

การทำงานของไซโตโครม พี450 2อี1 ในผู้ป่วยโรคไขมันในตับ
ที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์



นางสาวนันทพร พรหมพิลา

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคำหลักสูตรปริชญ์อุยวทยาสาสตรมหาบัณเฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

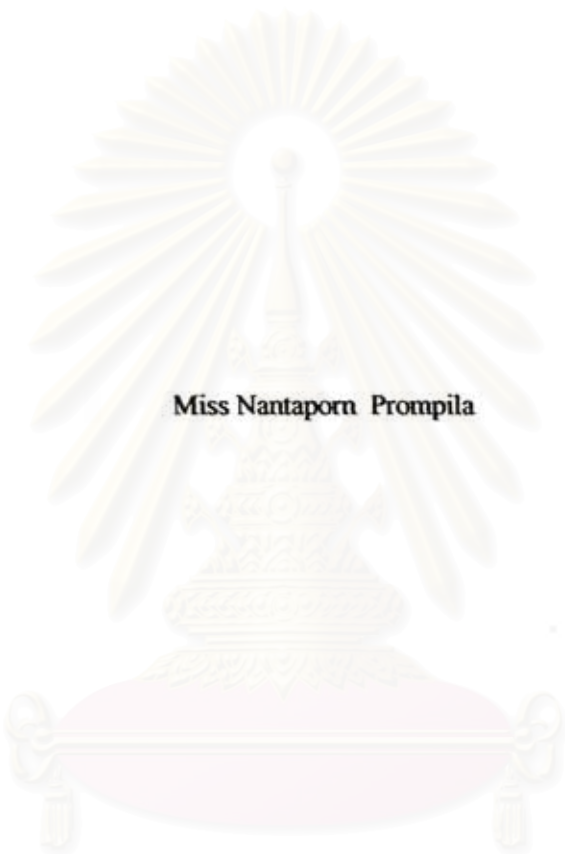
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2287-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**HEPATIC CYTOCHROME P450 2E1 ACTIVITY IN
NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE**



Miss Nantaporn Prompila

สถาบันวิทยบริการ

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology**

(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2287-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การทำงานของไซโตโครม พี450 2อี1 ในผู้ป่วยโรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์

โดย

นางสาว นันทพร พรหมพิลา

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา


อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ สุพิชา วิทยเลิศปัญญา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โภมลมิศร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

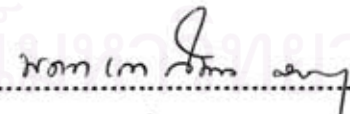

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว. กัลยา ดิงศักดิ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพิชรา ศรีไชยรัตน์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สุพิชา วิทยเลิศปัญญา)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โภมลมิศร์)


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


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์)

นันทพร พรหมพิลา : การทำงานของไซโตโครม พี450 2อี1 ในผู้ป่วยโรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ (HEPATIC CYTOCHROME P450 2E1 ACTIVITY IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.สุพิชา วิทยเลิศปัญญา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นพ.ปิยะวัฒน์ โกลมณิศรี, 83 หน้า. ISBN 974-14-2287-3

โรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ (NAFLD) เป็นโรคที่พบได้มากในปัจจุบัน แต่พยาธิกำเนิดที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด หนึ่งในสมมติฐานการกำเนิดโรคเชื่อว่ามาจากการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเกิดการอักเสบของตับ chlorzoxazone (CHZ) ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ที่ตับไปเป็น 6-hydroxychlorzoxazone (6-OH-CHZ) และได้รับการยอมรับให้เป็น probe drug ในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับคน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับของผู้ป่วย NAFLD โดยใช้อัตราส่วนของ 6-OH-CHZ / CHZ เป็นตัวชี้วัด โดยให้กลุ่มคนสุขภาพดี (จำนวน 10 คน) แต่ละคนรับประทาน CHZ ปริมาณ 400 มิลลิกรัม เก็บตัวอย่างเลือดก่อนและหลังรับประทานยาที่เวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6 และ 8 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ด้วยวิธี HPLC พบว่าที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยามีระดับความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในเลือดสูง ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยา พบว่าอัตราส่วนของ 6-OH-CHZ / CHZ ในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพดี โดยที่เวลา 2.5 ชั่วโมงค่าอัตราส่วนดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD สูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีมากที่สุด คือ 0.40 ± 0.27 และ 0.24 ± 0.11 ตามลำดับ ($P = 0.10$)

แม้จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ของอัตราส่วน 6-OH-CHZ / CHZ ในระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD การศึกษานี้ก็แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ของการเพิ่มขึ้นของการทำงานของ CYP2E1 ในตับผู้ป่วย NAFLD โดยอัตราส่วน 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 2.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยา อาจจะเป็นดัชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในผู้ป่วย NAFLD ที่ดีที่สุด

สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิติศ.....ศ.นันทพร พรหมพิลา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4589096620 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORDS : NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE / CYTOCHROME P450 2E1 / CHLORZOAZONE

NANTAPORN PROMPILA : HEPATIC CYTOCHROME P450 2E1 ACTIVITY IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPEECHA WITTAYALERTPANYA, THESIS COADVISOR : PIYAWAT KOMOLMIT, M.D., Ph.D., 83 pp. ISBN : 974-14-2287-3.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a worldwide phenomenon spanning all the continents. The pathogenesis of NAFLD has not been completely elucidated. One hypothesis is that hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) plays an important role in increasing of lipid peroxidation and oxidative stress in NAFLD. Chlorzoxazone (CHZ) can be used as a probe of CYP2E1 activity in humans. It is mainly metabolized by CYP2E1 to 6-hydroxychlorzoxazone (6-OH-CHZ) as a major metabolite. The aim of this study was to examine hepatic CYP2E1 activity in NAFLD, as assessed by using the 6-OH-CHZ / CHZ concentration ratio. Healthy volunteers (n=10) received 400 mg dose of CHZ orally and serial plasma samples were collected at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6 and 8 h to measure CHZ and 6-OH-CHZ concentrations by using high-performance liquid chromatography. High concentration levels of CHZ and 6-OH-CHZ were found between 1.5 to 3 h. Patients with NAFLD were administered CHZ and plasma samples were collected at 0, 1.5, 2, 2.5 and 3 h. The ratio of 6-OH-CHZ / CHZ at 2.5 h was probably greater in patients with NAFLD compared with healthy volunteers (0.40 ± 0.27 vs. 0.24 ± 0.11 $\mu\text{g/ml}$, respectively, $P = 0.10$). Although the difference of the ratio of 6-OH-CHZ/CHZ between the two groups was not statistically significant, the data demonstrated an increasing possibility of hepatic CYP2E1 activity in patients with NAFLD. The 6-OH-CHZ/CHZ concentration ratio at 2.5 h after CHZ administration may be used as an index for measuring hepatic CYP2E1 activity in patients with NAFLD.

Student's signature..... Nantaporn Prompila
.....
.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุพิชา วิทลเศษปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้อย่างยิ่ง ตลอดจนช่วยกรุณาคัดเลือกกลุ่มผู้ปวยเข้าร่วมงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณเมตตา เขียวแสวง คุณวัลยา ตั้งจิตตประสาทสีล และคุณนงนุช ถาวร ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครตลอดโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ คุณวันดี เข็มศรี ที่ให้ความช่วยเหลือจัดหาอาสาสมัครสุขภาพดีและช่วยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครอีกท่านหนึ่งด้วย

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่กรุณาเป็นอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัยครั้งนี้ และให้ความร่วมมือในการทำงานเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณผู้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วย ทุนบัณฑิตวิทยาลัย และทุนอุดหนุนจาก นพ.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจในการศึกษากับผู้วิจัยเป็นอย่างดีเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
คำอธิบายลักษณะและคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
2. วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินการวิจัย	
วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	21
การหาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ.....	23
การศึกษาเพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์.....	25
การศึกษาในอาสาสมัคร.....	27
การรวบรวมข้อมูล.....	29
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	30
3. ผลการทดลอง	
การศึกษาเพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์.....	31
ผลการศึกษาในอาสาสมัคร.....	38
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	50
รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดง substrate ของ CYP2E1.....	4
2. แสดงสารที่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำและยับยั้งการทำงานของ CYP2E1.....	5
3. แสดงร้อยละของความชุกของ NAFLD จากการวินิจฉัยด้วยวิธีต่างๆ.....	7
4. แสดงร้อยละความชุกของภาวะต่างๆ ที่พบในผู้ป่วย NAFLD.....	8
5. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD.....	8
6. แสดงการแบ่งระดับความรุนแรงตามลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD.....	9
7. แสดงปัจจัยต่างๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิด NAFLD.....	10
8. แสดงลักษณะทางคลินิกของ NAFLD.....	14
9. แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ เมื่อทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน.....	32
10. แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ เมื่อทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน.....	32
11. แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ เมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน.....	33
12. แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ เมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน.....	33
13. แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ CHZ.....	34
14. แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ.....	34
15. แสดง %recovery ของการสกัด CHZ.....	35
16. แสดง %recovery ของการสกัด 6-OH-CHZ.....	35
17. แสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD.....	39
18. แสดงค่าชีวเคมีของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD.....	40
19. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ที่เวลา 0 ถึง 8 ชั่วโมงของกลุ่มคนสุขภาพดี.....	42
20. แสดงค่าเภสัชจลนศาสตร์ของกลุ่มคนสุขภาพดี.....	44
21. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ที่เวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมงของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD.....	45
22. แสดงการเปรียบเทียบค่า C_{max} และ T_{max} ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD.....	47
23. แสดงการเปรียบเทียบค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ระหว่างกลุ่ม คนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD.....	48
24. แสดงลักษณะทั่วไปและค่าชีวเคมีของคนสุขภาพดีแต่ละราย.....	68
25. แสดงลักษณะทั่วไปและค่าชีวเคมีของผู้ป่วย NAFLD แต่ละราย.....	69

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดงสัดส่วนของ CYP แต่ละ isoform ในตับของคน.....	3
2. แสดงบทบาทของ CYP2E1 กับความเป็นพิษต่อตับ.....	6
3. แสดงพยาธิกำเนิดของ steatosis.....	12
4. แสดงพยาธิกำเนิดของ NAFLD.....	13
5. แสดงสูตร โครงสร้างของ CHZ.....	17
6. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ CHZ.....	18
7. แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ.....	37
8. แสดงกราฟมาตรฐานของ CHZ.....	38
9. แสดงกราฟมาตรฐานของ 6-OH-CHZ.....	38
10. แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดี.....	43
11. แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD.....	46
12. แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่ม ผู้ป่วย NAFLD.....	49
13. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 1.....	70
14. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 2.....	70
15. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 3.....	71
16. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 4.....	71
17. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 5.....	72
18. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 6.....	72
19. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 7.....	73
20. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 8.....	73
21. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 9.....	74
22. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของคนสุขภาพดีคนที่ 10.....	74
23. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 1.....	75
24. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 2.....	75
25. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 3.....	76

สารบัญรูปลภาพ (ต่อ)

28. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 6.....	77
29. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 7.....	78
30. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 8.....	78
31. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 9.....	79
32. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 10.....	79
33. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 11.....	80
34. แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 12.....	80



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALT	=	alanine aminotransferase
AST	=	aspartate aminotransferase
AUC	=	area under the curve
BMI	=	body mass index
CHZ	=	chlorzoxazone
Cl	=	clearance
R ²	=	coefficient of determination
CYP	=	cytochrome P450
CYP1A1	=	cytochrome P450 1A1
CYP1A2	=	cytochrome P450 1A2
CYP3A	=	cytochrome P450 3A
CYP4A	=	cytochrome P450 4A
CYP2E1	=	cytochrome P450 2E1
FBS	=	fasting blood sugar
FFA	=	free fatty acid
GGT	=	gamma-glutamyltransferase
t _{1/2}	=	half-life
HSC	=	hepatic stellate cells
HPLC	=	high performance liquid chromatography
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
6-OH-CHZ	=	6-hydroxychlorzoxazone
*OH	=	hydroxy radical
C _{max}	=	maximum concentration
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
MTP	=	microsomal triglyceride transfer protein
ml	=	millilitre
NAC	=	N-acetylcysteine

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

NASH	=	nonalcoholic steatohepatitis
PUFAs	=	polyunsaturated fatty acids
ROS	=	reactive oxygen species
RSD	=	relative standard deviation
SD	=	standard deviation
SEM	=	standard error of mean
SRS-A	=	slow-reacting substance of anaphylaxis
$O_2^{\bullet-}$	=	superoxide anion radical
UDCA	=	ursodeoxycholic acid
VLDL	=	very-low density lipoproteins
Vd	=	volume of distribution



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ



ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

โรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) เป็นโรคทางพยาธิวิทยาคลินิก ประกอบไปด้วยหลายระยะของโรคตั้งแต่ steatosis จนถึง nonalcoholic steatohepatitis (NASH) และอาจจะพัฒนาไปเป็น fibrosis, cirrhosis และ end-stage liver disease มีลักษณะทางพยาธิวิทยาคล้ายคลึงกับโรคตับที่มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ แต่ NAFLD เป็นโรคที่พบในผู้ป่วยที่ไม่ได้บริโภคแอลกอฮอล์ในปริมาณมากจนเป็นอันตรายต่อตับ

พยาธิกำเนิดของโรคที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเกิด steatosis และการเปลี่ยนแปลงจาก steatosis ไปเป็น steatohepatitis ตลอดจนระยะอื่นๆ ของโรค แต่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยด้วยกันทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ในปี ค.ศ. 1998 ได้มีสมมติฐานอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของ NAFLD เรียกว่า “two-hit” โดย first hit กล่าวถึงการเกิด steatosis ว่าเป็นผลมาจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน เนื่องจากทำให้มีกรดไขมันอิสระเข้าสู่ตับเพิ่มมากขึ้น แต่มีโครกลีเซอไรด์จำนวนน้อยที่ถูกกำจัดออกไป จึงเกิดเป็นโครกลีเซอไรด์สะสมอยู่ภายในตับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงจาก steatosis ไปสู่ steatohepatitis นั้น second hit อธิบายว่าเป็นเพราะ oxidative stress เนื่องจากกรดไขมันอิสระเป็นตัวกระตุ้น cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot OH$) และ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$) ซึ่งเป็นสารก่อการออกซิเดชัน (oxidative substances) ออกมา และเมื่อกรดไขมันอิสระเข้าสู่ตับจะเกิดการออกซิเดชันที่ไม่ได้ออกซิเดชัน จากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิด ROS เช่นกัน เมื่อมีสารก่อการออกซิเดชันจำนวนมากจึงเกิด oxidative stress ขึ้น และเป็นสาเหตุของการเกิด lipid peroxidation กระตุ้นให้เกิด hepatic stellate cells, hepatocyte death, hepatocellular injury และ fibrosis

สาเหตุการเกิดภาวะ oxidative stress ใน steatohepatitis ประกอบไปด้วย ROS จากไมโทคอนเดรีย เอนไซม์ CYP (CYP2E1 และ CYP4A) และ hepatic iron แต่ CYP2E1 เป็นแหล่งสำคัญหลักของการก่อให้เกิด oxidative stress และมีการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนของ CYP2E1 เพิ่มขึ้นในตับหนูขาวที่มีภาวะ steatohepatitis และผู้ป่วย NASH จึงเป็นการสนับสนุนแนวคิดที่ว่า CYP2E1 มีบทบาทในพยาธิกำเนิดของ NAFLD

การวัดการทำงานของ CYP2E1 ในตับสามารถทำได้โดยการวัดอัตราเร็วของการเปลี่ยนแปลงสารที่เป็น substrate ของเอนไซม์ ปัจจุบัน chlorzoxazone (CHZ) ซึ่งเป็นยาใช้คลายกล้ามเนื้อ ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ก่อนข้างมีความปลอดภัย ผลข้างเคียงที่มีคือ วิงเวียน คลื่นไส้ ง่วงซึม ปากแห้ง ได้รับการยอมรับว่ามีความจำเพาะเจาะจงและสามารถใช้เป็น probe drug ศึกษาการทำงานของ CYP2E1 ในตับคนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ CHZ วัดการทำงานของ CYP2E1 ในตับของกลุ่มคนที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD โดยวัดระดับ CHZ และ 6-hydroxychlorzoxazone (6-OH-CHZ) ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์หลักที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วย CYP2E1 ในตับจากพลาสมาของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาหาวิธีการตรวจวัดระดับ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD
2. ศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับของคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD โดยใช้อัตราส่วนของ 6-OH-CHZ / CHZ เป็นดัชนีชี้วัด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับของคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร
2. ได้ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของ CHZ ในคนไทยที่มีสุขภาพดี

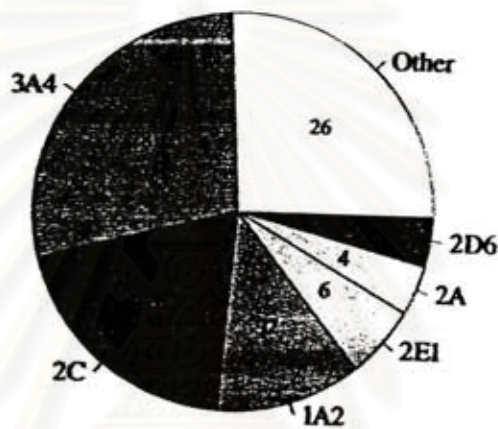
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Nonalcoholic fatty liver disease
- Cytochrome P450 2E1
- Chlorzoxazone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Cytochrome P450 (CYP) เป็น superfamily ของ haemoproteins(1) มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารหลายชนิดทั้งยา สารก่อมะเร็ง สารต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม และสารภายในร่างกาย เช่น steroids และ fatty acids แต่ละ isoform ของ CYP มีบทบาทและการทำงานที่แตกต่างกันออกไป รวมทั้งความจำเพาะเจาะจงคือ substrate(2) อวัยวะของคนที่พบ CYP มากที่สุดคือตับ(3) ซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ(4) โดยมีสัดส่วนของแต่ละ isoform ของ CYP ในตับที่แตกต่างกันออกไป ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงสัดส่วนของ CYP แต่ละ isoform ในตับของคน(4)

CYP2E1 คือหนึ่งในหลายๆ isoform ของ CYP ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 6 ของ CYP ทั้งหมดในตับ(4,5) นอกจากตับแล้วยังสามารถพบ CYP2E1 ที่อื่นๆ ด้วย เช่น เนื้อเยื่อคิ้ว ขนัยเนื้อเยื่อไขมัน ไต ปอด และสมอง(6-8) CYP2E1 มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารภายในตับ โดย substrate ของ CYP2E1 มีมากมายหลายชนิดหลายประเภท เช่น ยา คิวทำละลาย สารระเหย และสารก่อมะเร็ง(8) ดังตารางที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดง substrates ของ CYP2E1(9)

Substrates	Products measured
Aromatic compounds	
- Pyridine	- Pyridine N-oxide
- <i>p</i> -nitrophenol	- 4-nitrocatechol
- Benzene	- Phenol
- Phenol	- Hydroquinone ; catechol
- Acetaminophen	- Glutathione conjugates
- Pyrazole	- 4-hydroxypyrazole
- Chlorzoxazone	- 6-hydroxychlorzoxazone
- Styrene	- Glutathione conjugate
- Aniline	- <i>p</i> -aminophenol
Halogenated alkanes and alkenes	
- Chloroform	- Glutathione conjugate
- Chloromethane	- Formaldehyde
- Dichloromethane	- Glutathione conjugate
- 1,2-dichloropropane	- Glutathione conjugate
- 1,1,1-trichloroethane	- 1,1,1-trichloro-2-hydroxyethane
- Trichloroethylene	- Chloral
- Ethylene dibromide	- 1, <i>N</i> -ethenoadenosine
- Ethylene dichloride	- 1, <i>N</i> -ethenoadenosine
- Vinyl chloride	- 1, <i>N</i> -ethenoadenosine
- Vinyl bromide	- 1, <i>N</i> -ethenoadenosine
- Enflurane	- Fluoride
- Haloethane	- Trifluoroacetic acid
- 1,1,1,2-tetrafluoroethane	- Fluoride
Alcohols / Ketones / Nitriles	
- Ethanol	- Acetaldehyde
- Propanol	- Propionaldehyde
- Isopropanol	- Acetone
- Butanol	- Butyraldehyde
- Glycerol	- Formaldehyde
- Acetone	- Acetol
- Acetonitrile (+ catalase)	- Cyanide

ตารางที่ 1 แสดง substrates ของ CYP2E1(9) (ต่อ)

Substrates	Products measured
Nitrosamines / Azocompounds	
- <i>N,N</i> -dimethylnitrosamine	- Formaldehyde / nitrite
- Azoxymethane	- Azoxymethanol
- <i>N</i> -nitrosopyrrolidine	- 4-hydroxybutyraldehyde
Ethers	
- Diethyl ether	- Acetaldehyde
- Methyl <i>t</i> -butyl ether	- Formaldehyde / <i>t</i> -butanol
Reductive substrates	
- Carbon tetrachloride	- Lipid peroxidation / chloroform
- Chromium	- Product not measured
- Oxygen	- Superoxide / peroxide / water

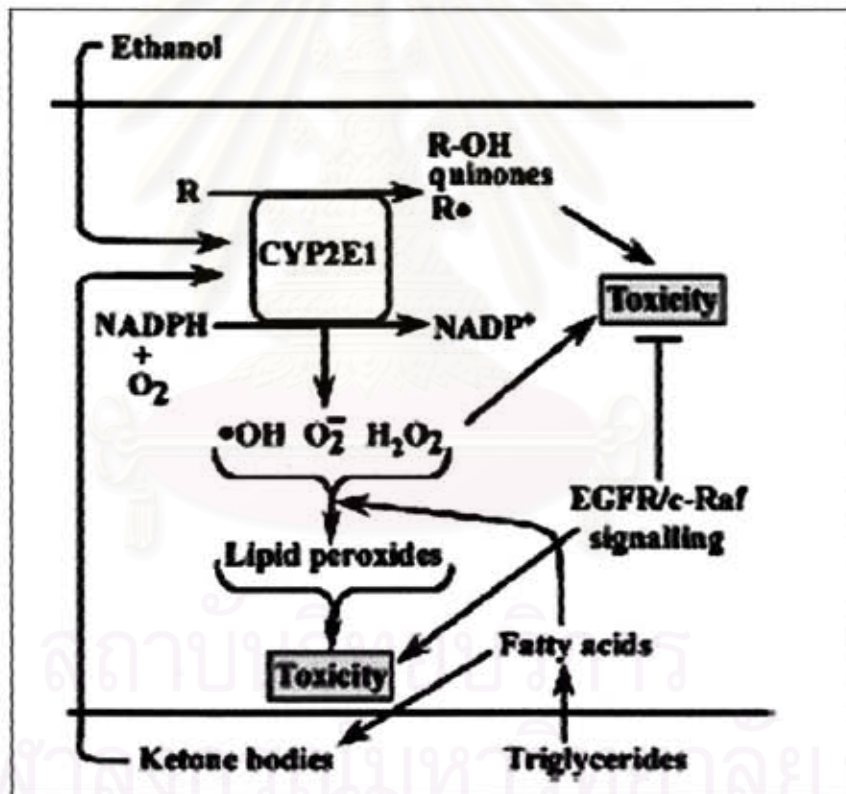
ปัจจัยที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการทำงานของ CYP2E1 มีทั้งปัจจัยภายในและภายนอกในร่างกาย โดยปัจจัยภายใน เช่น ความอ้วน โรคเบาหวาน การขาดอาหาร การตัดต่อมไธมัส(10) ภายนอกได้แก่ ยาและสารเคมีในกลุ่มต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลไฮดรอกไซด์ คีโตน อัลคีน และอีเทอร์ ดังตารางที่ 2 สำหรับปัจจัยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้แก่ ยาและสารเคมีต่างๆ เช่นกัน(5) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงสารที่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำและยับยั้งการทำงานของ CYP2E1(5)

สารเหนี่ยวนำ	Ethanol, Isopropanol, Isopentanol, Acetone, β -hydroxybutyrate, Ether, Trichloroethylene, Pyridine, Myristicin, Isoniazid, Pyrazole, Cigarette smoke, 4-methylpyrazole, Acetylsalicylic acid, Clofibrate, Dexamethasone, Sulfur- and nitrogen-containing heterocycles, Xylene, Toluene, Benzene,
สารยับยั้ง	3-amino-1,2,4-triazole, Carbon tetrachloride, Disulfiram and metabolites (carbon disulfide, Diethyldithiocarbamate), Diallylsulfide and metabolites (Diallylsulfoxide, Diallylsulfone), Capsaicin, Halothane, Phenethyl isothiocyanate, <i>In vivo</i> inhibitors : 2-(Allythio)pyrazine, Chlormethiazole, Malotilate and analog YH439, 4-methylpyrazole and pyrazole

บทบาทของ CYP2E1 กับการเกิดพิษต่อตับ

ในวงจรของการเปลี่ยนแปลง CYP ต้องใช้ H^+ จาก NADPH เพื่อรีดิวซ์ O_2 ทำให้เกิด hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot OH$) และ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$) หรือที่รวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นสารก่อการออกซิเดชัน (oxidative substances) ทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรีย การเปลี่ยนแปลงของ DNA เกิด lipid peroxidation เพิ่มการหลั่ง cytokine หรือทำปฏิกิริยากับ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ซึ่งจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และในกระบวนการเปลี่ยนแปลง substrate ของ CYP2E1 สามารถก่อให้เกิดเมแทบอไลต์ที่มีคุณสมบัติเป็น electrophilic แล้วทำปฏิกิริยากับสาร โมเลกุลใหญ่ในเซลล์เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนั้นกรดไขมันซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็น ketone bodies ยังมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ CYP2E1 ทำให้มีผลผลิตประเภท ROS เพิ่มขึ้น(11) ดังรูปที่ 2



R = substrates

EGFR = epidermal growth factor receptor

รูปที่ 2 แสดงบทบาทของ CYP2E1 กับการเกิดพิษต่อตับ(11)

โรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์

โรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) เป็นโรคทางพยาธิวิทยาคลินิก ประกอบไปด้วยหลายระยะของโรคตั้งแต่ steatosis จนถึง nonalcoholic steatohepatitis (NASH) และอาจจะรุนแรงขึ้นจนเป็น fibrosis, cirrhosis และ end-stage liver disease ในผู้ป่วยบางราย(12-16)

ผู้ป่วย NAFLD มีกระจายอยู่ทั่วไปในโลก แต่ความชุกที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากผู้ป่วยไม่มีการแสดงอาการของโรค ไม่ได้คัดขึ้นเนื้อมาตรวจวินิจฉัย(17) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบผู้ป่วย NAFLD ส่วนใหญ่เป็นหญิง (ร้อยละ 60) โดยพบมากที่สุดในช่วงอายุ 40 – 60 ปี แต่จากข้อมูลปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าความชุกของโรคพบในผู้ชายมีเท่ากับกับผู้หญิง การประเมินปริมาณความชุกของ NAFLD แตกต่างกันไปในแต่ละรายงาน โดยรวมแล้วจะอยู่ในช่วงร้อยละ 4 – 60 ซึ่งช่วงความชุกที่กว้างนี้เนื่องจากความแตกต่างของวิธีที่ใช้ตรวจสอบและลักษณะของประชากรที่ศึกษา บางรายงานจัด NAFLD คือผู้ป่วยที่มี steatosis แต่บางรายงานจัดว่าผู้ป่วย NAFLD จะต้อง มี steatohepatitis(18) การประเมินความชุกของ NAFLD ด้วยวิธีการต่างๆ แสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของความชุกของ NAFLD จากกรวินิจฉัยด้วยวิธีต่างๆ(13)

วิธีการ	NAFLD	NASH
LFTs (NHANES)	28	-
Liver biopsy	15 – 39	1 – 32
Autopsy	16 – 24	2.1 2.4
Ultrasound	16 – 23	-
Computed tomography	9.7	-

LFTs , Liver function test

NHANES , National health and nutrition examination survey

ภาวะที่เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับ NAFLD คือ ความอ้วน โรคเบาหวาน ระดับไขมันในเลือดสูง เนื่องจากการพบว่าปริมาณความชุกของ NAFLD เพิ่มขึ้นในผู้ที่มีภาวะเหล่านี้ร่วมอยู่ด้วย(18) ดังตารางที่ 4 ในเด็กพบว่าร้อยละ 2.6 ของเด็กที่มีน้ำหนักตัวปกติเป็น NAFLD และความชุกของโรคเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 22.5 – 52.8 ในเด็กที่มีภาวะอ้วน(19-21)

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละความชุกของภาวะต่างๆ ที่พบในผู้ป่วย NAFLD(18)

ความผิดปกติ	ความชุกในผู้ป่วย NAFLD
ความอ้วน	30 – 98
ระดับไขมันในเลือดสูง	21 – 60
ระดับ serum iron เพิ่มขึ้น	58
โรคเบาหวาน	21 - 33

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD มีความคล้ายคลึงกับ alcoholic hepatitis มากจนไม่สามารถแยกแยะได้(20) โดยลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD(22)

ลักษณะที่พบมากที่สุด	<ul style="list-style-type: none"> - Macrovesicular steatosis - Parenchymal inflammation - Hepatocyte necrosis - Ballooning hepatocyte degeneration
ลักษณะอื่นๆ	<ul style="list-style-type: none"> - Perivenular, perisinusoidal or periportal fibrosis - Mallory bodies - Glycogenated nuclei - Councilman bodies - Lipogranulomas - Stainable hepatic iron

ผู้ป่วยแต่ละรายจะมีลักษณะทางพยาธิวิทยาเหล่านี้เพียงแบบเดียว หรือพบร่วมกันหลายแบบขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ได้มีการแบ่งระดับความรุนแรงของ steatosis, steatohepatitis และ fibrosis ตามลักษณะทางพยาธิวิทยา(20) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการแบ่งระดับความรุนแรงตามของลักษณะทางพยาธิวิทยาของ NAFLD(20)

<p>Grading สำหรับ steatosis</p> <p>Grade 1 : < 33% ของ hepatocyte affected</p> <p>Grade 2 : 33% ของ hepatocyte affected</p> <p>Grade 3 : > 66% ของ hepatocyte affected</p>
<p>Grading สำหรับ steatohepatitis</p> <p>Grade 1, mild</p> <p>Steatosis: predominantly macrovesicular, involves up to 66% of lobules</p> <p>Ballooning : occasionally observed; zone 3 hepatocytes</p> <p>Lobular inflammation : scattered and mild acute inflammation (polymorphonuclear cells) and occasional chronic inflammation (mononuclear cells)</p> <p>Portal inflammation : none or mild</p> <p>Grade 2, moderate</p> <p>Steatosis : any degree; usually mixed macrovesicular and microvesicular</p> <p>Ballooning : obvious and present in zone 3</p> <p>Lobular inflammation : polymorphonuclear cells may be noted in association with ballooned hepatocytes; pericellular fibrosis; mild chronic inflammation may be seen</p> <p>Portal inflammation : mild to moderate</p> <p>Grade 3, severe</p> <p>Steatosis : typically involves > 66% of lobules (panacinar); commonly mixed steatosis</p> <p>Ballooning : predominantly zone 3; marked</p> <p>Lobular inflammation : scattered acute and chronic inflammation; polymorphonuclear cells may be concentrated in zone 3 areas of ballooning and perisinusoidal fibrosis</p> <p>Portal inflammation : mild to moderate</p>
<p>Staging สำหรับ fibrosis</p> <p>Stage 1 : zone 3 perivenular, perisinusoidal, or pericellular fibrosis; focal or extensive</p> <p>Stage 2 : as above, with focal or extensive periportal fibrosis</p> <p>Stage 3 : bridging fibrosis, focal extensive</p> <p>Stage 4 : cirrhosis</p>

พยาธิกำเนิดของโรค

สาเหตุและกลไกของการเกิดโรคที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่นอน เพราะยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิด steatosis และการเปลี่ยนแปลงไปเป็น steatohepatitis ตลอดจนระยะอื่นๆ ของโรค แต่เชื่อว่ามี ความเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยด้วยกัน รวมทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม(23) โดยปัจจัยต่างๆ ที่เชื่อว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด NAFLD แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงปัจจัยต่างๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิด NAFLD(23)

Cause	Associations	Steatosis type
Primary	Metabolic syndrome	Macrovesicular
Secondary		
Nutritional	Total parental nutrition, rapid weight loss, starvation, intestinal bypass surgery	Macrovesicular
Drug	Glucocorticoids, estrogens, tamoxifen, methotrexate, zidovudine	Macrovesicular
	Amiodarone, ASA, intravenous tetracycline, didanosine, cocaine, perhexilene, hyperzitamiosis A, diltiazem	Microvesicular
Toxins	Toxic mushrooms (<i>Amanita phalloides</i> , <i>lepioda</i>)	Macrovesicular
	Petrochemicals, phosphorus, <i>Bacillus cereus</i> toxin	Microvesicular
Metabolic	Lipodystrophy, dysbetalipoproteinemia, Weber-Christian disease, Wolman's disease	Macrovesicular
	Acute fatty liver of pregnancy, Reye's syndrome	Microvesicular
Other	Inflammatory bowel disease, HIV infection, small-bowel diverticulosis with bacterial overgrowth	Macrovesicular

ปัจจุบันมีหลายสมมติฐานที่ถูกเสนอขึ้นเพื่ออธิบายถึงสาเหตุและกลไกของการเกิดโรค ซึ่งหนึ่งในนั้นคือสมมติฐานที่เรียกว่า “two-hit” โดยแบ่งออกเป็น

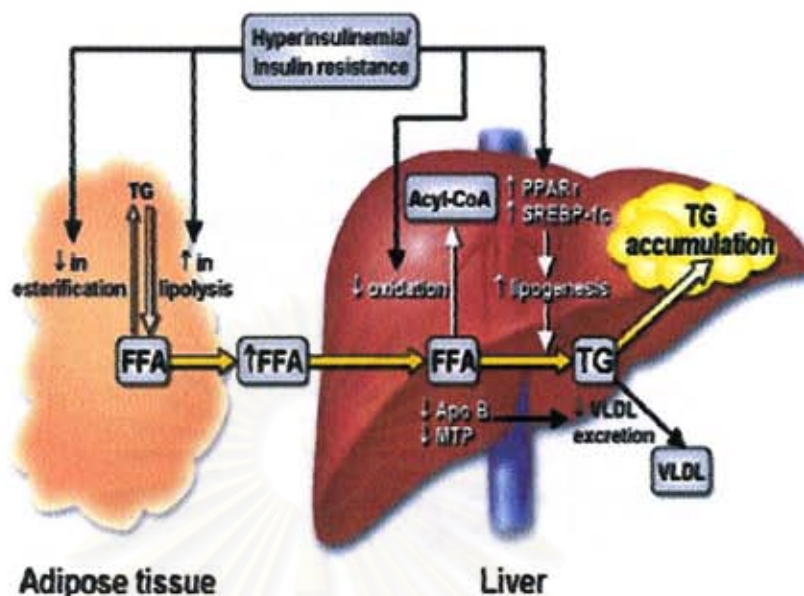
- first hit : อธิบายถึงสาเหตุและกลไกการเกิด steatosis
- second hit : กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงจาก steatosis ไปสู่ steatohepatitis(12)

First hit

ภาวะคือคออินซูลินซึ่งพบได้ในคนที่เป็โรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคอ้วน ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดการสะสมของไขมันในตับ (steatosis) ในภาวะของคนปกติเมื่อร่างกายได้รับสารอาหารประเภทไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ (free fatty acids : FFA) ส่งเข้าสู่ตับ จากนั้นจะถูกเก็บอยู่ในเซลล์ไขมัน (adipose tissue) ในรูปของไตรกลีเซอไรด์อีกครั้ง หรือใช้เป็นแหล่งพลังงานของกล้ามเนื้อ และในระหว่างเวลาที่ไม่ได้รับอาหาร ไตรกลีเซอไรด์ที่เก็บอยู่ในเซลล์ไขมันก็จะถูก hydrolyze เป็นกรดไขมันอิสระแล้วส่งเข้าสู่ตับ(15,22) ซึ่งภายในตับกรดไขมันอิสระจะถูกออกซิไดซ์โดยไมโทคอนเดรีย(15,22-24) หรือใช้ในการสังเคราะห์เป็นไตรกลีเซอไรด์หรือถูกใช้ไปในรูปของ phospholipids และ cholesterol esters การสะสมของไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งไตรกลีเซอไรด์ในตับเกิดขึ้นเมื่อมีกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน (lipogenesis) มากกว่ากระบวนการสลายไขมัน (lipolysis) ซึ่งเกิดจากมีกรดไขมันอิสระจำนวนมากเข้าสู่ตับ และมากเกินกว่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยไมโทคอนเดรีย การสังเคราะห์ของ phospholipids และ cholesterol esters ได้(15,22)

ผู้ที่มภาวะคือคออินซูลินจะมีระดับอินซูลินเพิ่มมากขึ้น(18) ซึ่งจะส่งผลต่อการสลายไขมันและเกิดภาวะอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia) โดยภาวะคือคออินซูลินจะเพิ่มการสลายไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ไขมัน ทำให้มีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นและเข้าสู่ตับมากขึ้น และยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระโดยไมโทคอนเดรียภายในตับ แต่เพิ่มการสร้างไตรกลีเซอไรด์จากกรดไขมันอิสระทำให้เกิดไตรกลีเซอไรด์มากขึ้น อีกทั้งยังลดการทำงานของ microsomal triglyceride transfer protein (MTP) และการสร้าง apolipoprotein B (apoB) ซึ่งใช้ในการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปที่จะถูกขับออกจากตับได้นั้นคือ very-low density lipoproteins (VLDL) จึงเกิดเป็นการสะสมของไตรกลีเซอไรด์อยู่ภายในตับ ดังรูปที่ 3 ดังนั้นภาวะคือคออินซูลินจึงน่าจะเป็นกลไกสำคัญต่อการเกิด NAFLD(15,27)

ทฤษฎีนี้ได้รับการสนับสนุนจากหลายการศึกษาซึ่งพบว่าผู้ป่วย NAFLD จำนวนมากจะมีภาวะคือคออินซูลิน และความคิดปกติของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารภายในร่างกายร่วมอยู่ด้วย แม้ผู้ป่วยเหล่านั้นจะไม่ใช่โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือโรคอ้วนก็ตาม(28)

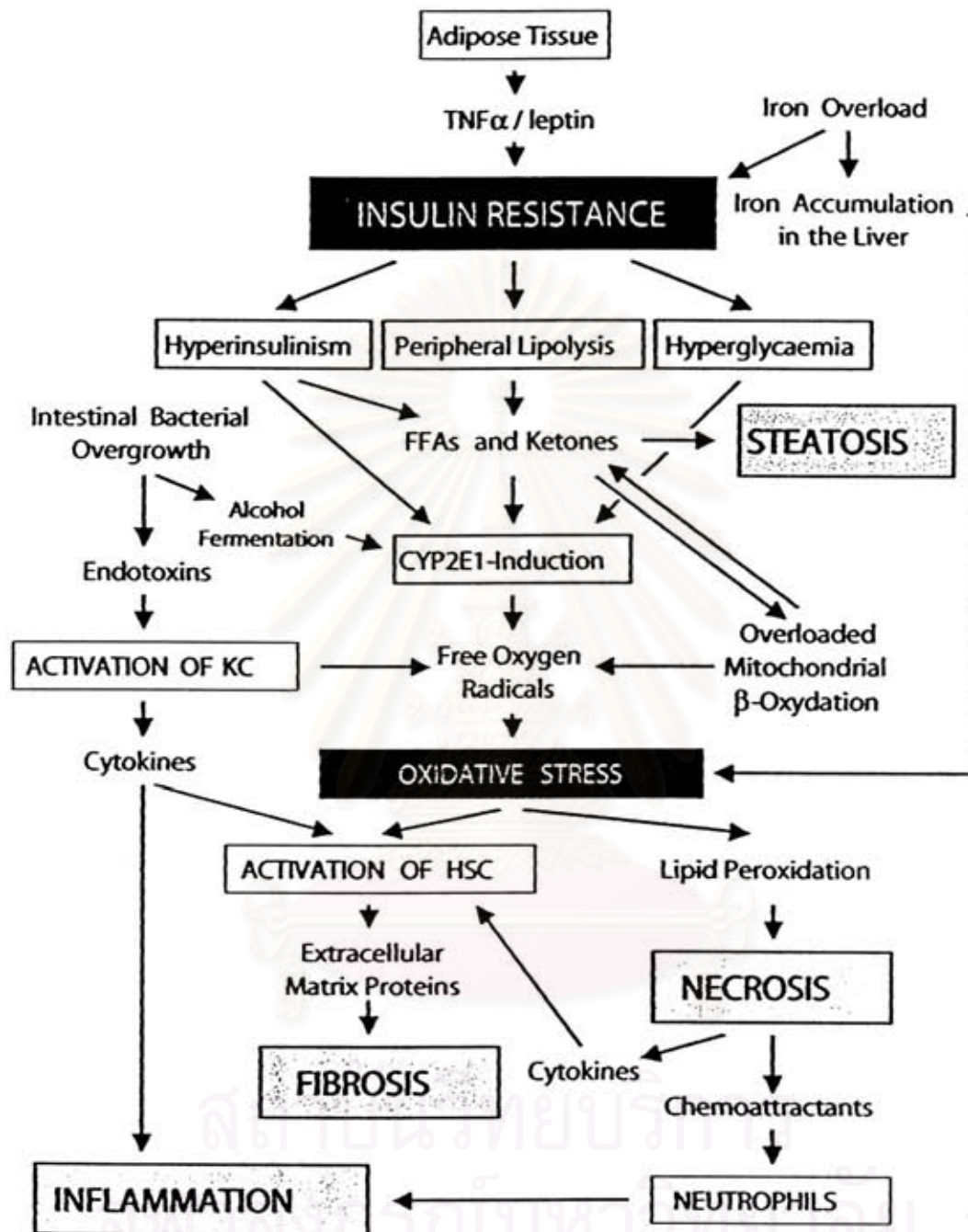


รูปที่ 3 แสดงพยาธิกำเนิดของ steatosis(27)

Secondary hit

การเปลี่ยนแปลงจาก steatosis ไปสู่ steatohepatitis เชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกับ oxidative stress และ lipid peroxidation เนื่องจากเมื่อกรดไขมันอิสระเข้าสู่ตับจะเกิดการออกซิเดชันที่ไม่ดีคอนเดย์ ซึ่งจากปฏิกิริยานี้จะมีการปล่อย reactive oxygen species (ROS) ออกมา(15) และกรดไขมันอิสระก็มีผลกระตุ้น CYP2E1(12) จากบทบาทของ CYP2E1 ต่อการเกิดพิษต่อตับข้างต้นและพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคตับเนื่องจากแอลกอฮอล์ทำให้ทราบว่า CYP2E1 ก่อให้เกิด H_2O_2 , $\cdot OH$ และ $O_2^{\cdot -}$ และมีส่วนในปฏิกิริยา microsomal $\omega-1$ และ $\omega-2$ ของกรดไขมันอิสระ(25,29) ดังนั้นเมื่อมีกรดไขมันอิสระเข้าสู่ตับเพิ่มมากขึ้นก็จะทำให้เกิดการออกซิเดชันในไมโทคอนเดรียมากขึ้นและเพิ่มการทำงานของ CYP2E1(17) ทำให้มีสารก่อออกซิเดชันเกิดขึ้นมากเกินกว่ากระบวนการต้านการออกซิเดชัน (antioxidant) ในตับจะจัดการได้จึงเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะไปกระตุ้น hepatic stellate cells (HSC), hepatocyte death, hepatocellular injury และ fibrosis นอกจากนี้ oxidative stress ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิด lipid peroxidation(28) ซึ่งมีส่วนในการกระตุ้นการหลั่ง inflammatory mediators ต่างๆ เช่น $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$ และ IL-8 มีผลทำให้เกิด neutrophil infiltration, fibrosis, Mallory bodies และ hepatocyte death(12)

ผังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงพยาธิกำเนิดของ NAFLD(29)

จากรูปที่ 4 สาเหตุการเกิดภาวะ oxidative stress ใน steatohepatitis จึงประกอบด้วย ROS, เอนไซม์ CYP (CYP2E1 และ CYP4A) และ hepatic iron(28) แต่ CYP2E1 จัดเป็นแหล่งสำคัญหลักของการเกิด oxidative stress(30) และจากการศึกษาของ Videla และคณะพบว่า NAFLD มีความสัมพันธ์กับการเสียกระบวนการด้านการออกซิเดชัน ซึ่งมีความรุนแรงใน steatohepatitis มากกว่าใน fatty liver ซึ่งเป็นระยะที่ไม่ค่อยมีความรุนแรงของโรค(31) และมีการศึกษาพบมีการแสดงออกของยีนของ CYP2E1 เพิ่มขึ้นในตับของหนูขาวที่มีภาวะ steatohepatitis(30,32) และในตับผู้ป่วย NASH ด้วยเช่นกัน(12,30,33) และพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับความรุนแรงของ steatosis กับการทำงานของ CYP2E1 ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ *in vivo* โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของ probe drug แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนของ CYP2E1 กับความรุนแรงของการเกิดการอักเสบใน NAFLD(31)

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัย NAFLD สามารถทำได้โดยอาศัยข้อมูลจากลักษณะทางคลินิก การประเมินทางห้องปฏิบัติการ การศึกษาด้วย imaging studies และ liver biopsy นอกจากนั้นแล้วผู้ป่วย NAFLD จะต้องไม่มีโรคแอลกอฮอล์หรือได้รับแอลกอฮอล์ในปริมาณที่น้อยกว่า 20 และ 30 กรัมต่อวัน ในผู้หญิงและผู้ชาย ตามลำดับ เนื่องจากอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด alcohol-induced liver disease ได้(20,34) และต้องไม่มีโรคใดๆ ที่มีผลต่อตับด้วย เช่น viral hepatitis, autoimmune hepatitis, hemochromatosis, primary biliary cirrhosis, α -1-antitrypsin deficiency และ Wilson's disease(15)

ลักษณะทางคลินิก

ลักษณะทางคลินิกของ NAFLD แสดงได้ดังตารางที่ 8 ลักษณะอาการและสัญญาณของโรคโดยทั่วไปพบว่าจะไม่แสดงอาการของโรค (asymptomatic) ร้อยละ 48 – 100 และตับโต (hepatomegaly) ร้อยละ 75 ตามลำดับ(22)

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะทางคลินิกของ NAFLD(22)

	อาการของโรค	สัญญาณของโรค
ลักษณะทั่วไป	Asymptomatic	Hepatomegaly
ลักษณะอื่นๆ	<ul style="list-style-type: none"> - Vague right upper quadrant pain - Fatigue - Malaise 	<ul style="list-style-type: none"> - Splenomegaly - Spider angiomas - Palmar erythema - Ascites

การประเมินทางห้องปฏิบัติการ

ความผิดปกติทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วย NAFLD ที่พบทั่วไปคือมีระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) หรือ alanine aminotransferase (ALT) หรือทั้งคู่เพิ่มขึ้น(26,28) และมีอัตราส่วนของระดับ AST/ALT น้อยกว่า 1 แต่อัตราส่วนนี้ก็อาจจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อโรคเข้าสู่ระยะที่เป็น fibrosis หรือ cirrhosis และมีระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase หรือ gamma-glutamyltransferase (GGT) เพิ่มขึ้น 2 – 3 เท่าจากภาวะปกติ(28) ความผิดปกติอื่นที่อาจพบได้ทางห้องปฏิบัติการ เช่น hypoalbuminemia, hyperbilirubinemia, prolonged prothrombin time(20)

Imaging studies

ปัจจุบันการศึกษาด้วยวิธี imaging studies (ultrasonography, computed tomography และ magnetic resonance imaging) มีความเชื่อถือได้ และจัดเป็นวิธีที่ non-invasive ในการประเมินโรค(35)

Liver biopsy

เนื่องจากลักษณะทางคลินิกและการประเมินทางห้องปฏิบัติการไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการวินิจฉัยโรค อีกทั้งวิธี imaging studies ก็ไม่สามารถตรวจหา fibrosis และแยกแยะระหว่าง steatohepatitis กับ NAFLD แบบอื่นๆ ได้ ดังนั้นการทำ liver biopsy จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัย NAFLD ได้อย่างถูกต้องที่สุด(28)

การรักษา

ปัจจุบันยังไม่มียาหรือวิธีการใดได้รับการพิสูจน์อย่างชัดเจนว่ามีความสามารถในการรักษา NAFLD ได้อย่างมีประสิทธิภาพ(13,28) การรักษามีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมและปรับปรุงภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรค เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 และภาวะอินซูลินในเลือดสูง ร่วมกับการให้ยาที่มีฤทธิ์ป้องกันตับเพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลงของโรคไม่ให้ความรุนแรงขึ้น(13) โดยวิธีการและยาที่ใช้ในการรักษา NAFLD ในปัจจุบัน ได้แก่

1. การลดน้ำหนัก

การลดน้ำหนักเชื่อว่าสามารถช่วยรักษา NAFLD ได้ จากการศึกษาพบว่าการลดน้ำหนักลงร้อยละ 10 ของน้ำหนักตัว ช่วยลดความผิดปกติของระดับเอนไซม์ในตับ ภาวะตับโต ม้ามโต และ steatosis(13,20,28,36) ได้ แต่การลดน้ำหนักอย่างรวดเร็วอาจมีผลทำให้เกิด necroinflammation, portal fibrosis และ bile stasis ได้(20)

2. Lipid-lowering agents

มีฤทธิ์รักษาภาวะมีไขมันในเลือดสูง ซึ่งอาจจะช่วยในการรักษา NAFLD ได้ ยาในกลุ่มนี้ที่ดูก็นำมาใช้เช่น

2.1 Atorvastatin ช่วยลดภาวะ ballooning degeneration และ inflammation(28)

2.2 Gemfibrozil ลดระดับเอนไซม์ aminotransferase ได้(28) โดย gemfibrozil จะยับยั้งกรดไขมันอิสระจากเซลล์ไขมัน และลดการสร้างแต่เพิ่มการกำจัด very-low-density lipoprotein (VLDL) ออกจากตับ(13)

3. Ursodeoxycholic acid (UDCA)

UDCA ช่วยทำให้ระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase, ALT, GGT และภาวะ steatosis ลดลง(12,13)

4. Metformin

มีฤทธิ์ลดภาวะอินซูลินในเลือดสูง(15) ภาวะตับโต steatosis และลดระดับเอนไซม์ aminotransferase(12,27)

5. Vitamin E

มีคุณสมบัติเป็น antioxidant โดยต้าน lipid peroxidation ยับยั้ง TNF- α , IL-1 และ IL-8 expression(15) ทำให้ระดับเอนไซม์ aminotransferase การอักเสบ และภาวะ fibrosis ลดลง(15,28)

6. Betaine

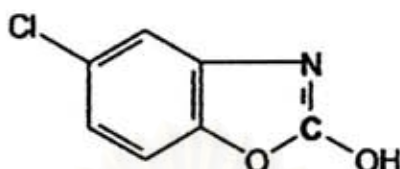
ช่วยทำให้ระดับเอนไซม์ aminotransferase ภาวะ steatosis, fibrosis และ necroinflammatory ลดลง(12,18)

7. N-acetylcysteine (NAC)

NAC มีฤทธิ์ต้าน oxidative stress และช่วยลดระดับเอนไซม์ aminotransferase(15)

Chlorzoxazone (CHZ)

CHZ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 5



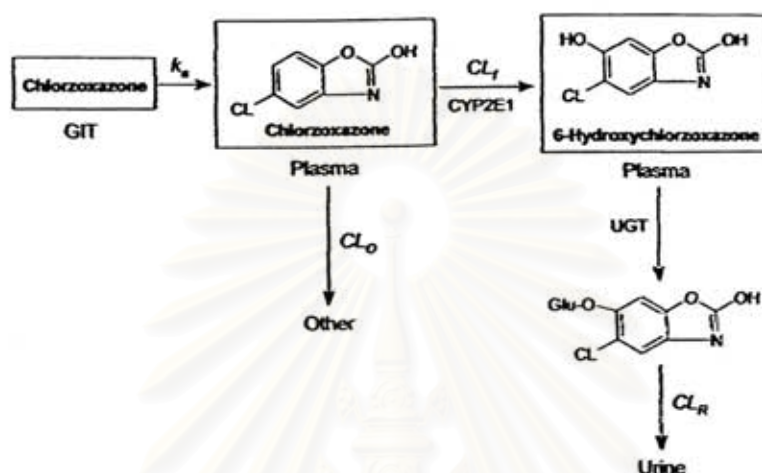
รูปที่ 5 แสดงสูตร โครงสร้างของ CHZ(44)

ชื่อทางเคมี (IUPAC name)	: 5-chloro-3H-benzoxazol-2-one
สูตร โมเลกุล (chemical formula)	: C ₇ H ₄ ClNO ₂
น้ำหนัก โมเลกุล (molecular weight)	: 169.565
สถานะ	: ของแข็ง
จุดหลอมเหลว	: 191.5°C
ความสามารถในการละลายน้ำ	: 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร(38)

CHZ เป็นยาคลายกล้ามเนื้อใช้บรรเทาภาวะการปวดกล้ามเนื้อเฉียบพลัน เช่น กล้ามเนื้อหดเกร็ง จัดอยู่ในประเภทสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท เนื่องจาก CHZ ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง ไม่มีผลต่อกล้ามเนื้อลายโดยตรง CHZ ออกฤทธิ์เบื้องต้นที่ระดับไขสันหลังและ subcortical areas ของสมอง โดยจะไปยับยั้ง multisynaptic reflex arcs ที่มีส่วนในการเกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อลาย(38-42) ผลทางคลินิกที่เกิดขึ้นคือลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อลาย บรรเทาอาการปวดและทำให้กล้ามเนื้อเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น(38-40) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ CHZ คือจะไปยับยั้งการสลาย granule ของ mast cells ป้องกันการหลั่งฮีสตามีน และ SRS-A (slow-reacting substance of anaphylaxis) ที่เป็นสื่อของ type I allergic reactions นอกจากนั้น CHZ อาจจะไปลดการหลั่งสาร leukotrienes ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และยับยั้งการไหลของแคลเซียมเข้าเซลล์(38)

CHZ ถูกดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหาร(43) สามารถตรวจวัดระดับยาในเลือดได้ตั้งแต่ระหว่าง 30 นาทีหลังจากรับประทานยา(39,40) มีระดับยาสูงสุดในพลาสมาภายในระยะเวลาประมาณ 1 – 2 ชั่วโมง (39-41) โดยมี onset of action ภายใน 1 ชั่วโมง(42) ระยะเวลาออกฤทธิ์ 3 – 4 ชั่วโมง และค่าครึ่งชีวิตของยาในพลาสมามีค่าประมาณ 1 – 2.8 ชั่วโมง(42)

การเปลี่ยนแปลงของ CHZ เกิดขึ้นในตับ(41,42) โดยเอนไซม์ CYP2E1 ค้ำขบวนการออกซิเดชัน เปลี่ยนเป็น 6-hydroxychlorzoxazone (6-OH-CHZ)(45-47) ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ (metabolite) หลักเพียง ชนิดเดียวของ CHZ(43,47) จากนั้นเกิดปฏิกิริยา glucuronidation และขับออกทางไต(45-47) ดังรูปที่ 6



GIT : gastrointestinal, k_a : absorption rate constant, CL_o : other, unaccounted for clearance of CHZ

CL_f : 6-OH-CHZ formation clearance, UGT : uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase

CL_R : renal clearance of 6-OH-CHZ

รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ CHZ(49)

เอนไซม์อื่นที่มีส่วนในการเปลี่ยนแปลง CHZ ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP3A แต่เนื่องจาก CYP1A1 พบได้น้อยมากหรือไม่พบเลยในตับของคน CYP2E1 มีอัตราเร็วในการจับ (affinity) และการปล่อย (turn over) ความชอบต่อ CHZ มากกว่า CYP1A1 ถึง 5 และ 10 เท่าตามลำดับ(6,48) ส่วน CYP1A2 และ CYP3A แม้จะมีการศึกษาทาง *in vitro* พบว่ามีส่วนในการเปลี่ยนแปลง CHZ แต่ก็ไม่มีข้อมูลจาก *in vivo* ที่ยืนยันผลของ CYP1A2 และ CYP3A ต่อการเปลี่ยนแปลง CHZ(1,49,50) และจากการศึกษาของ Lucas และคณะ ได้ยืนยันให้เห็นว่าทั้ง 3 เอนไซม์นี้มีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลง CHZ น้อยมาก โดยน้อยกว่าร้อยละ 2 ของการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด(49)

จากการเปลี่ยนแปลงของ CHZ ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลง CHZ คือเอนไซม์ CYP2E1 ที่ผ่านมาจึงมีการนำ CHZ มาใช้ศึกษาการทำงานของ CYP2E1 ในตับคนในหลายๆ การทดลอง และปัจจุบัน CHZ ก็ได้รับการยอมรับว่ามีความเหมาะสมและสามารถใช้เป็น probe ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับคนได้(8,10,38) โดยการวัดระดับ CHZ และ 6-OH-CHZ ในเลือดหรือในปัสสาวะ

ผลข้างเคียงของ CHZ

ผลข้างเคียงของ CHZ ต่อระบบต่างๆ ในร่างกายได้แก่

1. ระบบทางเดินอาหาร : ผลที่อาจพบได้บ้างคือ รู้สึกกระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร และปวดท้อง ส่วนผลที่พบได้ค่อนข้างน้อยคือเลือดออกในทางเดินอาหาร
2. ระบบประสาทส่วนกลาง : อาจพบอาการ ง่วงซึม หน้ามืด คลื่นไส้ วิงเวียน หรือกระตุ้นประสาทส่วนกลางได้บ้าง
3. อาการแพ้ยา : มีโอกาสพบได้น้อยมากคือ ผื่นแดงที่ผิวหนัง มีเลือดออกเป็นจุดๆ หรือมีเลือดออกใต้ผิวหนัง ส่วน anaphylactic reactions มีโอกาสพบได้น้อยที่สุด
4. พิษต่อไต : มีผลในการทำให้ปัสสาวะเปลี่ยนสี แต่พบได้น้อย(39)

การได้รับ CHZ เกินขนาด

จากการศึกษาพบค่า LD₅₀ เท่ากับ 440 และ 763 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนูถีบจักรและหนูขาว ตามลำดับ(38) สำหรับในคนเมื่อได้รับ CHZ เกินขนาดจะมีอาการ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ง่วงซึม หน้ามืด วิงเวียน ปวดศีรษะ เกลื่อนไหวไม่ได้ตามที่ต้องการ การหายใจผิดปกติ ความดันเลือดลดลง เป็นต้น(39,40)

ยาที่มีผลต่อ CHZ

มียาหลายชนิดสามารถเพิ่มฤทธิ์ของ CHZ ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะ heavy sedation ได้ ได้แก่

1. Antihistamines เช่น brompheniramine, chlorpheniramine, azatadine, clemastine และยาอื่นๆ บางตัว
2. Narcotics เช่น meperidine, morphine, propoxyphene, hydrocodones, oxycodone, fentanyl และ codeine
3. Sedatives เช่น phenobarbital, amobarbital และ secobarbital
4. Phenothiazines เช่น chlorpromazine, fluphenazine, mesoridazine, perphenazine, prochlorperazine, thioridazine และ influoperazine
5. Antidepressants เช่น doxepin, imipramine, nortriptyline, fluoxetine, paroxetine, sertraline, phenelzine และ tranylcypromine(51)

อาหารและสารต่างๆ ที่มีผลต่อ CHZ

1. อาหาร : จากการศึกษาทาง *in vitro* พบว่าผักกระเฉด กระเทียม ชา กระหล่ำปลี และบรอกโคลี จะลดการดูดซึมและฤทธิ์ของ CHZ โดยสารบางตัวในอาหารเหล่านี้จะไปจับ CHZ ที่แตกตัวออกมาทำให้ CHZ อยู่ในรูปที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้
2. แอลกอฮอล์ : การดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ระหว่างรับประทาน CHZ จะเพิ่มผลข้างเคียงของยาได้ เช่น ง่วงซึม วิงเวียน และ lightheadedness และจากการศึกษาใน *in vitro* พบว่าแอลกอฮอล์จะเพิ่มการขจัด CHZ ออกจากร่างกาย
3. การสูบบุหรี่ : การสูบบุหรี่จะเพิ่มการขจัด CHZ ออกจากร่างกาย
4. Caffeine : CHZ จะลดการขจัด caffeine ออกจากร่างกาย ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดผลข้างเคียงของ caffeine ได้ เช่น กระวนกระวาย หงุดหงิด และนอนไม่หลับ(52)

การศึกษานี้จึงใช้ CHZ เป็น probe สำหรับเอนไซม์ CYP2E1 และตรวจระดับเมแทบอไลต์ของ CHZ คือ 6-OH-CHZ ที่เวลาต่างๆ ด้วยและหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้การทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในอาสาสมัครสุขภาพดีเปรียบเทียบกับผู้ป่วย NAFLD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษากับอาสาสมัคร
 - Chlorzoxazone (Maselax[®])
 - Sodium citrate trihydrate บริษัท MERCK
 - เข็มเบอร์ 20
 - Syringe ขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
 - I.V. catheter เบอร์ 20
 - Injection plug
 - สำลี
 - แอลกอฮอล์
 - ถุงมือ
 - หลอดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างพลาสมาขนาด 5 มิลลิลิตร

2. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ

2.1 สารเคมี

ชื่อสาร	บริษัท
- CHZ	Sigma Chemical Co, Germany
- 6-OH-CHZ	Ultrafine, Manchester, UK
- 3-aminophenyl sulfone	ALDRICH, Germany
- Sodium acetate	FLUKA, Switzerland
- Sodium chloride	MERCK, Germany
- β -glucuronidase (type G0751)	Sigma Chemical Co, Germany
- Diethyl ether HPLC grade	MERCK, Germany
- Methanol HPLC grade	MERCK, Germany
- Acetonitrile HPLC grade	MERCK, Germany
- Phosphoric acid	MERCK, Germany
- Double distill water	

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ชื่อ	บริษัท
- Vortex-2-Genic	Scientific Industries, USA
- Autopipette	
- Pipette P1000, P200 μ l	Gilson Meical Electronic, France
- Biohit proline 10 μ l	Biohit, Finland
- Angle centrifuge 4235A	Biosystem
- pH meter SA 520	Orian, USA
- Degassor model 2200	Brandson Europa B.V. Netherland
- อุปกรณ์ในการกรองสารละลาย	Water associates, USA
- เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ มีความละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Precisa Instruments, Switzerland

2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ High-performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งประกอบไปด้วย

ชื่อ	บริษัท
- Spectra system isocratic pump (PC1000)	Thermo separation product
- Spectra system autosamples (AS3000)	Thermo separation product
- Spectra system detector UV 1000	Thermo separation product
- Spectra system SN 4000	Thermo separation product
- Computer, soft ware program P1000	Thermo separation product
- Printer HP laserjet 6L	Hewlette packard
- Analytical column ได้แก่ μ -bondapak C ₁₈ แบบเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยซิลิกา C ₁₈ ขนาด 5 ไมครอนของ Water Associates Massachusetts, USA	
- Guard column แบบเหล็กกล้าไร้สนิมความยาว 2 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บรรจุด้วย bondapak C ₁₈ ของ Water Associates Massachusetts, USA	

การเก็บตัวอย่างเลือดที่ปราศจาก CHZ และ 6-OH-CHZ (Pool plasma)

นำเลือดที่ได้จากกลุ่มผู้ป่วย NAFLD และกลุ่มคนสุขภาพดี ใส่น้ำหล่อเย็นเลือดซึ่งมีสารกันเลือดแข็งตัวคือ sodium citrate ปริมาณ 0.015 กรัมอยู่ แล้วนำมาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา โดยวิธี HPLC

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ CHZ

เตรียม stock solution ของ CHZ ที่ความเข้มข้น 1,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง CHZ หนัก 0.0160 กรัม เติม methanol จนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานของ CHZ ความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำ serial dilution ดังนี้

- 1.1 นำ stock solution ของ CHZ มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ที่มีความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.2 นำสารละลาย 1.1 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.3 นำสารละลาย 1.2 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.4 นำสารละลาย 1.3 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.5 นำสารละลาย 1.4 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.6 นำสารละลาย 1.5 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.7 นำสารละลาย 1.6 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ CHZ ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ 6-OH-CHZ

เตรียม stock solution ของ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง 6-OH-CHZ หนัก 0.0020 กรัม เติม methanol จนปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานของ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการทำให้ serial dilution ดังนี้

- 2.1 นำ stock solution ของ 6-OH-CHZ มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 2.2 นำสารละลายข้อ 2.1 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- 2.3 นำสารละลายข้อ 2.2 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - 2.4 นำสารละลายข้อ 2.3 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - 2.5 นำสารละลายข้อ 2.4 มา 200 ไมโครลิตร เติม methanol ให้ครบ 400 ไมโครลิตร จะได้ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสติกเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียม blank พลาสติกและนำสารละลายมาตรฐานของ CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร เติมลงในพลาสติกมีปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร จะได้พลาสติกที่มี CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
 4. การเตรียมสารละลาย 3-aminophenyl sulfone ความเข้มข้น 170 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น internal standard
 - 4.1 ชั่ง 3-aminophenyl sulfone หนัก 0.0340 กรัม เติม methanol จนมีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้ stock solution ของ 3-aminophenyl sulfone ความเข้มข้น 3,400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - 4.2 นำ stock solution ของ 3-aminophenyl sulfone ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม methanol จนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้ความเข้มข้น 170 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 5. การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC
 - 5.1 นำพลาสติกที่มี CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้นต่างๆ มา 0.5 มิลลิลิตร
 - 5.2 เติม 1 มิลลิลิตร ของ 0.2 โมลาร์ sodium acetate buffer (pH 4.75) และ 200 units ของ β -glucuronidase (1,000 units ละลายด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.2% NaCl)
 - 5.3 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 13 ชั่วโมง
 - 5.4 เติม 3-aminophenyl sulfone ความเข้มข้น 170 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ acetonitrile ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
 - 5.5 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที
 - 5.6 แยกสารละลายส่วนใสออกมา และเติม diethyl ether ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร

- 5.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที
- 5.8 นำชั้นสารอินทรีย์ (สารละลายส่วนบน) มา 5.5 มิลลิลิตร แล้วระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 5.9 ละลายของแข็งที่เหลือในข้อ 5.8 ด้วย mobile phase ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ 4,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที
- 5.10 นำสารละลายส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดครั้งละ 50 ไมโครลิตร

6. การเตรียม mobile phase

- 6.1 นำ 85% phosphoric acid ปริมาตร 11.76 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 2 ลิตร ใน volumetric flask จะได้ phosphoric acid เข้มข้น 0.5% แล้วปรับ pH ด้วย pH meter ให้ได้ pH 3.5
- 6.2 นำ acetonitrile ผสมกับสารละลายข้อ 6.1 ในอัตราส่วน 40:60 ตามลำดับ
- 6.3 กรองด้วยกระดาษกรองและไล่อากาศด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 20 นาที

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Mobile phase	: Acetonitrile : 0.5% phosphoric acid pH3.5 (40:60)
Column	: μ -bondapak C ₁₈
Flow rate	: 0.8 มิลลิลิตร/นาที
Detector	: UV ความยาวคลื่น 287 นาโนเมตร
Injection volume	: 50 ไมโครลิตร

การศึกษาเพื่อยืนยันความเหมาะสมของการวิเคราะห์ (Validation method)

1. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์แสดงได้ด้วย retention time ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา ในรูปของโครมาโตแกรม ดูการแยกของ peak CHZ และ 6-OH-CHZ เปรียบเทียบกับ blank พลาสมาว่ามี peak อื่นใดมารบกวนหรือไม่

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ CHZ และ 6-OH-CHZ ที่วิธีนี้สามารถตรวจได้ในพลาสมา (Lower limit of quantitation, LLOQ)

โดยเตรียม CHZ และ 6-OH-CHZ ที่ความเข้มข้นระดับต่ำอย่างละ 5 หลอดทดลอง และหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% relative standard deviation : %RSD) ไม่เกิน 20%

$$\%RSD = (SD / \text{mean}) \times 100$$

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision) แบ่งเป็น

3.1 Intraday precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาภายในวันเดียวกัน โดยเตรียม CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 0.25, 1 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 หลอดทดลอง นำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD)

3.2 Interday precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาต่างวันกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่วิเคราะห์ในต่างวันกัน

ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) ทั้ง intraday และ interday ในแต่ละความเข้มข้นจะต้องได้ค่าไม่เกิน 15% จึงจะยอมรับได้

4. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของ %accuracy ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เตรียมขึ้น ซึ่งควรได้ค่า %accuracy อยู่ในช่วง 85 – 115% จึงจะยอมรับได้ แต่ถ้าสารที่ความเข้มข้น LLOQ ค่า %accuracy ต้องอยู่ในช่วง 20 – 80% จึงจะยอมรับได้ โดยใช้วิธีการดังนี้ เตรียม CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 0.25, 1 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 หลอดทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวในพลาสมา โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\%accuracy = \frac{\text{ความเข้มข้นของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ จริง}} \times 100$$

5. การทดสอบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีการสกัด (Recovery)

เป็นการศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดยา โดยเตรียม CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 0.25, 1 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในพลาสมาและ mobile phase ความเข้มข้นละ 5 หลอดทดลอง เปรียบเทียบ peak area ของ CHZ และ 6-OH-CHZ จากการวิเคราะห์ในพลาสมากับใน mobile phase

$$\%recovery = \frac{\text{Peak area ของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ จากการวิเคราะห์ในพลาสมา}}{\text{Peak area ของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ จากการวิเคราะห์ใน mobile phase}} \times 100$$

6. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ กับ internal standard แสดงค่าเป็น coefficient of determination (R^2) โดยทำการเตรียม CHZ และ 6-OH-CHZ ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 $\mu\text{g/ml}$ ในพลาสมา นำค่า peak area ratio ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า R^2 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

การศึกษาในอาสาสมัคร

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (แสดงในภาคผนวก ก) โดยศึกษาในอาสาสมัคร 2 กลุ่มคือ กลุ่มคนสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

การคัดเลือกกลุ่มคนสุขภาพดี จำนวน 10 คน

Inclusion criteria

1. เพศชายหรือหญิง อายุระหว่าง 18 – 60 ปี
2. สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคเกี่ยวกับตับ ไต หัวใจ ความดันโลหิตสูง และโรคประจำตัวใดๆ
3. ไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์หรือได้รับแอลกอฮอล์ในปริมาณที่น้อยกว่า 20 และ 30 กรัมต่อวัน ในผู้หญิงและผู้ชายตามลำดับ
4. ไม่มีประวัติแพ้ CHZ
5. สามารถงดการบริโภคแอลกอฮอล์ทั้งในเครื่องดื่มและอาหาร ยาและเครื่องดื่มเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการเจาะเลือดได้
6. สามารถงดอาหารหลังเที่ยงคืนก่อนการเจาะเลือดได้
7. ไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์
8. สามารถปฏิบัติตามเงื่อนไขการศึกษาได้ครบถ้วน

Exclusion criteria

1. เกิดความผิดปกติใดๆ ในระหว่างการทดลอง
2. ไม่ปฏิบัติตามเงื่อนไขของการศึกษา

จำนวนอาสาสมัครคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$N = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \delta^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

เมื่อ X_1 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1

X_2 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2

$$\delta^2 = \text{pooled variance} = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

กำหนดค่า $\alpha = 0.05$; $Z_{\alpha/2} = 1.96$

$\beta = 0.10$; $Z_{\beta} = 1.28$

การคำนวณขนาดตัวอย่างอ้างอิงจากงานวิจัยของ Karin D และคณะ(54)

$$n_1 = 14 \quad ; \quad n_2 = 20$$

$$X_1 = 0.50 \quad ; \quad X_2 = 0.19$$

$$S_1 = 0.28 \quad ; \quad S_2 = 0.10$$

$$\text{คำนวณหาค่า pooled variance} = \frac{(14 - 1)(0.28)^2 + (20 - 1)(0.10)^2}{14 + 20 - 2} = 0.0378$$

$$N = \frac{2(1.96 + 1.28)^2 \times 0.0378}{(0.50 - 0.19)^2}$$

$$= 8.2583 = 9 \text{ คน}$$

รวมความคลาดเคลื่อนอีก 10% ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครในแต่ละกลุ่มจะมีอย่างน้อย 10 คน

วิธีการศึกษาในคนสุขภาพดี

1. ชักประวัติตามแบบสอบถามที่กำหนด (ภาคผนวก ข)
2. สำหรับผู้ที่ผ่านการคัดเลือกตามแบบสอบถามจะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจการทำงานของตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. คัดเลือกอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์
4. ชี้แจงรายละเอียดและขั้นตอนการวิจัย
5. ให้อาสาสมัครลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ภาคผนวก จ)
6. ให้อาสาสมัครงดการบริโภคแอลกอฮอล์ทั้งจากที่ผสมในเครื่องดื่มและอาหาร ยาและงดสูบบุหรี่ 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง
7. ให้อาสาสมัครงดอาหารหลังเที่ยงคืนก่อนการทดลอง
8. เจาะเลือดก่อนรับประทาน CHZ เพื่อตรวจสอบว่าไม่มี CHZ, 6-OH-CHZ และ 3-aminophenyl sulfone ในเลือด

9. ให้อาสาสมัครแต่ละคนรับประทาน CHZ 400 มิลลิกรัม
10. เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากหลอดเลือดดำที่ท้องแขนหลังรับประทาน CHZ ที่เวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6 และ 8 ชั่วโมง
11. อาสาสมัครจะได้รับอาหารเช้าและกลางวันหลังจากรับประทาน CHZ 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ
12. นำเลือดมาปั่นแยกพลาสมา
13. วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาโดยวิธี HPLC
14. นำผลที่ได้จากการศึกษาในกลุ่มคนปกติไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

การคัดเลือกกลุ่มผู้ป่วย NAFLD จำนวน 12 คน

Inclusion criteria

1. เพศชายหรือเพศหญิง
2. ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์แล้วว่าเป็น NAFLD
3. ไม่มีประวัติแพ้ CHZ
4. ไม่ได้รับยาที่มีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงของ CHZ
5. ไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์
6. สามารถงดอาหารหลังเที่ยงคืนก่อนการเจาะเลือดได้

Exclusion criteria

1. เกิดความผิดปกติใดๆ ในระหว่างการทดลอง
2. ไม่ปฏิบัติตามเงื่อนไขของการศึกษา

วิธีการศึกษาในผู้ป่วย NAFLD

1. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์แล้วว่าเป็น NAFLD
2. ให้ผู้ป่วยงดอาหารหลังเที่ยงคืนก่อนการทดลอง
3. เจาะเลือดก่อนรับประทาน CHZ เพื่อตรวจสอบว่าไม่มี CHZ, 6-OH-CHZ และ 3-aminophenyl sulfone ในเลือด
4. ให้รับประทาน CHZ 400 มิลลิกรัม
5. เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากหลอดเลือดดำที่ท้องแขนหลังรับประทาน CHZ ที่เวลา 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมง เนื่องจากผลการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของกลุ่มคนสุขภาพดีพบระดับยาและเมแทบอไลต์ของยาในพลาสมามีค่าสูงในช่วงเวลานี้
6. ผู้ป่วยจะได้รับอาหารเช้าหลังจากรับประทาน CHZ 2 ชั่วโมง
7. นำเลือดมาปั่นแยกพลาสมา
8. วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาโดยวิธี HPLC

การรวบรวมข้อมูล

1. ชักประวัติตามแบบสอบถาม
2. บันทึกผลการตรวจร่างกายของของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD
3. คำนวณหาระดับ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา
4. หาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ได้แก่ C_{max} , T_{max} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, Cl , และ Vd ของกลุ่มคนสุขภาพดี
5. หาค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่เวลาต่างๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา ได้แก่ การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา การหาความถูกต้อง ความเที่ยงตรง ความจำเพาะ และความแม่นยำ
2. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ของระดับยา อัตราส่วนและพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์
3. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD โดยใช้สถิติ unpaired student t-test ด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$
4. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนความเข้มข้น 6-OH-CHZ / CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีกับผู้ป่วย NAFLD เพื่อวิเคราะห์หาอัตราส่วน ณ จุดเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นดัชนีชี้วัด และเปรียบเทียบค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ระหว่างคนทั้งสองกลุ่ม

บทที่ 3

ผลการทดลอง



การยืนยันความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

1. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์แสดงได้จากได้มาโคแกรมในรูปที่ 7 พบว่าค่า retention time ของ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเมื่อฉีดแต่ละครั้งมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 5.3 - 5.4 นาที และ retention time ของ CHZ อยู่ในช่วง 11.1 - 11.2 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ของ CHZ และ 6-OH-CHZ และแยกจาก peak ของ 3-aminophenyl sulfone ที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งมี retention time อยู่ในช่วง 8.3 - 8.4 นาที ทั้งนี้ peak ทั้งสามไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่นๆ ในพลาสมาโดยเปรียบเทียบกับ blank

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่วิธีการนี้สามารถวิเคราะห์ได้ (Lower limit of quantitation)

ความเข้มข้นต่ำสุดของ CHZ ในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 9.97 (n=5)

ความเข้มข้นต่ำสุดของ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 5.27 (n=5)

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) พบว่า %RSD ของ CHZ ในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday precision) มีค่าอยู่ในช่วง 1.36 - 8.80% ค่าเฉลี่ย $4.13 \pm 4.06\%$ และ %RSD ของ 6-OH-CHZ ในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.35 - 6.77% ค่าเฉลี่ย $5.16 \pm 2.44\%$

%RSD ของ CHZ ในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในต่างวัน (interday precision) มีค่าอยู่ในช่วง 6.26 - 11.06% ค่าเฉลี่ย $9.05 \pm 2.49\%$ และ %RSD ของ 6-OH-CHZ ในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในต่างวัน มีค่าอยู่ในช่วง 8.72 - 14.91% ค่าเฉลี่ย $12.49 \pm 3.30\%$ ดังตารางที่ 9 - 12

ตารางที่ 9 แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ ในพลาสมาเมื่อทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday precision) (n=5)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area ratio (Range)	Peak area ratio (mean \pm SD)	%RSD
0.25	0.047 – 0.061	0.054 \pm 0.005	8.80
1	0.225 – 0.231	0.232 \pm 0.005	2.24
8	1.731 – 1.760	1.768 \pm 0.024	1.36
%RSD (mean \pm SD)			4.13 \pm 4.06

ตารางที่ 10 แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเมื่อทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday precision) (n=5)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area ratio (Range)	Peak area ratio (mean \pm SD)	%RSD
0.25	0.032 – 0.038	0.035 \pm 0.002	6.36
1	0.104 – 0.120	0.108 \pm 0.007	6.77
8	1.180 – 1.253	1.218 \pm 0.029	2.35
%RSD (mean \pm SD)			5.16 \pm 2.44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ ในพลาสมาเมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวัน (interday precision) (n=5)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area ratio (Range)	Peak area ratio (mean \pm SD)	%RSD
0.25	0.047 – 0.055	0.051 \pm 0.003	6.26
1	0.188 – 0.237	0.214 \pm 0.021	9.84
8	1.359 – 1.768	1.577 \pm 0.174	11.06
%RSD (mean \pm SD)			9.05 \pm 2.49

ตารางที่ 12 แสดงความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวัน (interday precision) (n=5)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area ratio (Range)	Peak area ratio (mean \pm SD)	%RSD
0.25	0.025 – 0.035	0.035 \pm 0.002	14.91
1	0.087 – 0.108	0.108 \pm 0.007	8.72
8	0.890 – 1.218	1.218 \pm 0.029	13.82
%RSD (mean \pm SD)			12.49 \pm 3.30

4. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาแสดงด้วยค่า %accuracy พบว่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ CHZ มีค่าอยู่ระหว่าง 91.72 – 101.59% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $97.06 \pm 4.98\%$ และเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ มีค่าอยู่ระหว่าง 89.85 – 101.02% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $94.59 \pm 5.78\%$ ดังตารางที่ 13 – 14

ตารางที่ 13 แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ CHZ ในพลาสมา (n=5)

CHZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	%accuracy					%accuracy (Range)	%accuracy (mean \pm SD)
	1	2	3	4	5		
0.25	96.66	87.54	89.22	110.56	105.44	87.54 - 110.56	97.88 ± 10.02
1	103.57	104.03	99.22	105.33	95.78	95.78 - 105.33	101.59 ± 3.98
8	90.97	90.55	88.89	92.58	95.61	88.89 - 95.61	91.72 ± 2.54
%accuracy (mean \pm SD) = 97.06 ± 4.98							

ตารางที่ 14 แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ 6-OH-CHZ ในพลาสมา (n=5)

6-OH-CHZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	%accuracy					%accuracy (Range)	%accuracy (mean \pm SD)
	1	2	3	4	5		
0.25	103.92	104.08	98.96	96.60	101.56	96.60 - 104.08	101.02 ± 3.23
1	95.24	90.47	95.71	87.62	95.43	87.62 - 95.71	92.89 ± 3.66
8	89.21	89.35	86.78	87.35	96.58	86.78 - 96.58	89.85 ± 3.93
%accuracy (mean \pm SD) = 94.59 ± 5.78							

5. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัด (Recovery)

ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเพื่อการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า %recovery พบว่า %recovery ของ CHZ มีค่าระหว่าง 63.31 – 72.24 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $68.89 \pm 4.87\%$ และ %recovery ของ 6-OH-CHZ มีค่าระหว่าง 67.74 – 98.20% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $85.00 \pm 16.11\%$ แสดงดังตารางที่ 15 - 16

ตารางที่ 15 แสดงค่า %recovery ของวิธีการสกัด CHZ ในพลาสมา (n=5)

CHZ concentration (µg/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%recovery
	Plasma	Mobile phase	
0.25	15536.85 ± 1849.26	21507.45 ± 1138.67	72.24
1	67943.60 ± 4971.85	95531.40 ± 3870.12	71.12
8	495252.60 ± 13301.81	782291.20 ± 32127.91	63.31
%recovery (mean ± SD) = 68.89 ± 4.87			

ตารางที่ 16 แสดงค่า %physical recovery ของวิธีวิเคราะห์ 6-OH-CHZ ในพลาสมา (n=5)

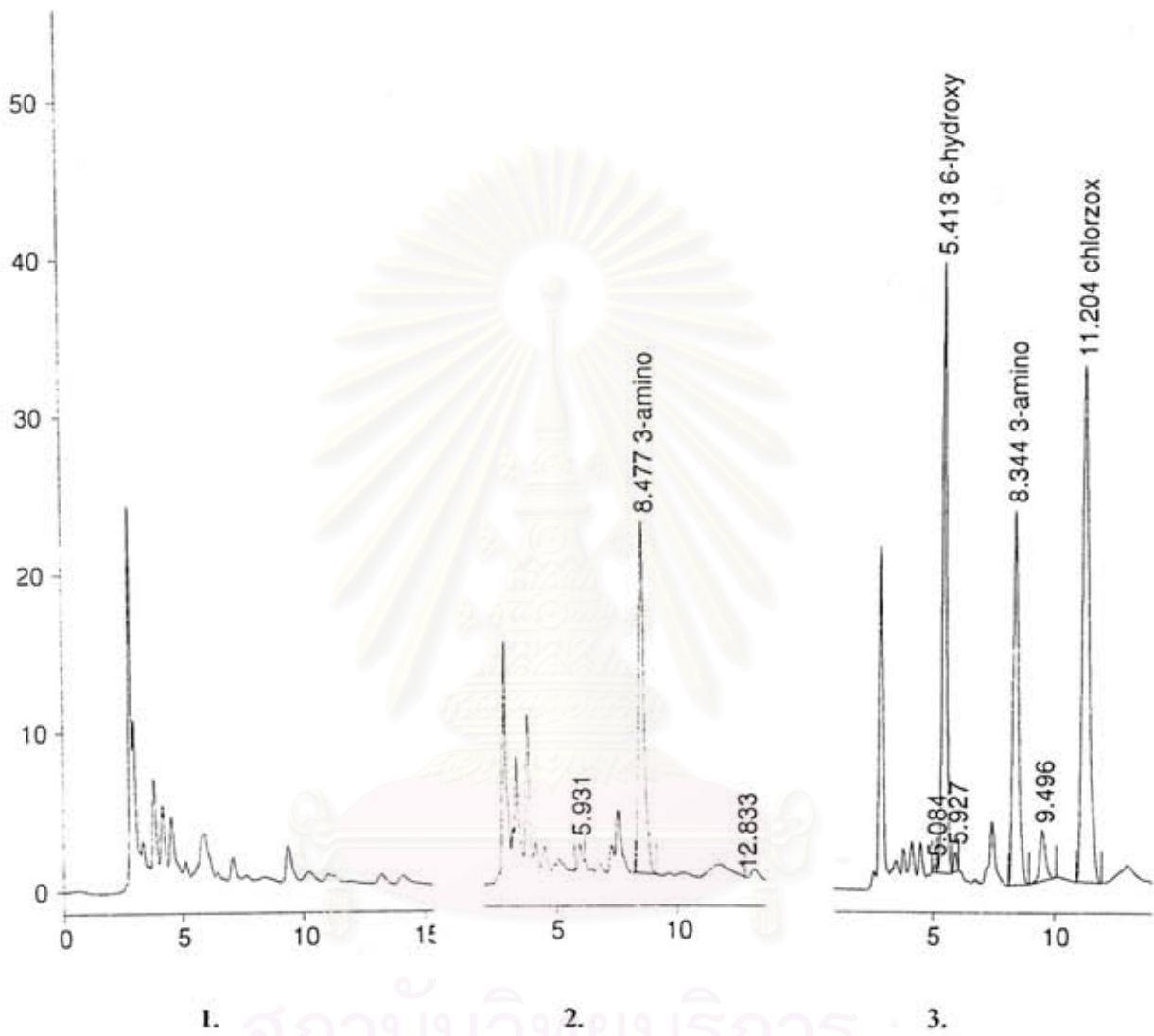
6-OH-CHZ concentration (µg/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%recovery
	Plasma	Mobile phase	
0.25	16329.65 ± 462.71	16628.65 ± 1589.97	98.20
1	62878.60 ± 4371.13	68307.00 ± 11008.68	92.05
8	491206.80 ± 20936.14	725130.80 ± 30466.23	67.74
%recovery (mean ± SD) = 85.00 ± 16.11			

6. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงแสดงด้วยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ ในพลาสมากับ peak area ratio มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 8 ไมโครกรัม / มิลลิกรัม ดังรูปที่ 8 และ 9 โดยการวิเคราะห์จากสมการ $Y = AX + B$ เมื่อ Y เป็นค่า peak area ratio และ X เป็นค่าความเข้มข้นของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ ในพลาสมา ค่า coefficient of determination (R^2) ของ CHZ และ 6-OH-CHZ เท่ากับ 0.9999 และ 0.9989 ตามลำดับ

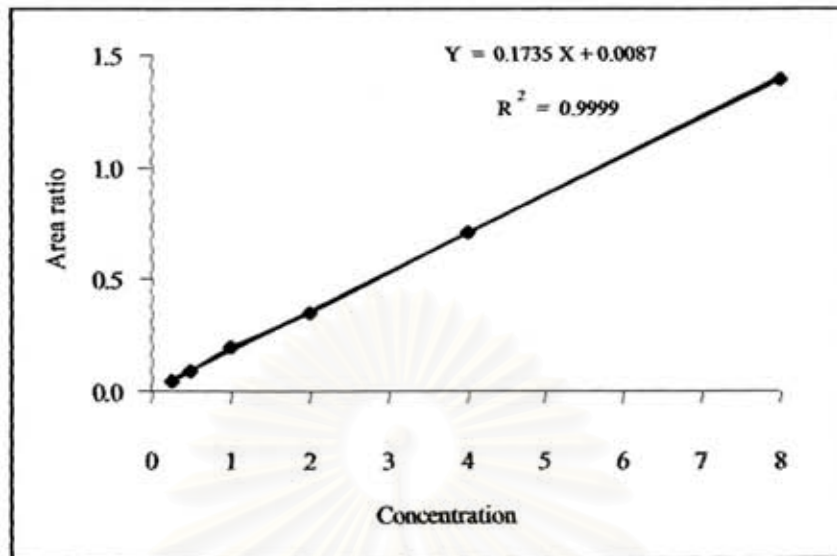


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

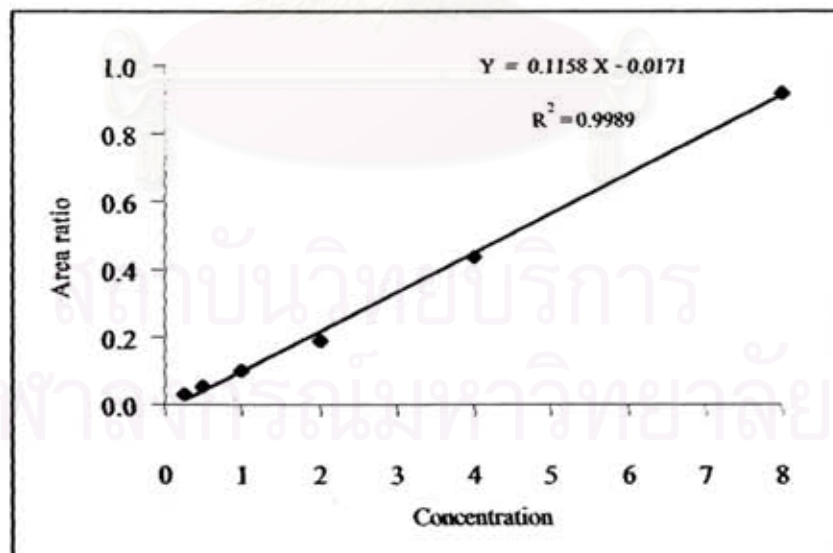


รูปที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

1. blank serum
2. blank serum + internal standard (3-aminophenyl sulfone)
3. blank serum + 6-OH-CHZ + internal standard + CHZ



รูปที่ 8 แสดงกราฟมาตรฐานของ CHZ ในพลาสมา



รูปที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานของ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

ผลการศึกษาในอาสาสมัคร

1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มอาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครเข้าเกณฑ์การคัดเลือก 12 คน คัดออก 2 คน เพราะตรวจพบค่า SGOT และ SGPT เกินกว่าค่าปกติ จึงได้กลุ่มคนสุขภาพดีจำนวน 10 คน

กลุ่มคนสุขภาพดีมีจำนวน 10 คน เป็นเพศชาย 4 คน และเพศหญิง 6 คนอายุระหว่าง 26 – 38 (33.80 ± 4.85) ปี น้ำหนัก 41 – 70 (57.60 ± 7.93) กิโลกรัม และส่วนสูง 150 – 175 (159.6 ± 9.31) เซนติเมตร สำหรับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีจำนวน 12 คน เป็นเพศชาย 7 คน และเพศหญิง 5 คน มีอายุระหว่าง 29 – 79 (50.17 ± 12.82) ปี น้ำหนัก 49 – 89 (73.79 ± 10.21) กิโลกรัม และส่วนสูง 150 - 181 (165.58 ± 10.84) เซนติเมตร ดังตารางที่ 17 และแสดงค่าลักษณะทั่วไปของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD แต่ละรายในภาคผนวก ข และ ข ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

ลักษณะ	กลุ่มคนสุขภาพดี		กลุ่มผู้ป่วย NAFLD	
	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD
อายุ (ปี)	26 – 38	33.80 ± 4.85	29 - 79	50.17 ± 12.82
น้ำหนัก (กิโลกรัม)	41 - 70	57.60 ± 7.93	49 – 89	73.79 ± 10.21
ความสูง (เซนติเมตร)	150 - 175	159.6 ± 0.09	150 - 181	165.58 ± 10.84
BMI (กิโลกรัม/เมตร ²)	18.22 – 25.24	22.56 ± 2.20	23.15 – 32.89	26.94 ± 3.29

2. ผลการตรวจสารชีวเคมีในเลือดเพื่อประเมินการทำงานของตับ

การตรวจสารชีวเคมีในเลือดเพื่อประเมินการทำงานของตับ ประกอบด้วย SGOT, SGPT และ Alkaline phosphatase กลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีค่าสารชีวเคมีในเลือด ดังตารางที่ 18 และแสดงค่าสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD แต่ละรายในภาคผนวก ข และ ข ตามลำดับ และผู้ป่วยทุกคนได้รับการตรวจวินิจฉัยด้วย liver biopsy แล้วว่าเป็น NAFLD

ตารางที่ 18 แสดงค่าสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

สารชีวเคมี	ค่าปกติ	กลุ่มคนสุขภาพดี		กลุ่มผู้ป่วย NAFLD	
		Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD
SGOT	0 – 38 (U/L)	14 - 28	21.20 \pm 5.51	29 - 70	45.08 \pm 14.79
SGPT (U/L)	0 – 38 (U/L)	9 - 37	17.80 \pm 9.02	40 - 121	76.92 \pm 28.05
Alkaline phosphatase	39 – 117 (U/L)	44 - 93	63.50 \pm 13.17	57 – 117*	81.18 \pm 16.14*

*n = 11

3. ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลา 0 คือก่อนรับประทานยา ถึง 8 ชั่วโมง หลังรับประทานยาของกลุ่มคนสุขภาพดีคนที่ 1 ถึง 10 แสดงในตารางที่ 19 กราฟที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดี

ตารางที่ 20 แสดงค่าเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดี ได้แก่ ค่า C_{max} ของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีค่า 7.15 ± 2.09 และ 1.77 ± 0.59 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า T_{max} ของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีค่า 2.00 ± 0.82 และ 3.05 ± 1.17 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า $AUC_{0-\infty}$ ของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีค่า 27.52 ± 8.5 และ 8.50 ± 2.78 ไมโครกรัม.ชั่วโมง / มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า $t_{1/2}$ ของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีค่า 1.49 ± 0.32 และ 1.95 ± 0.73 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า clearance (Cl) ของ CHZ เท่ากับ 15.77 ลิตร / ชั่วโมง และค่า Vd ของ CHZ เท่ากับ 33.13 ± 9.75 ลิตร

จากกราฟที่ 10 พบว่าที่เวลา 2.5 และ 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดีสูงสุด โดยมีค่า 5.67 และ 1.52 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ และแสดงให้เห็นว่าที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของกลุ่มคนสุขภาพดีก็มีค่าความเข้มข้นอยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกัน จากผลที่ได้นี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่เวลา 0 คือก่อนรับประทานยา 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยา

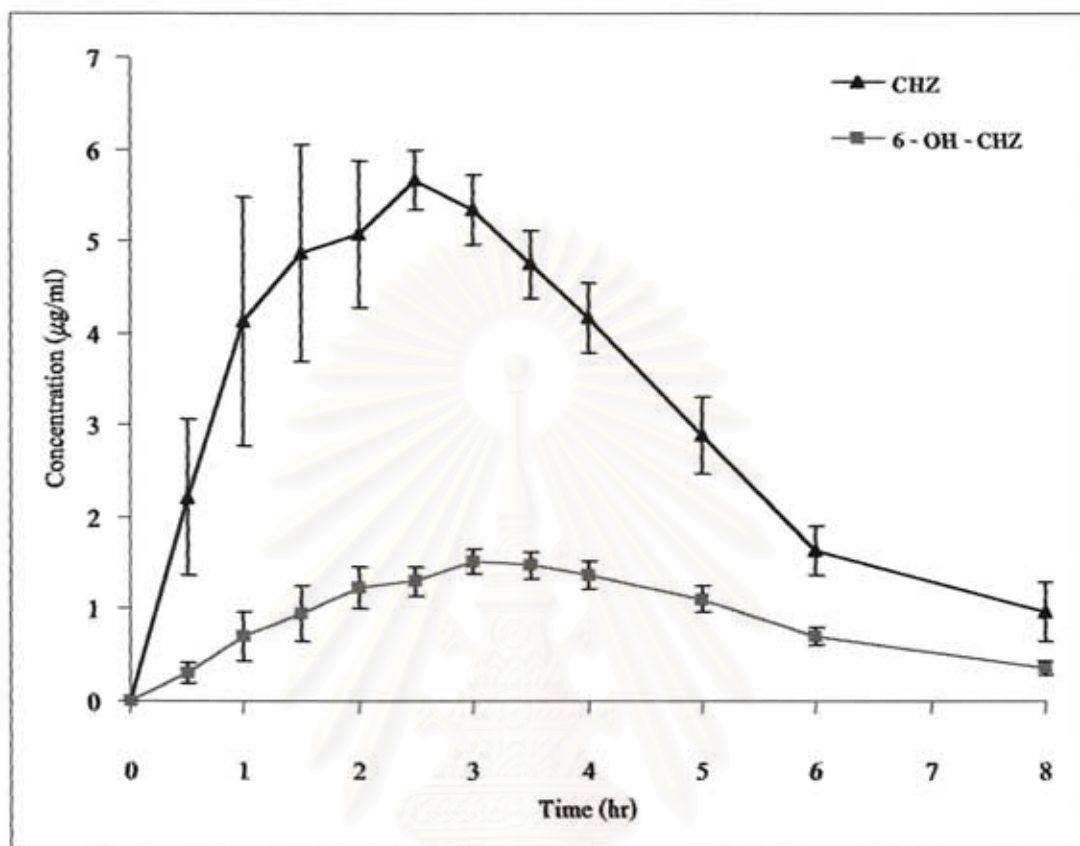
ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยาของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD คนที่ 1 ถึง 12 แสดงในตารางที่ 21 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลา 0-3 ชั่วโมง ของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD เปรียบเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดีแสดงในรูปที่ 11

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบค่า C_{max} และ T_{max} ของ CHZ ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD พบว่า C_{max} ของ CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ซึ่งหาค่า C_{max} ได้ 10 คน จาก 12 คน เนื่องจากมีผู้ป่วย NAFLD 2 คนที่มีความเข้มข้นของ CHZ ในพลาสมาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ที่ 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง จึงไม่สามารถสรุปค่า C_{max} และ T_{max} ของ CHZ ได้ C_{max} ของกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีค่า 7.15 ± 2.09 และ 4.16 ± 0.82 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน T_{max} ของ CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีและผู้ป่วย NAFLD มีค่าเท่ากันที่ 2 ชั่วโมง

อัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD แสดงดังตารางที่ 23 และรูปที่ 12 จากตารางที่ 24 พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชั่วโมง ของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีค่ามากกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.05$ โดยแต่ละเวลาที่ศึกษามีค่าความแตกต่างทางสถิติ คือ $P = 0.26, 0.30, 0.10$ และ 0.11 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่เวลา 2.5 ชั่วโมงมีค่าความแตกต่างระหว่างคนสองกลุ่มมากที่สุด ($P = 0.10$)

ตารางที่ 19 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลา 0 ถึง 8 ชั่วโมงของกลุ่มคนสุขภาพดี

No	CHZ ($\mu\text{g/ml}$)												6-OH-CHZ ($\mu\text{g/ml}$)											
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5	6	8	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5	6	8
1	0.0	0.11	0.13	0.46	4.18	6.25	6.16	5.69	5.21	2.92	1.52	0.39	0.0	0.04	0.07	0.12	0.48	1.04	1.57	1.63	1.73	1.43	0.92	0.32
2	0.0	0.24	0.30	0.32	0.37	5.54	5.11	5.14	4.41	2.98	1.73	0.64	0.0	0.07	0.09	0.12	0.14	0.43	0.90	1.15	1.21	1.12	0.72	0.32
3	0.0	0.97	0.76	3.12	3.77	4.56	4.91	4.70	3.93	2.25	1.20	0.65	0.0	0.20	0.25	0.59	1.25	1.70	1.93	2.35	2.11	1.72	0.81	0.33
4	0.0	0.53	2.16	2.57	4.02	5.63	5.84	5.49	5.37	4.43	1.58	3.43	0.0	0.08	0.53	0.71	1.08	1.22	1.58	1.46	1.42	1.07	0.65	0.71
5	0.0	2.07	3.56	3.70	3.57	5.21	5.19	5.05	4.71	4.95	3.35	1.76	0.0	0.21	0.65	0.65	1.04	0.87	1.48	1.64	1.70	1.74	1.29	0.87
6	0.0	7.26	9.15	7.83	5.72	4.93	3.46	2.42	1.88	0.78	0.35	0.25	0.0	1.02	2.33	2.78	2.45	1.92	2.09	1.75	1.46	0.79	0.48	0.22
7	0.0	0.79	9.89	8.60	7.95	7.33	6.61	5.46	5.13	3.33	2.11	0.51	0.0	0.14	0.38	0.78	1.01	1.01	0.91	1.02	0.85	0.77	0.55	0.27
8	0.0	5.96	9.72	9.02	7.39	6.36	6.82	5.44	4.35	3.39	2.25	1.07	0.0	0.84	2.01	2.37	2.24	2.00	1.92	1.74	1.60	1.22	0.87	0.34
9	0.0	3.47	4.77	9.38	8.15	6.61	5.67	5.17	4.18	2.60	1.46	0.50	0.0	0.26	0.62	0.91	1.49	1.43	1.42	1.02	0.74	0.63	0.38	0.11
10	0.0	0.69	0.88	3.71	5.65	4.27	3.66	2.90	2.48	1.34	0.81	0.41	0.0	0.13	0.18	0.48	1.20	1.47	1.35	1.08	0.92	0.59	0.42	0.13
Mean	0.0	2.21	4.13	4.87	5.08	5.67	5.34	4.75	4.16	2.90	1.64	0.96	0.0	0.30	0.71	0.95	1.24	1.31	1.52	1.48	1.37	1.11	0.71	0.36
SD	0.0	2.54	4.04	3.52	2.40	0.97	1.13	1.14	1.15	1.27	0.82	0.97	0.0	0.34	0.80	0.90	0.70	0.49	0.40	0.43	0.44	0.42	0.28	0.24



รูปที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่
เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

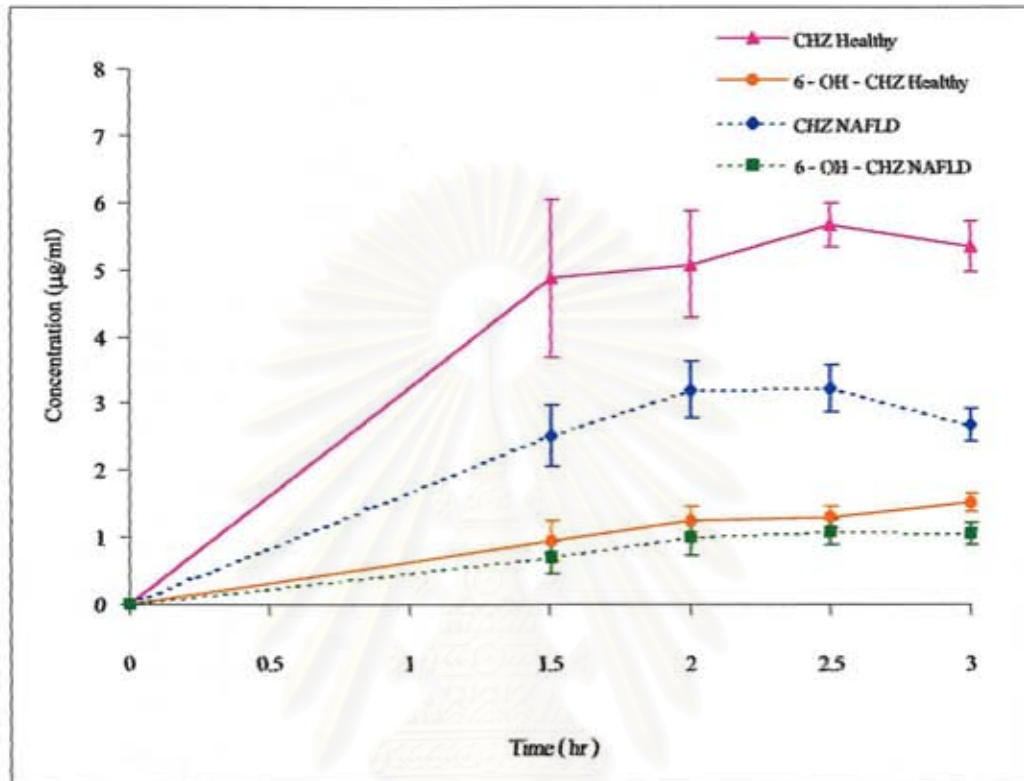
ตารางที่ 20 แสดงค่าเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดี

No.	C_{max} ($\mu\text{g} / \text{ml}$)		T_{max} (hr)		$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr} / \text{ml}$)		$T_{1/2}$ (hr)		Cl of CHZ (L / hr)	Vd of CHZ (L)
	CHZ	6-OH-CHZ	CHZ	6-OH-CHZ	CHZ	6-OH-CHZ	CHZ	6-OH-CHZ		
1	6.25	1.73	2.5	4.0	21.63	7.54	1.12	1.30	18.49	29.99
2	5.54	1.21	2.5	4.0	19.51	5.66	1.59	1.69	20.50	46.95
3	4.91	2.35	3.0	3.5	20.24	9.73	1.27	1.56	19.76	36.23
4	5.84	1.58	3.0	3.0	32.99	10.57	1.13	3.32	12.13	19.85
5	5.21	1.74	2.5	5.0	34.54	11.99	2.01	2.30	11.58	33.59
6	9.15	2.78	1.0	1.5	23.80	10.52	1.25	1.65	16.81	30.23
7	9.89	1.01	1.0	3.5	35.49	5.92	1.82	2.03	11.27	29.63
8	9.72	2.37	1.0	1.5	39.44	12.14	1.87	3.05	10.14	27.38
9	9.38	1.49	1.5	2.0	31.03	5.63	1.37	1.17	12.89	25.45
10	5.65	1.47	2.0	2.5	16.58	5.25	1.49	1.40	24.13	51.98
Mean	7.15	1.77	2.00	3.05	27.52	8.50	1.49	1.95	15.77	33.13
SD	2.09	0.56	0.82	1.17	8.05	2.78	0.32	0.73	4.81	9.75

ตารางที่ 21 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมงของ
กลุ่มผู้ป่วย NAFLD

No.	CHZ ($\mu\text{g/ml}$)					6-OH-CHZ ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	1.5	2	2.5	3	0	1.5	2	2.5	3
1	0.0	3.32	2.84	2.67	2.79	0.0	0.98	1.00	0.93	1.25
2	0.0	4.07	4.40	3.40	2.49	0.0	0.24	0.85	0.89	0.85
3	0.0	0.57	5.55	5.38	3.63	0.0	0.13	1.16	1.40	1.39
4	0.0	4.23	4.25	3.12	2.37	0.0	3.13	3.61	2.95	2.37
5	0.0	4.55	4.30	3.32	2.89	0.0	0.75	0.86	0.77	0.74
6	0.0	4.67	4.01	3.79	2.91	0.0	0.79	0.86	0.83	0.71
7	0.0	0.90	1.91	2.74	1.97	0.0	0.33	0.73	1.62	1.41
8	0.0	1.90	3.91	3.57	3.45	0.0	0.07	0.54	0.67	0.60
9	0.0	2.09	2.10	2.49	2.72	0.0	1.15	1.12	1.12	1.20
10	0.0	0.84	1.48	4.56	3.84	0.0	0.22	0.26	0.79	1.10
11	0.0	2.75	3.41	3.19	2.73	0.0	0.43	0.62	0.70	0.74
12	0.0	0.34	0.38	0.39	0.44	0.0	0.30	0.33	0.35	0.35
Mean	0.0	2.52	3.21	3.22	2.69	0.0	0.71	0.99	1.08	1.06
SD	0.0	1.63	1.49	1.21	0.88	0.0	0.84	0.87	0.68	0.53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบค่า C_{max} และ T_{max} ของ CHZ ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วยNAFLD

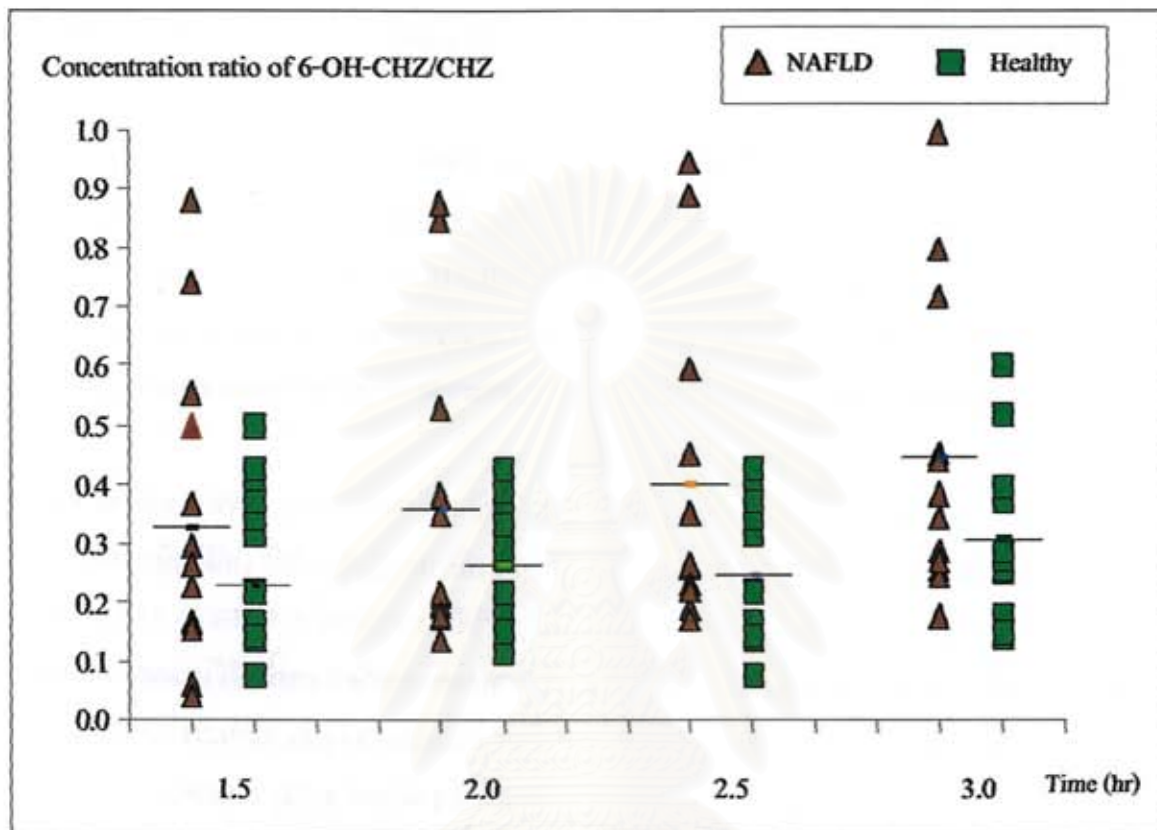
No.	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)		T_{max} (hr)	
	Healthy	NAFLD	Healthy	NAFLD
1	6.25	3.32	2.5	1.5
2	5.54	4.44	2.5	2.0
3	4.91	5.55	3.0	2.0
4	5.84	4.43	3.0	2.0
5	5.21	4.55	2.5	1.5
6	9.15	4.67	1.0	1.5
7	9.89	2.74	1.0	2.5
8	9.72	3.91	1.0	2.5
9	9.38	4.56	1.5	2.5
10	5.65	3.41	2.0	2.0
Mean	7.15	4.16	2.00	2.0
SD	2.09	0.82	0.82	0.41
P value	P < 0.05		P = 1	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

No.	1.5 hr		2 hr		2.5 hr		3 hr	
	Healthy	NAFLD	Healthy	NAFLD	Healthy	NAFLD	Healthy	NAFLD
1	0.26	0.29	0.12	0.35	0.17	0.35	0.25	0.45
2	0.38	0.06	0.39	0.19	0.08	0.26	0.18	0.34
3	0.19	0.23	0.33	0.21	0.37	0.26	0.39	0.38
4	0.27	0.74	0.27	0.85	0.22	0.95	0.27	1.00
5	0.18	0.16	0.29	0.20	0.17	0.23	0.28	0.25
6	0.35	0.17	0.43	0.22	0.39	0.22	0.60	0.24
7	0.09	0.37	0.13	0.38	0.14	0.59	0.14	0.72
8	0.26	0.04	0.30	0.14	0.31	0.19	0.28	0.17
9	0.10	0.55	0.18	0.53	0.22	0.45	0.25	0.44
10	0.13	0.26	0.21	0.17	0.34	0.17	0.37	0.29
11	-	0.16	-	0.18	-	0.22	-	0.27
12	-	0.88	-	0.88	-	0.89	-	0.80
Mean	0.22	0.33	0.26	0.36	0.24	0.40	0.30	0.45
SD	0.10	0.27	0.10	0.26	0.11	0.27	0.13	0.26
P value	P = 0.26		P = 0.30		P = 0.10		P = 0.11	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 1.5 ถึง 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วย NAFLD และกลุ่มคนสุขภาพดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาสำหรับงานวิจัยนี้พัฒนาจากวิธีการศึกษาของ Frye RF. และคณะ(45) และ Mishin VM. และคณะ(53) โครมาโตแกรมที่ได้จากการศึกษาพบว่า peak ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ไม่ถูกรบกวนด้วย peak อื่นใดในพลาสมา นอกจากนี้ peak ดังกล่าวยังแยกจาก peak ของ 3-aminophenyl sulfone ซึ่งเป็น internal standard อย่างชัดเจน วิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ CHZ ในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้คือ 0.125 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร มีค่า %RSD เท่ากับ 9.97% และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6-OH-CHZ ในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้คือ 0.125 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร มีค่า %RSD เท่ากับ 5.27% ซึ่ง %RSD ของระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมามีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และได้ค่าความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากงานวิจัยนี้พบ 7 ตัวอย่างพลาสมาใน 180 ตัวอย่างจากกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่วิเคราะห์พบความเข้มข้นของ CHZ หรือ 6-OH-CHZ มีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งจะคิดเป็น undetectable (UD) โดยวิเคราะห์พบในช่วง 0.5 ถึง 1.5 และ 8 ชั่วโมงหลังรับประทานยา ซึ่งเป็นช่วงเริ่มการดูดซึมยาและช่วงปลายที่ยาถูกกำจัดออกตามลำดับ จึงเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความไวเพียงพอและเหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาแสดงด้วยค่า %RSD พบว่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาในวันเดียวกันมีค่าเฉลี่ย %RSD เท่ากับ $4.13 \pm 4.06\%$ และ $5.16 \pm 2.44\%$ ตามลำดับ ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาในต่างวันกันมีค่าเฉลี่ย %RSD เท่ากับ $9.05 \pm 2.49\%$ และ $12.49 \pm 3.30\%$ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่เกิน 15% วิธีวิเคราะห์นี้จึงเป็นวิธีที่มีความเที่ยงตรง

ความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของ %accuracy พบว่ามีค่าเฉลี่ย %accuracy ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเท่ากับ 97.06 ± 4.98 และ 94.59 ± 5.78 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ 85 - 115% วิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับได้ การหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดแสดงในรูป %recovery พบว่ามีค่าเฉลี่ย %recovery ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเท่ากับ 68.89 ± 4.87 และ 85.00 ± 16.11 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับประมาณ 70 - 80% เนื่องจากการสกัดสารด้วยวิธีนี้ต้องผ่านหลายขั้นตอน อาทิเช่น ต้องใส่ β -glucuronidase ในตัวอย่างพลาสมาไว้เป็นเวลา 13 ชั่วโมงเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ 6-OH-CHZ ได้สมบูรณ์ ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย acetonitrile

แล้วสกัดแยกด้วย diethyl ether อีกครั้ง จึงทำให้ %recovery ที่ได้ไม่ถึง 100% แต่ก็อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยเกณฑ์ทั่วไป คือ 60 – 100% วิเคราะห์นี้จึงมีประสิทธิภาพพอสมควร ในการสกัดสาร

การหาความเป็นเส้นตรงของของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 8 ไมโครกรัม / มิลลิกรัม พบว่ามีค่า coefficient of determination (R^2) ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาเท่ากับ 0.9999 และ 0.9989 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงความเป็นเส้นตรง

จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะ ความไว ถูกต้อง เทียบตรง มีประสิทธิภาพในการสกัด และมีความเป็นเส้นตรง ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ในการหาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาสำหรับงานวิจัยนี้

การประเมินการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับ

CHZ เป็นยาคลายกล้ามเนื้อใช้บรรเทาภาวะปวดกล้ามเนื้ออย่างเฉียบพลัน เช่น อาการกล้ามเนื้อหดเกร็ง(38-42) ก่อนข้างมีความปลอดภัย ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้เช่น ง่วงซึม คลื่นไส้ วิงเวียน(39,40) การเปลี่ยนแปลง CHZ เกิดขึ้นในตับด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการเปลี่ยนแปลง CHZ เนื่องจากเอนไซม์อื่น ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP3A มีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลง CHZ น้อยกว่า 2% ของการเปลี่ยนแปลง CHZ ทั้งหมด(49) CHZ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ไปเป็น 6-OH-CHZ ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์หลักอย่างเดี่ยวของ CHZ จากนั้นเกิดปฏิกิริยา glucuronidation และขับออกไปกับปัสสาวะ(45-47) มีหลายงานวิจัยได้นำ CHZ มาใช้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับ และปัจจุบัน CHZ ได้รับการยอมรับว่าสามารถใช้เป็น probe ในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในตับคนได้(10,47)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นของทั้ง CHZ และ 6-OH-CHZ ได้ในตัวอย่างเลือด แต่ในปัสสาวะสามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ ได้เพียงอย่างเดียว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ปริมาณ CHZ ที่ใช้รับประทานเพื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีหลายขนาดด้วยกัน ได้แก่ 750 มิลลิกรัม(10,53), 500 มิลลิกรัม(7,30), 250 มิลลิกรัม(45,55) และ 200 มิลลิกรัม(56,57) และขนาดที่ใช้ในการรักษา คือ 500 มิลลิกรัมต่อครั้ง ไม่เกิน 3 ถึง 4 ครั้งต่อวัน(40) การให้ CHZ 200 มิลลิกรัม เป็นปริมาณน้อยที่สุดที่พบในรายงานการศึกษา แต่เพื่อป้องกันการตรวจไม่พบระดับยา CHZ และ 6-OH-CHZ ด้วยปริมาณยาที่ให้น้อยเกินไป และเพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นได้กับอาสาสมัครถ้าหากใช้ยา CHZ มากเกินไป งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ CHZ (Maselax[®]) 2 เม็ด มี CHZ ปริมาณ 400 มิลลิกรัม แก้อาสาสมัครแต่ละราย

มีรายงานแตกต่างกันออกไปในการใช้ค่าที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญของ CHZ ที่จะนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้แก่ ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของ CHZ และ 6-OH-CHZ ค่า oral clearance (Cl) ของ CHZ ค่า 6-OH-CHZ renal excretion ค่า fractional clearance ของ 6-OH-CHZ และค่า AUC ของ CHZ และ 6-OH-CHZ (7,53,55) ซึ่ง fractional clearance ของ 6-OH-CHZ เป็นวิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 โดยตรงที่สุด(7) เพราะเป็นการวัดค่า clearance ที่ละเอียด โดยต้องใช้ข้อมูลค่า AUC $_{0-\infty}$ ของ CHZ ระดับความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ ที่ตรวจวัดได้จากปัสสาวะ และปริมาณยาที่รับประทาน(47,48) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ต้องใช้เวลานาน ไม่ค่อยสะดวกเนื่องจากต้องเก็บตัวอย่างปัสสาวะ โดยการคาสาย catheter ใวนานถึง 12 ชั่วโมง นอกจากค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ เหล่านี้แล้วยังได้มีการใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ มาเป็นดัชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ด้วย(7) การใช้ค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้เนื่องจากจะแสดงถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลง CHZ ไปเป็น 6-OH-CHZ ถ้า CYP2E1 มีการทำงานสูงก็จะเปลี่ยน CHZ ไปเป็น 6-OH-CHZ ได้มาก อัตราส่วนของ 6-OH-CHZ / CHZ ก็จะมาก การใช้อัตราส่วนของ 6-OH-CHZ / CHZ ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 มีความแตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา ในปริมาณของ CHZ และเวลาที่ใช้ตรวจวัด เช่น งานวิจัยของ Girte และคณะในปี ค.ศ. 1994 และงานวิจัยของ Lucas และคณะในปี ค.ศ. 1999 วัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ หลังรับประทาน CHZ ปริมาณ 500 มิลลิกรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง(7) Chen และคณะใช้ปริมาณ CHZ 200 มิลลิกรัม และวัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่ 4 ชั่วโมงหลังรับประทานยา(57) ส่วนรายงานของ Nolin และคณะได้แสดงว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ หลังรับประทาน CHZ 2 - 4 ชั่วโมง สามารถใช้ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้(49) และในการศึกษาของ Lucas และคณะในปี 1993 ใช้ปริมาณ CHZ 500 มิลลิกรัม วัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่ 1 และ 1.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยา ซึ่งเป็นเวลาที่มีระดับความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในเลือดของอาสาสมัครสูงที่สุด เนื่องจากการวัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ณ เวลาที่มีระดับความเข้มข้นในเลือดสูงสุดนี้อาจจะช่วยขจัดความหลากหลายอันเนื่องมาจากความแตกต่างในการดูดซึม CHZ หรือปริมาตรการกระจายตัว (volume of distribution) ของ CHZ ได้(46) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ในการวัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ในช่วงเวลาที่ระดับความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในเลือดสูงเป็นดัชนีชี้วัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 โดยจะศึกษาหาช่วงเวลาที่มีระดับความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในเลือดสูงจากกลุ่มคนสุขภาพดี แล้วเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่ช่วงเวลานั้น เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ให้น้อยที่สุด

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้พบค่า T_{max} ของ CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีอยู่ในช่วง 1 - 3 ชั่วโมง หลังรับประทานยา มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 2 ชั่วโมง โดยที่ 2.5 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของ CHZ ในคนสุขภาพดีแต่ละรายสูงสุด ซึ่งช้ากว่าในรายงานการศึกษาจากต่างประเทศที่พบระดับยาสูงสุดในพลาสมาอยู่ภายในระยะ

เวลาประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง(39-41) จากงานวิจัยพบค่า $t_{1/2}$ ของ CHZ เท่ากับ 1.49 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับรายงานการศึกษาจากต่างประเทศคือมี $t_{1/2}$ ของ CHZ ประมาณ 1 - 2.8 ชั่วโมง(42) และพบว่าค่า T_{max} ของ 6-OH-CHZ ของกลุ่มคนสุขภาพดีอยู่ในช่วง 1.5 - 5 ชั่วโมงหลังรับประทานยา มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 3 ชั่วโมง และช่วง 1.5 - 3 ชั่วโมง มีระดับความเข้มข้นสูงใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยจึงได้เลือกเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วย NAFLD ที่เวลา 0 คือก่อนรับประทานยา และที่เวลา 1.5 - 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยา

จากสมมติฐานพยากรณ์กำเนิดของ NAFLD พบว่าผู้ป่วย NAFLD น่าจะมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 มากกว่าคนสุขภาพดี เนื่องจากผู้ป่วย NAFLD จะมีกรดไขมันอิสระเข้าสู่ตับเพิ่มมากขึ้น และกรดไขมันอิสระก็มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้ ซึ่งถ้ามีการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 เพิ่มขึ้นก็น่าจะมีผลทำให้ระดับความเข้มข้นของ CHZ ในผู้ป่วยน้อยกว่าคนปกติ เพราะเกิดการเปลี่ยนแปลง CHZ ได้มากขึ้น จากการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษา ระดับความเข้มข้นของ CHZ ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD พบค่า C_{max} ของ CHZ ในผู้ป่วย NAFLD แต่ละรายมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มคนสุขภาพดี คือ 4.16 และ 7.15 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานว่าผู้ป่วย NAFLD มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 เพิ่มขึ้นมากกว่าคนสุขภาพดี

แต่อย่างไรก็ตามค่า C_{max} เป็นค่าที่ถูกปัจจัยรบกวนได้ด้วยความสามารถในการดูดซึมยา การกระจายตัวของยา จึงไม่ได้บอกค่าการทำงานของเอนไซม์ได้โดยตรง แต่การใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ จะบอกถึงปริมาณการเปลี่ยนแปลง CHZ ไปเป็น 6-OH-CHZ ได้ จึงใช้แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ได้ตรงกว่า จากผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD จะมีค่ามากกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีในทุกเวลาที่ศึกษา แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ โดยเวลาที่มีความแตกต่างของค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ในกลุ่มคนสุขภาพดีกับกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มากที่สุด คือ ที่ 2.5 ชั่วโมง ($P = 0.10$) ค่าอัตราส่วนที่ไม่แตกต่างกันที่ $P < 0.05$ แต่ต่างกันที่ $P = 0.10$ อาจเพราะว่ากลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาบ่อยเกินไป และมีความแตกต่างของความรุนแรงของโรค NAFLD ซึ่งจากบทนำแสดงให้เห็นว่ามีความต่างของความรุนแรงของโรคเป็นหลายระดับ จึงทำให้ผลของการวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 มีความหลากหลายมาก

จากข้อมูลอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลาต่างๆ ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 และการที่มีค่า C_{max} ของ CHZ แตกต่างกันระหว่างกลุ่มคนสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วย NAFLD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการวิจัยครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในผู้ป่วย NAFLD มีแนวโน้มมากกว่าคนสุขภาพดี

สรุปผลการทดลอง

1. การหาความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมา โดยวิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่เชื่อถือได้ มีความถูกต้อง แม่นยำ สามารถนำมาใช้งานได้
2. จากผลการศึกษาในกลุ่มคนสุขภาพดีพบค่า C_{max} ของ CHZ และ 6-OH-CHZ เท่ากับ 7.15 และ 1.77 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า T_{max} ของ CHZ และ 6-OH-CHZ เท่ากับ 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า $AUC_{0-\infty}$ ของ CHZ และ 6-OH-CHZ มีค่า 27.52 ± 8.5 และ 8.50 ± 2.78 ไมโครกรัม.ชั่วโมง / มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า $t_{1/2}$ ของ CHZ และ 6-OH-CHZ เท่ากับ 1.5 และ 2.0 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า Cl ของ CHZ เท่ากับ 15.8 ลิตร / ชั่วโมง และค่า Vd ของ CHZ เท่ากับ 33.13 ± 9.75 ลิตร ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ของ CHZ ในคนต่อไปได้
3. อัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีในทุกเวลาที่ศึกษา โดยที่เวลา 2.5 ชั่วโมงมีความแตกต่างกันมากที่สุด ($P = 0.10$) ระหว่างคนสองกลุ่ม

ข้อเสนอแนะ

1. อัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD มีค่ามากกว่ากลุ่มคนสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นผลจากกลุ่มประชากรน้อยเกินไปจึงควรใช้กลุ่มคนให้มากกว่านี้
2. น่าจะศึกษา profile ของ CHZ ที่เวลา 0 ถึง 8 ชั่วโมงในผู้ป่วยที่ยินยอมเพื่อให้ได้ค่า C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, Cl, Vd และ AUC เพิ่มเติม
3. ค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ที่เวลา 2.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยา ระหว่างคนสองกลุ่มมีความแตกต่างกันมากที่สุดแม้ว่าจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.10$) น่าจะเป็นไปได้ว่าการวัดอัตราส่วนความเข้มข้นของ 6-OH-CHZ / CHZ ณ เวลานี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ประเมินผลการทำงานของตับ ประกอบกับผลตรวจทางคลินิกอื่นๆ เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วย NAFLD ได้



รายการอ้างอิง

1. Wang, Z.; Hall, S. D.; Maya, J. F.; Li, L.; Asghar, A.; and Gorski, J. C. Diabetes mellitus increases the *in vivo* activity of cytochrome P450 2E1 in humans. Br. J. Clin. Pharmacol. 55 (2003): 77-85.
2. Nelson, D. Cytochrome P450 (CYP)[Online]. 2000. Available from:
<http://www.anaesthetist.com/physiol/basics/metabol/cyp/cyp.htm>[2004, June]
3. Tanaka, E.; Terada, M.; and Misawa, S. Cytochrome P450 2E1 : its clinical and toxicological role. J. Clin. Phar. Ther. 25 (2000): 165-175.
4. Zimmerman, H. J. Hepatotoxicity. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1999.
5. Raucy, J., and Carpenter, S. P. CYP2E1. In R. H. Levy; K. E. Thummel; W. F. Trager; P. D. Hansten; and M. Eichelbaum (eds.), Metabolic drug interactions, pp. 95-114. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000.
6. Draper, A. J.; Madan, A.; Latham, J.; and Parkinson, A. Development of a non-high pressure liquid chromatography assay to determine [¹⁴C] chlorzoxazone 6-hydroxylase (CYP2E1) activity in human liver microsomes. Drug Meta. and Disp. 26 (1998): 305-312.
7. Haufroid, V.; Buchet, J. P.; Gardinal, S.; and Lison, D. Cytochrome R4502E1 phenotyping by the measurement of the chlorzoxazone metabolic ratio : assessment of its usefulness in workers exposed to styrene. Int. Arch. Occup. Environ. Health 75 (2002): 453-458.
8. Ernstgard, L.; Warholm, M.; and Johanson, G. Robustness of Chlorzoxazone as an *in vivo* measure of cytochrome P450 2E1 activity. Br. J. Clin. Pharmacol. 58 (2004): 190-200.
9. Roop, D. R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6 (1992): 724-730.
10. Emery, M. G.; Fisher, J. M.; Chien, J. Y.; Kharasch, E. D.; Dellinger, E. P.; Kowdley, K. V.; and Thummel, K. E. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 38 (2002): 428-435.
11. Gonzalez, F. J. Role of cytochrome P450 in chemical toxicity and oxidative stress : studies with CYP2E1. Mutat. Res. 569 (2005): 101-110.
12. Grant, L. M.; and Lisker-Melman, M. Nonalcoholic fatty liver disease. Ann. Hepatol. 3 (2004): 93-99.
13. Yu, A. S.; and Keeffe, E. B. Nonalcoholic fatty liver disease. Rev. Gastroenterol. Disord. 2 (2002): 11-19.

14. Machado, M.; and Cortez-Pinto, H. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 17 (2005): 823-826.
15. Mehta, K.; Van Thiel, D. H.; Shah, N.; and Mobarhan, S. Nonalcoholic fatty liver disease : pathogenesis and the role of antioxidant. Nutr. Rev. 60 (2002): 289-293.
16. Browning, J. D.; and Horton, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J. Clin. Invest. 114 (2004): 147-152.
17. Harrison, S. A.; Kadakia, S.; Lang, K. A.; and Schenker, S. Nonalcoholic steatohepatitis : what we know in the new millennium. Am. J. Gastroenterol. 97 (2002): 2714-2724.
18. Russo, M. W.; and Jacobson, I. M. Nonalcoholic fatty liver disease. Hospital Physician 67 (2002): 36-41.
19. Patrick, L. Nonalcoholic fatty liver disease : relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. Altern. Med. Rev. 7 (2002): 276-291.
20. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. N. Engl. J. Med. 346 (2002): 1221-1231.
21. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease[Online]. Available from:
http://www.omge.org/publications/archive/2001_3/quad/quad1.htm[2003, December]
22. Reid, A. E. Nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 121 (2001): 710-723.
23. Pessayre, D.; Berson, A.; Fromenty, B.; and Mansouri, A. Mitochondria in steatohepatitis. Semin. Liver Dis. 21 (2001): 57-69.
24. Pessayre, D.; Mansouri, A.; and Fromenty, B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. AJP-Gastrointest. Liver Physiol. 282 (2002): 193-199.
25. Lieber, C. S. CYP2E1 : from ASH to NASH. Hepatol. Res. 28 (2004): 1-11.
26. Sligte, K.; Bourass, I.; Sels, J. P.; Driessen, A.; Stockbrugger, R. W.; and Koek, G. H. Non-alcoholic steatohepatitis : review of a growing medical problem. Eur. J. Int. Med. 15 (2004): 10-21.
27. Adam, L. A.; Angulo, P.; and Lindor, K. D. Nonalcoholic fatty liver disease. CMAJ. 172 (2005): 899-905.
28. Collantes, R.; Ong, J. P.; and Younossi, Z. M. Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic of obesity. Cleve. Clin. J. of Med. 71 (2004): 657-664.
29. Oneta, C. M.; and Dufour, J. F. Non-alcoholic fatty liver disease : treatment options based on pathogenic considerations. Swiss. Med. WKLY. 132 (2002): 493-505.

30. Chalasani, N.; Gorski, J. C.; Asghar, M. S.; Asghar, A.; Foresman, B.; Hall, S. D.; and Crabb, D. W. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37 (2003): 544-550.
31. Leclercq, I. A. Antioxidant defence mechanisms : new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis?. *Clin. Sci.* 106 (2004): 253-237.
32. Weltman, M. D.; Farrell, G. C.; and Liddle, C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 111 (1996): 1654-1653.
33. Weltman, M. D.; Farrell, G. C.; Hall, P.; Ingelman-Sundberg, M.; and Liddle, C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27 (1998): 128-133.
34. Younossi, Z. M.; Diehl, A. M.; and Ong, J. P. Nonalcoholic fatty liver disease : an agenda for clinical research. *Hepatology* 35 (2002): 746-752.
35. Mendler, M. Fatty liver : nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[Online]. Schoenfield, L. J., 2005. Available from: http://www.medicinenet.com/fatty_liver/article.htm[2005, September]
36. McCullough, A. J. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 34 (2002): 255-262.
37. Jonas, M. M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Adolesc. Med.* 15 (2004): 159-173.
38. Wishart, D. Drug bank chlorzoxazone[Online]. Available from: <http://www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=APRD00308.txt> [2005, September]
39. The comprehensive resource for physicians, drug and illness information[Online]. Available from: [http://www.rxmed.com/b_main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monograph\)](http://www.rxmed.com/b_main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20(General%20Monograph))[2003, November]
40. Parafon forte[®] DSC (chlorzoxazone)[Online]. Ortho-Mcneil, Inc. Available from: <http://www.ortho-mcneil.com/products/pi/pdfs/parafon.pdf>[2003, December]
41. Drug information chlorzoxazone[Online]. Available from: <http://www.mdbrowse.com/Druginf/c/chlorzoxaone.htm>[2004, February 4]
42. Chlorzoxazone and acetaminophen (systemic)[Online]. Available from: http://www.drugs.com/MMX/Chlorzoxazone_and_Acetaminophen.html[2005, September]

43. Leclercq, I.; Horsmans, Y.; and Desager, J. P. Estimation of chlorzoxazone hydroxylase activity in liver microsomes and of the plasma pharmacokinetics of chlorzoxazone by the same high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. A* 828 (1998): 291-296.
44. Cytochrome P450 isoform-specific *in vitro* methods to predict drug metabolism and interactions [Online]. Oulu university library, 2000. Available from:
<http://www.herkules.oulu.fi/isbn9514259009/html/i412252.html>[2005, September]
45. Frye, R. F.; and Stiff, D. D. Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 686 (1996): 291-96.
46. Lucus, D.; Berthou, F.; Girre, C.; Poitrenaud, F.; and Menez, J. F. High-performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in serum : a tool for indirect evaluation of cytochrome P4502E1 activity in humans. *J. Chromatogr.* 622 (1993): 79-86.
47. Kramer, I.; Dalhoff, K.; Clemmsen, J. O.; Loft, S.; and Poulsen, H. E. Comparison of chlorzoxazone one-sample methods to estimate CYP2E1 activity in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59 (2003): 775-778.
48. Dreisbach, A. W.; Ferencz, M.; Hopkins, N. E.; Fuentes, M. G.; Rege, A. B.; George, W. J.; and Lertora, J. J. L. Urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone as an index of CYP2E1 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 58 (1995): 498-505.
49. Nolin, T. D.; Gastonguay, M. R.; Bies, R. R.; Matzke, G. R.; and Frye, R. F. Impaired 6-hydroxychlorzoxazone elimination in patients with kidney disease : Implication for cytochrome P450 2E1 pharmacogenetic studies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74 (2003): 555-568.
50. Raucy, J. L.; Schultz, E. D.; Wester, M. R.; Arora, S.; Johnston, D. E.; Omdahl, J. L.; and Carpenter, S. P. Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, A putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity. *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997): 1429-1435.
51. Chlorzoxazone drug information[Online]. Available from:
<http://www.drugs.com/MTM/chlorzoxazone.html>[2003, December]
52. Chlorzoxazone[Online]. Available from:
<http://www.raleys.com/ctapps/healthnotesra/healthnotes.cfm?org=raleys&contentID=1106008>
[2003, December]

53. Mishin, V. M.; Rosman, A.; Basu, P.; Kessova, I.; Oneta, C. M.; and Lieber, C. S. Chlozoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am. J. Gastroenterol.* 93 (1998): 2154-2161.
54. Dilger, K.; Metzler, J.; Bode, J. C.; and Klotz, U. CYP2E1 activity in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 27 (1997): 1009-1014.
55. Clark, J. M.; Brancati, F. L.; and Diehl, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122 (2002): 1649-1657.
56. Tanaka, E. Simultaneous determination of chlorzoxazone, indicator of CYP2E1, and its metabolite in human serum using a new reversed-phase chromatographic column of 2- μ m porous microspherical silical-gel. *J. Pharm. Biomed Anal.* 16 (1998): 899-904.
57. Chen, X.; Tan, Z.; Huang, S.; Huang, Z.; Ou-Yang, d.; and Zhou, H. Isozyme-specific induction of low-dose aspirin on cytochrome P450 in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 73 (2003): 264-271.
58. กรองทอง ชูฉัตร. เกษัชจลนศาสตร์. ใน ยุพิน ตั้งวรินทร์, สุภินันท์ อัญเชิญ, พยงค์ วัฒนเกียรติ, และ นพมาศ วงศ์วิทย์เคชา (บรรณาธิการ), *เภสัชวิทยา*, หน้า 14-27. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2537.
59. ลักขณา ธรรมวิจิตร. *แคล์เฟอินเคลิยร่าจในผู้ป่วยมะเร็งระดับก่อนและหลังการรักษาด้วยวิธีแทรนแค็ทธิเทอะออยล์เคโมเอ็มโบไลเซชัน*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2542.
60. โสภิต ธรรมอารี. หลักทั่วไปในเภสัชวิทยา ตอนที่ 2 เกษัชจลนศาสตร์. ใน คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา (บรรณาธิการ), *เภสัชวิทยา 1*, หน้า 10-54. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ทีเคจีแอนด์เจอร์นัล, 2542.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ใบแสดงการผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



No.240/2004

Study Protocol and Consent Form Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol and informed consent dated and/or amended as follows in compliance with the ICH/GCP.

Study Title : Hepatic CYP2E1 activity in nonalcoholic fatty liver disease

Study Code : -

Centre : Chulalongkorn University

Principle Investigator : Miss Nantaporn Prompila

Protocol Date : March 25, 2004

Document Reviewed : -

.....
(Professor Anek Aribarg, M.D.)
Chairman of Ethics Committee

.....
(Associate Professor. Vilai Chentanez, M.D.)
Associate Dean for Research Affairs

Date of Approval : May 24, 2004

Approval Expire : May 24, 2005

ภาคผนวก ข

แบบฟอร์มกรอกประวัติเพื่อคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย

Code No

วันที่ เวลา

1. ข้อมูลทั่วไป

ชื่อ นามสกุล อายุ ปี
 น้ำหนัก กิโลกรัม, ส่วนสูง เซนติเมตร, อาชีพ, BP mmHg
 สถานที่ทำงาน โทร

2. ประวัติความเจ็บป่วย

ปัจจุบันป่วยเป็นโรคใดหรือไม่ เช่น ไข้หวัด น้ำมูกไหล

โรคประจำตัว โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน
 โรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง โรคกระเพาะ
 โรคไวรัสตับอักเสบ B หรือ C

โรคประจำตัวอื่นๆ (ระบุ)

เคยเข้ารับการผ่าตัดมาก่อนหรือไม่ ไม่ เคย (ระบุ)

เคยได้รับเลือดหรือไม่ ไม่ เคย

3. ประวัติการใช้ยา

ปัจจุบันรับประทานยาใดหรือไม่

ยาที่รับประทานเป็นประจำ

การแพ้ยา

เคยรับประทานยาประเภท steatogenic medications (เช่น systemic prednisone, aminodarone หรือ methotrexate) หรือไม่ ไม่ เคย

4. เคยบริจาคโลหิตหรือไม่ ไม่ เคย

5. ดื่มสุราหรือเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์หรือไม่ ไม่ดื่ม ดื่ม ปริมาณ

6. สูบบุหรี่หรือไม่ ไม่สูบ สูบปริมาณ

7. ท่านสามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ได้หรือไม่ ได้ ไม่ได้

ลงชื่อ ผู้บันทึก

(.....)

ภาคผนวก ก

แบบฟอร์มประวัติการตรวจร่างกายผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (คนสุขภาพดี)

1. Code No.
2. เจาะเลือดตรวจร่างกายวันที่
3. ผลการตรวจร่างกาย (รายงานผลวันที่

Vital signs

Temp°C, Pulse / min, BP mmHg, HR / min

ชนิดของ Lab ที่ส่งตรวจ	ค่าที่ตรวจพบ	ค่าปกติ
FBS		< 110 mg/dl
SGOT		0 – 38 U/L
SGPT		0 – 38 U/L
Alkaline Phosphatase		39 – 117 U/L
Creatinine		0.5 – 2 mg/dl

ลงชื่อ ผู้บันทึก
(.....)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

แบบฟอร์มประวัติการตรวจร่างกายผู้เข้าร่วม โครงการวิจัย (ผู้ป่วย NAFLD)

1. Code No.
 2. ตรวจร่างกายวันที่
 3. ผลการซักประวัติและรายงานผลวันที่
- ปริมาณการบริโภคแอลกอฮอล์ กรัม / วัน
- ลักษณะอาการที่พบ Right upper quadrant pain Fatigue
 Abdominal discomfort Malaise
 Asymptomatic Others
- BP mmHg, HR / min
4. ผลการตรวจร่างกาย
.....
.....
.....
.....
.....
 5. ผลการ liver biopsy ที่พบ Macrovesicular steatosis Mallory bodies
 Lobular inflammation Hepatic iron
 Hepatocyte necrosis Fibrosis
 Ballooning degeneration Cirrhosis
 Grading and staging
 6. การเก็บ clotted blood 6 ml เก็บ ไม่ได้เก็บ
 7. การเก็บ EDTA blood 6 ml เก็บ ไม่ได้เก็บ

8. ผลการวิเคราะห์ทางห้องทดลอง

ชนิดของ Lab ที่ส่งตรวจ	ค่าที่ตรวจพบ	ค่าปกติ
AST		0 – 38 U/L
SGPT		0 - 38 U/L
Alkaline phosphatase		30 - 120 U/L
GGT		0 – 30 U/L
FBS		< 110 mg/dl
Total cholesterol		< 200 mg/dl
Triglyceride		< 150 mg/dl
HDL		40 – 59 mg/dl
Iron saturation		20 – 45%
ANA		< 1 : 20 liter
Antismooth muscle Ab		Negative
HBsAg		Negative
AntiHCV		Negative
Ceruloplasmin		20 – 35 mg/dl
Albumin		40 – 60 g/L
Globulin		2.0 – 3.5 g/dl
TB		0.3 – 1.0 mg/dl
DB		0.1 – 0.3 mg/dl

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลงชื่อ ผู้บันทึก
 (.....)

ภาคผนวก จ

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การทำงานของไซโตโครม พี 450 2 อี 1 ในผู้ป่วยโรคไขมันในตับที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์

วันที่ให้คำยินยอม วันที่ เดือน พ.ศ.

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัยข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้ทำการวิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่บิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วม โครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ และเข้าร่วม โครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกเข้าร่วม โครงการนี้จะไม่เกิดผลเสียใดๆ ต่อข้าพเจ้าเลย

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านและทำความเข้าใจในข้อความทั้งหมดของใบยินยอมครบถ้วนดีแล้ว ทั้งนี้ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ โดยไม่มีการบังคับใดๆ พร้อมทั้งลงลายมือชื่อเพื่อเป็นหลักฐานในการเข้าร่วมโครงการวิจัยดังกล่าว

ลงชื่อ ผู้ยินยอม

(.....)

ลงชื่อ แพทย์ผู้เกี่ยวข้อง

(.....)

ลงชื่อ ผู้ดำเนินการวิจัย

(.....)

ลงชื่อ พยาน

(.....)

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกผลอาการข้างเคียงที่เกิดจากสารทดสอบที่ได้รับ
(Adverse Events Form)

วันที่

Code No.

อาการข้างเคียงจากการรับประทานยา chlorzoxazone ขนาด 400 มิลลิกรัม

อาการ	ระยะเวลาหลังจากได้รับยา
<input type="checkbox"/> คลื่นเหียน (malaise)	
<input type="checkbox"/> วิงเวียน (dizziness)	
<input type="checkbox"/> ง่วงซึม (drowsiness)	
<input type="checkbox"/> ปากแห้ง (dry mouth)	
<input type="checkbox"/> มีผื่นคัน (rash)	
<input type="checkbox"/> ระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal disturbances)	
<input type="checkbox"/> อื่นๆ	
<input type="checkbox"/> ไม่มีอาการใดๆ	

ลงชื่อ ผู้บันทึก

(.....)

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 24 แสดงลักษณะทั่วไปและผลการตรวจสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มคนสุขภาพดี

No.	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ส่วนสูง (ซม.)	BMI (กก./เมตร ²)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Alkaline phosphatase (U/L)
1	27	57	1.67	20.44	18	9	51
2	38	58	1.52	25.10	26	37	60
3	36	62	1.68	21.98	19	18	68
4	37	63	1.58	25.24	27	29	67
5	37	50	1.50	22.22	15	12	66
6	28	61	1.65	22.41	28	14	44
7	26	70	1.75	22.86	14	14	66
8	37	41	1.50	18.22	20	12	54
9	38	54	1.56	22.19	17	11	66
10	34	60	1.55	24.97	28	22	93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

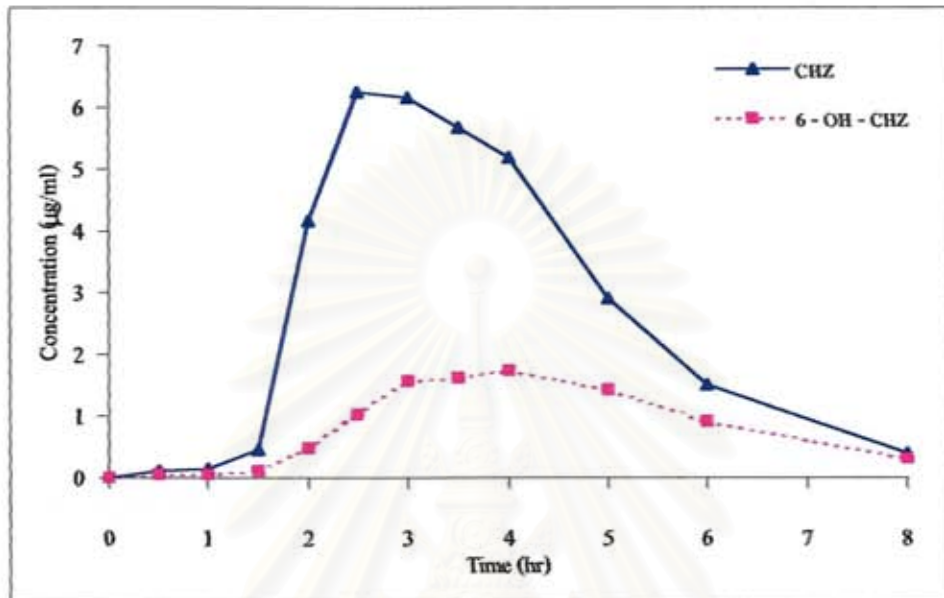
ตารางที่ 25 แสดงลักษณะทั่วไปและผลการตรวจสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD

No.	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ส่วนสูง (ซม.)	BMI (กก./เมตร ²)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Alkaline phosphatase (U/L)
1	60	71.5	1.66	25.95	67	112	78
2	29	89	1.70	30.80	70	121	57
3	46	86	1.81	26.25	35	62	-
4	59	49	1.52	21.21	66	120	117
5	55	65	1.52	28.13	41	64	81
6	46	77	1.72	26.03	38	79	72
7	41	73	1.67	26.18	46	74	80
8	49	74	1.50	32.89	31	42	77
9	39	76	1.76	24.54	29	68	66
10	56	80	1.63	30.11	34	55	86
11	79	70	1.58	28.04	49	40	111
12	43	75	1.80	23.15	35	86	68

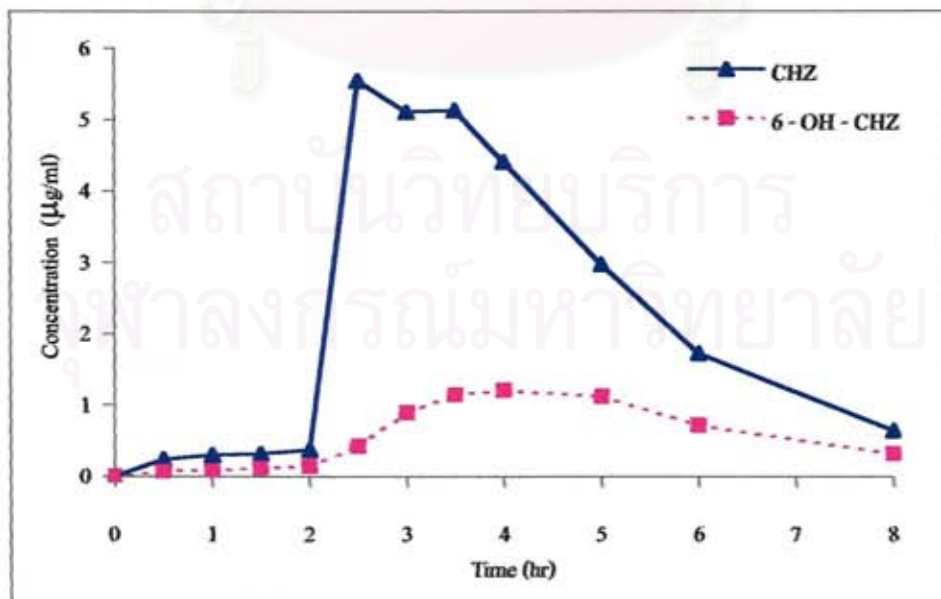
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

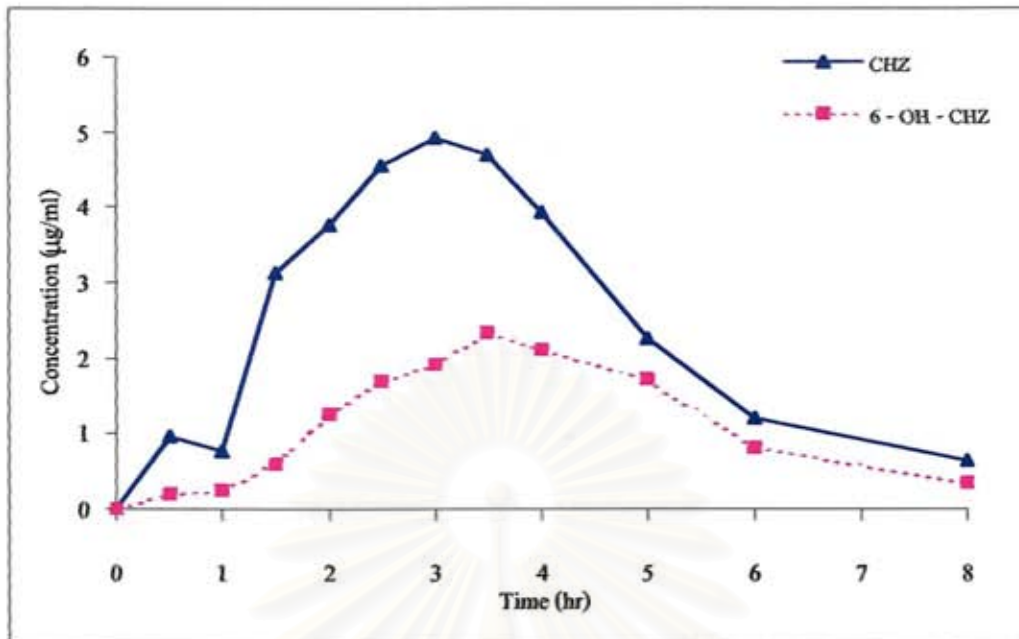
แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของกลุ่มคนสุขภาพดีแต่ละคน



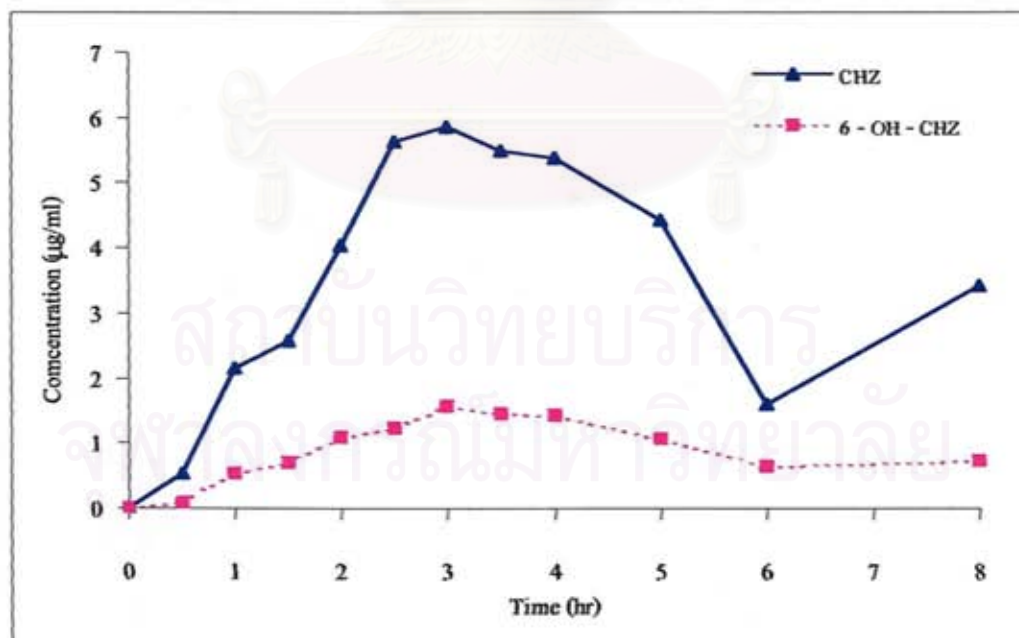
รูปที่ 13 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 1



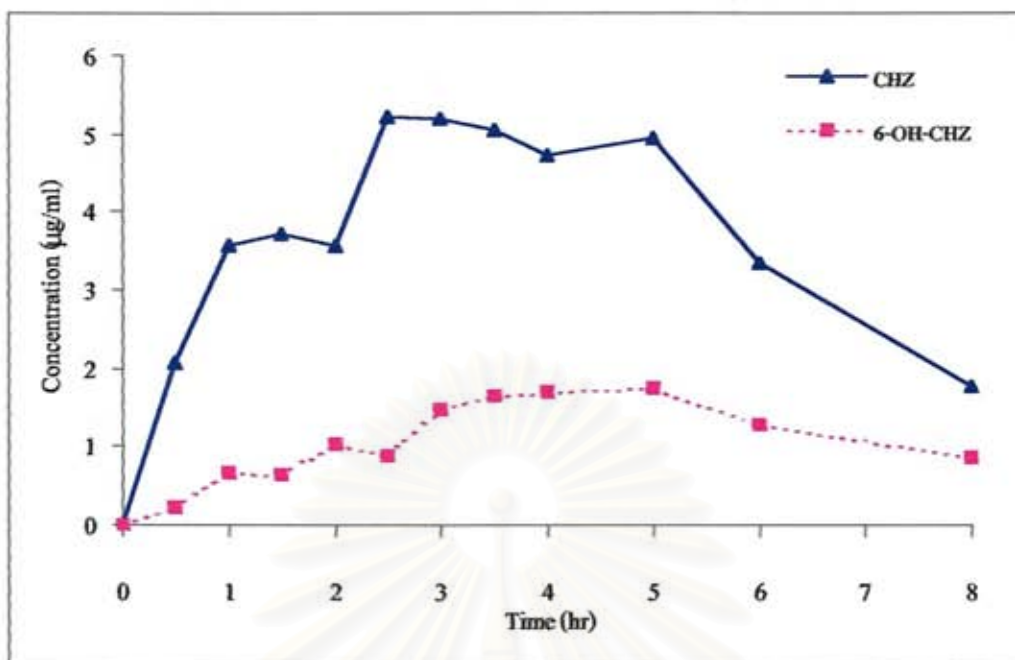
รูปที่ 14 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 2



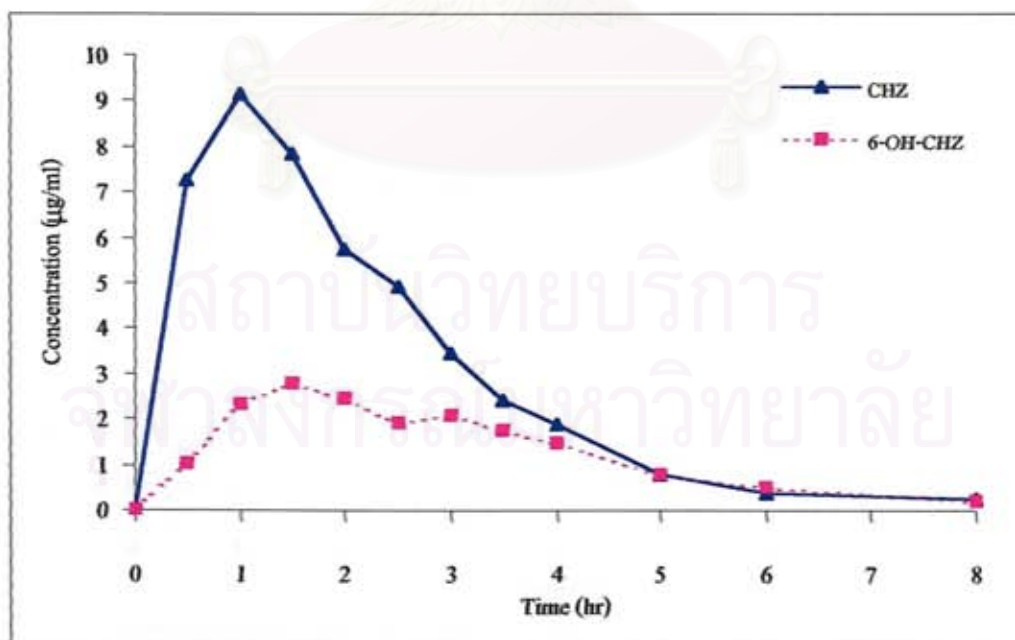
รูปที่ 15 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 3



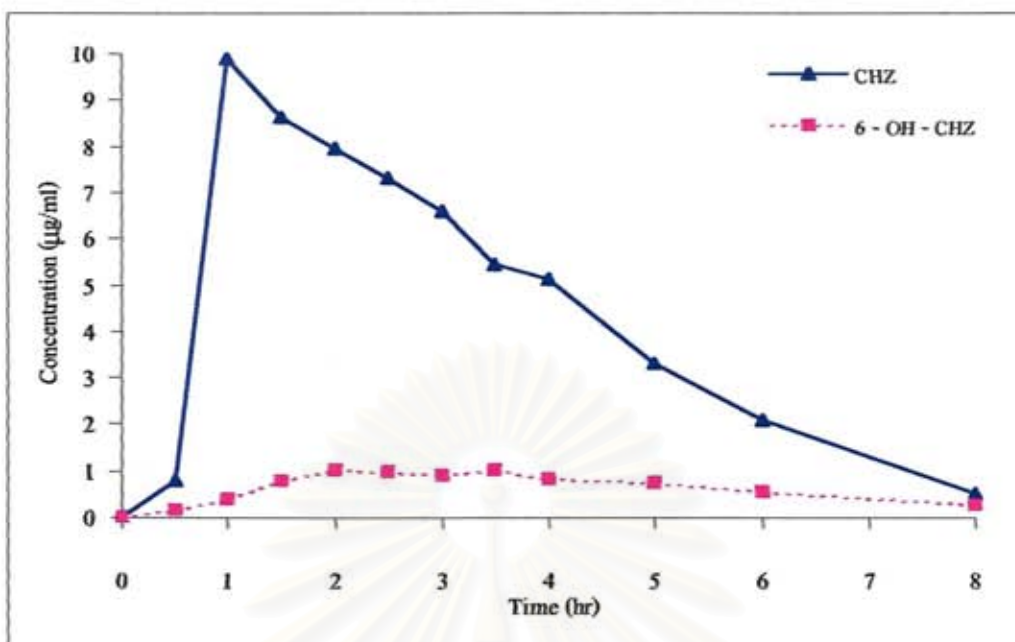
รูปที่ 16 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 4



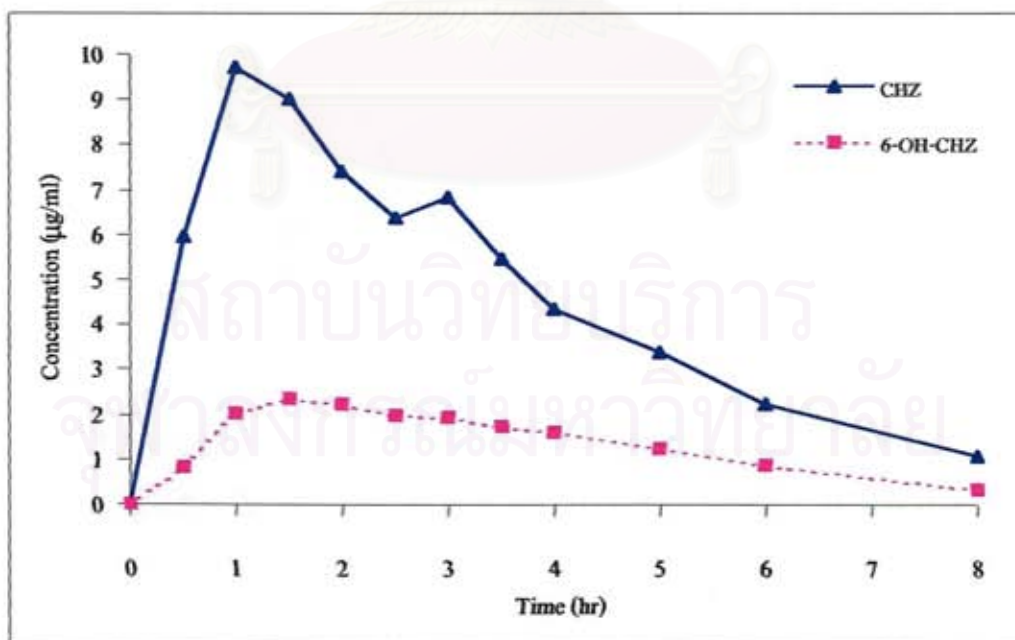
รูปที่ 17 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 5



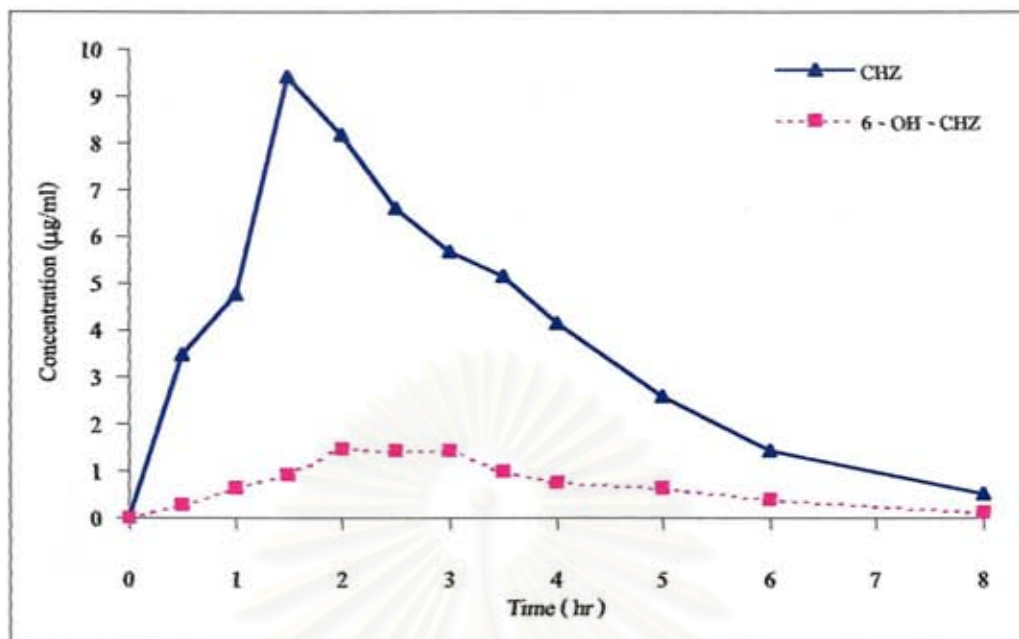
รูปที่ 18 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 6



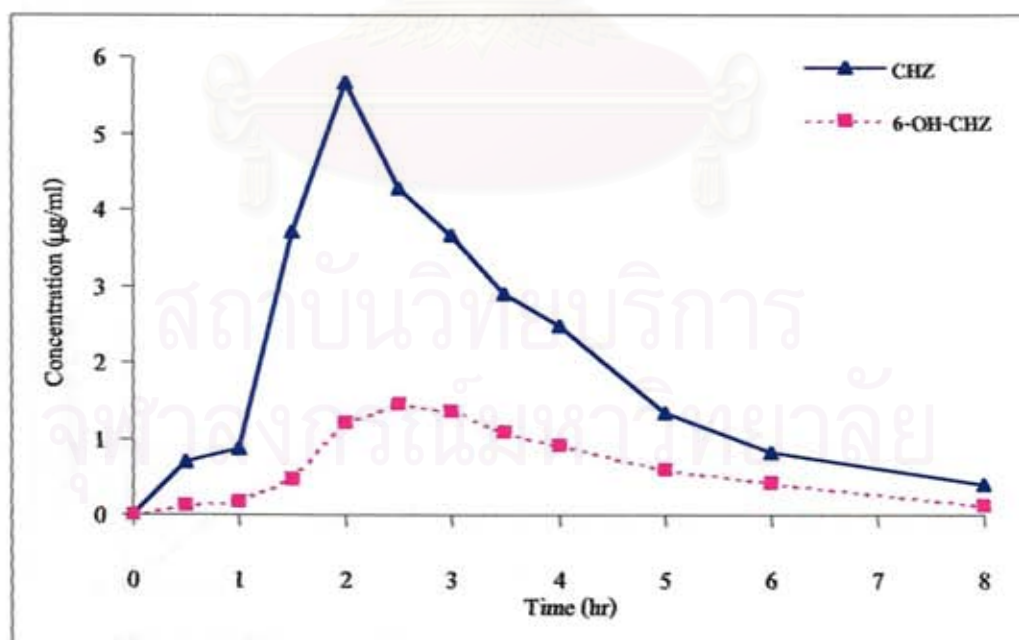
รูปที่ 19 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 7



รูปที่ 20 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 8



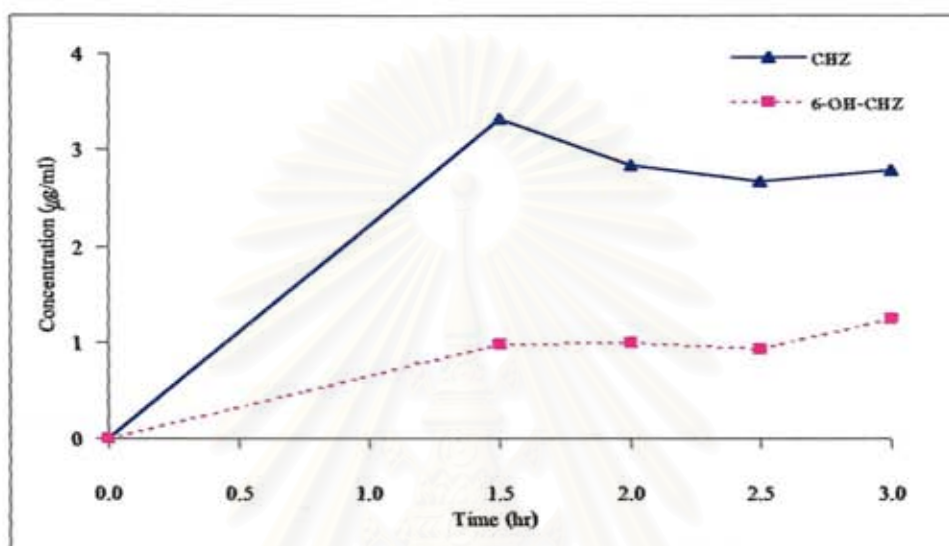
รูปที่ 21 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 9



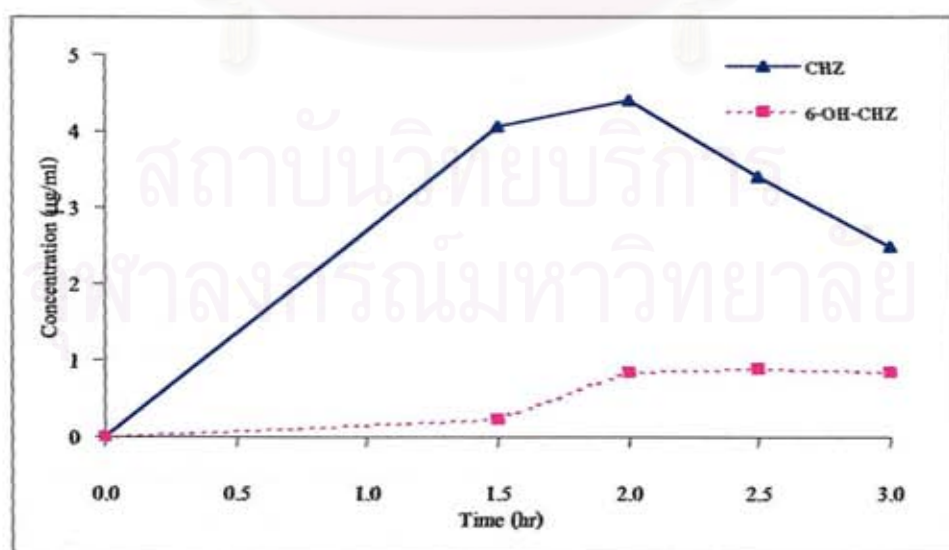
รูปที่ 22 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของคนสุขภาพดีคนที่ 10

ภาคผนวก ฉ

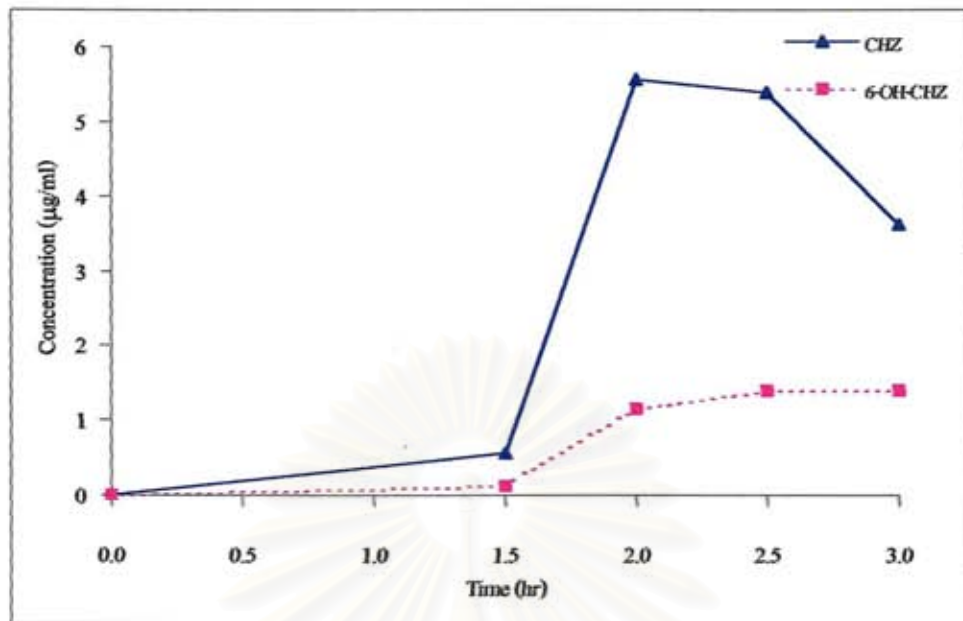
แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วย NAFLD แต่ละคน



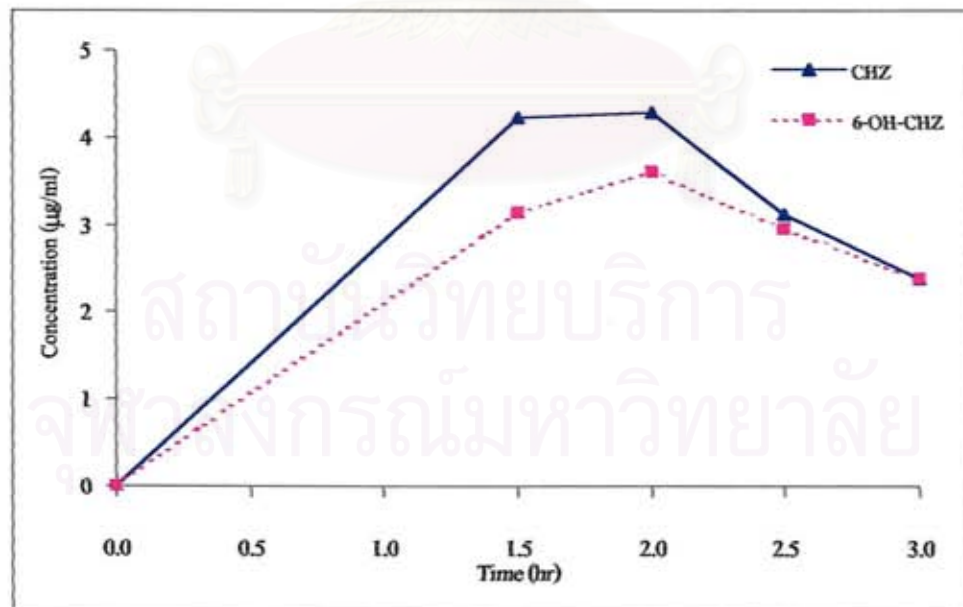
รูปที่ 23 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 1



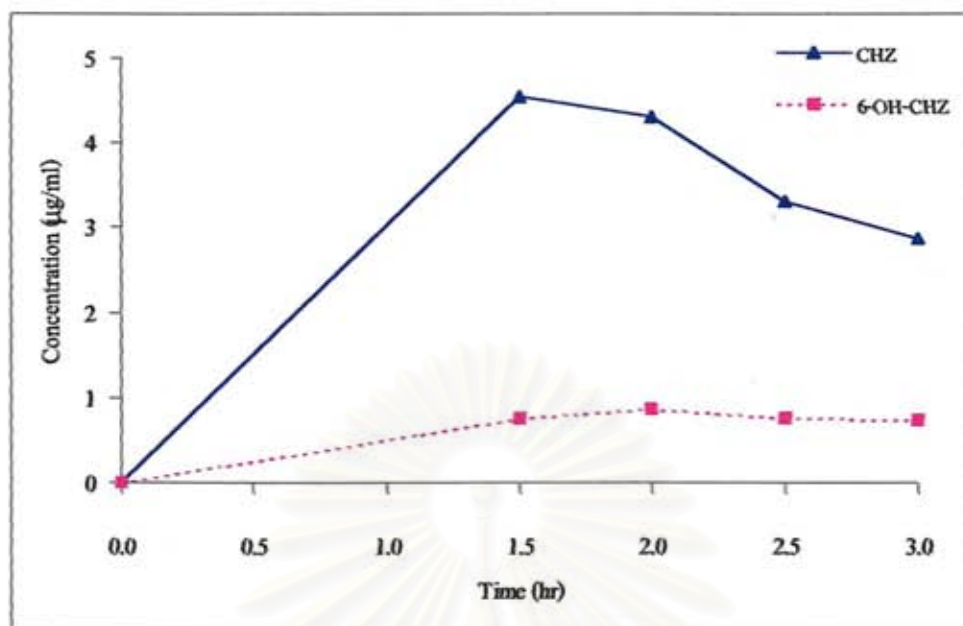
รูปที่ 24 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 2



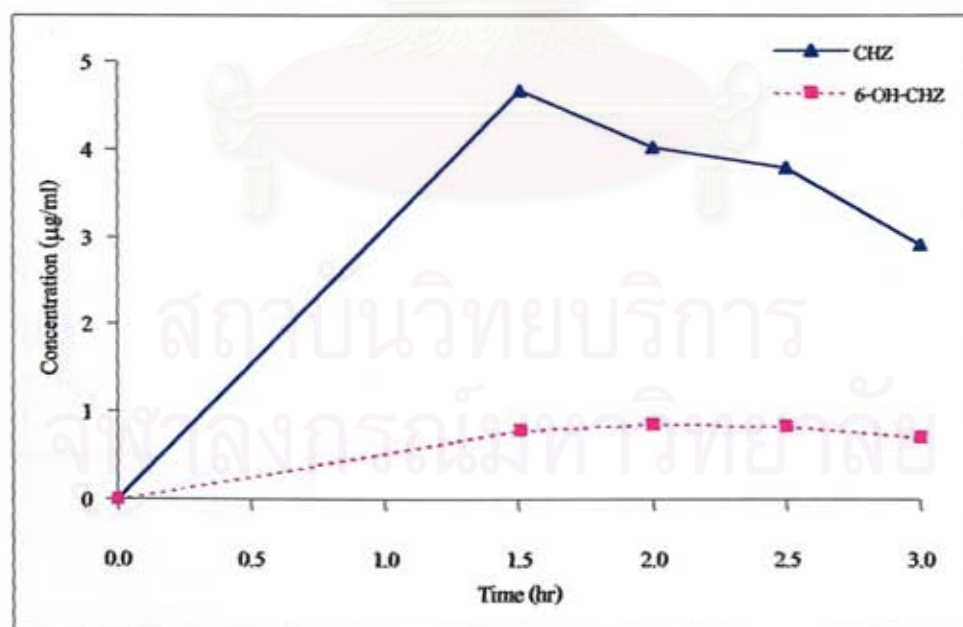
รูปที่ 25 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 3



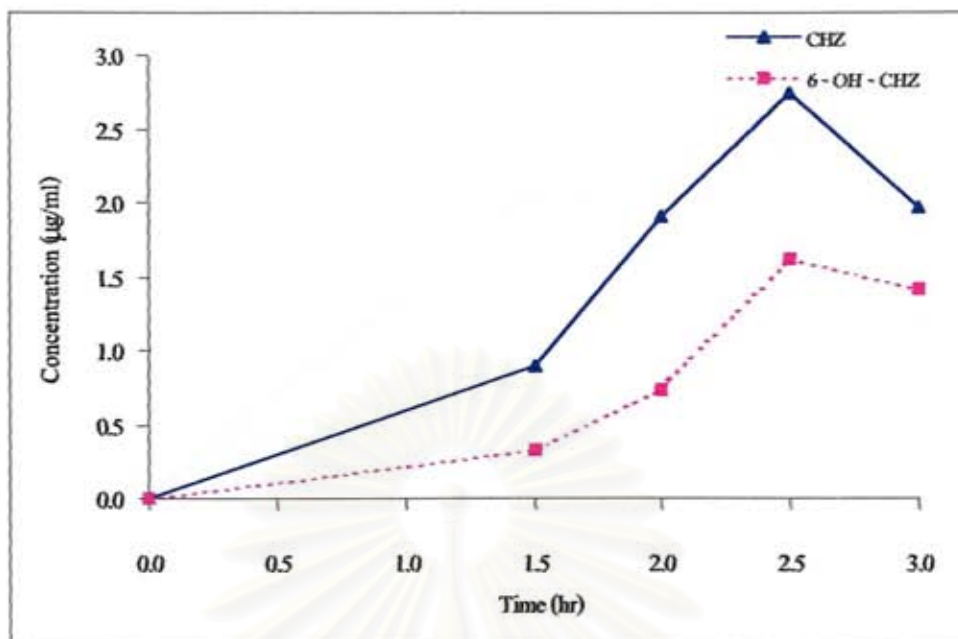
รูปที่ 26 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 4



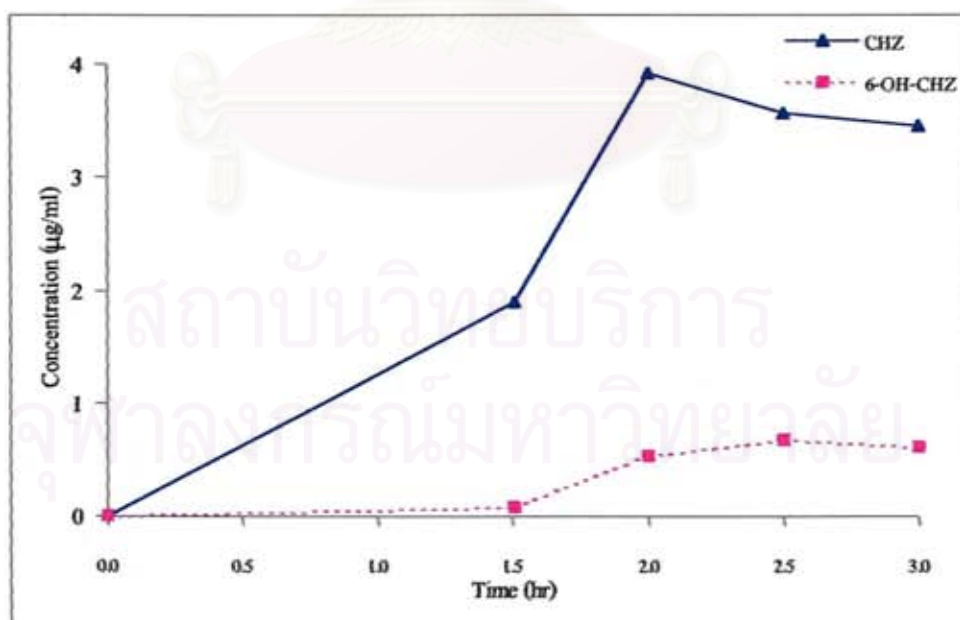
รูปที่ 27 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 5



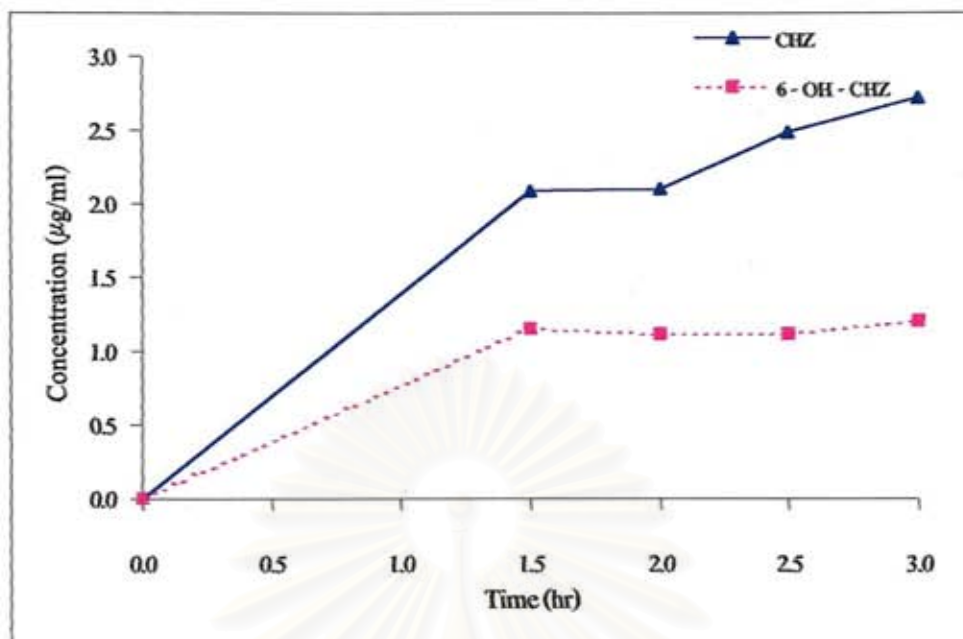
รูปที่ 28 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 6



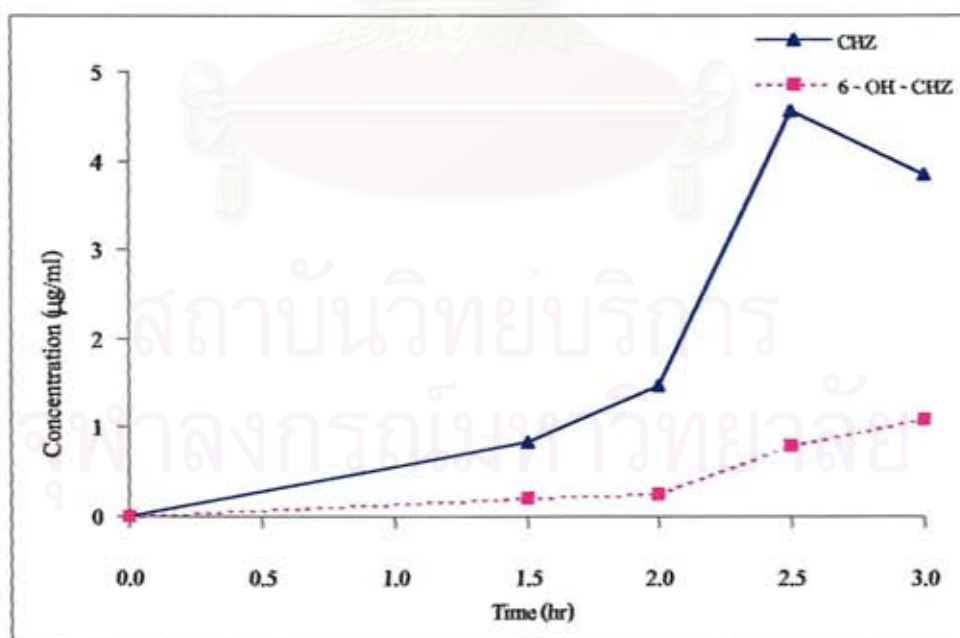
รูปที่ 29 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 7



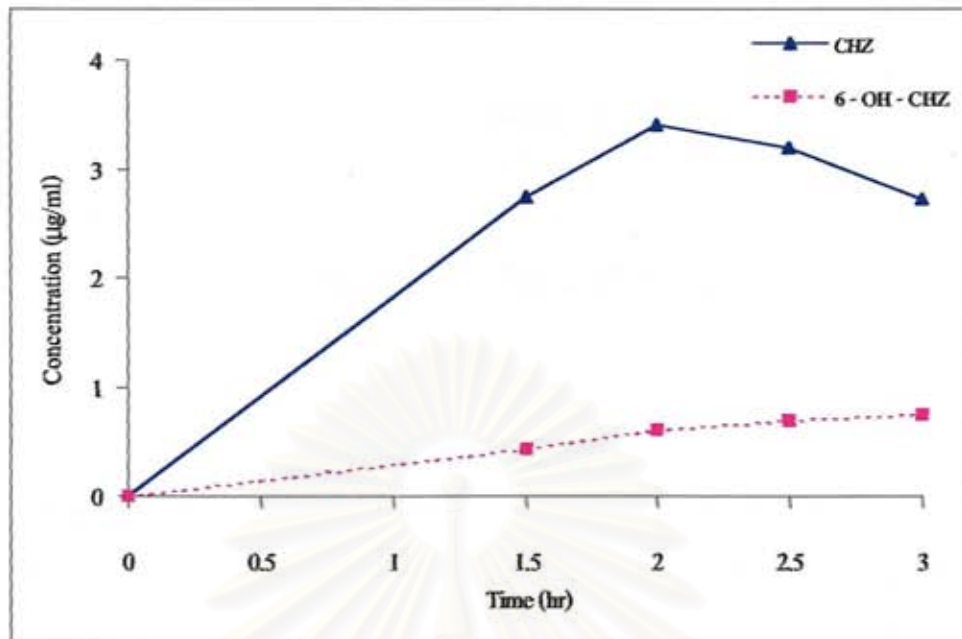
รูปที่ 30 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 8



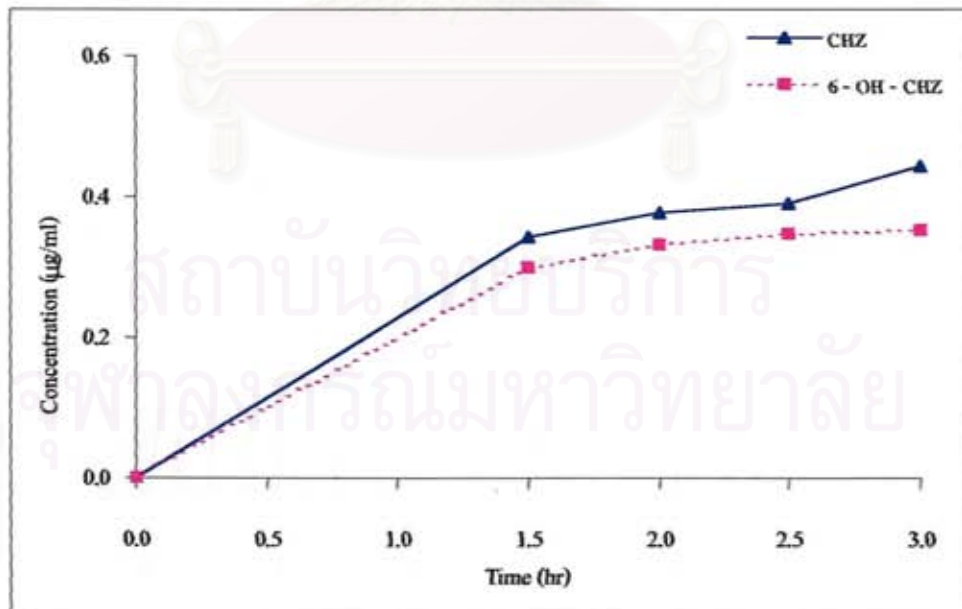
รูปที่ 31 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 9



รูปที่ 32 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 10



รูปที่ 33 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 11



รูปที่ 34 แสดงความเข้มข้นของ CHZ และ 6-OH-CHZ ในพลาสมาของผู้ป่วย NAFLD คนที่ 12

ภาคผนวก ฎ

การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์(58-60)

1. พื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve, AUC)

การคำนวณหาค่า $AUC_{0-\infty}$ โดย trapezoidal rule คำนวณได้จากสูตร

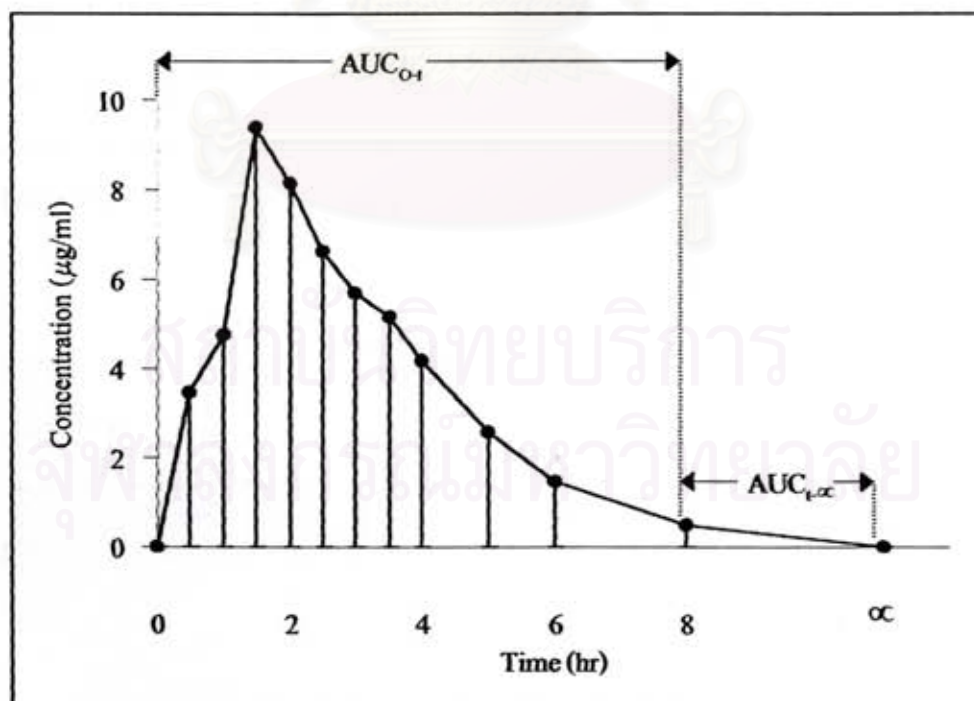
$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}$$

AUC_{0-t} = พื้นที่สามเหลี่ยมและพื้นที่สี่เหลี่ยมคางหมู ที่ได้จากการแบ่งพื้นที่ภายใต้เส้นกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลาออกเป็นส่วนๆ แล้วนำพื้นที่ทั้งหมดที่คำนวณได้ตั้งแต่เวลา 0-t มารวมกันจะได้เป็น AUC_{0-t}

$$AUC_{t-\infty} = C_t / Kel$$

C_t = ความเข้มข้นที่เวลา t (เวลาในครั้งสุดท้ายที่เก็บตัวอย่างเลือด)

Kel = ค่าคงที่อัตราการกำจัดยา (elimination rate constant) คำนวณจากความชันของกราฟ



2. ค่าครึ่งชีวิต (Half-life, $t_{1/2}$)

ค่าครึ่งชีวิตคือ ระยะเวลาที่ต้องการในการลดระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมาลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}} = \frac{0.693 \times V_d}{Cl}$$

3. ความสามารถในการกำจัดยา (Clearance, Cl)

เป็นค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ที่บ่งถึงความสามารถในการกำจัดยาออกจากร่างกาย หมายถึงปริมาตรของของเหลวเช่น พลาสมาที่ขาดูกกำจัดออกหมดต่อหน่วยเวลา มีหน่วยเป็น มิลลิลิตร / นาที หรือ ลิตร / ชั่วโมง คำนวณได้จากสูตร

$$Cl = \text{Dose} / AUC$$

หรือ

$$Cl = K_{el} / V_d$$

4. ปริมาตรของการกระจาย (Volume of distribution, V_d)

ปริมาตรของการกระจายเป็นค่าที่บ่งถึงการกระจายของยาในร่างกาย ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในเลือดกับขนาดยาที่ให้ คำนวณได้จากสูตร

$$V_d = \frac{\text{Dose}}{AUC \times K_{el}} = \frac{Cl}{K_{el}}$$

สถาบันวิจัยการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนันทพร พรหมพิลา เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเคมี) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2541 เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเภสัชวิทยา) ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย