



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอลในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี
(Effect of UDP-glucuronosyltransferase1A (UGT1A) polymorphisms on propranolol pharmacokinetics in β -thalassemia /Hb E)

โดย พ.ท.หญิง.ดร. จีรานุช ตันคณิตเลิศ

เสร็จโครงการ เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552

สัญญาเลขที่ TRG5080009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอลในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี
Effect of UDP-glucuronosyltransferase1A (UGT1A) polymorphisms on propranolol pharmacokinetics in β -thalassemia /Hb E

โดย พ.ท.หญิง.ดร. จีรานุช ตันคณิตเลิศ
สังกัดภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
315 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของบุคคลหลายฝ่ายเช่น
เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาลัยมหิดล และศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี ตลอดจนผู้ปวยธาลัสซีเมียและ
อาสาสมัครผู้ยินดีเข้าร่วมโครงการทุกท่าน นอกจากนี้ยังได้รับการช่วยเหลือและให้คำแนะนำอย่างดีเลิศ
จากนักวิจัยที่ปรึกษา ศศ. ดร. นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส และที่สำคัญโครงการวิจัยนี้จะไม่สำเร็จ
ได้ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

พ.ท.หญิง ดร. จีรานุช ตันคณิตเลิศ
หัวหน้าโครงการ

ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอลในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี

จิราณัฐ ตันคณิตเลิศ¹, นพวรรณ กุ่มมาลา มอราเลส²

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า, jeeranuts@yahoo.com

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและความผิดปกติในการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ อันเนื่องมาจากภาวะเหล็กเกินนั้นอาจ นำมาซึ่งภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โปรปราโนลอล เป็นยากลุ่มกันเบต้ารีเซพเตอร์ ใช้เป็นยารักษาโรคของระบบหัวใจหลอดเลือด มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทำให้ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ลดความดันโลหิต นอกจากนี้ยายังมีผลลด free fatty acid และลดการเกาะกลุ่มของ platelet การที่โปรปราโนลอลถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่ตับก่อนที่จะเข้าสู่กระแสเลือดส่งผลให้ระดับยาในเลือดมีความแตกต่างกัน นำไปสู่การกำเริบในการรักษาต่างกัน ยาส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับผ่านทาง 3 กระบวนการคือ glucuronidation, side chain oxidation และ ring oxidation ได้เมตาโบไลต์ที่สำคัญเช่น 4-OH propranolol ซึ่งยังคงมีฤทธิ์เหมือนโปรปราโนลอล จากนั้นเมตาโบไลต์นี้จะถูกเปลี่ยนโดยกระบวนการ glucuronidation ได้เป็น 4-OH propranolol glucuronide (HOP-G) ดังนั้นกระบวนการ glucuronidation จึงมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยาโปรปราโนลอล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามดูผลของการหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UGT 1A6 ที่มีบทบาทสำคัญในเภสัชจลนศาสตร์ของยา โปรปราโนลอล อาสาสมัครจำนวน 13 ราย และผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มตาม UGT1A6 genotype คือกลุ่ม wild type (UGT1A6*1/*1), heterozygote (UGT1A6*1/*2) และ homozygote (UGT1A6*2/*2) หลังจากรับยา โปรปราโนลอล 40 มิลลิกรัมเพียงครั้งเดียว ได้เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลาต่างๆ และ ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดระดับยาโปรปราโนลอลและเมตาโบไลต์ด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography และ gas-chromatography-mass spectrometry พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม wild-type ในผู้ป่วยและในอาสาสมัครกลุ่มที่เป็น heterozygote และ homozygote มีระดับยาสูงสุด (Cmax) และปริมาณยาในเลือดสูง (AUC) ในขณะที่มีการกระจายยา (Vd/F) และปริมาณเลือดต่อหนึ่งหน่วยเวลาที่ยาถูกขับออก (CL/F) สัดส่วนของเมตาโบไลต์ (propranolol-glucuronide) ทั้งในพลาสมาและปัสสาวะ ต่อปริมาณโปรปราโนลอลในเลือดลดลง และ สัดส่วนของเมตาโบไลต์ (4-OH-propranolol-glucuronide) ในปัสสาวะ ต่อปริมาณโปรปราโนลอลในเลือดลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยกับอาสาสมัครเฉพาะกลุ่มที่เป็น wild-type เหมือนกัน พบว่าในผู้ป่วยมีระดับยาในเลือดสูงกว่า ณ ทุกจุดเวลา ค่าครึ่งชีวิตของยา (T_{1/2}) นานขึ้น และค่าคงที่ของการขจัดยา (K_e) จากผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นบทบาทสำคัญของ UGT1A6*2 ที่เข้ามามีบทบาทต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ propranolol ทั้งในอาสาสมัครและผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยพบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงส่งผลให้ระดับยาในเลือดสูงกว่า ค่าครึ่งชีวิตของยานานขึ้นอาจส่งผลให้ยาออกฤทธิ์นานขึ้น ผลการวิจัยนี้อาจใช้เป็นประโยชน์ในการปรับขนาดยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยต่อไป

คำสำคัญ โปรปราโนลอล, ธาลัสซีเมีย, UGT1A6

Effect of UDP-glucuronosyltransferase1A (UGT1A) polymorphisms on propranolol pharmacokinetics in β -thalassemia /Hb E

Jeeranut Tankanilt¹, Noppawan Phumala Morales²

¹Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand, jeeranuts@yahoo.com

²Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok Thailand

Abstract

Pathological changes in patient with thalassemia which are consequences of chronic anemia, requires increased cardiac output and eventually may produce hypoxia, hypertension and congestive heart failure. Propranolol is a non selective beta-adrenergic receptor blocking drug widely use for the treatment of cardiovascular diseases. The contribution of presystemic hepatic metabolism to the highly variable oral bioavailability of propranolol leads to different therapeutic effect. The drug was metabolized by oxidation, N-dealkylation and glucuronidation pathway. The oxidation product ; active metabolite (4-OH propranolol) was conjugated with glucuronide activated by UGT 1A6 to produce 4-OH propranolol-glucuronide. To examine the effects of *UGT1A6* polymorphisms (*UGT1A6*2*) on the pharmacokinetics of propranolol in healthy volunteers and thalassemic patients, thirteen healthy volunteers and ten thalassemic patients with different *UGT1A6* genotype including wild type; *UGT1A6*1/*1*, heterozygote; *UGT1A6*1/*2* ; and homozygote; *UGT1A6*2/*2* were enrolled the study. *UGT1A6* genotypes were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. After an overnight fast, the subjects received a single oral dose of 40 mg propranolol. Blood samples were collected before and at different time points after dosing. Urine output was collected for 24 hour. Propranolol (P) and propranolol-glucuronide (PG) concentrations in plasma and urine were determined using a validated high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry method (GC/MS). 4-OH-propranolol glucuronide (HOP-G) in urine samples were also determined by GC/MS. Compared to wild type group, the healthy volunteers and thalassemic patients with heterozygote and homozygote showed the statistically significant increase of area under concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$), and maximum concentration (C_{max}) of propranolol and decrease of V_d/F , and Cl/F . Lower PG/P and HOP-G/P plasma and urine ratio were noted. There was higher plasma concentration and longer half-life of propranolol in patients with wild-type than in volunteers with wild-type. These results demonstrated that the *UGT1A6*2* appeared to exert statistically significant effects on the single-dose pharmacokinetics of propranolol in both volunteers and thalassemic patients. The *UGT1A6*2* decreased the enzyme activity resulting in higher plasma concentration and longer half-life of propranolol. The result from this study may useful for dose adjustment in the patient .

Key word : Propranolol, Thalassemia, *UGT1A6*, Pharmacokinetics

เนื้อหาทางวิจัย

บทนำ

พยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมียเช่น ภาวะเลือดจาง บิลิรูบินในเลือดสูง ระดับคอเลสเตอรอลต่ำ ภาวะเหล็กเกิน (iron overload) นำมาซึ่งความผิดปกติของระบบต่างๆในผู้ป่วยเช่น ระบบต่อมไร้ท่อ และเมตาโบลิซึม โรคของระบบหัวใจหลอดเลือด ตลอดจนการทำงานของตับ ไต ซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการเปลี่ยนแปลงและขับถ่ายยาออกจากร่างกาย พยาธิสภาพทั้งหมดดังกล่าวนี้อาจส่งผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ของยาที่จำเป็นต้องใช้ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

โพรปราโนลอล (propranolol) เป็นยากลุ่มกั้น β -adrenergic receptor ใช้เป็นยารักษาโรคของระบบหัวใจหลอดเลือด มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทำให้ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ลดความดันโลหิต นอกจากนี้ยายังมีผลลด free fatty acid และลดการเกาะกลุ่มของ platelet ยาส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับผ่านทาง 3 กระบวนการคือ glucuronidation, side chain oxidation และ ring oxidation ได้เมตาโบไลต์ที่สำคัญเช่น 4-OH propranolol ซึ่งยังคงมีฤทธิ์เหมือนโพรปราโนลอล จากนั้นเมตาโบไลต์นี้จะถูกเปลี่ยนโดยกระบวนการ glucuronidation ได้เป็น 4-OH propranolol glucuronide (HOP-G) ดังนั้นกระบวนการ glucuronidation จึงมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยาโพรปราโนลอล

ในกระบวนการ glucuronidation ต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญคือ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) ซึ่งมีหลาย isoform เช่น UGT 1A1, 1A2, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6 เป็นต้น ในแต่ละ isoform จะมีความจำเพาะในการจับกับ substrate ที่ต่างกัน เช่น substrate ของ UGT1A6 จะเป็นสารที่มีโครงสร้างของ phenol เช่นยาพาราเซตามอล โพรปราโนลอล เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ UGT1A1 มีความจำเพาะกับบิลิรูบินซึ่งเป็นผลผลิตของการที่เม็ดเลือดถูกทำลาย หากประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลงอาจเนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรมหรือปัจจัยอื่นก็จะส่งผลกระทบต่อการจัดบิลิรูบินในร่างกาย ตัวอย่างเช่น ความผิดปกติที่บริเวณ promoter ของยีนของ เอนไซม์ UGT1A1 ซึ่งปกติมีการซ้ำกันของ TA จำนวน 6 ครั้ง ($(A(TA))_6TAA$) เปลี่ยนไปเป็นซ้ำกัน 7 ครั้ง ($(A(TA))_7TAA$) หรือที่เรียกว่า Gilbert's syndrome จะพบว่าผู้ป่วยมีระดับของบิลิรูบินในเลือดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มี Gilbert's syndrome ร่วมด้วยจะมีระดับบิลิรูบินในเลือดสูงมากขึ้นอีก จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวแบบ heterozygous และ homozygous ในคนไทยคิดเป็น ร้อยละ 25 และ 2 ตามลำดับ

ในประเทศไทยยังมีการศึกษาถึงเภสัชจลนศาสตร์ของยาต่างๆที่ใช้บ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอย่างมีระบบน้อยมากทำให้แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ยังคงใช้แบบแผนการให้ยาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับคนไข่อื่นๆทำให้การรักษายังไม่เกิดประสิทธิผลเท่าที่ควร ผู้วิจัยและคณะได้เริ่มทำการศึกษาวิจัยและพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UGTs และภาวะบิลิรูบินใน

เลือดสูงมีผลกระทบอย่างมากต่อเภสัชจลนศาสตร์ของพาราเซตามอลในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย อย่างไรก็ตามอย่างไรก็ตามยาโปรปราโนลอลนั้นมีความแตกต่างหลายอย่างจากพาราเซตามอลทั้งในด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ดังนั้นการศึกษาติดตามดูอิทธิพลของการหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ UGT 1A (genetic polymorphisms) โดยเฉพาะ UGT1A6 ที่มีบทบาทสำคัญในเภสัชจลนศาสตร์ของยา โปรปราโนลอล ซึ่งถือว่าเป็นยาที่ใช้มาก ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี จะนำไปสู่การหาตัวชี้วัดที่สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการบริหารยาให้มีความเหมาะสมต่อไป

วิธีวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสามการทดลองดังนี้

1. พัฒนารูปแบบการตรวจวัดระดับยาโปรปราโนลอลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ chromatography-mass spectrometry method (GC/MS)
2. คัดเลือกอาสาสมัครและผู้ป่วยธาลัสซีเมียมาตรวจและวิเคราะห์ยีนของเอนไซม์ UGT1A (genotype analysis)
3. ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอลทั้งในอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พัฒนารูปแบบการตรวจวัดระดับยาโปรปราโนลอลและเมตาโบไลต์จากตัวอย่างเลือดด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Gurvinder SR, 1995 (18) และตัวอย่างปัสสาวะด้วยเครื่อง Gas-chromatography Mass-Spectrometry (GC/MS) โดยหาวิธีมาตรฐานสำหรับการทำ
 - calibration curve
 - Separation และ specificity
 - Linearity
 - Precision
 - Lower limit of quantitation
 - Recovery

**ผลการพัฒนารูปแบบวิเคราะห์โปรปราโนลอลและเมตาโบไลต์ด้วยเครื่อง HPLC และ GC/MS อยู่ในภาคผนวก

2. คัดเลือกอาสาสมัครและผู้ป่วยธาลัสซีเมียมาตรวจและวิเคราะห์ยีนของเอนไซม์ UGT1A

2.1 คัดเลือกอาสาสมัครและผู้ป่วยประมาณ 15-30 ราย

- อายุ 18-45 ปี
- น้ำหนัก 30-70 กิโลกรัม

- สำหรับผู้ป่วยเลือกเฉพาะผู้ป่วย intermediate β -thalassemia /Hb E
- การทำงานของตับ ไต ปกติหรืออยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกันในผู้ป่วยธาลัสซีเมียซึ่งรวมถึง

Aspartate aminotransferase (AST)

Alanine aminotransferase (ALT)

Alkaline phosphate (ALP)

Blood urea nitrogen (BUN)

Creatinine (Cr)

Cholesterol

Serum ferritin

- ไม่เคยได้รับเลือดมาก่อนหรือได้รับเลือดครั้งสุดท้ายมานานกว่า 3 เดือน
- ไม่ได้รับยาหรือสารที่อาจมีผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอล ยกเว้น Folic acid ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย
- อาสาสมัครและผู้ป่วยหญิงทุกรายจะต้องไม่อยู่ในช่วงตั้งครรภ์ (ต้องได้รับการตรวจสอบการตั้งครรภ์ก่อนทุกราย)
- อาสาสมัครและผู้ป่วยทุกรายที่เข้าร่วมวิจัยจะต้องเซ็นติบายนยอมเข้าร่วมวิจัยโดยโครงการนี้จะนำเสนอเพื่อการพิจารณาจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลรามารับดี ก่อนเริ่มโครงการ
- เก็บตัวอย่างเลือด รายละ 3 มิลลิลิตร
- สกัด DNA ด้วยวิธี salting out

2.2 การวิเคราะห์ UGT 1A6 gene

โดยวิเคราะห์ในส่วน coding region ของยีนที่ codon 7, 181 และ 184 โดยใช้เทคนิค

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) รายละเอียดดังนี้

2.2.1 เพิ่มจำนวน DNA โดย PCR- technique ซึ่งประกอบด้วย

- 10 μ l DNA (10 ng/ μ l)
- 0.2 μ l dNTP
- 2 μ l 10X buffer
- 4 μ l Q solution
- 3.2 μ l ddH₂O
- 0.2 μ l Taq polymerase
- 0.4 μ l forward primer (5'CATCAACTGCCAGAGCCTCC 3')
- และ reverse primer (5' GGAAGTTGGCCACTCGTTGG 3')

- PCR condition

Preheat 94 °C 2 min.

Denature 94 °C 45 sec.

Annealling 64 °C 45 sec.

Extension 72°C 45 sec. (X 45 cycles)

2.2.2 เตรียมเอ็นไซม์ NsiI Aall และ Fnu4H1 ใน buffer จนได้ความเข้มข้น 2 uM

2.2.3. ผสม 5 ul PCR product กับเอ็นไซม์ในข้อ 2.2.2 แล้ว incubate ที่ 37 °C 24 ชั่วโมง

2.2.4. หยุดปฏิกิริยา ด้วย 2 µl 0.5M EDTA

2.2.5 นำไปแยกใน 8% polyacrylamide gel

2.2.6 ย้อมเจล ด้วย Cyber gold 30 นาที และป้องกันจากแสง

2.2.7 นำเจลไป scan ด้วย เครื่อง Geldoc

3. ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาโปรปราโนลอลทั้งในอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคตับ

3.1. แบ่งกลุ่มอาสาสมัครและผู้ป่วยที่มี UGT1A genotype ต่างกัน กลุ่มละประมาณ 5 ราย

3.2. หลังจากงดอาหาร 10 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะถูกเจาะเลือดเป็นระยะๆ โดยการคาเข็มพลาสติกที่เส้นเลือดดำที่แขนเพื่อเก็บเลือดที่เวลาก่อนและ 0.15, 30, 60, 90, 150, 210, 330 และ 450 นาทีหลังได้รับยาโปรปราโนลอล (Inderal®) 40 มิลลิกรัม อาสาสมัครและผู้ป่วยจะรับประทานอาหารที่มีโปรตีนต่ำเหมือนกันทุกรายได้หลังจากได้รับยาแล้ว 3 ชั่วโมง และงดเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์และกาแฟ

3.3. นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ 1700 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเก็บส่วนพลาสมาไว้ที่ อุณหภูมิ-20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.4 นำพลาสมา 0.5 ml มาเติม Pronethalol hydrochloride (200 ng/ml) ซึ่งเป็น internal standard และ 1M sodium carbonate buffer จากนั้นนำไปสกัดด้วย 3 ml diethyl ether โดย vortex 3 วินาที centrifuged 760 g 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำส่วนบนของสารสกัดมา 2 ml แล้วทำให้แห้งด้วย nitrogen นำสารที่แห้งมาละลายด้วย mobile phase 500 µl เขย่าเบาๆ และนำสารละลายนี้ 40 µl ฉีดเข้า HPLC column เพื่อตรวจวัดระดับยาโปรปราโนลอลและเมตาโบไลต์

3.5 วิเคราะห์ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ AUC_{0-t} , AUC_{0-inf} , C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, Ke , Cl/F และ Vd/F ของ โปรปราโนลอล โดยโปรแกรมสำเร็จรูป PK solution และใช้ non-compartment model ในการคำนวณ และวิเคราะห์ทางสถิติดังนี้

- A. เปรียบเทียบ pharmacokinetic parameters ของผู้ป่วยกับอาสาสมัครสุขภาพดีที่มี UGT1A6 genotype ต่างกันโดยโปรแกรม SPSS version 12 ด้วย one way ANOVA และ กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ที่ 95 % confidence intervals
- B. คำนวณสถิติอื่นๆของ pharmacokinetic parameters ที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมดได้แก่ mean, median, minimum, maximum, standard error of mean, standard deviation

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

1. เกสัชจลนศาสตร์ของโพรปราโนลอลในอาสาสมัครสุขภาพดี
2. เกสัชจลนศาสตร์ของโพรปราโนลอลในผู้ป่วยโรคหัวใจ

1. เกสัชจลนศาสตร์ของโพรปราโนลอลในอาสาสมัครสุขภาพดี

อาสาสมัครสุขภาพดีถูกแบ่งตาม UGT1A6 genotype เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่ม wild type (UGT1A6*1/*1), heterozygote (UGT1A6*1/*2) และ homozygote (UGT1A6*2/*2) โดยมีรายละเอียดตามตารางที่ 1 จากการศึกษาพบว่าอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มมี clinical characteristics ไม่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มอาสาสมัครตาม UGT1A6 genotype

อาสาสมัครที่มี UGT1A6 genotype ต่างกัน	Single Nucleotide Polymorphism ของ UGT1A6		
	Ser7Ala	Thr181Ala	Arg184Ser
Wild-type (UGT1A6*1/*1)	T/T	A/A	A/A
Heterozygote (UGT1A6*1/*2)	T/G	A/G	A/C
Homozygote (UGT1A6*2/*2)	G/G	G/G	C/C

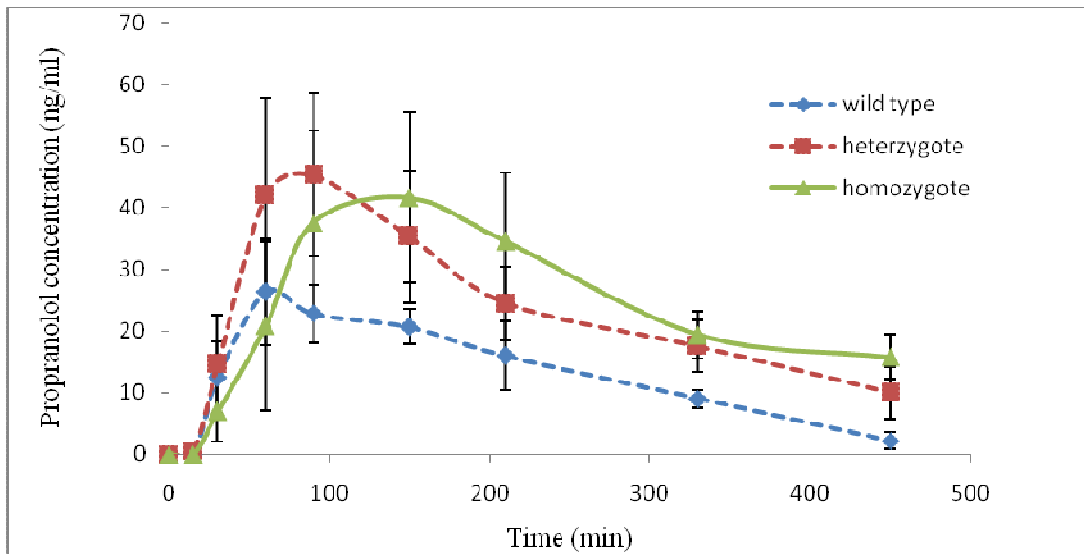
T=thymine, G=guanine, C=cytosine, A=adenine

ตารางที่ 2: Clinical characteristics ของ อาสาสมัครสุขภาพดี แบ่งตาม *UGT1A6* genotypes

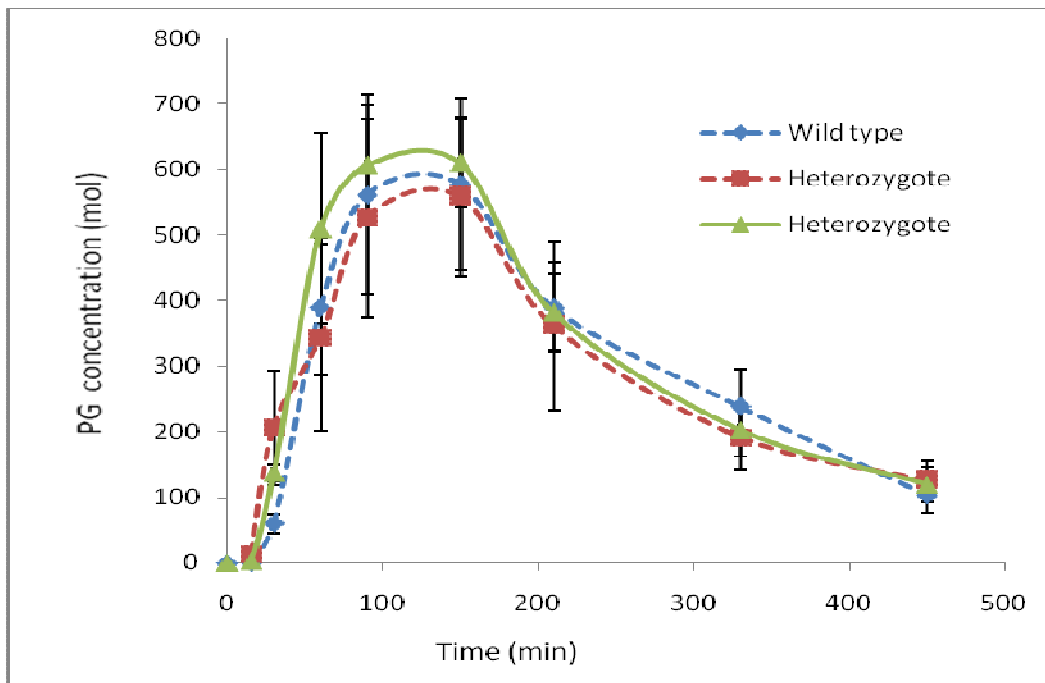
Characteristic	<i>UGT1A6</i> *1/*1	<i>UGT1A6</i> *1/*2	<i>UGT1A6</i> *2/*2
Subject (M/F)	3/2	2/3	2/1
Ages (years)	31.4±3.4	33.6±3.7	33.7±6.9
Weight (Kg)	58.2±4.2	61.8±2.2	54.3±0.6
Hb (12-18 g/dl)	13.9±0.6	14.0±0.5	14.0±1.0
Hct (30-54%)	40.3±1.6	40.3±1.0	41.1±1.0
ALP (50-136 U/L)	76.31±0.3	64.3±0.7	53.5±3.5
AST (15-37 U/L)	17.0±0.8	23.7±2.0	16.5±1.5
ALT (30-65 U/L)	31.3±4.1	47.7±9.9	25.5±0.5
Albumin (34-50 g/L)	46.6±2.1	51.6±0.3	48.1±6.9
TB (0.17.1 µmol/L)	15.7±1.2	16.6±0.8	19.7±0.2
DB (0-5 µmol/L)	4.4±0.1	4.4±0.1	3.8±0.2

Data are given as Mean±SEM Hb = haemoglobin, HCT = haematocrit, ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase, TP = total protein, Cho = cholesterol, TB = total bilirubin, DB = direct bilirubin,

หลังจากอาสาสมัครได้รับยาโปรปรานอลอล 40 mg ครั้งเดียว ได้ plasma profile ของ propranolol ดังรูปที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม wild-type กลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีระดับยา propranolol สูงกว่าในทุกจุดเวลาหลังจากยาขึ้นถึงจุดสูงสุดแล้วและมีพื้นที่ใต้กราฟที่แสดงถึงปริมาณยาในเลือดสูงกว่า ส่วนเวลาที่ถึงระดับสูงสุดของ propranolol-glucuronide จะพบหลังเวลาที่ถึงระดับสูงสุดของ propranolol แต่ plasma profile ของ propranolol-glucuronide ไม่แตกต่างกันในสามกลุ่ม (รูปที่ 2)



รูปที่ 1: plasma profile ของ propranolol หลังอาสาสมัครได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว



รูปที่ 2: plasma profile ของ propranolol-glucuronide (PG) หลังอาสาสมัครได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว

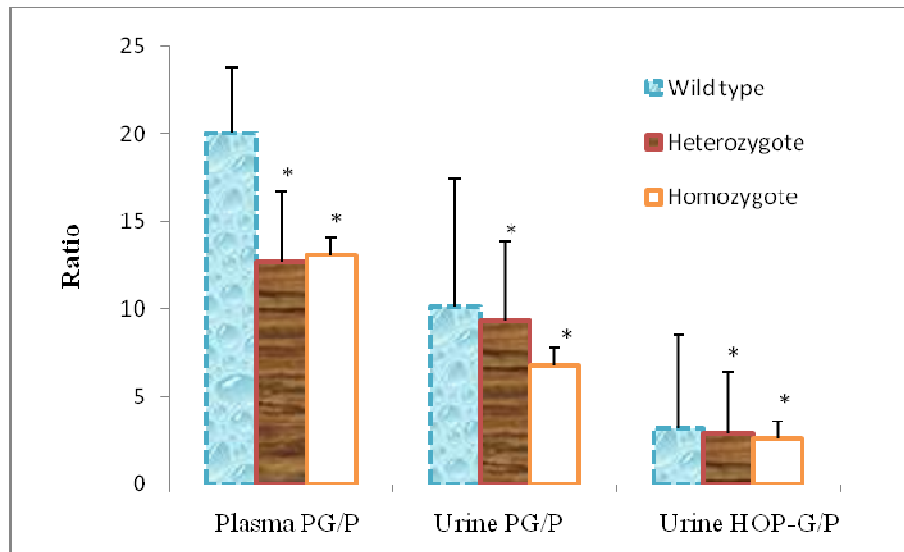
เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของกลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีความแตกต่างจากกลุ่ม wild-type เกือบทุกพารามิเตอร์ เช่น maximum concentration(C_{max}), Area under concentration time curve(AUC), elimination half-life($T_{1/2}$) สูงกว่าขณะที่มี clearance ต่ำกว่า ร้อยละของยา propranolol ที่ถูกขับออกทางปัสสาวะมีค่าเพิ่มขึ้นขณะที่มี propranolol-glucuronide น้อยลง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 : เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์หลังอาสาสมัครที่มี UGT1A6 genotype ต่างกันเมื่อได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว

Parameter	UGT1A6 *1/*1	UGT1A6 *1/*2	UGT1A6 *2/*2
C_{max} (ng/mL)	32.6±7.3	50.9±13.6*	43.5±11.3 *
T_{max} (min)	126±29.1	96±14.7*	170±22.7 *
$T_{1/2}$ (min)	125.2±15.5	145.2±28.3 *	123.5±5.6
AUC _{0-∞} (min.ng/mL)	100.3±17.6	177.6±49.5*	189.0±43.3 *
Ke (1/h)	0.37±0.04	0.30±0.04*	0.33±0.01
Vd/F (mL/kg)	7.2±1.4	6.3±3.0*	4.7±0.9 *
CL/F (mL/min/kg)	43.9±10.7	34.8±10.8 *	25.9±4.1 *
24 h urinary excretion			
- P (% dose)	0.16±0.07	0.17±0.02	0.18±0.02
- PG (% dose)	0.21±0.04	0.20±0.05	0.17±0.03

Data are presented as mean ± SEM , *=P<0.05 compared with wild-type,P=propranolol, PG=propranolol-glucuronide

ในการวิจัยนี้ได้ทำการวัด metabolites ของ propranolol ด้วย คือ propranolol-glucuronide(PG) และ 4-OH-propranolol-glucuronide (HOP-G) แต่ standard ของ metabolite ทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีขายจึงใช้วิธีวัดโดยเปรียบเทียบค่า Absorbance และ molecular weight แทน และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยพิจารณาจากสารตั้งต้นที่เท่ากัน จึงได้เปรียบเทียบสัดส่วนของ AUC ของ PG ทั้งในพลาสมาและปัสสาวะและ HOP-G ในปัสสาวะต่อ AUC ของ propranolol ในพลาสมา พบว่ากลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีสัดส่วนต่ำกว่ากลุ่ม wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมี polymorphism ของ UGT1A6 การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดประมาณร้อยละ 19-37 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 สัดส่วนของ metabolites และ propranolol ในเลือดและในปัสสาวะของอาสาสมัครที่มี UGT1A6 genotype ต่างกัน

2. เกสัชจลนศาสตร์ของโพรปราโนลอลในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียถูกแบ่งตาม UGT1A6 genotype เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่ม wild type (UGT1A6*1/*1), heterozygote (UGT1A6*1/*2) และ homozygote (UGT1A6*2/*2) ซึ่งมี clinical characteristic แตกต่างกันบ้างเช่นค่า alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total bilirubin, และ direct bilirubin เป็นต้น ตามตารางที่ 4

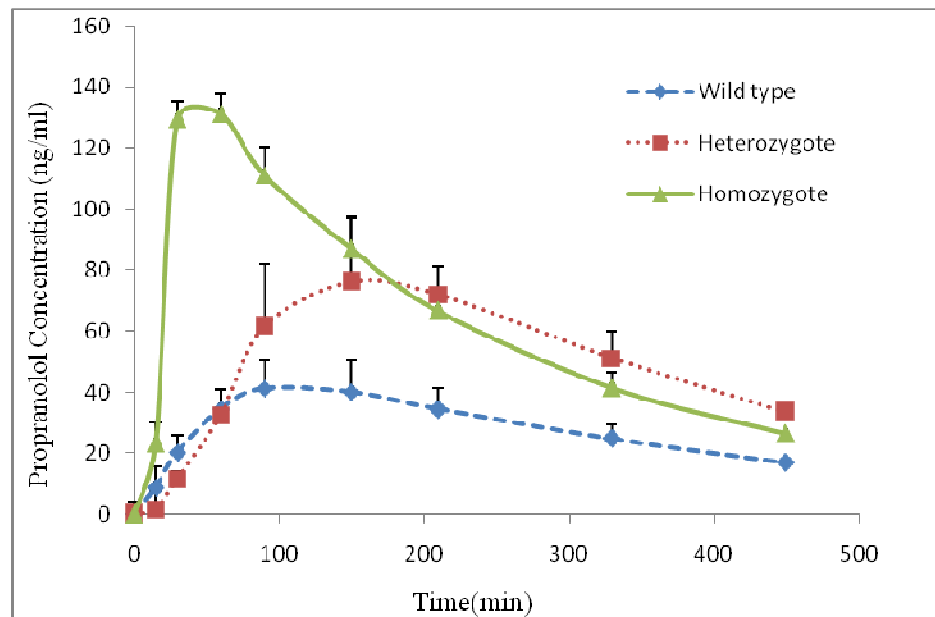
ตารางที่ 4: Clinical characteristics ของ ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย แบ่งตาม *UGT1A6* genotypes

Characteristic	<i>UGT1A6</i> *1/*1	<i>UGT1A6</i> *1/*2	<i>UGT1A6</i> *2/*2
Subject (M/F)	2/1	2/2	1/2
Ages (years)	42.6±6.1	40.6±4.3	45.0±3.2
Weight (Kg)	44.6±0.3	46.6±6.1	40.2±5.3
Hb (12-18 g/dl)	6.0±0.9	6.3±2.0	6.0±1.8
Hct (30-54%)	20.1±2.6	20.2±5.0	20.3±4.8
ALP (50-136 U/L)	35.6±3.4	84.3±32.6*	57.8±4.6*
AST (15-37 U/L)	29.0±4.5	88.3±23.0*	63.5±21.7*
ALT (30-65 U/L)	78.3±5.6	69.3±23.4	128.5±35.6*
Albumin (34-50 g/L)	42.5±0.1	38.2±5.0	42.5±6.7
TB (0.17.1 µmol/L)	2.5±0.5	4.3±1.2*	6.8±3.6*
DB (0-5 µmol/L)	0.4±0.004	0.6±0.16*	0.8±0.3*
BUN(mg/dl)	13.3±0.9	12.0±0.8	15.3±0.9
Creatinine(mmol/d)	0.56±0.50	0.60±0.08	0.40±0.05

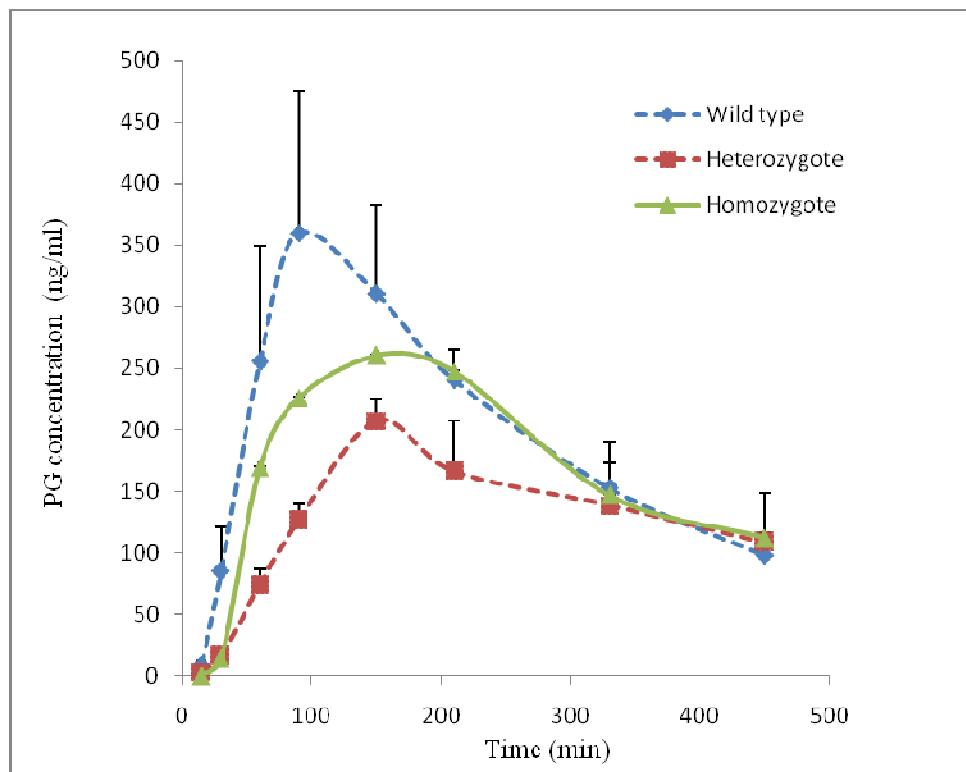
Data are given as Mean±SEM Hb = haemoglobin, HCT = haematocrit, ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase;

ALT = alanine aminotransferase, TP = total protein, Cho = cholesterol, TB = total bilirubin, DB = direct bilirubin, *=P<0.05 compared with wild-type

หลังจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้รับยาโพรปราโนลอล 40 mg ครั้งเดียวได้ plasma profile ของ propranolol ดังรูปที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม wild-type กลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีระดับยา propranolol สูงกว่าในทุกจุดเวลาหลังจากยาขึ้นถึงจุดสูงสุดแล้วและมีพื้นที่ใต้กราฟที่แสดงถึงปริมาณยาในเลือดสูงกว่า ส่วน plasma profile ของ propranolol-glucuronide(PG) จะเห็นว่า maximum concentration ของ PG เกิดในเวลาใกล้เคียงหรือหลัง maximum concentration ของ propranolol ในทุกกลุ่ม (รูปที่ 5)



รูปที่ 4: plasma profile ของ propranolol หลังผู้ป่วยได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว



รูปที่ 5: plasma profile ของ propranolol-glucuronide หลังผู้ป่วยได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว

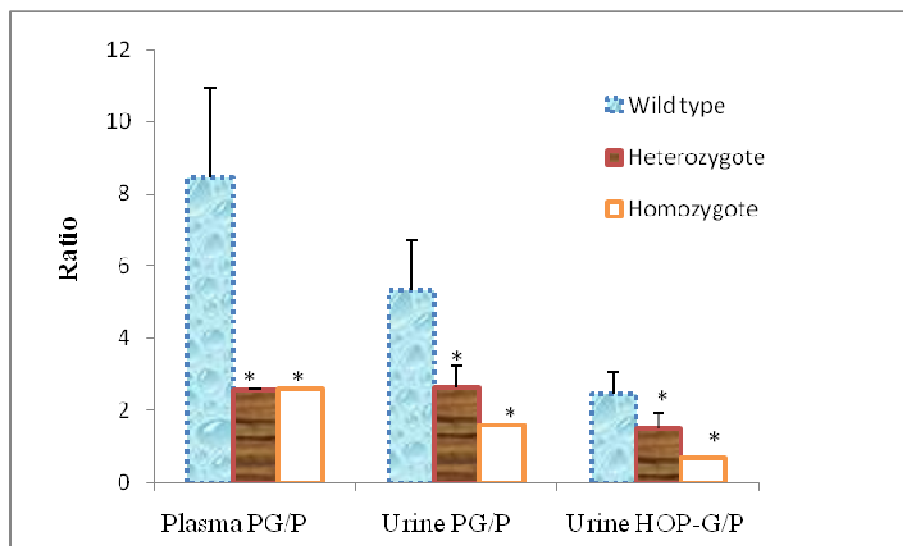
เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของกลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีความแตกต่างจากกลุ่ม wild-type เกือบทุกพารามิเตอร์เช่นเดียวกับที่พบในอาสาสมัครสุขภาพดี เช่นมี maximum concentration(C_{max}), Area under concentration time curve(AUC), elimination half-life($T_{1/2}$) สูงกว่าขณะที่มี clearance ต่ำกว่า ร้อยละของยา propranolol ที่ถูกขับออกทางปัสสาวะมีค่าเพิ่มขึ้นขณะที่มี propranolol-glucuronide น้อยลง ผู้ป่วยในกลุ่มที่เป็น homozygote ไม่สะดวกเก็บปัสสาวะให้ จึงสามารถเก็บได้เพียงรายเดียว (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 : เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ของผู้ป่วยโรคตับซีเมียที่มี UGT1A6 genotype ต่างกันเมื่อได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว

Parameter	UGT1A6 *1/*1	UGT1A6 *1/*2	UGT1A6 *2/*2
C_{max} (ng/mL)	43.7±9.4	77.1±17.5*	107.0±31.0*
T_{max} (min)	2.2±0.3	2.0±0.3	1.8±0.6
$T_{1/2}$ (min)	3.7±0.1	3.4±0.7	2.3±0.4*
AUC _{0-∞} (min.µg/mL)	210.0±58.4	564.7±78.3*	422.3±75.0*
Ke (1/h)	0.19±0.006	0.23±0.04*	0.30±0.05*
Vd/F (mL/kg)	4.7±1.0	2.2±0.3*	1.4±0.5*
CL/F (mL/min)	53.4±12.9	27.7±2.9*	22.9±75.9*
24 h urinary excretion			
- P (% dose)	0.011±0.002	0.012±0.003	0.001 #
- PG (% dose)	0.20±0.05	0.21±0.04	0.20 #

Data are presented as mean ± SEM , *= $P < 0.05$ compared with wild type, P=propranolol, PG=propranolol-glucuronide, # = n=1

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของ AUC ของ propranolol-glucuronide ทั้งในพลาสมาและปัสสาวะและเมตาโบไลต์ (4-OH-propranolol-glucuronide; HOP-G) ในปัสสาวะต่อ AUC ของ propranolol ในพลาสมา พบว่ากลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีสัดส่วนต่ำกว่ากลุ่ม wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมี polymorphism ของ UGT1A6 การทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่าในอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างเห็นได้ชัดคือประมาณร้อยละ 70-90 (รูปที่ 6)



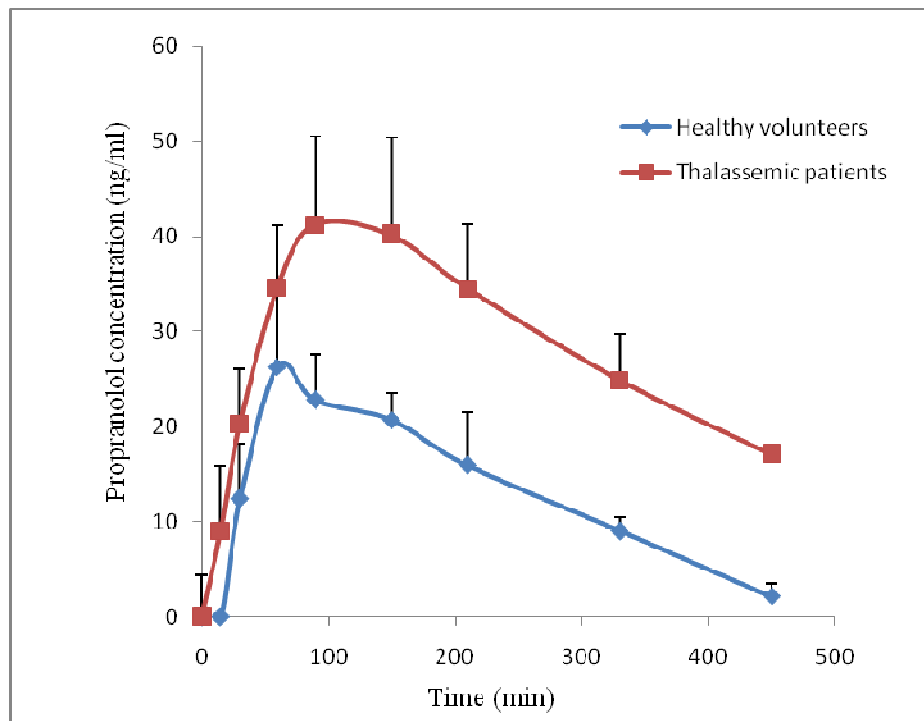
รูปที่ 6 สัดส่วนของ metabolites และ propranolol ในเลือดและในปัสสาวะของผู้ป่วยที่มี UGT1A6 genotype ต่างกัน

เพื่อประเมินคุณิทธิพลของพยาธิสภาพของผู้ป่วยว่ามีผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ของโพรปราโนลอลมากน้อยเพียงใด จึงได้เปรียบเทียบเภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์ในกลุ่มที่เป็น wild-type ของอาสาสมัครและผู้ป่วยพบว่าในผู้ป่วยมีระดับยาในเลือดสูงกว่าในทุกจุดของเวลา ค่า C_{max} , AUC , $T_{1/2}$ สูงขึ้นขณะที่ K_e และ V_d/F ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ(ตารางที่ 6 รูป 7)

ตารางที่ 6 : เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์หลังอาสาสมัครและผู้ป่วยที่เป็น wild-type ของ UGT1A6 เมื่อได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียว

เภสัชจลนศาสตร์พารามิเตอร์	อาสาสมัคร	ผู้ป่วย
C_{max} (ng/mL)	32.6±7.3	43.7±9.4*
T_{max} (min)	126±29.1	132±18.0
$T_{1/2}$ (min)	125.2±15.5	222±6.0*
$AUC_{0-\infty}$ (min.µg/mL)	100.3±17.6	210.0±58.4*
K_e (1/h)	0.37±0.04	0.19±0.006*
V_d/F (mL/kg)	7.2±1.4	4.7±1.0*
CL/F (mL/min/kg)	43.9±10.7	53.4±12.9
24 h urinary excretion		
- P (% dose)	0.16±0.07	0.011±0.002*
- PG (% dose)	0.21±0.04	0.20±0.05

Data are presented as mean ± SEM , *= $P < 0.05$ compared with wild type, P=propranolol, PG=propranolol-glucuronide



รูปที่ 7: plasma profile ของ propranolol ของอาสาสมัครและผู้ป่วยที่เป็น wild-type ของ UGT1A6

บทวิจารณ์

ผลการทดลองภายหลังจากอาสาสมัครได้รับ propranolol 40 mg ครั้งเดียวพบว่าในกลุ่มอาสาสมัครที่เป็น heterozygote และ homozygote มีค่าเภสัชจลนศาสตร์ พารามิเตอร์ หลายอย่างที่แตกต่างกันไปจากกลุ่มที่เป็น wild-type เช่น Cmax, AUC ที่สูงขึ้น ขณะที่ Ke และ Clearance ต่ำลง ทำให้ระดับยา propranolol ยังคงค้างอยู่ในกระแสเลือดสูงและนานขึ้นค่าครึ่งชีวิตของยาจะนานขึ้น (ตารางที่ 5) โดยทั่วไป ปริมาณของ UGT1A6 expression จะมีความแตกต่างกันในรายบุคคลอันเนื่องจากหลายปัจจัยเช่น การได้รับสิ่งกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ต่างกันด้วย (1) แต่เมื่อจัดแบ่งกลุ่มตาม UGT1A6 genotype แล้ว ผลของ UGT1A6 polymorphism (UGT1A6*2) ยังแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนสะท้อนให้เห็นว่า UGT1A6*2 มีบทบาทสำคัญต่อ pharmacokinetics ของยา propranolol

ในกระบวนการเปลี่ยนแปลง propranolol ยาจะถูกเปลี่ยนผ่านทางปฏิกิริยา Oxidation ได้ 4-OH-propranolol (HOP) ซึ่งเป็น active metabolite หลังจากนั้นจะถูกทำให้หมดฤทธิ์ผ่านกระบวนการ glucuronidation ได้เป็น 4-OH-propranolol-glucuronide (HOP-G) ในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถคำนวณค่าความเข้มข้นของ HOP ได้เนื่องจากไม่มี standard ข่ายจึงใช้วิธีการวัดค่า absorbance แทน และเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่สารตั้งต้นคือ propranolol ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเท่ากัน จึงได้วิเคราะห์ในรูปแบบของสัดส่วนของ HOP-G ต่อ ปริมาณ propranolol ในเลือด และพบว่ากลุ่ม heterozygote และกลุ่ม homozygote มีสัดส่วนดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่ม wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) อันสะท้อนให้เห็นว่าอาจมี HOP อยู่ในกระแสเลือดสามารถออกฤทธิ์ได้นานขึ้น และแสดงให้เห็นว่าเมื่อมี UGT1A6*2 การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Cuotti et al ในปี 1997 ที่แสดงให้เห็นว่า recombinant UGT1A6*2 allozyme ทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง(2) ในทางตรงข้ามมีบางการศึกษาใน *in vitro* ได้ผลตรงกันข้ามเช่นงานของ Krishnaswamy et al (3) และ Nagar et al. (4) พบว่า UGT1A6*2 ทำให้เอนไซม์ทำงานได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม Mackenzie et al ได้เสนอความคิดเห็นว่าเนื่องจาก UGT1A6 เป็น เอนไซม์ที่ฝังตัวอยู่ใน cell membrane เมื่อจับกับ substrate แล้วจะมี configuration ที่เหมาะสมจึงจะทำงานได้เต็มที่ การศึกษาใน *in vitro* จึงมีข้อจำกัดเรื่องนี้ ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาใน *in vitro* อาจไม่ไปในทางเดียวกันกับการศึกษาใน *in vivo* (5)

ในส่วนของผู้ป่วยได้ผลคล้ายกับในอาสาสมัครคือเห็นบทบาทของ UGT1A6*2 อย่างชัดเจนแต่เมื่อเปรียบเทียบค่าเภสัชจลนศาสตร์ พารามิเตอร์ในอาสาสมัครและผู้ป่วยที่เป็น wild-type เหมือนกันแล้วพบว่า ระดับยาที่อยู่ในเลือดของผู้ป่วยจะสูงกว่าในอาสาสมัครในทุกจุดเวลา (รูปที่7) ส่งผลให้เภสัชจลนศาสตร์ พารามิเตอร์ หลายอย่างแตกต่างกันไปด้วยเช่น ค่าครึ่งชีวิตที่ยาวขึ้น ปริมาณยาในกระแสเลือดมีมากขึ้นขณะที่การขจัดยาลดลง (ตารางที่ 6) ทั้งนี้อาจเนื่องจากประสิทธิภาพของ UGT1A6 ในผู้ป่วยลดลงมากกว่าในอาสาสมัคร นอกจากนี้ภาวะชืดเรื้อรังในผู้ป่วยนำมาซึ่งกระบวนการชดเชยของร่างกายหลายอย่างเช่นมี cardiac output เพิ่มขึ้น มี rapid turnover ของการหมุนเวียนเลือดทำให้มี blood flow ไปที่ตับมีผลมาก ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบมากต่อการเปลี่ยนแปลงยา propranolol

อย่างไรก็ดีแม้ว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมี เลือดไปเลี้ยงที่ตับมากกว่าเนื่องจากพยาธิสภาพของโรค (6) ซึ่ง โอกาสที่ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงน่าจะมากกว่าดังเช่นในการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าการขจัดยา antipyrine และ paracetamol เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (7,8) ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของยาดังกล่าวสั้นลง แต่ในการวิจัยครั้งนี้กลับเห็นว่ายา propranolol ถูกเปลี่ยนแปลงได้น้อยกว่า แสดงว่า UGT1A6*2 เป็น strong modifier ในการเปลี่ยนแปลง propranolol ได้มากกว่าอิทธิพลของพยาธิสภาพของผู้ป่วย

จากคุณสมบัติ ของเอนไซม์ UGT1A ที่มี overlapping substrate พบว่า propranolol นอกจากจะเป็น substrate ของ UGT1A6 แล้วยังสามารถเป็น substrate ของ เอนไซม์ isoform อื่นๆ เช่น UGT1A9 ได้อีกด้วย ดังนั้นบทบาทของ UGT1A9 polymorphism จึงเป็นสิ่งที่น่าจะนำมาพิจารณาต่อไป (9)

จากผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นบทบาทสำคัญของ UGT1A6*2 ที่เข้ามากกระทบต่อเภสัช จลนศาสตร์ของ propranolol ทั้งในอาสาสมัครและผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยผู้ป่วยจะมีประสิทธิภาพของ เอนไซม์ลดลงมากกว่าในอาสาสมัครส่งผลให้มีระดับยาในเลือดสูงกว่า ค่าครึ่งชีวิตของยานานขึ้นอาจ ส่งผลให้ยาออกฤทธิ์นานขึ้น ผลการวิจัยนี้อาจใช้เป็นประโยชน์ในการปรับขนาดยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยต่อไป

หนังสืออ้างอิง

1. Bock KW, Köhle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol.* 2005;400:57-75.
2. Ciotti M, Marrone A, Potter C, Owens IS. Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 485–95.
3. Krishnaswamy S, Hao Q, Al-Rohaimi A, Hesse LM, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 pharmacogenetics. II. Functional impact of the three most common nonsynonymous UGT1A6 polymorphisms (S7A, T181A, and R184S). *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 1340–6.
4. Nagar S, Zalatoris JJ, Blanchard RL. Human UGT1A6 pharmacogenetics: identification of a novel SNP, characterization of allele frequencies and functional analysis of recombinant allozymes in human liver tissue and in cultured cells. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 487–99.
5. Predicting human drug glucuronidation parameters: application of in vitro and in silico modeling approaches. Miners JO, Smith PA, Sorich MJ, McKinnon RA, Mackenzie PI. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:1-25. Review.
6. Blendis LM, Modell CB, Bowdler AJ and Williams R. Some effects of splenectomy in thalassemia major. *Br J haematol* 1974; 28: 77.
7. Rifkind AB, Canale V, New MI. Antipyrine clearance in homozygous beta-thalassemia. *Clin Pharmacol Ther* 1976; 20(4): 476-483.
8. Tankanitlert J, Howard TA, Temsakulphong A, Sirankapracha P, Morales NP, Sanvarinda Y, Fucharoen P, Ware RE, Fucharoen S, Chantharaksri U. A Pharmacokinetic study of paracetamol in Thai beta-thalassemia/Hb E patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006; 62: 743-748
9. Ethell BT, Ekins S, Wang J, Burchell B. Quantitative structure activity relationships for the glucuronidation of simple phenols by expressed human UGT1A6 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos.* 2002 Jun;30(6):734-8

ภาคผนวก

I. การพัฒนาวิธีวัดระดับยาด้วย HPLC

1. HPLC condition

HPLC consisted of a waters 600 pump, fluorescence detector waters 966, and autosampler injector waters 717 and Water symmetry C18 column (3.9 nm x150 cm) (Water Corp.,Milford, Mass., USA). The excitation wavelength was set at 240 nm and the emission wavelength at 410 nm. The mobile phase consisted of 100 mM potassium dihydrogen phosphate, pH 3, and methanol at the volume ratio of 90:10 buffer to methanol. The flow rate was 1.0 ml/min. Peak area were integrated with Millenium 3.2 software (Water Corp.,Milford, Mass., USA). (Waters).

2. Calibration curves

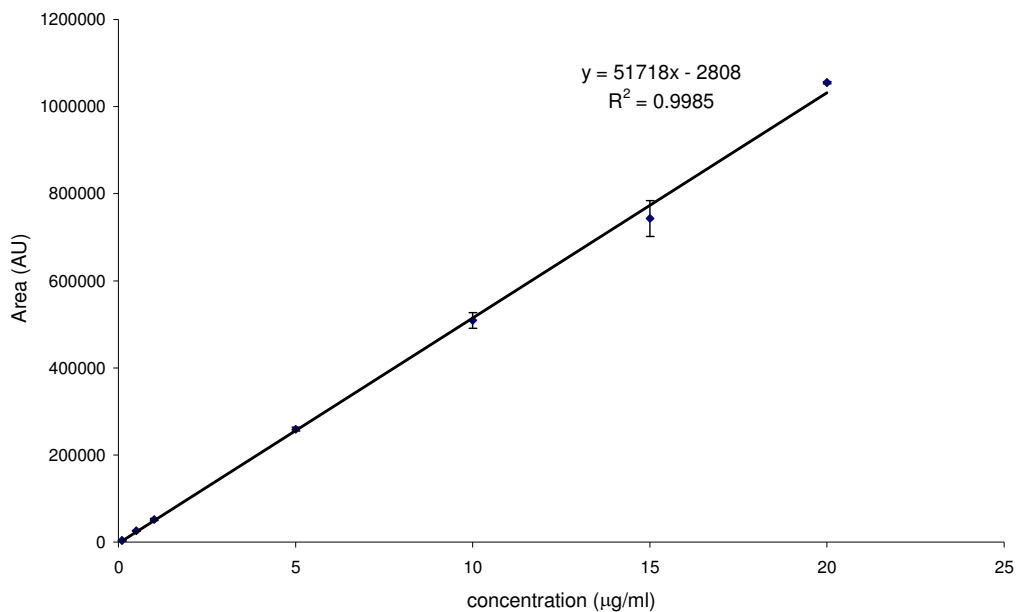
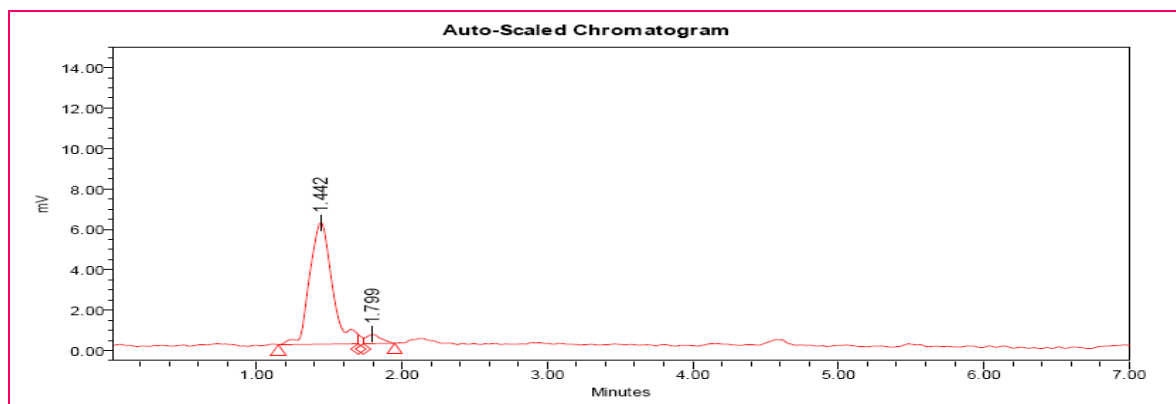


Figure 1 : The calibration curves of propranolol. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

3. Separation

A



B

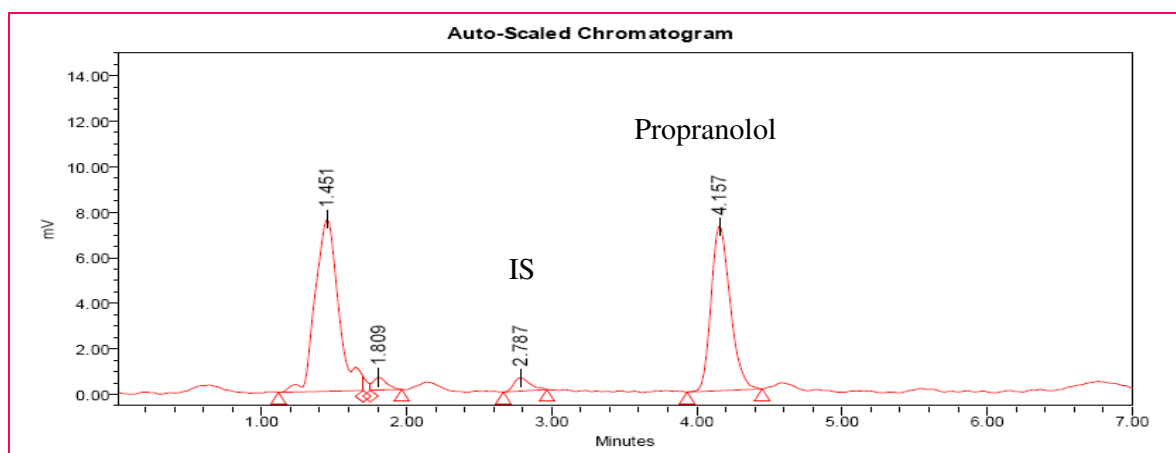


Figure 2 : Chromatograms of (A) blank plasma, (B) 10 µg/mL of standard propranolol and internal standard (IS)

4. The precision

Table 1 : The precision of propranolol analysis in plasma.

Standard concentration (ng/mL)	Intra-day assay (ng/mL)	% of deviation	CV (%)	Inter-day assay (ng/mL)	% of deviation	CV (%)
1	1.04 ± 0.01	4%	1.29	1.07 ± 0.01	7%	2.86
10	10.03 ± 0.19	0.3%	1.92	10.17 ± 0.25	1.7%	2.46
20	20.30 ± 0.65	1.5%	3.19	19.79 ± 0.62	1.1%	3.16

Values are expressed as mean ± SD (n=3)

5.Recovery

Table 2 : Recovery of the analytical procedure for PCM in plasma.

Standard concentration (ng/mL)	Peak Height		% Recovery
	Drug in buffer	Drug in plasma	
0.01	464 ± 9.1	406 ± 8.9	87.5 ± 8.0
100	3823 ± 4.1	3773±6.1	98.7 ± 5.5
200	7494 ± 1.7	7252 ±1.2	96.8 ± 1.94

Values are expressed as mean ± SD (n=3)

II Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

2.1. GC/MC condition

Substance separation was achieved using a HP 6890 gas chromatograph from *Agilent Technologies (USA)*. fitted with a 25 m Ultra-1 capillary column from HP from *Agilent Technologies (USA)* with 0.2 mm internal diameter and 0.11 mm film thickness. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 0.9 mL/min. The initial column temperature was 120 C rising by 25 C/min to 320 C for 3 minutes. The injector temperature was 280 C. Electron impact mass spectra were recorded with a mass-selective detector (MSD 5973) from *Agilent Technologies (USA)* The temperature of the MSD transfer line was 280_C, and the ionization

voltage was 70 eV. For propranolol and 4-OH-P 1 target ion used for quantification and 2 qualifier ions used to confirm the presence of the compounds were selected for SIM measurement. The selection criteria were ion specificity, abundance, and the absence of interfering ions of the same m/z ratio in the chromatogram: for propranolol, m/z = 284, 129 and 427; for 4-OH-P, m/z = 284, 129 and 515,; for penbutolol;the internal standard, m/z = 86 , 348 and 363. The retention time of propranolol, 4-OH-P and penbutolol were 5.85,6.55 and 5.22 min, respectively.

2.2 Precision and accuracy

INTRA-ASSAY PRECISION

CONC. ng/mL	CONC. CALC. ng/mL	STD\$ ng/mL	CV (%)	N	n° ASSAY
15	16.39	0.96	5.88	5	1
150	164.81	5.26	3.19	5	1
400	399.34	5.83	1.46	5	1

INTRA-ASSAY ACCURACY

CONC. ng/mL	CONC. CALC. ng/mL	ERROR ng/mL	ERROR (%)	N	n° ASSAY
15	16.39	1.39	9.27	5	1
150	164.81	14.81	9.88	5	1
400	399.34	-0.66	-0.17	5	1

INTER-ASSAY PRECISION

CONC. ng/mL	CONC. CALC. ng/mL	STD\$	CV (%)	N	n° ASSAY
15	16.96	1.08	6.38	11	3
150	171.00	7.21	4.22	11	3
400	407.34	15.50	3.80	11	3

INTER-ASSAY ACCURACY

CONC. ng/mL	CONC. CALC. ng/mL	ERROR	ERROR (%)	N	n° ASSAY
15	16.96	1.96	13.10	11	3
150	171.00	21.00	14.00	11	3
400	407.34	7.34	1.84	11	3

2.3 Limit of detection = 10 ng/ml

2.4 Limit of qualification = 15 ng/ml

III Output จากโครงการวิจัย

Tankanitlert, J., Yamanont, P., Rodrat, S., Morales, NP. The UGT1A6*2 genotype-related to the pharmacokinetics of propranolol in healthy volunteers:preliminary data. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **2009**; 105 supplement 1:80 Impact factor 3.128

IV Abstract 2 เรื่อง สำหรับการตีพิมพ์ในวารสาร British Journal of Clinical Pharmacology และ Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology

Important of UDP-glucuronosyltransferase1A6*2 on pharmacokinetics of propranolol in β -thalassemia /Hb E

Jeeranut Tankanittert¹, Noppawan Phumala Morales²

¹Department of Pharmacology,Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand, jeeranuts@yahoo.com

²Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok Thailand

Abstract

Pathological changes in patient with thalassemia which are consequences of chronic anemia, requires increased cardiac output and eventually may produce hypoxia, hypertension and congestive heart failure. Propranolol is a non selective beta-adrenergic receptor blocking drug widely use for the treatment of cardiovascular diseases. The contribution of presystemic hepatic metabolism to the highly variable oral bioavailability of propranolol leads to different therapeutic effect. The drug was metabolized by oxidation, N-dealkylation and glucuronidation pathway. The oxidation product ; active metabolite (4-OH propranolol) was conjugated with glucuronide activated by UGT 1A6 to produce 4-OH propranolol-glucuronide. To examine the effects of *UGT1A6*2* on the pharmacokinetics of propranolol in thalassemic patients, ten thalassemic patients with different UGT1A6 genotype determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis including wild type; *UGT1A6*1*1*, heterozygote; *UGT1A6*1*2* ; and homozygote; *UGT1A6*2*2* were enrolled the study. After an overnight fast, the subjects received a single oral dose of 40 mg propranolol. Blood samples were collected before and at different time points after dosing. Urine output was collected for 24 hour. Propranolol (P) and propranolol-glucuronide (PG) concentrations in plasma and urine were determined using a validated high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry method (GC/MS). 4-OH-propranolol glucuronide (HOP-G) in urine samples were also determined by GC/MS. Compared to wild type group, thalassemic patients with heterozygote and homozygote showed the statistically significant increase of area under concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$), and maximum concentration (C_{max}) of propranolol and decrease of volume of distribution (V_d/F), and clearance (Cl/F). Lower PG/P and HOP-G/P plasma and urine ratio were noted. These results demonstrated that the *UGT1A6*2* appeared to exert statistically significant effects on the single-dose pharmacokinetics of propranolol in thalassemic patients. The *UGT1A6*2* decreased the enzyme activity resulting in higher plasma concentration and longer half-life of propranolol. The result from this study may useful for dose adjustment in the patient .

Key word : Propranolol, Thalassemia, UGT1A6, Pharmacokinetics

Influence of UDP-glucuronosyltransferase1A6*2 on pharmacokinetics of propranolol in healthy volunteers

Jeeranut Tankanittert¹, Noppawan Phumala Morales²

¹Department of Pharmacology,Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand, jeeranuts@yahoo.com

²Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok Thailand

Abstract

Propranolol is a non selective beta-adrenergic receptor blocking drug widely use for the treatment of cardiovascular diseases. The contribution of presystemic hepatic metabolism to the highly variable oral bioavailability of propranolol leads to different therapeutic effect. The drug was metabolized by oxidation, N-dealkylation and glucuronidation pathway. The oxidation product ; active metabolite (4-OH propranolol) was conjugated with glucuronide activated by UGT 1A6 to produce 4-OH propranolol-glucuronide. To examine the effects of *UGT1A6* polymorphisms(*UGT1A6*2*) on the pharmacokinetics of propranolol in healthy volunteers, thirteen healthy volunteers with different *UGT1A6* genotype determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis including wild type; *UGT1A6*1*1*, heterozygote; *UGT1A6*1*2* ; and homozygote; *UGT1A6*2*2* were enrolled the study. After an overnight fast, the subjects received a single oral dose of 40 mg propranolol. Blood samples were collected before and at different time points after dosing. Urine output was collected for 24 hour. Propranolol (P) and propranolol-glucuronide (PG) concentrations in plasma and urine were determined using a validated high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry method (GC/MS). 4-OH-propranolol glucuronide (HOP-G) in urine samples were also determined by GC/MS. Compared to wild type group, the healthy volunteers with heterozygote and homozygote showed the statistically significant increase of area under concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$), and maximum concentration (C_{max}) of propranolol and decrease of volume of distribution(V_d/F), and clearance (Cl/F). Lower PG/P and HOP-G/P plasma and urine ratio were observed. In corresponding to the plasma propranolol level of heterozygous and homozygous subjects, significant change in blood pressure and pulse rate were observed at almost time point after dosing. These results demonstrated that the *UGT1A6*2* appeared to exert statistically significant effects on the single-dose pharmacokinetics of propranolol in healthy volunteers. The *UGT1A6*2* decreased the enzyme activity resulting in higher plasma concentration and longer half-life of propranolol.

Key word : Propranolol, Thalassemia, *UGT1A6*, Pharmacokinetics