บทที่ 1 บทนำ

ไตเป็นอวัยวะที่สำคัญในการกำจัดยาและสารต่างๆออกจากร่างกายทางปัสสาวะทั้งในกระบวนการกรองผ่านหลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลัส และกระบวนการขับทิ้งสารผ่านท่อไตฝอย ในกระบวนการขับทิ้งดังกล่าวอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งบนเยื่อบุผิวหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน โปรตีนขนส่งนี้จึงมีความสำคัญต่อประสิทธิผลการรักษา การสะสมของยาในร่างกาย ตลอดจนอาการไม่พึงประสงค์ของยาต่างๆ เป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันความสนใจเกี่ยวกับการตอบสนองต่อยาที่ต่างกันจึงมุ่งไปที่กระบวนการขับทิ้งของยาออกไปกับปัสสาวะจากการทำงานของตัวขนส่งสารต่าง ๆ เหล่านี้

ยาที่รับประทานเข้าไปเมื่อดูดซึมแล้วส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ในรูปประจุลบหรือประจุบวก เมื่อผ่านไปที่ไตจะถูกขับทิ้งออกไปกับปัสสาวะผ่านโปรตีนขนส่งที่สำคัญคือ Organic anion transporter (OATs) และ Organic cation transporter () ยาที่ถูกขับทิ้งโดย OATs เช่น β-lactam antibiotics, diuretics, NSAID, antiviral drugs, antidiabetic และ antineoplastic agents เป็นต้น (1) ส่วนยาที่ถูกขับทิ้งโดย OCTs เช่น ยากลุ่ม β-Blocker, anti-Parkinson, antiviral drug, antibiotic และ anti-hypertensive drug และ HIV protein inhibitor เป็นต้น (1, 2) ตัวอย่างยาและสารยับยั้งการทำงานของ OCT2 ดังแสดงในตารางที่ 1 (3)

มีรายงานเกี่ยวกับเภสัชจลน์พลศาสตร์ที่แตกต่างกันในเพศหญิงและชายทำให้ปริมาณหรือความเข้มข้นของยาในพลาสมาตลอดจนการตอบสนองต่อยาที่ได้รับแตกต่างกัน ส่วนหนึ่งอาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของ drug metabolizing enzyme และขึ้นอยู่กับว่ายานั้นถูกขับทิ้งออกไปกับปัสสาวะได้มากน้อยเพียงใด (4) จากการศึกษาโดยใช้ DNA microarray technology สำรวจยีนในหนูทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่ามียีนที่ต่างกันมากมาย ไม่เฉพาะยีนในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ แต่รวมไปถึงยีนในไตและตับ (5) ทั้งยังพบว่ายีนที่ต่างกันในไตและตับของทั้งสองเพศเกี่ยวข้องกับ drug transporters (5-8) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าการตอบสนองต่อยาที่ต่างกัน น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับจำนวนและ/หรือประสิทธิภาพการทำงานที่ต่างกันของ OATs และ OCTs ในเพศหญิงและ

ชายมีผลทำให้ระดับยาในพลาสมาต่างกัน ทั้งนี้ปัจจุบันการศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนเพศต่อจำนวนและประสิทธิภาพการทำงานของ Organic ion transporters ทั้ง OATs และ OCTs มีไม่มากนัก (6,7)

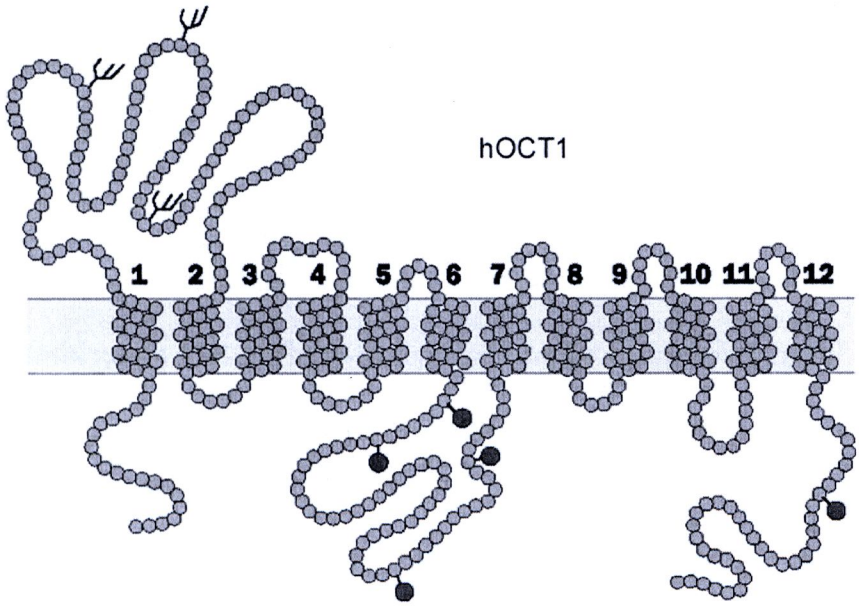
ตารางที่ 1. Substrates and Inhibitors of OCTs family (ดัดแปลงจาก Lee & Kim, 2004)

Name	Substrates	Inhibitors/Drugs
OCT1 (SLC22A1) Human	MPP^+, TEA Drugs: acylclovir, ganciclovir	Choline,creatinine, corticosterone,desipramine, dopamine, β-estradiol,nicotine, NMN, progesterone Drugs: anti-HIV drugs, acebutolol,amantadine, cimetidine, clonidine, disopyramide, midazolam, procainamide, prazosin, quinine, quinidine, vecuronium, verapamil
OCT1 (Slc22a1) Rat	TEA, MPP^+, NMN, monoamine neurotransmitters Drugs:AZT,cimetidine,cladribine, cytarabine, D-tubocurarine	Corticosterone, guanidine, histamine, nicotine, o-methylisoprenaline Drugs: clonidine, desipramine, quinine, quinidine,mepiperphenidol, procainamide, reserpine
OCT2 (SLC22A2) Human	TEA, MPP^+, NMN, agmatine, monoamine neurotransmitters Drugs: amantadine, memantine	Corticosterone, o-methylisoprenaline, progesterone Drugs:despramine, mepiperphenidol, phenoxybenzamine, procainamide, quinine
OCT2 (Slc22a2) Rat	TEA, MPP^+, adrenaline, agmatine, creatinine, monoamine neurotransmitters Drugs: amantadine, cimetidine, memantine	Corticosterone, dexoycorticosterone, β-estradiol, NMN, progesterone, monoamine neurotransmitters Drugs: cimetidine, cisplatin, procainamide, quinine
OCT3 (SLC22A3) Human	MPP^+, guanidine, monoamine neurotransmitters Drugs: cimetidine, tyramine	Corticosterone, fl-estradiol, MPTP, o-methylisoprenaline, progesterone Drugs: clonidine, desipramine, imipramine, phenoxybenzamine, prazosin, procainamide
OCT3 (Slc22a3) Rat	MPP^+, TEA, guanidine	Monoamine neurotransmitters,corticosterone, dexoycorticosterone,β-estradiol,NMN, progesterone, testosterone Drugs: amphetamine, cimetidine, clonidine, desipramine,methamphetamine

NMN = N-methylnicotinamide MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine MPP = Methyl-4-phenyl pyridinium acetate

Organic Cation Transporters

OCTs เป็นโปรตีนขนส่งที่มีคุณสมบัติเป็น polyspecific ซึ่งหมายความว่าสามารถขนส่งสารที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันได้ OCTs อยู่ใน SLC22 family ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ OCT1-3, OAT1-6, urate transporter, OCTN1-2 และ CT2 ลักษณะร่วมของโปรตีนขนส่งในกลุ่มนี้ คือการมี 12 transmembrane domains (TMD) และมี extracellular loop ขนาดใหญ่อยู่ระหว่าง TMD 1 และ 2 รวมทั้งมี intracellular loop ที่มีตำแหน่ง phosphorylation อยู่หลายตำแหน่ง อันแสดงถึงการควบคุมผ่านกระบวนการ signaling ใน เซลล์

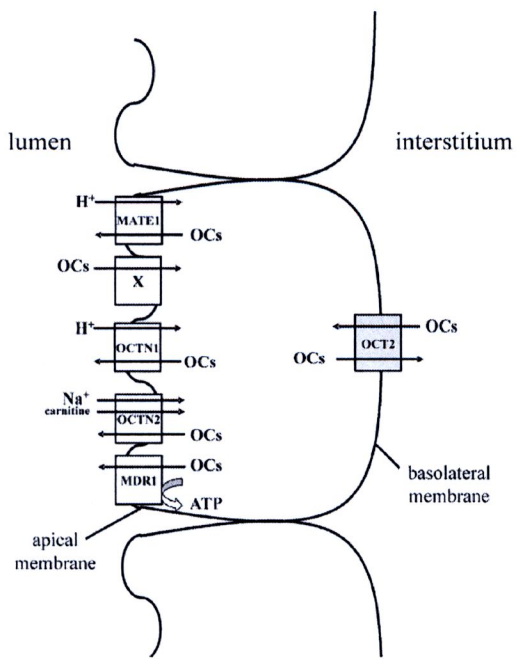


รูปที่ 1. โครงสร้างของโปรตีนขนส่งประจุบวก (organic cation transporter) (9)

OCT2 ได้ถูกพบครั้งแรกในไตหนูขาวโดย Okuda และคณะในปี 1966 (10) และต่อมามีการค้นพบในมนุษย์ หมู หนู และกระต่าย (11,12) สารที่ขนส่งโดย OCT2 ส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ประจุบวกหรือสารที่มีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อน และยังมีรายงานว่ามีสารที่ไม่มีประจุสามารถผ่านการขนส่งโดย OCT2 ได้ ตัวอย่างของสารเหล่านี้ได้แก่ เช่น monoamine neurotransmitter, acetylcholine (2)

การศึกษาโดย northern blot analysis แสดงให้เห็นว่า OCT2 พบมากที่สุดในไต และยังพบใน thymus, adrenal gland, neurons และ choroid plexus (2, 13) โดยมีรายงานว่า hOCT2 และ mOCT2 มีการแสดงออกในแบบแผนเดียวกัน (11,12) ที่ไต OCT2 จะอยู่ที่ basolateral membrane ของ proximal tubules (S2 และ S3 segments) (12,13) และจากการศึกษาการขนส่งสาร Tetraethylammonium (TEA) ซึ่งเป็นตัวแทนของสารประจุบวกใน isolated rabbit renal proximal tubules พบว่าTEA uptake ใน S2 segment เกิดผ่าน OCT2 (14) เป็นส่วนใหญ่

กระบวนการขับทิ้งสารที่ proximal tubule เป็นกระบวนการที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเกิดทางด้าน basolateral โดยเป็นกระบวนการขนส่งผ่าน OCT2 แบบ electrogenic facilitate diffusion ขั้นตอนที่สองเป็นการขนส่งด้าน apical โดยอาศัย transporter หลายชนิดดัง รูปที่ 2 กระบวนการ transcellular secretion ของ organic cation ที่ proximal tubule สำหรับ organic cation ประเภท 1 ซึ่งมีขนาดเล็ก จะเข้าเซลล์โดยอาศัย potential difference ภายในเซลล์ที่เป็นลบ และออกจากเซลล์ด้าน apical โดยแลกเปลี่ยนกับ H^+ ส่วน organic cation ประเภท 2 ที่มีขนาดใหญ่ จะออกจากเซลล์ผ่านทาง MDR1 หรือ P-glycoprotein นอกจากนั้นทางด้าน apical membrane ยังพบว่ามี multidrug and toxic compound extrusion 1 (MATE1) เกี่ยวข้องด้วย



รูปที่ 2. แสดงการขนส่งสารอินทรีย์ประจุบวกที่ proximal tubule (15)

กระบวนการควบคุมการทำงานของ OCT2

OCT2 จะมีการแสดงออกที่ไตเป็นส่วนใหญ่ และมีความสำคัญต่อกระบวนการขับทิ้งของสารอินทรีย์ประจุบวก แต่กระบวนการควบคุมการทำงานของ OCT2 ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก เนื่องจากมีรายงานการควบคุมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ model ที่ใช้ทดลองและสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่นำ OCT มาศึกษา โดยสามารถแบ่งเป็นการควบคุมระยะสั้น และการควบคุมระยะยาว

การควบคุมระยะสั้น

จากการที่โครงสร้างของ OCT มีตำแหน่งที่สามารถเกิดกระบวนการ phosphorylation อยู่หลายตำแหน่ง ทำให้เชื่อว่า protein kinase สามารถควบคุมการทำงานของ OCT2 ได้ การกระตุ้น protein kinase A (PKA) ลดการขนส่งใน OCT2 ของมนุษย์ (16) การกระตุ้น protein kinase C (PKC) ไม่มีผลต่อ OCT2 ของมนุษย์ แต่มีผลเพิ่มการทำงานของ OCT2 ของหนูขาว (17) OCT2ของมนุษย์ถูกยับยั้งได้ด้วย cabachol (muscarinic acetylcholine receptor agonist) และCa^{2+}–calmodulin complex กระตุ้นการแสดงออกของ OCT1, OCT2 และ OCT3 ในมนุษย์ (16) และมีรายงานว่า Nitric Oxide มีผลลดการทำงานของ OCT2 (18)

การควบคุมระยะยาวโดยฮอร์โมนเพศ

โดยมีรายงานว่าฮอร์โมนเพศจัดเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในสิ่งมีชีวิตได้โดยทาง classical pathway (genomic pathway) ในกระบวนการนี้ฮอร์โมนเพศจะผ่านเข้าเซลล์และจับกับตัวรับที่อยู่ในเซลล์ และจะกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการ transcription หรือ translation ของยีนเป้าหมาย ซึ่งจะส่งผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน หรือออกฤทธิ์โดยผ่าน acute effect (non–genomic pathway) ซึ่งจะแสดงผลอย่างรวดเร็วโดยไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรตีน และสามารถแสดงฤทธิ์ได้ในภาวะที่มีตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยเชื่อว่าสเตียรอยด์ฮอร์โมนออกฤทธิ์ผ่านตัวรับที่มีอยู่ที่เซลล์เมมเบรนและและสามารถกระตุ้นกระบวนการ transduction pathway ต่าง ๆ เช่น กระตุ้น protein kinase กระตุ้นการเปิดของ ion channel หรือการเพิ่มแคลเซียมในเซลล์ ในการพิสูจน์ non –genomic action ทำได้โดย incubate สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ transcription หรือ translation ร่วมกับสเตียรอยด์ หรืออาจใช้สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ไม่สามารถผ่าน

เข้าเซลล์ หากยังให้ผลการทดลองเหมือนกับการใช้สเตียรอยด์ต้นแบบฤทธิ์นั้นจะเกิดผ่าน non-genomic

ในการควบคุมแบบ genomic pathway นั้น ได้มีรายงานว่าการแสดงออกของ rOCT2มีความแตกต่างระหว่างเพศ (19) ในหนูเพศผู้มีการแสดงออกของ OCT2 ที่ไตสูงกว่าหนูเพศเมียถึง 4 เท่า โดยที่ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของ OCT1 และ OCT3 เลย และในหนูขาวตัวผู้ที่ตัด testis ออก ระดับ OCT2 mRNA จะลดลงเทียบเท่ากับในหนูตัวเมีย แสดงถึงบทบาทของ testosterone ต่อการแสดงออกของ OCT2 (20,21) การฉีดเทสโทสเตอโรนให้กับหนูขาวทั้งสองเพศมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของ OCT2 เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้าม การฉีด estrogen ให้กับหนูเพศผู้ก็ส่งผลทำให้การแสดงออกของ OCT2 ที่ไตหนูลดลง โดยที่ estrogen ไม่มีผลในหนูตัวเมีย (22,23) ข้อมูลที่ได้นี้อาจสรุปได้ว่า OCT2 ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเพศและการควบคุมโดยฮอร์โมนนี้ อาจเป็นกลไกที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางเพศที่พบในการขับทิ้งของยาต่าง ๆ ในมนุษย์

Berkin และ Humphreys ได้รายงานในปี 2001 (24) ว่าสเตียรอยด์ฮอร์โมน มีผลต่อกระบวนการ tubular secretion ของสารอินทรีย์โดยผ่านทางฤทธิ์ genomic และ non-genomic เช่น glucocorticoid สามารถควบคุมการ uptake ของ phosphate เข้าสู่เซลล์ ทั้งทาง genomic และ non-genomic ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่า proximal tubule สามารถตอบสนองต่อกระบวนการ non-genomic ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนได้ ทำให้เกิดแนวคิดในการทำการวิจัยชิ้นนี้เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าเทสโทสเทอโรนจะมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของ OCT2 ผ่านทางกลไก non-genomic ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการใช้ยาที่มีการขับออกผ่านทาง OCT2

วัตถุประสงค์ของโครงการ

โครงการนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาให้ทราบแน่ชัดถึงอิทธิพลและความสำคัญของเทสโทสเตอโรน ต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งที่ท่อไตโดยเจาะจงที่จะศึกษา OCT2 ดังนี้

1) ศึกษาฤทธิ์เฉียบพลันของเทสโทสเทอโรนต่อประสิทธิภาพการทำงาน (transport activity) ของ OCT2
2) ศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (kinetic characteristics) ของ OCT2 ภายใต้การควบคุมของเทสโทสเตอโรน
3) ศึกษาถึง signaling pathway เบื้องต้นของการควบคุมอย่างเฉียบพลัน