภาวะ uremia ยังจะลดการทำงานของ vitamin D ในทางเดินอาหารอีกด้วย

6.) Hematocrit ลดลง

ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมักจะมีปัญหาซีด เนื่องจากการลดลงของ erythropoietin จากการลดลงของการทำงานของไต รวมทั้งภาวะ uremia

กระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง

ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยาในร่างกายของผู้ป่วยแต่ละคนต่างกันไปเนื่องจากภาวะไตวายเรื้อรังส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาต่างไปจากปกติ (Matzke et al. 2011) ดังต่อไปนี้

- การเปลี่ยนแปลงทางการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีค่า bioavailability ของยาหลายชนิดในเชิงปริมาณแตกต่างไปจากผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ gastrointestinal transit time, ความเป็นกรดต่างของกระเพาะอาหาร, ภาวะบวมน้ำในทางเดินอาหาร, อาการคลื่นไส้อาเจียนและการได้รับยาลดกรดซึ่งส่งผลให้การดูดซึมของยาเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้กระบวนการ first pass metabolism หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาในทางเดินอาหารและตับที่เกิดขึ้นก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดเพื่อส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายของผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไปเช่นถ้ากระบวนการ first pass metabolism ลดลงจะทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า bioavailability เพิ่มขึ้นเสี่ยงต่อการเกิดพิษจากยาแต่ถ้ากระบวนการ first pass metabolism เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดต่ำส่งผลให้ค่า bioavailability ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ

- การเปลี่ยนแปลงทางการกระจายยาในร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีปริมาตรการกระจายยาเพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณ protein binding ลดลง ปริมาณ tissue binding เพิ่มขึ้นหรือปริมาตรของน้ำในร่างกายหรืออัตราส่วนของน้ำในร่างกายต่อน้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลงไปในภาวะที่ไตทำงานบกพร่อง

- การเปลี่ยนแปลงทางการเมแทบอลิซึมของยาในร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆที่เกิดขึ้นที่ไตและตับลดลงเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450, uptake transporters และ efflux transporters ทั้งในตับและที่อวัยวะอื่นๆเปลี่ยนแปลงไป

- การเปลี่ยนแปลงทางการขจัดยาออกจากร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าเมื่ออัตราการกรองสารออกจากทาง glomerular ลดลงจะส่งผลให้การขจัดยาออกจากไตลดลงด้วยส่งผลให้ยาที่อาศัย glomerular filtration เป็นหลักในการขจัดยาออกจากร่างกายมีค่าครึ่งชีวิตยาวขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ดังกล่าวส่งผลให้ความเข้มข้นของยา ณ บริเวณที่ออกฤทธิ์ (site of action) ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังต่างไปจากผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติหรือส่งผลให้เกิดการ

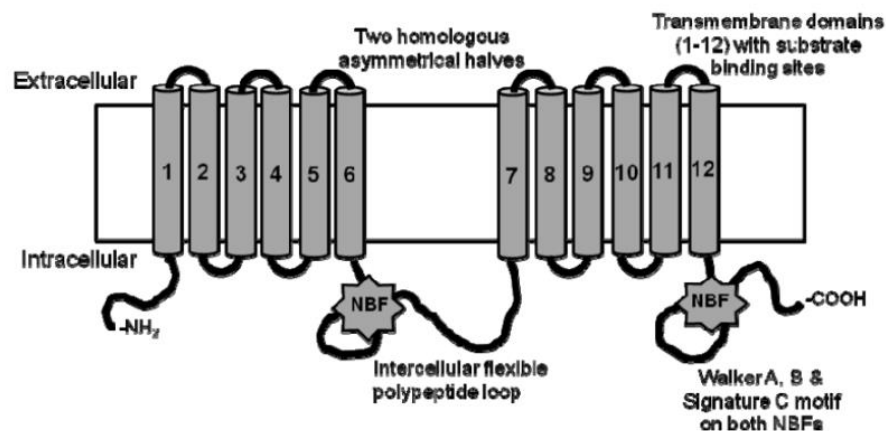
สะสมของยาหรือ metabolite ในร่างกายเพิ่มสูงขึ้นอีกทั้งผู้ป่วยไตวายเรื้อรังมักจะได้รับยาหลายชนิด
อย่าง

ต่อเนื่องพร้อมๆกันเพื่อรักษาโรคของไต โรคที่พบร่วมด้วยและภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ดังนั้นเพื่อ
ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างยาเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆจากยาทั้ง
ต่อไตและอวัยวะอื่นๆเพื่อให้ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังได้รับผลการรักษาตามที่คาดหวังและเพื่อช่วย
ทำนายนายการเปลี่ยนแปลงระดับยาแต่ละชนิดในร่างกายผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังได้ควรมีการศึกษา
เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาในภาวะที่ไตทำงานบกพร่องเพื่อช่วยให้ผู้ป่วย
ได้รับประโยชน์สูงสุดจากการใช้ยาและได้รับผลเสียจากการใช้น้อยที่สุด

2.1 Drug transporters

ปัจจุบันพบว่ากระบวนการขนส่งยาเข้าสู่ร่างกายโดย carrier mediated processes หรือ
transporters เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญ โดยขึ้นกับระดับของการแสดงออก (expression) ของ
transporters ในอวัยวะต่างๆ เช่น ลำไส้ ตับ และไต เป็นต้น membrane transporters เป็น
โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุม physiologic solute และสมดุลของเหลวในเซลล์ การทำงาน
ของ protein transporter แต่ละชนิดก็แตกต่างกันไป (Estudante et al. 2013) และในบางชนิดก็
ทำหน้าที่ได้หลายอย่างรวมทั้งมีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาในการขนส่ง endogenous substances
ต่างๆ เช่น น้ำตาล, ไขมัน, amino acid, bile acid, steroids ฮอร์โมนต่างๆ ในร่างกาย และยาต่างๆ
เช่น cyclosporine และ erythromycin เป็นต้น (จุฬาวัดฒนชล. 2546)

โดยสามารถแบ่งได้ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือชนิดที่เป็นตัวขนส่งยาออกจากเซลล์ (efflux
transporters) เช่น P-glycoprotein (P-gp) และ multidrug resistance associated proteins
(Mrps) และชนิดที่เป็นตัวขนส่งยาเข้าเซลล์ (uptake/influx transporters) เช่น transporter ที่
เป็นสมาชิกใน solute-linked carrier (SLC หรือ SLCO) superfamily ตัวอย่างเช่น organic
anion-transporting polypeptides (Oatps) ซึ่ง P-gp, Mrps, Oatps นับเป็น transporter ที่มี
บทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ P-glycoprotein transporter

(Bansal et al. 2009)

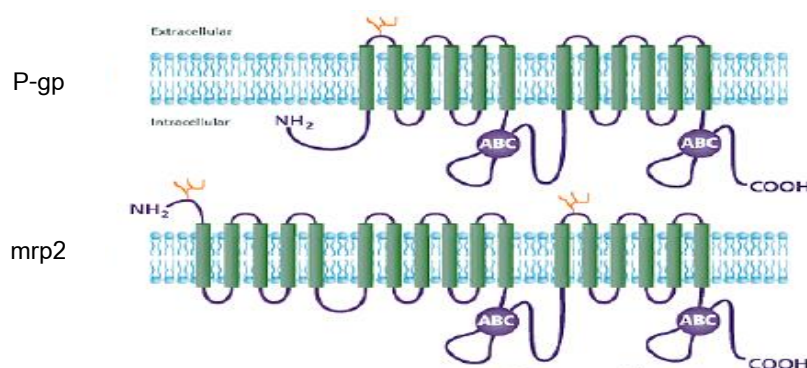
P-glycoprotein (P-gp) เป็น transmembrane transporter ที่สร้างขึ้นในร่างกายโดยยีนควบคุมของ *mdr1* gene เป็นสมาชิกใน adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporter superfamily (ABC transporters) ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งสารหรือยาออกจากเซลล์ด้วยขบวนการ active transport โดยอาศัยพลังงานจาก ATP P-gp พบอยู่ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ ลำไส้เล็ก ไต ตับ สมอง รก และ lymphocytes โดยบริเวณที่พบส่วนใหญ่จะเป็นที่ apical หรือ luminal surface ของ epithelial cell ของอวัยวะเช่นที่ลำไส้เล็ก (Takano et al. 2006) P-gp มีบทบาทที่สำคัญในการขับสารหรือยาออกจากร่างกายเช่น ผ่านทาง biliary canalicular membrane ของเซลล์ตับออกสู่ลำน้ำดี หรือผ่านทาง brush border membrane ของ proximal tubule ของไตออกสู่ปัสสาวะ หรือออกสู่ท่อลำไส้ ซึ่งทำให้การดูดซึมยาลดลง ในหนูเม้าส์มียีนที่ code เป็น P-gp ด้วยกันสองยีนคือ *mdr1a* และ *mdr1b* ดังตารางที่ 2 โดย *mdr1a* ในหนูเม้าส์มีความคล้ายคลึงกับในคน ในการทดลองจึงเลือกศึกษาใน *mdr1a*

สารตั้งต้นของ P-gp มีเป็นจำนวนมากและมีลักษณะโครงสร้างที่ต่างกันไปส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ตัวอย่างสารตั้งต้นที่สำคัญของ P-gp เช่น กลุ่มยารักษามะเร็ง กลุ่มยา immunosuppressants, cardiac glycosides, steroid และเป็นสิ่งที่สังเกตว่า กลุ่มยาเหล่านี้มักเป็นยาที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดย cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) ด้วย ดังนั้น สารตั้งต้นของ P-gp หลายชนิดจึงเป็นสารตั้งต้นของ CYP3A4 (จุฬาวัดชนทล. 2546)

ตารางที่ 2 แสดงค่า correlation coefficients ของ mdr1 gene ในคน, หนูเม้าส์ และหนูแรท (Takeuchi et al. 2006)

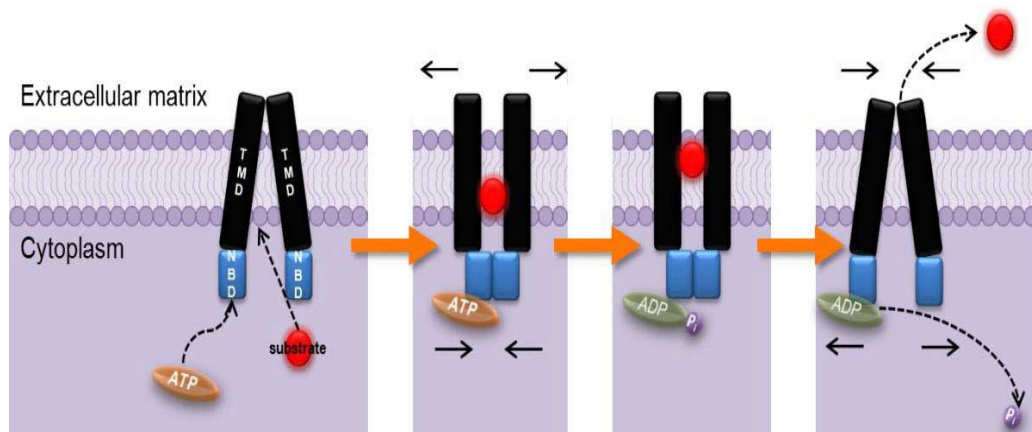
	Human mdr1	Rat mdr1a	Rat mdr1b	Mouse mdr1a	Mouse mdr1b
Rat mdr1a	0.762	1			
Rat mdr1b	0.753	0.886	1		
Mouse mdr1a	0.780	0.786	0.828	1	
Mouse mdr1b	0.738	0.794	0.931	0.822	1

multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) ควบคุมโดย mrp2 gene ซึ่งในมนุษย์มีความคล้ายคลึงกับ mrp2 gene ในหนูเม้าส์ โดยมีความคล้ายคลึงกัน 78% เท่ากันกับในหนูแรท (Nies and Keppler 2007) mrp2 อยู่ในกลุ่ม adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporter superfamily (ABC transporters) ดังภาพที่ 2 ขนส่งสารหรือยาออกจากเซลล์ ด้วยขบวนการ active transport โดยอาศัยพลังงานจาก ATP ดังภาพที่ 3 สามารถพบได้ที่บริเวณ apical membrane ของ hepatocytes, renal proximal tubule epithelia และ intestinal epithelia เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในการขนส่ง organic anions รวมทั้ง phase II metabolic product (Murakami and Takano 2008)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของ ATP-binding cassette (ABC) transporters

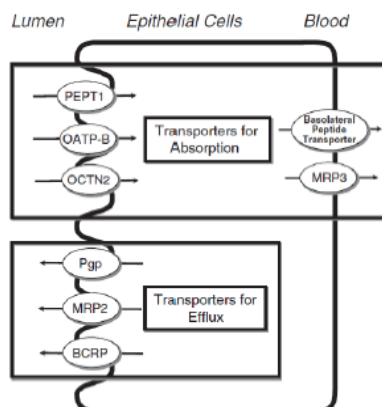
(Gottesman et al. 2002)



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ของ ABC transporters

(Szakacs et al. 2006)

organic anion-transporting polypeptide3 (Oatp3) เป็น membrane influx transporters ที่เป็น Na^+ -independent transporters ซึ่ง encode โดย oatp3 gene ส่วนในหนูเมาส์ คือ oatp3 gene โดยมีความคล้ายคลึงกันกับมนุษย์ถึง 72% เช่นเดียวกันกับในหนูแรท การขนส่งสารหรือยาเข้าเซลล์ของ Oatps ไม่ต้องอาศัย ATP แต่เป็นการขนส่งสารหรือยาจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ Oatps กระจายอยู่ในอวัยวะและบริเวณต่างๆของร่างกายที่สำคัญได้แก่ ตับ ไต ลำไส้ สมอง และรก โดยหน้าที่ที่สำคัญที่พบที่ลำไส้คือช่วยในกระบวนการดูดซึมยา กล่าวคือขนส่งยาผ่านผนัง duodenum เข้าสู่กระแสเลือดโดยปกติจะมีบทบาทในการขนส่ง endogenous compounds เช่น bile acids, bilirubin, eicosanoids, steroid conjugates, thyroid hormone (Huang et al. 2000)



ภาพที่4 แสดง transporters ที่พบในลำไส้

(Szakacs et al. 2006)

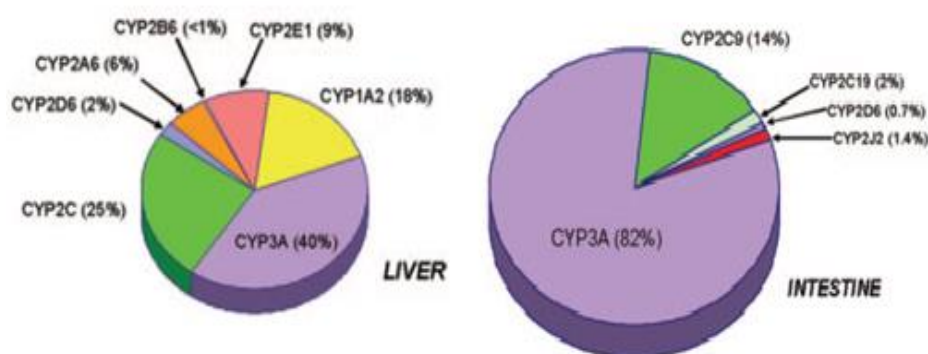
จากการที่ยีน *mdr1a* และ *mrp2* เป็น efflux transporters และ *oatp3* และ influx transporters ที่มีความสำคัญอย่างมากในลำไส้เล็ก (Naud et al. 2007) ซึ่งหากเกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ efflux transporters และ influx transporters จากการเกิดโรคไตวายเรื้อรังอาจส่งผลทำให้มีปริมาณยาเพิ่มขึ้นหรือลดลง (Matzke et al. 2011) ทำให้ส่งผลต่อการใช้ยาในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3* ในลำไส้หนูเมาส์ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรัง ที่เกี่ยวข้องกับการขบวนการ drug transporters ในร่างกาย ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ส่งผลให้กระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเปลี่ยนไปจากผู้ที่มีการทำงานของไตปกติ

2.2 เอนไซม์ cytochrome P450

เอนไซม์ cytochrome P450 (CYP450) ถูกค้นพบประมาณเมื่อ 50 กว่าปีที่แล้วเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ (xenobiotic) ที่เข้าสู่ร่างกายโดยทั่วไปเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมไปเป็น metabolite ที่มีความเป็นขั้วมากขึ้นเพื่อให้สารนั้นถูกกำจัดออกทางไตได้ง่ายโดยเอนไซม์ CYP จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ทำให้เกิดสารใหม่หรือ metabolite ที่มีคุณสมบัติต่างจากสารเดิมคือ metabolite ที่ได้อาจมีฤทธิ์มากขึ้นหรือลดลงหรือหมดฤทธิ์ซึ่งจะพบเอนไซม์ CYP ได้มากที่สุดที่ตับและลำไส้ และยังพบได้ที่สมอง, ปอด, เต้านม, กระเพาะอาหารและ ไตเป็นต้น (Brunton L. et al. 2010)

โดยลำไส้เล็ก เป็นบริเวณของทางเดินอาหารที่ยาถูกดูดซึมมากที่สุด จากการให้ยาโดยการรับประทานซึ่งเป็นวิธีการให้ยาที่ใช้มากที่สุด ในบริเวณของลำไส้เล็กเองก็มีเอนไซม์ CYP ที่สามารถเปลี่ยนแปลงยาได้เช่นเดียวกันกับตับ โดยหลังจากการให้ยาโดยการรับประทาน ยาที่ถูกดูดซึมได้จะถูกเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอม ไปเป็น metabolite ที่มีความเป็นขั้วมากขึ้นเพื่อให้สารนั้นถูกกำจัดออกทางไต อาจทำให้ปริมาณยาที่จะเข้าสู่ systemic circulation ลดลง ซึ่งจากการที่ยาถูกทำลายไปก่อนที่จะเข้าสู่ systemic circulation นี้เรียกว่า “first pass metabolism”(Leblond et al. 2002) ดังนั้น bioavailability อาจไม่เท่ากับปริมาณยาที่ถูกดูดซึมได้จากทางเดินอาหาร

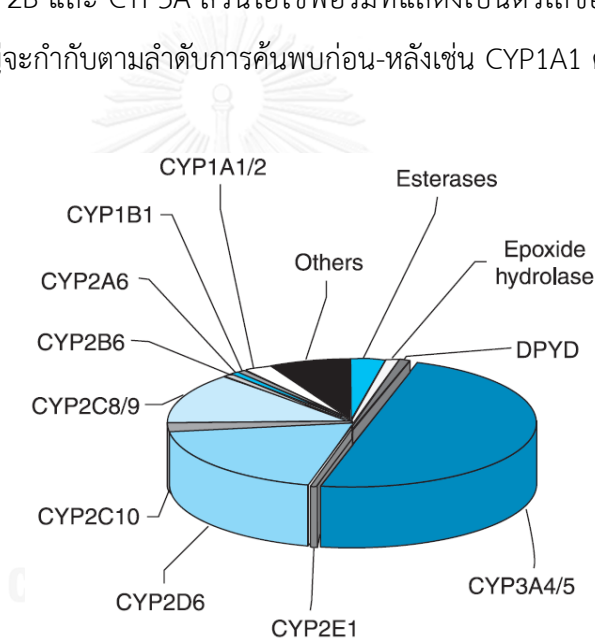
เอนไซม์ CYP3A เป็นไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกมากที่สุดในลำไส้เล็ก ดังภาพที่ 5 โดยเอนไซม์ CYP3A มีการแสดงออกตลอดความยาวของลำไส้เล็ก โดยพบ 31, 23, 17 pmol/mg microsomal protein ใน duodenum, jejunum และ ileum ตามลำดับ (Paine et al. 1997) โดยพบว่าไอโซฟอร์มที่มีมากที่สุดใน duodenum ได้แก่ CYP3A4 ได้มีการศึกษาทางคลินิกชี้ให้เห็นว่าลำไส้เล็ก มีส่วนสำคัญอย่างมากในขบวนการ first pass metabolism ของยา cyclosporine, nifedipine, midazolam, verapamil เป็นต้น (Lin et al. 1999)



ภาพที่ 5 เอนไซม์ cytochrome P4503A ในลำไส้และตับ

(Paine et al. 2006)

เอนไซม์ CYP เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไอโซฟอร์มย่อยหลายชนิดที่มีการแสดงออกและการทำงานในอวัยวะต่างๆแตกต่างกันและพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่นแบคทีเรีย, รา, พืชและสัตว์ ส่วนในคนนั้นพบว่ามียีนทั้งสิ้น 57 ไอโซฟอร์ม (isoform) จาก 18 แฟมิลี (family) และ 43 แฟมิลีย่อย (subfamily) เช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 และ CYP3A5 เป็นต้น (Martignoni et al. 2006) ระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ CYP ขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน ถ้าคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 40 จะจัดอยู่ในแฟมิลีเดียวกันและแสดงเป็นเลขอารบิกเช่น CYP1, CYP2 และ CYP3 แต่ถ้าคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 55 จะจัดอยู่ในแฟมิลีย่อยเดียวกันและแสดงเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่เช่น CYP1A, CYP2B และ CYP3A ส่วนไอโซฟอร์มที่แสดงเป็นตัวเลขอารบิกหลังตัวอักษรภาษาอังกฤษโดยส่วนใหญ่จะกำกับตามลำดับการค้นพบก่อน-หลังเช่น CYP1A1 ค้นพบก่อน CYP1A2



ภาพที่ 6 เอนไซม์ cytochrome P450 (Brunton L. et al. 2010)

การทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450

กลไกการทำงานของเอนไซม์ CYP ในการเร่งปฏิกิริยา oxidation เมื่อสารตั้งต้น (R-H) เข้าสู่ เซลล์จะจับกับ heme ของเอนไซม์ CYP ที่อยู่ในรูป ferric (Fe^{3+}) กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน คือ $\text{Fe}^{3+}(\text{R-H})$ จากนั้น $\text{Fe}^{3+}(\text{R-H})$ จะถูกรีดิวซ์โดยการรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase ทำให้ Fe^{3+} ที่อยู่ในโมเลกุลของ heme เปลี่ยนรูปเป็น $\text{Fe}^{2+}(\text{R-H})$ ซึ่งเป็น สารประกอบเชิงซ้อนที่มีความสามารถจับกับ O_2 ได้ดีหลังจากนั้น $\text{Fe}^{2+}(\text{R-H})$ จะรวมตัวกับ O_2 กลายเป็น ferrous dioxygen; $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2(\text{R-H})$ และจะถูกเปลี่ยนต่อให้เป็น $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}(\text{R-H})$ โดยการ รับโปรตอนมาหนึ่งตัว และอิเล็กตรอนอีกหนึ่งตัวจาก NADPH-cytochrome P450 reductase จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะรับโปรตอนตัวที่สองเข้ามา ทำให้เกิดการสลายพันธะระหว่าง ออกซิเจนสองอะตอมกลายเป็น $(\text{FeO})^3+\text{R-H}$ ที่มีออกซิเจนหนึ่งอะตอมอยู่ในโมเลกุล ส่วนออกซิเจนที่ เหลืออีกหนึ่งอะตอมจะถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ ต่อจากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะมีการจัดเรียง โมเลกุลใหม่ให้มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดี และปลดปล่อยสารตั้งต้นที่ถูกออกซิไดซ์ ในรูป R-O-H ออกมาหรือปล่อย product ที่ได้ออกมา พร้อมทั้งมีการปรับโครงสร้างของ CYP ให้ กลับคืนสู่ภาวะ Fe^{3+} เช่นเดิมเพื่อทำหน้าที่จับกับซับสเตรทโมเลกุลใหม่ต่อไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้นโดยเอนไซม์ CYP นั้นเกิดจากการนำออกซิเจนหนึ่งอะตอมเข้าไป สอดแทรกในโมเลกุลของสารตั้งต้น (Guengerich 2008, Lewis and Ito 2008)

กระบวนการเมแทบอลิซึมยาของเอนไซม์ CYP ด้วยปฏิกิริยา oxidation จะอาศัยเอนไซม์ oxygenase หรือ mixed-function oxidase (MFO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีออกซิเจน (O_2) เป็น ตัวออกซิไดซ์ (oxidant) และมีตัวรีดิวซ์ (reductant) คือ NADPH ทำหน้าที่เป็น cofactor ของ เอนไซม์ ดังสมการ



2.3 เอนไซม์ cytochrome P4503A

เอนไซม์ cytochrome P4503A (CYP3A) เป็นแฟมิลีย่อยของเอนไซม์ CYP ที่มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมยาและสารแปลกปลอมต่างๆที่เข้าสู่ร่างกายซึ่ง CYP3A เป็นเอนไซม์ที่มีสับสเตรทที่จำเพาะจงเจาะมากมายเช่น testosterone, midazolam, nifedipine และ erythromycin เป็นต้น และมียาหลายชนิดที่เป็นทั้ง inhibitor ของเอนไซม์ CYP3A เช่น tacrolimus และ fluconazole เป็นต้น และ inducer ของเอนไซม์ CYP3A เช่น rifampicin เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน (Martignoni et al. 2006) ดังนี้

เอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์

เอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์มี 4 ไอโซฟอร์มได้แก่ CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 และ CYP3A43 โดยพบว่าเอนไซม์ CYP3A เป็นแฟมิลีย่อยที่สำคัญที่สุดในการ metabolism ยาที่เข้าสู่ร่างกายโดยยาประมาณร้อยละ 50 ของยาที่มีใช้ทางคลินิกมักถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ CYP3A เช่น ยา terfenadine, ยา กลุ่ม benzodiazepines, midazolam, triazolam, quinidine, lidocaine, carbamazepine, nifedipine, tacrolimus, dapsone และ erythromycin เป็นต้น (Brunton L. et al. 2010) นอกจากนี้เอนไซม์ CYP3A ยัง metabolize สารภายในร่างกายด้วยเช่น steroids, bile acid เป็นต้นนอกจากตัวยังสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ทั่วร่างกายได้แก่ กระเพาะอาหาร, ปอด, ลำไส้และไตในมนุษย์นั้นพบว่าเอนไซม์ CYP3A4 เป็นไอโซฟอร์มที่มีมากที่สุด ในจำนวนไอโซฟอร์มทั้งหมดของเอนไซม์ CYP3A (ภาพที่6) และเป็นไอโซฟอร์มที่มีการแสดงออกในตัวยามากที่สุดส่วน

เอนไซม์ CYP3A5 เป็นไอโซฟอร์มที่มีประมาณร้อยละ 20 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมดซึ่งคิดเป็นหนึ่งในสามของเอนไซม์ CYP3A4 แต่อย่างไรก็ตามในบางคนอาจจะมีเอนไซม์ CYP3A5 มากกว่าร้อยละ 50 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมด ส่วนเอนไซม์ CYP3A7 จะมีการแสดงออกในตับของทารกเพียงอย่างเดียวและเอนไซม์ CYP3A43 จะแสดงออกที่ตับเช่นกันแต่มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ CYP3A4 คือมีการแสดงออกและการทำงานร้อยละ 0.2-5 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมดดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ CYP3A4 เป็นไอโซฟอร์มที่สำคัญที่สุดในการเปลี่ยนแปลงยาที่เข้าสู่ร่างกายซึ่งวิธีที่นิยมในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ได้แก่วิธี testosterone 6 β -hydroxylation และวิธี midazolam 1'-hydroxylation ดังนี้

- **Testosterone 6 β -hydroxylation** เป็นวิธีที่ใช้ testosterone เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา คือ 6 β -hydroxytestosterone (6 β HT) โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 238 nm

- **Midazolam 1'-hydroxylation** เป็นวิธีที่ใช้ midazolam เป็นสับสเตรทและ ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา คือ 1'-hydroxymidazolam (1HMZ) และ 4-hydroxymidazolam (4HMZ) โดยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm

จากการรายงานก่อนหน้านี้ (Yuan et al. 2002) พบว่าเอนไซม์ CYP3A ทุกไอโซฟอร์ม ยกเว้น CYP3A7 เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา testosterone 6 β -hydroxylation โดยพบการทำงาน CYP3A4 มากที่สุดและจากการศึกษาการทำงานเอนไซม์ CYP3A4 ใน human liver microsomes แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ CYP3A4 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา testosterone 6 β -hydroxylation และ midazolam 1'-hydroxylation โดย midazolam 1'-hydroxylation มีค่า Km เท่ากับ 3-5 μ M และ testosterone 6 β -hydroxylation มีค่า Km 50-100 μ M ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ CYP3A จับ midazolam ได้ดีกว่า testosterone โดยดูจากค่า Km แต่อย่างไรก็ตาม midazolam ไม่สามารถละลายในน้ำได้ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดเช่น acetone จะมีผลให้การ metabolism ของ midazolam เพิ่มขึ้นในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวไม่มีผลต่อ testosterone นอกจากนี้ยังพบว่า midazolam เป็นสับสเตรทที่มีความไวมากกว่า testosterone เนื่องจากจะต้องใช้ testosterone ที่ความเข้มข้น \leq 250 μ M ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 แต่ใช้ midazolam ที่ความเข้มข้น < 10 μ M เท่านั้นนอกจากนี้ยังพบว่าการปรับเปลี่ยนปริมาณเอนไซม์ CYP3A4 ด้วย inhibitor หรือ inducer ของเอนไซม์ CYP3A นั้นขึ้นกับสับสเตรทที่ใช้ด้วยเช่นยา fluconazole ซึ่งเป็น inhibitor ของเอนไซม์ CYP3A4 พบว่ายา fluconazole สามารถลดการ metabolism ของ midazolam ได้ร้อยละ 65 และลดการ metabolism ของ testosterone ได้เพียงร้อยละ 37 ในขณะที่ยา nimodipine สามารถลดการ metabolism ของ midazolam ได้ร้อยละ 60 แต่ลดการ metabolism ของ testosterone ได้ร้อยละ 96 เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่า สับสเตรททั้งสองของเอนไซม์ CYP3A4 มีความแตกต่างกัน ในการศึกษาจึงสนใจใช้ทั้งสองสับสเตรท ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เพื่อยืนยันผลการศึกษา

เอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์

เอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ มี 6 ไอโซฟอร์มได้แก่ CYP3A11, CYP3A13, CYP3A16, CYP3A25, CYP3A41, CYP3A44 โดยพบว่าหนูเมาส์ ช่วงอายุ 4-8 สัปดาห์จะมีระดับของเอนไซม์ CYP3A11 และเอนไซม์ CYP3A13 มากที่สุดโดย พบว่าในหนูเมาส์เอนไซม์ CYP3A11 เป็นไอโซฟอร์มที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ของมนุษย์ และมีการแสดงออกที่ลำไส้คล้ายคลึงกับ CYP3A4 ในมนุษย์อีกด้วยส่วนเอนไซม์ CYP3A16 จะพบในทารกในครรภ์และจะมีปริมาณลดลงหลังจากคลอด ส่วนเอนไซม์ CYP3A25 จะพบในตับและลำไส้เล็กของหนูเมาส์ แรกเกิดและ adult พบได้ทั้งตัวผู้และตัวเมียและเอนไซม์ CYP3A41 กับเอนไซม์ CYP3A44 จะพบในหนูเมาส์ตัวเมียเท่านั้น

นอกจากนี้เอนไซม์ CYP3A4 ยังเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา เนื่องจากร้อยละ 50 ของยาที่ใช้ทางคลินิกจะถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ CYP3A4 สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม รายงานการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ CYP3A ที่สำคัญในการเมแทบอลิซึมยาในคนและในหนูเมาส์ (ตารางที่ 3) พบว่า CYP3A11 เป็นชนิดของเอนไซม์ที่พบในหนูเมาส์ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ของคนมากถึงร้อยละ 76 และมีการแสดงออกที่ลำไส้คล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ในคนอีกด้วย Bogaards และคณะ (Bogaards et al. 2000) พบว่าหนูเมาส์เป็นสัตว์ทดลองที่คล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุด โดยดูจากรูปแบบการถูกยับยั้งของเอนไซม์ CYP ในแต่ละไอโซฟอร์ม และดูจากจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m/V_{max}) ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์จึงน่าจะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในคน เพื่อใช้ในการทำนายกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เข้าสู่ร่างกาย

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบไอโซฟอร์มที่สำคัญของเอนไซม์ CYP ในการเปลี่ยนแปลงยาที่เข้าสู่ร่างกายของคน, หนูเม้าส์, หนูแรท (Martignoni et al. 2006)

Family	Subfamily	Human	Mouse	Rat
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2, 3A9, 3A18, 3A62

จากการที่เอนไซม์ CYP3A ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่พบมากในลำไส้ และปริมาณยาที่ใช้ทางคลินิก ส่วนใหญ่มักถูก metabolize ผ่านเอนไซม์นี้ (Lin et al. 1999, Paine et al. 2006) ดังนั้นหากมีการทำงานหรือการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A เปลี่ยนแปลงไปในการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง จึงอาจทำให้มีปริมาณยาเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้เอนไซม์ CYP3A11 ของหนูเมาส์ เป็นตัวแทนในการศึกษาประสิทธิภาพการแสดงผลออกของเอนไซม์ และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ในมนุษย์โดยวิธีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP3A11 ได้แก่วิธี testosterone 6beta-hydroxylation ซึ่งจะทำการศึกษาในไมโครโซมของหนูเมาส์ โดยใช้ testosterone เป็นสับสเตรท และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา คือ 6 β -hydroxytestosterone หรือวิธี midazolam 1'-hydroxylation โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรทและตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา คือ 1'-hydroxymidazolam เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A และการขนส่งยาในลำไส้เล็กหนู

ปี ค.ศ. 2001 Veau และคณะ (Veau et al. 2001) ศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure, CRF) ต่อ activity ของ P-gp และการแสดงออกของ mRNA และ protein ของ P-gp ในลำไส้หนูแรท กลุ่ม chronic renal failure และกลุ่ม control ซึ่งทำการทดลองโดยใช้หนูแรท ที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยวิธี nephrectomy หลังจากนั้น 5 สัปดาห์ ศึกษา rhodamine 123 transport โดยใช้วิธี everted sacs model และการแสดงออกของ mRNA และ protein ในลำไส้ โดยใช้วิธี semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของ mRNA และ protein ของ P-gp ระหว่างหนูกลุ่ม chronic renal failure และหนูกลุ่ม control ไม่แตกต่างกัน ส่วน intestinal rhodamine 123 transport ลดลงในหนูกลุ่ม chronic renal failure

ปี ค.ศ. 2001 Leblond และคณะ (Leblond et al. 2001) ศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure; CRF) ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYP (CYP1A1/1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1, CYP3A1 และ CYP3A2) ในตับหนูแรท ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยวิธี nephrectomy พบว่ามีการแสดงออกของ CYP2C11, CYP3A1 และ CYP3A2 ลดลงทั้งในระดับยีนและโปรตีนส่วนการศึกษาการทำงานของ CYP3A2 โดยใช้ erythromycin เป็น

สับสเตรทพบว่ามีการทำงานของ CYP3A2 ลดลงและการศึกษาต่อมาพบว่าเมื่อให้ยา dexamethasone และยา phenobarbital ซึ่งเป็น inducer ของเอนไซม์ CYP3A2 ทาง intraperitoneal แก่หนู CRF พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A2 เพิ่มขึ้นทั้งในระดับยีนและโปรตีนดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโรคไตวายเรื้อรังส่งผลให้การแสดงออกของ CYP2C11, CYP3A1 และ CYP3A2 ในตับหนูแรทลดลงและการลดลงของเอนไซม์ CYP3A2 นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับยาที่เป็น inducer ของเอนไซม์ CYP3A2

ปี ค.ศ. 2007 Naud และคณะ (Naud et al. 2007) ศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรัง chronic renal failure ต่อ liver drug transporters ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยศึกษาผลกระทบของโรคไตวายเรื้อรังต่อ liver drug transporters ทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน รวมทั้ง metabolic activity และผลของ serum ต่อ drug transporter ในเซลล์ตับ พบว่า การแสดงออกของ mRNA ของ mdr1 และ mrp2 เพิ่มขึ้น 40% และ 35% ตามลำดับ ในหนูกลุ่ม CRF, ในขณะที่พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน oatp2 ลดลง 35 % ในหนูกลุ่ม CRF แต่ mRNA ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งคล้ายกันกับผลของ serum ต่อ drug transporter ในเซลล์ตับแสดงให้เห็นว่าโรคไตวายเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของ liver transporters

ปี ค.ศ. 2008 Simard และคณะ (Simard et al. 2008) ศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) ต่อ N-acetyltransferase (NAT) ในตับหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง ที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยวิธี 5/6 nephrectomy โดยศึกษาผลกระทบของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของ mRNA และ protein ของ Net1 และ Net2 พบว่าในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังมีการแสดงออกของ mRNA และ protein ของทั้ง Net1 และ Net2 ลดลงมากกว่าร้อยละ 30 และยังมีการทำงานของ Net2 ลดลงมากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังการเกิดปฏิกิริยา acetylation ลดลง

ปี ค.ศ. 2011 Naud และคณะ (Naud et al. 2011) ศึกษาผลของโรค chronic renal failure (CRF) ต่อการเปลี่ยนแปลงและการกำจัดยาที่ไตของหนูแรท ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค CRF โดยทำการศึกษาการทำงานและการแสดงออกของ drug transporter และเอนไซม์ CYP ทั้งในระดับยีน และระดับโปรตีน, ดูการสะสมของยา digoxin และยา benzylpenicillin ที่บริเวณไต, ดูผลของ uremic serum ต่อการแสดงออกและการทำงานของ P-gp ใน proximal tubule cell line ผลที่ได้พบว่าการเกิดโรคไตวายเรื้อรังส่งผลให้การแสดงออกและการทำงานของตัวขนส่งยาที่ไตเปลี่ยนแปลง

ไปทำให้การขับยาออกทางไต (renal clearance) ลดลงเกิดการสะสมของยาที่ไตและเกิดพิษต่อไต (nephrotoxicity) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจาก uremic serum

ปีค.ศ. 2013 Gai และคณะ (Gai et al. 2014) ได้ศึกษาผลของ chronic renal failure ต่อการแสดงออกของ mRNA และ protein ของ bile acid-synthesizing enzyme cyp7a1 และ bile acid transporters เช่น ntcp, bsep, mrp3, ost- α , Ost- β ในตับและลำไส้ของหนูแรท ที่ทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังจากการทดลองพบว่า หนูกลุ่ม chronic renal failure มีระดับของ cholesterol และ bile acid เพิ่มขึ้น ส่วนการแสดงออก mRNA และ protein ของ cyp7a1 นั้นเท่ากันทั้งกลุ่ม chronic renal failure และกลุ่ม control และพบว่ามี การแสดงออกของ mrp3, ost- α และ ost- β เพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่ม basolateral efflux ของ bile acid ไปยังเลือด

ปีค.ศ. 2014 Yano และคณะ (Yano et al. 2014) ได้ศึกษาผลของ chronic kidney disease ต่อการแสดงออกของยีน ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) ซึ่งเป็นตัวขนส่ง uric acid ในลำไส้เล็กของหนูแรท การศึกษาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยวิธี 5/6 nephrectomy ศึกษาการแสดงออกของยีน ABCG2 ด้วยวิธี real time polymerase chain reaction (PCR) พบว่า ในหนูกลุ่ม 5/6 nephrectomy มีระดับของ uric acid ในปัสสาวะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ระดับของ uric acid ในซีรัมไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีการขับออกของ uric acid ในส่วนอื่น ซึ่งจากการทดลองพบว่าการแสดงออกของ ABCG2 เพิ่มขึ้นใน ileum ในหนูกลุ่ม 5/6 nephrectomy เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ปีค.ศ. 2014 Joy และคณะ (Joy et al. 2014) ได้ศึกษาผลของ chronic kidney disease การเปลี่ยนแปลงยาและการขนส่งยา ในผู้ป่วย โดยทำการศึกษาแบบ prospective study ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง 18 คน เก็บเลือดและ urine ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา fexofenadine เพื่อวัดการทำงานของตัวขนส่งยาเนื่องจากยา fexofenadine เป็นสับสเตรทของตัวขนส่งยาหลายชนิด และศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา flurbiprofen เป็นสับสเตรทของ CYP2C9 ด้วย จากการทดลองพบว่า ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมี oral clearance ของ fexofenadine ลดลง 40% ขณะที่เภสัชจลนศาสตร์ของยา flurbiprofen ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ปีค.ศ. 2016 Naud และคณะ (Naud et al. 2016) ศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรัง chronic renal failure ต่อ cytochrome P450 (P450) ในสมองหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยศึกษาผลกระทบของโรคไตวายเรื้อรังและผลของ parathyroid hormone (PTH) ต่อ

cytochrome P450 ทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน พบว่า cyp1a, cyp2c11, และ cyp3a มีการแสดงออกในระดับโปรตีนลดลงใน brain microsomal ของหนูที่เกิดโรคไตวายเรื้อรัง รวมทั้งมีการทำงานของ cyp3a ลดลงด้วยใน microsomal ของหนูที่เกิดโรคไตวายเรื้อรังจากการวัดแทบอสิซึมของ 3-[(3, 4-difluorobenzyl) oxy]-5, 5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl] phenyl] furan-2(5H)-1 นอกจากนี้ PTH ยังทำให้มีการการแสดงออกในระดับโปรตีนของ cyp3a ลดลงใน astrocytes ที่บ่มด้วยซีรัมของหนูที่เกิดโรคไตวายเรื้อรัง

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่าโมเดลที่ใช้เหนี่ยวนำในหนูทดลองเป็นการใช้การเหนี่ยวนำแบบ nephrectomy และใช้หนูแรทเป็นหลัก การเหนี่ยวนำด้วยวิธี nephrectomy ซึ่งจะมีกพบอัตราการรอดชีวิตของหนูต่ำ (Yang et al. 2010) และยังไม่มีการศึกษาการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง (chronic kidney failure, CRF) โดยการใช้หนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion model ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน mdr1a, mrp2, oatp3, cyp3a11 และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion เพื่อนำไปสู่การอธิบายถึงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา โดยเฉพาะต่อกระบวนการดูดซึมที่ลำไส้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

จากการศึกษาของ Naud และคณะปีค.ศ. 2007 (Naud et al. 2007) ทำการทดลอง โดยใช้หนูทดลองต่อกลุ่มๆละ 6-8 ตัวการศึกษานี้จึงใช้หนูทดลองกลุ่มละ 5-6 ตัวรวมหนูทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยนี้ทั้งสิ้นจำนวน 22 ตัว

3.2 การเหนี่ยวนำให้หนูเมาส์เกิดโรคไตวายเรื้อรัง

หนูเมาส์ น้ำหนัก 30-35 กรัม สายพันธุ์ ICR อายุ 4-8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ โดยการทดลองแบ่งหนูเมาส์ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

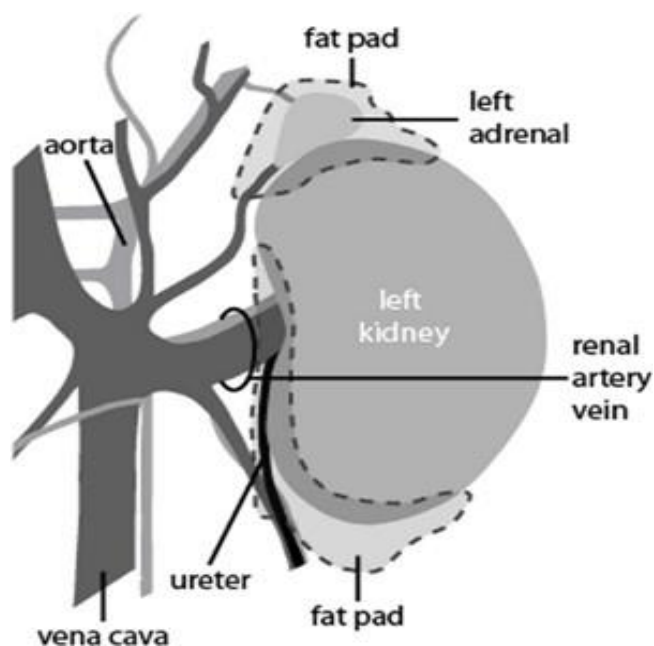
กลุ่มที่ 1 หนูกลุ่มปกติ 2 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2 หนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง 2 สัปดาห์หลังจากตัดไตข้างขวา

กลุ่มที่ 3 หนูกลุ่มปกติ 4 สัปดาห์

กลุ่มที่ 4 หนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง 4 สัปดาห์หลังจากตัดไตข้างขวา

โมเดลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ chronic ischemic reperfusion model โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการผ่าตัดเปิดช่องท้องหนูโดยการดมสลบหนูเมาส์ ด้วย isoflurane เพื่อปิดหลอดเลือดแดงที่นำเลือดเข้าสู่ไตข้างซ้าย (renal artery) โดยการใช้ micro-clampหนีบเพื่อปิดหลอดเลือด ภาพที่ 7 จากนั้นทำการปิดช่องท้องหนูและทิ้งไว้ 50 นาที แล้วทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องหนูอีกครั้งเพื่อเปิดหลอดเลือดแดงที่นำเลือดเข้าสู่ไตข้างซ้ายและปิดช่องท้องหนู หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์ ทำการผ่าตัดไตข้างขวาทิ้ง (nephrectomy) เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด 2 สัปดาห์หรือ 4 สัปดาห์ หลังจากผ่าตัดไตข้างขวาทิ้ง ทำการการุณยฆาต (sacrificed) หนูเมาส์เพื่อเก็บเลือดและลำไส้เล็ก



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของไต วงกลมสีดำแสดงตำแหน่ง micro-clamp ที่ปิดหลอดเลือด
(Skrypnyk et al. 2013)

3.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับวัดระดับซีรัม creatinine และซีรัม urea โดยมีการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังที่ระยะเวลา 2 หรือ 4 สัปดาห์เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดทำการการุณยฆาต (sacrificed) และเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ นำมา centrifuge เพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์เพื่อประเมินการทำงานของไต

3.4 การเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กหนู

เก็บตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนต้นของหนู สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของ transporters, cyp3a11 และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กของหนูเริ่มต้นจากนำลำไส้เล็กออกจากร่างกาย หนูนำไปแช่ไว้ใน liquid nitrogen (N₂) ที่เย็นจัดประมาณ 1 นาทีและเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กในหลอดเก็บตัวอย่างโดยการแช่ในอุณหภูมิที่ -80 องศาเซลเซียสจนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์

3.5 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Experimental study

3.6 วิธีวิจัย

3.6.1 การทดสอบภาวะไตวายเรื้อรังด้วยระดับ serum creatinine

วัดระดับ serum creatinine ด้วย Creatinine assay kit [Quantichrom™ creatinine assay, BioAssay Systems, USA] เตรียมสารละลายมาตรฐาน creatinine ที่ 4, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25 mg/dl จากนั้นทำการเตรียม working reagent โดยเติม Reagent A 100 µl + Reagent B 100 µl เติมสารละลายมาตรฐาน creatinine ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ serum sample 30 µl ลงใน 96-well plate เติม working reagent 200 µl ลงใน 96-well plate ทุกตำแหน่งวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรโดยวัดที่เวลา 0 นาที (OD0) และเวลา 5 นาที (OD5) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า serum creatinine concentration โดยใช้สูตร

$$\text{Creatinine concentration} = \frac{\text{OD}_{\text{sample5}} - \text{OD}_{\text{sample0}}}{\text{OD}_{\text{STD5}} - \text{OD}_{\text{STD0}}}$$

3.6.2 การทดสอบภาวะไตวายเรื้อรังด้วยระดับ serum urea

วัดระดับ serum urea ด้วย Urea assay kit [Quantichrom™ urea assay, BioAssay Systems, USA] เตรียมสารละลายมาตรฐาน urea ที่ 50, 40, 30, 20, 10, 5 mg/dl จากนั้นทำการเตรียม working reagent โดยเติม Reagent A 100 µl + Reagent B 100 µl เติมสารละลายมาตรฐาน urea ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ serum sample 5 µl ลงใน 96-well plate เติม working reagent 200 µl ลงใน 96-well plate ทุกตำแหน่งวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า serum urea concentration โดยใช้สูตร

$$\text{Urea concentration} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{STD}} - \text{OD}_{\text{blank}}}$$

3.6.3 การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp2* และ *cyp3a11* ในลำไส้เล็กหนูเมาส์

วิเคราะห์แสดงออกของยีน *mdr1a*, *mrp2*, *oatp3* และ *cyp3a11* โดยวิธี Quantitative real time RT-PCR และใช้ยีน *gapdh* เป็น internal control

ตารางที่ 4 แสดง gene expression assays

	Gene	Gene Expression assay
P-gp	<i>mdr1a</i>	Mm00440761_m1
MRP2	<i>mrp2</i>	Mm00496899_m1
OATP3	<i>oatp3</i>	Mm00453720_m1
CYP3A11	<i>cyp3a11</i>	Mm00731567_m1
GAPDH	<i>gapdh</i>	Mm99999915_g1

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

- Trizol reagent [Gibco, USA]
- Chloroform [Lab-scan, Thailand]
- 2-Propanol [Merk, Germany]
- Ethanol (EtOH) [Merk, Germany]
- DEPC-treated water [Ambion, USA]
- ImProm-ITM Reverse Transcription system [Promega, USA]
- TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® [Applied Biosystems, USA]
- TaqMan® Gene expression assay Master Mix [Applied Biosystems, USA]
- Volumetric flask
- Autopipets ขนาด 1 - 1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]

- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Homogenizer [IKA®, Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Nanodrop [Thermo, USA]
- Autoclave [Sanyo, Japan]
- StepOnePlus™ Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]
- PCR thermal cycler [Eppendorf, Germany]

มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) นำลำไส้เล็กส่วนต้น มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® reagent
- 2.) วัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
- 3.) นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยใช้ ImProm-ITM reverse transcription system
- 4.) นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีน mdr1a, mrp2, oatp3 และ CYP3A11 ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน mdr1a, mrp2, oatp3 และ CYP3A11 และใช้ยีน gapdh เป็น internal control

3.6.4 การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์

- การเตรียมไมโครโซมจากลำไส้เล็กหนูเมาส์ โดยทำการเตรียมไมโครโซมจากลำไส้เล็กของหนูเมาส์ โดยใช้วิธีมาตรฐาน

- 1.) นำลำไส้เล็ก ออกจาก freezer -80 °c
- 2.) ล้างด้วย 0.9% normal saline ล้างด้วย cool wash buffer โดยใช้ปีกเกอร์ขนาด 100 ml ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งตลอด และตัดตามยาวเพื่อเปิด luminal surface ขูดส่วนของ mucosa ใส่ลงใน borosilicate glass homogenization tube
- 3.) เติม homogenizing buffer และ homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer (voltage 120 V, Rate 1000-2000 rpm)

- 4.) นำ homogenate ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องที่ความเร็ว 9,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที
- 5.) นำ supernatant ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultra-centrifuge ที่ความเร็ว 95,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที
- 6.) นำตะกอน (pellet) ที่ได้มาเติม homogenizing buffer นำไป homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer (volt 120 V, Rate 1000-2000 rpm)
- 7.) เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์

- การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในไมโครโซม

โดยก่อนทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP3A จะต้องทราบปริมาณโปรตีนในไมโครโซม ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ Bio-Rad Dc Protein Assay เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในไมโครโซมจากลำไส้เล็กของหนูเมาส์ หลักการในการวิเคราะห์คือ เป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับสารละลาย alkaline copper tartrate และสาร forlin ทำให้เกิดสีน้ำเงิน โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 405-750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml ตามลำดับ
- 2.) เติมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ, สารละลายบัฟเฟอร์ PBS (blank) และ ตัวอย่างไมโครโซม ปริมาณ 5 μ l ลงในหลุมแต่ละหลุมของ 96 well plate
- 3.) เติมสาร reagent A ปริมาณ 25 μ l
- 4.) เติมสาร reagent B ปริมาณ 200 μ l
- 5.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 650 nm

- การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ โดยใช้ testosterone เป็นสับสเตรท

การศึกษาเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของ 6β -OH-TST ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา testosterone 6β -hydroxylation โดยเกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ CYP3A จากลำไส้เล็กหนูเมาส์ ในหลอดทดลอง และใช้ testosterone เป็นสับสเตรท ด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Wonganan และคณะ (Wonganan et al. 2011)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [Aldrich-Sigma, USA]
- Potassium chloride [Carlo Erba, France]
- TRIS base [Merk, Germany]
- Hydrochloric acid (HCL) [Merk, Germany]
- Sodium pyrophosphate [Aldrich-Sigma, USA]
- Glycerol [BDH Chemical Ltd., England]
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA]
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) [Carlo Erba, France]
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) [Merk, Germany]
- Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) [Merk, Germany]
- Phosphoric acid [Merk, Germany]
- Dichloromethane (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Methanol (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Testosterone [Tokyo chemical, Japan]
- 6beta-hydroxytestosterone (6β -OH-TST) [Cayman Chemical, USA]
- 11alpha-hydroxyprogesterone (11α -OH-PGT) [Tokyo chemical, Japan]
- Volumetric flask

- Cylinder ขนาด 5 – 1000 ml
- Autopipets ขนาด 2 - 5000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [Shimadzu]
- Symmetry C18 column 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm [Water, Japan]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Ultra-centrifuge [Beckman, USA]
- Reciprocal shaking water bath [Mettmert, Germany]
- Homogenizer [IKA®, Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Evaporator [Genevac, USA]

วิเคราะห์หา CYP3A enzyme-substrate activities ด้วยปฏิกิริยา testosterone hydroxylation และใช้ testosterone ที่ความเข้มข้น 243 μmol เป็นสับสเตรท มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) เตรียมสารผสมที่จะทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.2M ของ KPi pH 7.4 ปริมาตร 500 μl , regenerating system (ประกอบด้วย 5mM ของ NADP, 100mM ของ G6P, 100mM MgCl_2) ปริมาตร 150 μl , microsome ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1000 μg , 34.67 mM ของ testosterone ปริมาตร 10 μl และเติม water จนปริมาตรครบ 993 μl
- 2.) นำหลอดทดลองไปอุ่นใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C 5 นาที
- 3.) เติม 1 unit/ μl ของ G6PD ปริมาตร 7 μl จับเวลา 120 นาที
- 4.) เติม dichloromethane 5 ml ลงในหลอดทดลอง
- 5.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที
- 6.) เติม 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ 11 α -OH-PGT (internal standard) ปริมาตร 10 μl
- 7.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 8.) ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
- 9.) ละลายกลับด้วย methanol ปริมาตร 50 μl
- 10.) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μl

การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ : H₂O : Methanol (50:50)

คอลัมน์ : Symmetry C18 column, 3.5 μm, 4.6×100 mm

อัตราการไหล : 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : UV ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ปริมาตรฉีด : 10 ไมโครลิตร

อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส

- การศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

การศึกษานี้เริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของ 1'-OH-MDZ ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา midazolam 1'-hydroxylation โดยเกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ CYP3A จากลำไส้เล็กหนูเมาส์ในหลอดทดลองและใช้ midazolam เป็นสับสเตรท ด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jurica และคณะ (Jurica et al. 2007)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [Aldrich-Sigma, USA]
- Potassium chloride [Carlo Erba, France]
- TRIS base [Merk, Germany]
- Hydrochloric acid (HCL) [Merk, Germany]
- Sodium pyrophosphate [Aldrich-Sigma, USA]
- Glycerol [BDH Chemical Ltd., England]
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA]
- Magnesium chloride (MgCl₂) [Carlo Erba, France]
- Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) [Merk, Germany]
- Di-potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) [Merk, Germany]

- Phosphoric acid [Merk, Germany]
- 1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ) [Cerilliant, USA]
- Dichloromethane (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Methanol (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Acetonitrile (HPLC grade) [Lab-Scan, Thailand]
- Sodium acetate trihydrate [Merk, Germany]
- Diazepam [Cerilliant, USA]
- Midazolam [Cerilliant, USA]
- Volumetric flask
- Cylinder ขนาด 5 – 1000 ml
- Autopipets ขนาด 2 - 5000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [Shimadzu]
- Symmetry C18 column 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm [Water, Japan]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Ultra-centrifuge [Beckman, USA]
- Reciprocal shaking water bath [Mettmert, Germany]
- Homogenizer [IKA®, Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland] 4002157302
- Evaporator [Genevac, USA]

วิเคราะห์หา CYP3A enzyme-substrate activities ด้วยปฏิกิริยา Midazolam hydroxylation และใช้ midazolam ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) เตรียมสารผสมที่จะทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.2 M ของ KPi pH 7.4 ปริมาตร 500 μl , regenerating system (ประกอบด้วย 5mM ของ NADP, 100mM ของ G6P, 100mM MgCl_2) ปริมาตร 150 μl , microsome ที่มี

- 2.) ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1000 μg , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ midazolam ปริมาตร 10 μl และเติม water จนปริมาตรครบ 990 μl
- 3.) นำหลอดทดลองไปอุ่นใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที
- 4.) เติม 1 unit/ μl ของ G6PD ปริมาตร 10 μl จับเวลา 90 นาที
- 5.) เติม dichloromethane 5 ml ลงในหลอดทดลอง
- 6.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที
- 7.) เติม 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ DZP (internal standard) ปริมาตร 10 μl
- 8.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 9.) ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
- 10.) ละลายกลับด้วย mobile phase ปริมาตร 50 μl
- 11.) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μl

การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ : 10 mM Sodium acetate buffer (pH 4.7):Acetonitrile (55:45)

คอลัมน์ : Symmetry C18 column, 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm

อัตราการไหล : 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : UV ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

ปริมาตรฉีด : 50 ไมโครลิตร

อุณหภูมิคอลัมน์ : 25 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

แสดงผลข้อมูลเชิงพรรณนา (descriptive) ที่ได้จากการทดลองทั้งหมดเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm standard error of the mean) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง 2 กลุ่มด้วยวิธีทดสอบ unpaired Student's t test โดยใช้โปรแกรม Statistical Packages for the Social Science เวอร์ชัน 20 (SPSS version 20.0, SPSS Inc., USA) และพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติที่ p -value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$)

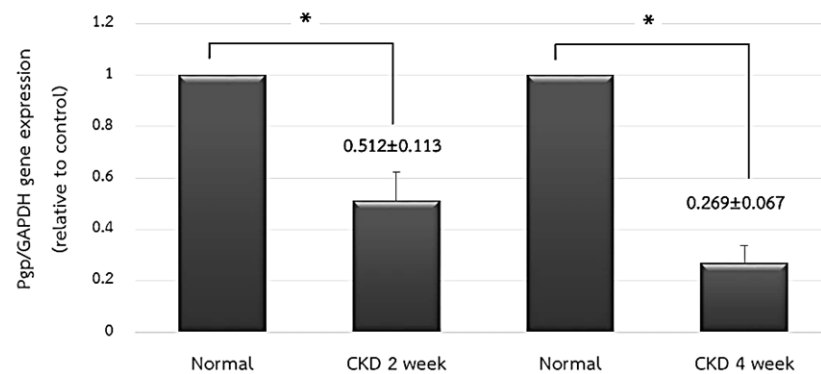
บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลค่าระดับ serum creatinine, serum urea และ น้ำหนักตัวหนูเมาส์ในกลุ่มที่เหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

จากการทดสอบชั่งน้ำหนักตัวของหนูเมาส์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์มีน้ำหนักตัวลดลง 10.83% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.01$) และพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์มีน้ำหนักตัวลดลง 11.97% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.01$)

จากการวัดระดับ serum creatinine ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ค่าระดับ serum creatinine เพิ่มขึ้น 151.78% และ 61.96% ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของระดับ serum creatinine นั้นมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.01$) ดังตารางที่ 5 ในหนูที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลาที่ 2 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ $0.78 \pm 0.02 \text{ mg/dL}$, กลุ่มปกติเท่ากับ $0.31 \pm 0.08 \text{ mg/dL}$ และ 4 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ $0.47 \pm 0.03 \text{ mg/dL}$, กลุ่มปกติเท่า $0.29 \pm 0.03 \text{ mg/dL}$ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่เกิดโรคไตวายเรื้อรัง 2 และ 4 สัปดาห์ ค่าระดับ serum creatinine แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยระดับ serum creatinine ปกติในหนูเมาส์มีค่าเท่ากับ $0.20 \pm 0.50 \text{ mg/dL}$ (Elbieta et al. 2009)

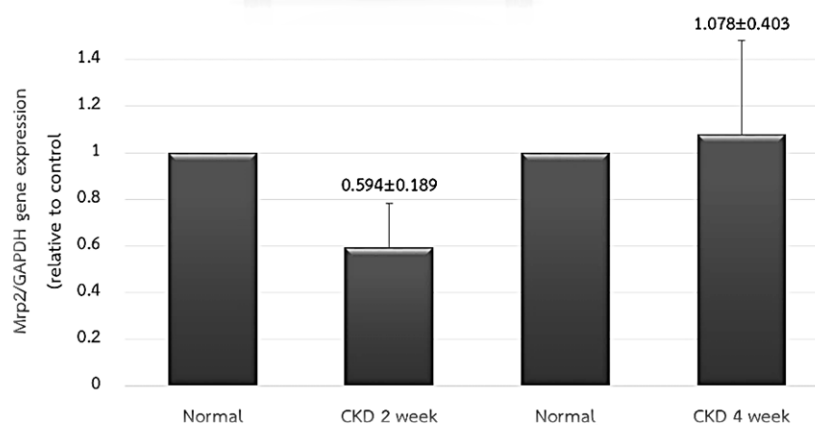
จากการวัดระดับ serum urea ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ค่าระดับ serum urea เพิ่มขึ้น 91.08% และ 76.77% ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของระดับ serum urea นั้นมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.01$) ดังตารางที่ 5 ในหนูที่ได้รับการเหนียวน้ำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลาที่ 2 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ $31.92 \pm 1.05 \text{ mg/dL}$, กลุ่มปกติเท่ากับ $16.70 \pm 1.02 \text{ mg/dL}$ และ 4 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ $45.57 \pm 3.12 \text{ mg/dL}$, กลุ่มปกติเท่า $25.77 \pm 1.02 \text{ mg/dL}$ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่เกิดโรคไตวายเรื้อรัง 2 และ 4 สัปดาห์ ค่าระดับ serum urea แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยระดับ serum urea ปกติในหนูเมาส์มีค่าไม่เกิน 30.00 mg/dL (Leelahavanichkul et al. 2010)



ภาพที่ 8 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a* ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR, * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

4.2.2 ผลการแสดงออกของ *mrp2* ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

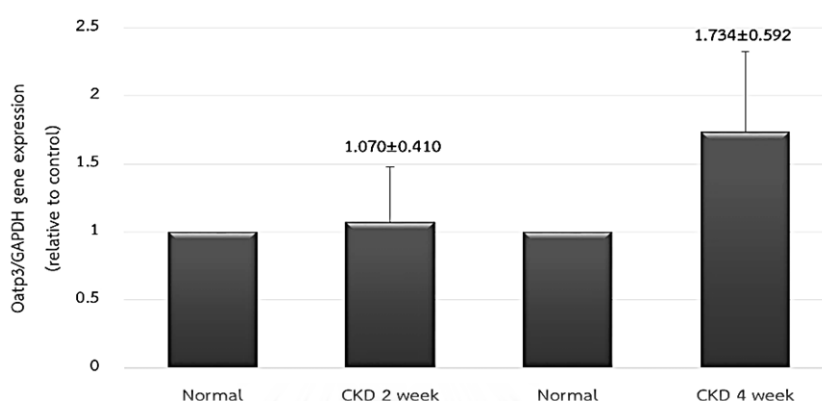
หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ การแสดงออกของยีน *mrp2* ไม่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p = 0.362$ และ $p = 0.892$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *mrp2* ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR

4.2.3 ผลการแสดงออกของ *oatp3* ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

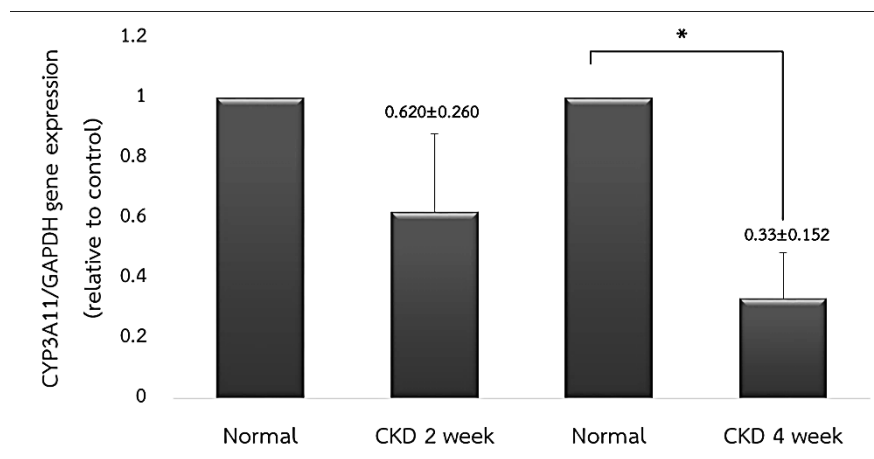
หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ การแสดงออกของยีน *oatp3* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p=0.890$ และ $p=0.380$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *oatp3* ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR

4.2.4 ผลการแสดงออกของยีน *cyp3a11* ในลำไส้เล็กหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

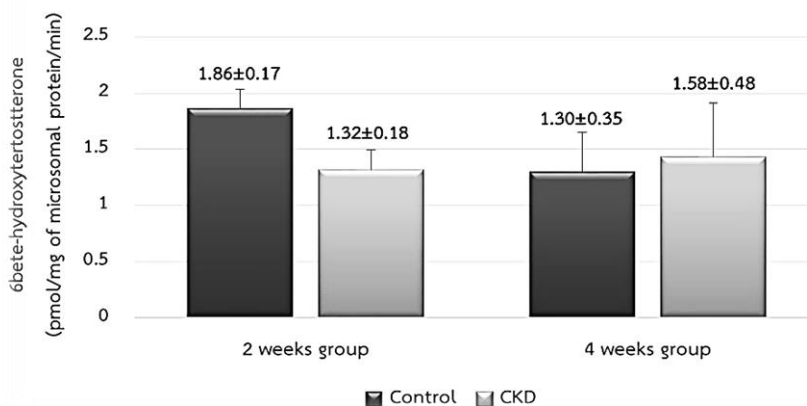
หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ มีการแสดงออกของยีน *cyp3a11* ดังภาพที่ 11 หนูกลุ่มเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ $p<0.05$



ภาพที่ 11 แสดงผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน cyp3a11 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR, * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

4.3 ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยใช้ testosterone เป็นสับสเตรท

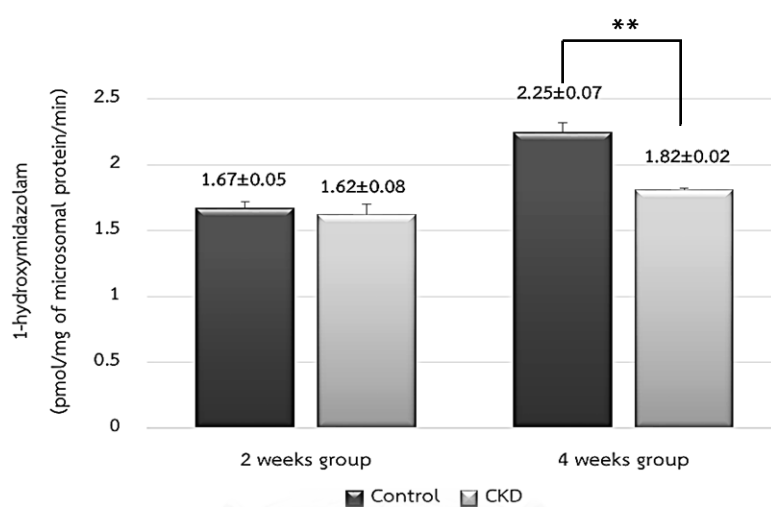
เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ testosterone เป็นสับสเตรท พบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มปกติ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นสับสเตรทด้วยเทคนิค HPLC

4.4 ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท พบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตวายเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ($p < 0.01$) ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam สับสเตรท ด้วยเทคนิค HPLC, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

โรคไตวายเรื้อรังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประชากรทั่วโลก และยังพบว่ามี ความชุกของโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้โรคไตวายเรื้อรังยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและการขจัดยา เช่นที่ลำไส้และตับ ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมักพบปัญหาทางคลินิกในด้านการใช้ยาที่มักได้ผลการรักษาไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง (Matthew A. et al, 2016)

โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า P-gp และ Mrp2 ซึ่งเป็น efflux transporters และ oatps ซึ่งเป็น influx transporters พบว่ามีความสำคัญอย่างมากในลำไส้เล็ก (Naud et al. 2007) นอกจากนี้ drug transporters แล้ว กระบวนการดูดซึมยาบริเวณทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นบริเวณที่ยาถูกดูดซึมมากที่สุดคือส่วนของลำไส้เล็ก และมีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงยา โดยเฉพาะ CYP3A เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ metabolism ของยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากยาประมาณร้อยละ 50 ของยาที่มีใช้ทางคลินิกมักถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ชนิดนี้ (Martignoni et al. 2006) โดยในลำไส้เล็กเอนไซม์ CYP3A ยังมีความเชื่อมโยงกันกับ drug transporters เนื่องจากการที่ยาหลายชนิดที่เป็นสารตั้งต้นมักเป็นยากลุ่มเดียวกัน (จุฬาวัดชนทล. 2546) การศึกษานี้จึงสนใจศึกษาผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อ drug transporters และเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็ก โดยเลือกศึกษาในหนูเมาส์และเหนี่ยวนำให้เกิดไตวายเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion

การศึกษาร่วมใหญ่ก่อนหน้านี้นิยมใช้หนูแรทเป็นโมเดลในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง ซึ่งในการศึกษานี้ใช้หนูเมาส์เป็นโมเดลในการศึกษาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion ในปัจจุบันการใช้หนูเมาส์เป็นโมเดลได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเนื่องจากสามารถสร้างหนูดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic mice) ได้ การใช้หนูเมาส์จึงได้รับความนิยมมากกว่าการใช้หนูแรทเป็นโมเดล (Wei and Dong 2012)

นอกจากนี้โมเดล chronic ischemic reperfusion นี้มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Naud และคณะ (Naud et al. 2007) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังในหนูแรทด้วยวิธี 5/6 nephrectomy โมเดลนี้ใช้วิธีการผูกหลอดเลือดแดงของไตข้างซ้ายแทนการตัดไตข้างซ้ายและระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังสั้นกว่า โมเดลนี้ใช้เวลา 2-4 สัปดาห์ แต่ Naud และ คณะ ใช้เวลา 5 สัปดาห์ วิธีการผูกหลอดเลือดแดงของไตข้างซ้ายทำให้เกิดความรุนแรงน้อยกว่า อัตราการรอดชีวิตสูงกว่า ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะทำการศึกษาวิจัยได้เป็นผลสำเร็จมากกว่า และการใช้หนูเมาส์น่าจะประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า

การทดสอบการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง โดยระดับ serum creatinine ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดไตวายเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีค่าเพิ่มขึ้น 151.78% และ 61.96% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ และระดับ serum urea ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำเกิดไตวายเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์เพิ่มขึ้น 91.08% และ 76.77% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ส่วนน้ำหนักของหนูที่เกิดโรคมียาค่าต่ำกว่าหนูปกติอย่างเห็นได้ชัด creatinine เป็นสารในร่างกายนที่สร้างจากกล้ามเนื้อ creatinine จะถูกกรองผ่าน glomerulus โดยไม่มีการดูดกลับอีก ในภาวะปกติการกำจัดและการสร้าง creatinine จะสมดุลกัน แต่ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังซึ่งมี GFR ลดลง จะมีการคั่งของ creatinine ส่วน urea จะเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของอาหารประเภทโปรตีน โดย urea จะถูกกรองและบางส่วนจะถูกดูดกลับ ดังนั้นเมื่อการทำงานของไตลดลงจะเกิดการคั่งของ urea ดังนั้นค่า serum creatinine และ serum urea ที่สูงขึ้นในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion เป็นการแสดงให้เห็นว่าหนูเกิดโรคไตวายเรื้อรังจริง

มีรายงานการเกิดโรคไตวายเรื้อรังต่อ liver drug transporters ในหนูแรท ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยวิธี 5/6 nephrectomy โดยศึกษาผลกระทบของโรคไตวายเรื้อรังต่อ liver drug transporters ทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน รวมทั้ง metabolic activity และผลของ serum ของหนูแรทต่อ drug transporters ในเซลล์ตับ พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของ mdr1a และ mrp2 เพิ่มขึ้น 40% และ 35% ตามลำดับ คล้ายกันกับผลของเซลล์ตับที่บ่ม serum ของหนูแรทที่เกิดโรคไตวายเรื้อรัง (Naud et al. 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังในหนูแรท พบว่ามีผลทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของยาลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A (Leblond et al. 2001) ในการศึกษาพบว่าหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน mdr1a ลดลง 48.80% และ 73.15% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม

ปกติ ($p < 0.05$) จากการทดลองพบว่าหนูในกลุ่ม 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน *mdr1a* ลดลงมากกว่าในกลุ่ม 2 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจมีความเชื่อมโยงกับผลของ serum urea ในกลุ่ม 4 สัปดาห์ที่มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่มีการทำงานของไตปกติและมีค่าสูงกว่าในหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของยีน *mrp2* และ *oatp3* ในหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังในหนูแรท ด้วยวิธี 5/6 nephrectomy พบว่าการแสดงออกของยีน *mrp2* และ *oatp3* ในลำไส้หนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมเช่นกัน (Naud et al. 2007)

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้อธิบายถึงกลไกที่เกิดขึ้นว่าเป็นผลมาจากการสะสมของ uremic serum (Guevin et al. 2002) เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสะสมของ uremic toxin สามารถยับยั้งและลดการแสดงออกของ drug metabolizing enzymes และ drug transporters (Reyes and Benet 2011, Tsujimoto et al. 2010) ตัวอย่างของ uremic toxin ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในโรคไตเช่น indoxyl sulfate และ p-cresylsulfate (Barreto et al. 2009, Liabeuf et al. 2010) โดย uremic toxin ไปกระตุ้น nuclear factor kappa B ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการหลั่ง inflammatory cytokine หลายชนิด เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin 1 (IL-1) เป็นต้น (Bolati D et al. 2013) อาจเป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน

เมื่อเปรียบเทียบผลของโรคไตเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน *cyp3a11* ระหว่างหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน *cyp3a11* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ สอดคล้องกับผลของ serum urea ในหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์ที่มีค่า serum urea สูงกว่าในหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ ซึ่งในหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์นั้นมีการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่นานกว่าและน่าจะเกิดโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการผูกหลอดเลือดแดง (renal artery) ที่ไตข้างซ้ายเป็นระยะเวลา 50 นาที ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงคล้ายกับกลุ่มอาการ ischemic nephropathy ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากการอุดตันของ renal artery ทำให้เลือดไปเลี้ยงไตลดลง

จากการศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่าเมื่อใช้ testosterone เป็นสับสเตรท ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้ของหนูกลุ่มที่เหนียวให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังที่ 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่เหนียวให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังมีการทำงานของ CYP3A ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรทพบว่าหนูกลุ่มที่เหนียวทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ลำไส้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกในระดับยีน กล่าวคือหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนียวทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ลำไส้ลดลงเมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่า midazolam สามารถจับกับเอนไซม์ CYP3A4 ได้ดีกว่า testosterone (Yuan et al. 2002) และจากการศึกษาของ Velenosi และคณะ จะเห็นได้ว่า testosterone เป็นสับสเตรททั้งของเอนไซม์ CYP3A และ CYP2C (Velenosi et al. 2012) ดังนั้นผลการทดลองของการทำงานของ CYP3A ที่แตกต่างกันระหว่างการให้ midazolam และ testosterone เป็นสับสเตรท อาจเป็นผลเนื่องมาจาก midazolam น่าจะเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CYP3A ที่จำเพาะเจาะจงและให้ผลที่แม่นยำกว่า testosterone นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพบว่าการแสดงออกและการทำงานของ CYP3A และ CYP2C ลดลงในเซลล์ตับของหนูแรทที่บ่มด้วยซีรัมของผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (End Stage Renal Disease (ESRD)) (Michaud et al. 2005) ข้อมูลนี้น่าจะเป็นประโยชน์สำหรับใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ต่อไป

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเกิดโรคไตวายเรื้อรังในหนูเมาส์ที่ถูกเหนียวทำให้เกิดโรคด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion มีผลต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a* ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์และยังมีผลต่อการแสดงออกของยีน *cyp3a11* และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็ก ผลการศึกษานี้อาจสามารถเชื่อมโยงได้ว่าอาจเกิดขึ้นทำนองเดียวกันในคน เพราะยีนที่เลือกศึกษาในหนูเมาส์นั้นเทียบเคียงกับยีนตัวสำคัญในคน จึงอาจกล่าวได้ว่าผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่มีการทำงานของไตเสื่อมลง ปกติจะสูญเสียหน้าที่ในการขจัดของเสียอยู่แล้ว ยังส่งผลให้ยาโดยเฉพาะยาที่ผ่าน first-pass metabolism ที่ลำไส้และตับมี oral bioavailability เพิ่มขึ้น (Yeung et al. 2014) ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาหรือ metabolite ในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดความเสี่ยงจากอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆจากยาในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังได้

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะโรคไตวายเรื้อรังส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *mdr1a* การแสดงออกของยีน *cyp3a11* และการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงผลของภาวะไตวายเรื้อรังต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CYP3A ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นที่ทำให้เกิดการสะสมของยาในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังและเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์และการปรับขนาดของยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CYP3A ให้เหมาะสมกับผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังต่อไป



รายการอ้างอิง



รายการอ้างอิง

- Bansal, T., et al. (2009). "Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy." J Pharm Pharm Sci 12(1): 46-78.
- Barreto, F. C., et al. (2009). "Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients." Clin J Am Soc Nephrol 4(10): 1551-1558.
- Bogaards, J. J., et al. (2000). "Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man." Xenobiotica 30(12): 1131-1152.
- Brunton L., et al. (2010). "Goodman and Gilman'Pharmacological Basis of Therapeutics." 12th Edition.
- Elbieta, W.-D., et al. (2009). "Selected blood serum biochemical indicators in twelve inbred strains of laboratory mice." Animal Science Papers and Reports 27(2): 159-167.
- Estudante, M., et al. (2013). "Intestinal drug transporters: an overview." Adv Drug Deliv Rev 65(10): 1340-1356.
- Gai, Z., et al. (2014). "Effect of chronic renal failure on the hepatic, intestinal, and renal expression of bile acid transporters." Am J Physiol Renal Physiol 306(1): F130-137.
- Gottesman, M. M., et al. (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." Nat Rev Cancer 2(1): 48-58.
- Guengerich, F. P. (2008). "Cytochrome p450 and chemical toxicology." Chem Res Toxicol 21(1): 70-83.

Guevin, C., et al. (2002). "Down-regulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure: role of uremic mediators." Br J Pharmacol 137(7): 1039-1046.

Huang, Z. H., et al. (2000). "Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure." Eur J Pharmacol 406(3): 453-460.

Ingsathit, A., et al. (2010). "Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the Thai adult population: Thai SEEK study." Nephrol Dial Transplant 25(5): 1567-1575.

Joy, M. S., et al. (2014). "In Vivo Alterations in Drug Metabolism and Transport Pathways in Patients with Chronic Kidney Diseases." Pharmacotherapy 34(2): 114-122.

Jurica, J., et al. (2007). "HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 852(1-2): 571-577.

Leblond, F., et al. (2001). "Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol 12(2): 326-332.

Leblond, F. A., et al. (2002). "Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol 13(6): 1579-1585.

Leelahavanichkul, A., et al. (2010). "Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model." Kidney Int 78(11): 1136-1153.

Lewis, D. F. and Y. Ito (2008). "Human cytochromes P450 in the metabolism of drugs: new molecular models of enzyme-substrate interactions." Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(9): 1181-1186.

Liabeuf, S., et al. (2010). "Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease." Nephrol Dial Transplant 25(4): 1183-1191.

Lin, J. H., et al. (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" Pharmacol Rev 51(2): 135-158.

Martignoni, M., et al. (2006). "Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine." Drug Metab Dispos 34(6): 1047-1054.

Matzke, G. R., et al. (2011). "Drug dosing consideration in patients with acute and chronic kidney disease-a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)." Kidney Int 80(11): 1122-1137.

Michaud, J., et al. (2005). "Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450." Br J Pharmacol 144(8): 1067-1077.

Murakami, T. and M. Takano (2008). "Intestinal efflux transporters and drug absorption." Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(7): 923-939.

Naud, J., et al. (2016). "Effects of Chronic Renal Failure on Brain Cytochrome P450 in Rats." Drug Metab Dispos 44(8): 1174-1179.

Naud, J., et al. (2011). "Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats." Drug Metab Dispos 39(8): 1363-1369.

Naud, J., et al. (2007). "Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats." J Pharmacol Exp Ther 320(3): 978-985.

Nies, A. T. and D. Keppler (2007). "The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2)." Pflugers Arch 453(5): 643-659.

Paine, M. F., et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos 34(5): 880-886.

Paine, M. F., et al. (1997). "Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism." J Pharmacol Exp Ther 283(3): 1552-1562.

Reyes, M. and L. Z. Benet (2011). "Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics." J Pharm Sci 100(9): 3831-3842.

Simard, E., et al. (2008). "Downregulation of Hepatic Acetylation of Drugs in Chronic Renal Failure." J Am Soc Nephrol 19(7): 1352-1359.

Skrzynyk, N. I., et al. (2013). "Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice." J Vis Exp(78).

Szakacs, G., et al. (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." Nat Rev Drug Discov 5(3): 219-234.

Takano, M., et al. (2006). "Expression and function of efflux drug transporters in the intestine." Pharmacology & Therapeutics 109(1-2): 137-161.

Takeuchi, T., et al. (2006). "Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1." Pharm Res 23(7): 1460-1472.

Tsujimoto, M., et al. (2010). "Inhibitory effects of uraemic toxins 3-indoxyl sulfate and p-cresol on losartan metabolism in vitro." J Pharm Pharmacol 62(1): 133-138.

Veau, C., et al. (2001). "Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion." Nephrol Dial Transplant 16(8): 1607-1614.

Velenosi, T. J., et al. (2012). "Down-regulation of hepatic CYP3A and CYP2C mediated metabolism in rats with moderate chronic kidney disease." Drug Metab Dispos 40(8): 1508-1514.

Wei, Q. and Z. Dong (2012). "Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks." American Journal of Physiology - Renal Physiology 303(11): F1487-F1494.

Wonganan, P., et al. (2011). "Species differences in the pharmacology and toxicology of PEGylated helper-dependent adenovirus." Mol Pharm 8(1): 78-92.

Yang, H. C., et al. (2010). "Models of chronic kidney disease." Drug Discov Today Dis Models 7(1-2): 13-19.

Yano, H., et al. (2014). "Uric acid transporter ABCG2 is increased in the intestine of the 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease." Clin Exp Nephrol 18(1): 50-55.

Yeung, C. K., et al. (2014). "Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport." Kidney Int 85(3): 522-528.

Yuan, R., et al. (2002). "Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions." Drug Metab Dispos 30(12): 1311-1319.

กันตชูเวสศิริ., ส. (2555). แนวทางการตรวจคัดกรองและดูแลรักษาภาวะแทรกซ้อนทางไตในผู้ป่วยเบาหวานและความดันโลหิตสูง, กรุงเทพมหานคร:สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

จุฬารัตนทล., ส. (2546). ก้าวหน้าของเภสัชกรในงานบริหารผู้ป่วยนอก, กรุงเทพมหานคร: สมาคมเภสัชกรรมโรงพยาบาล(ประเทศไทย).

ตั้งสง่า., เ. (2554). Textbook of nephrology, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัท เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น.





ภาคผนวก ก

ตารางที่ 6 แสดงค่า serum creatinine หนูเมาส์กลุ่ม 2 สัปดาห์

serum creatinine(mg/dL)							
	N1	N2	N3	N4	N5	Mean	SEM
Normal	0.05	0.19	0.47	0.38	0.44	0.31	0.08
CKD2wk	0.83	0.86	0.75	0.75	0.72	0.78	0.02

ตารางที่ 7 แสดงค่า serum creatinine หนูเมาส์กลุ่ม 4 สัปดาห์

serum creatinine(mg/dL)								
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Mean	SEM
Normal	0.15	0.25	0.39	0.36	0.30	0.29	0.29	0.03
CKD4wk	0.45	0.52	0.60	0.40	0.47	0.40	0.47	0.03

ตารางที่ 8 แสดงค่า serum urea หนูเมาส์กลุ่ม 2 สัปดาห์

serum urea(mg/dL)							
	N1	N2	N3	N4	N5	Mean	SEM
Normal	14.4	20.15	16.15	15.12	17.70	16.70	1.02
CKD2wk	33.78	33.18	31.40	33.23	28.03	31.92	1.05

ตารางที่ 9 แสดงค่า serum urea หนูเมาส์กลุ่ม 4 สัปดาห์

serum urea(mg/dL)								
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Mean	SEM
Normal	21.40	28.13	28.13	25.05	26.58	25.40	25.77	1.02
CKD4wk	47.30	51.23	50.83	49.30	43.83	30.95	45.57	3.12

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์และการเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 β -OH-TST (standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) ของ 6 β -OH-TST

เตรียม stock solution ของ 6 β -OH-TST ที่ความเข้มข้น 3,200 μ M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

(Molecular weight = 304.43 g/mol)

$$\text{จากสูตร} \quad N = g / MW = CV/1000$$

$$g / 304.43 = (3,000 \times 10^{-6} \text{ M}) (5 \text{ ml}) / 1000$$

$$1000 g = (3,200 \times 10^{-6} \text{ M}) (5 \text{ ml}) / 304.43$$

$$g = 0.00487$$

ดังนั้น ชั่ง 6 β -OH-TST หนัก 0.00487 กรัม เติม methanol จนปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้ 6 β -OH-TST ที่ความเข้มข้น 3,200 μ M

2.) การเตรียมสารละลายของ 6 β -OH-TST เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ ความเข้มข้นละ 10 μ l เติมลงในสารละลายหรือในไมโครโซม ที่มีปริมาตรรวม 50 μ l จะได้สารละลายหรือไมโครโซมที่มี 6 β -OH-TST ความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μ M ตามลำดับ

2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 μ M จาก 400 μ M (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก} \quad C1V1 = C2V2$$

$$(400 \mu\text{M}) V1 = (200 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l})$$

$$V1 = 200 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 400 μ M 6 β -OH-TST 200 μ l และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 μ l จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 200 μ M

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 μM จาก 200 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(200 \mu\text{M}) V_1 = (100 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 200 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 100 μM

2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 μM จาก 100 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(100 \mu\text{M}) V_1 = (50 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 100 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 50 μM

2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 25 μM จาก 50 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(50 \mu\text{M}) V_1 = (25 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 50 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 25 μM

2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 12.5 μM จาก 25 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(25 \mu\text{M}) V_1 = (12.5 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 25 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 12.5 μM

2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6.25 μM จาก 12.5 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(12.5 \mu\text{M}) V_1 = (6.25 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 12.5 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 6.25 μM

2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3.125 μM จาก 6.25 μM (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(6.25 \mu\text{M}) V_1 = (3.125 \mu\text{M}) (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 50 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 6.25 μM 6 β -OH-TST 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 50 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 3.125 μM

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ของ 11 α -OH-PGT เพื่อใช้เป็น internal standard

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ 11 α -OH-PGT ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 10 ml

คำนวณ เมื่อ 1 ml ของสารละลาย มีสาร 11 α -OH-PGT 100 μg

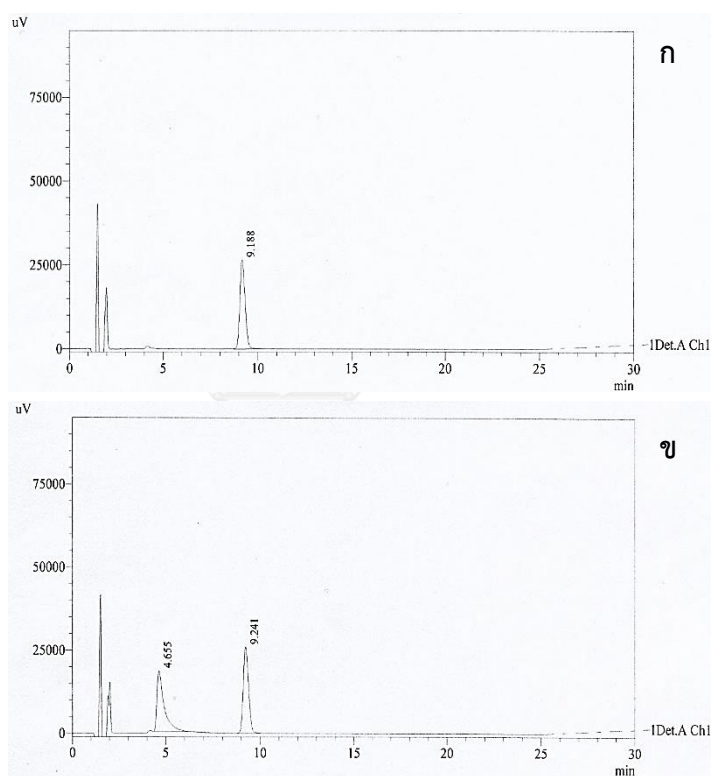
ถ้า 10 ml ของสารละลาย มีสาร 11 α -OH-PGT 1 mg

ดังนั้น ชั่ง 11 α -OH-PGT หนัก 1 mg เติม methanol จนปริมาตรครบ 10 ml ใน volumetric flask จะได้ 11 α -OH-PGT ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$

ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม ซึ่งพบว่าค่า retention time ของ 6 β -OH-TST อยู่ระหว่าง 6.3 ± 0.5 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ของ 6 β -OH-TST และโครมาโตแกรมของ 6 β -OH-TST แยกออกจากโครมาโตแกรมของ 11 α -OH-PGT ที่ใช้เป็น ซึ่งมีค่า retention time อยู่ระหว่าง 12.0 ± 0.5 นาที ทั้งนี้โครมาโตแกรมทั้งสองไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ๆ ในไมโครโซมเมื่อเทียบกับ blank



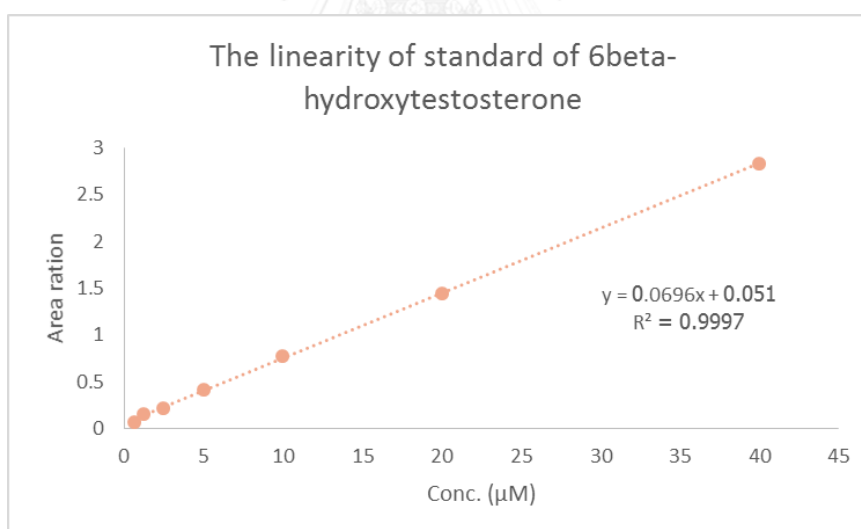
ภาพที่ 14 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ
(ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 6 β -OH-TST และ internal standard

การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.625 μ M โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 0.013% (n=3) และค่า %DEV เท่ากับ 0.023% (n=3) ซึ่งจากผลที่ได้พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %RSD และค่า %DEV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง และความถูกต้องเชื่อถือได้

ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve)

กราฟมาตรฐานของ 6 β -OH-TST มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.625-40 μ M โดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST และได้ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 และมากกว่า 0.99 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และค่าความเข้มข้นที่วัดได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นไม่เบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่เติมลงไปเกิน 15%



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของ 6 β -OH-TST

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 6 β -OH-TST แสดงด้วยค่า %DEV ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน พบว่าค่า %DEV ของ 6 β -OH-TST ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.90%, 1.40%, 0.72% ตามลำดับ จากผลดังกล่าวพบว่า ค่า %DEV ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มี ความถูกต้องเชื่อถือได้

ตารางที่ 10 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6 β -OH-TST

6 β -OH-TST concentration (μ M)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	1	2	3	Average		
Low (2 μ M)	2.00	2.03	2.09	2.04	1.90	2.23
Medium (15 μ M)	15.26	15.26	15.11	15.21	1.40	0.60
High (30 μ M)	30.15	30.45	30.04	30.21	0.72	0.72

ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ 6 β -OH-TST แสดงด้วยค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intra-day precision) พบว่ามีค่า %RSD ของ 6 β -OH-TST ทั้ง 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 2.23%, 0.60% และ 0.72% ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD มีค่าไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มี ความเที่ยงตรง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1'-OH-MDZ (standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.) การเตรียมสารละลายของ 1'-OH-MDZ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ ความเข้มข้นละ 10 µl เติมลงในสารละลายหรือในไมโครโซม ที่มีปริมาตรรวม 50 µl จะได้สารละลายหรือไมโครโซมที่มี 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml ตามลำดับ

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 µg/ml จาก 1000 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ µg/ml}) V_1 = (50 \text{ µg/ml}) (400 \text{ µl})$$

$$V_1 = 20 \text{ µl}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1000 µg/ml 1'-OH-MDZ 20 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 380 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 µg/ml จาก 50 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(50 \text{ µg/ml}) V_1 = (40 \text{ µg/ml}) (400 \text{ µl})$$

$$V_1 = 320 \text{ µl}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 50 µg/ml 1'-OH-MDZ 320 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 60 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 40 µg/ml

2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 30 µg/ml จาก 40 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(40 \text{ µg/ml}) V_1 = (30 \text{ µg/ml}) (400 \text{ µl})$$

$$V_1 = 300 \text{ µl}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 40 µg/ml 1'-OH-MDZ 300 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 100 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 30 µg/ml

2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 µg/ml จาก 30 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(30 \mu\text{g/ml}) V_1 = (20 \mu\text{g/ml}) (360 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 240 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 30 µg/ml 1'-OH-MDZ 240 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 120 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 20 µg/ml

2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 20 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(20 \mu\text{g/ml}) V_1 = (10 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 200 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 20 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 10 µg/ml

2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 5 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10 \mu\text{g/ml}) V_1 = (5 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 200 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 10 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 5 µg/ml

2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2.5 µg/ml จาก 5 µg/ml (stock solution)

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(5 \mu\text{g/ml}) V_1 = (2.5 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 200 \mu\text{l}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 5 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 2.5 µg/ml

เตรียมสารละลายของ DZP ที่ความเข้มข้น 80 µg/ml จาก 1,000 µg/ml ปริมาตร 1 ml

$$\text{คำนวณจาก } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1,000 \text{ µg/ml}) V_1 = (80 \text{ µg/ml}) (1,000 \text{ µl})$$

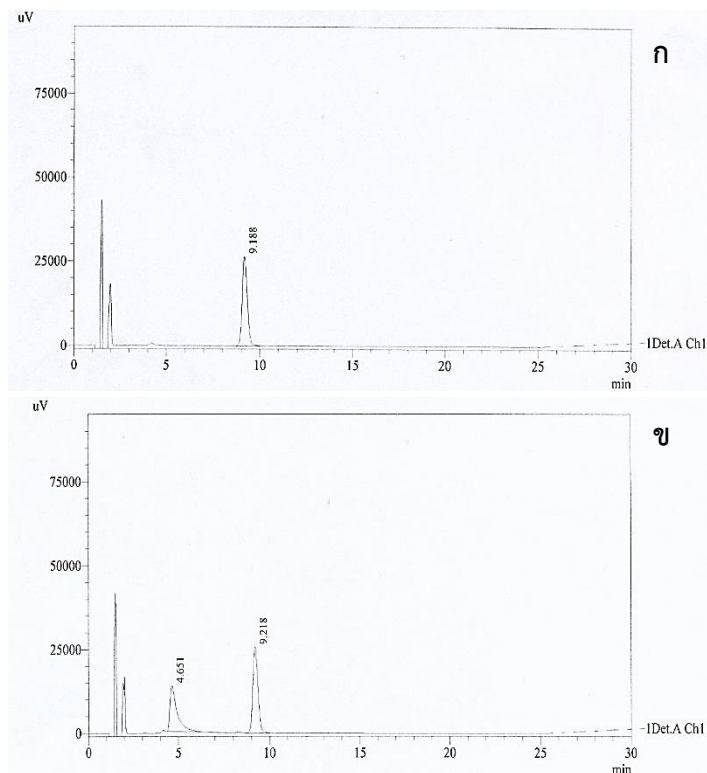
$$V_1 = 80 \text{ µl}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1,000 µg/ml DZP 80 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 1,000 µl จะได้ DZP ที่มีความเข้มข้น 80 µg/ml

ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม ซึ่งพบว่าค่า retention time ของ 1'-OH-MDZ อยู่ระหว่าง 4.6 ± 0.5 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ของ 1'-OH-MDZ และโครมาโตแกรมของ 1'-OH-MDZ แยกออกจากโครมาโตแกรมของ DZP ที่ใช้เป็น ซึ่งมีค่า retention time อยู่ระหว่าง 9.1 ± 0.5 นาที ทั้งนี้โครมาโตแกรมทั้งสองไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่นๆ ในไม่โครโซมเมื่อเทียบกับ blank



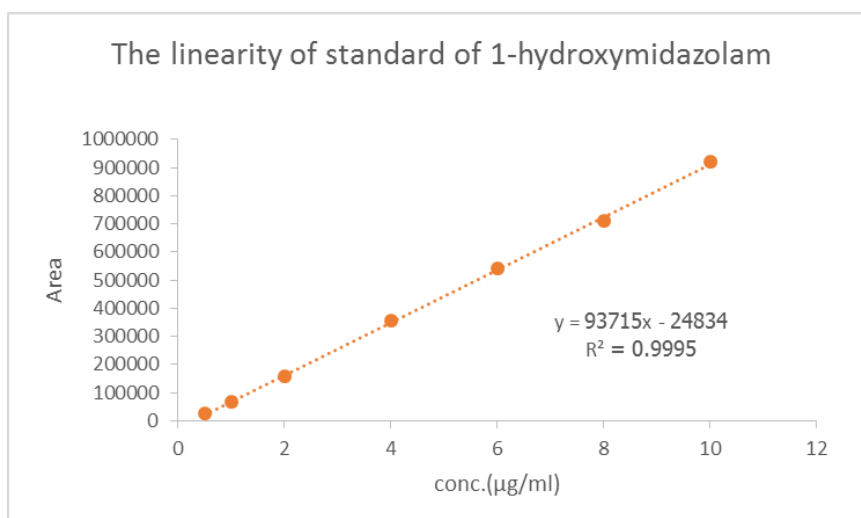
ภาพที่ 16 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ
(ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 1'-OH-MDZ และ internal standard

การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.333% ($n=3$) และค่า %DEV เท่ากับ 4.163% ($n=3$) ซึ่งจากผลที่ได้พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %RSD และค่า %DEV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง และความถูกต้องเชื่อถือได้

ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve)

กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 μM โดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ และได้ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9995 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 และมากกว่า 0.99 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และค่าความเข้มข้นที่วัดได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นไม่เบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่เติมลงไปเกิน 15%



ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ แสดงด้วยค่า %DEV ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน พบว่าค่า %DEV ของ 1'-OH-MDZ ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -4.50%, 3.80%, 3.30% ตามลำดับ จากผลดังกล่าวพบว่า ค่า %DEV ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องเชื่อถือได้

ตารางที่ 11 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ

1'-OH-MDZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	1	2	3	Average		
Low (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	1.45	1.47	1.49	1.47	-4.50	3.00
Medium (5 $\mu\text{g/ml}$)	5.24	5.20	5.13	5.19	3.80	1.11
High (9 $\mu\text{g/ml}$)	9.24	9.08	9.50	9.27	3.04	2.36

ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ แสดงด้วยค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intra-day precision) พบว่ามีค่า %RSD ของ 1'-OH-MDZ ทั้ง 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 3.00%, 1.11% 2.37% ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD มีค่าไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงตรง

ภาคผนวก ข



เลขที่ใบรับรอง 9/2559

เลขที่โครงการวิจัย 004/2558

คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อ drug transporters และเอนไซม์ CYP3A ในลำไส้เล็กหนู mouse

(ภาษาอังกฤษ) Effects of chronic kidney disease on intestinal drug transporters and CYP3A
in a mouse model

ผู้เสนอโครงการใช้สัตว์ทดลอง รองศาสตราจารย์ สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามที่ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

ลงนาม.....

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่รับรอง : พฤษภาคม พ.ศ.2559

วันหมดอายุ : พฤษภาคม พ.ศ.2560

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาววรัมพร สุขคำมี

ปัจจุบันเป็นนิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2555

การฝึกอบรม

- 27-28 มีนาคม พ.ศ. 2557 "Advanced Pharmacology Drug Development Toward The ASEAN Union", The pharmacology and Therapeutic Society of Thailand, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Thailand

- 18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 "Good Clinical Practice for Biomedical Research (GCP Training)", Mahicol University, Thailand

การตีพิมพ์เผยแพร่

- 1-3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 " Effects of Chronic Kidney Disease on Intestinal Drug Transporters in a Mouse Model ", Proceedings of the 13 th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting.

