



รายงานการวิจัย

ชื่อเรื่องภาษาไทย	ผลของส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin การทำงานของ CYP3a2 และการแสดงออกของยีน <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในหนูแรท
ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ	Effect of pomelo on the pharmacokinetics of simvastatin, CYPa2 activity and <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> and <i>Slc21a5</i> mRNA expressions in rats
ผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์ นายกฤษกรณ์ ระย้าศิลป์
ชื่อหน่วยงาน	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่แล้วเสร็จ	2561

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (This research is funded by Chulalongkorn University)

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการที่หน่วยวิจัย Clinical Pharmacokinetics and Pharmacogenomics Research Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University ขอขอบคุณบุคลากรในหน่วยและภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้คำปรึกษา แก้ไขปัญหา ตลอดจนแนวทางการดำเนินวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ Chula Pharmacokinetic Research Center ทุกท่านที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาตลอดจนแนวทางในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ และห้องปฏิบัติการภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนในการให้ใช้สถานที่และเครื่องมือทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ส้มโอ (*Citrus grandis* L. Osbeck) เป็นผลไม้ประเภท citrus ด้วยความคล้ายคลึงกันทางพฤกษศาสตร์กับเกรปฟรุ้ต (*Citrus paradisi*) ที่มีรายงานว่าก่อให้เกิดการรบกวนเภสัชจลนศาสตร์ของยาหลายชนิดรวมถึงยา simvastatin ที่ใช้รักษาโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแต่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายได้โดยเฉพาะต่อกล้ามเนื้อ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3a2 (CYP3a2) และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในหนูแรทเพศผู้ โดยแบ่งหนูแรทออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้น้ำส้มโอ (1ml/kg) เท่านั้นวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่รับยา simvastatin เท่านั้น (ขนาดยา 20 mg/kg) และกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอ (1ml/kg) วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin (20mg/kg) โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหนูกลุ่มที่ได้ยา simvastatin เป็นเวลาทั้งหมด 12 ชั่วโมงเพื่อวัดระดับ simvastatin และ simvastatin acid ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับและลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3a2 ด้วยเทคนิค HPLC ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีค่า $AUC_{0-\infty}$ ของ simvastatin เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ($p<0.01$) และ simvastatin acid เป็น 3 เท่า ($p<0.01$) ค่าความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ยของยา (C_{max}) เพิ่มขึ้น 3.9 เท่า ($p<0.01$) และ simvastatin acid เพิ่ม 3.6 เท่า ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่รับยา simvastatin เท่านั้น ส่วนค่า K_{el} , $t_{1/2}$ และ t_{max} ไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม พบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในเซลล์ลำไส้เล็กในหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้น และกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin ลดลง 79.8% ($p<0.01$) และ 84.3% ($p<0.01$) ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในลำไส้ของหนูทั้งสองกลุ่มลดลง 52.6% ($p<0.05$) และ 56.9% ($p<0.05$) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่รับยา simvastatin เท่านั้นมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ลำไส้เล็กไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในเซลล์ตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่ามีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ตับของหนูแรททุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3a2 พบว่าหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้น และกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3a2 ลดลงถึง 51.77% ($p<0.01$) และ 49.17% ($p<0.01$) ตามลำดับ โดยสรุปน้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับยา simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทและมีผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กของหนูแรทรวมถึงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3a2 ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้แสดงให้เห็นความเสี่ยงของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำส้มโอกับยา simvastatin

Abstract

Pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) is a famous fruit and used as herbal medicine. Simvastatin is widely used for hyperlipidemia patients. The aim of this study is to investigate the effects of pomelo on the pharmacokinetics of simvastatin, CYP3a2 activity and *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNA expressions in rats. The expression of hepatic and intestinal *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNA were measured using the real-time RT-PCR. CYP3a2 activity was investigated in rat hepatic microsomes using midazolam 1'-hydroxylation as a probe reaction determined by using HPLC technique.

Rats were divided into 4 groups: pomelo and combine group were orally administered pomelo juice (1 ml/kg) twice daily for 7 days, but combine and simvastatin group were received simvastatin (20 mg/kg) single dose on day 8. LC-MS/MS was used for determination of plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. $AUC_{0-\infty}$ for simvastatin and simvastatin acid in combine group was increased by 4-fold ($p < 0.01$) and 3-fold ($p < 0.01$), respectively, C_{max} for simvastatin and simvastatin acid in combine group was higher than simvastatin group by 3.9-fold ($p < 0.01$) and 3.6-fold ($p < 0.01$), respectively, but no significant differences in k_{el} , $t_{1/2}$ and t_{max} . The expressions of intestinal *Mdr1a* mRNA were decreased approximately 80% ($p < 0.01$) and 84% ($p < 0.01$), *Mdr1b* mRNA levels were decreased about 53% ($p < 0.05$) and 57% ($p < 0.05$) in pomelo and combine group respectively, but intestinal *Slc21a5* mRNA was unaltered. Conversely, pomelo and combine group down-regulated the expressions of hepatic *Slc21a5* mRNA by 62% and 59% ($p < 0.05$) respectively, but *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA in the livers did not change. Rat hepatic CYP3a2 activity of pomelo group and combine group were decreased by 52% ($p < 0.01$) and 49% ($p < 0.01$) respectively, but remained unchanged in simvastatin group.

In conclusion, administration of pomelo significantly enhance plasma simvastatin and simvastatin acid levels, down-regulated the expressions of intestinal *Mdr1a*, *Mdr1b* and hepatic *Slc21a5* mRNAs in rats and also probably inhibit CYP3a2 activity, suggesting that there is a risk of pomelo and drug interaction which is associated with inhibition of drug transporters expression and CYP3A activity caused by pomelo.

สารบัญเรื่อง (List of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	2
บทคัดย่อภาษาไทย.....	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	4
สารบัญเรื่อง.....	5
สารบัญตาราง.....	8
สารบัญรูปภาพ.....	9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	10
บทที่1 บทนำ (introduction).....	12
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	13
1.1.1 ยา simvastatin.....	13
1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา simvastatin (Mechanism of simvastatin).....	13
1.1.3 กระบวนการเมแทบอลิซึมของยา simvastatin (Metabolism of simvastatin).....	14
1.1.4 ผลที่ไม่พึงประสงค์ของยา simvastatin (Adverse reaction of simvastatin).....	15
1.1.5 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารและยา simvastatin (Food-simvastatin interaction).....	16
1.1.6 ส้มโอ (pomelo).....	16
1.1.6.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์ในส้มโอและเกรปฟรุต (Flavonoids in pomelo and grapefruit).....	16
1.1.6.2 สารประกอบฟิวแรโนคูมารินในส้มโอและเกรปฟรุต (Furanocoumarins in pomelo and grapefruit).....	17
1.1.7 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (cytochrome P450).....	17
1.1.7.1 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 3เอ cytochrome P4503A (CYP3A).....	17
1.1.7.2 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในมนุษย์.....	17
1.1.7.3 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในหนูแรท.....	18
1.1.8 ตัวขนส่งยา (Drug transporters).....	18
1.1.8.1 พีไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein).....	18
1.1.8.2 Organic anion-transporting polypeptides (OATPs).....	19
1.1.9 การศึกษาผลที่เกี่ยวข้องกับส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา.....	19

1.2	วัตถุประสงค์.....	20
1.3	สมมติฐานการวิจัย.....	20
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	20
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง (Main Body).....		21
2.1	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Methods).....	21
2.1.1	สัตว์ทดลอง (Animals).....	21
2.1.2	การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination).....	21
2.1.3	การเตรียมน้ำส้มโอ (Pomelo juice preparation).....	22
2.1.4	การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sampling).....	22
2.1.5	การเก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กของหนูแรท (Liver and Intestinal tissues).....	22
2.1.6	รูปแบบการวิจัย (Research design).....	22
2.1.7	การทดลอง (Experiments).....	22
2.1.7.1	การหาปริมาณสารประกอบ flavonoids ในน้ำส้มโอ.....	22
2.1.7.2	การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรท.....	22
2.1.7.3	การวัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid (active form) ในตัวอย่างเลือดหนูแรท.....	23
2.1.7.4	การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับและลำไส้หนูแรท.....	24
2.1.7.5	การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในตับหนูแรทโดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท.....	26
2.1.8	การวิเคราะห์ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics analysis).....	27
2.1.9	การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis).....	27
2.1.9.1	สถิติที่ใช้วิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์.....	27
2.1.9.2	สถิติที่ใช้วิเคราะห์การศึกษาการแสดงออกของ mRNA transporters และการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2.....	27
2.2	ผลการศึกษา (Results).....	27
2.2.1	ปริมาณ total flavonoid contents ในน้ำส้มโอ.....	27
2.2.2	ระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรท.....	27

2.2.2.1 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ในหนูแรท.....	29
2.2.3 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท.....	31
2.2.3.1 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในลำไส้ เล็กของหนูแรท.....	31
2.2.3.2 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับ ของหนูแรท.....	32
2.2.4 ผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรท โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท.....	33
บทที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง (Discussion).....	35
3.1 น้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของยา simvastatin ในเลือดของหนูแรท.....	35
3.2 น้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในเซลล์ตับของหนูแรท....	36
3.3 น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของ <i>Mdr1</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในลำไส้เล็กและ ตับของหนูแรท.....	37
3.4 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	38
บทที่ 4 สรุปและเสนอแนะผลการศึกษา (Conclusion).....	39
บรรณานุกรม.....	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	46

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ด้วยค่า correlation coefficients ของ <i>MDR1</i> gene ในมนุษย์และหนูแรท.....	18
ตารางที่ 2 แสดงลำดับของไพรเมอร์จำนวนสี่คู่สำหรับ quantitative real-time RT-PCR.....	25
ตารางที่ 3 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในปลาสมานูแรทสองกลุ่มภายหลังจากได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) และกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (1 mL/kg/day-7days) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg).....	30

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของยา simvastatin โดยการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อ mevalonate pathway ในการสร้างคอเลสเตอรอล.....	14
ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ simvastatin และ simvastatin hydroxy acid....	15
ภาพที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD.....	28
ภาพที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20mg/kg) เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD.....	29
ภาพที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM.....	32
ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับของหนูแรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM * <i>p</i> <0.05 เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control.....	33
ภาพที่ 7 แสดงผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรทเมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรท วิเคราะห์ระดับ 1'-Hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC แสดงผลด้วยค่า mean±SEM.....	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

%	Percent
1'-OH-MDZ	1'-hydroxymidazolam
AUC	Area under the curve
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
C _{max}	Maximum concentration
CV	Coefficient of Variation
CYP	Cytochrome P450
g	gram
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA
hr	Hour
K _{el}	Elimination rate constant
l	Liter
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantification
LV	Lovastatin
MDZ	Midazolam
µg	Microgram
µg/ml	Microgram per milliliter
µl	Microliter
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ng	Nanogram

ng/ml	Nanogram per milliliter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	P-glycoprotein
R ²	Coefficient of determination
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SV	Simvastatin
SVA	Simvastatin acid
t _{max}	Time at maximum concentration
t _{1/2}	Half-life

บทที่ 1

บทนำ (introduction)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ยากลุ่มสแตติน (statins, HMG-CoA reductase inhibitors)² โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา simvastatin (SV) ถูกนำมาใช้เป็นยาอันดับแรก (first-line drug) ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) หรือภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia)^{3,4} simvastatin เป็น inactive lactone prodrug เมื่อถูกไฮโดรไลส์จะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูป hydroxy acid ชื่อว่า simvastatin acid (SVA) ซึ่งเป็น active form สามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้⁴

simvastatin และ simvastatin acid เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4) หากรับประทานยาในขนาดสูงหรือรับประทานยาหรือสารอื่นที่มีฤทธิ์ต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยานี้ อาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาได้ หากยานั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4 inhibitors) ผลดังกล่าวส่งผลให้ simvastatin และ simvastatin acid ในกระแสเลือดสูงขึ้นซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียง เช่น กล้ามเนื้ออักเสบ (myopathy) ในรายที่รุนแรงอาจเกิดภาวะกล้ามเนื้อตาย (rhabdomyolysis) และเสียชีวิตได้⁵

ปัจจุบันนิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น การบริโภคผัก ผลไม้ สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพิ่มมากขึ้น แต่การรับประทานอาหารดังกล่าวเหล่านี้ร่วมกับยาอาจเกิดอันตรกิริยากับยาได้ (food or herbal drug interaction) เพราะฉะนั้นการรับประทานอาหารหรือสมุนไพรร่วมกับยา simvastatin อาจทำให้เปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้จึงพึงระวัง อย่างไรก็ตามข้อมูลความปลอดภัยในการรับประทานยาร่วมกับอาหารยังไม่เพียงพอสำหรับผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นและมีความเป็นไปได้มากขึ้นที่ผู้ป่วยจะรับประทานร่วมกับยาแผนปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากทราบคุณสมบัติที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น หากรับประทานอาหารบางชนิดร่วมกับยา simvastatin แล้วจะมีคุณสมบัติเสริมกันในการลดไขมันในกระแสเลือดผู้ป่วยอาจเชื่อและทำตามเพื่อทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น

ส้มโอ (pomelo) เป็นผลไม้ที่มีสารอาหารมาก เช่น มีวิตามินซี ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) รวมถึงมีคุณค่าทางยานำมาใช้รักษาไข้ แก้ปวด เป็นต้น⁶ นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่าหากรับประทานส้มโอสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้⁷ จึงมีแนวโน้มที่ผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูงนั้นจะรับประทานส้มโอร่วมกับยา simvastatin เพื่อลดปัญหาดังกล่าว แต่ยังไม่มีความเชื่อถือของการรับประทานยา simvastatin ร่วมกับส้มโอแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์หรือโทษอย่างไร โดยเฉพาะอย่างยิ่งความคล้ายคลึงกันของส้มโอและเกรปฟรุตที่มีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และฟูราโนคูมาริน (furanocoumarins) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีรายงานว่าสารประกอบดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ได้^{8,9} ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4¹⁰

นอกจากนี้กระบวนการขนส่งยาก็มีความสำคัญโดยต้องอาศัย drug transporters ยา simvastatin นั้นเป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein, P-gp) ซึ่งเป็น efflux transporter และ organic anion-transporting polypeptide1B1 (OATP1B1) ซึ่งเป็น influx transporter ที่มีบทบาทต่อการการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาได้เนื่องจากการแสดงออกของตัวขนส่งยานี้มีผลต่อยา simvastatin หากมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ transporters จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในร่างกายผู้ป่วยได้^{11,12}

การศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาในหนูแรทซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับมนุษย์โดยใช้ยีนเทียบเคียงเพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อมนุษย์ได้ โดยพบว่ายีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* มีความใกล้เคียงมีความใกล้เคียงกับยีน *MDR1* และ *SLCO1B1* ในมนุษย์เป็น 76.5%, 75.3% และ 72% ตามลำดับ^{13,14} และศึกษาผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ โดยใช้ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 (CYP3a2) ในหนูแรทมีลักษณะใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ของมนุษย์ประมาณ 73%¹⁵

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid เมื่อให้ร่วมกับส้มโอและผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 และการแสดงออกของ drug transporters เช่น P-gp และ OATPs หรือไม่ อันเป็นปัจจัยที่สามารถอธิบายถึงกลไกการเกิดอันตรกิริยา โดยใช้หนูแรทเป็นโมเดลในการศึกษาทดลอง

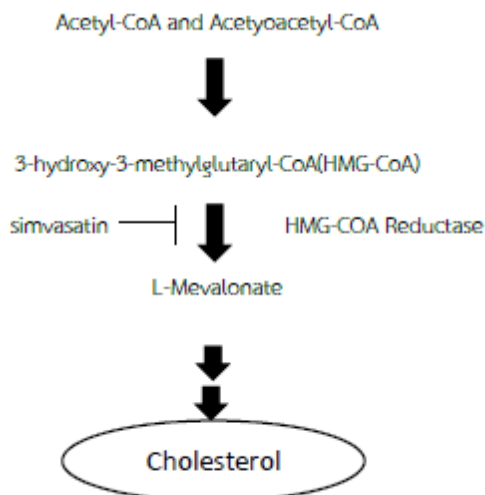
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

1.1.1 ยา simvastatin

ยากุ่มสแตติน (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase inhibitors, HMG-CoA reductase inhibitors) ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1976 ยากุ่มนี้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mevalonate ซึ่งเป็น intermediate pathway ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา simvastatin เนื่องจากยามีประสิทธิภาพสูงสุดและผู้ป่วยทนต่อยาได้ดี¹⁶

1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา simvastatin (Mechanism of simvastatin)

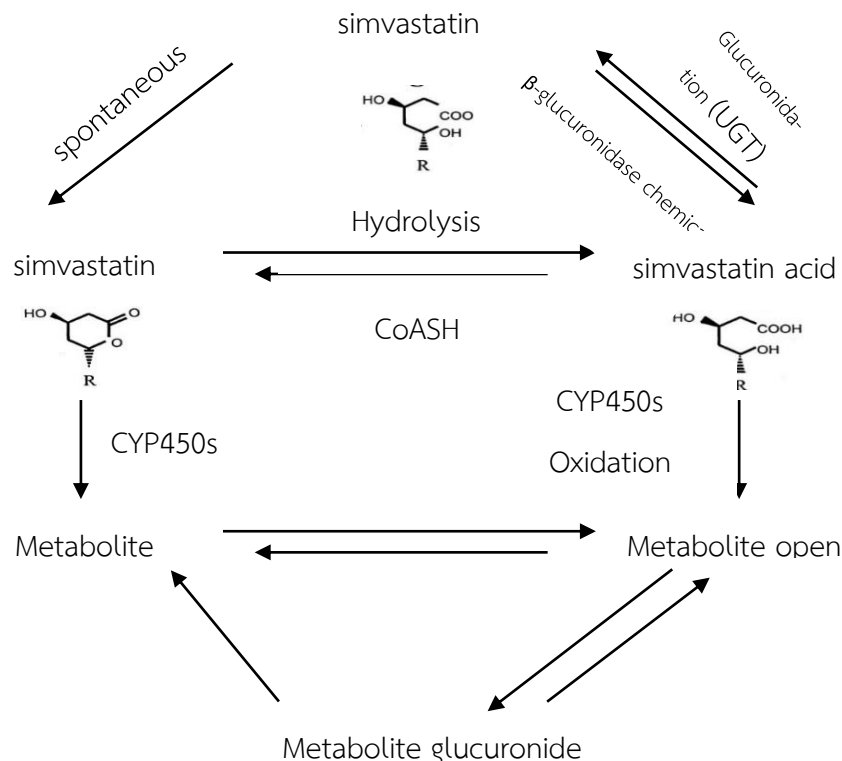
ยา simvastatin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ปกติคอเลสเตอรอลถูกสร้างจาก acetyl-CoA โดย HMG-CoA reductase เป็นเอนไซม์ในขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting enzyme) ในการสร้างและสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่ตับ หากเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง HMG CoA จะไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็น mevalonate จึงไม่เกิด mevalonate pathway ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้การสร้างคอเลสเตอรอลลดลงและระดับ LDL-C ในเลือดลดลงตามไปด้วย¹⁷



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของยา simvastatin โดยการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อ mevalonate pathway ในการสร้างคอเลสเตอรอล¹⁸

1.1.3 กระบวนการเมแทบอลิซึมของยา simvastatin (Metabolism of simvastatin)

ยา simvastatin อยู่ในรูปที่ยังไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (inactive prodrug หรือ inactive lactone prodrug) เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterase) หรือเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) จะถูกเปลี่ยนแปลงกลายเป็นยาที่มีหมู่ไฮดรอกซีซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้¹⁹ เป็นรูป active acid form คือ β -hydroxy acid หรือ simvastatin acid (SVA) เป็น potent competitive inhibitor ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase เมื่อ simvastatin ผ่านกระบวนการ oxidative metabolism โดยผ่านไซโทโครมพี 450 โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4) ซึ่งพบเอนไซม์นี้ได้มากที่บริเวณลำไส้เล็กและตับ ในขณะที่ simvastatin acid นั้นจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึมผ่าน β -oxidation และ oxidative metabolism ซึ่งผ่านเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4เช่นกัน²⁰ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ simvastatin และ simvastatin hydroxy acid²⁰

1.1.4 ผลที่ไม่พึงประสงค์ของยา simvastatin

แม้ว่ายา simvastatin จะมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้ดีและนิยมใช้อย่างแพร่หลาย แต่ก็มีผลข้างเคียงหรือ ข้อจำกัดในการใช้ เนื่องด้วยเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เมื่อถูกยับยั้งการทำงานจะทำให้ระดับยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้น²¹ ส่งผลต่อระบบทางเดินอาหาร อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง (abdominal pain) ท้องอืด (flatulence) คลื่นไส้ (nausea) ท้องผูก (constipation) ท้องเสีย (diarrhea) รวมถึงอาจเกิดความผิดปกติที่กล้ามเนื้อ (myotoxicity) ดังนี้ myopathy myalgia myositis และ rhabdomyolysis²² รวมถึงอาจตรวจพบภาวะไตเสื่อมที่เกิดจากการสลายตัวของกล้ามเนื้อซึ่งส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตได้²³ ประเทศไทยมีการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยในปี ค.ศ. 1984-2009 พบว่าอุบัติการณ์การเกิด rhabdomyolysis จากยา simvastatin ถึงร้อยละ 6.36%²⁴ นอกจากนี้ยังมีผลข้างเคียงอื่นๆที่เกิดจากยาได้ เช่น ผลกระทบต่อดับและระบบประสาทส่วนกลาง เพราะฉะนั้นการใช้ยา simvastatin จึงต้องอยู่ภายใต้การดูแลและคำสั่งของแพทย์เท่านั้น

1.1.5 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารและยา simvastatin (Food drug interaction)

การเกิดอันตรกิริยาของยา simvastatin เกิดได้จากยาหรืออาหารที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) หรือเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของยา simvastatin ได้ ผลดังกล่าวนี้อาจทำให้การรักษาด้วยยาชนิดนี้ไม่ได้ผลหรืออาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากยา มีการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารหรือสมุนไพรกับยา (food or herbal-drug interaction) มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าเกรปฟรุ๊ตนั้นสามารถก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาได้หลายชนิดรวมถึงกลุ่มยาลดไขมัน (antihyperlipidemic drugs) เช่น ยา lovastatin และยา simvastatin เป็นต้น โดยพบว่าเกรปฟรุ๊ตทำให้ระดับยาที่รับประทานร่วมกันมีในกระแสเลือดมากขึ้น โดยพิจารณาจาก AUC และ C_{max} ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา ดังนั้น การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างยาและอาหารนั้นจะเป็นประโยชน์สำคัญต่อผู้ป่วย เพื่อเป็นข้อมูลความปลอดภัยในการใช้ยา²⁵

1.1.6 ส้มโอ (pomelo)

ส้มโอมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* หรือ *Citrus grandis* (L.) Osbeck ในปัจจุบันชื่อ *Citrus grandis* มักนำมาใช้เรียกมากกว่า แต่ชื่อทางวิทยาศาสตร์ภายใต้ International Code of Botanical Nomenclature จะใช้ *Citrus maxima* (J. Burman) Merrill²⁶ ส้มโอเป็นผลไม้ที่มีความนิยมในการบริโภคอย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากส้มโอมีคุณค่าทางโภชนาการสูง พันธุ์ของส้มโอที่นิยมบริโภคและส่งออกมากที่สุดคือส้มโอพันธุ์ทองดีหรือขาวทองดี มีรายงานว่าส้มโอมีคุณสมบัติในการรักษาโรคได้ เช่น มีคุณสมบัติระงับประสาทที่ใช้รักษาโรคลมชัก รักษาแผลบวมหรืออักเสบ ลดอาการไอ รักษาอาการอาหารไม่ย่อย ลดไข้²⁷ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ²⁸ นอกจากนี้ส้มโอมีฤทธิ์ลดไขมัน (antihyperlipidemic) อีกด้วย⁷

ส้มโอมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemicals หรือ phytonutrients) ใกล้เคียงกับเกรปฟรุ๊ต (grapefruit ; *Citrus paradise* MacFad.) เนื่องจากอยู่ในสกุล (genus) เดียวกันจึงมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีคล้ายคลึงกันคือ มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารประกอบฟิวแรโนคูมาริน (furanocoumarins) ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญเช่นเดียวกัน^{8,29,30}

1.1.6.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์ในส้มโอและเกรปฟรุ๊ต (Flavonoids in pomelo and grapefruit)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในได้ในส้มโอและเกรปฟรุ๊ตได้แก่ นารินจิน (naringin) นารินจินิน (naringenin) เฮสเพอริดิน (hesperidin) และนีโอเฮสเพอริดิน (neohesperidin) เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer)⁷ มีรายงานการศึกษาพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์นี้อาจก่อให้เกิดการรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ใน human liver microsome³¹ การศึกษาของ Lim และคณะพบว่าสารประกอบ naringin สามารถยับยั้งการทำงานของ ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ1 และไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 รวมถึงสามารถ

ยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีน ในหนูแรทได้³² การศึกษาของ Mandery และคณะพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ในเกรปฟรุต เช่น นารินจิน (naringin) นารินจีนิน (naringenin) สามารถยับยั้งการทำงานของ OATP1B1 และ OATP1B3 ในเซลล์ HEK293³³

1.1.6.2 สารประกอบฟิวเรโนคูมารินในส้มโอและเกรปฟรุต (Furanocoumarins in pomelo and grapefruit)

สารประกอบ furanocoumarins ที่พบในส้มโอและเกรปฟรุต ได้แก่ เบอร์กามอททิน (bergamottin, BG) และ 6',7'-dihydroxybergamottin (DHBG) สารประกอบชนิดนี้อาจรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่ามียฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และยับยั้งการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีน ดังนั้นการดื่มน้ำเกรปฟรุตจึงสามารถเพิ่มระดับยาในเลือด^{8,9} ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้จากการศึกษาของ Egashira และคณะ⁶² พบว่าส้มโอมีสารประกอบ furanocoumarins จึงคาดว่าส้มโออาจจะมีผลไปเพิ่มระดับยาทาโครลิมีส (tacrolimus) โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 หรือยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีน หรือยับยั้งการทำงานทั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และพีไกลโคโปรตีน นักวิจัยจึงเตือนผู้ป่วยที่ได้รับยาทาโครลิมีสให้หลีกเลี่ยงการรับประทานส้มโอหรือผลไม้ที่มีความใกล้เคียงกับเกรปฟรุต อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัด

1.1.7 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (cytochrome P450)

เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (CYP450) ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ 1950³⁴ เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาและสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารให้เป็นเมแทบอไลต์ที่มีชีวมากขึ้นเพื่อกำจัดออกจากร่างกายได้ง่าย

1.1.7.1 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 3เอ cytochrome P4503A (CYP3A)

เอนไซม์ไซโทโครมพี4503เอ (CYP3A) เป็น subfamily ของเอนไซม์ไซโทโครมพี450 ซึ่งมีความสำคัญโดยมีบทบาทต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา นอกจากนี้เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ ยังมีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการเกิด first-pass metabolism ของยา³⁵ พบว่าการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน³⁶

1.1.7.2 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในมนุษย์

ไอโซฟอร์มของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอที่พบในมนุษย์มีหลายไอโซฟอร์ม ได้แก่ CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 โดยพบว่ายาที่ถูกเมแทบอไลต์ผ่านเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เป็นไอโซฟอร์มที่มีมากที่สุดดังนั้นเอนไซม์ CYP3A4 จึงเป็นไอโซฟอร์มที่นิยมศึกษาในกลุ่ม CYP3A มากที่สุด³⁶ รวมถึง simvastatin และ simvastatin acid เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เช่นกัน หากเอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งการทำงานจะทำให้ระดับยา simvastatin และ simvastatin acid ในร่างกายมีมากเกินไปอาจส่งผลข้างเคียงจากยาได้

เพราะฉะนั้นการวัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid สามารถประเมินการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารหรือยาที่รับประทานร่วมกันกับยา simvastatin ได้³⁷

1.1.7.3 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในหนูแรท

การศึกษาของ Wójcikowski และคณะ ปีค.ศ.2012¹⁵ พบว่าไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 (CYP3A2) ในหนูแรทพบมากที่สุดที่เซลล์ตับในขณะที่ CYP3A1 มีปริมาณที่น้อยกว่า นอกจากนี้ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ยังมีความคล้ายคลึงกับไอโซฟอร์มไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในมนุษย์ถึง 73% จึงนิยมใช้ในศึกษาการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทเพศผู้เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทเพศผู้เช่นเดียวกัน

1.1.8 ตัวขนส่งยา (Drug transporters)

ตัวขนส่งยา (drug transporters) มีบทบาทสำคัญต่อการขนส่งยารวมถึงอาจมีบทบาทต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาหรือมีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรกคือตัวขนส่งยาออก (efflux transporter, pump) เช่นพีไกลโคโปรตีน กลุ่มที่สองคือตัวขนส่งยาเข้าเซลล์ (uptake, influx transporter) เช่น organic anion transporting polypeptides (OATP)³⁸

1.1.8.1 พีไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein)

การขับยาหรือสารออกจากร่างกายนั้นจะมีพีไกลโคโปรตีนเป็นตัวสำคัญช่วยในการขับออกจากร่างกาย เช่น ผ่านทาง biliary canalicular membrane ของเซลล์ตับออกสู่น้ำดี หรือผ่านทาง brush border membrane ของ proximal tubule ของไตออกสู่ปัสสาวะ หรือออกสู่ท่อลำไส้จึงทำให้มีการดูดซึมยาลดลง หนูแรทมียีนที่ code เป็น P-gp transporters ด้วยกัน 2 ยีน คือ *Mdr1a* และ *Mdr1b*¹³

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ด้วยค่า correlation coefficients ของ *MDR1* gene ในมนุษย์และหนูแรท¹³

	Human <i>MDR1</i>	Rat <i>Mdr1a</i>	Rat <i>Mdr1b</i>
Rat <i>Mdr1a</i>	0.762	1	
Rat <i>Mdr1b</i>	0.753	0.886	1

ในปี ค.ศ.2002 Tian และคณะ³⁹ พบว่าน้ำเกรปฟรุตและน้ำส้มสกัดสามารถยับยั้ง efflux ที่เป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนที่บริเวณลำไส้เล็กของหนูแรทซึ่งอาจก่อให้เกิดการเพิ่ม bioavailability ของยาได้ รวมถึงการศึกษาของ Lim และ คณะ ปี ค.ศ. 2008⁴⁰ พบว่าน้ำส้มโอมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีนที่ศึกษาใน L-MDR1 cell ได้เช่นเดียวกันกับน้ำเกรปฟรุต นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำส้มโอมีผลต่อการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีน โดยเกิด down regulated P-gp expression ในเซลล์ขณะที่น้ำเกรปฟรุตนั้นไม่เกิดผลดังกล่าว

1.1.8.2 Organic anion-transporting polypeptides (OATPs)

OATPs เป็น membrane influx transporter ที่ encode ด้วยยีน solute carrier family 21A(SLC21A) ส่วนในหนูแรทคือ Oatp2 ที่ encode ด้วยยีน *Slc21a5* โดยในหนูแรทนั้นจะมีความคล้ายคลึงกับในมนุษย์ถึง 72%¹⁴ การศึกษาของ Niemi ในปี ค.ศ.2011⁴¹ พบว่า OATP1B1 มีความสำคัญต่อการขนส่งยาเข้าเซลล์ (influx transporter) พบการแสดงออกที่ sinusoidal membrane ของ human hepatocyte OATP1B1 จะ encode ด้วยยีน *SLCO1B1* นอกจากนี้มีการรายงานว่ายาน simvastatin นั้นมี simvastatin acid เป็นสับสเตรทของ OATP1B1¹⁴

การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อ OATPs มีไม่มากนักพบเพียงการศึกษาของ Al-Ghazawi และคณะ⁴² พบว่าน้ำส้มโอมีผลลดระดับยาซิลเดนาฟิลในกระแสเลือดอาจเนื่องมาจากน้ำส้มโอยับยั้งการทำงานของ OATP1A2 หรือยับยั้งการแสดงออกของ OATP1A2 ที่ลำไส้เล็กแต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยยังไม่ได้ศึกษากลไกที่แน่ชัด นอกจากนี้มีรายงานว่าทั้ง simvastatin และ simvastatin acid (active form) นั้นเป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนซึ่งเป็นตัวขนส่งยาออก (efflux transporter) ที่ลำไส้เล็กและตับ และ simvastatin acid เป็นสับสเตรทของ OATP1B1 ที่บริเวณเซลล์ตับ เพราะฉะนั้นเมื่อ OATP1B1 ถูกยับยั้งการทำงาน simvastatin acid จะไม่ถูกขนส่งเข้าเซลล์ตับ อาจมีผลทำให้ระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น และหากพีไกลโคโปรตีนที่บริเวณลำไส้เล็กถูกยับยั้งจะทำให้ simvastatin และ simvastatin acid ดูดซึมเข้าร่างกายได้มากขึ้น และอาจก่อให้เกิดอันตรายจากยาที่มีระดับสูง¹⁴

1.1.9 การศึกษาผลที่เกี่ยวข้องกับส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา

ปี ค.ศ.2000 Hou และคณะ⁴³ ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) ในสุกร พบว่าเมื่อสุกรได้รับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ระดับยาไซโคลสปอรินเพิ่มสูงขึ้น โดยพิจารณาจาก AUC และ C_{max} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสุกรที่ไม่ได้รับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

การศึกษาทางคลินิกของ Grenier และคณะ⁴⁴ ได้ศึกษาผลของการดื่มน้ำส้มโอหรือน้ำแครนเบอร์รี่ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินในอาสาสมัคร พบว่าผู้ที่ดื่มน้ำส้มโอร่วมกับยาไซโคลสปอริน มีค่า AUC และ C_{max} ของยาไซโคลสปอรินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ผู้ที่ดื่มแครนเบอร์รี่ไม่แสดงผลดังกล่าว

ในปี ค.ศ.2015 Anlamlert และคณะ⁴⁵ ศึกษาผลของเนื้อส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินในอาสาสมัคร พบว่าผู้ที่ได้รับทั้งส้มโอและยาไซโคลสปอรินจะมีระดับ AUC และ C_{max} ของยาไซโคลสปอริน เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาของ Lin และคณะในปี ค.ศ. 2011⁴⁶ ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินและยาทาโครลิมีส (tacrolimus) ในหนูแรทเพศผู้ พบว่าหากหนูที่ได้รับสารสกัด

จากเปลือกส้มโอพร้อมกับยาไซโคลสปอรินจะมีผลเพิ่ม bioavailability ของยาไซโคลสปอรินและยาทาโครลิมีส เป็น 100% และ 234.7% ตามลำดับ

ในทางตรงกันข้ามการศึกษาของ Al-Ghazawi และคณะ⁴² ศึกษาผลของการดื่มน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาซิลเดนาฟิล (sildenafil) ในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่าผู้ที่ดื่มน้ำส้มโอจะมีค่า C_{max} , AUC น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่นักวิจัยไม่ได้ศึกษากลไกของกระบวนการดังกล่าว

เนื่องด้วยผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูงเพิ่มจำนวนมากขึ้นในปัจจุบันกรบกับกระแสความนิยมการใช้สมุนไพรหรือบริโภคอาหารเพื่อหวังผลทางสุขภาพก็เป็นที่ยอมรับมากขึ้น ซึ่งการบริโภคอาหารหรือสมุนไพรเหล่านั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมาเมื่อรับประทานร่วมกับยาแผนปัจจุบัน (Food or Herbal-Drug interaction)^{47,48} และมีความเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยจะรับประทานส้มโอและยา simvastatin ร่วมกัน ดังนั้นหากทราบถึงอันตรกิริยาของส้มโอและยาก็คจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย แต่เนื่องด้วยยังไม่มีการศึกษาผลทางเภสัชจลนศาสตร์ของส้มโอและยา simvastatin มีเพียงรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ให้ผลขัดแย้งกันกับยาตัวอื่นที่ไม่ใช่ยา simvastatin และยังไม่ทราบกลไกของสารในส้มโอที่แน่ชัด รวมถึงผลของ drug transporters ต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยา (Food-Drug interaction) ระหว่างกันอาจมีความเป็นไปได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลความปลอดภัยเพิ่มเติมของการใช้ยาและทำให้การรักษาผู้ป่วยนั้นเป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น หากทราบว่ากรที่ได้รับยา simvastatin และส้มโอร่วมกันนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ซึ่งเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในหนูแรท

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในตับของหนูแรท และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 น้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของ simvastatin และ simvastatin ในเลือดของหนูแรท

1.3.2 น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP3a2 ในตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 และผลต่อการแสดงออกของ drug transporters ในหนูแรท หากเกิดอันตรกิริยาต่อกันจะเป็นการทำนายผลที่มีโอกาสเกิดได้ในมนุษย์ซึ่งอาจได้รับความเสี่ยงอันจะเป็นข้อมูลที่เป็ประโยชน์ในการใช้ยาดังกล่าวในผู้ป่วยต่อไป

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง (main body)

2.1 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

2.1.1 สัตว์ทดลอง (Animals)

การศึกษานี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 250-330 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ สัตว์ทดลองจะอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 24 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลองซึ่งได้รับน้ำและอาหารแบบไม่จำกัดปริมาณ ภายใต้การควบคุมความมืดและสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมง ก่อนการทดลองหนูแรทจะถูกงดน้ำและอาหารข้ามคืน

2.1.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

วิธีคำนวณจำนวนสัตว์ทดลองที่จะใช้ในงานวิจัย อ้างอิงจากงานวิจัยของแก้วกั้ววาล และคณะ¹ โดยสูตรที่ใช้คือ

$$n = 2 \cdot S.D.^2 \frac{(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta})^2}{\delta^2}$$

n = ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ

$S.D.$ = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรหลัก (50%)⁹² (Bangphumi K et al. 2015)

$Z_{\frac{\alpha}{2}}$ = ค่านัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (1.96)

Z_{β} = ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างที่ความเชื่อมั่น 95% (1.28)

δ = ค่าความแตกต่างที่มีความสำคัญทางสถิติ (100%)

$$\begin{aligned} n &= 2 \cdot 0.5^2 \frac{(1.96 + 1.28)^2}{1.0^2} \\ &= 5.25 \end{aligned}$$

สรุปใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว ออกแบบการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ดังนั้นการศึกษานี้ต้องใช้หนูแรทจำนวน 24 ตัว

2.1.3 การเตรียมน้ำส้มโอ (Pomelo juice preparation)

นำเนื้อส้มโอพันธุ์ทองดีมาปั่นด้วยเครื่องปั่น Hurom HU 500 Slow Juicer จากนั้นนำไปกรองแยกเพื่อเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำส้มโอ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการทดลองและใช้เลือดเดียวกันตลอดการทดลองโดยซื้อจากสวนส้มโอจาก อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ซื้อในช่วงคือช่วงเดือนมีนาคม

2.1.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sampling)

เก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะที่บริเวณหาง (tail vein) ครั้งละ 0.3 ml เก็บใน eppendorf tube ที่หล่อหัวเข็มด้วย heparin เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจะทำการการุณยฆาต (sacrificed) จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาที 25 องศาเซลเซียส แยกส่วนพลาสมาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์ด้วยระดับยา simvastatin และ simvastatin acid

2.1.5 การเก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กของหนูแรท (Liver and Intestinal tissues)

เก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูแรทภายหลังการการุณยฆาต เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ transporters และการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 โดยเริ่มต้นจากการนำตับและลำไส้ส่วนต้นออกจากร่างกายหนูแรทหลังการทำการุณยฆาตทันทีและเก็บตัวอย่างไว้ในหลอดทดลองใส่ในภาชนะที่บรรจุไนโตรเจนเหลวเย็นจัด (liquid nitrogen) เพื่อคงสภาพตัวอย่างไว้ จากนั้นนำตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวันที่ทำการวิเคราะห์

2.1.6 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Experimental research study

2.1.7 การทดลอง (Experiments)

2.1.7.1 การหาปริมาณสารประกอบ flavonoids ในน้ำส้มโอ

หาปริมาณสารประกอบ flavonoids ทั้งหมด (total flavonoid contents) ในน้ำส้มโอพันธุ์ทองดีด้วยวิธี colorimetric assay (chromogenic system และ color reaction) จากวิธีของ Zhishen และคณะ⁵⁰ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เพื่อหาหาปริมาณที่แน่นอนของสารประกอบ flavonoids ทั้งหมดในน้ำส้มโอตัวอย่าง

2.1.7.2 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรท แบ่ง

หนูแรทออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 control group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับ 0.5% CMC (Carboxymethyl cellulose) ปริมาณ 1 ml/kg กลุ่มที่ 2 simvastatin group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin ขนาด 20 mg/kg เท่านั้น กลุ่มที่ 3 pomelo group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอปริมาณ 1 ml/kg เท่านั้น กลุ่มที่ 4 combine group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอปริมาณ 1 ml/kg ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)

โดยหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอจะได้รับครั้งละ 1 ml/kg เป็นเวลา 7 วันติดต่อกันในเวลา 9.00 น. และ 17.00 น. ในขณะที่หนูกลุ่มอื่นที่ไม่ได้รับน้ำส้มโอจะได้รับน้ำเปล่าครั้งละ 1 ml/kg เป็นเวลา 7 วันติดต่อกันในเวลา 9.00 น. และ 17.00 น.

หนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin จะได้รับยา simvastatin ในสารละลาย 0.5% CMC ซึ่งมีขนาดยา 20 mg/kg ครั้งเดียว (single dose) ผ่านทาง oral gavage โดยหนูกลุ่ม combine group จะได้รับน้ำส้มโอในวันที่ 7 ก่อนได้รับยา simvastatin 30 นาที

ในวันที่ทำการทดลองเจาะวัดระดับยาในพลาสมาหนูแรท หนูจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดโดยมีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดคือก่อนได้รับยา (predose) 0 ชั่วโมงและหลังได้รับยา (postdose) ที่เวลา 0.50, 1.00, 1.25, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00, 9.00 และ 12.00 ชั่วโมง ตามลำดับ

2.1.7.3 การวัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid (active form) ในตัวอย่างเลือดหนูแรท

วัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed และคณะ⁵¹ โดยเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) จากนั้นจึงทำการตรวจวัดระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในตัวอย่างดังนี้

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

Acetonitrile (LC-MS grade) [Merck, Germany], Ammonium acetate [Merck, Germany], Glacial acetic acid [Fisher Scientific, USA], Lovastatin [Toronto Research chemicals, Canada], Methyl tertiary butyl ether (MTBE) [Merck, Germany], Simvastatin [Toronto Research chemicals, Canada], Simvastatin hydroxyl acid, ammonium salt [Toronto Research chemicals, Canada]

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือ Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [ยี่ห้อ Shimadzu, Japan รุ่น 8040]

สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้วิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ใช้ 10mM ammonium acetate: acetonitrile (25:75), คอลัมน์ Luna C₁₈ 100A, 3µm, 100mm x 2mm [Phenomenex, USA] อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ auto sampler 4 องศาเซลเซียส

MS/MS Optimization

ทำการ optimization simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin (internal standard) โดยเลือกใช้ ESI source ที่เหมาะสม การทดลองนี้ได้เลือก protonated molecular ion $[M+H]^+$ simvastatin มีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 419.00 simvastatin acid ได้ค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 437.50 และ lovastatin ได้มวลต่อประจุคือ 405.40 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jemal และคณะ⁵² ติดตามการเปลี่ยนของปริมาณของค่ามวลต่อประจุของ simvastatin $419.00 > 199.00$ second transitions จะได้ $m/z=225.15$ (m/z 419 > 225.00) ในขณะที่ simvastatin acid คือ $437.00 > 303.00$ second transitions คือ 285.05 (m/z 419 > 285.00) และ lovastatin คือ $405.00 > 243.00$ เลือก second transitions เท่ากับ 266.90 (m/z 405 > 267.00) เพื่อใช้ในการยืนยันไอออนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin

ช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานของ simvastatin และ simvastatin acid จะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ng/ml ถึง 20 ng/ml ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (LLOQ) ของ simvastatin และ simvastatin acid คือ 0.092 ng/ml และ 0.105 ng/ml ตามลำดับ จากการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day analysis) มีค่า coefficient of variation (CV) ดังนี้ simvastatin ความเข้มข้น 0.3 ng/mL CV=9.29 %, ความเข้มข้น 3.5 ng/mL CV=3.47 % และความเข้มข้น 15.0 ng/mL CV=4.93% simvastatin acid ความเข้มข้น 0.3 ng/mL CV=10.20 %, ความเข้มข้น 3.5 ng/mL CV=1.50 % และความเข้มข้น 15.0 ng/mL CV=4.21%

2.1.7.4 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้หนูแรท

วิเคราะห์การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* โดยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยมีเอ็มอาร์เอ็นเอ *GAPDH* เป็น internal control

ตารางที่ 2 แสดงลำดับของไพรเมอร์จำนวนสี่คู่สำหรับ quantitative real-time RT-PCR⁵³

mRNA	Orientation	Primer sequences 5' to 3' orientation
<i>Mdr1a</i>	Forward	5'-TCT GGC GGC CAT TAT CCA T-3'
	Reverse	5'-TCA TAC TAC GGT TGT TTC CTA CAT TTG-3'
<i>Mdr1b</i>	Forward	5'-TGA ATC CCA AAG TGA CAC TGG T-3'
	Reverse	5'-ATA CTT CTG CGA ATT GAT CTC CTT ATT-3'
<i>Slc21a5</i>	Forward	5'-CCA CTG CTG AGG TAG TCT TCC TTA TG-3'
	Reverse	5'-CAG AGC CAG AAT GCT AAG TGT GC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
	Reverse	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

2-Propanol [Merck, Germany] Chloroform [Lab, scan, Thailand], Dichloromethane [Merck, Germany], ImProm-IITM Reverse transcription system [Promega, USA], Primers, TaqMan® Gene expression assay Master Mix [Applied Biosystems, USA], TRIzol® reagent [Gibco, USA]

วัสดุอุปกรณ์

Homogenizer [IKA®, Malaysia], Nanodrop [Thermo, USA], PCR Thermal cycler [Eppendorf, Germany], StepOnePlus™ Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]

ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วย TRIzol® reagent ด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]

นำลำไส้เล็กและตับของหนูแรทมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® reagent วัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยใช้ ImProm-IITM Reverse transcription system นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Thermal cycler หาปริมาณ mRNA จากการคำนวณค่า C_t ที่ได้จากเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR มาทำ normalization ด้วยเอ็มอาร์เอ็นเอ *GAPDH* จากนั้นคำนวณหา

ระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ค่า C_t คือจำนวนรอบของการทำ PCR น้อยที่สุดแต่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด [threshold cycle, C_t])

2.1.7.5 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในตับหนูแรท

โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

การศึกษานี้จะเริ่มด้วยการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นจึงทำการตรวจวัด ปริมาณของ 1'-OH-MDZ ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Midazolam 1'-hydroxylation ที่เกิดขึ้นผ่าน เอนไซม์ ไซโทโครมพี3เอ2 จากตับหนูแรทในหลอดทดลอง โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท การวัดปริมาณ 1'-OH-MDZ ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Jurica และคณะ⁵⁴

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ) [Cerilliant, USA], Diazepam [Cerilliant, USA] Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) [Merck, Germany], Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA], Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA], Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE), Midazolam [Cerilliant, USA], Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) [Aldrich-Sigma, USA], Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) [Aldrich-Sigma, USA], TRIS base [Merck, Germany]

วัสดุอุปกรณ์

High Pressure Liquid Chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น prominence คอลัมน์ที่ใช้ Symmetry C18 column 3.5um, 4.6x100 mm [Water, Japan]

โดยวัด 1'-OHMDZ จากปฏิกิริยา Midazolam hydroxylation ใช้ Midazolam ความเข้มข้น 100 μ M เป็นสับสเตรท และใช้ diazepam เป็น internal standard โดยใช้เครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น prominence นำระดับความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ที่วัดได้ มาคำนวณการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 จากสูตร

$$\text{specific activity} = \frac{\text{enzyme activity } (\mu\text{mol})}{\text{total protein } (\text{mg})}$$

2.1.8 การวิเคราะห์ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics analysis)

หาค่า C_{max} , t_{max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ ของ simvastatin, simvastatin acid โดยค่า C_{max} , t_{max} สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรงจากข้อมูล ค่า AUC_{0-12} จะถูกคำนวณด้วย trapezoidal rule ส่วน AUC ในส่วนที่เป็นความเข้มข้นสุดท้ายวิเคราะห์จากช่วงสุดท้ายของกราฟความเข้มข้นของยากับเวลา ทำเป็น log-linear regression ได้ค่าคงที่การกำจัด (elimination rate constant: k_{el}) นำมาคำนวณด้วยสูตร $AUC_{t-\infty} = C_{last}/K_{el}$ เพื่อหาค่า $AUC_{0-\infty}$ ส่วนค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) คำนวณได้จากสมการ $t_{1/2} = \ln 2/k_{el}$

2.1.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

2.1.9.1 สถิติที่ใช้วิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์

ข้อมูลที่ได้จะแสดงผลด้วยค่า mean±SD ยกเว้นค่า t_{max} ซึ่งจะแสดงเป็น median (range) จะใช้ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% และ 99% ที่นัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมใช้สถิติ Student's *t*-test (two-tailed) ค่า t_{max} จะใช้ Wilcoxon rank test และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS

2.1.9.2 สถิติที่ใช้วิเคราะห์การศึกษาการแสดงออกของ mRNA transporters และการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2

ข้อมูลจะแสดงผลด้วยค่า mean±SEM เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มหลายกลุ่มสถิติที่ใช้คือ one way analysis of variance (Anova) post hoc tests การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมใช้สถิติ Student's *t*-test (two-tailed) ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% และ 99% ที่นัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS

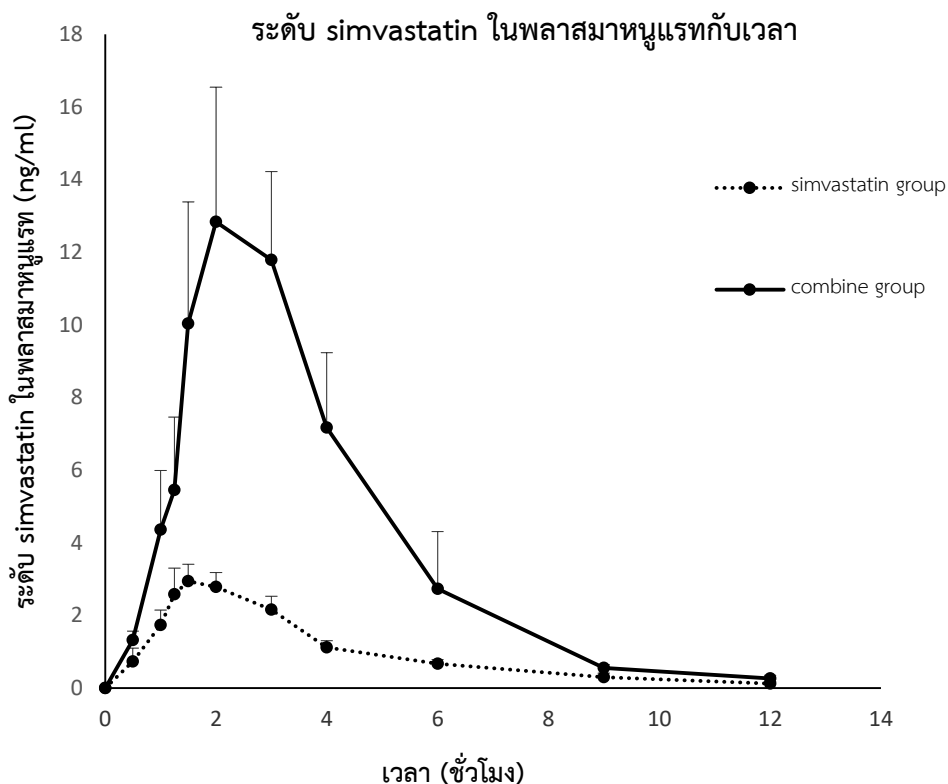
2.2 ผลการศึกษา (Results)

2.2.1 ปริมาณ total flavonoid contents ในน้ำส้มโอ

ปริมาณสารประกอบ flavonoid ทั้งหมด (total flavonoids contents) ของน้ำส้มโอตัวอย่างจะอยู่ในช่วง 9169.37-12782.62 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ของน้ำส้มโอที่บริโภคได้ (edible portion) (จากตัวอย่างวิเคราะห์ $n=8$)

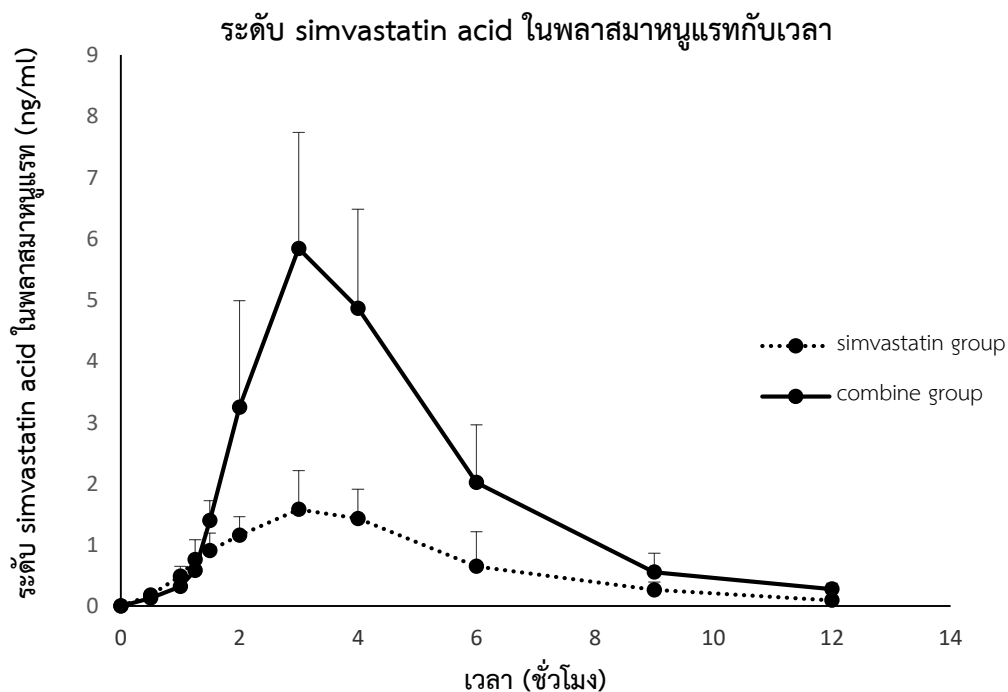
2.2.2 ระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรท

ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ simvastatin ณ จุดเวลาต่างๆ ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น และหนูกุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่าหนูกุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีระดับความเข้มข้นของ simvastatin สูงกว่าหนูกุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD

ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ณ จุดเวลาต่างๆ ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาสูงกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20mg/kg) เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD

2.2.2.1 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ในหนูแรท

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin เปรียบเทียบความแตกต่างแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาหนูแรทสองกลุ่มภายหลังจากได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) และกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (1 ml/kg/day-7days) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)

(แสดงผลด้วยค่า mean±SD ยกเว้น ค่า t_{max} ที่แสดงด้วยค่า median with ranges)

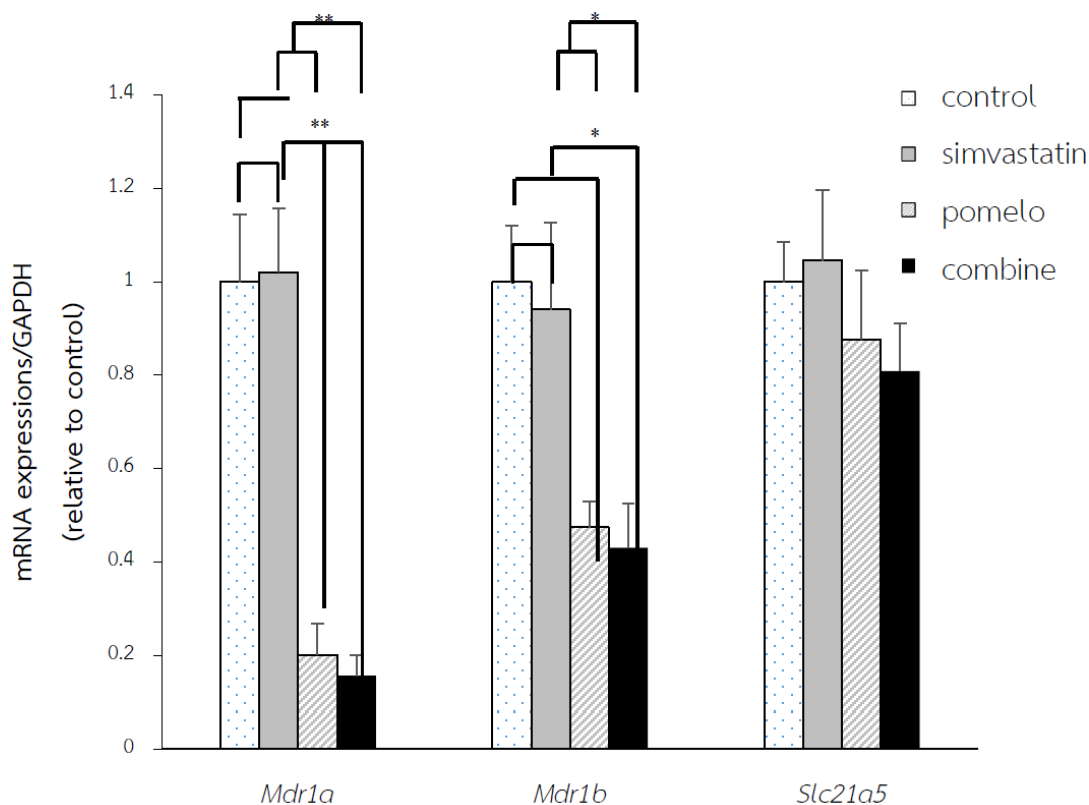
	หนูที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น (simvastatin group)	หนูที่ได้รับยา simvastatin ร่วมกับ น้ำส้มโอ (combine group)	p-value
<u>simvastatin</u>			
C_{max} (ng/ml)	3.83 ± 0.75	15.03 ± 1.52	** $p < 0.01$
t_{max} (hr)	1.75 (1.25-3)	3 (2-3)	$p = 0.068$
$t_{1/2}$ (hr)	2.01 ± 0.48	2.12 ± 0.37	$p = 0.67$
AUC ₀₋₁₂ (ng·hr/ml)	9.34 ± 2.06	39.36 ± 3.93	
AUC _{12-∞} (ng·hr/ml)	0.37 ± 0.17	0.84 ± 0.30	
AUC _{0-∞} (ng·hr/ml)	9.70 ± 2.17	40.20 ± 4.15	** $p < 0.01$
K_{el} (hr ⁻¹)	0.36 ± 0.07	0.34 ± 0.06	$p = 0.56$
<u>simvastatin acid</u>			
C_{max} (ng/ml)	1.89 ± 0.45	6.78 ± 1.07	** $p < 0.01$
t_{max} (hr)	3.5 (3-6)	3 (3-4)	$p = 0.18$
$t_{1/2}$ (hr)	2.31 ± 0.63	2.36 ± 0.67	$p = 0.83$
AUC ₀₋₁₂ (ng·hr/ml)	7.57 ± 2.30	21.91 ± 5.49	
AUC _{12-∞} (ng·hr/ml)	0.31 ± 0.10	0.93 ± 0.40	
AUC _{0-∞} (ng·hr/ml)	7.87 ± 2.36	22.85 ± 5.78	** $p < 0.01$
K_{el} (hr ⁻¹)	0.32 ± 0.08	0.31 ± 0.08	$p = 0.88$

* $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้น

2.2.3 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

2.2.3.1 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูแรท

พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในลำไส้เล็กลดลงถึง 79.8% และ 84.3% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $**p < 0.01$ ($p = 0.009$ และ $p = 0.007$ ตามลำดับ) แต่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในลำไส้เล็กของหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.932$) นอกจากนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กลดลง 52.6% และ 56.9% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $*p < 0.05$ ($p = 0.025$ และ $p = 0.017$ ตามลำดับ) ขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.894$) อย่างไรก็ตามพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กหนูแรทไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p = 0.720$, $p = 0.581$ และ $p = 0.826$ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 5

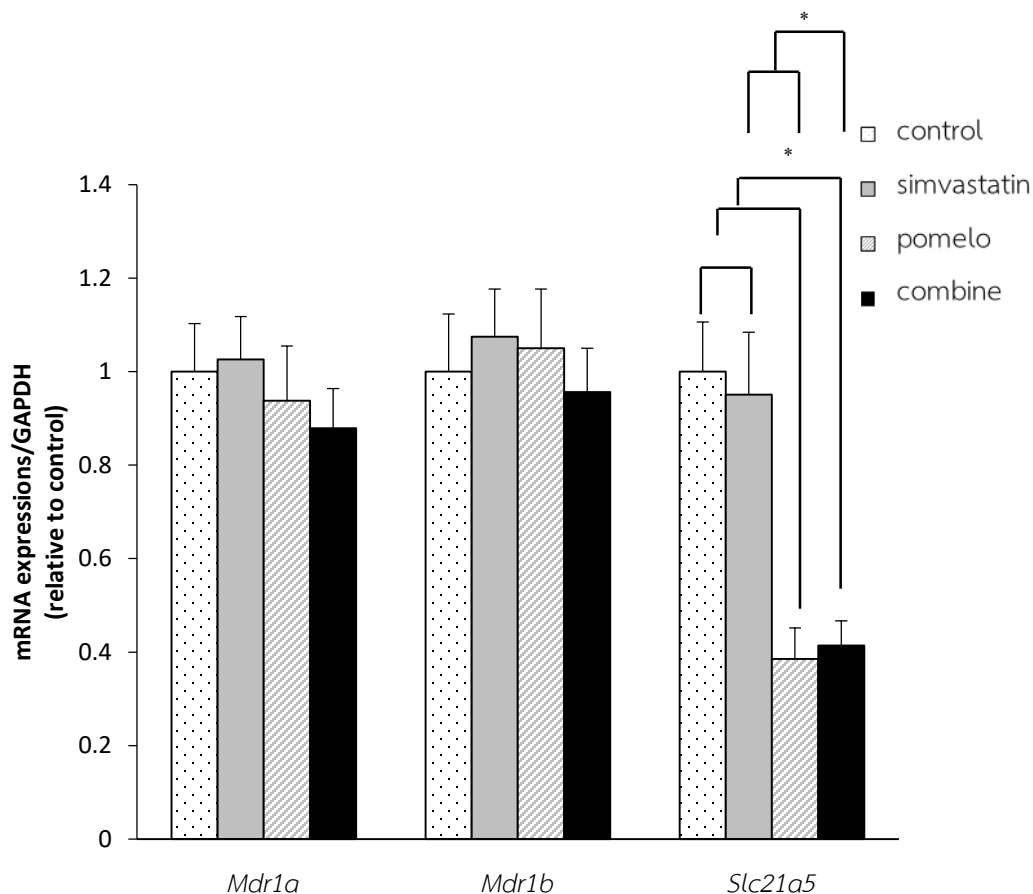


ภาพที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM

** $p < 0.01$ และ * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control

2.2.3.2 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับของหนูแรท

จากผลการทดลองพบว่าหนูแรทที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับของหนูแรทลดลง 61.5 % และ 58.6% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม $p < 0.05$ ($p = 0.034$ และ $p = 0.040$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอชนิดนี้ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ($p = 0.902$) ในขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น กลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p = 0.867$, $p = 0.744$ และ $p = 0.732$ ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในตับของหนูแรทซึ่งพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.898$, $p = 0.909$ และ $p = 0.688$ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 6



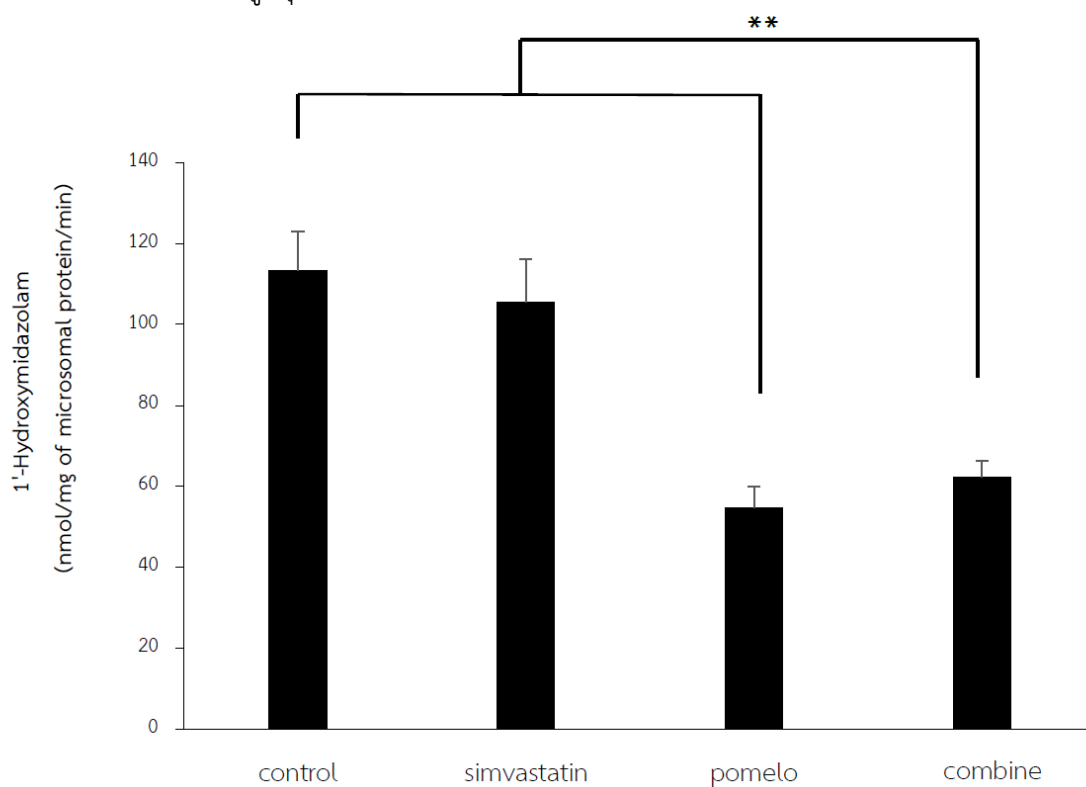
ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับของหนูแรท ด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control

2.2.4 ผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรท โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท พบว่าหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้นและหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ลดลง 51.77% และ 49.17% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูแรทกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แต่การทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ระหว่างหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นกับหนูแรทกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.356$) ดังแสดงในภาพที่ 7

ภาพที่ 7 แสดงผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรทเมื่อใช้ midazolam เป็น สับสเตรท วิเคราะห์ระดับ 1'-Hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC แสดงผลด้วยค่า mean±SEM

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control



บทที่ 3

อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

ส้มโอเป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่คาดการณ์ว่าอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการดูดซึมยา การกระจายตัวของยาในร่างกาย และการกำจัดยาออกสู่ร่างกายเนื่องจากส้มโอมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกับเกรปฟรุ้ต มีรายงานว่า การรับประทานเกรปฟรุ้ตร่วมกับยา simvastatin ทำให้ระดับยาสูงขึ้นมากกว่าปกติอาจเป็นผลจากการยับยั้งการทำงานและการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนจึงส่งผลให้มีปริมาณยาที่เป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นในกระแสเลือดเนื่องจากยาไม่ถูกส่งออกจากร่างกายจึงก่อให้เกิดอันตรายจากยาได้^{55,56} นอกจากนี้มีรายงานว่า drug transporters ได้แก่ พีไกลโคโปรตีนและOATP1B1 มีความสำคัญต่อกระบวนการดูดซึมยาและกระบวนการขจัด simvastatin⁵⁷ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลจากน้ำเกรปฟรุ้ต อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างส้มโอกับยา simvastatin มาก่อน งานวิจัยนี้จึงศึกษาอันตรกิริยาระหว่างระหว่างน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin โดยศึกษาาระดับยาในเลือดของหนูแรทและการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของพีไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็น efflux transporter ที่ถูกสร้างจากยีน *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในหนูแรท และศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของ OATP1B1 (*Oatp2* ในหนูแรท) ซึ่งเป็น influx transporter ที่ถูกสร้างจากยีน *Slc21a5* โดยศึกษาทั้งในเซลล์ตับและเซลล์ลำไส้เล็กของหนูแรท^{14, 15, 58} โดยมีสมมติฐานของการศึกษาคือน้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของยา simvastatin ในเลือดของหนูแรทและสมมติฐานที่สองคือน้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในไมโครโซมจากเซลล์ตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

3.1 น้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของยา simvastatin ในเลือดของหนูแรท

ผลจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และการพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid สนับสนุนสมมติฐานนี้โดยพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ย (C_{max}) และค่า $AUC_{0-\infty}$ ของทั้ง simvastatin และ simvastatin acid ในกลุ่มที่ได้รับยาร่วมกับน้ำส้มโอมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาเท่านั้น จึงส่งผลให้มีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของ simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้น การศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Anlamlert และคณะ⁴⁵ ที่ศึกษาผลของเนื้อส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา cyclosporine ในอาสาสมัครเพศชายชาวไทยสุขภาพดีพบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับเนื้อส้มโอร่วมกับยา cyclosporine จะมีค่าเฉลี่ยระดับ C_{max} และ $AUC_{0-\infty}$ ของ ระดับยา cyclosporine สูงขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อส้มโอมีผลไปเพิ่มชีวประสิทธิผลของระดับยา cyclosporine ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เช่นเดียวกับยา simvastatin การศึกษาของ Lin และคณะ ในปี ค.ศ.2011⁴⁶ ได้สนับสนุนสมมติฐานโดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอเมื่อให้ร่วมกับยา cyclosporine และยา tacrolimus พบว่าสารสกัดดังกล่าวจะเพิ่มระดับชีวประสิทธิผลของยาทั้งสองชนิดในหนูแรท เนื่องจากยาทั้งสองชนิดนี้จะถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กเมื่อได้รับสารสกัดดังกล่าวส่งผลต่อการยับยั้งการ

ทำงานของฟิโกลโคโปรตีนทำให้ยาไม่ถูกกำจัดออกจากบริเวณลำไส้เล็กจึงมีปริมาณยา cyclosporine และ tacrolimus มากขึ้น รวมไปถึงน้ำส้มโออาจมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในลำไส้เล็กและตับจึงเพิ่มปริมาณการดูดซึมยาทั้งสองชนิด การศึกษาของ Lilja ในปี ค.ศ.2004⁵⁹ พบว่าเมื่ออาสาสมัครได้รับเกรปฟรุตร่วมกับยา simvastatin มีค่าชีวประสิทธิผลของยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น นักวิจัยอ้างว่าเกรปฟรุตรบกวนเมแทบอลิซึมของยา simvastatin โดยมีกลไกคือน้ำเกรปฟรุตร่วมมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ซึ่งเป็น CYP3A4-mediated ที่มีผลต่อ first-pass metabolism บริเวณผนังลำไส้เล็กจึงทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างเกรปฟรุตร่วมและยา simvastatin ได้ อันดับต่อไปคือเกิดสมดุลไดนามิกระหว่าง simvastatin และ simvastatin acid จึงทำให้ระดับการเพิ่มขึ้นของ simvastatin และ simvastatin acid เป็นจำนวนเท่าที่ไม่แตกต่างกัน ฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ simvastatin และ simvastatin acid จะเพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 3 เท่าตามลำดับนั้นคือเกิดภาวะสมดุลไดนามิกระหว่าง simvastatin และ simvastatin acid หลังได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin รวมไปถึงน้ำส้มโอมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทซึ่งเป็น first-pass metabolism ที่ตับทำให้ลดการกำจัด simvastatin acid แต่เพิ่มการดูดซึมยามากขึ้นส่งผลให้ระดับยาของ simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มมากขึ้นในหนูแรทซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำส้มโอและยา simvastatin แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการอธิบายการทำงานของน้ำส้มโอต่อการดูดซึมของยายังมีไม่มากนัก แต่มีการศึกษาในหลอดทดลอง^{40, 56, 62} ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และฟิโกลโคโปรตีนซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเป็นเหตุให้การได้รับน้ำส้มโอทำให้เกิดการดูดซึมยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มมากขึ้นในการทดลองนี้

3.2 น้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในเซลล์ตับของหนูแรท

ผลที่ได้จากการศึกษาการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในเซลล์ตับสุนัขสมมติฐานนี้พบว่าน้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทหลังได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันทั้งในกลุ่มที่ได้รับเพียงน้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้รับร่วมกับยา simvastatin

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในน้ำเกรปฟรุตร่วมที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ selectivity ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ใน human liver microsome⁶¹ และงานวิจัยที่ศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการลดการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในหลอดทดลอง⁶² กลไกการเกิดการยับยั้งนักวิจัยอ้างว่าเนื่องมาจากองค์ประกอบที่ซับซ้อนในน้ำส้มโอสารประกอบสำคัญดังกล่าวจะไปจับกับเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ส่งผลให้เกิด irreversible deactivate ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในไมโครโซมจากเซลล์ตับของมนุษย์จึงส่งผลต่อการยับยั้งฤทธิ์ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 มีรายงานถึงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ที่ส้มโอไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 โดยพบว่าสารประกอบ bergamottin แสดงฤทธิ์เป็น substrate-dependent inhibition⁶³ และยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ โดยสารประกอบ bergamottin เป็น mechanism-based, NADPH-dependent และ

เป็น CYP3Adependent-metabolism⁶⁴ ในการศึกษาจากหลอดทดลองด้วยไมโครโซมจากตับของมนุษย์⁶⁵ นอกจากนี้พบว่าน้ำส้มโอก็ถูกระบุว่ามีกลไกเช่นเดียวกันกับเกรปฟรุ้ต โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ไป inactivate เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในลำไส้เล็กของมนุษย์⁶⁶ การศึกษาน้ำส้มโอในหลอดทดลองที่มีสารประกอบ bergamottin พบว่าแม้ว่าจะมีปริมาณที่น้อยกว่า ในเกรปฟรุ้ตแต่น้ำส้มโอก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ⁵⁷ รวมไปถึงสารประกอบ flavonoids โดยในการศึกษานี้ใช้ส้มโอพันธุ์ทองดีในการศึกษา โดยส้มโอชนิดนี้มีสารประกอบ flavonoid ได้แก่ kaemferol, myricetin, apigenin, quercetin, luterolin, hesperitin เป็นต้น มีรายงานว่าในน้ำส้มโอพันธุ์ดังกล่าวมีปริมาณสารประกอบ flavonoids ทั้งหมด (total flavonoid contents) เฉลี่ย 13,994.21 µg/100g ของน้ำส้มโอที่บริโภคได้ (edible portion)⁶⁰ ในงานวิจัยนี้พบปริมาณสารประกอบ flavonoids ทั้งหมดอยู่ในช่วง 9169.37-12782.62 µg/100g ของน้ำส้มโอที่บริโภคได้ (edible portion) ซึ่งพบว่ามีสารประกอบ flavonoids ในปริมาณสูงเช่นกันและมีรายงานว่าสารประกอบ naringin ซึ่งเป็นหนึ่งในสารประกอบของ flavonoids มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ ในไมโครโซมของมนุษย์เช่นกัน⁶⁷

3.3 น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของ *Mdr1*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กและตับของหนูแรท

โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งยาบนผิวเซลล์ (membrane transport protein) เป็นตัวกำหนดที่สำคัญในการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย การกระจายตัวของยาในร่างกายและการกำจัดยาออกจากร่างกาย โปรตีนเหล่านี้บางครั้งถูกยับยั้งการแสดงออกด้วยยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกายทำให้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ซึ่งเป็นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในการขับยาออกจากร่างกาย ส่วนเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* เป็นเอ็มอาร์เอ็นเอที่มีความสำคัญต่อการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์⁵⁸ จากผลการศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูแรทที่ได้รับน้ำส้มโอพบว่าการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ลดลงแต่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอก่อให้เกิด down regulated expression ของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* แต่ไม่มีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูแรท การยับยั้งการแสดงออกของ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ทำให้อัตราและปริมาณการดูดซึมยา (Bioavailability) ในลำไส้เล็กเพิ่มขึ้นอย่างไรก็ตามผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับของหนูแรทให้ผลที่แตกต่างกัน โดยพบว่าน้ำส้มโอไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* แต่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอก่อให้เกิด down regulated expression ของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* แต่ไม่มีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ตับของหนูแรท การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับที่ลดลงนั้นส่งผลให้การนำยาเข้าไปกำจัดในเซลล์ตับลดลงและทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดสูงขึ้น

จากผลการทดลองพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ที่เซลล์ลำไส้เล็กและเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ที่เซลล์ตับไม่ถูกลดการแสดงออกนั้นขัดแย้งกับสมมติฐานที่ว่าน้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ทั้งสองเซลล์ การที่น้ำส้มโอมีผลต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* แตกต่างกันในลำไส้เล็กและเซลล์ ตับของหนูแรทอาจเป็นผลมาจากความจำเพาะในการแสดงออกของ transporter ในแต่ละตำแหน่งที่แตกต่างกัน (site-specificity) โดยพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* แสดงออกอย่างจำเพาะที่เซลล์ตับ (liver-specific expression)^{68,69} จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าน้ำส้มโอมีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กและเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับของหนูแรทซึ่งสนับสนุนสมมติฐานของการวิจัย นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ของน้ำส้มโอมีคุณสมบัติที่จำเพาะต่อตำแหน่ง (site-specificity) โดยที่น้ำส้มโอมีฤทธิ์ลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ที่ลำไส้เล็กแต่ไม่แสดงผลที่ตับขณะที่น้ำส้มโอมีผลลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ตับแต่ไม่แสดงผลที่บริเวณลำไส้เล็กของหนูแรท

3.4 ข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาผลของปริมาณความเข้มข้นของน้ำส้มโอที่แตกต่างกันโดยกำหนดให้หนูได้รับน้ำส้มโอในขนาดเดียวคือ 1 ml/kg จำนวน 2 ครั้งต่อวันเป็นเวลา 7 วัน หากกำหนดปริมาณความเข้มข้นน้ำส้มโอน้อยลง อาจจะไม่ทำให้เห็นผลดังในการทดลองครั้งนี้เช่นในการศึกษาของ Egashira และคณะ⁷⁰ ได้ศึกษาผลของการได้รับปริมาณความเข้มข้นน้ำส้มโอที่แตกต่างกันต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา tacrolimus ในหนูแรทพบว่าหนูที่ได้รับน้ำส้มโอปริมาณความเข้มข้น 100% จะมีค่าชีวประสิทธิผลที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมขณะที่หนูที่ได้รับน้ำส้มโอความเข้มข้น 50% ไม่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าผลกระทบนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำส้มโอที่ให้ (concentration dependence) ข้อจำกัดของงานวิจัยอีกประการคือไม่ได้ตรวจวัดสารสำคัญ furanocoumarins ในน้ำส้มโอ (พันธุ์ทองดี) จึงไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของสารประกอบสำคัญชนิดนี้ นอกจากนี้ไม่ได้วัดการทำงานเทียบเคียงกับไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ที่บริเวณลำไส้เล็กซึ่งเป็นข้อจำกัดของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทเพศผู้ที่ทำการตรวจวัดได้เฉพาะเซลล์ตับเท่านั้นรวมถึงไม่ทราบปริมาณของโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ทั้งเซลล์ตับและลำไส้เล็กซึ่งเป็นประเด็นที่ควรศึกษาต่อไป

บทที่ 4

สรุปและเสนอแนะผลการศึกษา (Conclusion)

การศึกษานี้พบว่าน้ำส้มโอมีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin โดยน้ำส้มโอมีผลยับยั้งการ แสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ซึ่งเป็น efflux transporter ที่สำคัญบริเวณลำไส้เล็กของหนู แรทส่งผลให้ simvastatin และ simvastatin acid ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กมากขึ้นและลดการขับยาออกทำให้ ปริมาณยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นในกระแสเลือด ขณะเดียวกันน้ำส้มโอมีผลลดการ แสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ซึ่งเป็น liver-specific influx transporter ส่งผลลดการทำลายยาจึง ทำให้ปริมาณยา simvastatin เพิ่มขึ้นในร่างกายเช่นกัน นอกจากนี้น้ำส้มโอที่เข้าสู่เซลล์ตับได้มีผลลดการทำงานของ ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ซึ่งส่งเสริมการลดการทำลายยา simvastatin ทำให้ชีวประสิทธิผลของยา เพิ่มขึ้นเช่นกัน การรับประทานร่วมกันระหว่างน้ำส้มโอกับยา simvastatin ห/หรือยาที่มีความใกล้เคียงกับ ยา simvastatin อาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้จึงพึงระวัง ฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เป็นแนวทางในการศึกษา การเกิดอันตรกิริยาของน้ำส้มโอกับยาชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นไปได้ที่จะได้รับร่วมกันรวมถึงใช้เป็นข้อมูลความ ปลอดภัยเบื้องต้นสำหรับผู้ป่วยได้

รายการอ้างอิง

1. แก้วกั้งวาล จ. ตำราการวิจัยทางคลินิก. 2554;1:107.
2. Chinwong D, Patumanond J, Chinwong S, Siri wattana K, Gunaparn S, Hall JJ, et al. Statin therapy in patients with acute coronary syndrome: low-density lipoprotein cholesterol goal attainment and effect of statin potency. *Therapeutics and clinical risk management*. 2015;11:127.
3. Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *The American journal of cardiology*. 1998;82(4):3J-10J.
4. Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, et al. In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug Metabolism and Disposition*. 1997;25(10):1191-9.
5. Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(5):343-70.
6. Morton J. Pummelo. *Fruits of warm climates*'(Ed JF Morton) pp. 1987:147-51.
7. Mäkyänen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, Sakai N, Puranachoti S, Nirojsinlapachai N, et al. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food chemistry*. 2013;139(1):735-43.
8. Guo L-Q, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004;25(2):129-36.
9. Wagstaff DJ. Dietary exposure to furocoumarins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1991;14(3):261-72.
10. Kim H, Yoon Y-J, Shon J-H, Cha I-J, Shin J-G, Liu K-H. Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34(4):521-3.
11. De Schryver N, Wittebole X, Van den Bergh P, Haufroid V, Goffin E, Hantson P. Severe rhabdomyolysis associated with simvastatin and role of ciprofloxacin and amlodipine coadministration. *Case reports in nephrology*. 2015;2015.
12. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in Statin Drug Interactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2006;26(11):1601-7.

13. Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S-I, Ebihara T, et al. Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharmaceutical research*. 2006;23(7):1460-72.
14. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2003;1609(1):1-18.
15. Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA. Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacological Reports*. 2012;64(6):1411-8.
16. Plosker GL, McTavish D. Simvastatin. *Drugs*. 1995;50(2):334-63.
17. Mauro VF, MacDonald JL. Simvastatin: a review of its pharmacology and clinical use. *Dicp*. 1991;25(3):257-64.
18. Gazzero P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological reviews*. 2012;64(1):102-46.
19. Vickers S, Duncan C, Chen I-W, Rosegay A, Duggan D. Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. *Drug Metabolism and Disposition*. 1990;18(2):138-45.
20. Aura A-M, Mattila I, Hyötyläinen T, Gopalacharyulu P, Bounsaythip C, Orešič M, et al. Drug metabolome of the simvastatin formed by human intestinal microbiota in vitro. *Molecular BioSystems*. 2011;7(2):437-46.
21. Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;56(1):120-4.
22. O'Sullivan S. Statins: A review of benefits and risks. *TSMJ*. 2007;8:52-6.
23. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *Jama*. 2003;289(13):1681-90.
24. Boonmuang P, Nathisuwan S, Chaiyakunapruk N, Suwankesawong W, Pokhagul P, Teerawattanapong N, et al. Characterization of statin-associated myopathy case reports in Thailand using the health product vigilance center database. *Drug safety*. 2013;36(9):779-87.
25. Muntingh G. An overview of interactions between grapefruit juice and drugs. *SA Pharmaceutical Journal*. 2011;78(8):40-5.
26. Scora RW, Nicolson DH. The correct name for the shaddock, *Citrus maxima*, not *C. grandis* (Rutaceae). *Taxon*. 1986:592-5.

27. Arias BA, Ramón-Laca L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;97(1):89-95.
28. Suarez J, Herrera M, Marhuenda E. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*. 1998;5(6):469-73.
29. Saita T, Fujito H, Mori M. Screening of furanocoumarin derivatives in citrus fruits by enzyme-linked immunosorbent assay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(7):974-7.
30. Mokbel MS, Suganuma T. Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) fruit albedo tissues. *European Food Research and Technology*. 2006;224(1):39-47.
31. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids- potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*. 2002;139(1):1-21.
32. Lim S-L, Lim L-Y. Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport pathways of Caco-2 cell monolayers. *International journal of pharmaceutics*. 2006;307(1):42-50.
33. Mandery K, Balk B, Bujok K, Schmidt I, Fromm MF, Glaeser H. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;46(1):79-85.
34. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism*. 2002;3(6):561-97.
35. Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: Prediction of in vivo activity in humans. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 1996;24(5):475-90.
36. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2006;2(6):875-94.
37. Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1998;64(2):177-82.
38. Goodman LS. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics: McGraw-Hill New York; 1996.
39. Tian R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y. Effects of grapefruit juice and orange juice on the intestinal efflux of P-glycoprotein substrates. *Pharmaceutical research*. 2002;19(6):802-9.

40. Lim S-L, Tan M, Lim L-Y. Effects of citrus fruit juices on P-glycoprotein-mediated transport in L-MDR1 cells and CYP3A4-mediated metabolism in human intestinal microsomes. *Tree Forestry Sci Biotech.* 2008;2:102-11.
41. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacological reviews.* 2011;63(1):157-81.
42. Al-Ghazawi MA, Tutunji MS, AbuRuz SM. The effects of pummelo juice on pharmacokinetics of sildenafil in healthy adult male Jordanian volunteers. *European journal of clinical pharmacology.* 2010;66(2):159-63.
43. Hou Y-C, Hsiu S-L, Tsao C-W, Wang Y-H, Chao P-DL. Acute intoxication of cyclosporin caused by coadministration of decoctions of the fruits of *Citrus aurantium* and the pericarps of *Citrus grandis*. *Planta medica.* 2000;66(07):653-5.
44. Grenier J, Fradette C, Morelli G, Merritt GJ, Vranderick M, Ducharme MP. Pomelo juice, but not cranberry juice, affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2006;79(3):255-62.
45. Anlamlert W, Sermsappasuk P, Yokubol D, Jones S. Pomelo enhances cyclosporine bioavailability in healthy male Thai volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2015;55(4):377-83.
46. Lin S-P, Chao P-DL, Tsai S-Y, Wang M-J, Hou Y-C. *Citrus grandis* peel increases the bioavailability of cyclosporine and tacrolimus, two important immunosuppressants, in rats. *Journal of medicinal food.* 2011;14(11):1463-8.
47. Huang SM, Lesko LJ. Drug-Drug, Drug—Dietary Supplement, and Drug—Citrus Fruit and Other Food Interactions: What Have We Learned? *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2004;44(6):559-69.
48. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *The Lancet.* 2000;355(9198):134-8.
49. Bangphumi K, Kittiviriyakul C, Towiwat P, Rojsitthisak P, Khemawoot P. Pharmacokinetics of Curcumin Diethyl Disuccinate, a Prodrug of Curcumin, in Wistar Rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics.* 2016;41(6):777-85.
50. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry.* 1999;64(4):555-9.

51. Ahmed TA, Horn J, Hayslip J, Leggas M. Validated LC–MS/MS method for simultaneous determination of SIM and its acid form in human plasma and cell lysate: Pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2012;2(6):403-11.
52. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2000;23(2):323-40.
53. Xu D, Li F, Zhang M, Zhang J, Liu C, Hu M-y, et al. Decreased exposure of simvastatin and simvastatin acid in a rat model of type 2 diabetes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014;35(9):1215-25.
54. 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.
55. Kane GC, Lipsky JJ, editors. *Drug–grapefruit juice interactions*. Mayo Clinic Proceedings; 2000: Elsevier.
56. Xu J, Go ML, Lim L-Y. Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo. *Pharmaceutical research*. 2003;20(2):169-76.
57. Guo L-Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000;28(7):766-71.
58. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(12):873-9.
59. Lilja JJ, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Effects of regular consumption of grapefruit juice on the pharmacokinetics of simvastatin. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;58(1):56-60.
60. Kongkachuichai R, Charoensiri R, Sungpuag P. Carotenoid, flavonoid profiles and dietary fiber contents of fruits commonly consumed in Thailand. *International journal of food sciences and nutrition*. 2010;61(5):536-48.
61. Tassaneeyakul W, Guo L-Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;378(2):356-63.

62. Egashira K, Ohtani H, Itoh S, Koyabu N, Tsujimoto M, Murakami H, et al. Inhibitory effects of pomelo on the metabolism of tacrolimus and the activities of CYP3A4 and P-glycoprotein. *Drug metabolism and disposition*. 2004;32(8):828-33.
63. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;312(3):1151-60.
64. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;283(3):1552-62.(discuss)
65. Lin H-l, Kent UM, Hollenberg PF. The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(1):154-64.
66. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: Comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69(1):14-23.
67. Miniscalco A, Lundahl J, Regårdh C, Edgar B, Eriksson U. Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;261(3):1195-9.
68. Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y. Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug metabolism and disposition*. 2007;35(6):922-8.
69. Lacombe O, Woodley J, Solleux C, Delbos J-M, Boursier-Neyret C, Houin G. Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2004;23(4):385-91.
70. Egashira, K., Sasaki, H., Higuchi, S., & Ieiri, I. (2012). Food-drug interaction of tacrolimus with pomelo, ginger, and turmeric juice in rats. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 27(2), 242-247.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

Name : Supeecha Wittayalertpanya

Present position : Associate Professor , Department of Pharmacology

Email address : supeechas@hotmail.com

Degrees and certificate :

1974 : B.Sc. (In Pharm), Chulalongkorn University

1986 : M.Sc. (Pharmacology), Mahidol University

Members and awards :

Member of The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

Member of The Gastroenterological Association of Thailand.

Previous appointment :

1998-2000: Secretary of Master of Science Program in Pharmacology.

1998-1999: Secretary General of The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

2002-2003: Secretary General of The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

2004-2007: Secretary General of The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

2006-present : Ethical Committee of Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

2002-2013 : Associate Dean of Graduate School, Chulalongkorn University

2013-present : Head of Department of Pharmacology, Faculty of medicine, Chulalongkorn University

Field of Interest :

Clinical pharmacokinetics , Bioequivalence study

Liver metabolism

Pharmacogenetics

Publications : - 48 articles

Name: Piyanuch Wonganan

Present position: Assistant Professor, Department of Pharmacology

Email address: piyanuch.w@chula.ac.th

Education:

- Ph.D. (Pharmaceutics) College of Pharmacy, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA
- M.Sc. (Pharmacology) Interdisciplinary Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- B.Sc. (Biochemistry), Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Publications: 17 articles

Name : Kritsakorn Rayasilp

Education

2014 – 2017 Master of Science (Pharmacology), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

2011 – 2014 Bachelor of Science (Chemistry), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand