



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กลไกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารเบต้าแลคโตglobulinใน
นมวัวกับยาไซโครสปอริน

Mechanism of the interaction between β -lactoglobulin in cows'
milk and cyclosporin A

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี หิรัญพานิช ซาโตะและคณะ

มิถุนายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กลไกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารเบต้าแลคโตglobulin ในนมวัวกับ
ยาไซโครสปอริน

Mechanism of the interaction between β -lactoglobulin in cows' milk and
cyclosporin A

คณะผู้วิจัย / สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิลาสินี หิรัญพานิช ชาติตะ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
2. รองศาสตราจารย์ ดร. จุฑามณี สุทธิสีสังข์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุน

สนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อสมบัติการดูดซึมของยาไซโครสปอริน ผ่านลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด โดยทำการทดสอบในสัตว์ทดลองและในหลอดทดลอง การทดลองในสัตว์ทดลองหลังจากให้ยาไซโครสปอรินขนาด 5 มก./กก.ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 150 มก./กก. ในหนูทดลอง พบว่าเวลาที่พบระดับยาในเลือดสูงสุด (T_{max}) สั้นลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งให้ยาไซโครสปอรินอย่างเดียวในขนาดที่เท่ากัน แสดงว่ายาลูกถูกดูดซึมจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดได้เร็วขึ้น และพบว่าระดับยาสูงสุดในเลือด (C_{max}) และค่าชีวประสิทธิผลของยา (AUC) มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ค่าครึ่งชีวิตของยาไม่แตกต่างจากของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้จากการประมาณค่าอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก โดยใช้วิธีดีคอนวอลูชัน (deconvolution) พบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินประมาณ 12 เท่า ผลการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มอัตราและปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็กได้ จากการทดลองในหลอดทดลองเพื่อทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 พบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินในรูปแบบอิสระจากด้านที่ให้ยาไปยังด้านที่รองรับยาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินจับกับโมเลกุลยาไซโครสปอรินในรูปแบบอิสระ และพยายามทำหน้าที่เป็นสะพานนำส่ง (carrier) ยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ผ่านไปยังมายังด้านรองรับยา จึงมีผลเพิ่มการนำส่งยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์ Caco-2

จากผลการทดลองทั้งจากในสัตว์ทดลองและหลอดทดลอง สามารถสรุปได้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลช่วยเพิ่มสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์ Caco-2 ซึ่งฤทธิ์นี้อาจเป็นกลไกที่ใช้อธิบายฤทธิ์เพิ่มอัตราการดูดซึมและปริมาณการดูดซึมยาไซโครสปอรินเมื่อให้ยาร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในสัตว์ทดลองได้

คำสำคัญ: เบต้าแลคโตกลอบูลิน; ไซโครสปอริน; สารเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของยา

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of β -lactoglobulin (β -LG) on the intestinal absorption of cyclosporin A (CsA) *in vivo* and *in vitro*. After intraduodenal co-administration of CsA (5 mg/kg) with 150 mg/kg β -LG, $T_{\max}$ was significantly lower than that of control rats which were given the same dose of CsA without β -LG. $C_{\max}$ and AUC were significantly increased as compared with the control while $T_{1/2}$ were not significant. Moreover, a deconvolution method revealed that the rate of CsA absorption was enhanced by β -LG (150 mg/kg) by about 12 times. These results indicate that β -LG significantly enhanced the rate of CsA absorption and extent of CsA bioavailability in the gut. Using the Caco-2 monolayer which is an *in vitro* model of intestinal absorption, we also demonstrated that β -LG increased the apical-to-basolateral intrinsic permeability clearance of unbound CsA ($PS_{u,cell}$) in a concentration-dependent manner. In conclusion, β -LG was shown to enhance the rate and extent of intestinal CsA absorption *in vivo*, possibly due to the β -LG-mediated transport of CsA.

Key words: β -lactoglobulin; cyclosporin A; oral absorption enhancer

สารบัญ

	หน้า
1.บทคัดย่อภาษาไทย	1
2. Abstract	2
3. Executive Summary	4
4. เนื้อหางานวิจัย	13
5. Output ที่ได้จากโครงการ	36
6. ภาคผนวก	
-manuscript ที่เกี่ยวข้องกับการเผยแพร่งานวิจัย	37

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

กลไกของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารเบต้าแลคโตโกลบูลินในนมวัวกับยาไซโครสปอริน
(Mechanism of the interaction between β -lactoglobulin in cows' milk and cyclosporin A)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ยาไซโครสปอรินเป็นยาที่ใช้ในการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drugs) ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้มากในปัจจุบันเพื่อป้องกันการต่อต้านของร่างกายต่ออวัยวะที่ปลูกถ่ายเข้าไปใหม่ (graft rejection) ภายหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ เช่น ไต ตับ ไขกระดูก หัวใจ เป็นต้น ยาไซโครสปอรินเป็นยาที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ประมาณ 1,203 ดาลตัน และมีสมบัติในการละลายในไขมันสูง (high lipophilicity) ยาไซโครสปอรินชนิดแรกที่ถูกผลิตขึ้นมาขายในท้องตลาดมีรูปแบบเป็นน้ำมัน ในชื่อการค้าว่าซันดิมันน์ (Sandimmune®) ยาชนิดนี้มีสมบัติในการละลายและการดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กที่ต่ำมาก และมีค่าการดูดซึมที่ไม่แน่นอนและมีค่าแตกต่างกันหลากหลายในแต่ละบุคคล ปัจจุบันพบว่ามีหลากหลายปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการดูดซึมของยาไซโครสปอริน เช่น ปริมาณของน้ำดีในลำไส้เล็กซึ่งมีผลเพิ่มการดูดซึมของยา การรับประทานยาร่วมกับชนิดต่างๆ ของอาหาร เช่น การรับประทานพร้อมกับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงจะมีผลเพิ่มการดูดซึมของยา หรือภาวะของโรคประจำตัวในผู้ป่วย เช่น ผู้ป่วยในภาวะท้องเสียจะมีผลลดการดูดซึมของยา เป็นต้น

เนื่องจากยาไซโครสปอรินชนิดซันดิมันน์ มีลักษณะเป็นน้ำมัน และมีรสชาติไม่ดี ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้ผู้ป่วยรับประทานยาร่วมกับนม หรือน้ำผลไม้ เพื่อกลบรสชาติของยา อย่างไรก็ตามมีผลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลายชิ้นยืนยันว่า นมหรือส่วนประกอบของนมมีผลในการเพิ่มปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอรินชนิดซันดิมันน์เข้าสู่ร่างกาย ผลของปฏิภานี้อาจทำให้เพิ่มฤทธิ์ในการรักษา ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียง หรือความเป็นพิษของยาไซโครสปอรินได้ แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุและกลไกการออกฤทธิ์ของอันตรกิริยาดังกล่าวได้

เบต้าแลคโตโกลบูลินเป็นโปรตีนชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุดในส่วนผสมของนมวัวโดยพบประมาณ 10-15% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีในนมวัว เบต้าแลคโตโกลบูลินเป็นโปรตีนรูปร่างกลมที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 162 ตัว และมีขนาดโมเลกุลประมาณ 18.4 กิโลดาลตัน แม้เด็กทารกจะมีปริมาณน้ำดีและระบบการดูดซึมในลำไส้เล็กที่ยังไม่สมบูรณ์ แต่พบว่าทารกที่ดื่มนมวัวซึ่งมีสารเบต้าแลคโตโกลบูลินอยู่จะสามารถได้รับวิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamin) ผ่านทางนมได้ โดยมีหลักฐานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าสารเบต้าแลคโตโกลบูลินสามารถจับกับโมเลกุลของวิตามิน เช่น สารเรตินอล (retinol) ในวิตามินเอ และนำส่งไปสู่ทารกที่ดื่มนมได้ นอกจากนั้นมียางานการวิจัยพบว่าสารเบต้าแลคโตโกลบูลินสามารถจับกับสารฟอสโฟลิปิด (phospholipid) กรดไขมัน (fatty acid) และสารที่มีสมบัติละลายในน้ำมันที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และนำพาสารดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายได้โดยผ่านทาง การดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตาม

ตามยังไม่ม้งานวิจัยใดๆที่แสดงผลของของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการนำส่งยาไซโครสปอรินผ่านผนังลำไส้เล็ก และต่อการดูดซึมของยาไซโครสปอรินโดยตรง

งานวิจัยนี้คาดว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในนม อาจเป็นสารสำคัญในนมที่ก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาไซโครสปอริน โดยอาจมีผลส่งเสริมการละลายของยาไซโครสปอริน และสารเบต้าแลคโตกลอบูลินนี้อาจจับกับโมเลกุลของยาไซโครสปอริน และส่งผลเพิ่มการนำส่งยาผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มค่าชีวประสิทธิผลของยาไซโครสปอริน ทำให้ระดับยาไซโครสปอรินในเลือดมีระดับสูงขึ้น และอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากยาไซโครสปอรินได้นั้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในนมวัวกับยาไซโครสปอริน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้แบ่งเป็นการวิจัยในหลอดทดลอง (*in vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การวิจัยในหลอดทดลอง (*in vitro*)

3.1.1 การทดสอบผลสารเบต้าแลคโตกลอบูลินของสารค่าการละลายของยาไซโครสปอริน

การทดสอบค่าการละลายและค่าการกระจาย (Drug distribution coefficients [*D*]) ของยาไซโครสปอริน เมื่อผสมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในหลอดทดลอง โดยวิธี flask method ทำการทดลองค่าการละลายของยาไซโครสปอรินในน้ำ (apparent solubility) และทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อทำการคำนวณค่าเฉลี่ยของค่าการละลายและค่า [*D*]

3.1.2 การทดสอบผลสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าแพร่ผ่าน (permeability) ของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2

ทดสอบค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 (human colon carcinoma cell line) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และมีการเรียงตัวชั้นเดียว (Monolayer) โดยมีปริมาณของ transporter proteins บนเซลล์เมมเบรนคล้ายกับในผนังเอนโดทีเลียมในลำไส้เล็กของมนุษย์ ในการทดสอบสมบัติการดูดซึมผ่านลำไส้เล็กของยา การแพร่ผ่านของยา และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาซึ่งเกิดภายในในลำไส้เล็ก

ในการวิจัยนี้จะแบ่งการวิจัยเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่

- 1) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2
- 2) ทำการทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน
แผนและขั้นตอนการทดลองได้แก่

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ใน Tissue culture plate well ที่ภายในมี transwell filter (insert) สอดอยู่ ทำการ incubate เซลล์ที่เลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 37°C ควบคุมความชื้น และให้มีปริมาณอากาศ 5% CO_2 และ 95% O_2 ทำการเปลี่ยน culture medium วันเว้นวัน เป็นเวลาประมาณ 22-24 วัน จากนั้นถอด transwell filter ออกจาก Tissue culture plate well และวัดหาค่าความสามารถในการซึมผ่าน (transepithelial electrical resistances ,TEER) ของเซลล์ที่เรียงตัวบน transwell filter โดยการใช้เครื่อง Millicell-ERS เมื่อค่า TEER มีค่าประมาณ $500 \Omega\text{cm}^2$ จึงนำมาเซลล์มาใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน

หลังจากได้เนื้อเยื่อที่ต้องการแล้ว ทำการทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

- นำ transwell filter ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่พร้อมที่จะทำการทดสอบ มาล้างด้วยน้ำยา Hank's balanced buffered saline (HBBS) 2 ครั้ง
- ทำการวัดหาค่า TEER อีกครั้งเพื่อทดสอบให้แน่ใจว่าเซลล์มีการเรียงตัวที่สมบูรณ์ โดยค่า TEER ควรมีค่าประมาณ $400-500 \Omega\text{cm}^2$
- นำ transwell plate ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มาใส่ใน the vertical-type diffusion chamber cell ซึ่งมีเซลล์ 2 ซีกประกบกัน แบ่งเป็นด้าน basal side และ apical side โดยมีที่สำหรับบรรจุ transwell filter ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 อยู่
- ประกบ diffusion chamber cell ทั้งสองด้านเข้าด้วยกันและเติมน้ำยา Hank's balanced buffered saline ลงใน แต่ละด้านของเซลล์
- นำ diffusion chamber cell ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 คั่นอยู่ระหว่าง diffusion chamber cell แต่ละข้างใส่ใน NaviCyte Multichannel Vertical Ussing/Diffusion Chamber System[®] equipped with a heat block and a gas manifold ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และมีท่ออากาศที่มีปริมาณ 95% O_2 / 5% CO_2 เข้าที่ diffusion chamber cell แต่ละด้าน

- เริ่มทำการทดลองหาค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยการเติมยาไซโครสปอรินเดี่ยว ๆ หรือยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลิน ลงใน HBSS buffer ของด้าน apical side
- ทำการ sampling สารละลายจำนวน 50 มคล. จากด้าน basal side ณ เวลา 30, 60, 90, และ 120 นาที
- วิเคราะห์หาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่าง

หมายเหตุ: ทำการทดลองจำนวน 3 ครั้งเพื่อทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่าการแพร่ผ่าน (permeability)

3.2 การวิจัยในหนูทดลองเพื่อศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินต่อการดูดซึมและค่าชีวประสิทธิผลของยาไซโครสปอริน

ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้หนูทดลองเพศผู้พันธุ์วิสตา (Wistar Rat) น้ำหนักประมาณ 200-220 กรัม ในการทดลองเพื่อวัดผลของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินต่อสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอริน จำเป็นต้องวัดระดับยาในเลือดของหนูทดลอง ที่ได้รับยาไซโครสปอรินอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลิน (กลุ่มทดลอง)

ในการทดลองนี้ออกแบบให้ทำการทดลองในหนูทดลองจำนวนประมาณ 5-6 ตัว ต่อกลุ่มของหนูทดลอง แต่ละกลุ่ม หนูทดลองที่จะใช้ในการทดลองจะถูกพักไว้ในกรงเลี้ยงหนูทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และมีการเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง และได้อาหารเลี้ยงและน้ำ ตามอิสระ (ad libitum) อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง เพื่อให้หนูทดลองได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมและก่อนทำการวิจัยแต่ละครั้งหนูทดลองจะถูกจำกัดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่ยังคงสามารถดื่มน้ำได้

ในการทดลองเพื่อเก็บเลือดของหนูทดลอง จำเป็นต้องมีการผ่าตัดหนูทดลองแต่ละตัว 2 แห่งด้วยกัน โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อนำส่งยาเข้าสู่ลำไส้เล็กโดยตรง: ในการทดลองนี้ต้องการความแน่นอนในการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายของหนูทดลอง และลดปัจจัยที่อาจก่อให้เกิดความแตกต่างของอัตราและความเร็วของการดูดซึมยาไซโครสปอรินในหนูทดลองแต่ละตัวที่เกิดจากการป้อนยาทางปาก เช่น เวลาที่กระเพาะอาหารต้องใช้ ในการส่งยาออกไปได้หมด (gastric emptying) ผู้วิจัยจึงได้วางแผนจะให้ยาโดยการนำส่งยาเข้าสู่ลำไส้เล็กโดยตรง (Intraduodenal, i.d.)
2. เพื่อเก็บเลือด: ในการทดลองนี้จะทำการเก็บเลือดหนูทดลอง โดยการผ่าตัดสอดท่อชนิดโพลีเอทิลีน (polyethylene tubing) ที่บรรจุน้ำเกลือ (normal saline) และสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน (heparin) เข้าที่หลอดเลือดแดงต้นขา (Femoral artery) ของหนูทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้ยาสลบชนิดเพนโทบาบิทัล (pentobarbital) โดยการฉีดเข้าผนังหน้าท้อง (i.p.) ขนาด 40 มก./กก. ซึ่งเป็นขนาดปกติที่ใช้ในการสลบหนูทดลอง และหลังจากผ่าตัดแล้วจะทำความสะอาดและป้องกันการติดเชื้อที่แผลโดยทาน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดเบตาดีน (betadine)

หลังหนูทดลองผ่านการผ่าตัด และฟื้นจากยาสลบแล้ว จะพักหนูทดลองในกรงโบว์แมนเคส (Bolman-cage) ซึ่งเป็นกรงที่ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการเก็บเลือดหนูทดลอง ทำการสุ่มแบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 5-6 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดลอง และ กลุ่มเปรียบเทียบ ตามลำดับ โดยหนูทดลองกลุ่มควบคุมจะได้รับการป้อนยาไซโครสปอรินขนาด 5 มก./กก.เพียงอย่างเดียวทาง i.d. กลุ่มทดลองได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก.ร่วมกับสารเบต้ากลูบูลิน ทาง i.d. จากนั้นทำการเก็บเลือดหนูทดลองแต่ละตัวในปริมาณ 120 มคล. ทางท่อที่ฝังไว้ที่หลอดเลือดแดงที่ต้นขา ลงในหลอดพลาสติกที่บรรจุสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA ณ เวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, และ 12 ชั่วโมง หลังจากที่ได้รับยา นำตัวอย่างเลือดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4° องศา และทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่างเลือด

3.2.1 การวัดวิเคราะห์หาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่าง

ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการหาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่างทั้งในการทดลองในหลอดทดลอง และในเลือดของหนูทดลอง วัดหาปริมาณ monoclonal antibody โดยวิธี fluorescence polarization immunoassay (FPIA) ผ่านชุดตรวจวัดระดับยาไซโครสปอรินสำเร็จรูป TDX cyclosporin-SP-Dinapack[®] kit โดยใช้เครื่องมือ TDxFLx Analyzer

3.2.2 การวิเคราะห์หาสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอริน

ทำการวัดสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอรินโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้กับคอมพิวเตอร์ชนิดวินโดว WinNonlin[®] (version 5.2, Pharsight Corporation, MA, USA) ในการคำนวณหาค่าสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และใช้การวิเคราะห์แบบ non-compartmental analysis ได้แก่ ค่าการกำจัดยา (total clearance; CL_{tot}/F) ค่าครึ่งชีวิตของยา (elimination half-life; $T_{1/2}$) ระดับยาสูงที่สุดในเลือด (maximum blood concentration; C_{max}) เวลาที่พบระดับยาสูงสุด (time to reach C_{max} ; T_{max}) ค่าการกระจายตัวของยาในร่างกาย (volume of distribution; V_{dss}/F) และค่าชีวิประสิทธิผลของยา (the areas under the whole blood concentration-time curve from zero to infinity; $AUC_{0-\infty}$)

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรม	ระยะที่ 1			ระยะที่ 2		
	2	4	6	8	10	12
1. ทบทวนวรรณกรรมและสังเคราะห์ข้อสรุปและอุปสรรคที่จำเป็นในการทดลอง	↔					
2. ทำการทดลองในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>) ศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินต่อค่าการละลายของยาไซโครสปอริน และทำการคำนวณค่าการละลายและการแพร่กระจาย		↔				
3. ทำการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 และทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2		↔				
4. ทำการวิจัยในหนูทดลอง (<i>in vivo</i>) โดยศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินต่อระดับยาไซโครสปอรินในเลือด				↔		
5. ตรวจทางห้องปฏิบัติการและวิเคราะห์ข้อมูล				↔		
6. สรุปและประเมินผล จัดทำรายงานสรุปผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์					↔	

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Interaction effect between β -lactoglobulin in cows' milk and cyclosporin A

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Life Sciences ซึ่งมีค่า Impact factor: 2.583

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

สารเบต้าแลคโตโกลบูลิน (β -lactoglobulin: β -LG) เป็นเวย์โปรตีน (whey protein) ที่สำคัญซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในนมวัวโดยพบประมาณ 10-15% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในนมวัว สารเบต้าแลคโตโกลบูลินเป็นโปรตีนรูปร่างกลมที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 162 ตัว และมีขนาดโมเลกุลประมาณ 18.4 กิโลดาลตัน และมีสมบัติทนต่อการดัดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontopidis et al., 2004) ในปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่หรือบทบาทที่แท้จริงของสารเบต้าแลคโตโกลบูลิน แต่พบว่าเด็กทารกที่ได้รับการเลี้ยงดูด้วยนมวัวที่มีสารเบต้าแลคโตโกลบูลินอยู่จะสามารถได้รับวิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamins) ผ่านทางน้ำนมได้ แม่นในเด็กทารกนั้นจะมีปริมาณน้ำดีและระบบการดูดซึมในลำไส้เล็กที่ยังไม่สมบูรณ์ (Kontopidis, 2004, Sawyer and Kontopidis, 2000, Yang et al., 2008) มีหลักฐานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าสารเบต้าแลคโตโกลบูลินสามารถจับกับโมเลกุลของวิตามินหลายชนิด เช่น สารเรตินอล (retinol) ในวิตามินเอ เบต้าแคโรทีน เป็นต้น (Pérez and Calvo, 1995) และนำส่งไปสู่ทารกที่ถูกป้อนด้วยนมได้ นอกจากนั้นมีรายงานการวิจัยพบว่าสารเบต้าแลคโตโกลบูลินสามารถจับกับสารฟอสโฟลิปิด (phospholipid) (Martins, 2008) กรดไขมัน (fatty acid) (Pérez and Calvo 1995) และสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งมีสมบัติละลายในน้ำมันสูง (Lipophilicity) (Liu et al., 2009, Kontopidis et al., 2004) และนำพาสารดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายได้โดยการดูดผ่านผนังลำไส้เล็ก

ยาไซโครสปอรินเป็นยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drugs) ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้เพื่อป้องกันการต่อต้านของร่างกายต่ออวัยวะที่ปลูกถ่ายเข้าไปใหม่ (graft rejection) ภายหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ เช่น ไต ตับ ไชกระดูก หัวใจ เป็นต้น ยาไซโครสปอรินเป็นยาที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประมาณ 1,203 ดาลตัน และมีสมบัติในการละลายในไขมันสูง (high lipophilicity) ยาไซโครสปอรินชนิดแรกที่ถูกผลิตมาขายในท้องตลาดมีรูปแบบเป็นน้ำมัน ในชื่อการค้าว่าซันดิมมูนัล (Sandimmune®) ยาชนิดนี้มีสมบัติในการละลายน้ำต่ำมาก ประมาณ 27.67 ไมโครกรัม/มล. (Ismailos et al., 1991) ทำให้ยามีการดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กได้ยาก มีค่าการดูดซึมที่ไม่แน่นอนและมีค่าแตกต่างกันหลากหลายในแต่ละบุคคล (Christians, 2004) ปัจจุบันพบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลกระทบต่อ การดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก เช่น การรับประทานยาไซโครสปอรินร่วมกับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงจะมีผลเพิ่มการดูดซึมของยา หรือภาวะของโรคประจำตัวในผู้ป่วย เช่น ผู้ป่วยในภาวะท้องเสียจะมีผลลดการดูดซึมของยา เป็นต้น

มีการพยายามพัฒนาและค้นหาวิธีเพื่อจะเพิ่มอัตราการดูดซึมยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก เช่น การใช้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารที่มีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมยาไซโครสปอริน (Absorption enhancer) เช่น กรดไขมัน สารโคโคซาน เป็นต้น โดยสารดังกล่าวมีผลปรับเปลี่ยนสมบัติของเซลล์เมมเบรนในลำไส้เล็กและเพิ่มการนำยาไซโครสปอรินผ่านเข้าทาง tight junction ของผนังลำไส้เล็กมากขึ้น อย่างไรก็ตามนักวิจัยหลายท่านให้

ข้อสังเกตว่าการที่สารเพิ่มอัตราการดูดซึมเหล่านั้น มีผลเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลล์เมมเบรน อาจส่งผลโดยตรงทำให้เกิดการทำลายเยื่อผนังลำไส้เล็กได้และก่อให้เกิดพิษได้ (Sharma et al., 2005) ดังนั้นการวิจัยในปัจจุบันจึงยังคงมุ่งเน้นพัฒนาหาสารที่มีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ปัจจุบันมีรายงานว่ามีการพัฒนานำสารเบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นสารช่วยในระบบนำส่งยาและวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมันและวิตามินบางชนิด เช่น เรตินอล เบต้าแคโรทีน เป็นต้น ซึ่งมีผลช่วยเพิ่มการดูดซึมและเพิ่มความคงตัวของยาหรือสารเหล่านั้นมากยิ่งขึ้น (de Wolf and Brett, 2000) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการวิจัยใดๆที่แสดงผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการนำส่งยาไซโครสปอรินผ่านผนังลำไส้เล็ก และผลต่อการดูดซึมของยาไซโครสปอรินโดยตรง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการดูดซึมของยาไซโครสปอรินชนิดซัลติมันส์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

1. การทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยทำการศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อระดับยาไซโครสปอรินในเลือดของหนูทดลอง
2. การทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยแบ่งทำการศึกษาดังนี้ 2 ด้าน ได้แก่
 - 2.1 การละลายของยาไซโครสปอรินในหลอดทดลอง
 - 2.2 การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่าน (permeability) ของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบน transwell filter

1. การทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยทำการศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อระดับของยาไซโครสปอรินในเลือดของหนูทดลอง

1.1 วิธีการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้หนูทดลองเพศผู้พันธุ์วิสตา (Wistar Rat) น้ำหนักประมาณ 200-220 กรัม เพื่อวัดผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อระดับยาไซโครสปอรินในเลือดและสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอริน เปรียบเทียบหนูทดลองที่ได้รับยาไซโครสปอริน (5 มก./กก.) อย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) กับร่วมกับหนูทดลองที่ได้รับยาไซโครสปอรินขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ขนาด 15 มก./กก. (กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1) และขนาด 150 มก./กก. (กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2) ตามลำดับ

ในการทดลองนี้ครั้งใช้หนูทดลองจำนวน 5 ตัว ต่อกลุ่ม ก่อนเริ่มการทดลองหนูทดลองที่จะใช้ในการทดลองจะถูกพักไว้ในที่เลี้ยงหนูทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และมีการเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง และได้

อาหารเลี้ยงและน้ำ ตามอิสระ (ad libitum) อย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูทดลองได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อม และก่อนทำการวิจัยแต่ละครั้ง หนูทดลองจะถูกจำกัดอาหาร แต่ยังคงสามารถดื่มน้ำได้ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในการทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดของหนูทดลอง จำเป็นต้องมีการผ่าตัดหนูทดลองแต่ละตัวจำนวน 2 แห่ง ด้วยกัน โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อนำส่งยาเข้าสู่ลำไส้เล็กโดยตรง: ในการทดลองนี้ต้องการความแน่นอนในการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายของหนูทดลอง และลดปัจจัยที่อาจก่อให้เกิดความแตกต่างของอัตราและความเร็วของดูดซึมยาไซโครสปอรินในหนูทดลองแต่ละตัวที่อาจเกิดจากการป้อนยาทางปาก เช่น เวลาที่กระเพาะอาหารต้องใช้ ในการส่งยาออกไปได้หมด (gastric emptying) เป็นต้น ผู้วิจัยจึงได้ผ่าตัดเปิดช่องท้องและให้ยาแก่หนูทดลองโดยการนำส่งยาผ่านท่อชนิดโพลีเอทิลีน (polyethylene micro-tubing: PE50) เข้าสู่ลำไส้เล็กโดยตรง (Intraduodenal, i.d.)
2. เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด: ในการทดลองนี้จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดของหนูทดลอง โดยการผ่าตัดสอดท่อชนิดโพลีเอทิลีนที่บรรจุน้ำเกลือ (normal saline) และสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA เข้าที่หลอดเลือดแดงต้นขา (Femoral artery) ของหนูทดลอง

ขณะทำการผ่าตัดหนูทดลองจะใช้ยาสลบชนิดเพนโทบาบิทัล (pentobarbital) โดยการฉีดเข้าผนังหน้าท้อง (i.p.) ขนาด 40 มก./กก. ซึ่งเป็นขนาดปกติที่ใช้ในการสลบหนูทดลอง และหลังจากผ่าตัดแล้วจะทำความสะอาดและป้องกันการติดเชื้อที่แผลโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อชนิดเบตาดีน (betadine)

หลังหนูทดลองผ่านการผ่าตัด และฟื้นจากยาสลบแล้ว จะพักหนูทดลองในเครื่องโบว์แมนเคส (Bolman-cage) ซึ่งเป็นกรงที่ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดของหนูทดลอง

ทำการเตรียมยาไซโครสปอรินโดยละลายยาไซโครสปอริน 5 มก. ในน้ำมันข้าวโพดจำนวน 1 มล. และให้หนูทดลองแต่ละตัวในขนาด 5 มก./กก. (4.16 ไมโครโมล/กก.) โดยหนูทดลองกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับยาร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลินขนาด 15 และ 50 มก./กก. หรือคิดเป็น 0.81 และ 8.13 ไมโครโมล/กก. ตามลำดับ

แผนและลำดับการทดลองในหนูทดลอง แสดงในแผนภูมิที่ 1

หนูทดลองเพศผู้พันธุ์วิสตา ที่อดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมง



ทำการสลบหนูทดลองด้วยยาเพนโทบาบิทัล โดยการฉีดเข้าผนังหน้าท้อง ขนาด 40 มก./กก.



ผ่าตัดสอดท่อเข้าที่ลำไส้เล็กเพื่อนำส่งยาและหลอดเลือดแดงที่ต้นขา เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด



พักหนูทดลองไว้ในโบว์แมนเคส และรอจนกว่าหนูทดลองฟื้นจากการผ่าตัด



สุ่มแบ่งหนูทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว



กลุ่มควบคุม

กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1

กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2

ได้รับยาไซโครสปอรินขนาด
5 มก./กก. อย่างเดียว

ได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก.
ร่วมกับสารเบต้ากลูบูลิน ขนาด 15 มก./กก.

ได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก.
ร่วมกับสารเบต้ากลูบูลิน ขนาด 150 มก./กก.



เก็บตัวอย่างเลือดของหนูทดลองแต่ละตัวในปริมาณ 120 ไมโครลิตร (มкл.) ทางท่อที่สอดไว้ที่หลอด
เลือดแดงที่ต้นขา ลงในหลอดพลาสติกที่บรรจุสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA ณ เวลา
0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, และ 12 ชั่วโมง หลังจากที่ได้รับยา



วิเคราะห์หาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่างเลือด โดยเครื่อง TDX-Flx Analyzer

แผนภูมิที่ 1: แผนการทดลองและลำดับการทดลองในหนูทดลอง

1.2 การวัดวิเคราะห์หาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่าง

ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการหาปริมาณยาไซโครสปอรินในตัวอย่างทั้งจากการทดลองในหลอดทดลอง และในเลือดของหนูทดลอง โดยใช้การวัดหาปริมาณ monoclonal antibody โดยวิธี fluorescence polarization immunoassay (FPIA) ผ่านชุดตรวจวัดระดับยาไซโครสปอรินสำเร็จรูป TDX cyclosporin-SP-Dinapack[®] kit โดยใช้เครื่องมือ TDxFLx Analyzer (การทดลองนี้ได้รับการอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่อง TDxFLx Analyzer จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยโชนะ ประเทศญี่ปุ่น)

1.3 วิเคราะห์หาสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอริน

ทำการวัดสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอรินโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้กับคอมพิวเตอร์ ชนิดวินโดวส์ WinNonlin[®] (version 5.2, Pharsight Corporation, MA, USA) โดยได้รับการอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยโชนะ ประเทศญี่ปุ่น ในการคำนวณหาค่าของตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์

ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอรินที่จะทำการวิเคราะห์หาได้แก่ ค่าการกำจัดยา (total clearance; CL_{tot}/F) ค่าครึ่งชีวิตของยา (elimination half-life; $T_{1/2}$) ระยะเวลาเฉลี่ยที่พบบยาอยู่ในร่างกาย (mean residence time, MRT) ระดับยาสูงที่สุดในเลือด (maximum blood concentration; C_{max}) เวลาที่พบระดับยาสูงสุด (time to reach C_{max} ; T_{max}) ค่าการกระจายตัวของยาในร่างกาย (volume of distribution; V_{dss}/F) และค่าชีวประสิทธิผลของยา (areas under whole blood concentration-time curve; $AUC_{0-\infty}$)

1.4 การคำนวณค่าประมาณของอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก

ในการทดลองนี้ใช้วิธี Deconvolution method ในการคำนวณค่าอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก โดยสามารถคำนวณระดับยาไซโครสปอรินในเลือด ($C_{po}(t)$) ภายหลังจากการให้ยาโดยวิธี *i.d.* โดยใช้สมการ (Kiwada et al., 1977) ดังนี้

$$C_{po}(t) = \int_0^t f(\theta) C_{iv}(t - \theta) d\theta \quad (1)$$

โดย $f(t)$ และ $C_{iv}(t)$ หมายถึงอัตราการดูดซึม และระดับยาไซโครสปอรินในเลือด ภายหลังจากการฉีดยาไซโครสปอรินเข้าทางกระแสเลือดที่เวลา t ขณะที่ $f(\theta)\Delta\theta$ คือปริมาณยาที่ถูกฉีดเข้าทางกระแสเลือดที่เวลา θ และระดับยาในเลือดที่สัมพันธ์กับแต่ละครั้งของการฉีดยาคำนวณได้จาก $f(\theta)\Delta\theta C_{iv}(t-\theta)$ และอัตราการดูดซึมยาในลำไส้เล็กสามารถคำนวณได้จากกระบวนการ deconvolution ของค่า $C_{po}(t)$ กับค่า $C_{iv}(t)$ ในสมการที่ (1)

หมายเหตุ: ในการทดลองนี้อ้างอิงข้อมูลของระดับยาไซโครสปอรินในเลือดในเวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดยาไซโครสปอรินขนาด 5 มก./กก. (ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้) เข้าสู่เส้นเลือด femoral vein เข้ากระแสเลือดของหนูทดลอง ในการคำนวณค่าอัตราการดูดซึมยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็ก จากการทดลองเดิมที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Hirunpanich et al., 2006) ซึ่งได้นำมาแสดงข้อมูลอีกครั้งในส่วนของผลการทดลองในสัตว์ทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

แสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่ม 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ Student's *t*-test และใช้สถิติ one-way ANOVA ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่มีจำนวนมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป หลังจากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละคู่โดยใช้สถิติ Dunnett's post hoc test โดยแต่ละกลุ่มจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า *p* value มีค่าน้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$)

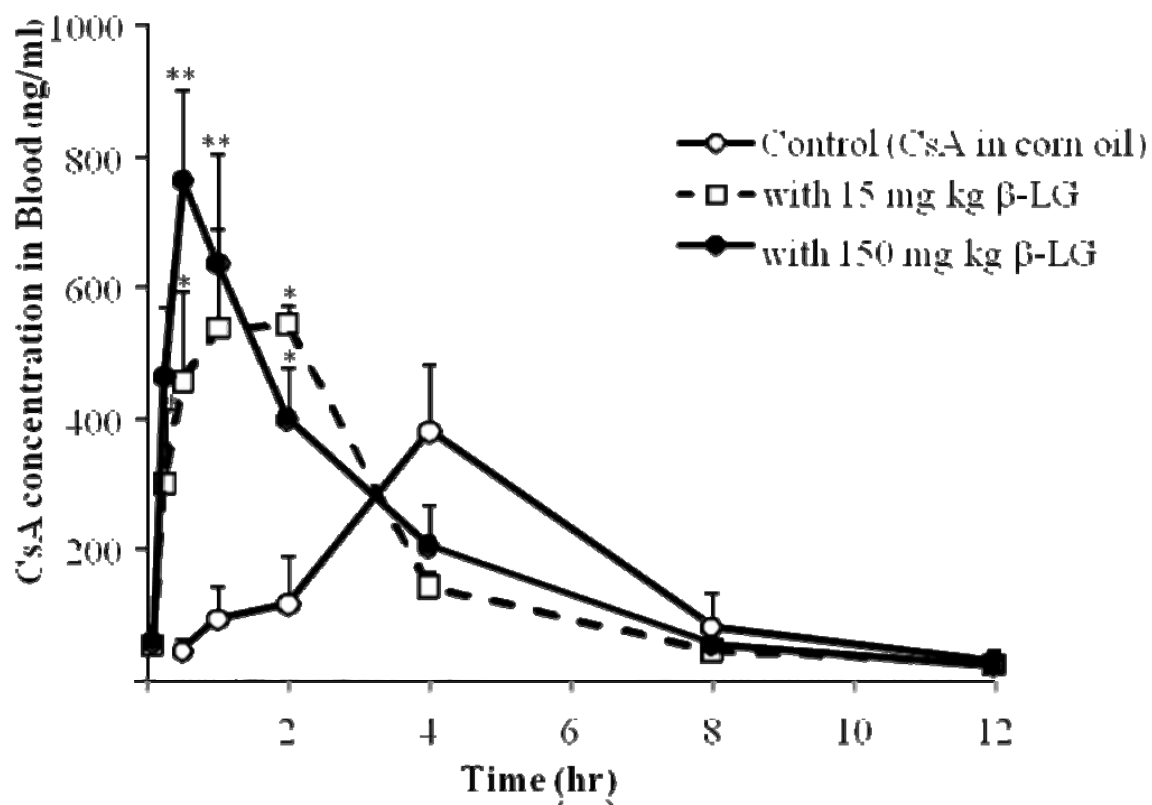
ผลการทดลองในสัตว์ทดลอง

รูปที่ 1 แสดงระดับยาไซโครสปอรินในเลือดหลังจากได้รับยาเพียงอย่างเดียวหรือเมื่อได้รับยาร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 15 หรือ 150 มก./กก. ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเมื่อให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 15 และ 150 มก./กก. จะมีผลเพิ่มระดับยาในเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับของกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะเมื่อให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ขนาด 150 มก./กก. จะมีผลเพิ่มค่าชีวประสิทธิผลของยา ($AUC_{0-\infty}$) และระดับยาสูงที่สุดในเลือด (C_{max}) ประมาณ 30 และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งค่าของทั้งสองตัวแปรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของตัวแปรเดียวกันในกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (ข้อมูลแสดงในตารางที่ 1) และพบว่าเมื่อให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินทั้งสองขนาด มีผลลด T_{max} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับของกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลทำให้สามารถพบยาในกระแสเลือดได้เร็วขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่ายาไซโครสปอรินสามารถดูดซึมได้เร็วขึ้น ผลการทดลองในสัตว์ทดลอง บ่งชี้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน มีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอริน เนื่องจาก T_{max} ลดลง โดยเฉพาะเมื่อให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ขนาด 150 มก./กก. ซึ่งนอกจากจะมีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมแล้วยังมีผลเพิ่มปริมาณยาที่สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ด้วย โดยจะเห็นได้จากค่า $AUC_{0-\infty}$ และ C_{max} มีค่าสูงขึ้น

นอกจากนั้นจากการคำนวณหาอัตราการดูดซึมยาไซโครสปอรินในเลือดโดยใช้กระบวนการ deconvolution ซึ่งใช้ระดับยาไซโครสปอรินในเลือดที่ได้จากการฉีดยาไซโครสปอรินเข้าในกระแสเลือด (*i.v.*) ซึ่งแสดงข้อมูลในรูปที่ 2 และจากการให้ยาเข้าสู่ลำไส้เล็กโดยตรง (*i.d.*) ผลการทดลองพบว่าอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในกลุ่มควบคุมมีค่า 1.9% ของขนาดยา/ชั่วโมง โดยในกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 15 และ 150 มก./กก. มีค่าเป็น 9.3 และ 24% ของขนาดยา/ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอัตราการดูดซึมยาสูงกว่ากลุ่มควบคุม 4 และ 12 เท่า ตามลำดับ

โดยปกติยาจะถูกเมตาบอไลต์และกำจัดในตับ โดยยาที่ถูกกำจัดที่ตับได้เร็วจะมีค่าครึ่งชีวิตของยา ($T_{1/2}$) ต่ำ ค่าอย่างไรรู้ตามพบว่าในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม มีค่า $T_{1/2}$ ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการที่สารเบต้าแลคโตกลอบูลินไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า $T_{1/2}$ จึงเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินไม่มีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการกำจัดยาที่เกิดขึ้นในตับ แต่มีผลโดยตรงที่บริเวณลำไส้เล็กเท่านั้น

จากผลการทดลองในสัตว์ทดลอง สามารถสรุปได้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมและปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอรินที่ลำไส้เล็กได้ในหนูทดลอง



รูปที่ 1 : ระดับยาไซโครสปอรินในเลือดเทียบกับเวลาหลังจากหนูทดลองได้รับยาไซโครสปอรินอย่างเดียวหรือได้รับยาร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลินขนาด 15 และ 150 มก./กก. ตามลำดับ

แสดงผลในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ที่ได้จากผลการทดลองจากหนูทดลองจำนวน 6 ตัว/กลุ่ม)

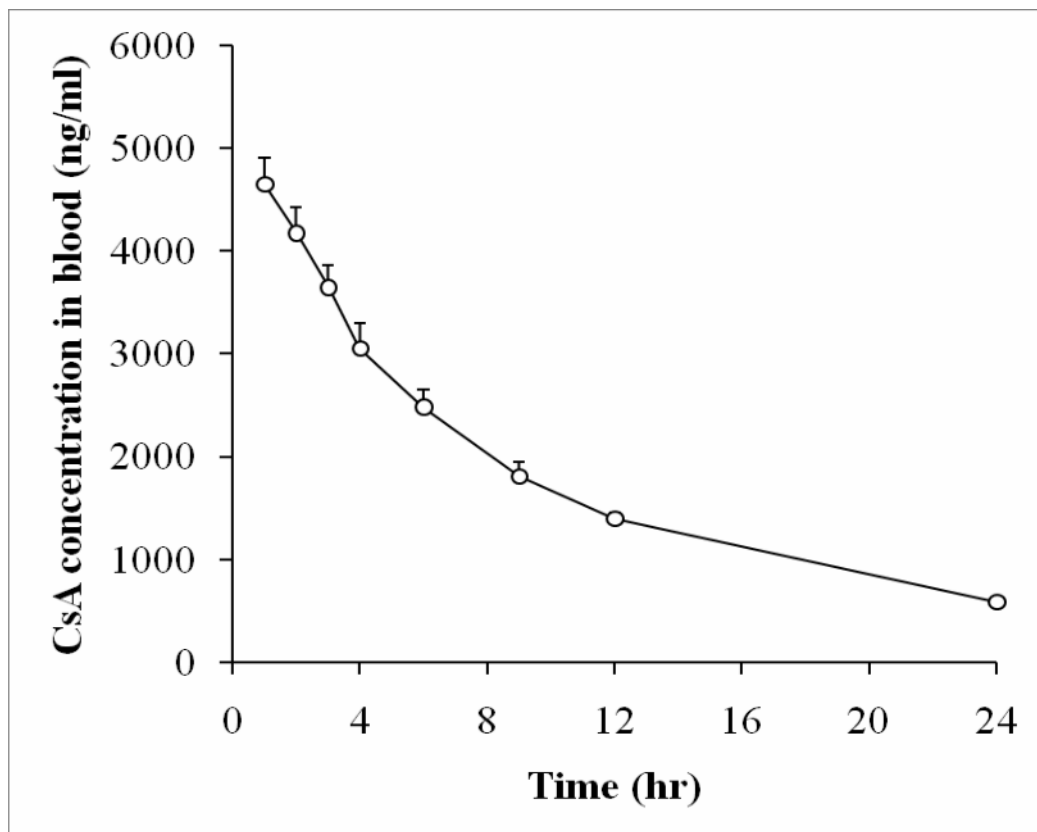
* และ ** หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโครสปอรินในหนูทดลอง

ตัวแปรทางเภสัช จลนศาสตร์ (หน่วย)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1	กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2
	(ได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก.อย่าง เดียว)	(ได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับสารเบต้ากลูบูลิน ขนาด 15 มก./กก.)	(ได้รับยาไซโครสปอริน ขนาด 5 มก./กก. ร่วมกับสารเบต้ากลูบูลิน ขนาด 150 มก./กก.)
$T_{1/2}$ (hr)	3.20 ± 1.20	3.20 ± 0.49	2.55 ± 0.25
C_{max} (ng/ml)	379 ± 208	604 ± 79	$763 \pm 140^*$
T_{max} (hr)	4.0 ± 0.0	$1.50 \pm 0.58^*$	$0.50 \pm 0.0^*$
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml·hr)	1753 ± 214	2097 ± 310	$2297 \pm 247^*$
CL_{tot}/F (L/hr/kg)	3.56 ± 1.94	2.43 ± 0.37	$2.25 \pm 0.49^*$
V_d/F (L/kg)	19.1 ± 9.60	8.97 ± 1.47	$7.39 \pm 1.0^*$
MRT (hr)	5.86 ± 0.38	$3.71 \pm 0.44^*$	$3.35 \pm 0.50^*$

แสดงผลในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$



รูปที่ 2: ระดับยาไซโครสปอรินในเลือดหลังจากหนูทดลองได้รับการฉีดยาไซโครสปอรินเข้าทางเส้นเลือด femoral vein ในขนาด 5 มก./กก.

แสดงผลในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ได้จากผลการทดลองจากหนูทดลองจำนวน 5 ตัว) (ในบางครั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าต่ำกว่า error bar ถูกบดบังด้วยสัญลักษณ์ในกราฟซึ่งทำให้ไม่สามารถมองเห็น error bar จากกราฟได้)

หมายเหตุ: อ้างอิงจากการทดลองเดิมที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Hirunpanich et al., 2006)

2. การทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยแบ่งทำการศึกษ 2 ด้าน ได้แก่

2.1 การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการละลายของยาไซโครสปอรินในหลอดทดลอง
ทดสอบค่าการละลายของยาไซโครสปอรินโดยใช้วิธีของ Jiko et al. (2002) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

- ชั่งผงยาไซโครสปอริน จำนวน 10 มก. และสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน จำนวน 30 มก.
- เตรียมบีกเกอร์ที่มีสาร CMC-Na ในความเข้มข้น 0.5% จำนวน 5 มล. จำนวน 2 บีกเกอร์
- โปรรยผงยาไซโครสปอริน ลงในบีกเกอร์ที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ส่วนในบีกเกอร์ที่ 2 โปรรยผงยาไซโครสปอริน ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน (กลุ่มทดลอง)
- ใช้แท่งแก้วคน คนสารในแต่ละบีกเกอร์นาน 5 นาที
- นำของเหลวจากทั้งสองบีกเกอร์ไปปั่นแยกส่วนในเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ในความเร็ว 15,000 x g นาน 20 นาที
- นำของเหลวส่วนบนของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมาละลายด้วยน้ำเกลือ แล้วกรองด้วยเครื่องกรองขนาดเล็ก (microfilter) ที่มีกระดาษกรองภายในเครื่องกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- นำของเหลวที่ผ่านการกรองแล้วไปวัดหาปริมาณยาไซโครสปอรินที่ละลายได้โดยใช้เครื่อง Fluorescent Polarized Immunoassay (FPIA) ผ่านชุดตรวจวัดระดับยาไซโครสปอรินสำเร็จรูป TDX cyclosporin-SP-Dinapack[®] kit โดยใช้เครื่องมือ TDxFLx Analyzer (Dinabot, Tokyo, Japan)
- ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 การทดลอง เพื่อทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่าการละลาย

ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่ายาไซโครสปอรินมีค่าการละลายเฉลี่ย 67.2 ± 2.7 ไมโครกรัม/มล. และเมื่อเติมสารเบต้าแลคโตกลอบูลินพบว่ายาไซโครสปอรินมีค่าการละลายเป็น 62.6 ± 2.5 ไมโครกรัม/มล. จากข้อมูลบ่งชี้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของยาไซโครสปอริน

2.2 การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าแพร่ผ่าน (permeability) ของยาไซโครสปอริน ผ่านเซลล์เยี่ยงชนิด Caco-2

การทดลองนี้ทดสอบค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน โดยใช้เซลล์เยี่ยงชนิด Caco-2 (human colon carcinoma cell line) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเซลล์เยี่ยง Caco-2 มีการเรียงตัวชั้นเดียว (Monolayer) โดยมีปริมาณของเอนไซม์ และมีสมบัติควบคุมการแพร่ผ่านของยาและสารต่างๆ คล้ายคลึงกับในลำไส้เล็ก (Hidalgo et al., 1989, Pinto et al., 1983, Hunter et al., 1993) เพื่อทดสอบสมบัติการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน และผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน

ในการวิจัยนี้จะแบ่งการวิจัยเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่

- 1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้เซลล์เยี่ยง Caco-2 บน transwell filter
- 2) การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน

แผนและขั้นตอนการทดลองได้แก่

1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้เซลล์เยี่ยง Caco-2 บน transwell filter

เลี้ยงเซลล์เยี่ยง Caco-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ใน Tissue culture plate well ที่ภายในมี transwell filter สอดอยู่ ทำการ incubate เซลล์ที่ติดเลี้ยงเชื้อซึ่งถูกควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ควบคุมความชื้น และควบคุมให้มีปริมาณอากาศเป็น 5% CO₂ และ 95% O₂ ทำการเปลี่ยน culture medium วันเว้นวัน เป็นเวลาประมาณ 22-24 วัน จากนั้นถอด transwell filter ออกจาก Tissue culture plate well และวัดหาค่าความสามารถในการแพร่ผ่าน (transepithelial electrical resistances, TEER) ของเซลล์ที่เรียงตัวบน transwell filter โดยใช้เครื่อง Millicell-ERS เมื่อค่า TEER มีค่าประมาณ 500 Ωcm^2 จึงนำมาเซลล์เยี่ยงมาใช้ในการทดลองต่อไป

2 การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน

หลังจากได้เซลล์เยี่ยง Caco-2 ที่ต้องการแล้ว ทำการทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน เนื่องจากยาไซโครสปอรินมีสมบัติในการละลายในไขมันสูงซึ่งอาจจะทำให้มีบางส่วนละลายและติดอยู่ในชั้นของเซลล์เยี่ยง ทำให้ไม่สามารถประเมินค่าการแพร่ผ่านของยาที่แท้จริงได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะประเมินค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอริน โดยยาไซโครสปอรินชนิดที่มีธาตุกำมะถันตรังสีไฮโดรเจนติดอยู่ (³H]-CsA) และวัดปริมาณการแพร่ของยาผ่านเซลล์โดยวัดจากปริมาณสารกำมะถันภาพรังสีที่ติดกับยาไซโครสปอรินโดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1 วัดการแพร่ผ่านของ [^3H]-CsA ผ่าน Caco-2 cell ที่เพาะอยู่บน transwell filter (PS_{total})

- นำ transwell filter ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งพร้อมที่จะทำการทดสอบ มาล้างด้วยน้ำยา Hank's balanced buffered saline (HBSS) จำนวน 2 ครั้ง

- วัดหาค่า TEER อีกครั้งเพื่อทดสอบให้แน่ใจว่าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 มีการเรียงตัวที่สมบูรณ์ โดยค่า TEER ควรมีค่าประมาณ $400\text{--}500\ \Omega\text{cm}^2$

- นำ transwell plate ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มาใส่ใน vertical-type diffusion chamber cell ซึ่งมีเซลล์ 2 ซีกประกบกัน แบ่งเป็นด้าน ด้าน apical side ซึ่งเป็นด้านที่ใส่ยาที่ต้องการทดสอบ โดยมีที่ช่องสำหรับการบรรจุ transwell filter ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 กั้นกลางระหว่าง apical side และ basal side ซึ่งเป็นด้านที่ต้องการวัดปริมาณยา [^3H]-CsA ที่สามารถแพร่ผ่านจาก apical มาด้าน basal side ได้

- ประกบ diffusion chamber cell ทั้งสองด้านเข้าด้วยกันและเติมน้ำยา Hank's balanced buffered saline (HBSS buffer) ลงใน แต่ละด้านของเซลล์ จำนวนด้านละ 5 มล.

- นำ diffusion chamber cell ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 คั่นอยู่ระหว่าง diffusion chamber cell แต่ละข้างใส่ใน NaviCyt Multichannel Vertical Ussing/Diffusion Chamber System[®] ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และมีท่ออากาศที่มีปริมาณ $95\%\text{O}_2 / 5\%\text{CO}_2$ ต่อเข้าที่ diffusion chamber cell แต่ละด้าน

- เริ่มทำการทดลองหาค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยการเติม [^3H]-CsA ความแรง $0.5\ \mu\text{Ci}$ /มล. หรือ เติม [^3H]-CsA ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลิน ในความเข้มข้น $0.2\ \mu\text{M}$ หรือ $2\ \mu\text{M}$ ลงใน HBSS buffer ของด้าน apical side

- ทำการ sampling สารละลายจำนวน $100\ \mu\text{L}$ จากด้าน basal side ณ เวลา 30, 60, 90, และ 120 นาที โดยทุกครั้งที่มีการ sampling ของเหลวออก จะมีการเติม HBSS buffer ไปแทนที่เพื่อรักษาปริมาตรของของเหลวในด้าน apical side ของ diffusion chamber cell

- วิเคราะห์หาปริมาณ [^3H]-CsA ในตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counting (LSC-5200, Aloka, Japan)

- ทำการพล็อตกราฟระหว่างปริมาณ [^3H]-CsA ที่สามารถผ่าน Caco-2 cells ที่เพาะบน transwell filter (แกน y) โดยเทียบกับเวลา (แกน x)

- คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านทั้งหมดของ [^3H]-CsA จากด้าน apical side ผ่าน Caco-2 cells ที่เพาะอยู่บน transwell filter ไปด้าน basal side (apparent permeability clearance of [^3H]-CsA across Caco-2 cells cultured on the transwell filter (PS_{total}) โดยใช้สมการ (2) ซึ่งอ้างอิงจาก Artursson (1990)

$$PS_{total} (\mu l / min) = \left(\frac{d(C_r)}{d(t)} \right) \times \frac{1}{C_0} \times V \quad (2)$$

โดย

$d(C_r)/d(t)$ คือ อัตราการการแพร่ผ่านของ $[^3H]$ -CsA ซึ่งคำนวณจากความชันของกราฟที่พล็อตระหว่าง ปริมาณ $[^3H]$ -CsA ที่สามารถผ่าน Caco-2 cells เทียบกับเวลา (นาที) โดยมีหน่วยเป็นไมโครคูรี/มล./นาที

V คือ ปริมาตรของของเหลวที่ได้จากการ sampling สารละลายใน basal side โดยมีหน่วยเป็น ไมโครลิตร

C_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ $[^3H]$ -CsA ที่เติมใน basal side โดยมีหน่วยเป็นไมโครคูรี/มล.

2.2 การแพร่ผ่านของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน transwell filter (PS_{filter})

-ทำการทดลองโดยวัดปริมาณการแพร่ผ่านของ $[^3H]$ -CsA บน transwell filter อย่างเดียว โดยไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 อยู่ โดยใช้วิธีเดียวกับที่ได้กล่าวไปในข้อ 2.1

-วิเคราะห์หาปริมาณ $[^3H]$ -CsA ที่สามารถแพร่ผ่านจาก apical side ที่มีแต่ transwell filter อย่างเดียว (ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 ไปด้าน basal side โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counting (LSC-5200, Aloka, Japan)

- ทำการพล็อตกราฟระหว่างปริมาณ $[^3H]$ -CsA ที่สามารถผ่าน transwell filter (แกน y) โดยเทียบกับ เวลา (นาที) (แกน x)

- คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านที่แท้จริงของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน transwell filter อย่างเดียว (ไม่มี Caco-2 cells) (apparent permeability clearance of $[^3H]$ -CsA on the transwell filter (PS_{filter}) โดยใช้สมการที่ (1)

2.3 คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ของ $[^3H]$ -CsA (PS_{cell})

คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ของ $[^3H]$ -CsA (PS_{cell}) โดยใช้สมการที่ (3) ซึ่งอ้างอิงจาก Artursson (1990) ดังนี้

$$PS_{cell} = \frac{1}{\frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{filter}}} = \frac{PS_{total} \cdot PS_{filter}}{PS_{filter} - PS_{total}} \quad (3)$$

เมื่อ PS_{total} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน Caco-2 cell ที่เพาะอยู่บน transwell filter และ PS_{filter} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน transwell filter (ที่ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2)

2.4 คำนวณปริมาณ $[^3\text{H}]\text{-CsA}$ อิสระ (fraction unbound: f_u) ที่ไม่ได้เกาะติดกับส่วนใดๆในส่วนของ donor-side medium โดยใช้สมการที่ (4)

$$f_u = \frac{PS_{\text{filter}(+\beta\text{-LG})}}{PS_{\text{filter}(-\beta\text{-LG})}} \quad (4)$$

เมื่อ $PS_{\text{filter}(+\beta\text{-LG})}$ และ $PS_{\text{filter}(-\beta\text{-LG})}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของ $[^3\text{H}]\text{-CsA}$ ผ่าน transwell filter (ที่ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2) เมื่อมีและไม่มีสารเบต้าแลคโตกลอบูลินใน donor-side medium ตามลำดับ

2.5 คำนวณปริมาณของ $[^3\text{H}]\text{-CsA}$ อิสระที่ถูกส่งผ่านเซลล์ Caco-2 จาก donor-side medium ไปยัง receiver-side medium (intrinsic permeability clearance of unbound $[^3\text{H}]\text{-CsA}$ across the Caco-2 cells: $PS_{u,\text{cell}}$) โดยใช้สมการที่ (5)

$$PS_{u,\text{cell}} (\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{PS_{\text{cell}}}{f_u} \quad (5)$$

2.6 การทดสอบผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการซึมผ่านของยาไซโครสปอรินผ่าน **Caco-2 cells** โดยไม่มีผลของ CYP3A และ P-gp มาเกี่ยวข้อง

ยาไซโครสปอรินเป็นยาที่มีค่าการดูดซึม และค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ต่ำ เนื่องจากการดูดซึมของยาไซโครสปอรินถูกจำกัดโดยเอนไซม์ CYP 3A และ transporter ชนิด P-gp ในลำไส้เล็ก (Christians, 2004) ซึ่งการวิจัยพบว่าบนเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 cells นั้นมีเอนไซม์ CYP3A และ transporter ชนิด P-gp เหมือนที่พบในเยื่อลำไส้เล็กด้วย (Pinto et al., 1983, Hunter et al., 1993) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีการใช้ยาคีโตโคนาโซล (ketoconazole) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ CYP3A และ P-gp (Ogasawara et al., 2007) ในการนี้เพื่อต้องการศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการการซึมผ่านลำไส้เล็กของยาไซโครสปอรินที่แท้จริงโดยไม่มีปัจจัยอื่นเช่นผลของ CYP3A และ P-gp มาเกี่ยวข้อง

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวในข้อ 2.1-2.3 โดยในการทดลองนี้จะทำการแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม: เติม $[^3\text{H}]\text{-CsA}$ ความแรง 0.5 ไมโครคูรี ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินความเข้มข้น 0.2 และ 2 ไมโครโมล

2. กลุ่มทดลอง 1: เติม [^3H]-CsA ความแรง 0.5 ไมโครคูรี ร่วมกับยาซีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล
3. กลุ่มทดลอง 2: เติม [^3H]-CsA ความแรง 0.5 ไมโครคูรี ร่วมกับสารเบต้าแคโทกลอบูลิน ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล และยาซีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล
 - เริ่มการทดลองโดยการ sampling สารละลายจำนวน 100 ไมโครลิตร จากด้าน basal side ของ diffusion chamber ณ เวลา 30, 60, 90, และ 120 นาที
 - วิเคราะห์หาปริมาณ [^3H]-CsA ในตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counting
 - คำนวณหาค่า PS_{cell} ตามสมการที่ (2) และ (3)

ผลการทดสอบและการวิเคราะห์ผลฤทธิ์ของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อการแพร่ผ่านของ [³H]-CsA ผ่าน Caco-2 cells

จากผลการทดลอง สามารถคำนวณการแพร่ผ่านของ [³H]-CsA ผ่าน Caco-2 cell ที่เพาะอยู่บน transwell filter (PS_{total}) การแพร่ผ่านของ [³H]-CsA ผ่าน transwell filter (โดยไม่มี Caco-2 เซลล์) (PS_{filter}) และการแพร่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่แท้จริงของ [³H]-CsA (PS_{cell}) ได้เป็น 7.42 ± 0.78 , 156.3 ± 19.2 , 7.80 ± 1.12 ไมโครลิตร/นาที่ ตามลำดับ

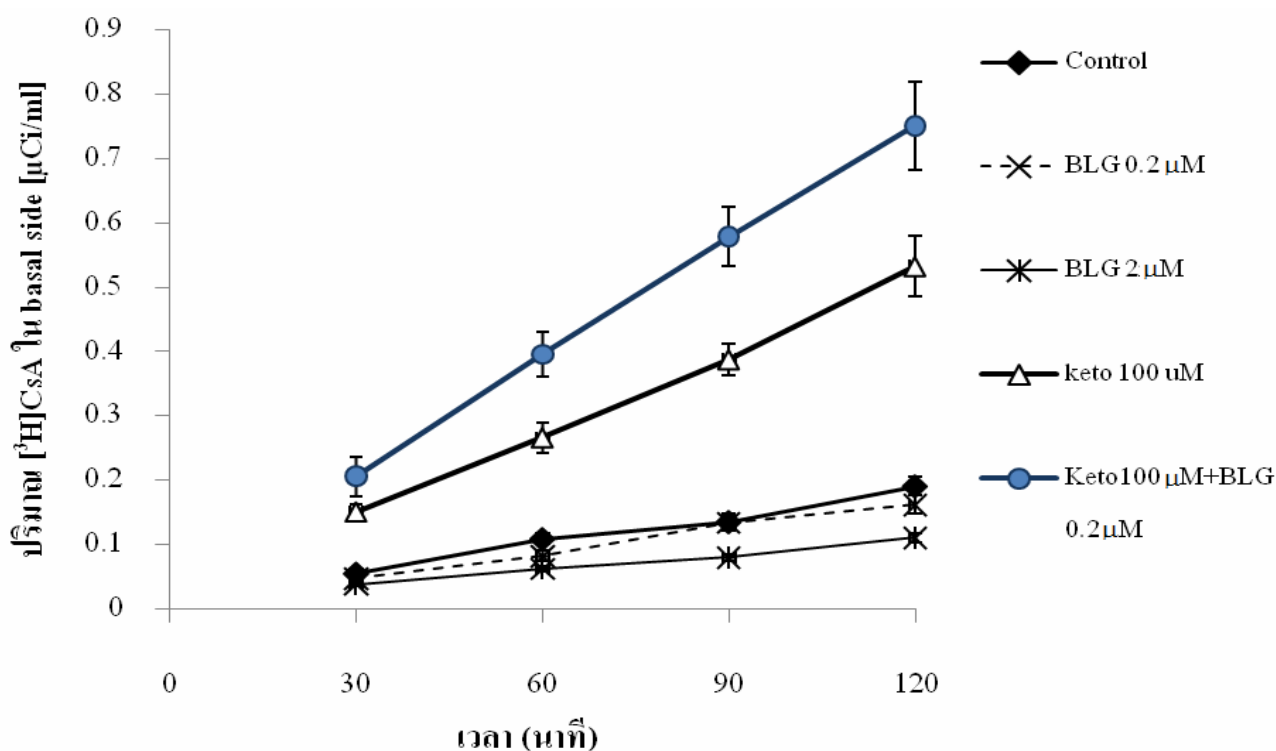
จากข้อมูลแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเมื่อให้ [³H]-CsA ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในช่วงความเข้มข้น 0.2, 1, 2 และ 20 ไมโครโมล พบว่าค่า PS_{filter} , PS_{cell} และ f_u ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ซึ่งแสดงว่าการจับกันของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินกับโมเลกุลของ [³H]-CsA มีผลลดปริมาณ [³H]-CsA ในรูปแบบอิสระที่เกาะอยู่ที่ medium, filter และที่ Caco2-cell ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองที่พบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของ [³H]-CsA อิสระจาก donor ไปยัง receiver sides ($PS_{u, cell}$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินจับกับโมเลกุล [³H]-CsA แล้วจะมีผลเร่งการแพร่ผ่านของ [³H]-CsA ในรูปแบบอิสระผ่าน Caco2-cell มายัง receiver sides และเนื่องจากสารเบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีสมบัติในการจับกับโมเลกุลที่ชอบจับกับไขมัน จึงคาดว่าผลของการจับของโปรตีนกับโมเลกุล [³H]-CsA (protein-mediated transport) เป็นกลไกสำคัญในการเร่งการแพร่ผ่านของยาผ่าน Caco2-cell

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของ [^3H]-CsA เมื่อมีหรือไม่มีสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน (0.2, 1, 2 และ 20 ไมโครโมล) ในเซลล์ Caco-2

กลุ่ม	PS_{filter} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	PS_{cell} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	f_u	$PS_{u,cell}$ ($\mu\text{l}/\text{min}$) (% of control)
กลุ่มควบคุม (ไม่มี β -LG)	156.3 ± 19.2	7.80 ± 1.12	1	7.8 (100%)
0.2 μM β -LG	108.2 ± 10.3	7.15 ± 0.68	0.69	10.3 (133%)
1 μM β -LG	59.2 ± 6.4	5.15 ± 1.02	0.38	13.6 (174%)
2 μM β -LG	41.1 ± 7.9	4.25 ± 0.52	0.26	16.2 (207%)
20 μM β -LG	15.9 ± 2.1	3.45 ± 0.67	0.10	33.9 (434%)

แสดงผลของค่า PS_{filter} และ PS_{cell} ในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากผลการทดลอง
จำนวน 3-4 การทดลอง

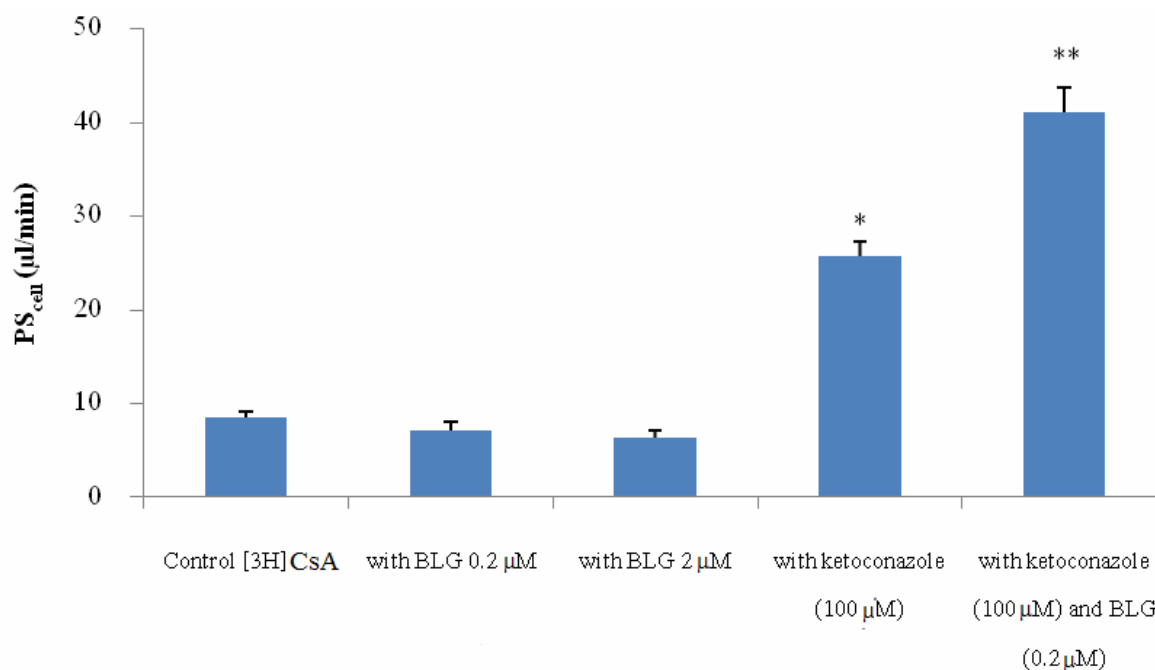
จากผลการทดลอง (รูปที่ 3 และ 4) พบว่าเมื่อเติมสารเบต้าแลคโตกลอบูลินใน apical side ค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน Caco-2 cell มีค่าไม่แตกต่างกับค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA ในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อเติมยาคีโตโคนาโซลซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 และ P-gp บนเซลล์ Caco-2 พบว่าค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA มีค่าสูงกว่าค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA กลุ่มควบคุม ($[^3H]$ -CsA อย่างเดียว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเติมยาคีโตโคนาโซลร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินใน apical side พบว่าค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA ผ่าน Caco-2 cell มีค่าสูงขึ้นประมาณ 5 เท่า และมีค่าสูงกว่าค่า PS_{cell} ของ $[^3H]$ -CsA กลุ่มควบคุม ($[^3H]$ -CsA เดี่ยวๆ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 3 ปริมาณ $[^3H]$ -CsA ใน basal side เมื่อเติม $[^3H]$ -CsA ใน donor side เดี่ยวๆ หรือ เมื่อให้ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ความเข้มข้น 0.2 และ 2 ไมโครโมล หรือเมื่อให้ร่วมกับยาคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล หรือ ร่วมกับ ยาคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล และสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล

แสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง

หมายเหตุ: control คือ กลุ่มควบคุม ($[^3H]$ -CsA), BLG คือ สารเบต้าแลคโตกลอบูลิน, Keto คือ ยาคีโตโคนาโซล



รูปที่ 4 ค่า PS_{cell} ของ [³H]-CsA เดี่ยวๆ หรือ เมื่อให้ร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ความเข้มข้น 0.2 และ 2 ไมโครโมล หรือเมื่อให้ร่วมกับยาคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล หรือ ร่วมกับยาคีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล และสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล

*, ** $p < 0.05$ และ $p < 0.01$, ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ([³H]-CsA อย่างเดียว)

แสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง

หมายเหตุ: control คือ กลุ่มควบคุม ([³H]-CsA), BLG คือ สารเบต้าแลคโตกลอบูลิน, Ketoconazole คือ ยาคีโตโคนาโซล

วิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อให้ยาไซโครสปอรินร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 150 มก./กก. จะมีผลเพิ่มระดับยาสูงสุดในเลือด (C_{max}) ประมาณสองเท่า $AUC_{0-\infty}$ ประมาณ 30% และทำให้เวลาที่ทำให้มีระดับยาในเลือดสูงที่สุด (T_{max}) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการคำนวณค่าอัตราการดูดซึมยาที่บริเวณลำไส้เล็กซึ่งคำนวณโดยวิธี deconvolution โดยพบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินขนาด 150 มก./กก. มีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมประมาณ 12 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลในการเพิ่มอัตราการดูดซึมยาและส่งเสริมปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในสัตว์ทดลอง ผลการวิจัยนี้ส่งผลให้คณะผู้วิจัยต้องการศึกษาหากลไกที่ทำให้สารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมและปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอริน

โดยปกติยาไซโครสปอรินมีค่าการละลายต่ำจึงมีผลทำให้ยาถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กได้ช้าและส่งผลลดปริมาณการดูดซึมยา ข้อมูลจากงานวิจัยของเหลียงและคณะ (Liang et al, 2008) และรีดีและคณะ (Reddy et al., 2006) พบว่า สารเบต้าแลคโตกลอบูลินมีฤทธิ์เพิ่มค่าการละลายของยาหลายชนิด เช่น ทีโอฟีลลีน (theophylline) และซันฟาเมโทซาโซล (sulfamethoxazole) เป็นต้น โดยส่งผลให้ปริมาณยาที่ถูกดูดซึมเพิ่มขึ้น จากข้อมูลนี้ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่ากลไกที่ทำให้สารเบต้าแลคโตกลอบูลินเพิ่มอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในหนูทดลองอาจเกี่ยวข้องกับค่าการละลายยาไซโครสปอริน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในหลอดทดลองเราพบว่าสารเบต้าแลคโตกลอบูลินไม่ได้มีผลเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของยาไซโครสปอรินแต่อย่างใด ดังนั้นค่าการละลายของยาไซโครสปอรินจึงไม่น่าเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินในการส่งเสริมอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในสัตว์ทดลอง

เนื่องจากยาไซโครสปอรินเป็นยาที่มีอัตราการแพร่ผ่านผนังลำไส้เล็กต่ำ ซึ่งสมบัตินี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอรินผ่านลำไส้เล็ก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงตั้งข้อสงสัยว่าการเปลี่ยนแปลงค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินอาจมีผลเกี่ยวข้องกับอัตราการดูดซึมยาไซโครสปอรินในหนูทดลอง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลของสารเบต้าแลคโตกลอบูลินต่อสมบัติการแพร่ผ่านผนังลำไส้เล็กโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่เพาะบน transwell filter ในการทดสอบค่าการแพร่ผ่านของยาไซโครสปอรินในรูปแบบที่มีสารกัมมันตภาพรังสีติดอยู่ ($[^3H]$ -CsA)

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 การแพร่ผ่านของ ($[^3H]$ -CsA) ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่เพาะบน transwell filter พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน transwell filter (PS_{cell}), ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านยาไซโครสปอริน transwell filter (ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2): PS_{filter} และปริมาณ $[^3H]$ -CsA ที่เป็นอิสระ (f_u) มีค่าลดลงเมื่อเติมสารเบต้าแลคโตกลอบูลิน ในขณะที่ปริมาณยา $[^3H]$ -

CsA ในรูปแบบอิสระที่ถูกส่งผ่านจากเซลล์ Caco2 มายัง receiver side ($PS_{u,cell}$) มีค่าสูงขึ้น แสดงว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินมีผลจับโมเลกุลของยา [3H]-CsA จึงทำให้ปริมาณยาที่อยู่ในรูปแบบอิสระใน donor side มีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของเบอชิงคิ และคณะ (Burczynski et al., 1990) และพูโยลและคณะ (Puyol et al., 1995) ซึ่งพบว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินมีบทบาทในการจับและเพิ่มการดูดซึมของพาร์มิเตท (palmitate) เรตินอล (retinol) และกรดไขมัน (fatty acid) ในลำไส้เล็ก ตามลำดับ สืบเนื่องจากข้อมูลดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงแปลผลที่ได้จากการทดลองนี้ว่าในภาวะที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน transwell filter สารเบต้าแลคโตกลูบูลินจะไม่ได้เพียงแค่จับกับโมเลกุลยาไว้เหมือนดังเมื่อทำการทดลองบน transwell filter อย่างเดียว แต่เมื่อมีเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 สารเบต้าแลคโตกลูบูลินนี้จะทำหน้าที่จับกับเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 และยาไซโครสปอริน และพยายามทำหน้าที่เป็นสะพานนำส่ง (carrier) ยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ผ่านไปยัง receiver side

จากสมบัติของยาไซโครสปอรินซึ่งถูกจำกัดการดูดซึมในลำไส้เล็กโดยเอนไซม์ CYP 3A4 และ transporter ชนิด P-gp ในลำไส้เล็ก จากผลการทดลองซึ่งให้ [3H]-CsA ร่วมกับยาซีโตโคนาโซล ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 และ P-gp พบว่ามีผลเพิ่มการแพร่ผ่านของ [3H]-CsA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเติมยาซีโตโคนาโซลร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลินใน apical side พบว่าค่า PS_{cell} ของ [3H]-CsA ผ่าน Caco-2 cell มีค่าสูงขึ้นกว่าเมื่อให้ [3H]-CsA ร่วมกับยาซีโตโคนาโซล ประมาณ 5 เท่า ผลการทดลองบ่งชี้ว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินมีผลเพิ่มสมบัติการแพร่ผ่านของ [3H]-CsA โดยไม่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 และ P-gp

เนื่องจากนมวัวมีสารเบต้าแลคโตกลูบูลินประมาณ 3 กรัม/ลิตร (163 ไมโครโมล) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองครั้งนี้ซึ่งพบว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินขนาด 150 มก./กก. (340 ไมโครโมล) มีผลส่งเสริมการดูดซึมของยาไซโครสปอรินได้ในหนูทดลอง หากพิจารณาขนาดของหนูทดลองเทียบกับผู้ใหญ่หนัก 60 กิโลกรัมพบว่า อันตรกิริยาจะเกิดเมื่อรับประทานสารเบต้าแลคโตกลูบูลินขนาด 9 กรัม (นมวัวประมาณ 3 ลิตร) ดังนั้นจากการทดลองเมื่อพิจารณาในแง่ของโอกาสเกิดอันตรกิริยาของผู้ป่วยที่กำลังใช้ยาไซโครสปอรินร่วมกับการดื่มนมวัวในขนาดปกติ (เช่น 1 ลิตรต่อวัน) พบว่ามีโอกาสเกิดอันตรกิริยาได้น้อย แต่หากดื่มในขนาดสูง (มากกว่า 3 ลิตรต่อวัน) อาจมีผลทำให้เพิ่มการดูดซึมของยาไซโครสปอรินซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดอาการข้างเคียงจากยาได้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินมีผลเพิ่มอัตราการดูดซึมของยาไซโครสปอริน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มอัตราการดูดซึมในระบบนำส่งยา

จากผลการทดลองทั้งจากในสัตว์ทดลองและหลอดทดลอง สามารถสรุปได้ว่า สารเบต้าแลคโตกลูบูลินมีผลช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านยาไซโครสปอรินผ่านเซลล์ Caco-2 ซึ่งฤทธิ์นี้อาจเป็นกลไกที่ใช้อธิบายฤทธิ์เพิ่มอัตราการดูดซึมและปริมาณการดูดซึมยาไซโครสปอรินเมื่อให้ยาร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลินในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามควรต้องมีการทดลองหากลไกการออกฤทธิ์ของสารเบต้าแลคโตกลูบูลินในเชิงลึกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1990; 79(6):476-82
2. Christians U. Transport proteins and intestinal metabolism: P-glycoprotein and cytochrome P4503A, *Ther. Drug Monit.* 2004; 26: 104-106
3. de Wolf F.A., Brett G.M. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. *Pharmacol Rev.* 2000;52(2):207-36
4. Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989;96:736–749
5. Hunter J., Jepson M.A., Tsuruo T., Functional expression of P-glycoprotein in apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem.* 1993;268:14991–14997
6. Ismailos G., Reppas C., Dressman J. B., Macheras P. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991; 43: 287–289
7. Jiko M., Yano I., Wakasugi H., Saito H., Inui K Evaluation of pharmacokinetic interaction between cyclosporin A and probucol in rats. *Pharm Res.* 2002; 19(9): 1362-7
8. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. *Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function.* *J. Dairy Sci.* 2004; 87:785–796
9. Liu L., Bagal D., Kitova E.N., Schnier P.D., Klassen J.S. Hydrophobic protein-ligand interactions preserved in the gas phase. *J Am Chem Soc.* 2009 ;131(44):15980-1
10. Martins P.A., Gomes F., Vaz W.L., Moreno M.J. Binding of phospholipids to beta-Lactoglobulin and their transfer to lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778(5):1308-15
11. Ogasawara A, Kume T, Kazama E. Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35(3):410-8.
12. Pérez M.D. and Calvo M. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *J Dairy Sci.* 1995; 78(5):978-88
13. Pinto M., Robine-Leon S., Appay M-D. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Bio Cell.* 1983; 47:323–330.
14. Sawyer L. and Kontopidis G. The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta.* 2000.;1482(1-2):136-48
15. Sharma P., Varma M.V., Chawla H.P., Panchagnula R. In situ and in vivo efficacy of peroral absorption enhancers in rats and correlation to in vitro mechanistic studies. *Farmaco.* 2005; 60(11-12): 874-83
16. Yang M.C., Guan H.H., Liu M.Y., Lin Y.H., Yang J.M., Chen W.L., Chen C.J., Mao S.J. Crystal

- structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk beta-lactoglobulin. *Proteins*. 2008;71(3):1197-210
17. Hunter J., Jepson M.A., Tsuruo T., Functional expression of P-glycoprotein in apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 1993;**268**:14991–14997
 18. Pinto M., Robine-Leon S., Appay M-D. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Bio Cell*. 1983; **47**:323–330.
 19. Ogasawara A, Kume T, Kazama E. Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*. 2007; 35(3):410-8.

Output ที่ได้จากโครงการ

จากผลการวิจัยซึ่งพบว่าสารเบต้าแลคโตกลูบูลินซึ่งเป็นสารที่มีความปลอดภัย และพบได้ในนมวัว มีสมบัติส่งเสริมอัตราการดูดซึมและปริมาณการดูดซึมของยาไซโครสปอรินในลำไส้เล็กได้ ซึ่งผลการวิจัยนี้อาจจะใช้ต่อยอดในอุตสาหกรรมการผลิตสารช่วยการนำส่งยา โดยอาจมีการนำสารเบต้าแลคโตกลูบูลินนี้ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำส่งยาไปใช้ร่วมยาไซโครสปอรินเพื่อส่งเสริมการดูดซึม ซึ่งเป็นการช่วยลดขนาดและปริมาณการใช้ยาไซโครสปอรินในแต่ละครั้งได้ด้วย เนื่องจากปกติยาไซโครสปอรินมีค่าการดูดซึมที่ต่ำทำให้ต้องใช้ยาในขนาดสูงเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้เกิดอาการข้างเคียงจากยาได้มาก ดังนั้นการใช้อย่างร่วมกับสารเบต้าแลคโตกลูบูลินอาจจะนำไปสู่โอกาสในการลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการที่ต้องยาไซโครสปอรินในขนาดสูงได้ นอกจากนั้นอาจนำไปสู่การวิจัยในการใช้สารนี้ร่วมกับยาชนิดอื่นๆที่มีสมบัติดูดซึมในลำไส้เล็กได้ต่ำเช่นกัน

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาในแง่ของโอกาสเกิดอันตรกิริยาของผู้ป่วยที่กำลังใช้ยาไซโครสปอริน ร่วมกับการดื่มนมวัวในขนาดปกติ (เช่น 1 ลิตรต่อวัน) ซึ่งมีสารเบต้าแลคโตกลูบูลินประมาณ 3 กรัม/ลิตร พบว่าไม่เกิดโอกาสเกิดอันตรกิริยาหรืออาจเกิดได้ต่ำ แต่หากดื่มในขนาดสูง (มากกว่า 3 ลิตรต่อวัน) อาจมีผลทำให้เพิ่มการดูดซึมของยาไซโครสปอรินซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดอาการข้างเคียงจากยาได้

ภาคผนวก

ได้แก่ manuscript
ที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการ
ไปใช้ประโยชน์

Manuscript submitted in journal of Biological & Pharmaceutical Bulletin (BPB)

Enhancing effect of β -lactoglobulin on the rate of cyclosporin A absorption

in vivo and *in vitro*

Vilasinee Hirunpanich^a, Chuthamanee Suthisisang^b and Hitoshi Sato^{c,*}

^a Faculty of Pharmacy, Maha sarakham University, Kantharavichai, Maha sarakham, 44150, Thailand

^b Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Rajadhevi, Bangkok 10400, Thailand

^c Department of Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8555, Japan

* Corresponding author. Tel: +81-3-3784-8611; Fax: +81-3-5498-1148

E-mail address: sato-tky@umin.net

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effects of β -lactoglobulin (β -LG) on the intestinal absorption of cyclosporin A (CsA) *in vivo* and *in vitro*. After intraduodenal co-administration of CsA (5 mg/kg) with 150 mg/kg β -LG, $T_{\max}$ was significantly lower than that of control rats which were given the same dose of CsA without β -LG. $C_{\max}$ and AUC were significantly increased as compared with the control while $T_{1/2}$ were not significant. Moreover, a deconvolution method revealed that the rate of CsA absorption was enhanced by β -LG (150 mg/kg) by about 12 times. These results indicate that β -LG significantly enhanced the rate of CsA absorption and extent of CsA bioavailability in the gut. Using the Caco-2 monolayer which is an *in vitro* model of intestinal absorption, we also demonstrated that β -LG increased the apical-to-basolateral intrinsic permeability clearance of unbound CsA ($PS_{u,cell}$) in a concentration-dependent manner. In conclusion, β -LG was shown to enhance the rate and extent of intestinal CsA absorption *in vivo*, possibly due to the β -LG-mediated transport of CsA.

Key words: β -lactoglobulin; cyclosporin A; oral absorption enhancer

INTRODUCTION

β -Lactoglobulin (β -LG) is a major whey protein of bovine milk, and has been reported to help absorption of lipophilic vitamins in neonates whose bile acids secretion is not matured.¹⁾ β -LG shows a resistance to acidic pH therefore it has been introduced as a carrier to increase the stability for several compounds and nutrients.^{2,3)} However, the effect of β -LG on the gastrointestinal absorption of lipophilic drugs has not been examined quantitatively so far.

Cyclosporine A (CsA) is an immunosuppressive drug, and its oral bioavailability is low due to its poor absorption which is related to water insolubility, P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux, and first-pass metabolism by CYP3A4 in the liver and gut.⁴⁾ Some strategies have been proposed to enhance the absorption of CsA by using absorption enhancers including surfactants, fatty acids, or chitosan derivatives to modify cell membrane permeability or modulate gut tight junctions.⁵⁾ However, local toxicities of these absorption enhancers on intestinal epithelial cells are the matter of concern, and the development of a safer and effective absorption enhancer for CsA has thus been paid much attention.

The aim of this study, therefore, was to determine the effect of β -LG on the intestinal absorption of CsA *in vivo* and *in vitro*. The effect of β -LG on the pharmacokinetics of orally administered CsA was examined in rats and the rate of CsA absorption was calculated by a deconvolution method. Moreover, the effects of β -LG on the solubility of CsA and the permeability of CsA across the Caco-2 monolayer model were determined *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Effect of β -LG on pharmacokinetic of CsA in rats: Male Wistar rats (Nihon Ikagaku Doubutsu, Saitama, Japan) weighing from 250 to 280 g were employed to determine the pharmacokinetic interaction between β -LG and CsA *in vivo* which was studied according to the guidelines for Animal Experimentation in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa University. The rats (n=6 rats/groups) were acclimatized to environmental control (a temperature-controlled facility with a 12-h light/dark cycle) for at least one week. The rats were fasted for approximately 12 h with water given *ad libitum* and then anesthetized by pentobarbital (40 mg/kg). The femoral artery was cannulated with polyethylene tubing (SP-31, Natsume Seisakusho, Tokyo, Japan) filled with saline and EDTA to facilitate blood sampling.

In order to exclude the variability in effect as a result of gastric emptying, β -LG was administered intraduodenally to rats. Polyethylene micro-tubing (PE 50) was used for duodenal cannulation according to the method previously reported.⁶⁾ The abdominal cavity of the femoral artery-cannulated rats was opened and the distal part of the duodenum was exposed and clamped gently. The clamped duodenum was punctured using an 18-gauge needle and a cannula was inserted at the punctured site of the duodenum and the purse sutures were tightened around the cannula. The clamp was removed, and the cannula was flushed by physiological saline. The cannulated rat was kept for 18-24 hr in a Bolman cage and the experiment was performed following recovery from anesthesia.

CsA was supplied by Novartis (Tokyo, Japan) and dissolved in corn oil and given intraduodenally at the dose of 5 mg/kg (4.16 μ mol/kg) alone (*i.e.* control group) or together with β -LG 15 mg/kg (0.81 μ mol/kg) or 150 mg/kg (8.13 μ mol/kg). At 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 12 hr after administration of CsA, blood samples (120 μ l) were taken into plastic tubes containing EDTA and stored at 4°C until assay. CsA concentrations in whole blood samples were assayed by a monoclonal antibody fluorescence polarization immunoassay (FPIA), as previously described.⁷⁾

Pharmacokinetic parameters of CsA, *i.e.*, the area under the concentration-time curve from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$), elimination half-life ($T_{1/2}$), mean residence time (MRT), the maximum blood concentration ($C_{\max}$), volume of distribution (V_{dss}/F), total body clearance (CL_{tot}/F), and time to reach $C_{\max}$ ($T_{\max}$), were calculated by a non-compartmental analysis using WinNonlinTM (version 4.0.1, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

The intestinal absorption rate of CsA after intraduodenal administration to rats was calculated by a deconvolution method. Blood concentration of CsA after oral CsA administration as a function of time, $C_{\text{po}}(t)$, is expressed as follows:⁸⁾

$$C_{\text{po}}(t) = \int_0^t f(\theta) C_{\text{iv}}(t - \theta) d\theta \quad (1)$$

where $f(t)$ and $C_{\text{iv}}(t)$ are the absorption rate and the blood concentration, respectively, at time t after intravenous injection of CsA. When the amount of $f(\theta)\Delta\theta$ is rapidly injected to the systemic circulation at time θ , blood concentration associated with the pulse is $f(\theta)\Delta\theta C_{\text{iv}}(t-\theta)$ at time t . Equation 1 holds since an absorption rate-time profile is composed of an infinite number of the input pulses. Absorption profiles of CsA were estimated by deconvoluting $C_{\text{po}}(t)$ with $C_{\text{iv}}(t)$ in Eq. 1.⁸⁾ $C_{\text{iv}}(t)$ used in this analysis was cited from a previous study⁷⁾, where the same dose of CsA (5mg/kg) was intravenously administered to rats and the blood-concentration profile of CsA were obtained.

Effect of β -LG on the solubility of CsA in vitro: The solubility of CsA was determined according to a method described by Jiko *et al.*⁹⁾ with some modifications. Briefly, CsA (10 mg) was added to 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) solution (5 ml) in the absence or presence of β -LG (30 mg). Samples were centrifuged at 15,000 x g for 20 min. Then, aliquots of supernatant were taken, diluted with saline and filtrated through a microfilter (pore size 0.45 μ m) before CsA was quantified by FPIA.

Effect of β -LG on the permeability of CsA in the Caco-2 monolayer: Caco-2 cells (American type culture collection, Manassas, USA) were seeded at a density of 6×10^4 cells/cm² on the Snapwell Transwell permeable polycarbonate (PC) filters (12 mm diameter, 0.4 mm pore size, 1 cm² growth area) (Coring Costar Corp., Cambridge, MA, USA) and cultured as previously described.⁷⁾ The monolayer of Caco-2 cultured on a PC filter was mounted into the diffusion apparatus (Coring Costar Corp.). The cells and PC membrane faced the donor and receiver chambers nominated as the apical (A) and basolateral (B) sides, respectively. Then, 5 ml of HBSS was pipetted into the A and B sides of the diffusion cells maintained at 37°C, where 95%O₂/5%CO₂ was bubbled continuously. Transport study was initiated by adding [mebmt- β -³H]-cyclosporin A (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) ([³H]-CsA, 0.5 μ Ci/ml) at various concentrations of β -LG (0, 0.2, 1, 2 and 20 μ M) into the A side of the diffusion cells. In additional experiments, a P-gp inhibitor PSC833 (10 μ M) or a CYP3A/P-gp inhibitor ketoconazole (10 μ M) was added into the A side of the diffusion cells before addition of [³H]-CsA. Aliquots of 100 μ l of the incubation mixture were taken from the B chamber at 0, 30, 60, 90, and 120 min and the radioactivity measured by a liquid scintillation counting (LSC-5200, Aloka, Japan).

The amount of [³H]-CsA (C_r) transported to the receiver side (*i.e.*, the B side) was plotted against time t (min), and the apparent permeability clearance of [³H]-CsA across the cells cultured on a PC filter (PS_{total}) was calculated according to a previous report¹⁰⁾ as follows:

$$PS_{total} (\mu\text{l}/\text{min}) = \left(\frac{dC_r}{dt} \right) \times \frac{1}{C_0} \times V \quad (2)$$

where dC_r/dt represents the transport rate of [³H]-CsA, calculated by plotting the amount of [³H]-CsA transported against time and determining the slope of the regression line (μ Ci/ml/min), V is the volume in the receiver chamber (μ l) and C_0 represents the initial concentration of [³H]-CsA in the donor chamber (μ Ci/ml).

In another study, C_r in the absence of the cells (*i.e.*, filter only) at various concentrations of β -LG (0, 0.2, 1, 2 and 20 μ M) were also plotted against time t (min), and the permeability clearance of [3 H]-CsA across the filter without cells (PS_{filter}) was calculated by Eq. (2).

The transcellular permeability clearance of [3 H]-CsA across the Caco-2 cells (PS_{cell}) was calculated as follows: ¹⁰⁾

$$PS_{cell}(\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{1}{\frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{filter}}} = \frac{PS_{total} \cdot PS_{filter}}{PS_{filter} - PS_{total}} \quad (3)$$

The fraction of unbound [3 H]-CsA in the donor-side medium (f_u) was calculated as follows:

$$f_u = \frac{PS_{filter(+\beta-LG)}}{PS_{filter(-\beta-LG)}} \quad (4)$$

where $PS_{filter(+\beta-LG)}$ and $PS_{filter(-\beta-LG)}$ represent the permeability clearances of [3 H]-CsA across the filter (without Caco-2 cells) in the presence and absence of β -LG, respectively.

The intrinsic permeability clearance of unbound [3 H]-CsA across the Caco-2 cells ($PS_{u,cell}$) was calculated by Eq. 5, as follows:

$$PS_{u,cell}(\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{PS_{cell}}{f_u} \quad (5)$$

Statistical Analysis: Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (S.D.). Comparisons between two groups and among more than three groups were performed using Student's *t*-test and one-way ANOVA for multiple comparisons among the groups, followed by Dunnett's post hoc test for the individual differences, respectively. Difference was considered to be statistically significant if the probability value was less than 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

β -LG is a lipocalin protein family which has a β -barrel of eight anti-parallel β -strands with a hydrophobic interior. β -LG exhibits the ability to bind a variety of compounds including retinol, phospholipids, phenolic compounds, fatty acids, and other small hydrophobic molecules via tight binding inside its hydrophobic calyx.¹⁾

Certain compositions of milk such as milk fat globule membranes (MFGM) have been reported to enhance the intestinal absorption of lipophilic drugs including CsA after administered concomitantly.^{11,12)} In accordance, our in vivo data show that β -LG increased blood concentration of CsA in concentration-dependent manner (Fig.1). Co-administration of 150 mg/kg β -LG significantly increased AUC and $C_{\max}$ of CsA by about 30% and 100%, respectively, as compared with control ($p<0.05$) (Table 1). $T_{\max}$ after co-administration of CsA with 15 and 150 mg/kg β -LG was significantly lower than that of control ($p<0.05$). Moreover, we calculated the intestinal absorption rate by using a deconvolution method using the profiles of the CsA concentrations in blood after intravenous and intraduodenal administration. As a result, the average rates of CsA absorption were determined to be 9.3 % dose/hr with 15 mg/kg β -LG, 24 % dose/hr with 150 mg/kg β -LG and 1.9 % dose/hr with the control. Therefore, the rates of CsA absorption in the presence of 15 and 150 mg/kg β -LG were greater than that of control by about 4 and 12 times, respectively. In contrast, $T_{1/2}$ was not significantly different among the β -LG-treated and control groups, indicating that the hepatic clearance of CsA was not affected by β -LG. These results clearly indicate that β -LG enhances the rate and extent of the gastrointestinal CsA absorption.

Very low solubility of CsA in aqueous solution is considered to limit the oral bioavailability of CsA. β -LG has been reported to bind and solubilize several compounds, such as resveratrol, theophylline and sulfamethoxazole.^{13,14)} We preliminarily expected that β -LG binds CsA and thus may increase the drug solubility. However, we found that β -LG did not actually affect the solubility

of CsA, as compared with control (63.2 ± 0.31 vs 67.7 ± 11.2 $\mu\text{g/ml}$ in the absence and presence of β -LG, respectively).

PS_{total} , $\text{PS}_{\text{filter}}$, and PS_{cell} of $[^3\text{H}]$ -CsA were calculated to be 7.42 ± 0.78 , 156.3 ± 19.2 , and 7.80 ± 1.12 $\mu\text{l/min}$, respectively. In the presence of β -LG, $\text{PS}_{\text{filter}}$, PS_{cell} and f_u of $[^3\text{H}]$ -CsA were decreased in a concentration-dependent manner with β -LG (Table 2). These results indicate that the binding of β -LG with $[^3\text{H}]$ -CsA resulted in the reduction of unbound fraction of $[^3\text{H}]$ -CsA in the donor chamber. However, we found that β -LG increased the apical-to-basolateral intrinsic permeability clearance of unbound CsA ($\text{PS}_{\text{u,cell}}$) (Table 2), suggesting that β -LG may accelerate the transport of CsA at the proximity of Caco-2 cells (generally nominated as protein-mediated transport) to the receiver side. A detailed mechanism of this phenomenon has been proposed by Martin et al,¹⁵⁾ who demonstrated that β -LG accelerates the phospholipid exchange between lipid bilayers after adsorption of the protein at the membrane surface and thus may act as an absorption enhancer of hydrophobic compounds. Moreover, we determined the PS_{cell} values in the presence of PSC833 and ketoconazole to be 21.3 ± 0.8 and 22.6 ± 1.1 $\mu\text{l/min}$, respectively (without β -LG). Since these values are much higher than the PS_{cell} value (3.45 ± 0.67 $\mu\text{l/min}$) observed in the presence of β -LG (20 μM), it was suggested that β -LG does not show little, if any, effect on P-gp or CYP3A, in consistent with the fact that there have been no reports to demonstrate that β -LG has any effect on P-gp and CYP3A. Thus, β -LG may act as a carrier-protein of CsA, in consistent with a previous report that β -LG enhanced the intestinal absorption of palmitate,¹⁶⁾ retinol,¹⁷⁾ and fatty acid.¹⁷⁾ Another example of protein-mediated transport can be seen with fatty acids, as Burczynski *et al.*¹⁸⁾ reported that the uptake of $[^3\text{H}]$ -palmitate by hepatocytes was statistically greater in the presence of chemically modified albumin which has higher *pI* values, and therefore concluded that the protein-mediated complex does interact with the hepatocyte membrane.

Since the volume/length ratio of the rat intestine was set at 0.1 (ml/cm) in the rat jejunum,¹⁹⁾ and the total length of the duodenum and jejunum of rats is 60 cm,¹⁹⁾ we can calculate the intestinal

fluid volume to be 6.0 ml in rats. Therefore, the average concentration of β -LG in the intestine could be calculated to be approximately 34 μ M and 340 μ M for 15 mg/kg and 150 mg/kg doses of β -LG, respectively. These β -LG concentrations *in vivo* are higher than the maximum concentration (20 μ M) employed in the CsA transport experiments using Caco-2 cells and, therefore, the *in vitro* effects of β -LG could be expected to take place in the *in vivo* experiments. It has to be also considered that the fraction of unbound CsA in corn oil used in the control experiment *in vivo* should be far less than that in the β -LG formulation, as inspected from the β -LG-mediated increase in the $PS_{u,cell}$ *in vitro*. Since milk contains approximately 3g/L (163 μ M) of β -LG which corresponds to our experimental conditions of β -LG, the enhancing effect of β -LG on CsA absorption found in this study could happen *in vivo* when one takes milk together with CsA. In this regard, there emerged a notion that milk-CsA interaction could happen in daily life. This notion can be supported by a recent study²⁰⁾ reporting that novel milk-based formulations of lipophilic drugs show enhanced pharmacokinetic properties in human.

The enhancing effects of β -LG on CsA absorption *in vivo* appears to be moderate as compared with the effects reported previously⁵⁾ with fatty acids (e.g., sodium caprate) and the commercially available formulation which contains a surfactant, cremophore EL (Neoral[®]). However, the use of β -LG contained in milk may not cause noticeable toxicities, and thus be favorable as a drug carrier in general. As such, the combined use of β -LG and chitosan nanoparticles has been reported and considered to be promising as a biocompatible drug carrier.²¹⁾

Taken altogether, β -LG was shown to enhance the rate and extent of intestinal CsA absorption *in vivo*, possibly due to the β -LG-mediated increase in the effective unbound fraction of CsA. Due to its binding property with lipophilic drugs, β -LG could be used as an oral absorption enhancer for other lipophilic drugs.

Acknowledgements : This work was supported by the Thailand Research Fund (MRG5380140).

REFERENCES

- 1) Sawyer L., Kontopidis G., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1482, 136-148 (2000).
- 2) Barbiroli A., Beringhelli T., Bonomi F., Donghi D., Ferranti P., Galliano M., Iametti S., Maggioni D., Rasmussen P., Scanu S., Vilardo M. C, *Biol. Chem.*, 391, 21-32 (2010).
- 3) Chen L., Subirade M., *Biomaterials*, 26, 6041-6053 (2005).
- 4) Christians U., *Ther. Drug Monit.*, 26, 104-106 (2004).
- 5) Sharma P., Varma M. V., Chawla H. P., Panchagnula R., *Farmaco.*, 60, 874-883 (2005).
- 6) Lukas S. E., Moreton J. E., *Life Sci.*, 25, 593-600 (1979).
- 7) Hirunpanich V., Katagi J., Sethabouppha B., Sato H., *Drug Metab. Dispos.*, 34, 305-310 (2006).
- 8) Kiwada H., Morita K., Hayashi M., Awazu S., Hanano M., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 25, 1312–1318 (1977).
- 9) Jiko M., Yano I., Wakasugi H., Saito H., Inui K., *Pharm. Res.*, 19, 1362–1367 (2002)
- 10) Artursson P., *J. Pharm. Sci.*, 79, 476–482 (1990).
- 11) Sato H., Liu H. X., Adachi I., Ueno M., Lemaire M., Horikoshi I., *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1526-1528 (1994).
- 12) Charkoftaki G., Kytariolos J., Macheras P., *Int. J. Pharm.*, 390, 150-159 (2010).
- 13) Liang L., Tajmir-Riahi H. A., Subirade M., *Biomacromolecules*, 9, 50-56 (2008).
- 14) Reddy T. T., Lavenant L., Lefebvre J., Renard, D., *Biomacromolecules.*, 7, 323–330. (2006).
- 15) Martins P.A.T., Gomes F., Vaz W.L.C., Moreno M.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1778 1308–1315 (2008).
- 16) Burczynski F. J., Moran J. B., Cai Z. S., Forker E. L, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 68, 201-206 (1990).

- 17) Puyol P., Perez M. D., Sanchez L., Ena J. M., Calvo M., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1236, 149-154 (1995).
- 18) Burczynski F. J., Wang G. Q., Elmadhoun B., She Y. M., Roberts M. S., Standing K. G., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 79, 868-875 (2001).
- 19) Masaoka Y., Tanaka Y., Kataoka M., Sakuma S., Yamashita S., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 240-250 (2006).
- 20) Charkoftaki G., Kytariolos J., Macheras P., *Int. J. Pharm.*, 390, 150-159 (2010).
- 21) Chen L., Subirade M., *Biomaterials*, 26, 6041-6053 (2005).

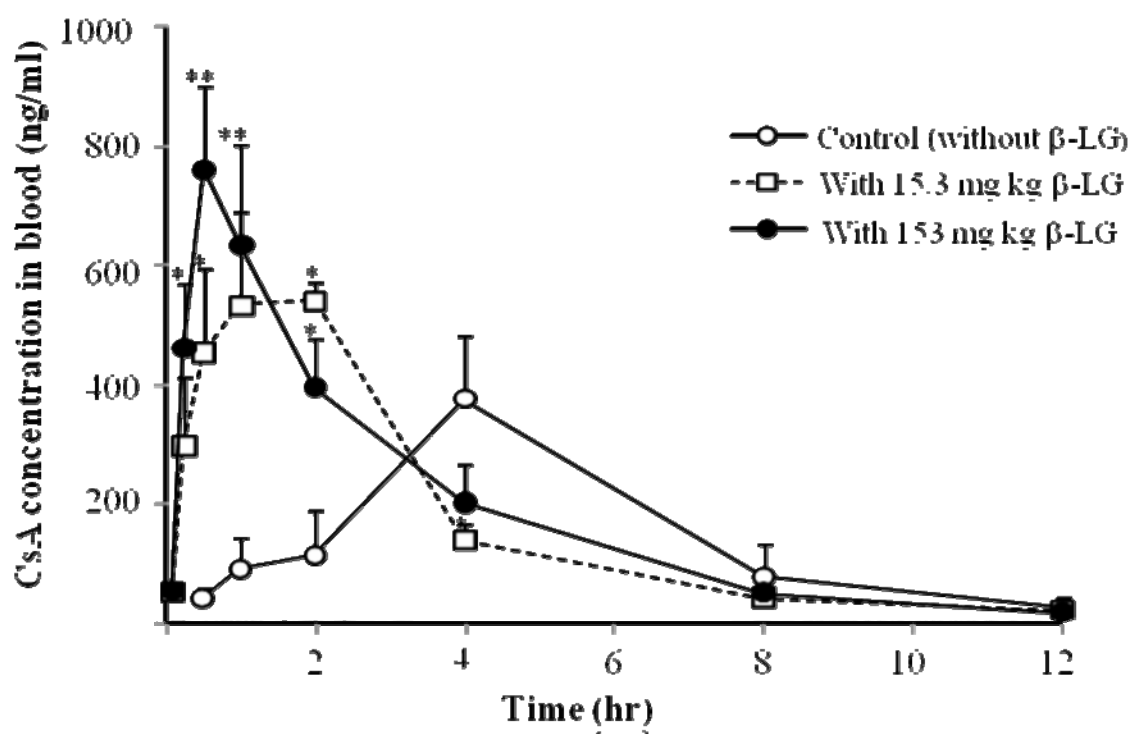


Figure 1: The blood concentration-time profiles of CsA in rats after intraduodenal administration of CsA with or without β-LG (15 and 150 mg/kg)

Each value is expressed as the mean $\pm$ S.D. (n=6).

*, ** represent $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively as compared with the control group (without β-LG).

Table 1: Pharmacokinetic parameters of CsA (5 mg/kg) after intraduodenal administration to rats

^E Parameters (unit)	Control (CsA only)	Co-administration with 15 mg/kg β -LG	Co-administration with 150 mg/kg β -LG
$T_{1/2}$ (hr)	3.20 ± 1.20	3.20 ± 0.49	2.55 ± 0.25
$C_{\max}$ (ng/ml)	379 ± 208	604 ± 79	$763 \pm 140^*$
$T_{\max}$ (hr)	4.0 ± 0.0	$1.50 \pm 0.58^*$	$0.50 \pm 0.0^*$
AUC (ng/ml·hr)	1753 ± 214	2097 ± 310	$2297 \pm 247^*$
CL_{tot}/F (L/hr/kg)	3.56 ± 1.94	2.43 ± 0.37	$2.25 \pm 0.49^*$
V_d/F (L/kg)	19.1 ± 9.60	8.97 ± 1.47	$7.39 \pm 1.0^*$
MRT (hr)	5.86 ± 0.38	$3.71 \pm 0.44^*$	$3.35 \pm 0.50^*$

Each value is expressed as the mean $\pm$ S.D. (n=6). * $p < 0.05$ as compared with the control group (without β -LG).

Table 2: The permeability clearances of [^3H]-CsA without and with β -LG (0.2, 1, 2 and 20 μM) in Caco-2 cell monolayer model

Group	PS_{filter} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	PS_{cell} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	f_u	$PS_{u,cell}$ ($\mu\text{l}/\text{min}$) (% of control)
Without β -LG	156.3 ± 19.2	7.80 ± 1.12	1	7.8 (100%)
0.2 μM β -LG	108.2 ± 10.3	7.15 ± 0.68	0.69	10.3 (133%)
1 μM β -LG	59.2 ± 6.4	5.15 ± 1.02	0.38	13.6 (174%)
2 μM β -LG	41.1 ± 7.9	4.25 ± 0.52	0.26	16.2 (207%)
20 μM β -LG	15.9 ± 2.1	3.45 ± 0.67	0.10	33.9 (434%)

Each value of PS_{filter} and PS_{cell} is expressed as the mean $\pm$ S.D. of 3-4 experiments.

f_u and $PS_{u,cell}$ represent the fraction unbound and the intrinsic permeability clearance of unbound [^3H]-CsA, respectively, calculated as mean values by [Eq. 4](#) and [5](#).