

ผลของโรคไตเรื้อรังในหนูเมาส์ต่อเอนไซม์ CYP3A ในตับ



นางสาวพัชรินทร์ จิตติศักดิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of Chronic Kidney Disease on Hepatic CYP3A in a Mouse Model

Miss Patcharin Jittisak



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

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของโรคไตเรื้อรังในหนูเมาส์ต่อเอนไซม์ CYP3A ในตับ
โดย	นางสาวพัชรินทร์ จิตติศักดิ์
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ แพทย์หญิง ดร. ปาจริย์ จรรย์วิลาศกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์
	อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อัษฎาศ์ ลีฬหวนิชกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง ดร.เนาวรัตน์ สุธัมมาภงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ แพทย์หญิง ดร. ปาจริย์ จรรย์วิลาศกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อัษฎาศ์ ลีฬหวนิชกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรพิน วงศ์สวัสดิ์กุล)

พัชรินทร์ จิตติศักดิ์ : ผลของโรคไตเรื้อรังในหนูเมาส์ต่อเอนไซม์ CYP3A ในตับ (Effects of Chronic Kidney Disease on Hepatic CYP3A in a Mouse Model) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. พญ. ดร. ปาจารย์ จริยวิลาศกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์, อ. นพ. ดร. อัษฎาศ ลีฬหวนิชกุล, 64 หน้า.

โรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้มักประสบปัญหาด้านการใช้ยา อาจเพราะโรคไตเรื้อรังไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 โดยเฉพาะเอนไซม์ CYP3A ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ที่สำคัญของยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังในหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11 โดยแบ่งหนูเมาส์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม 2 สัปดาห์ และกลุ่ม 4 สัปดาห์ ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยโมเดล ischemic reperfusion โดยเริ่มจากการผูกไตข้างซ้ายเป็นเวลา 50 นาที และ 7 วันต่อมาตัดไตข้างขวาออก หลังจากนั้นที่เวลา 2 และ 4 สัปดาห์จะทำการการุณยฆาตเพื่อเก็บเลือดมาตรวจวัดระดับ serum creatinine และเก็บเนื้อตับเพื่อดูการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ด้วยเทคนิค HPLC โดยเลือกใช้ testosterone และ midazolam เป็นซับสเตรต และศึกษาการแสดงออกของยีน CYP3A11 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR ผลที่ได้พบว่าระดับ serum creatinine ของหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำเกิดไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.816 ± 0.10 mg/dL ต่อ 0.359 ± 0.05 mg/dL ที่ $p < 0.01$, 0.478 ± 0.03 ต่อ 0.295 ± 0.03 mg/dL ที่ $p < 0.01$ ตามลำดับ) และพบว่าเมื่อใช้ testosterone เป็นซับสเตรต การทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในตับหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 สัปดาห์ลดลง 50.60% และกลุ่ม 4 สัปดาห์ลดลง 54.96% ($p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) และเมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในตับหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 สัปดาห์ลดลง 66.48% และกลุ่ม 4 สัปดาห์ลดลง 46.51% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลง 97.53% และ 82.65% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) สรุปได้ว่าภาวะโรคไตเรื้อรังในหนูเมาส์ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ทราบความเป็นไปได้เบื้องต้นของกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A ในภาวะโรคไตเรื้อรัง และเป็นแนวทางในการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์โรคไตเรื้อรังต่อไป

สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5587238320 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: CHRONIC KIDNEY DISEASE / MOUSE / CYTOCHROME P450 / METABOLISM / LIVER

PATCHARIN JITTISAK: Effects of Chronic Kidney Disease on Hepatic CYP3A in a Mouse Model. ADVISOR: PAJAREE CHARIVAVILASKUL, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: PIYANUCH WONGANAN, Ph.D., ASADA LEELAHAVANICHKUL, M.D., Ph.D., 64 pp.

Chronic kidney disease (CKD) is an important problem of public health in Thailand. Patients with CKD have been reported to be at risk of adverse drug reactions and drug-drug interaction since CKD may be associated with alteration of cytochrome P450 (CYP) enzyme in the liver. The aim of this study was to investigate the effect of CKD on the function of hepatic CYP3A and the expression of CYP3A11 gene in mice. ICR mice were randomized to the CKD 2 weeks group and CKD 4 weeks group. CKD was induced by ligating renal artery of left kidney for 50 minutes then right nephrectomy was performed 7 days afterwards. Fourteen days or twenty-eight days later, mice were sacrificed. Serum samples were collected to measure serum creatinine levels using Quantichrom™ Creatinine assay kit. Liver tissue was harvested to measure CYP3A activity and CYP3A11 gene expression using high-performance liquid chromatography (HPLC) and quantitative real-time RT-PCR, respectively. Serum creatinine levels were significantly higher in the 2 and 4 weeks CKD groups compared with control groups (0.816 ± 0.21 compared to 0.359 ± 0.10 mg/dL, respectively, $p < 0.01$; 0.478 ± 0.03 compared to 0.295 ± 0.03 mg/dL, respectively, $p < 0.01$). Using testosterone as a CYP3A substrate, hepatic CYP3A activity of 2 and 4 weeks CKD groups were reduced by 50.60% and 54.96%, respectively, compared with controls ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Using midazolam as a CYP3A substrate, hepatic CYP3A activity of 2 and 4 weeks CKD groups were reduced by 66.48% and 46.51%, respectively, compared with controls ($p < 0.05$). Additionally, CYP3A11 gene expression of 2 and 4 weeks CKD groups were reduced by 97.53% and 82.65%, respectively, compared with controls ($p < 0.05$). These data demonstrated that a reduction of the activity of CYP3A enzyme and CYP3A11 gene expression in CKD-induced mice. These results suggested that further studies on the pharmacokinetics properties of drugs that are substrates of CYP3A are of interest in CKD-induced mice.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูง จากอาจารย์แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, อาจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์ และอาจารย์นายแพทย์ ดร.อัษฎาศรี ลิฬหวนิชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม โดยให้คำปรึกษา แนะนำวิธีการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะ เป็นปัญหา ทางด้านการศึกษาหรือปัญหาด้านการทำงานวิจัย ตลอดจนให้กำลังใจผู้เขียนด้วยความเมตตา ขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่เมตตาให้คำปรึกษางานวิจัย ข้อคิดเห็น และได้ชี้แนะแนวคิดอันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรเภสัชวิทยา สหสาขา ทุกท่านที่ได้ ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณทุนวิจัย "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" ครั้งที่ 3/2557 ซึ่งเป็นแหล่ง เงินทุนอุดหนุนสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

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

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา ทุกคนที่คอยให้ ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีให้ผู้เขียนเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ผู้เขียนศึกษาทำงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rational)	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease; CKD).....	4
คำจำกัดความของโรคไตเรื้อรัง (CKD).....	4
การประเมินอัตราการกรองของไต	4
ระยะของโรคไตเรื้อรัง.....	5
การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง.....	6
สาเหตุของโรคไตเรื้อรัง	6
การเปลี่ยนแปลงด้านเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง	7
2.2 เอนไซม์ cytochrome P450	9

การทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450.....	12
2.3 เอนไซม์ cytochrome P4503A.....	13
เอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์	14
เอนไซม์ CYP3A ในหนูแรท	14
เอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์.....	15
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A.....	16
การศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อเอนไซม์ CYP3A	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 สัตว์ทดลอง	20
3.2 การเหนี่ยวนำให้หนูเม้าส์เกิดโรคไตเรื้อรัง (Chronic Kidney Disease model).....	20
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)	21
3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood samples) เพื่อวัด serum creatinine	21
3.5 การเก็บตัวอย่างตับหนู (Liver tissue samples) เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11	21
3.6 รูปแบบการวิจัย (Research design).....	21
3.7 การทดลอง.....	21
3.7.1 การวัดระดับ serum creatinine	21
3.7.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A โดยใช้ testosterone เป็นซับสเตรต	22
3.7.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A โดยใช้ midazolam เป็นซับสเตรต.....	31
3.7.4 การวัดการแสดงออกของยีน CYP3A11.....	38
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง	41
4.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังและผลของโรคไตเรื้อรังต่อค่าทางชีวเคมีและน้ำหนัก ตัวของหนูเม้าส์	41

4.2. ผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ testosterone เป็นซัพสเตรต.....	42
4.3 ผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ midazolam เป็นซัพสเตรต	43
4.4 การแสดงออกของยีน CYP3A11 ในตัวอย่างตับหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง.....	45
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย	47
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	47
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	49
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	53
ภาคผนวก ก การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์.....	54
1. ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ในไมโครโซม... 54	
1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)	54
1.2 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ).....	55
1.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve).....	55
1.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)	56
1.5 ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)	56
1.6 การศึกษาประสิทธิภาพในการสกัด (Recovery of extraction).....	57
2. ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ในไมโครโซม... 58	
2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)	58
2.2 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ).....	59

2.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve).....	59
2.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)	60
2.5 ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)	60
2.6 การศึกษาประสิทธิภาพในการสกัด (Recovery of extraction).....	61
ภาคผนวก ข เอกสารรับรองอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่อทางวิทยาศาสตร์	63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	64



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงค่าจำกัดความและการแบ่งระยะของโรคไตเรื้อรัง.....	4
ตารางที่ 2	แสดงการเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ CYP ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมยา ในคน, หนูเม้าส์ และหนูแรท	16
ตารางที่ 3	แสดงผลโรคไตเรื้อรังต่อน้ำหนักตัวหนูและค่า serum creatinine.....	41
ตารางที่ 4	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6 β -OH-TST ในวันเดียวกัน (Intra-day)..	56
ตารางที่ 5	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6 β -OH-TST ในต่างวันกัน (Inter-day)....	57
ตารางที่ 6	แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 6 β -OH-TST (%Recovery).....	57
ตารางที่ 7	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ ในวันเดียวกัน (Intra-day) .	60
ตารางที่ 8	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ ในต่างวันกัน (Inter-day)...	61
ตารางที่ 9	แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 1'-OH-MDZ (%Recovery).....	61

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 เอนไซม์ cytochrome P450.....	10
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งที่ตั้งของเอนไซม์ cytochrome P450 ภายในเซลล์.....	11
ภาพที่ 3 แสดงวัฏจักรการทำงานของ cytochrome P450 ในกระบวนการเมแทบอลิซึมยา	13
ภาพที่ 4 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นซับสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC.....	42
ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นซับสเตรต กับระดับ serum creatinine.....	43
ภาพที่ 6 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC	44
ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต กับระดับ serum creatinine.....	44
ภาพที่ 8 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน CYP3A11 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR.....	45
ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน CYP3A11 กับระดับ serum creatinine..	46
ภาพที่ 10 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐาน บริสุทธิ์ 6 β -OH-TST และ internal standard.....	54
ภาพที่ 11 (ก) ไมโครโซมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank microsome) และ (ข) ไมโครโซมที่มีสาร 6 β -OH-TST และ internal standard.....	55
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของ 6 β -OH-TST	56
ภาพที่ 13 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐาน บริสุทธิ์ 1'-OH-MDZ และ internal standard	58
ภาพที่ 14 (ก) ไมโครโซมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank microsome) และ (ข) ไมโครโซมที่มี สาร 1'-OH-MDZ และ internal standard.....	59
ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ.....	60

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	Percent
°C	Degree celsius
ng/ml	Nanogram per milliliter
mg/dl	Milligram per deciliter
μM	Micromolar
μg/ml	Microgram per milliliter
g	Gram
kg	Kilogram
L	Liter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
K_m	Michaelis constant
V_{max}	Maximal velocity of reaction
R^2	Coefficient of determination
Fe^{2+}	Ferrous
Fe^{3+}	Ferric
O_2	Oxygen
CO	Carbon monoxide
BSA	Bovine serum albumin
PBS	Phosphate buffer saline PBS
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
$MgCl_2$	Magnesium chloride
KH_2PO_4	Potassium dihydrogen phosphate

K ₂ HPO ₄	Di-potassium hydrogen phosphate
N ₂	liquid Nitrogen
HCL	Hydrochloric acid
HPLC	High performance liquid chromatography
RSD	Relative standard deviation
DEV	Deviation
CKD	Chronic kidney disease
CYP	Cytochrome P450
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
OD	Optical density
6β-OH-TST	6β-hydroxytestosterone
11α-OH-PGT	11alpha-hydroxyprogesterone
LLOQ	Lower limit of quantification
1'-OH-MDZ	1'-hydroxymidazolam
DZP	Dizepam
MDZ	Midazolam
K/DOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
GFR	Glomerular filtration rate
ESRD	End stage kidney disease
LSD	Least Significant Difference
ตร.ม.	ตารางเมตร
มล.	มิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rational)

โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease, CKD) คือภาวะที่มีความผิดปกติของไตติดต่อกันเป็นเวลานานเกิน 3 เดือน ได้แก่การมีความผิดปกติของไตในเชิงปริมาณวัดจากค่าอัตราการกรองของหน่วยไต (glomerular filtration rate, GFR) ต่ำกว่า 60 มล./นาที/1.73 ตร.ม. โดยอาจตรวจพบหรือไม่พบร่องรอยความผิดปกติของไตในเชิงคุณภาพ หรือมีความผิดปกติของไตในเชิงคุณภาพ ได้แก่ มีผลการตรวจภาพถ่ายรังสีของไตผิดปกติ หรือมีผลการตรวจเลือดหรือปัสสาวะผิดปกติ โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่า GFR ว่าอยู่ในระดับใด (1) ในปัจจุบันโรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย (2) ซึ่งต้องการการรักษาด้วยยาอย่างต่อเนื่อง และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของโรค การรายงานจากสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย พบว่าจำนวนผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ส่งผลให้โรคนีกลายเป็นปัญหาที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นในอนาคต (3)

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมักประสบปัญหาด้านการใช้ยา เนื่องจากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมักได้รับยาหลายชนิดเพื่อรักษาโรคของไต โรคที่พบร่วมด้วย และภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ อีกทั้งภาวะโรคไตเรื้อรังจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา ทำให้ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีการตอบสนองต่อยาที่ต่างไปจากผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่ตับ โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังอาจลดลง เพิ่มขึ้น หรือคงเดิมก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของยาที่ได้รับ ภาวะของโรคไต และเอนไซม์ในร่างกายผู้ป่วย (4) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมของยาในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นส่วนหนึ่งเกิดจากโรคไตเรื้อรังไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ CYP3A (5)

เอนไซม์ CYP3A เป็นตระกูลย่อยของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP) โดยชนิดของเอนไซม์ CYP3A ที่มีมากที่สุดของคน คือ CYP3A4 นอกจากนี้เอนไซม์ CYP3A4 ยังเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา เนื่องจากร้อยละ 50 ของยาที่ใช้ทางคลินิกจะถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ CYP3A4 (6) สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม รายงานการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ CYP3A ที่สำคัญในการเมแทบอลิซึมยาในคนและในหนูเม้าส์ พบว่า CYP3A11 เป็นชนิดของเอนไซม์ที่พบในหนูเม้าส์ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ของคนมากถึงร้อยละ 76 และมีการแสดงออกที่ไล่คล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ในคนอีกด้วย (7) Bogaards และคณะ (8) พบว่าหนูเม้าส์เป็นสัตว์ทดลองที่

คล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุด โดยดูจากรูปแบบการถูกยับยั้งของเอนไซม์ CYP ในแต่ละไอโซฟอร์ม และดูจากจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m/V_{max}) ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์จึงน่าจะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในคน เพื่อใช้ในทำนายกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เข้าสู่ร่างกาย

ก่อนหน้านี้มีศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ erythromycin (9, 10), testosterone และ midazolam (11) เป็นซับสเตรต ผลที่ได้พบว่าการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ปัจจุบันมีเพียงการศึกษาเดียวที่ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยการศึกษาที่ใช้ erythromycin เป็นซับสเตรต ผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่าการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (12)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion และเลือกใช้ testosterone และ midazolam เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

เพื่อศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง

1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

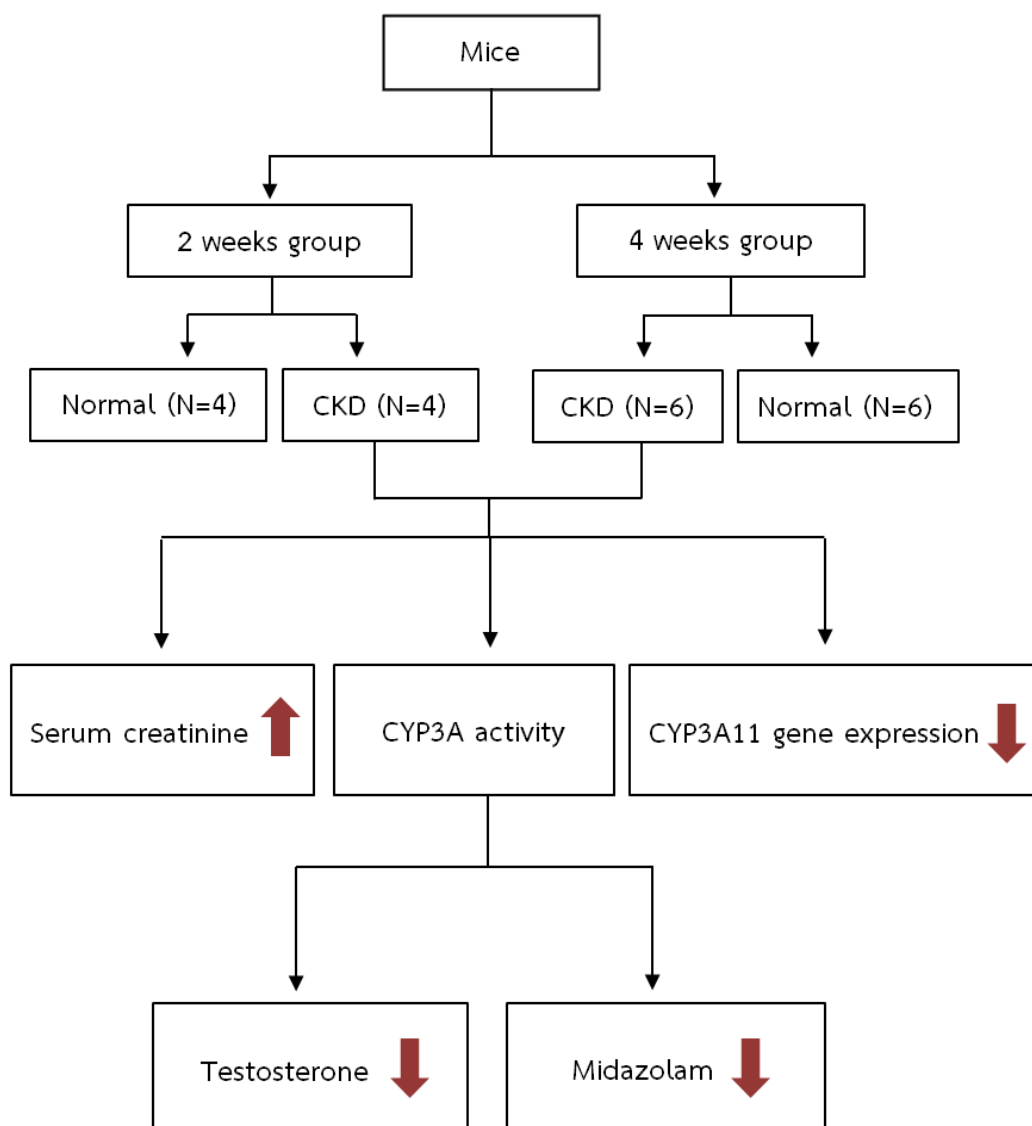
การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังลดลง เมื่อเทียบกับหนูเม้าส์ที่มีการทำงานของไตปกติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และปริมาณของเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรัง เพื่อทำนายความเป็นไปได้เบื้องต้นของกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เข้าสู่ร่างกายในภาวะโรคไตเรื้อรัง และเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา

ต่อไปเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์และการปรับขนาดของยาที่ถูก metabolized ผ่านเอนไซม์ CYP3A ให้เหมาะสมแก่ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease; CKD)

คำจำกัดความของโรคไตเรื้อรัง (CKD)

โรคไตเรื้อรัง (CKD) เป็นภาวะที่มีความผิดปกติของไตติดต่อกันเป็นเวลานานเกิน 3 เดือน โดยมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนี้ (1, 13)

1) มีความผิดปกติของไตในเชิงปริมาณ โดยวัดจากค่าอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) ต่ำกว่า 60 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร นานกว่า 3 เดือน โดยอาจมีความผิดปกติของไตในเชิงคุณภาพหรือไม่ก็ได้

2) มีความผิดปกติของไตในเชิงคุณภาพ คือ มีความผิดปกติทางพยาธิวิทยาของไต หรือมีตัวบ่งชี้ว่ามีความเสียหายต่อไต ได้แก่ ความผิดปกติของส่วนประกอบในเลือดหรือปัสสาวะ และการตรวจทางรังสีวินิจฉัย นานกว่า 3 เดือน โดยอาจมีอัตราการกรองของไต (GFR) ลดลงหรือไม่ก็ได้

ตารางที่ 1 แสดงคำจำกัดความและการแบ่งระยะของโรคไตเรื้อรัง (1)

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

การประเมินอัตราการกรองของไต

การคำนวณหาค่าอัตราการกรองของไต (GFR) เป็นการประเมินการทำงานของไตที่ดีที่สุด ปัจจุบันมีการพัฒนาสูตรที่ใช้ในการคำนวณหาค่า GFR เป็นสูตรที่มีการปรับปรุงปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อค่า serum creatinine เรียกว่า estimated GFR (eGFR) เนื่องจากค่า serum creatinine นอกจากจะขึ้นกับการทำงานของไตแล้ว ยังขึ้นอยู่กั อายุ, เพศ, เชื้อชาติ, ขนาดร่างกาย, อาหาร และยาบางชนิด เป็นต้น ดังนั้นในการประเมินระดับการทำงานของไตในผู้ป่วย จะพิจารณาเฉพาะค่า serum creatinine เพียงอย่างเดียวยังไม่แม่นยำพอ หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อค่า serum creatinine อยู่ในช่วง

ปกติไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยรายนั้นจะมีความทำงานของไตปกติเสมอไป สูตรที่นิยมใช้ในการคำนวณค่าอัตราการกรองของไต (eGFR) มีดังนี้ (14)

1. สูตร Crockcroft - Gault Equation

$$\text{Creatinine clearance} = \frac{(140 - \text{อายุ}) \times \text{น้ำหนัก (กก.)}}{72 \times \text{serum creatinine}}$$

**คูณค่าที่ได้ด้วย 0.85 ในกรณีที่เป็นผู้หญิง

2. สูตรจากการศึกษาวิจัย Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)

$$\text{GFR (ml/min/1.73m}^2\text{)} = 175 \times (\text{serum creatinine})^{-1.154} \times (\text{อายุ})^{-0.203} \\ \times (0.742 \text{ ในกรณีที่เป็นผู้หญิง})$$

ระยะของโรคไตเรื้อรัง

Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K/DOQI) แบ่งระยะของโรคไตเรื้อรังออกเป็น 5 ระยะ เพื่อความสะดวกในการพิจารณาความเหมาะสมในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังตามระดับความรุนแรงของการดำเนินโรค ดังนี้ (1, 13)

- ระยะที่ 1:** ไตมีพยาธิสภาพ หรือมีตัวบ่งชี้ความเสียหายกับไต เช่น ตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือน แต่ยังมีการทำงานของไตปกติ มีอัตราการกรองของไต (GFR) มากกว่าหรือเท่ากับ 90 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร
- ระยะที่ 2:** ไตมีพยาธิสภาพ หรือมีตัวบ่งชี้ความเสียหายกับไต เช่น ตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือน หรือมีการทำงานของไตลดลง โดยพบค่าอัตราการกรองของไต (GFR) อยู่ระหว่าง 60-89 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร
- ระยะที่ 3:** ไตมีพยาธิสภาพ หรือมีตัวบ่งชี้ความเสียหายกับไต เช่น ตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือน หรือมีการทำงานของไตลดลงปานกลาง โดยมีอัตราการกรองของไต (GFR) อยู่ ระหว่าง 30-59 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร
- ระยะที่ 4:** ไตมีพยาธิสภาพ หรือมีตัวบ่งชี้ความเสียหายกับไต เช่น ตรวจพบโปรตีนหรือเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะนานอย่างน้อย 3 เดือน หรือมีการทำงานของไตลดลงอย่างรุนแรง โดยมีอัตราการกรองของไต (GFR) อยู่ระหว่าง 15-29 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร
- ระยะที่ 5:** เป็นภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage kidney disease, ESRD) เป็นภาวะที่ไตสูญเสียการทำงานอย่างถาวร จนผู้ป่วยไม่อาจมีชีวิตรอยู่ได้หากไม่ได้รับการบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy) เช่น การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis), การล้างไตทางช่องท้องแบบต่อเนื่อง (continuous peritoneal

dialysis) หรือการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) โดยมีอัตราการกรองของไต (GFR) น้อยกว่า 15 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร

การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เหมาะสม ประกอบด้วยหลักสำคัญต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (1)

- การรักษาเฉพาะเจาะจงตามชนิดของโรคไตเรื้อรัง
- ประเมินและรักษาโรคหรือภาวะอื่นที่พบร่วมด้วย
- ชะลอการเสื่อมของไต
- ป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด
- ป้องกันและรักษาผลแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของไตลดลง
- เตรียมผู้ป่วยสำหรับกรณีไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย คือเตรียมรักษาทดแทนไต
- การรักษาทดแทนไต เช่น dialysis หรือการปลูกถ่ายไต

สาเหตุของโรคไตเรื้อรัง

โรคไตเรื้อรังเกิดจากเนื้อไตถูกทำลายจนก่อให้เกิดโรค อาจเกิดได้ทั้งจากตัวโรคเรื้อรัง หรือ ความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด โดยโรคไตเรื้อรังเกิดได้จากหลายสาเหตุและมักแตกต่างกันไปในแต่ละ ภูมิภาค ซึ่งสาเหตุหลักของไตวายเรื้อรัง คือ โรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน แต่ยังมีปัจจัยอีก หลายอย่าง เช่น โรคไตอักเสบ (chronic glomerulonephritis), โรคถุงน้ำที่ไต (polycystic kidney disease), โรคไตอื่น ๆ ที่ผู้ป่วยเคยมีมาก่อนหรือกำลังมีอยู่, โรคนิ่วไตและนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะ ส่วนบน ซึ่งโรคนี้อาจทำให้เกิดการอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะ (obstructive nephropathy) นำไปสู่การทำลายเนื้อไต และ/หรือการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ, โรค renal tubular acidosis (RTA), พิษจากโลหะหนักบางชนิดจากสภาพแวดล้อมที่ได้รับอย่างต่อเนื่อง เช่น ในบางพื้นที่ของ ออสเตรเลียพบว่ามีปริมาณสารแคดเมียมสูง ซึ่งสารแคดเมียมจะไปสะสมในเมสันเซลล์ ทำให้ ประชากรที่ทานข้าวที่มีการปนเปื้อนด้วยธาตุแคดเมียมต่อเนื่องเป็นเวลานานจะทำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง ได้, ยาสมุนไพรบางชนิดอาจมีการปนเปื้อนของสารที่มีพิษต่อไต หากรับประทานต่อเนื่องอาจทำให้ เกิดโรคไตเรื้อรังได้ อย่างไรก็ตามปัจจัยดังกล่าวเป็นเพียงสาเหตุที่พบบ่อยเท่านั้น และยังมีปัจจัยอีก หลายอย่างที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าโรคไตเรื้อรังเกิดจากสาเหตุใด (1)

จากสาเหตุหลักของโรคไตเรื้อรังดังกล่าว จะเห็นได้ว่าโรคไตเรื้อรังมักเกิดร่วมกับโรคทั่วไปได้ เช่น ในผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงและเป็นโรคเบาหวานร่วมด้วยมักจะตรวจพบโรคไตใน ภายหลัง ดังนั้นการให้ยาในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจะต้องมีความรอบคอบและระมัดระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากผู้ป่วยเหล่านี้มักได้รับยาหลายชนิดเพื่อรักษาโรคของไต โรคที่พบร่วมด้วย ภาวะแทรกซ้อน

ต่าง ๆ นอกจากนี้ผลจากยาอื่น ๆ ที่ได้รับร่วมด้วยยังอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การทำงานของไตแย่ง แพทย์และบุคลากรสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องจำเป็นต้องให้ความสำคัญและต้องทำความเข้าใจ เกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ของยาในภาวะที่ไตทำงานบกพร่องเป็นอย่างดี เพื่อกำหนดขนาดยาให้เหมาะสม และควรติดตามระดับยาในเลือดหากทำได้เพื่อช่วยปรับขนาดยาให้เหมาะสม

การเปลี่ยนแปลงด้านเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

โรคไตเรื้อรังส่งผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาต่างไปจากปกติ (5) ดังต่อไปนี้

- การเปลี่ยนแปลงด้านการดูดซึมยา (Absorption)

ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่าชีวสมมูล (bioavailability) ของยาหลายชนิดในเชิงปริมาณ แตกต่างไปจากผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของ gastrointestinal transit time, ความเป็นกรดต่างของกระเพาะอาหาร, ภาวะบวมน้ำในทางเดินอาหาร และอาการคลื่นไส้อาเจียน เป็นต้น ส่งผลให้การดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกายในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวสมมูลของยาในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังทำได้ยาก เนื่องจากผู้ป่วยมักได้รับยาหลายชนิดพร้อมกัน และไม่สามารถหยุดยาชนิดใดชนิดหนึ่งเพื่อศึกษาชีวสมมูลของยาใดยาหนึ่งได้ อีกทั้งกระบวนการ first pass metabolism หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาในทางเดินอาหารและตับที่เกิดขึ้นก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดเพื่อส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ค่าชีวสมมูลของยาเปลี่ยนไปด้วย กล่าวคือ ถ้ากระบวนการ first pass metabolism ลดลง จะทำให้ปริมาณยาอิสระในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าชีวสมมูลเพิ่มสูงขึ้น เสี่ยงต่อการเกิดพิษจากยา แต่ถ้ากระบวนการ first pass metabolism เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดต่ำ ส่งผลให้ค่าชีวสมมูลลดลง เมื่อเทียบกับคนปกติ

- การเปลี่ยนแปลงด้านการกระจายยา (Distribution)

ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีปริมาตรการกระจายยาเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากปริมาณ protein binding และปริมาณ tissue binding เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของน้ำในร่างกายหรืออัตราส่วนของน้ำในร่างกายต่อน้ำหนักตัวของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังเปลี่ยนแปลงจากคนปกติ ส่งผลให้ปริมาตรการกระจายของยาบางชนิดเปลี่ยนแปลงไป เช่น ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีภาวะบวมน้ำ (edema) ทำให้ยาที่ละลายน้ำได้ดี และยาที่ชอบจับรวมตัวกับโปรตีนในพลาสมามีค่าปริมาตรกระจายตัวเพิ่มขึ้น แต่ถ้าผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีภาวะขาดน้ำ (dehydration) จะทำให้ยาที่ละลายน้ำได้ดี มีค่าปริมาตรกระจายตัวลดลง ซึ่งความรู้เกี่ยวกับ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำในร่างกายผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง จะช่วยทำนายความเข้มข้นของยาในเลือดไปใช้ทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามการทำนายผลทางคลินิกเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงความสามารถของยาในการจับกับโปรตีนในพลาสมาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังทำได้ยาก เนื่องจากเมื่อยาจับกับโปรตีนในพลาสมาลดลง ก็จะทำให้มีปริมาณยาอิสระที่จะไปออกฤทธิ์บริเวณที่ยาออกฤทธิ์เพิ่มขึ้น แต่ในขณะเดียวกันปริมาตรการกระจายตัวของยาอาจจะเปลี่ยนแปลงไปด้วย และปริมาณของยาอิสระที่เพิ่มขึ้นก็จะถูกเปลี่ยนแปลง และกำจัดออกจากร่างกายได้มากขึ้นด้วย

- การเปลี่ยนแปลงด้านกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา (Metabolism)

ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่อาศัยปฏิกิริยา reduction และ hydrolysis ในการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นไตและตับเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450, uptake transporters และ efflux transporters ทั้งในตับและที่อวัยวะอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการเมแทบอลิซึมยาในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังแต่ละรายอาจลดลง เพิ่มขึ้น หรือคงเดิมก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของยาที่ให้, การใช้ยาร่วมด้วย, อายุผู้ป่วย, การสูบบุหรี่, การดื่มแอลกอฮอล์ และเอนไซม์ในร่างกายของผู้ป่วยแต่ละราย ดังนั้นการให้ยาต่าง ๆ ที่อาจได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงด้านกระบวนการเมแทบอลิซึมในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง จะต้องปรับขนาดยาที่ใช้ และติดตามผลอย่างเหมาะสม

- การเปลี่ยนแปลงทางด้านการขับยา (Excretion)

การขับยาออกจากร่างกายทางไต (renal clearance) ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ glomerular filtration, tubular secretion และ tubular reabsorption ซึ่งในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง พบว่าเมื่ออัตราการกรองที่ไตลดลง จะส่งผลให้การขับยาออกทางไตลดลงด้วย โดยเฉพาะยาที่อาศัย glomerular filtration เป็นหลักในการขับออกจากร่างกาย แต่ยาที่อาศัย tubular secretion เป็นหลักยังได้รับผลกระทบน้อย

จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ส่งผลให้ความเข้มข้นของยาที่บริเวณออกฤทธิ์ (site of action) ในผู้ป่วยไตเรื้อรังเปลี่ยนไปจากปกติ หรืออาจส่งผลให้เกิดการสะสมของยาหรือ metabolite ในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งผู้ป่วยไตเรื้อรังมักจะได้รับยาหลายชนิดอย่างต่อเนื่องพร้อม ๆ กัน ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างยา เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ จากยาทั้งต่อไตและอวัยวะอื่น ๆ เพื่อให้ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังได้รับผลการรักษาตามที่คาดหวัง และเพื่อช่วยทำนายการเปลี่ยนแปลงระดับยาแต่ละชนิดในร่างกายผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังได้ ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาในภาวะโรคไตเรื้อรัง โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงด้านกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา

2.2 เอนไซม์ cytochrome P450

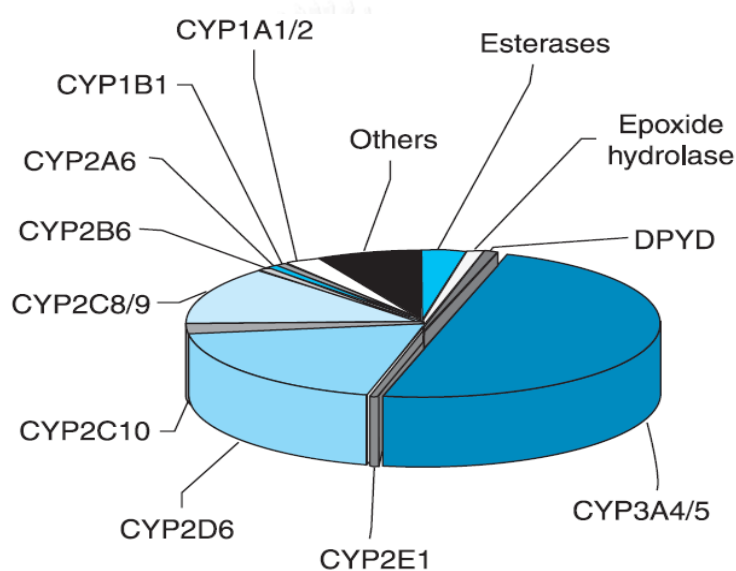
เอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) ถูกพบประมาณเมื่อ 50 กว่าปีที่แล้ว เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบ phase I ของยาหรือสารแปลกปลอมต่าง ๆ (xenobiotic) ที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากเอนไซม์ CYP สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีได้หลายชนิด และสามารถเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารเคมีต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ภายในร่างกาย หรือสารเคมีที่ได้รับจากภายนอกในร่างกาย เอนไซม์ CYP จึงมีบทบาทสำคัญต่อระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา, การกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย และการเมแทบอลิซึมของยาหรือสารต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกายให้กลายเป็นเมแทบอลิต์ที่มีคุณสมบัติต่างไปจากสารเดิม คือกลายเป็นเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์มากขึ้นหรือลดลงหรือหมดฤทธิ์ และละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) หรือกระบวนการสลาย (catabolism) สารพวกสเตียรอยด์ฮอร์โมน, กรดน้ำดี, วิตามินที่ละลายไขมัน, กรดไขมัน และสารกลุ่ม eicosanoids เช่น prostaglandins, thromboxane, prostacyclin และ leukotrienes (6)

เอนไซม์ CYP เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วยตระกูลย่อยหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็จะมี การแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ แตกต่างกันไป นอกจากนี้เอนไซม์ CYP สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย, รา, พืช และสัตว์ สำหรับเอนไซม์ CYP ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ microsomal CYP ที่อยู่บน endoplasmic reticulum แบบเรียบและ mitochondrial CYP ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย โดย microsomal CYP จะใช้ NADPH-cytochrome P450 reductase หรือ cytochrome b_5 เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน แต่ mitochondrial CYP ใช้ adenodoxin และ NADPH-adrenodoxin reductase เป็นตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน ซึ่งโดยทั่วไป microsomal CYP จะทำหน้าที่หลักในการเมแทบอลิซึมยาและสารแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย ส่วน mitochondrial CYP จะทำหน้าที่สังเคราะห์สารพวกสเตียรอยด์ฮอร์โมน หรือเมแทบอลิซึมวิตามินดีเป็นหลัก ในการศึกษาการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP ในการเมแทบอลิซึมยา จะศึกษากลุ่ม microsomal CYP เป็นหลัก (15, 16)

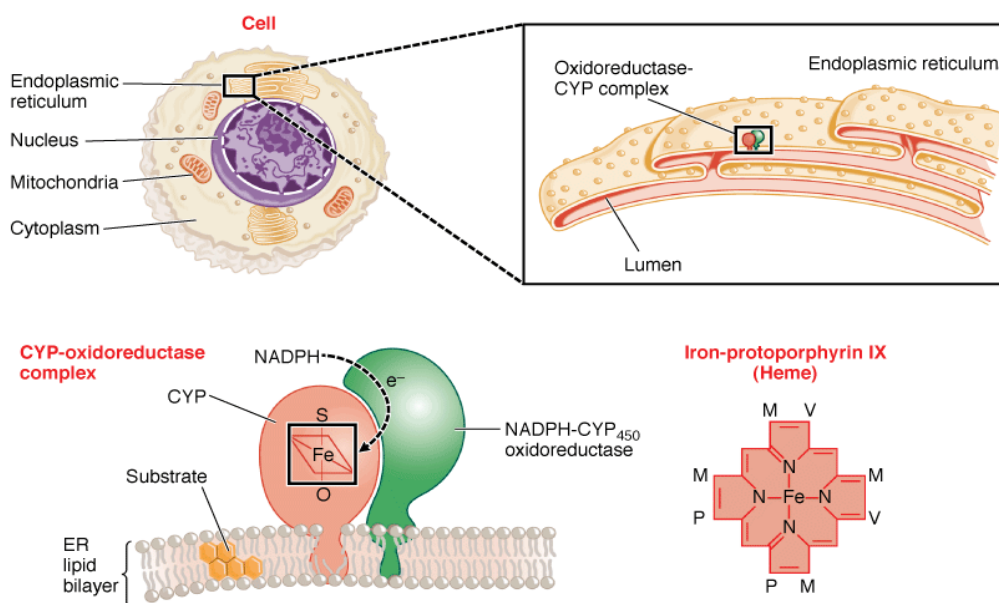
สำหรับระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ CYP ขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน ถ้า คล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 40 จะจัดอยู่ในตระกูล (family) เดียวกันและแสดงเป็นเลขอารบิก เช่น CYP1, CYP2, CYP3 แต่ถ้าคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 55 จะจัดอยู่ในตระกูลย่อย (subfamily) เดียวกันและแสดงเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ เช่น CYP1A, CYP2B, CYP3A ส่วนชนิด (isoform) ที่แสดงเป็นตัวเลขอารบิกหลังตัวอักษรภาษาอังกฤษ โดยส่วนใหญ่จะกำกับตามลำดับการ ค้นพบก่อน-หลัง เช่น CYP1A1 ค้นพบก่อน CYP1A2 ดังนั้นการเรียกชื่อเอนไซม์ CYP แต่ละชนิดจะ ชื่อด้วยชื่อตระกูล (family) ตามด้วยตระกูลย่อย (subfamily) และชนิด (isoform) ตัวอย่างเช่น

เอนไซม์ CYP3A4 หมายถึง CYP ชนิดหนึ่งที่อยู่ในตระกูลที่ 3 ตระกูลย่อย A และเป็นยีนที่ถูกค้นพบเป็นลำดับที่ 4 ของยีนในตระกูล 3A (15, 16)

เอนไซม์ CYP ในคน พบว่ามีทั้งสิ้น 57 ชนิด (isoform) จาก 18 ตระกูล (family) และ 44 ตระกูลย่อย (subfamily) โดย isoform ที่มีความสำคัญในการเมแทบอลิซึมยา (ภาพที่ 1) ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 และ CYP3A5 เป็นต้น (14) โดยยีนของเอนไซม์ CYP เหล่านี้จะกระจายอยู่บนโครโมโซมต่าง ๆ ซึ่งจะพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เกือบทุกชนิด แต่จะพบได้มากที่สุดที่ตับ และพบได้น้อยที่ ลำไส้, สมอ, ปอด, เต้านม, กระจกอาหาร และไต (6, 16)



ภาพที่ 1 เอนไซม์ cytochrome P450 (6)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งที่ตั้งของเอนไซม์ cytochrome P450 ภายในเซลล์ (6)

จากภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ CYP แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มที่เป็นชั้นไขมันสองชั้น (lipid bilayer) ของ endoplasmic reticulum แบบเรียง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากระบบที่ให้อิเล็กตรอน เช่น NADPH-cytochrome P450 reductase หรือ NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase และเกิดการเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึมของซับสเตรทที่ละลายได้ดีในไขมัน โดยเอนไซม์ CYP สามารถแทรกอยู่บนเยื่อหุ้ม endoplasmic reticulum แบบเรียงได้โดยอาศัย amino-terminal (N-terminal) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 20-30 ตัว โดย amino-terminal นี้จะอยู่ด้านใน (luminal) ของ endoplasmic reticulum สำหรับส่วนของเอนไซม์ที่ใช้ในการจับกับสารตั้งต้นและทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจะอยู่ด้าน cytosol ซึ่งจะอยู่ใกล้กับเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase ที่ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ CYP ในภาวะที่มีออกซิเจนเอนไซม์ CYP จะสามารถออกซิไดซ์สารเคมีที่มีคุณสมบัติละลายในชั้นไขมันของ endoplasmic reticulum ได้ดี (6, 15, 16)

เอนไซม์ CYP เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (heme protein) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในสภาพปกติอะตอมของเหล็ก (Fe) ที่อยู่ในโมเลกุล heme จะอยู่ในรูป ferric (Fe^{3+}) ซึ่งสามารถถูกรีดิวซ์ด้วย sodium dithionite ให้อยู่ในรูป ferrous (Fe^{2+}) ที่สามารถจับกับออกซิเจน และคาร์บอนมอนอกไซด์ได้ การรวมตัวของเอนไซม์ CYP กับคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide; CO) จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเรียกชื่อว่าเอนไซม์ CYP แต่อย่างไรก็ตามการ

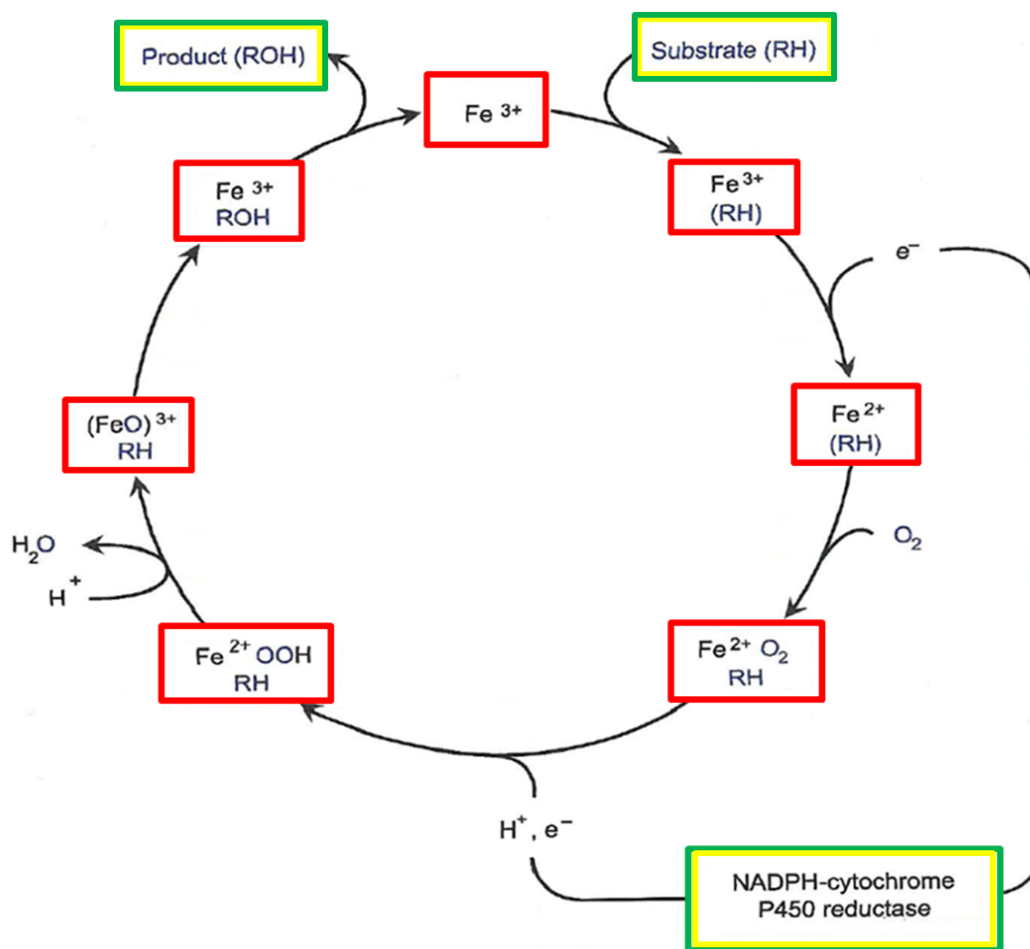
ดูดกลืนแสงสูงสุดเมื่อจับคาร์บอนมอนอกไซด์นั้นจะแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยระหว่างไอโซฟอร์มของเอนไซม์ CYP โดยจะอยู่ในช่วง 447 ถึง 452 นาโนเมตร (15-17)

การทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450

กลไกการทำงานของเอนไซม์ CYP ในการเร่งปฏิกิริยา oxidation สามารถอธิบายได้ดังภาพที่ 3 กล่าวคือ เมื่อสารตั้งต้น (R-H) เข้าสู่เซลล์จะจับกับ heme ของเอนไซม์ CYP ที่อยู่ในรูป ferric (Fe^{3+}) กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน คือ $\text{Fe}^{3+}(\text{R-H})$ จากนั้น $\text{Fe}^{3+}(\text{R-H})$ จะถูกรีดิวซ์โดยการรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase ทำให้ Fe^{3+} ที่อยู่ในโมเลกุลของ heme เปลี่ยนรูปเป็น $\text{Fe}^{2+}(\text{R-H})$ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความสามารถจับกับ O_2 ได้ดี หลังจากนั้น $\text{Fe}^{2+}(\text{R-H})$ จะรวมตัวกับ O_2 กลายเป็น ferrous dioxygen; $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2(\text{R-H})$ และจะถูกเปลี่ยนต่อให้เป็น $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}(\text{R-H})$ โดยการรับโปรตอนมาหนึ่งตัว และอิเล็กตรอนอีกหนึ่งตัวจาก NADPH-cytochrome P450 reductase จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะรับโปรตอนตัวที่สองเข้ามา ทำให้เกิดการสลายพันธะระหว่างออกซิเจนสองอะตอมกลายเป็น $(\text{FeO})^{3+}\text{R-H}$ ที่มีออกซิเจนหนึ่งอะตอมอยู่ในโมเลกุล ส่วนออกซิเจนที่เหลืออีกหนึ่งอะตอมจะถูกรีดิวซ์กลายเป็นน้ำ ต่อจากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะมีการจัดเรียงโมเลกุลใหม่ให้มีความสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดี และปลดปล่อยสารตั้งต้นที่ถูกออกซิไดซ์ในรูป R-O-H ออกมาหรือปล่อย product ที่ได้ออกมา พร้อมทั้งมีการปรับโครงสร้างของ CYP ให้กลับคืนสู่ภาวะ Fe^{3+} เช่นเดิมเพื่อทำหน้าที่จับกับซับสเตรทโมเลกุลใหม่ต่อไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้นโดยเอนไซม์ CYP นั้นเกิดจากการนำออกซิเจนหนึ่งอะตอมเข้าไปสอดแทรกในโมเลกุลของสารตั้งต้น (15, 18)

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





ภาพที่ 3 แสดงวัฏจักรการทำงานของ cytochrome P450 ในกระบวนการเมแทบอลิซึมยา (18)

2.3 เอนไซม์ cytochrome P4503A

เอนไซม์ cytochrome P4503A (CYP3A) เป็นตระกูลย่อยของเอนไซม์ CYP ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบ phase I ของยาหรือสารเคมีต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยเอนไซม์ CYP3A เป็นตระกูลย่อยที่มีปริมาณมากที่สุดในตับ และเยื่อทางเดินอาหาร นอกจากนี้เอนไซม์ CYP3A ยังเป็นเอนไซม์ที่มียับยั้งหรือกระตุ้นโดยยาหลายชนิด เช่น testosterone, midazolam, nifedipine และ erythromycin และมียาหลายชนิดที่เป็นทั้ง inhibitor ของเอนไซม์ CYP3A เช่น tacrolimus, fluconazole เป็นต้น และ inducer ของเอนไซม์ CYP3A เช่น rifampicin เป็นต้น และสามารถพบเอนไซม์ CYP3A ได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นจะมีความเหมือนและความแตกต่างกับในมนุษย์ (6, 16, 19) ดังตารางที่ 2

เอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์

เอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์มี 4 ชนิด ได้แก่ CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 และ CYP3A43 โดยพบว่าเอนไซม์ CYP3A4 มีปริมาณมากที่สุดในตับ (ร้อยละ 35-50 ของปริมาณเอนไซม์ CYP ทั้งหมดในตับ) ดังภาพที่ 2 และเอนไซม์ CYP3A4 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดในกระบวนการเมแทบอลิซึมยาเมื่อเทียบกับเอนไซม์ CYP ชนิดอื่น เนื่องจากประมาณร้อยละ 50 ของยาที่มีใช้ทางคลินิกมักถูก metabolize ผ่านเอนไซม์ CYP3A4 เช่น terfenadine, ยากลุ่ม benzodiazepines (เช่น midazolam, triazolam), quinidine, lidocaine, carbamazepine, nifedipine, tacrolimus, dapson และ erythromycin เป็นต้น (6, 19) พบว่ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 มีสูตรโครงสร้างเคมี และขนาดโมเลกุลที่หลากหลาย เนื่องจากเอนไซม์ CYP3A4 มีช่องสำหรับจับกับยับยั้งที่ใหญ่ ทำให้สามารถจับกับยับยั้งที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ ได้ดี

เอนไซม์ CYP3A5 เป็นไอโซฟอร์มที่พบได้ประมาณร้อยละ 20 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมด ในบางคนอาจจะมีเอนไซม์ CYP3A5 ถึงมากกว่าร้อยละ 50 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมด โดยจะพบเอนไซม์ CYP3A5 มากที่ไต และพบที่ตับได้บ้าง เอนไซม์ CYP3A5 จะมีการเมแทบอลิซึมสารต่าง ๆ ได้คล้ายคลึงกับ CYP3A4 แต่มีความสามารถในการทำงานที่ต่ำกว่า สำหรับเอนไซม์ CYP3A7 จะพบว่ามีแสดงออกในระดับของทารกในครรภ์เท่านั้น ในระยะหลังการคลอดกระบวนการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนของยีน CYP3A7 จะลดลงทำให้ปริมาณลดลง ในผู้ใหญ่จะพบเอนไซม์ CYP3A7 ได้ที่ลำไส้, ผนังมดลูก, ต่อมหมวกไต และต่อมลูกหมาก พบว่าเอนไซม์ CYP3A7 มีความสามารถในการเมแทบอลิซึมกรด retinotic และสารพวกสเตียรอยด์ฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องข้องกับกระบวนการการพัฒนาของร่างกายได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP3A4 ส่วนเอนไซม์ CYP3A43 พบว่ามีแสดงออกที่ตับเช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP3A4 แต่มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ CYP3A4 คือมีปริมาณเพียงร้อยละ 0.2-5 ของเอนไซม์ CYP3A ทั้งหมด (15, 16)

เอนไซม์ CYP3A ในหนูแรท

เอนไซม์ CYP3A ในหนูแรทมี 6 ชนิด ได้แก่ CYP3A1/CYP3A23, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18, CYP3A62 โดย CYP3A1 และ CYP3A2 มีการแสดงออกในระดับมากที่สุด ซึ่งจากรายงานพบว่ายีน CYP3A23 มีการแสดงออกเหมือนกับยีน CYP3A1 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ CYP3A ในหนูแรทแต่ละชนิดนั้น จะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันตามเพศ โดยเอนไซม์ CYP3A2 และ CYP3A18 จะมีการแสดงออกในหนูแรทเพศผู้ ส่วน CYP3A9 มีการแสดงออกในหนูแรทเพศเมีย นอกจากนี้เอนไซม์ CYP3A62 และ CYP3A9 ในหนูแรทมีการแสดงออกที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ในมนุษย์ โดย CYP3A62 จะพบมากที่สุดที่ลำไส้ ในขณะที่ CYP3A9 และ CYP3A18 จะพบมากที่สุดที่ตับและ

ลำไส้เล็ก แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูแรท พบว่าเอนไซม์ CYP3A1 ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในตับหนูแรท มีการทำงานไม่เพิ่มขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยา rifampicin ซึ่งเป็น inducer ของเอนไซม์ CYP3A ในมนุษย์ และพบว่าเมื่อให้ยา nifedipine ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A4 ในมนุษย์ ในหนูแรทไม่เกิด product จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา nifedipine (7, 20)

เอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์

เอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์มี 6 ชนิด ได้แก่ CYP3A11, CYP3A13, CYP3A16, CYP3A25, CYP3A41 และ CYP3A44 และหนูเมาส์ช่วงอายุ 4-8 สัปดาห์จะมีระดับของเอนไซม์ CYP3A11 และเอนไซม์ CYP3A13 มากที่สุดในตับหนูเมาส์มีระดับของเอนไซม์ CYP3A13 ต่ำกว่าเอนไซม์ CYP3A11 ประมาณ 5-10 เท่า เนื่องจากเอนไซม์ CYP3A13 จะมีการแสดงออกที่ลำไส้มากกว่าตับ และพบว่าเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเมาส์เป็นเอนไซม์ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ของคนมากถึงร้อยละ 76 และมีการแสดงออกที่ลำไส้คล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ในคนอีกด้วย ส่วนเอนไซม์ CYP3A16 จะพบในทารกในครรภ์ และจะมีปริมาณลดลงหลังจากคลอด เอนไซม์ CYP3A25 จะพบในตับและลำไส้เล็กของหนูเมาส์แรกเกิดและเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ จะพบได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ส่วนเอนไซม์ CYP3A41 กับเอนไซม์ CYP3A44 จะพบได้ในหนูเมาส์เพศเมียเท่านั้น (7) นิยมใช้ซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A11 ในหนูเมาส์เป็นตัวแทนในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ในมนุษย์ เนื่องจากชนิดที่ลำดับกรดอะมิโนและการแสดงออกที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์ CYP3A4 ในคนมากที่สุด การศึกษา Bogaards และคณะ (8) พบว่าหนูเมาส์เป็นสัตว์ทดลองที่คล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุด โดยดูจากรูปแบบการถูกยับยั้งของเอนไซม์ CYP ในแต่ละไอโซฟอร์ม และดูจากจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m/V_{max}) ดังนั้นการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11 ในหนูเมาส์จึงน่าจะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A4 ในมนุษย์ เพื่อทำนายกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เข้าสู่ร่างกาย

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ CYP ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมยาในคน, หนูเมาส์ และหนูแรท (7)

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

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A

การศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ทำหน้าที่เมแทบอลิซึมยาในร่างกายนั้น แหล่งของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา คือ ไมโครโซม (microsomes) จากเซลล์ตับ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีปริมาณของเอนไซม์ CYP3A มากที่สุดเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่น ๆ และใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เป็นตัววัด โดยยับยั้งที่เหมาะสมตามสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาแนะนำให้เลือกใช้เป็นตัววัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เป็นอันดับแรก คือ midazolam และ testosterone และยับยั้งที่ยอมรับได้ คือ erythromycin, dextromethorphan, triazolam, terfenadine และ nifedipine (21) การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ testosterone และ midazolam โดยมีวิธีการวัด ดังนี้

- **Testosterone 6 β -hydroxylation** เป็นวิธีที่ใช้ testosterone เป็นยับยั้งและตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา คือ 6 β -hydroxytestosterone (6 β -OH-TST) ด้วย

เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ประกอบด้วย C-18 column ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 238 nm (22)

- **Midazolam 1'-hydroxylation** เป็นวิธีที่ใช้ midazolam เป็นซับสเตรต และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา คือ 1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ) ด้วยเทคนิค HPLC ประกอบด้วย C-18 column ด้วย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 220 nm (23)

จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเอนไซม์ CYP3A ทุกชนิด ยกเว้น CYP3A7 เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา testosterone 6 β -hydroxylation ได้โดยจะพบการทำงาน CYP3A4 มากที่สุด และจากการศึกษาการทำงานเอนไซม์ CYP3A4 ใน human liver microsomes แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ CYP3A4 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา testosterone 6 β -hydroxylation โดยมีค่า K_m เท่ากับ 50-100 μ M และ midazolam 1'-hydroxylation มีค่า K_m เท่ากับ 3-5 μ M สำหรับ 1'-OH-MDZ และ 40-60 μ M สำหรับ 4'-hydroxymidazolam (4'-OH-MDZ) (24) ซึ่งจะเห็นได้ว่า midazolam สามารถจับกับเอนไซม์ CYP3A ได้ดีกว่า testosterone นอกจากนี้ยังพบว่า midazolam เป็นซับสเตรตที่มีความไวมากกว่า testosterone เนื่องจากจะต้องใช้ testosterone ที่ความเข้มข้น \leq 250 μ M ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A แต่ใช้ midazolam ที่ความเข้มข้น $<$ 10 μ M เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับเปลี่ยนปริมาณเอนไซม์ CYP3A ด้วย inhibitor หรือ inducer ของเอนไซม์ CYP3A นั้น ขึ้นกับซับสเตรตที่ใช้ด้วย เช่นยา fluconazole ซึ่งเป็น inhibitor ของเอนไซม์ CYP3A4 สามารถลดการเมแทบอลิซึมของ midazolam ได้ร้อยละ 65 และลดการเมแทบอลิซึมของ testosterone ได้เพียงร้อยละ 37 ในขณะที่ยา nimodipine สามารถลดการเมแทบอลิซึมของ midazolam ได้ร้อยละ 60 แต่ลดการเมแทบอลิซึมของ testosterone ได้ร้อยละ 96 เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าซับสเตรตทั้งสองของเอนไซม์ CYP3A4 มีความแตกต่างกัน

การศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อเอนไซม์ CYP3A

ปี ค.ศ. 2001 Leblond และคณะ (9) ศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อเอนไซม์ CYP (CYP1A1/1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1, CYP3A1 และ CYP3A2) ในสัตว์หนูแรทที่ได้รับ การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วย five-sixths nephrectomy model พบว่ามีการแสดงออกของ CYP2C11, CYP3A1 และ CYP3A2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในระดับยีนและโปรตีน ส่วนการศึกษาการทำงานของ CYP3A2 โดยใช้ erythromycin เป็นซับสเตรต พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และการศึกษาต่อมาพบว่าเมื่อให้ยา dexamethasone และยา phenobarbital ซึ่งเป็น inducer ของเอนไซม์ CYP3A2 ทาง intraperitoneal กับหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A2 เพิ่มขึ้นทั้งในระดับยีนและ

โปรตีน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโรคไตเรื้อรังส่งผลให้เอนไซม์ CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2 ในตับหนูแรทลดลง

ปี ค.ศ. 2002 Guevin และคณะ (10) ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาของ Leblond และคณะ และใช้โมเดลที่เหนี่ยวนำให้หนูแรทเกิดโรคไตเรื้อรังเหมือนกัน ศึกษาว่า serum ของหนูแรทที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังมีผลอย่างไรต่อเอนไซม์ CYP (CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A1 และ CYP3A2) ในตับหนูแรท ทำการศึกษาโดยนำตับหนูสุขภาพดีมาบ่มด้วย serum ของหนูแรทที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการแสดงออกของ CYP ทั้งระดับยีนและโปรตีน และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1 และ CYP3A2 ทั้งระดับโปรตีนและยีน ลดลงมากกว่า 35% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับผลการการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และพบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลงมากกว่า 35% การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมของ uremic serum เป็น mediator ที่ทำให้เกิดการ down-regulation ของเอนไซม์ CYP ใน normal hepatocyte

ปี ค.ศ. 2005 Michaud J และคณะ (25) ทำการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาของ Guevin และคณะ โดยศึกษาว่า serum ที่ได้จากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีผลอย่างไรต่อเอนไซม์ CYP ในเซลล์ตับหนูแรท ทำการศึกษาโดยนำเซลล์ตับหนูแรทมาบ่มด้วย serum ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่าการแสดงออกของ CYP1A2, CYP2C6, CYP2A11, CYP2D1/2D2, CYP3A2 และ CYP4A1/4A3 ลดลงมากกว่า 45% ทั้งในระดับยีนและโปรตีนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) ส่วนการแสดงออกของ CYP2E1 นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และ CYP1A ลดลง 51% และ 59% ตามลำดับ ($P < 0.001$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมของ uremic serum ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังนั้นเป็น mediator ที่ทำให้การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP ในเซลล์ตับหนูแรทลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Guevin และคณะ

ปี ค.ศ. 2012 Velenosi และคณะ (11) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในตับหนูแรทที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังระดับปานกลางและระดับรุนแรง โดยทำการศึกษาการทำงานของ CYP3A และ CYP2C โดยใช้ midazolam และ testosterone เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A และใช้ tolbutamide และ testosterone เป็นซับสเตรตของ CYP2C พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2C11 และ CYP3A ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการศึกษาการแสดงออกของ CYP3A และ CYP2C ทั้งระดับยีนและระดับโปรตีน พบว่าการแสดงออกของ CYP3A2 และ CYP2C11 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโรคไตเรื้อรังมีผลทำให้การแสดงออกและ

การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และ CYP2C ลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Leblond และคณะ และของ Guevin และคณะ ดังที่กล่าวข้างต้น

ปี ค.ศ. 2011 Naud และคณะ (26) ศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงและการกำจัดยาที่ไตของหนูแรทที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยทำการศึกษาเพื่อดูการทำงานและการแสดงออกของ drug transporter และเอนไซม์ CYP ทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน, ดูการสะสมของยา digoxin และยา benzylpenicillin ที่บริเวณไต, ดูผลของ uremic serum ต่อการแสดงออกและการทำงานของ P-glycoprotein ใน proximal tubule cell line ผลที่ได้พบว่าการเกิดโรคไตเรื้อรังส่งผลให้การแสดงออกและการทำงานของ drug transporters ที่ไตเปลี่ยนแปลงไป ทำให้การขับยาออกทางไต (renal clearance) ลดลง เกิดการสะสมของยาที่ไต และเกิดพิษต่อไต (nephrotoxicity) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจาก uremic serum

ปี ค.ศ. 2010 Dani และคณะ (12) ศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อเอนไซม์ CYP (CYP1A2, CYP2C29, CYP2D, CYP2E1, CYP3A11) และ *N*-acetyltransferases (NATs) ในตัวหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยโมเดล 3/4 nephrectomy โดยดูการแสดงออกของ CYP และ NATs ทั้งระดับยีนและโปรตีน และประเมินการทำงานของเอนไซม์ CYP โดยใช้ erythromycin เป็นตัววัด พบว่าหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง มีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C29, CYP3A11 และ NATs ลดลงทั้งระดับยีนและโปรตีน ส่วนเอนไซม์ CYP2D และ CYP2E1 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และยังพบว่าหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังมีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลง 25% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าโรคไตเรื้อรังส่งผลให้การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C29 และ CYP3A11 ในหนูเม้าส์ลดลง สอดคล้องกับการศึกษาในหนูแรท อย่างไรก็ตามการศึกษาผลโรคไตเรื้อรังต่อการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์มีเพียงการศึกษาเดียว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกในระดับยีนของเอนไซม์ CYP3A11 ในตัวหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยโมเดลที่แตกต่างออกไป และเลือกใช้ midazolam และ testosterone เป็นตัววัดที่จำเพาะกว่า erythromycin

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูเม้าส์เพศผู้สายพันธุ์ ICR น้ำหนักระหว่าง 30-35 กรัม จำนวน 20 ตัว อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 3-5 วันก่อนทำการทดลอง มีการควบคุมสลับเวลามืดและสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิประมาณ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์และน้ำโดยไม่จำกัดปริมาณ และปฏิบัติกับสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ

3.2 การเหนี่ยวนำให้หนูเม้าส์เกิดโรคไตเรื้อรัง (Chronic Kidney Disease model)

ก่อนและหลังการผ่าตัดได้ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูเม้าส์ทุก ๆ 3 วัน และแบ่งหนูเม้าส์ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูปกติ 2 สัปดาห์ (4 ตัว)

กลุ่มที่ 2: หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรัง 2 สัปดาห์ (4 ตัว)

กลุ่มที่ 3: หนูปกติ 4 สัปดาห์ (6 ตัว)

กลุ่มที่ 4: หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรัง 4 สัปดาห์ (6 ตัว)

โมเดลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ Chronic Ischemic Reperfusion model in house Chulalongkorn University ซึ่งเป็นโมเดลที่ได้พัฒนาขึ้นมาโดย อ.นพ.ดร.อัษฎาศักดิ์ ลิ้มพนิชกุล ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อ คือทำการดมสลบหนูเม้าส์ด้วยยา isoflurane เมื่อหนูสลบทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องหนู เพื่อผูกหลอดเลือดแดงที่นำเลือดไปสูไตข้างซ้าย (left renal artery) ทิ้งไว้ 50 นาทีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะขาดเลือด (ischemia) หลังจากนั้นจึงปล่อยให้เลือดไหลเข้าสู่ไตข้างซ้ายเป็นปกติ หนึ่งสัปดาห์ต่อมาทำการผ่าตัดไตข้างขวาทิ้ง (right nephrectomy) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรัง เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด คือ 2 หรือ 4 สัปดาห์ ทำการการุณยฆาต (sacrificed) หนูเม้าส์ด้วยวิธี cardiac puncture เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sample) และตัวอย่างตับ (liver tissue sample)

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ในการศึกษานี้อ้างอิงขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจากการศึกษาของ Velenosi และคณะ ปี ค.ศ. 2012 (11) พบว่าใช้หนูทดลองต่อกลุ่ม ๆ ละ 4-7 ตัว ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงใช้หนูทดลองกลุ่มละ 4-6 ตัว รวมหนูทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยนี้ทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัว

3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood samples) เพื่อวัด serum creatinine

การเก็บตัวอย่างเลือด 2 หรือ 4 สัปดาห์เวลาสุดท้ายหลังจากเหนี่ยวนำให้หนูเกิดโรคไตเรื้อรังแล้ว ทำการปั่นเลือดแยกส่วนประกอบที่เป็น serum และเก็บ serum ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์ระดับ serum creatinine เพื่อประเมินการทำงานของไต

3.5 การเก็บตัวอย่างตับหนู (Liver tissue samples) เพื่อวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11

เก็บตัวอย่างตับที่ 2 และ 4 สัปดาห์หลังจากเหนี่ยวนำให้หนูเกิดโรคไตเรื้อรังแล้ว เริ่มจากตัดตับออกจากร่างกายหนู นำไปแช่ไว้ใน liquid Nitrogen (N₂) ประมาณ 1 นาที และเก็บตัวอย่างตับในหลอดเก็บตัวอย่าง โดยการแช่ในอุณหภูมิที่ -80 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์

3.6 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Experimental study

3.7 การทดลอง

3.7.1 การวัดระดับ serum creatinine

วัดระดับ serum creatinine ด้วย Kinetic colorimetric method โดยใช้ Creatinine assay kit [Quantichrom™ creatinine assay, BioAssay Systems, USA]

การเตรียมสารละลาย

- 1.) เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) 4 mg/dl ของ creatinine standard ปริมาตร 125 μ l เพื่อนำไปเตรียมสารละลายมาตรฐานของ creatinine standard ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 mg/dl โดยวิธี serial dilution และใช้น้ำกรองบริสุทธิ์เจือจาง
- 2.) เตรียม working reagent โดยเติม Reagent A 100 μ l + Reagent B 100 μ l

วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.) เติม 4 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 2 mg/dl (ทำ duplicate)
- 2.) เติม 2 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 1 mg/dl (ทำ duplicate)
- 3.) เติม 1 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 0.5 mg/dl (ทำ duplicate)
- 4.) เติม 0.5 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 0.25 mg/dl (ทำ duplicate)
- 5.) เติม 0.25 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 0.13 mg/dl (ทำ duplicate)
- 6.) เติม 0.13 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 0.06 mg/dl (ทำ duplicate)
- 7.) เติม 0.06 mg/dl ของ creatinine standard 30 μ l + น้ำกรองบริสุทธ์ 30 μ l ลงใน 96-well plate จะได้ creatinine standard ความเข้มข้น 0.03 mg/dl (ทำ duplicate)
- 8.) เติม serum sample 30 μ l ลงใน 96-well plate ตำแหน่ง sample
- 9.) เติม working reagent 200 μ l ลงใน 96-well plate ทุกตำแหน่ง
- 10.) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 510 นาโนเมตร โดยวัดที่ เวลา 0 นาที (OD_0) และเวลา 5 นาที (OD_5)
- 11.) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า serum creatinine concentration โดยใช้สูตร

$$\text{Creatinine concentration} = \frac{OD_{\text{sample}5} - OD_{\text{sample}0}}{OD_{\text{STD}5} - OD_{\text{STD}0}} \times 2$$

3.7.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A โดยใช้ testosterone เป็นซับสเตรต

การศึกษาเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของ 6 β -OH-TST ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา testosterone 6 β -hydroxylation โดยเกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ CYP3A จากตับหนูเมาซีในหลอดทดลอง และใช้ testosterone เป็นซับสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Wonganun และคณะ (22)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี:

- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [Aldrich-Sigma, USA]
- Potassium chloride [Carlo Erba, France]
- TRIS base [Merk, Germany]
- Hydrochloric acid (HCL) [Merk, Germany]
- Sodium pyrophosphate [Aldrich-Sigma, USA]
- Glycerol [BDH Chemical Ltd., England]
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA]
- Magnesium chloride (MgCl₂) [Carlo Erba, France]
- Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) [Merk, Germany]
- Di-potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) [Merk, Germany]
- Phosphoric acid [Merk, Germany]
- Dichloromethane (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Methanol (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Testosterone [Tokyo chemical, Japan]
- 6beta-hydroxytestosterone (6β-OH-TST) [Cayman Chemical, USA]
- 11alpha-hydroxyprogesterone (11α-OH-PGT) [Tokyo chemical, Japan]

วัสดุอุปกรณ์:

- Volumetric flask
- Cylinder ขนาด 5 – 1000 ml
- Autopipets ขนาด 2 - 5000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [Shimadzu]
- Symmetry C18 column 3.5 μm, 4.6×100 mm [Water, Japan]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Ultra-centrifuge [Beckman, USA]
- Reciprocal shaking water bath [Mettler, Germany]

- Homogenizer [IKA[®], Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Evaporator [Genevac, USA]
- Microplate reader [Thermo, Finland]

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

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

เตรียม stock solution ของ 6β-OH-TST ที่ความเข้มข้น 3,200 μM ปริมาตร 5 มิลลิเมตร (Molecular weight = 304.43 g/mol)

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad N &= g / MW = CV/1000 \\
 g / 304.43 &= (3,000 \times 10^{-6} \text{ M}) (5 \text{ ml}) / 1000 \\
 1000 \text{ g} &= (3,200 \times 10^{-6} \text{ M}) (5 \text{ ml}) / 304.43 \\
 g &= 0.00487
 \end{aligned}$$

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

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

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2,000, 1,600, 1,200, 800, 400, 200, 100 μM แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ ความเข้มข้นละ 10 μl เติมลงในสารละลายหรือในไมโครโซม ที่มีปริมาตรรวม 200 μl จะได้สารละลายหรือไมโครโซมที่มี 6β-OH-TST ความเข้มข้น 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 μM ตามลำดับ

2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2,000 μM จาก 3,200 μM (stock solution)

$$\begin{aligned}
 \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\
 (3,200 \text{ μM}) V_1 &= (2,000 \text{ μM}) (400 \text{ μl}) \\
 V_1 &= 250 \text{ μl}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 3,200 μM 6β-OH-TST 250 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 150 μl จะได้ 6β-OH-TST ที่มีความเข้มข้น 2,000 μM

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,600 μM จาก 2,000 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (2,000 \mu\text{M}) V_1 &= (1,600 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 320 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 2,000 μM 6 β -OH-TST 320 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 1,600 μM

2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,200 μM จาก 1,600 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,600 \mu\text{M}) V_1 &= (1,200 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 300 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1,600 μM 6 β -OH-TST 300 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 1,200 μM

2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 800 μM จาก 1,200 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,200 \mu\text{M}) V_1 &= (800 \mu\text{M}) (300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1,200 μM 6 β -OH-TST 200 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 300 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 800 μM

2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 400 μM จาก 800 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (800 \mu\text{M}) V_1 &= (400 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 800 μM 6 β -OH-TST 200 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 400 μM

2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 μM จาก 400 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (400 \mu\text{M}) V_1 &= (200 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l}) \end{aligned}$$

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

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 400 μM 6 β -OH-TST 200 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 200 μM

2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 μM จาก 200 μM 6 β -OH-TST

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (200 \mu\text{M}) V_1 &= (100 \mu\text{M}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 200 μM 6 β -OH-TST 200 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 μl จะได้ 6 β -OH-TST ที่มีความเข้มข้น 100 μM

3.) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ของ 11 α -OH-PGT เพื่อใช้เป็น internal standard

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

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

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

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

การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ : H₂O : Methanol (50:50)

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

อัตราการไหล : 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : UV ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ปริมาตรฉีด : 10 ไมโครลิตร

อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เป็นการยืนยันผลของข้อมูลที่ได้ว่ามีความถูกต้องเชื่อถือได้อ้างอิงตาม US FDA Guideline (27)

1. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์แสดงได้ด้วยค่า retention time ของ 6 β -OH-TST (standard) และ 11 α -OH-PGT (internal standard) ในรูปของโครมาโตแกรม โดยดูการแยกของ peak ของ 6 β -OH-TST และ 11 α -OH-PGT ในสารละลายและในไมโครโซมที่ spike สารดังกล่าวลงไปเปรียบเทียบกับ blank ไมโครโซม ว่ามี peak อื่นใดมารบกวนหรือไม่

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่สามารถตรวจวัดได้ (Lower limit of quantitation, LLOQ)

โดยเตรียม 6 β -OH-TST ที่ความเข้มข้นระดับต่ำอย่างละ 3 หลอดทดลอง และหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation: %RSD) และค่า %deviation (%DEV) ไม่เกิน 20%

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

3.1) Intra-day precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ใน solution ภายในวันเดียวกัน โดยเตรียม 6 β -OH-TST ที่ความเข้มข้น 15, 50, 90 μ M ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้ต้องไม่เกิน 15% จึงจะยอมรับได้

$$\%RSD = \frac{\text{Standard deviation (SD)}}{\text{Mean}} \times 100$$

3.2) Inter-day precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ใน solution ต่างวันกัน โดยทำการทดลองและคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของ %deviation (%DEV) ของ 6 β -OH-TST ใน solution ที่เตรียมขึ้น ซึ่งค่า %DEV ต้องไม่เกิน 15% จึงจะยอมรับได้ โดยมีวิธีการดังนี้ เตรียม 6 β -OH-TST ความเข้มข้น 15, 50, 90 μ M ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวใน solution โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\%DEV = \frac{\text{ความเข้มข้นของ } 6\beta\text{-OH-TST ที่วิเคราะห์ได้} - \text{ความเข้มข้นของ } 6\beta\text{-OH-TST จริง}}{\text{ความเข้มข้นของ } 6\beta\text{-OH-TST จริง}} \times 100$$

5. การทดสอบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีการสกัด (Recovery)

เป็นการศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร โดยเตรียม 6 β -OH-TST ความเข้มข้น 15, 50, 90 μ M ในไมโครโซมและใน solution ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และทำการเปรียบเทียบ peak area ของ 6 β -OH-TST ที่ได้ทั้งในไมโครโซมในสารละลาย

$$\%recovery = \frac{\text{Peak area ของ } 6\beta\text{-OH-TST จากการวิเคราะห์ในไมโครโซม}}{\text{Peak area ของ } 6\beta\text{-OH-TST จากการวิเคราะห์ในสารละลาย}} \times 100$$

6. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ 6 β -OH-TST กับ 11 α -OH-PGT (internal standard) แสดงค่าเป็น coefficient of determination (R^2) โดยเตรียม 6 β -OH-TST ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 μ M นำค่า peak area ratio ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า R^2 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างสารละลายเพื่อทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้

- 1) Methanol 180 μ l + 6 β -OH-TST standard 10 μ l + internal standard 10 μ l
- 2) นำสารละลายที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μ l

การเตรียมตัวอย่างไมโครโซมเพื่อทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้

- 1) Blank microsome 180 μ l + 6 β -OH-TST standard 10 μ l
- 2) เติมน dichloromethane 5 ml
- 3) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 4) เติมน internal standard 10 μ l
- 5) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที
- 6) ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
- 7) ละลายกลับด้วย methanol ปริมาตร 200 μ l
- 8) กรอง sample ด้วย 0.22 μ m nylon filter ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

- 9) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μ l

การเตรียมไมโครโซมจากเซลล์ตับ (Hepatic microsome preparation)

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.1 เตรียม Homogenization buffer pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Homogenization buffer pH 7.4 ประกอบด้วย 0.1 M ของ EDTA, potassium chloride (KCL) 1.118% (w/v), TRIS base 1.211% (w/v) ดังนั้นจึง KCL หนัก 11.18 g, ซึ่ง TRIS base หนัก 12.11 g ละลายด้วย water ปริมาตร 900 มิลลิลิตร และเติม EDTA 10 ml แล้วนำไปปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 7.4 แล้วจึงเติม water จนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

1.2 เตรียม Wash buffer pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Wash buffer pH 7.4 ประกอบด้วย 0.1 M ของ EDTA, sodium pyrophosphate 4.461% (w/v) ดังนั้นจึง sodium pyrophosphate หนัก 44.61 g ละลายด้วย water ปริมาตร 900 มิลลิลิตร และเติม EDTA 10 ml แล้วนำไปปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 7.4 แล้วจึงเติม water จนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

1.3 เตรียม Storage buffer pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Storage buffer pH 7.4 ประกอบด้วย TRIS base 0.121% (w/v), glycerol 20% (v/v) ดังนั้นจึง TRIS base หนัก 0.121 g ละลายด้วย water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติม glycerol 20 ml แล้วนำไปปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 7.4 แล้วจึงเติม water จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมไมโครโซมจากเซลล์ตับ (Hepatic microsome preparation)

2.1 ชั่งน้ำหนักตับ

2.2 เติม homogenize buffer pH 7.4 ในปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักตับ

2.3 นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer

2.4 นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 9,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.5 นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง ultra-centrifuge ที่ 95,000 g เป็นเวลา 17 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.6 นำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายกลับด้วย wash buffer pH 7.4 ในปริมาณ 2 เท่าของน้ำหนักตับ และนำไปปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer

2.7 นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultra-centrifuge ที่ 95,000 g เป็นเวลา 17 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.8 นำส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายกลับด้วย storage buffer pH 7.4 ในปริมาณ 1 เท่าของ น้ำหนักตัว และนำไปบดปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer

2.9 เก็บรักษาไมโครโซมที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในไมโครโซม

ก่อนทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในไมโครโซม จะต้องทำการวิเคราะห์หา ปริมาณโปรตีนในไมโครโซม ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ Bio-Rad Dc Protein Assay ในการ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในไมโครโซม โดยมีหลักการพื้นฐาน คือ เป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง โมเลกุลโปรตีนกับสารละลาย alkaline copper tartrate และสาร forlin ซึ่งจะก่อให้เกิดระดับของสี น้ำเงินที่แตกต่างกัน และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 405-750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการเกิดสีดังกล่าว เป็นปฏิกิริยาที่มีความ เสถียรอยู่ในระดับหนึ่ง ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนประมาณ 5-10% หากทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ภายใน 1-2 ชั่วโมงหลังจากเติมสาร Reagent A และ B ลงไปแล้ว

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
- Reagent A: an alkaline copper tatrarte solution
- Reagent B: dilute folin reagent

วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.) เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml ตามลำดับ
- 2.) เติมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ, สารละลายบัฟเฟอร์ PBS (blank) และ ตัวอย่างไมโครโซม ปริมาณ 5 μl ลงในหลุมแต่ละหลุมของถาด 96 หลุม (96 well plate)
- 3.) เติมสาร reagent A ปริมาณ 25 μl
- 4.) เติมสาร reagent B ปริมาณ 200 μl
- 5.) ผสมสารทุกอย่างในแต่ละหลุมให้เข้ากันและทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

การวิเคราะห์หา CYP3A enzyme-substrate activities จาก microsomes

วิเคราะห์หา CYP3A enzyme-substrate activities ด้วยปฏิกิริยา testosterone hydroxylation และใช้ testosterone ที่ความเข้มข้น 243 μmol เป็นซับสเตรต ดัดแปลงมาจากวิธีของ Wonganun และคณะ (22) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมสารผสมที่จะทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.2 M ของ KPi pH 7.4 ปริมาตร 500 μl , regenerating system (ประกอบด้วย 5mM ของ NADP, 100mM ของ G6P, 100mM MgCl_2) ปริมาตร 100 μl , microsome ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 200 μg , 34.67 mM ของ testosterone ปริมาตร 7 μl และเติม water จนปริมาตรครบ 995 μl
- 2) นำหลอดทดลองไปอุ่นใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที
- 3) เติม 1 unit/ μl ของ G6PD ปริมาตร 5 μl จับเวลา 15 นาที
- 4) เติม dichloromethane 5 ml ลงในหลอดทดลอง
- 5) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที
- 6) เติม 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ 11 α -OH-PGT (internal standard) ปริมาตร 12 μl
- 7) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 8) ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
- 9) ละลายกลับด้วย methanol ปริมาตร 200 μl
- 10) กรอง sample ด้วย 0.22 μm nylon filter ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
- 11) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μl

3.7.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A โดยใช้ midazolam เป็นซับสเตรต

การศึกษานี้เริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของ 1'-OH-MDZ ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา midazolam 1'-hydroxylation โดยเกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ CYP3A จากตับหนูเมาซีในหลอดทดลอง และใช้ midazolam เป็นซับสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jurica และคณะ (23)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี:

- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [Aldrich-Sigma, USA]
- Potassium chloride [Carlo Erba, France]
- TRIS base [Merk, Germany]

- Hydrochloric acid (HCL) [Merk, Germany]
- Sodium pyrophosphate [Aldrich-Sigma, USA]
- Glycerol [BDH Chemical Ltd., England]
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA]
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) [Carlo Erba, France]
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) [Merk, Germany]
- Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) [Merk, Germany]
- Phosphoric acid [Merk, Germany]
- 1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ) [Cerilliant, USA]
- Dichloromethane (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Methanol (HPLC grade) [Merk, Germany]
- Acetonitrile (HPLC grade) [Lab-Scan, Thailand]
- Sodium acetate trihydrate [Merk, Germany]
- Diazepam [Cerilliant, USA]
- Midazolam [Cerilliant, USA]

วัสดุอุปกรณ์:

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

- Evaporator [Genevac, USA]
- Microplate reader [Thermo, Finland]

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 20 °C

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

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200, 160, 120, 80, 40, 20, 10 µg/ml แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ ความเข้มข้นละ 10 µl เติมลงในสารละลายหรือในไมโครโซม ที่มีปริมาตรรวม 200 µl จะได้สารละลายหรือไมโครโซมที่มี 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml ตามลำดับ

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 µg/ml จาก 1,000 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (200 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 80 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1,000 µg/ml 1'-OH-MDZ 80 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 320 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 200 µg/ml

1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 160 µg/ml จาก 200 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (200 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (160 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 320 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 200 µg/ml 1'-OH-MDZ 320 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 160 µg/ml

1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 120 µg/ml จาก 160 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (160 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (120 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 300 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 160 µg/ml 1'-OH-MDZ 300 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 120 µg/ml

1.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 80 µg/ml จาก 120 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (120 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (80 \mu\text{g/ml}) (300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 120 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 300 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 80 µg/ml

1.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 µg/ml จาก 80 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (80 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (40 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 80 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 40 µg/ml

1.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 µg/ml จาก 40 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (40 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (20 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 40 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 20 µg/ml

1.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 20 µg/ml 1'-OH-MDZ

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (10 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 20 µg/ml 1'-OH-MDZ 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 400 µl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 10 µg/ml

2.) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ DZP เพื่อใช้เป็น internal standard

- เตรียมสารละลายของ DZP ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml จาก 5 mg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (5,000 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (1,000 \mu\text{g/ml}) (2,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 400 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 1'-OH-MDZ 400 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 2,000 μl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$

- เตรียมสารละลายของ DZP ที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ จาก 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (80 \mu\text{g/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 80 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องใช้สารละลาย 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 1'-OH-MDZ 80 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 1,000 μl จะได้ 1'-OH-MDZ ที่มีความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$

การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

- 1.) การเตรียมตัวอย่างสารละลายเพื่อทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้
 - 1.1 Methanol 180 μl + 1'-OH-MDZ standard 10 μl + internal standard 10 μl
 - 1.2 นำสารละลายที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 50 μl
- 2.) การเตรียมตัวอย่างไมโครโซมเพื่อทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้
 - 2.1 Blank microsome 180 μl + 1'-OH-MDZ standard 10 μl
 - 2.2 เติม dichloromethane 5 ml
 - 2.3 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
 - 2.4 เติม internal standard 10 μl
 - 2.5 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที
 - 2.6 ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
 - 2.7 ละลายกลับด้วย methanol ปริมาตร 200 μl
 - 2.8 กรอง sample ด้วย 0.22 μm nylon filter ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
 - 2.9 นำสารละลายส่วนใสที่ได้ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 50 μl

การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เฟสเคลื่อนที่ : 10 mM Sodium acetate buffer (pH 4.7) : Acetonitrile (55:45)
- คอลัมน์ : Symmetry C18 column, 3.5 μm , 4.6x100 mm
- อัตราการไหล : 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : UV ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

ปริมาตรฉีด : 50 ไมโครลิตร

อุณหภูมิคอลัมน์ : 25 องศาเซลเซียส

การศึกษาเพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เพื่อเป็นการยืนยันผลของข้อมูลที่ได้ว่ามีความถูกต้องเชื่อถือได้อย่างอิงตาม US FDA Guideline (27)

1. การทดสอบความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์แสดงได้ด้วยค่า retention time ของ 1'-OH-MDZ (standard) และ DZP (internal standard) ในรูปของโครมาโตแกรม โดยดูการแยกของ peak ของ 1'-OH-MDZ และ DZP ในสารละลายและในไมโครโซมที่ spike สารดังกล่าวลงไปเปรียบเทียบกับ blank ว่ามี peak อื่นใดมารบกวนหรือไม่

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่นี้สามารถตรวจวัดได้ใน solution (Lower limit of quantitation, LLOQ)

โดยเตรียม 1'-OH-MDZ ที่ความเข้มข้นระดับต่ำอย่างละ 3 หลอดทดลอง และหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) และค่า %DEV ไม่เกิน 20%

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

3.1) Intra-day precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ใน solution ภายในวันเดียวกัน โดยเตรียม 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 1.5, 5, 9 µg/ml ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) และ %RSD ที่ได้ต้องไม่เกิน 15% จึงจะยอมรับได้

$$\%RSD = \frac{\text{Standard deviation (SD)}}{\text{Mean}} \times 100$$

3.2) Inter-day precision

เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ใน solution ต่างวันกัน โดยทำการทดลองและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของ %DEV ของ 1'-OH-MDZ ใน solution ที่เตรียมขึ้น ซึ่งค่า %DEV ต้องไม่เกิน 15% จึงจะยอมรับได้ โดยมีวิธีการดังนี้ เตรียม 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 1.5, 5, 9 µg/ml ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวใน solution โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\%DEV = \frac{\text{ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ที่วิเคราะห์ได้} - \text{ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ จริง}}{\text{ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ จริง}} \times 100$$

5. การทดสอบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีการสกัด (Recovery)

เป็นการศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร โดยเตรียม 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 1.5, 5, 9 µg/ml ในไมโครโซมและใน solution ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และทำการเปรียบเทียบ peak area ของ 1'-OH-MDZ ที่ได้ทั้งในไมโครโซมในสารละลาย

$$\%recovery = \frac{\text{Peak area ของ 1'-OH-MDZ จากการวิเคราะห์ในไมโครโซม}}{\text{Peak area ของ 1'-OH-MDZ จากการวิเคราะห์ในสารละลาย}} \times 100$$

6. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ 1'-OH-MDZ กับ DZP (internal standard) แสดงค่าเป็น coefficient of determination (R^2) โดยเตรียม 1'-OH-MDZ ความเข้มข้น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml นำค่า peak area ratio ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า R^2 ซึ่งค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

การเตรียมไมโครโซม (Hepatic microsomal preparation) และการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน microsomal

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2

การวิเคราะห์หา CYP3A enzyme-substrate activities จาก microsomes

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

- 1.) เตรียมสารผสมที่จะทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.2 M ของ KPi pH 7.4 ปริมาตร 500 μl , regenerating system (ประกอบด้วย 5mM ของ NADP, 100mM ของ G6P, 100mM MgCl_2) ปริมาตร 100 μl , Microsome ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 200 μg , 100 μM ของ midazolam ปริมาตร 7 μl และเติม water จนปริมาตรครบ 995 μl
- 2.) นำหลอดทดลองไปอุ่นใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที
- 3.) เติม 1 unit/ μl ของ G6PD ปริมาตร 5 μl จับเวลา 30 นาที
- 4.) เติม dichloromethane 5 ml ลงในหลอดทดลอง
- 5.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที
- 6.) เติม 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ DZP (internal standard) ปริมาตร 10 μl
- 7.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 8.) ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง
- 9.) ละลายกลับด้วย mobile phase ปริมาตร 200 μl
- 10.) กรอง sample ด้วย 0.22 μm nylon filter ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
- 12.) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 50 μl

3.7.4 การวัดการแสดงออกของยีน CYP3A11

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Quantitative real time RT-PCR โดยใช้ Taqman ที่มี primer จำเพาะต่อยีน CYP3A11 และใช้ยีน GAPDH เป็น internal control

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี:

- Trizol reagent [Gibco, USA]
- Chloroform [Lab-scan, Thailand]
- 2-Propanol [Merk, Germany]
- Ethanol (EtOH) [Merk, Germany]
- DEPC-treated water [Ambion, USA]
- ImProm-ITM Reverse Transcription system [Promega, USA]

- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix No AmpErase[®] UNG [Applied Biosystems, USA]
- TaqMan[®] Gene expression assay Master Mix [Applied Biosystems, USA]

วัสดุอุปกรณ์:

- Volumetric flask
- Autopipets ขนาด 1 - 1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Homogenizer [IKA[®], Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Nanodrop [Thermo, USA]
- Autoclave [Sanyo, Japan]
- StepOnePlus[™] Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]
- PCR thermal cyclers [Eppendorf, Germany]

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำตัวอย่างตับมาสกัด RNA โดยใช้ TRizol reagent
2. จากนั้นวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง nanodrop
3. แล้วนำ RNA ที่ความเข้มข้น 1000 ng/ml มาทำ reverse transcribed เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ ImProm-II[™] Reverse Transcription system
4. นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีน CYP3A11 ในตับหนูเม้าส์ โดยใช้ Taqman ที่มีไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน CYP3A11 และใช้ยีน GAPDH เป็น internal control

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

แสดงผลข้อมูลเชิงพรรณนา (descriptive) ที่ได้จากการทดลองทั้งหมดเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm standard error of the mean) วิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 กลุ่ม ด้วยวิธีทดสอบสหสัมพันธ์ลำดับที่สเปียร์แมน (Spearman's rank test) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง 2 กลุ่มด้วยวิธีทดสอบของแมนและวิทนีย (The Mann-Whitney U test) โดยใช้โปรแกรม Statistical Packages for the Social Science เวอร์ชัน 20 (SPSS version 20.0, SPSS Inc., USA) และพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05 ($P < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังและผลของโรคไตเรื้อรังต่อค่าทางชีวเคมีและน้ำหนักตัวของหนูเมาส์

จากการทดสอบชั่งน้ำหนักตัวของหนูเมาส์กลุ่ม 2 สัปดาห์ในวันที่ 14 หลังทำการผ่าตัดไตข้างขวาทิ้ง (nephrectomy) พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 สัปดาห์มีน้ำหนักตัวลดลง 7.56% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.029$) และจากการทดสอบชั่งน้ำหนักตัวของหนูเมาส์กลุ่ม 4 สัปดาห์ในวันที่ 28 หลังทำการผ่าตัดไตข้างขวาทิ้ง (nephrectomy) พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีน้ำหนักตัวลดลง 10.83% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.002$) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลโรคไตเรื้อรังต่อน้ำหนักตัวหนูและค่า serum creatinine

	กลุ่ม 2 สัปดาห์		กลุ่ม 4 สัปดาห์	
	ควบคุม	CKD	ควบคุม	CKD
จำนวนหนู (ตัว)	4	4	6	6
น้ำหนักตัว (g)	30.1 ± 0.05	27.8 ± 0.63*	40.0 ± 0.00	35.67 ± 0.42**
ค่า Serum creatinine (mg/dL)	0.359 ± 0.05	0.816 ± 0.10*	0.372 ± 0.03	0.555 ± 0.03**

CKD, โรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease)

* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

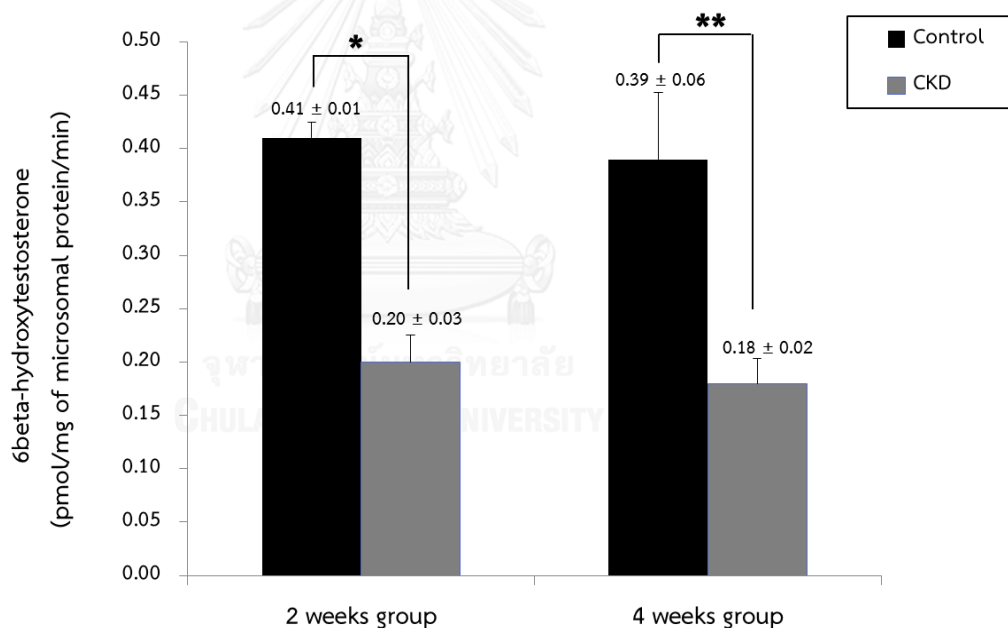
** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวัดระดับ serum creatinine ในหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง พบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีระดับ serum creatinine เพิ่มขึ้น 127.30% และ 49.31% ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของระดับ serum creatinine นั้นมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.029$ และ $p = 0.002$ สำหรับหนูกลุ่ม 2 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ) ดังตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยวิธี chronic ischemic reperfusion นั้นมีภาวะโรคไตเรื้อรังเกิดขึ้นจริง

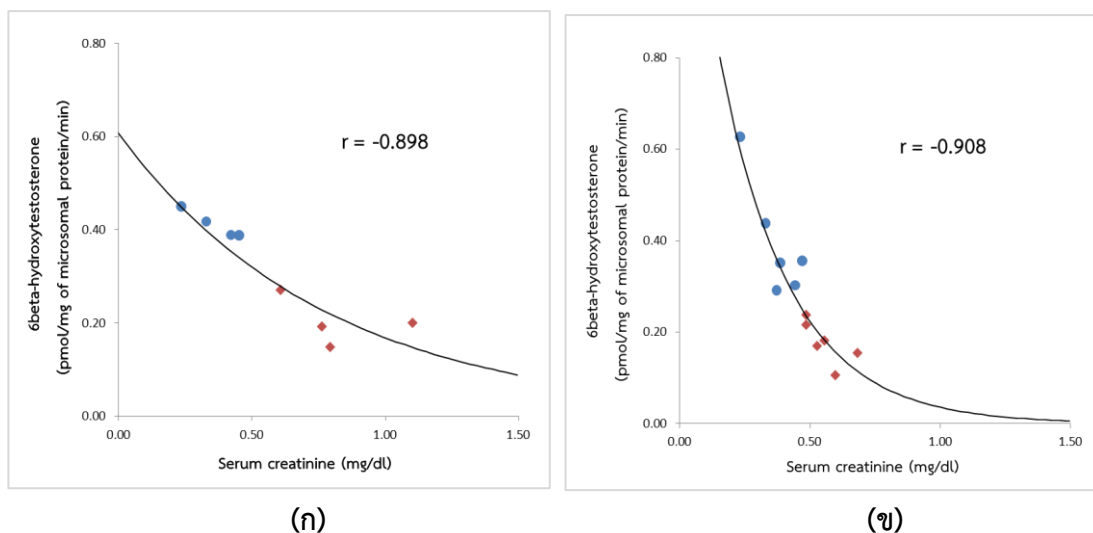
4.2. ผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ testosterone เป็นซัสเตรต

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ testosterone เป็นซัสเตรต พบว่าหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลง 50.60% และ 54.96% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.029$ และ $p = 0.002$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 4 อย่างไรก็ตามค่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ระหว่างกลุ่ม 2 และ 4 สัปดาห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.476$)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า serum creatinine กับการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันกันทั้งในกลุ่ม 2 สัปดาห์และกลุ่ม 4 สัปดาห์ โดยมี $r = -0.898$, $r = -0.908$ ตามลำดับ ($p = 0.002$ และ $p = 0.000$) ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวนี้แสดงได้ว่าหนูกลุ่มที่เกิดโรคไตเรื้อรังมีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลง เมื่อใช้ testosterone เป็นซัสเตรต ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นซัสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

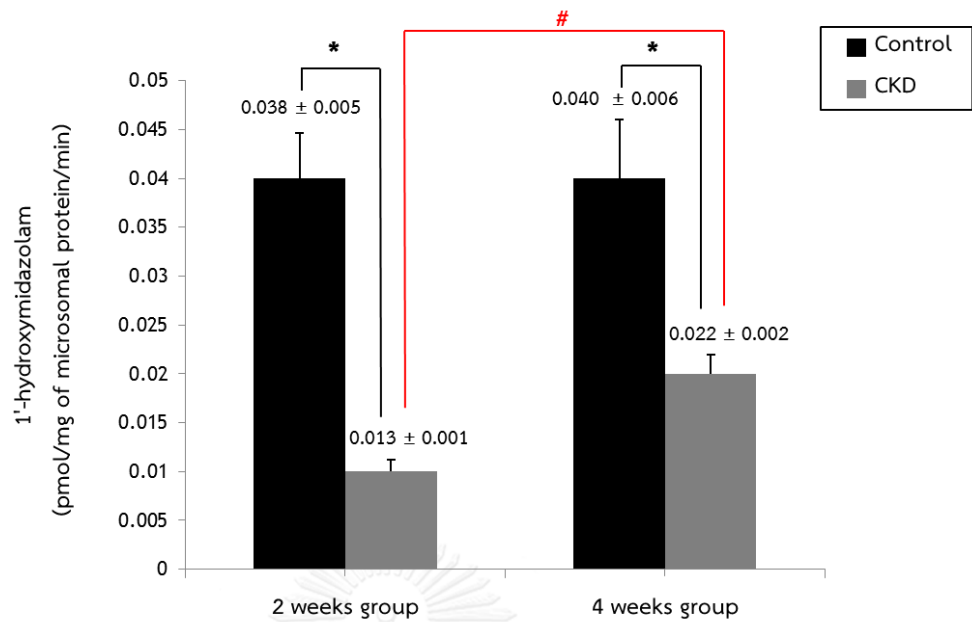


ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ testosterone เป็นยับยั้งระดับกับระดับ serum creatinine ของหนูกลุ่มควบคุม (●) และหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง (◆) โดยภาพ (ก) คือหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ และภาพ (ข) คือหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์

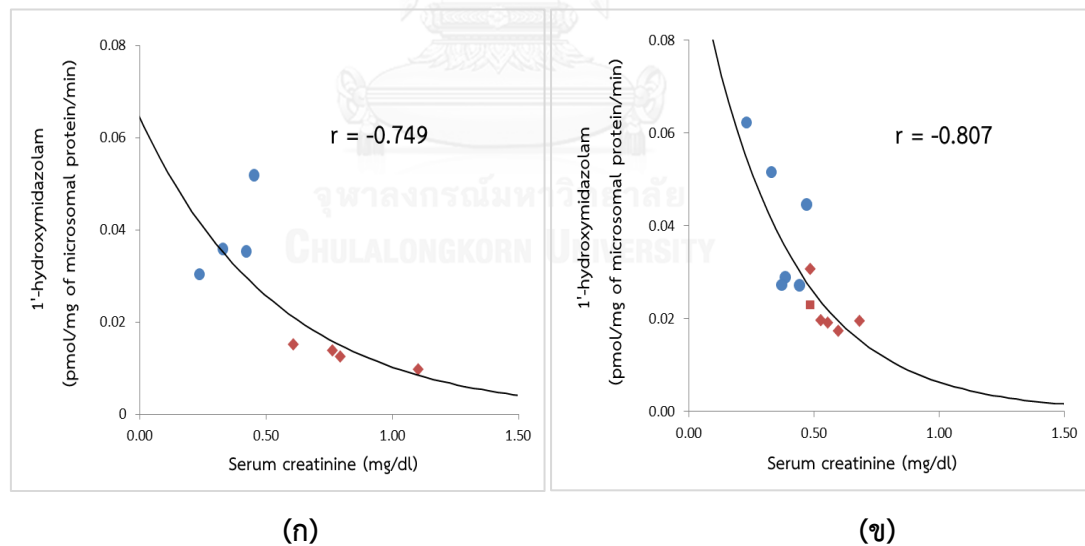
4.3 ผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ midazolam เป็นยับยั้ง

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ midazolam เป็นยับยั้ง พบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลง 66.48% และ 46.51% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.029$ และ $p = 0.015$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 6 และพบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ ($p = 0.010$)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่า serum creatinine กับการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam เป็นยับยั้ง พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันทั้งในกลุ่ม 2 สัปดาห์และกลุ่ม 4 สัปดาห์ โดยมี $r = -0.749$, $r = -0.807$ ตามลำดับ ($p = 0.032$ และ $p = 0.002$) ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวนี้แสดงว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังมีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลงเมื่อใช้ midazolam เป็นยับยั้ง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 6 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต ด้วยเทคนิค HPLC, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม 4 สัปดาห์

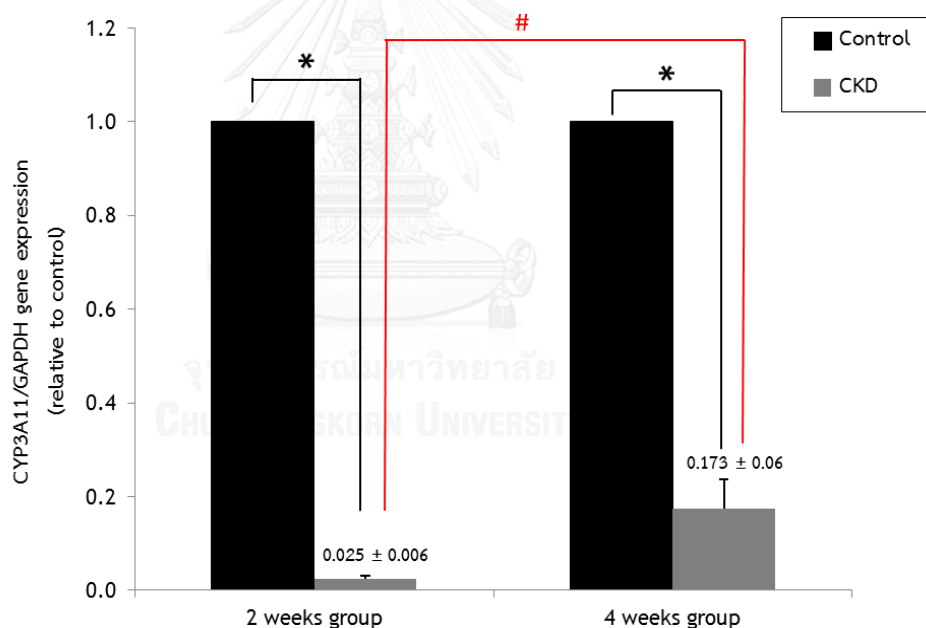


ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์ CYP3A เมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต กับระดับ serum creatinine ของหนูกลุ่มควบคุม (●) และหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง (◆) โดยภาพ (ก) คือหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ และภาพ (ข) คือหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์

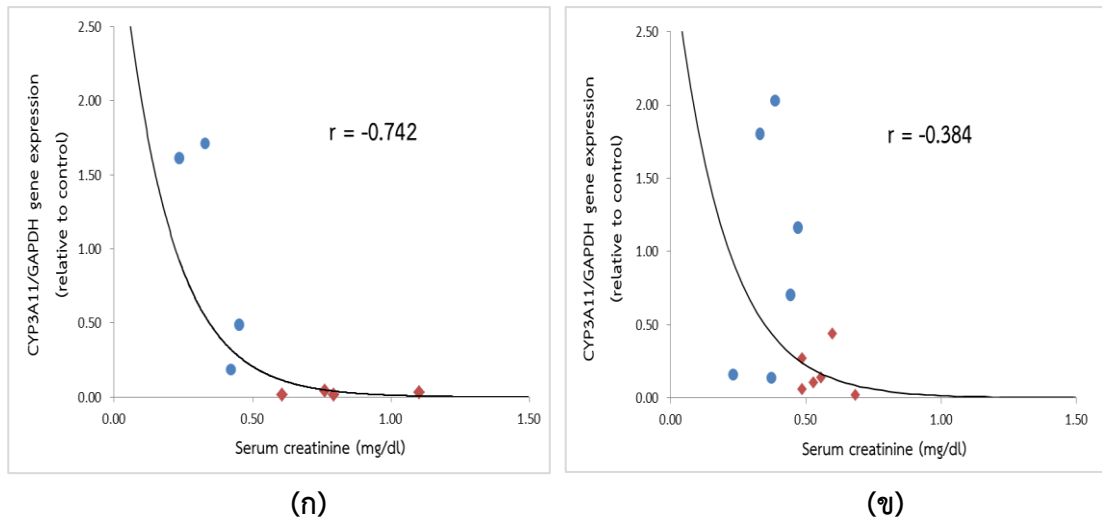
4.4 การแสดงออกของยีน CYP3A11 ในตัวอย่างตับหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง

หนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ มีการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลง 97.53% และ 82.65% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.029$ และ $p = 0.041$ ตามลำดับ) ดังภาพที่ 8 และพบว่าการแสดงออกของยีน CYP3A11 ในหนูกลุ่ม 2 และ 4 สัปดาห์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.038$) โดยผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง โดยใช้ midazolam เป็นซัสเตรต

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า serum creatinine กับการแสดงออกของยีน CYP3A11 พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผัน ทั้งในหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์และกลุ่ม 4 สัปดาห์ โดยมี $r = -0.742$, $r = -0.384$ ตามลำดับ ($p = 0.035$ และ $p = 0.217$) ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวนี้สามารถยืนยันได้ว่าหนูกลุ่มที่เกิดโรคไตเรื้อรังมีการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลง แสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 8 แสดงผลของโรคไตเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน CYP3A11 ด้วยเทคนิค quantitative real time RT-PCR, * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม 4 สัปดาห์



ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน CYP3A11 กับระดับ serum creatinine ของหนูกลุ่มควบคุม (●) และหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง (◆) โดยภาพ (ก) คือ หนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ และภาพ (ข) คือหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในทางคลินิกผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมักประสบปัญหาด้านการใช้ยากลุ่มที่เป็นซับสเตรตของ เอนไซม์ CYP3A และมักจะไม่ได้รับผลการรักษาตามที่คาดหวัง จากการรายงาน พบว่าภาวะโรคไตเรื้อรังน่าจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่ติดด้วย (5) การศึกษาก่อนหน้านี้ในหนูแรท (9, 11, 26) แสดงให้เห็นว่าโรคไตเรื้อรังมีผลให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของยาลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ตับ นอกจากนี้ Dani M. และคณะ (12) พบว่าโรคไตเรื้อรังในหนูเม้าส์ก็มีผลให้การทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ตับลดลง 25% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาผลกระทบของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของ CYP ยังไม่มากนัก และการศึกษาโดยส่วนใหญ่มักจะเลือกใช้ erythromycin เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A แต่มีเพียงการศึกษาของ Velenosi TJ และคณะ (11) ที่เลือกใช้ midazolam และ testosterone เป็นซับสเตรตในการศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังในหนูแรทต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ปัจจุบัน midazolam และ testosterone เป็นซับสเตรตที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา แนะนำให้เลือกใช้เป็นอันดับแรกในการวัดความสามารถของเอนไซม์ CYP3A (21) ดังนั้นการศึกษานี้ได้เลือกใช้ midazolam และ testosterone เป็นซับสเตรตเช่นเดียวกับการศึกษาของ Velenosi TJ และคณะ (11) แต่ทำการศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังในหนูเม้าส์ต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่าเมื่อใช้ testosterone เป็นซับสเตรตการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ลดลงถึง 50.60% และ 54.96% ตามลำดับ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการทำงานของไตปกติ และเมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรตก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูเม้าส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ลดลงถึง 66.48% และ 46.51% ตามลำดับ เทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Dani M. และคณะ (12) ที่มีการใช้โมเดลในการเหนี่ยวนำให้หนูเม้าส์เกิดโรคไตเรื้อรังและใช้ซับสเตรตที่แตกต่างกันกับการศึกษานี้

การทำงานของเอนไซม์ CYP3A ลดลงนี้อาจเป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของยีน CYP3A11 ในตับ (12) สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่ากลุ่มหนูเม้าส์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลง 97.53% และ 82.65% ตามลำดับเมื่อ

เทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) การศึกษาก่อนหน้านี้ได้อธิบายถึงกลไกที่เกิดขึ้นว่าเป็นผลมาจากการสะสมของ uremic serum (10, 25) โดย uremic toxin ไปกระตุ้น nuclear factor kappa B ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการหลั่ง inflammatory cytokine หลายชนิด เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) เป็นต้น (28-30) ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกรวมถึงการทำงานของเอนไซม์ CYP2C, CYP3A (10), CYP1A, CYP2D และ CYP4A (25) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า uremic toxin อาจเป็น mediator ที่สำคัญที่ลดการแสดงออกของยีน CYP3A11 และการทำงานของ CYP3A ในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด CKD ในงานวิจัยนี้ด้วยเช่นกัน

โมเดลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ chronic ischemic reperfusion ซึ่งโมเดลนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Dani M. และคณะ (12) คือระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังสั้นกว่า (โมเดลนี้ใช้เวลา 2-4 สัปดาห์ แต่ Dani M. และคณะใช้เวลา 5 สัปดาห์) และโมเดลนี้ใช้วิธีการผูกหลอดเลือดแดงของไตข้างซ้ายแทนการตัดไตข้างซ้าย จึงทำให้เกิดความรุนแรงของโรคไตน้อยกว่า อาจกล่าวได้ว่าโมเดลของการศึกษานี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังได้เร็วกว่า และโรคไตเรื้อรังที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองมีความรุนแรงน้อยกว่า

เมื่อเปรียบเทียบผลของโรคไตเรื้อรังต่อการแสดงออกของยีน CYP3A11 ระหว่างหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน CYP3A11 ลดลงมากกว่ากลุ่ม 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 8) ซึ่งผลที่ได้ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ว่าหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์นั้นมีการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่นานกว่าและน่าจะเกิดโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการผูกหลอดเลือดแดง (renal artery) ที่ไตข้างซ้ายเป็นระยะเวลา 50 นาที ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงคล้ายกับกลุ่มอาการ Ischemic nephropathy ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากการอุดตันของ renal artery ทำให้เลือดไปเลี้ยงไตลดลง ปริมาณออกซิเจนที่ไปเลี้ยงไตก็ลดลงด้วย ทำให้อัตราการกรองและการดูดกลับของสารต่าง ๆ ลดลง และส่งผลให้หลอดฝอยของไตเหี่ยวเฉาไป (tubular atrophy) ในระยะต้น (ระยะ 2 สัปดาห์) อย่างไรก็ตามร่างกายหนูสามารถ compensate และพยายามซ่อมแซมตนเอง (31) จึงอาจเป็นไปได้ว่าในหนูกลุ่ม 4 สัปดาห์พบการทำงานของไตจากการวัดค่า serum creatinine ต่ำกว่าหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ แต่ยังคงมีค่า serum creatinine ที่สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่มีการทำงานของไตปกติ (ตารางที่ 3)

จากการศึกษาผลของโรคไตเรื้อรังต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A พบว่าเมื่อใช้ testosterone เป็นซับสเตรต การทำงานของเอนไซม์ CYP3A ในหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการทำงานของเอนไซม์ระหว่างหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 2 และ 4 สัปดาห์ พบว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาในระดับยีน ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ midazolam เป็นซับสเตรต พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาใน

ระดับยีน กล่าวคือหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังที่ 4 สัปดาห์มีการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ดีกว่าหนูกลุ่ม 2 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ใน human liver microsomes แสดงให้เห็นว่า midazolam สามารถจับกับเอนไซม์ CYP3A4 ได้ดีกว่า testosterone (24) และจากการศึกษาของ Velenosi TJ และคณะ จะเห็นได้ว่า testosterone เป็นซับสเตรตทั้งของเอนไซม์ CYP3A และ CYP2C (11) ดังนั้นอาจสรุปว่า midazolam น่าจะเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A ที่จำเพาะเจาะจงและให้ผลที่แม่นยำกว่า testosterone ซึ่งจะเป็ประโยชน์สำหรับการศึกษาด้านการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ต่อไป โดยน่าจะเลือกใช้ midazolam เป็นซับสเตรตในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP3A และมีการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตมากกว่า 1 ความเข้มข้น อาจจะช่วยยืนยันผลการศึกษานี้ในหนูเมาส์ได้ดียิ่งขึ้น และอาจขยายผลไปสู่การศึกษาในมนุษย์ต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะโรคไตเรื้อรังส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ CYP3A และการแสดงออกของยีน CYP3A11 ในหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ทราบความเป็นไปได้เบื้องต้นของกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A ในภาวะโรคไตเรื้อรัง และเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์และการปรับขนาดของยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A ให้เหมาะสมกับผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney international*. 2011;80(1):17-28.
2. Ingsathit A, Thakkinstian A, Chaiprasert A, Sangthawan P, Gojaseni P, Kiattisunthorn K, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the Thai adult population: Thai SEEK study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(5):1567-75.
3. The Nephrology Society of thailand. Thailand Renal Replacement Therapy Report Year 2013. {update 2015 Nov 03; cited 2015 Dec 01} Available from: <http://nephrothai.org/trt/trt-l.asp>.
4. Dowling TC. Drug metabolism considerations in patients with chronic kidney disease. *Journal of Pharmacy Practice*. 2002;15(5):419-27.
5. Matzke GR, Aronoff GR, Atkinson AJ, Bennett WM, Decker BS, Eckardt K-U, et al. Drug dosing consideration in patients with acute and chronic kidney disease—a clinical update from *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. *Kidney international*. 2011;80(11):1122-37.
6. Brunton L, Chabner BA, Knollmann B. *Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. McGraw-Hill: Medical Publishing Division; 2010.
7. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2(6):875-94.
8. Bogaards J, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn M, Weaver R, Van Bladeren P, et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*. 2000;30(12):1131-52.
9. LEBLOND F, GUÉVIN C, DEMERS C, PELLERIN I, GASCON-BARRÉ M, PICHETTE V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001;12(2):326-32.

10. Guévin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *British journal of pharmacology*. 2002;137(7):1039-46.
11. Velenosi TJ, Fu AY, Luo S, Wang H, Urquhart BL. Down-regulation of hepatic CYP3A and CYP2C mediated metabolism in rats with moderate chronic kidney disease. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012;40(8):1508-14.
12. Dani M, Boisvert C, Michaud J, Naud J, Lefrançois S, Leblond FA, et al. Down-regulation of liver drug-metabolizing enzymes in a murine model of chronic renal failure. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(3):357-60.
13. National kidney foundation. Kidney disease outcome quality initiative (K/DOQI) guideline. *American Journal of Kidney Diseases*. 2002 39(2) : S17-S31.
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 2009;150(9):604-12.
15. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, et al. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*. 1999;20(1):1-137.
16. Nelson DR, Nebert DW. Cytochrome P450 (CYP) gene superfamily. *Encyclopedia of life science*. 2011.
17. Ioannides C. Cytochromes P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics: royal society of chemistry; 2008.
18. Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*. 2007;21(1):70-83.
19. Liu Y-T, Hao H-P, Liu C-X, Wang G-J, Xie H-G. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug metabolism reviews*. 2007;39(4):699-721.
20. Lu C, Li AP. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague–Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chemico-biological interactions*. 2001;134(3):271-81.
21. US Food and Drug Administration. Drug development and drug interactions: Table of substrate, inhibitors and inducers. [update 2006 Sep 25; cited 2015 Nov 20] Available from:

<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#cypEnzymes>

22. Wonganan P, Clemens CC, Brasky K, Pastore L, Croyle MA. Species differences in the pharmacology and toxicology of PEGylated helper-dependent adenovirus. *Molecular pharmaceutics*. 2010;8(1):78-92.
23. Jurica J, Dostálek M, Konečný J, Glatz Z, Hadašová E, Tomandl J. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *Journal of Chromatography B*. 2007;852(1):571-7.
24. Yuan R, Madani S, Wei X-X, Reynolds K, Huang S-M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002;30(12):1311-9.
25. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, et al. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *British journal of pharmacology*. 2005;144(8):1067-77.
26. Naud J, Michaud J, Beauchemin S, Hébert M-J, Roger M, Lefrancois S, et al. Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39(8):1363-9.
27. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration CfDEaRC, Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2013.
28. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.
29. Bolati D, Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- κ B pathway. *BMC nephrology*. 2013;14(1):56.
30. Miyamoto T, Carrero JJ, Stenvinkel P. Inflammation as a risk factor and target for therapy in chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2011;20(6):662-8.
31. Adamczak M, Wiecek A. Ischemic nephropathy-pathogenesis and treatment. *Nefrologia*. 2012;32(4):432-38.



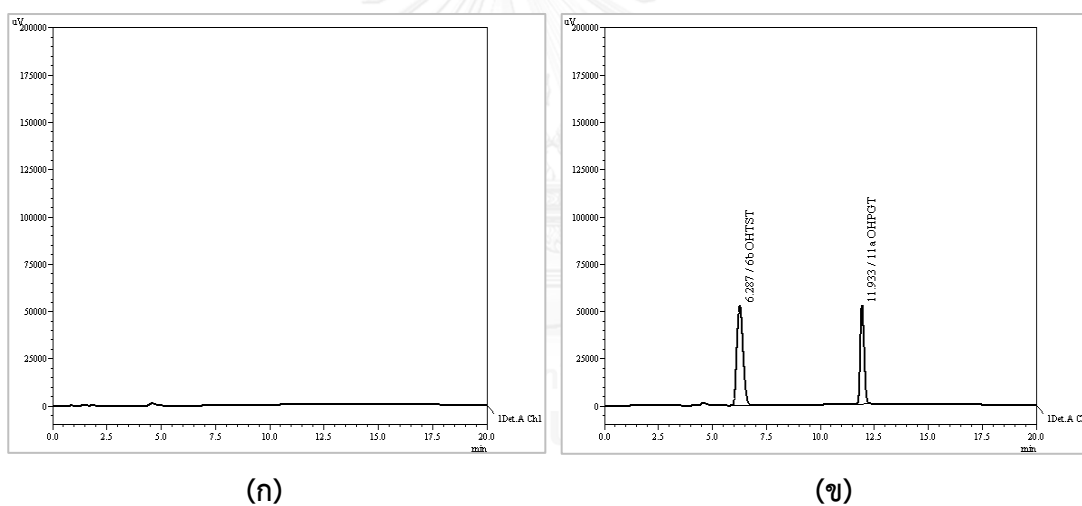
ภาคผนวก ก

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

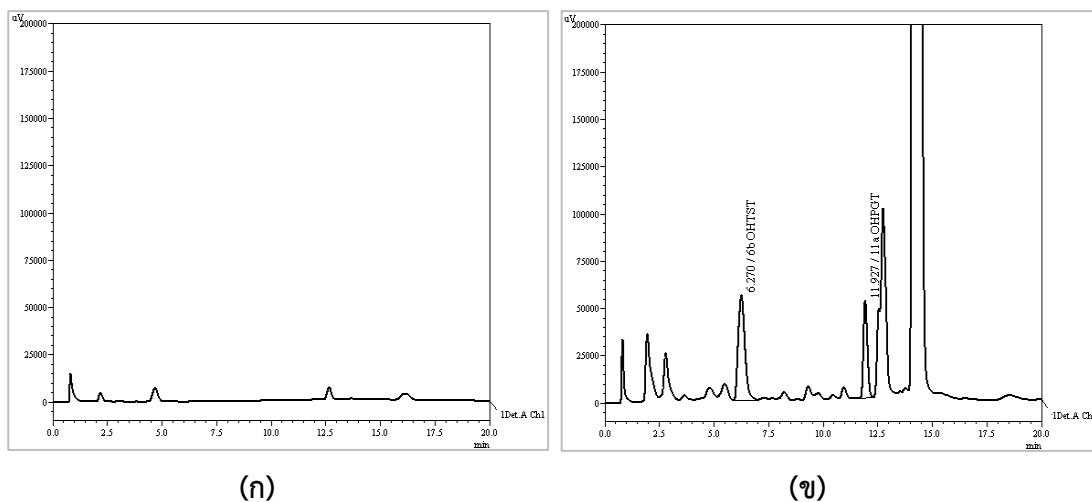
1. ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ในไมโครโซม

1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม ในภาพที่ 1 และ 2 ซึ่งพบว่าค่า retention time ของ 6 β -OH-TST อยู่ระหว่าง 6.3 \pm 0.5 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ของ 6 β -OH-TST และโครมาโตแกรมของ 6 β -OH-TST แยกออกจากโครมาโตแกรมของ 11 α -OH-PGT ที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งมีค่า retention time อยู่ระหว่าง 12.0 \pm 0.5 นาที ทั้งนี้โครมาโตแกรมทั้งสองไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ๆ ในไมโครโซมเมื่อเทียบกับ blank



ภาพที่ 10 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 6 β -OH-TST และ internal standard



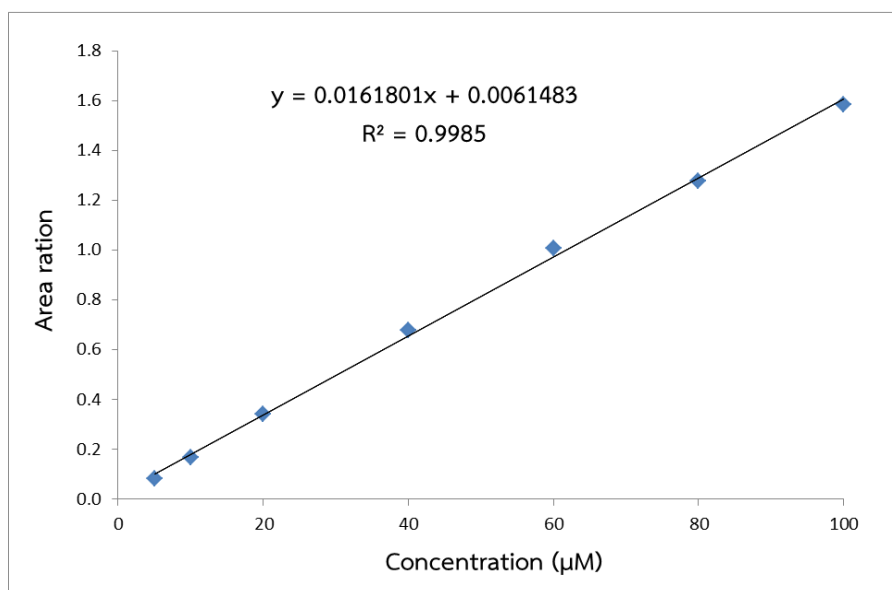
ภาพที่ 11 (ก) ไมโครโซมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank microsomes) และ (ข) ไมโครโซมที่มีสาร 6 β -OH-TST และ internal standard

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

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 5 μ M โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 0.20% (n=3) และค่า %DEV เท่ากับ 1.80% (n=3) ซึ่งจากผลที่ได้พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 6 β -OH-TST ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %RSD และค่า %DEV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง และความถูกต้องเชื่อถือได้

1.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve)

กราฟมาตรฐานของ 6 β -OH-TST มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5-100 μ M ดังภาพที่ 3 โดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST และได้ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9985 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 และมากกว่า 0.99 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และค่าความเข้มข้นที่วัดได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นไม่เบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่เติมลงไปเกิน 15%



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของ 6β-OH-TST

1.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 6β-OH-TST แสดงด้วยค่า %DEV ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน พบว่าค่า %DEV ของ 6β-OH-TST ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.65%, 2.46%, 1.08% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จากผลดังกล่าวพบว่า ค่า %DEV ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องเชื่อถือได้

ตารางที่ 4 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6β-OH-TST ในวันเดียวกัน (Intra-day)

6β-OH-TST concentration (µM)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	1	2	3	Average		
Low (15 µM)	15.28	15.31	15.32	15.30	2.02	0.14
Medium (50 µM)	50.84	50.75	50.78	50.79	1.58	0.09
High (90 µM)	92.36	92.04	92.05	92.15	2.39	0.20

1.5 ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ 6β-OH-TST แสดงด้วยค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟ

มาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intra-day precision) พบว่ามีค่า %RSD ของ 6 β -OH-TST ทั้ง 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 0.14%, 0.09% และ 0.20% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนการวิเคราะห์ในต่างวันกัน (inter-day precision) พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 3.49%, 1.55% และ 3.38% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จากผลที่ได้พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD มีค่าไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงตรง

ตารางที่ 5 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 6 β -OH-TST ในต่างวันกัน (Inter-day)

6 β -OH-TST concentration (μ M)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	Day 1	Day 2	Day 3	Average		
Low (15 μ M)	14.91	15.98	15.30	15.40	2.65	3.49
Medium (50 μ M)	50.76	52.15	50.79	51.23	2.46	1.55
High (90 μ M)	87.48	93.29	92.15	102.39	1.08	3.38

1.6 การศึกษาประสิทธิภาพในการสกัด (Recovery of extraction)

ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 6 β -OH-TST ในไมโครโซม แสดงด้วยค่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือความเข้มข้นต่ำ (low) กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน โดยมีค่า %Recovery เท่ากับ 84.59%, 86.94% และ 91.06% ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียง 100% และไม่น้อยกว่า 80% แสดงว่าวิธีการสกัดสาร 6 β -OH-TST นี้มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 6 แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 6 β -OH-TST (%Recovery)

6 β -OH-TST concentration (μ M)	Area under the curve (mean \pm SD)		%Recovery
	Solution	Microsome	
Low (15 μ M)	169,626.67 \pm 944.24	143,484.33 \pm 1245.96	84.59
Medium (50 μ M)	568,713.00 \pm 14038.78	494,465.33 \pm 9387.11	86.94
High (90 μ M)	1,013,679.67 \pm 1537.40	923,012.33 \pm 1068.10	91.06

จากผลการยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจง, ถูกต้องแม่นยำ, เที่ยงตรง และมีประสิทธิภาพการสกัดที่

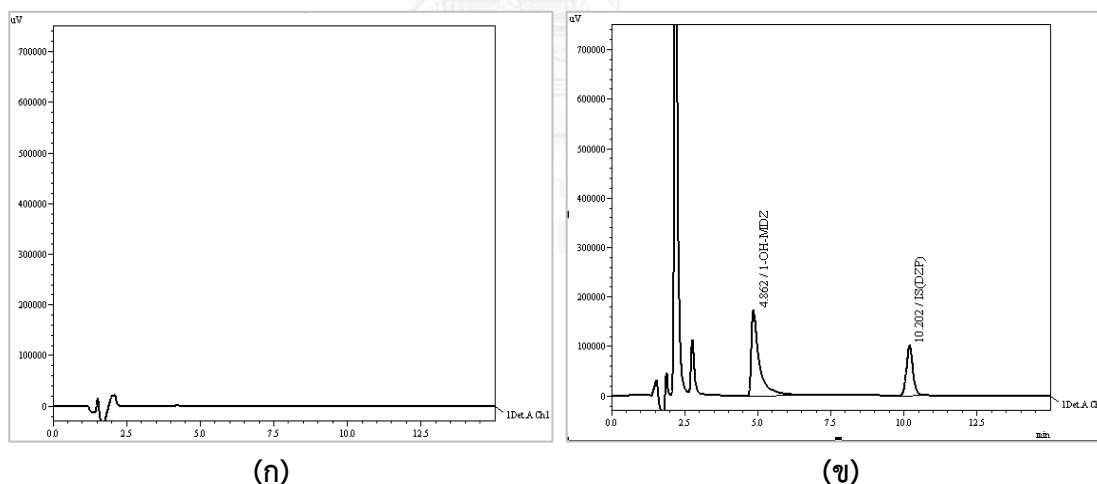
ดี ดังนั้นวิธีวิเคราะห์พัฒนาขึ้นนี้ จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ในไมโครโซม

และเมื่อทำการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ 6 β -OH-TST ในไมโครโซม ได้ทำการสร้าง calibration curve สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวในแต่ละครั้ง และทำการวิเคราะห์ quality control samples (QC samples) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ความเข้มข้นละ 2 ชุด พบว่า QC samples มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

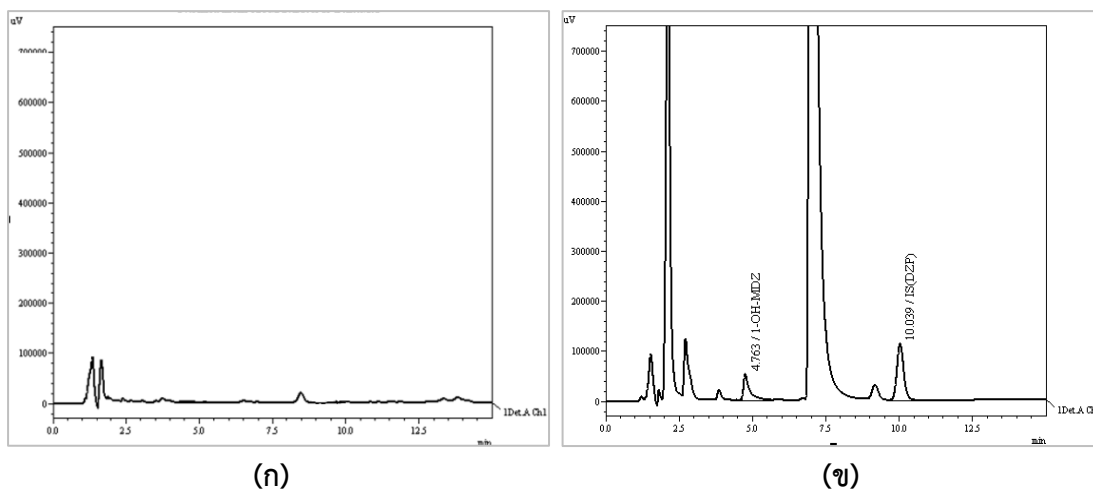
2. ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ในไมโครโซม

2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม ในภาพที่ 13 และ 14 ซึ่งพบว่าค่า retention time ของ 1'-OH-MDZ อยู่ระหว่าง 4.8 ± 0.5 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานบริสุทธิ์ของ 1'-OH-MDZ และโครมาโตแกรมของ 1'-OH-MDZ แยกออกจากโครมาโตแกรมของ DZP ที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งมีค่า retention time อยู่ระหว่าง 10.5 ± 0.5 นาที ทั้งนี้โครมาโตแกรมทั้งสองไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ๆ ในไมโครโซมเมื่อเทียบกับ blank



ภาพที่ 13 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 1'-OH-MDZ และ internal standard



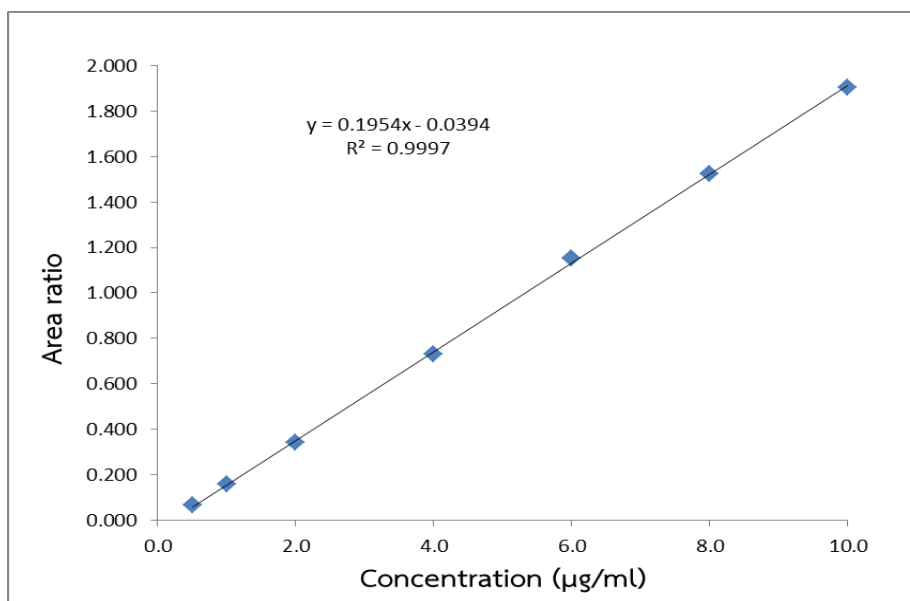
ภาพที่ 14 (ก) ไมโครโซมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank microsomes) และ (ข) ไมโครโซมที่มีสาร 1'-OH-MDZ และ internal standard

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

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.96% ($n=3$) และค่า %DEV เท่ากับ 2.00 ($n=3$) ซึ่งจากผลที่ได้พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-OH-MDZ ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %RSD และค่า %DEV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง และความถูกต้องเชื่อถือได้

2.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve)

กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพที่ 4.10 โดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ และได้ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 และมากกว่า 0.99 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และค่าความเข้มข้นที่วัดได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นไม่เบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่เติมลงไปเกิน 15%



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของ 1'-OH-MDZ

2.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ แสดงด้วยค่า %DEV ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน พบว่าค่า %DEV ของ 1'-OH-MDZ ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.22%, 4.69% และ 2.00% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) จากผลดังกล่าวพบว่า ค่า %DEV ที่ได้ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องเชื่อถือได้

ตารางที่ 7 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ ในวันเดียวกัน (Intra-day)

1'-OH-MDZ concentration (µg/ml)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	1	2	3	Average		
Low (1.5 µg/ml)	1.45	1.45	1.43	1.44	3.78	0.80
Medium (5 µg/ml)	5.02	4.98	4.89	4.96	0.73	1.34
High (9 µg/ml)	8.89	8.85	8.81	8.85	1.67	0.45

2.5 ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ แสดงด้วยค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของ

กราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intra-day precision) พบว่ามีค่า %RSD ของ 1'-OH-MDZ ทั้ง 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 0.80%, 1.34% และ 0.45% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ส่วน การวิเคราะห์ในต่างวันกัน (inter-day precision) พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 2.40%, 4.43% และ 4.68% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) จากผลที่ได้พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD มี ค่าไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง

ตารางที่ 8 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-OH-MDZ ในต่างวันกัน (Inter-day)

1'-OH-MDZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Measured value				Accuracy (%DEV)	Precision (%RSD)
	Day 1	Day 2	Day 3	Average		
Low (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	1.44	1.38	1.40	1.41	6.22	2.40
Medium (5 $\mu\text{g/ml}$)	4.96	4.54	4.79	4.77	4.69	4.43
High (9 $\mu\text{g/ml}$)	8.85	8.39	9.22	8.82	2.00	4.68

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพในการสกัด (Recovery of extraction)

ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 1'-OH-MDZ ในไมโครโซม แสดงด้วยค่า %Recovery ที่ ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือความเข้มข้นต่ำ (low) กลาง (medium) และสูง (high) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน โดยมีค่า %Recovery เท่ากับ 80.49%, 79.66% และ 80.99% ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียง 100% และไม่น้อยกว่า 80% แสดงว่าวิธีการสกัดสาร 1'-OH-MDZ นี้ มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 9 แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร 1'-OH-MDZ (%Recovery)

1'-OH-MDZ concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Area under the curve (mean \pm SD)		%Recovery
	Solution	Microsome	
Low (1.5 $\mu\text{g/ml}$)	542,602 \pm 2067.49	436,693 \pm 11496.28	80.48
Medium (5 $\mu\text{g/ml}$)	2,070,736 \pm 25254.95	1,649,532 \pm 69743.23	79.66
High (9 $\mu\text{g/ml}$)	2,479,541 \pm 21711.45	2,008,290 \pm 46552.76	80.99

จากผลการยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจง, ถูกต้องแม่นยำ, เที่ยงตรง และมีประสิทธิภาพการสกัดที่

ดี ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ในไมโครโซม

และเมื่อทำการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ในไมโครโซม ได้ทำการสร้าง calibration curve สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวในแต่ละครั้ง และทำการวิเคราะห์ quality control samples (QC samples) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (low), กลาง (medium) และสูง (high) ความเข้มข้นละ 2 ชุด พบว่า QC samples มีค่าความเข้มข้นอยู่ภายในช่วง $\pm 15\%$



ภาคผนวก ข

เอกสารรับรองอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่อทางวิทยาศาสตร์



เลขที่ใบรับรอง 10 /57

เลขที่โครงการวิจัย 6/57

คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลของโรคไตวายเรื้อรังต่อเอนไซม์ CYP3A ในตับหนู mouse

(ภาษาอังกฤษ) Effects of chronic kidney disease on hepatic CYP3A in a mouse model

ผู้เสนอโครงการใช้สัตว์ทดลอง อาจารย์แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์สภาวะวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามที่ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โสภณ นภатор)

คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่รับรอง : มิถุนายน พ.ศ.2557

วันหมดอายุ : มิถุนายน พ.ศ.2558

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวพัชรินทร์ จิตติศักดิ์

ปัจจุบันเป็นนิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อปีการศึกษา 2554

การฝึกอบรม

- 22-24 มีนาคม พ.ศ. 2555 "Novel Targets for drug Actions", The pharmacological and Therapeutic Society of Thailand, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

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

- 28-30 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 "Genomic Medicine and Novel Cancer Therapy: Challenges and Opportunities", The pharmacological and Therapeutic Society of Thailand, Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand

การตีพิมพ์เผยแพร่

- 28-30 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 "Effect of Chronic Kidney Disease on Hepatic CYP3A in a Mouse Model", Proceedings of the 37th Congress on Pharmacology of Thailand Meeting (2015)