



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8)
ในการขนส่งยา tenofovir disoproxil fumarate(TDF)
บนเซลล์ท่อไตฝอยในหลอดทดลอง

Determination of ABCC11-glycoprotein(MRP8) transporter function on
Tenofovir disoproxil fumarate(TDF) transport in renal tubular cells, In
vitro Study.

เภสัชกร รศ.ดร.สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย และ เภสัชกร อ.วิศิษฐ์ ตันหยง
สาขาวิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ในการขนส่งยา
tenofovir disoproxil fumarate(TDF) บนเซลล์ท่อไตฝอยในหลอดทดลอง

Determination of ABCC11-glycoprotein(MRP8) transporter function on
Tenofovir disoproxil fumarate(TDF) transport in renal tubular cells, In
vitro Study.

เภสัชกร รศ.ดร.สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย และ เภสัชกร อ.วิศิษฐ์ ตันหยง
สาขาวิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

๑ กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๘

(2) กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 05/2558 ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรและมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุและอุปกรณ์ เครื่องแก้ว คุุณภัณฑ์ทางวิทยาศาสตร์ ให้ใช้ดำเนินการทดลอง ตลอดจนที่ปรึกษาของโครงการวิจัย ได้แก่ เกษชกร รองศาสตราจารย์ ดร.สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย เกษชกร รองศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชัย ฉีนไพศาลและเภสัชกร ดร.พีรยศ พมรศิลป์ธรรม รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณบดีคณะเภสัชศาสตร์และคณาจารย์ในมหาวิทยาลัยบูรพา และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ให้แก่ผู้วิจัย จึงขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha university through National Research Council of Thailand(Grant no.5/2558). We thank Assoc. Prof .Dr. Sindhchai kaewkittichai, the Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Thailand for expert help in discussion. Special thank to Faculty of Pharmacy, Silpakorn University and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for experimental instruments supported.

เกษชกร รองศาสตราจารย์ ดร.สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย

และเภสัชกร อ.วิศิษฐ์ ต้นหยง

23 มีนาคม 2558

Abstract

Tenofovir(TFV) is also known as 9-(2-Phosphonyl-methoxypropyl) adenine (PMPA), a relatively high potency of anti-HIV and anti-hepatitis B virus activities which is a nucleotide reverse transcriptase inhibitor. Tenofovir is mainly undergoes renal elimination via a combination of glomerular filtration and active tubular secretion. The present major adverse effect of TFV is nephrotoxicity which is limited their used in clinically setting, but the exactly mechanism is remained poorly understood. Therefore, member of ATP-binding cassette subfamily C₁₁ (ABCC11) or MRP8 transporter at apical side of proximal tubular cells were studied to demonstrate the efflux ability on TFV transport. LLC-PK₁ cells were overexpressed the MRP8 transporter protein by transfected them with lentivirus vector that contained *mrp8* gene. Real time polymerase chain reaction(rt-PCR) and indirect immunofluorescence assay were used to determine the target gene and protein expression. TFV accumulations were assessed by using MTT, transport and uptake assay. Substrate specificity was confirmed by using MK-571 and methotrexate anhydrate which were a specific inhibitor and known substrate of this efflux transporter in accordingly. Intracellular and intravesicular concentrations of TFV, methotrexate monohydrate and their metabolises were determined by using liquid chromatography-tandem massspectrometry(LC-MS/MS). 2-way ANNOVA and Paired t-test have been used for statistically data analysis. The transport assay has shown the intracellular accumulation of TFV was fives fold lower levels in MRP8-overexpression cells, and its accumulation was reversed by using specific inhibitor. On the other hands, the inside-out vesicel uptake assay was shown the intravesicular concentration of TFV was higher levels in MRP8-overexpression vesicles than SF9-insect vesicles at every time point of sampling; this is also reversed by using specific MRP inhibitor. In addition, MTT assayed was also shown higher levels of CC₅₀ on MRP8-overexpression cells than parental cells and this effect was also reversed when increasing the concentration of specific inhibitor whereas the parental cells had no effect. In conclusion the TFV is a new substrate of MRP8 transporter protein, an alteration on the physiologic functions of this efflux pumps may influences the accumulation of TFV at proximal renal tubular cells and may be contributed to develop nephrotoxicity.

บทคัดย่อ

ทีโนโฟเวียร์เป็นยาที่มีชื่อโครงสร้างทางเคมีว่า 9-(2-Phosphonyl-methoxypropyl) adenine (PMPA) เป็นยาที่ใช้ได้ดีในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบี มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ nucleotide reverse transcriptase ร่างกายขับถ่ายยาทีโนโฟเวียร์ผ่านทางไตเป็นหลักโดยใช้กระบวนการกรองผ่าน โกลเมอรูลัสและการขับยาออกผ่านทางไตส่วนต้น อาการอันไม่พึงประสงค์ที่สำคัญของยาทีโนโฟเวียร์คือ พิษต่อไตซึ่งทำให้เกิดข้อจำกัดในการใช้ยานี้ในทางคลินิก แต่กลไกการทำให้เกิดพิษต่อไตนั้นยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางสรีรวิทยาพบว่าบริเวณท่อไตส่วนต้น มีการกระจายของโปรตีนขนส่งชนิดใช้พลังงาน ATP อยู่หลายกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มที่มีชื่อว่า ATP-binding cassette subfamily C₁₁(ABCC11) หรือ Multidrug related protein 8(MRP8) เป็นโปรตีนขนส่งชนิดขับสารออกจากเซลล์ท่อไตส่วนต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสนใจโปรตีนขนส่งชนิดนี้เป็นพิเศษเพื่อที่จะศึกษาว่าโปรตีนขนส่งชนิดนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ท่อไตส่วนต้นหรือไม่ ปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ท่อไตส่วนต้นพิสูจน์ด้วยวิธีการทดลองที่เรียกว่า transport และ uptake assayed โดยใช้เซลล์ชนิด LLCPK-1 เพิ่มปริมาณโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ด้วยวิธีการ transfection โดยใช้ Lentivirus นำพา *abcc11* gene เข้าไปในเซลล์เพื่อให้เกิดการสร้างกลัยโคโปรตีนชนิดนี้และใช้ synthetic MRP8 vesicle ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเพื่อแสดงความจำเพาะของ substrate ต่อกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ทางผู้วิจัยได้ใช้ Methotrexate anhydrate เป็น substrate และสาร MK571 เป็น inhibitor การศึกษาปริมาณการสะสมของยาทีโนโฟเวียร์และสารเมตาบอลิต์ทั้งในเซลล์และใน vesicle ใช้วิธีการวัดด้วย liquid chromatography-tandem massspectrometry(LC-MS/MS) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ LLCPK-1 ที่มีการแสดงออกของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 นั้น มีปริมาณยาทีโนโฟเวียร์น้อยกว่า 5.5 เท่าของเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P_{value} < .001$) ในทางกลับกันพบว่าปริมาณยาสะสมจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P_{value} < .001$) เมื่อมีสาร MK571 ซึ่งจัดเป็นสารยับยั้งการทำงานของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิดนี้ สำหรับการทดลองแบบ uptake assayed นั้นพบว่า vesicle ที่มีการแสดงออกของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 มีปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ใน vesicle มากกว่าในทุกๆ ช่วง เวลาที่ทำการวัดค่าที่ 0.5, 5, 10, 15 และ 30 นาที($P_{value} < .001$) ตามลำดับและให้ผลในทางตรงกันข้ามเมื่อมี MK571 เป็นสารยับยั้งกลัยโคโปรตีนชนิดนี้ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังพบอีกว่าผลการทดสอบด้วยวิธี MTT assayed นั้นพบว่าเซลล์ LLCPK-1 ที่มีการแสดงออกของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 นั้นมีค่า CC_{50} สูงกว่าเซลล์ควบคุมถึง 15 เท่าและค่าของ CC_{50} จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P_{value} < .001$) เมื่อมีสารยับยั้งกลัยโคโปรตีนชนิดนี้จนค่า CC_{50} ไม่แตกต่างกับเซลล์ควบคุม จึงสามารถสรุปได้ว่ายาทีโนโฟเวียร์เป็น substrate ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ดังนั้นถ้ามีการยับยั้งหรือรบกวนการทำงานของกลัยโคโปรตีนชนิดนี้อาจจะส่งผลต่อการขนส่งยานี้ผ่านทางท่อไตส่วนต้นจนอาจเกิดการสะสมของยาจนทำให้เกิดพิษต่อไตได้

คำสำคัญ : ABCC11, MRP8, ATP-binding cassette subfamily C11, Tenofovir, Tenofovir disoproxil fumarate, TFV, TDF, Pharmacogenetics, Pharmacology, Toxicology

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ(Introduction)	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาและขอบเขตของการวิจัย.....	31
1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	32
1.4 ประโยชน์ของการวิจัย	33
บทที่ 2 วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย(Material and Method)	
2.1.1 วัสดุ สารเคมีและอุปกรณ์	34
2.1.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	35
2.1.3 Cell characterization	36
2.1.4 MTT assay.....	39
2.1.5 Vesicular uptake assay with specific inhibitors	40
2.1.6 Cellular transport assay with specific inhibitors	43
บทที่ 3 2.2 ผลการวิจัย(Result)	44
2.2.1 ABCC11(MRP8) gene and protein expression.....	44
2.2.2 Tenofovir and Methotrexate Cytotoxic concentration (CC ₅₀)	46
2.2.3 Intracellular accumulation of Tenofovir and Methotrexate	47
2.2.4 Intravesicular accumulation of Tenofovir and Methotrexate.....	47
บทที่ 3 สรุปผลและอภิปรายผล(Discussion)	49
3.1 สรุปผลการวิจัย	49
3.2 อภิปรายผล	49
บทที่ 4 ข้อเสนอแนะ(Sugestion).....	51
บทที่ 5 ผลผลิต(Output).....	52

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ส่วนประกอบตอนท้าย	
รายงานการเงิน.....	53
เอกสารอ้างอิง.....	55
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดง Nomenclature และคุณสมบัติบางประการของ human MRP (ABCC) genes และ MRP (ABCC) proteins..... 7
2	แสดงการกระจายของ ABCC transporter protein บนเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ในมนุษย์..... 8
3	แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs บนยีน ABCC2 ที่ตำแหน่ง 1249 G>A ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย..... 16
4	แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs บนยีน ABCC4 ที่ตำแหน่ง 669 C>T ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย..... 16
5	แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs haplotype บนยีน ABCC2 ที่ตำแหน่ง 5'-UTR/exon 10/exon 25/exon 28 ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย..... 16
6	แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs haplotype บนยีน ABCC10 ที่ตำแหน่ง rs9349256, rs2125739 และการวิเคราะห์แบบ SNPs haplotype ในผู้ป่วยเอชไอวี 115 ราย 17
7	แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ extended SNPs haplotype บนยีน ABCC10 - ABCC2 ในผู้ป่วยเอชไอวี 115 ราย 18
8	ตารางแสดงคุณลักษณะพื้นฐานของ ABCC11 transporter protein 19
9	ตารางแสดงปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี Forskolin ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์..... 21
10	ตารางแสดงปริมาณของ cGMP ภายในเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี SIN-1A ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cGMP ภายในเซลล์ 21
11	ตารางแสดงความไวต่อยาของ LLC-PK1-ABCC11 overexpression เทียบกับเซลล์ควบคุม 22
12	แสดงผล sensitivity analysis ด้วย MTT cytotoxic assay โดยใช้ PC-6, MTArresistant cell lines และเซลล์ควบคุม 25
13	แสดง ABCC11 genotype และ IC50 ของ 13 adenocarcinoma cell lines 28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	แสดงสถิติของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและเอดส์ในปี 2010 ของประชากรทั่วโลก จากองค์การอนามัยโลก 1
2	กลไกการต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีชนิดที่ 1 ของยาด้านไวรัสที่มีอยู่ในปัจจุบัน 2
3	แสดงกระบวนการ esterification และ Phosphorylation ของยาทีโนโฟเวียร์..... 3
4	แสดงกระบวนการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์หลอดไตฝอย..... 4
5	แสดงกลไกของยาทีโนโฟเวียร์ในการยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase γ ในไมโทคอนเดรีย(Mitochondria) 6
6	แสดงพยาธิสภาพขยายของชั้นเนื้อเซลล์ท่อไตในผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อไต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง 6
7	แสดงการเรียงตัว(configuration) ของโปรตีนขนส่ง ABCC บนเซลล์เมมเบรน..... 7
8	กราฟแท่งแสดงปริมาณของแคลซิน (Calcein) ภายในเซลล์ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) ในสภาวะที่มีเวอร่าพามิล(Verapamil) และทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) เป็น substrate 9
9	กราฟแท่งแสดง ATPase activity ในสภาวะที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) และโพรเบนเนซิด(Probenecid) เป็น substrate ในเซลล์ Pgp-overexpressed..... 9
10	กราฟแท่งแสดงปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) ที่มีและไม่มีสารยับยั้ง การทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มี การปลูกถ่ายตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2..... 10
11	กราฟแท่งแสดง ATPase activity ในสภาวะที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) และโพรเบนเนซิด(Probenecid) เป็น substrate ในเซลล์ MRP2-overexpressed 11
12	กราฟเชิงเส้นแสดงอัตราการ uptake ของยาเอสตราไดออล กลูคูโรไนด์(Estradiol glucuronide) เทียบกับยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี ATP 11
13	กราฟแท่งแสดงปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์ CEM-R1 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี MK571 ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4..... 12
14	กราฟแท่งแสดงปริมาณการ uptake สะสมของยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ภายในเซลล์ Sf9 insect vesicle cell ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี ATP และ Dipyridamole ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ โปรตีนขนส่งชนิด MRP4 13

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
15	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนของปริมาณสะสมยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในเซลล์ HEK293 ที่มีปลุกถ่ายโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี เซฟาแรนทีน (Cepharanthine) ที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 14
16	กราฟแท่งแสดงสัดส่วนของปริมาณสะสมยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในเซลล์ HEK293 ที่มีปลุกถ่ายโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี เซฟาแรนทีน (Cepharanthine) ที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 14
17	แสดงค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์ PBMCs ในผู้ป่วยเอชไอวีที่มี variant type ที่ตำแหน่ง ABCC4(3463 A>G) เทียบกับ wild type.... 15
18	แสดงตำแหน่งของ SNPs บนยีน ABCC2 และ ABCC4 ที่ Izzedine H. และคณะ นำมาศึกษา genetic variations 15
19	แสดงตำแหน่ง SNPs บนยีน ABCC10 ที่ Pushpakom SP และคณะ ทำการศึกษา genetic variations 17
20	แสดง allele frequency distribution ของ ABCC11 SNP538 G>A 20
21	แสดงการเรียงตัว(configuration) และ mutation ของโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 20
22	แสดงปริมาณของ cAMP ภายนอกเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี Forskolin ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์..... 21
23	แสดงความไวของ LLC-PK1-ABCC11 overexpression ต่อ PMEA, ddC และ 5-FU ที่ระดับความเข้มข้นของยาต่างๆ กัน..... 22
24	แสดงปริมาณสะสมของ PMEA ภายนอกและภายในเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุมที่เวลาต่างๆ กัน(A; intracellular PMEA concentration และ B;extracellular PMEA concentration) 23
25	(A และ C) แสดง schematic diagram บทบาทหน้าที่ของตัวขนส่งโปรตีน ABCC11 ในการดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoropyrimidines (B) แสดงปริมาณสะสมของ ^[3H] 5-FdUMP, ^[3H] 5-FUra และ ^[3H] 5-FdUrd ใน vesicle transport system ที่เตรียมจาก LLC-PK1-ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุม..... 24
26	แสดงวิธีการพัฒนา PC-6, MTA-resistant cell lines ในห้องทดลองโดยการ induction ให้เกิด MTA-resistant ด้วย continuous exposure ด้วย premetrexate โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง..... 25
27	แสดง mRNA expression ของตัวขนส่งโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี western blot analysis ของเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม 26

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
28	แสดง protein expression ของตัวขนส่งโปรตีนชนิด ABCC11 ด้วยวิธี western blot analysis ของเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม..... 26
29	แสดง intracellular concentration ของ methotrexate ภายในเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม..... 27
30.	(A) แสดง ABCC11 gene expression level (B) แสดงผล MTT cytotoxic assay (C) แสดง intracellular concentration ของ methotrexate ภายในของเซลล์ PC-6, MTA-resistant ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA และเซลล์ควบคุม..... 28
31.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ABCC11 genotype และ median IC50 concentration ของ 13 adenocarcinoma cell lines..... 29
32.	กราฟแท่งแสดงปริมาณของ <i>abcc11</i> gene expression ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK ₁ -parental cell (B) แสดงการย้อมติดสีของ ABCC11 protein ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK ₁ -parental cell ด้วยวิธี Secondary หรือ Indirect immunofluorescences..... 43
33.	(A) กราฟแท่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK ₁ -parental cell ของสารยับยั้ง MK571 โดยแสดงเป็น % viability (B) กราฟแท่งแสดง ผลของยาทีโนโฟเวียร์ ต่อ Percentage of cell viability ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK ₁ -parental cell (C) กราฟแท่งแสดงความเป็นพิษของยาทีโนโฟเวียร์ต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK ₁ -parental cell โดยแสดงเป็น % viability ; (D)กราฟแท่งแสดงความเป็นพิษของยา Methotrexate ต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK ₁ -parental cell โดยแสดงเป็น % viability (E) กราฟแท่งแสดง Tenofovir cytotoxic concentration(CC ₅₀) ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK ₁ -parental cell (F) กราฟแท่งแสดง Methotrexate cytotoxic concentration(CC ₅₀) ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK ₁ -parental cell 44

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่

หน้า

34. A) กราฟแท่งแสดง Intracellular accumulation ของ Tenofovir
 ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell
 ในสภาวะที่มีสาร MK-571 ที่ยับยั้งการทำงานของ ABCC11 transporter
 B) กราฟแท่งแสดง Intracellular accumulation ของ Methotrexate
 ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell
 ในสภาวะที่มีสาร MK-571 ที่ยับยั้งการทำงานของ ABCC11 transporter..... 45
35. **A)** กราฟเส้นแสดง Intravesicular accumulation ของ Tenofovir ใน ABCC11
 overexpression vesicle เทียบกับ SF9 parental vesicle ในสภาวะแตกต่างกัน
 และที่เวลาในแต่ละจุดที่ต่างกัน**B)** กราฟเส้นแสดง Intravesicular
 accumulation ของ Methotrexate ใน ABCC11-overexpression vesicle
 เทียบกับ SF9 parental vesicle ในสภาวะแตกต่างกันและที่เวลา
 ในแต่ละจุดที่ต่างกัน 46

บทที่ 1

บทนำ(Introduction)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

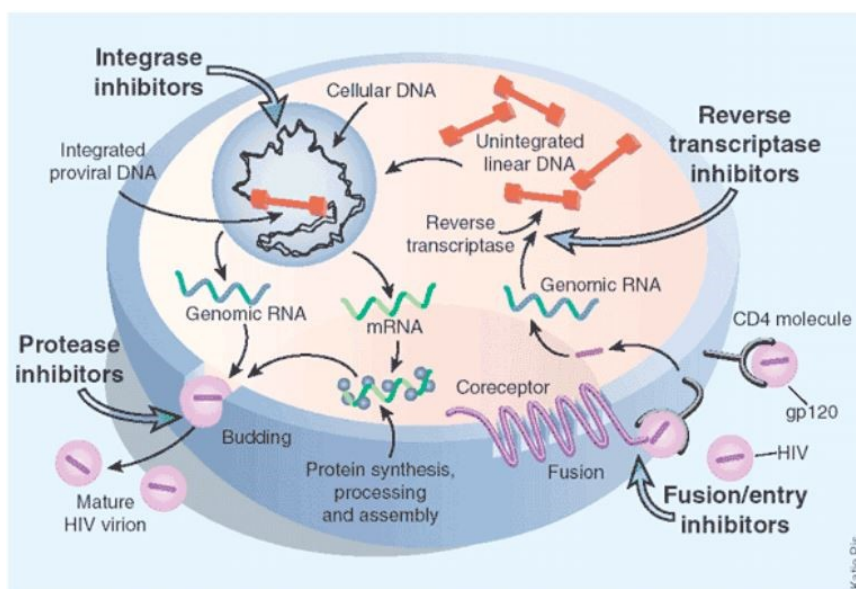
World Overview

	2001	2011
Adults and children living with HIV	29.4 million [27.2 million – 32.1 million]	34 million [31.4 million – 35.9 million]
Adults and children newly infected with HIV	3.2 million [2.9 million – 3.4 million]	2.5 million [2.2 million – 2.8 million]
% Adult prevalence	0.8 [0.7 – 0.9]	0.8 [0.7 – 0.8]
Adult and child deaths due to AIDS	1.9 million [1.7 million – 2.2 million]	1.7 million [1.5 million – 1.9 million]
Young people (15-24) prevalence (%)	Male	0.4 [0.3 – 0.5]
	Female	0.7 [0.6 – 0.9]
		0.3 [0.2 – 0.4]
		0.5 [0.4 – 0.6]

รูปที่ 1 แสดงสถิติของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและเอดส์ในปี 2010 ของประชากรทั่วโลก จากองค์การอนามัยโลก

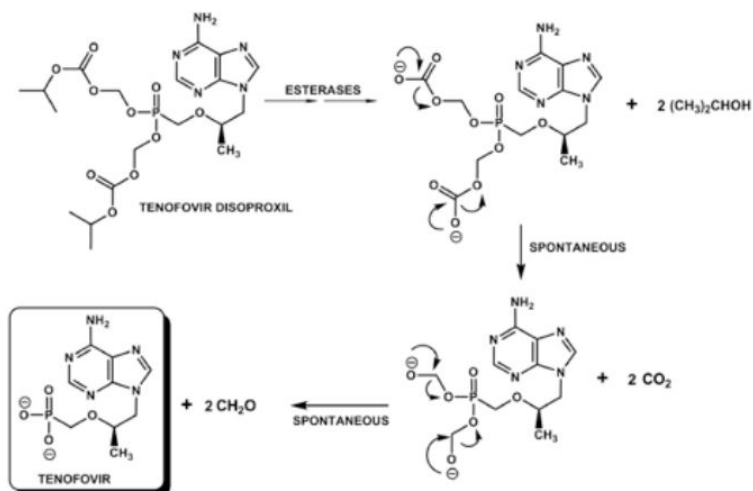
ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์มีจำนวนประมาณ 31.4 - 35.9 ล้านคนทั่วโลก^[1] ซึ่งการติดเชื้อก็ยังคงเพิ่มขึ้นในทุกๆปี แต่ในอัตราคงที่เฉลี่ยปีละ 2.5 ล้านคน^[1] ในขณะที่ประเทศไทยอยู่ในอันดับที่ 40^[2] โดยพบว่ามีอัตราการอุบัติการณ์อยู่ที่ 1.2 % ต่อปี^[2] ปัญหาผู้ติดเชื้อเอชไอวีดังกล่าวก็ยังสะสมและเป็นปัจจัยที่กระทบต่อภาวะการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจของทั้งประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศกำลังพัฒนาและประเทศด้อยพัฒนา เนื่องจากเป็นภาระด้านงบประมาณสาธารณสุขของแต่ละประเทศเพราะยาที่ใช้รักษาโดยส่วนใหญ่ต้องนำเข้าและมีราคาแพงการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์จำเป็นต้องใช้ยาหลายขนานร่วมกัน เพื่อลดปริมาณของเชื้อไวรัสในกระแสโลหิต เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและลดโอกาสการติดเชื้อฉวยโอกาสทำให้ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีอัตราการตายที่ลดลงมากในปัจจุบัน ข้อจำกัดการรักษาด้วยยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ได้แก่ ผลอันไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากยาที่ใช้ อันตรกิริยาระหว่างยาด้วยกัน การดื้อยาของเชื้อไวรัส ซึ่งยาทีโนโฟเวียร์ก็เป็นยาหนึ่งในสูตรยาด้านไวรัสที่ได้รับความนิยมและผลอันไม่พึงประสงค์ที่สำคัญก็คือพิษต่อไต ดังนั้นถ้าสามารถหลีกเลี่ยงจากปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับอาการอันไม่พึงประสงค์จากยาทีโนโฟเวียร์ได้ก็จะช่วยให้ผู้ป่วยนั้นได้รับผลการรักษาที่ดี ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาอาการอันไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยานี้ได้ การรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวีหรือโรคเอดส์ในปัจจุบันด้วยยาสูตรผสมที่เรียกว่า Highly active antiretroviral therapy (HAART) สามารถลดอัตราการเสียชีวิตและการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้^[3] มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนหนึ่งในประเทศไทยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวี

ล้มเหลวจากการดื้อยาในกลุ่ม nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)^[4] หรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา เช่น เกิด lipodystrophy จากยา stavudine หรือ zidovudine ทำให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีต้องได้รับการเปลี่ยนแปลงสูตรยาต้านเอชไอวีเป็นสูตรที่มียา tenofovir มากขึ้น^[4]

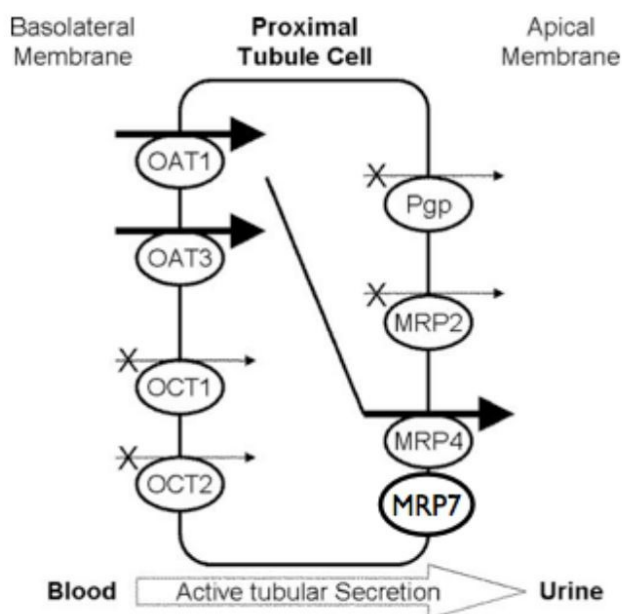


รูปที่ 2 กลไกการต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีชนิดที่ 1 ของยาต้านไวรัสที่มีอยู่ในปัจจุบัน^[5,6]

Tenofovir เป็นยาในกลุ่ม nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor ที่ได้รับอนุมัติจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2544 และนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยในปลายปี พ.ศ. 2549^[2,4] ยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir disoproxil fumarate, TDF) เป็นยาต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีชนิดหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Nucleotide Analogs ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ reverse transcriptase ของเชื้อเอชไอวี (ดังแสดงในรูปที่ 2)^[5] ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสโลหิตได้เป็นอย่างดีเมื่อใช้ร่วมกับสูตรยาต้านไวรัส ยาทีโนโฟเวียร์อยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ (Prodrug) เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะต้องใช้เอ็นไซม์เอสเทอเรส (Esterase) เพื่อปลดปล่อยยาให้อยู่ในรูปอิสระ (free tenofovir) และจะต้องผ่านกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตอีก 2 ครั้ง จึงจะอยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (active triphosphate form) สามารถยับยั้งการทำงานของ reverse transcriptase ของเชื้อไวรัสเอชไอวีได้ (ดังแสดงในรูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการ esterification และ Phosphorylation ของยาทีโนโฟเวียร์^[6]



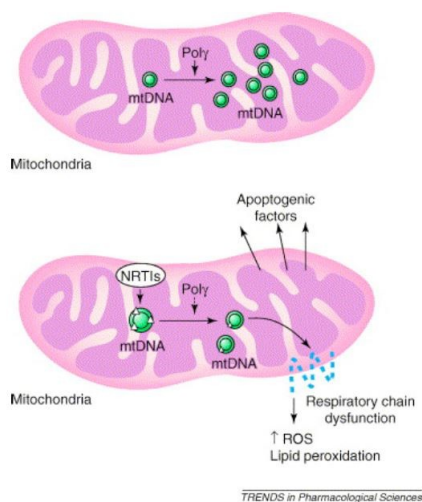
รูปที่ 4 แสดงกระบวนการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์หลอดไตฝอย^[6,7,8]

ยาทีโนโฟเวียร์ดูดซึมได้ไม่ดีนัก โดยมีค่าชีวประสิทธิผลประมาณ 27% เท่านั้น ยานี้ขับออกทางไตในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงออกจากร่างกายโดยกระบวนการ glomerular filtration ร่วมกับ active tubular secretion ประมาณ 20-30% โดยใช้ตัวขนส่งโปรตีนหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ OAT1, OAT3, MRP4^[7] และ MRP7^[8] โดยพบว่าตัวขนส่งโปรตีนที่นำเข้ายาทีโนโฟเวียร์จากเลือดเข้าสู่เซลล์ท่อไตคือ OAT1 และ OAT3^[7] ส่วนตัวขนส่งโปรตีนที่ทำหน้าที่ขับยาทีโนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ท่อไตคือ MRP4^[7] และ MRP7^[8] ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิดคือ ABCC4^[6,7] และ ABCC10^[6,8] ตามลำดับ(ดังแสดงในรูปที่ 4) เนื่องด้วย

ภายหลังที่ยานี้ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2001^[2] ยา tenofovir ก็ได้รับความนิยมในการใช้ร่วมกับยาอื่นๆ ในสูตรยาต้านไวรัสเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีเพิ่มขึ้น โดยพบว่า tenofovir มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสได้ทั้งเชื้อที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา^[5] มีอัตราการดื้อยาดำกว่ายาชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งมีผลต่อระดับไขมันในเลือดและเกิด lipodystrophy ได้น้อยกว่ายา stavudine^[9] อย่างชัดเจน อาการไม่พึงประสงค์จากยา tenofovir ที่พบได้บ่อยได้แก่ อาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องอืดซึ่งเป็นอาการอันไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรง แต่มีรายงานอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง คือ การเกิดพิษต่อไต^[10, 12-25] มีค่า median ของระดับยา tenofovir ในเลือดสูงในกลุ่มที่เกิดพิษต่อไต^[11] รายงานการเกิดพิษต่อไตจากการใช้ยา tenofovir ได้แก่ ไตวายเฉียบพลันร้อยละ 0.5-1.5^[5-6] หลังจากรับยา tenofovir ตั้งแต่ระยะเวลา 5 สัปดาห์ถึง 16 เดือน^[19-21] และพบว่าการทำงานของไตกลับปกติหลังหยุดยาลงอย่างน้อย 2-4 เดือน^[21-22] มีค่าการชำระครีเอตินินลดลงหลังได้รับยาตั้งแต่ 6 เดือน ถึง 3ปี^[22-24] โดยพบว่าการชำระครีเอตินิน ลดลง 10 มิลลิลิตร/นาที ในกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ยา tenofovir และลดลงมากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ยาในกลุ่ม nucleoside reverse-transcriptase inhibitor จากการติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลา 3 ปี^[9] ระดับฟอสเฟตในเลือดต่ำโดยจากการศึกษาของ K Buchacz และคณะ^[20] พบอุบัติการณ์ของระดับฟอสเฟตในเลือดต่ำอยู่ในช่วง 2.0-2.4 มิลลิลิตร/เดซิลิตร เท่ากับ 16.7/100 person-years ในกลุ่มที่ใช้ยา tenofovir และเท่ากับ 8/100 person-years ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้ใช้ยา tenofovir เมื่อติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลา 10.9 เดือน นอกจากนี้มีรายงานกรณีศึกษาตรวจพบน้ำตาลในปัสสาวะหลังใช้ยาประมาณ 8 เดือน^[19] และอาจพบ acute tubular necrosis ได้^[19,22]

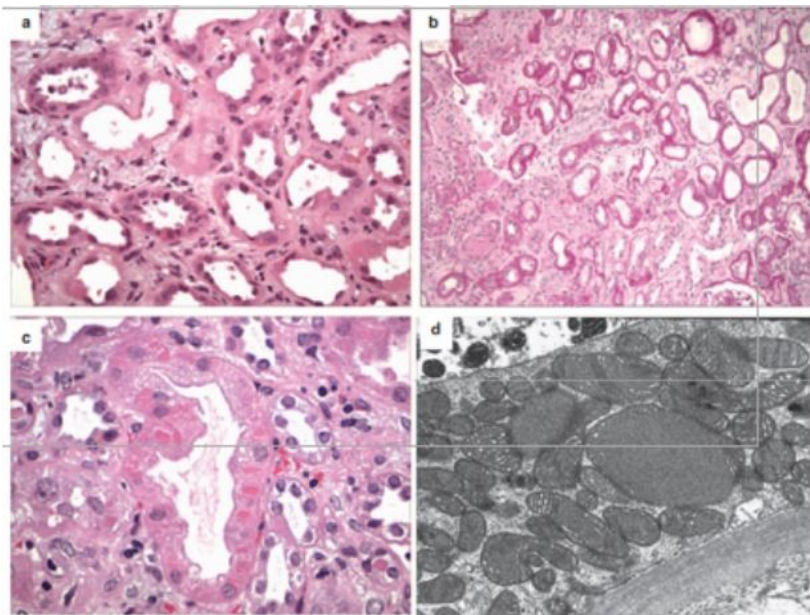
เมื่อระยะเวลาผ่านไปก็มีการนิศึกษาเกี่ยวกับพิษต่อไตของยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศไทยเองก็เช่นกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยมีผู้ป่วยจำนวน 405 คน^[27-28] ในโรงพยาบาลชลบุรีที่ได้รับการรักษาด้วย ยา tenofovir เฉลี่ย 16 เดือน (ตั้งแต่ 8 ถึง 21 เดือน) พบว่าผู้ป่วยจำนวน 78 คนหรือร้อยละ 19 มีการลดลงของค่า GFR มากกว่าร้อยละ 25 ขึ้นไป ตามการวิเคราะห์การอยู่รอดของ Kaplan-Meier ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นๆ ได้เคยรายงานไว้ ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างในการให้คำจำกัดความของความเป็นพิษต่อไตและประชากรที่ศึกษา นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในการศึกษานี้เคยได้รับยาด้านไวรัสมาก่อนเข้าร่วมการศึกษา ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่ดำเนินการในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยาด้านไวรัสมาก่อน ค่าเฉลี่ยของการลดลงของค่า GFR มากกว่าร้อยละ 25 ขึ้นไป เท่ากับ 28 เดือน เมื่อวิเคราะห์สมการการถดถอยแบบพหุคูณ พบว่า น้ำหนักตัวที่น้อย ค่าดัชนีมวลกายที่ต่ำ ค่า GFR พื้นฐาน การรับประทานยาด้านไวรัสกลุ่ม protease inhibitor และ ยาที่มีพิษต่อไตจะสัมพันธ์กับการลดลงของค่า GFR มากกว่าร้อยละ 25 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา นอกจากการศึกษาดังกล่าวในประเทศไทยแล้ว ยังมีการศึกษาอื่นๆ อีก^[28] โดยพบอัตราการเกิดพิษต่อไตเพิ่มขึ้นในอัตราประมาณ 5-18%^[28] ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการเกิดขึ้นที่รายงานเอาไว้ในต่างประเทศคือ 10-22%^[6] โดยอัตราที่เกิดขึ้นจากการรายงานดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษาทางคลินิกช่วงระยะที่ 3 มากกว่าถึง 5 เท่านอกจากนี้ยังพบว่าอัตราอุบัติการณ์เกิดพิษต่อไตนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการใช้ยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ความรุนแรงที่เกิดพิษต่อไตจากยาทีโนโฟเวียร์นั้นขึ้นกับการสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ท่อไตและมีช่วงของความรุนแรงของพิษต่อไตกว้างมาก

กล่าวคือ สามารถเกิดได้ในระดับความรุนแรงต่างๆ ผู้ป่วยจะมีการทำงานของไตปกติเพียงแค่หยุดยา 2-3 สัปดาห์ โดยไม่ต้องการการรักษาใดๆ แต่ในทางกลับกันมีผู้ป่วยบางกลุ่มจำเป็นต้องได้รับการฟอกไตและใช้เวลาการรักษายาวนานตลอดชีวิต จากรายงานพบว่าพิษต่อไตที่เกิดจากยาทีโนโฟเวียร์นั้นสามารถเกิดขึ้นได้ภายในระยะเวลา 2-3 เดือนภายหลังจากได้รับยาและพิษต่อไตจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหากผู้ป่วยได้รับยานี้ต่อเนื่องกันโดยไม่ได้หยุดยาและยังพบปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษต่อไต เช่น อายุ (โดยพบพิษต่อไตมากขึ้นในผู้ป่วยสูงอายุ) การใช้ยานี้ร่วมกับยาในกลุ่ม Proteinase inhibitors (โดยเฉพาะอินดินาเวียร์ (Indinavir)) ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม(โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับ ABCC Transporter Protein) ผู้ป่วยที่มีน้ำหนักตัวน้อย การใช้ยานี้ร่วมกับ Didanosine หรือยาอื่นที่มีพิษต่อไต ผู้ป่วยที่มีปริมาณของ CD4⁺ cells น้อย ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซี ร่วมด้วย และผู้ป่วยเบาหวาน ดังจะเห็นได้ว่าปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับการเกิดพิษต่อไตจากยาทีโนโฟเวียร์นั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมในมนุษย์ที่มีความแตกต่างกัน การศึกษาด้านพยาธิกำเนิดของพิษต่อไตที่เกิดจากยาทีโนโฟเวียร์นั้นยังไม่มีรายงานแต่เชื่อกันว่าจะเหมือนกับยาอะดีโฟเวียร์และซีโดโฟเวียร์[6] ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกันและจัดอยู่ในกลุ่มยาเดียวกันกับยาทีโนโฟเวียร์ คือ Nucleotide Analog Reverse Transcriptase Inhibitors(NuRTIs) กล่าวคือ เมื่อมีการสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในรูปไตรฟอสเฟส (Tenofovir Triphosphate) ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ท่อไต(renal tubular cells) เพิ่มสูงขึ้นอาจจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase gamma(POLG) ของไมโทคอนเดรีย ลดการทำหน้าที่กระบวนการสร้างโปรตีนภายในไมโทคอนเดรียถูกรบกวนและมีจำนวนลดลง ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้าง ATP ภายในเซลล์ด้วยกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน(electron transportation chain reaction) ซึ่ง ATP เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์สำคัญยิ่ง ผลดังกล่าวอาจสร้างความเครียดให้กับไมโทคอนเดรีย ส่งผลกระทบต่อให้เกิดการตายของเซลล์ท่อไตโดยการหลั่ง Cytochrome C และ Apoptotic Inducing Factors อื่นๆ[6](ดังแสดงในรูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงกลไกของยาทีโนโฟเวียร์ในการยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase- γ ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria)^[6,28]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบพยาธิสภาพของเซลล์ท่อไตโดยตรวจย้อมชิ้นเนื้อของเซลล์ท่อไตที่ได้จากการตัดชิ้นเนื้อในผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อไตจากยาทีโนโฟเวียร์ แล้วศึกษาชิ้นเนื้อดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงพบว่ามีการตายของเซลล์ท่อไตจำนวนมากและนอกจากนี้ยังพบขนาดของไมโทคอนเรียที่ใหญ่ขึ้นและมีขนาดที่แตกต่างกันอยู่เกาะกันเป็นกลุ่ม(ดังแสดงในรูปที่ 6)^[6,29] ผู้ทำการศึกษาจึงสรุปผลการศึกษาดังกล่าวว่าเป็นพิษต่อไตของยาทีโนโฟเวียร์น่าจะส่งมาจากพิษโดยตรงต่อไมโทคอนเรีย(direct toxic effects)^[6-7,29-31] เหมือนกับยาอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน ซึ่งได้แก่ ซิโดโฟเวียร์(Cidofovir)และอะดีโฟเวียร์(Adefovir)^[7,30-31]

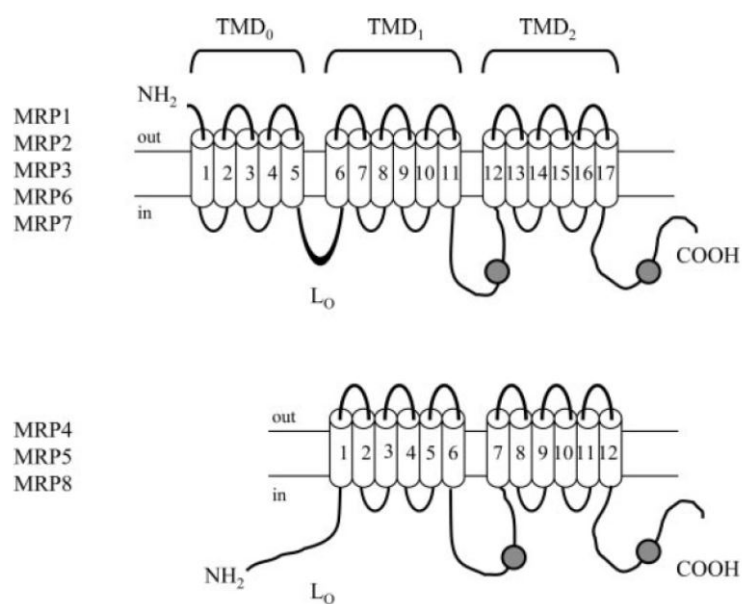


รูปที่ 6 แสดงพยาธิสภาพขยายของชิ้นเนื้อเซลล์ท่อไตในผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง^[6-7,29-31]

ABCC หรือ ATP binding cassette subfamily C เป็น subclass ของ ATP binding cassette (ABC) transporters^[30,32-35] โดยพบได้ตั้งแต่ archaea จนถึงในมนุษย์^[30,32] โครงสร้างของ functional protein ประกอบด้วย 4 โดเมน ได้แก่ 2 โดเมนที่อยู่บนเซลล์เมมเบรน (2 transmembrane domains) และอีก 2 โดเมนอยู่ในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ (2 cytosolic domains) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ATP binding domains(ดังแสดงในรูปที่ 7)^[30, 32-36] โดยปกติแล้วตัวโปรตีนขนส่งในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่หลายอย่าง ตั้งแต่การขนส่ง organic ions, endogenous substances จนถึงการขนส่งยาบางชนิดเข้าและออกจากเซลล์^[30,32-37] มีสมาชิกทั้งหมด 12 ชนิด (ดังแสดงในตารางที่ 1) และมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายมนุษย์(ดังแสดงในตารางที่ 2) แต่จากการศึกษาพบว่ามีโปรตีนขนส่ง(Transporter protein) ที่พบว่าทำหน้าที่ในการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ท่อไตนั้นมีอยู่ 2 ชนิด คือ MRP4(Multi-drug resistance protein 4)^[6-8] และ MRP7^[8] (Multi-drug resistance protein 4) อยู่ในกลุ่ม ABCC (ATP- binding cassette subtype C subfamily) transporter proteins^[30,32-36] ซึ่งจัดเป็นโปรตีนขนส่งที่อยู่บน apical side ของเซลล์ท่อไต โดยปกติแล้วตัวโปรตีนขนส่งดังกล่าวจะทำหน้าที่หลายอย่างตั้งแต่การขนส่ง organic ions, endogenous substances จนถึงการขนส่งยาบางชนิดออกจากเซลล์ซึ่งรวมถึงยาทีโนโฟเวียร์ด้วย

ตารางที่ 1 แสดง Nomenclature และคุณสมบัติบางประการของ human MRP (ABCC) genes และ MRP (ABCC) proteins^[30]

Symbol	Alternate name	Gene accession number ^a	Chromosomal localization ^a	Protein accession number ^b	Amino acids ^b	Amino acid identity ^b (%)
ABCC1	MRP1	NM_004996	16p13.1	NP_004987	1531	100
ABCC2	MRP2	NM_000392	10q24	NP_000383	1545	50
ABCC3	MRP3	NM_003786	17q22	NP_003777	1527	58
ABCC4	MRP4	NM_005845	13q32	NP_005836	1325	41
ABCC5	MRP5	NM_005688	3q27	NP_005679	1437	38
ABCC6	MRP6	NM_001171	16p13.1	NP_001162	1503	46
ABCC10	MRP7	NM_033450	6p12.1	NP_258261	1492	35
ABCC11	MRP8	NM_033151	16q12.1	NP_149163	1382	33
ABCC12	MRP9	NM_033226	16q12.1	NP_150229	1356	36
CFTR	ABCC7	NM_000492	7q31.2	NP_000483	1480	30
ABCC8	SUR1	NM_000352	11p15.1	NP_000343	1581	36
ABCC9	SUR2A	NM_005691	12p12.1	NP_005682	1549	35
	SUR2B	NM_020297	12p12.1	NP_064693	1549	36

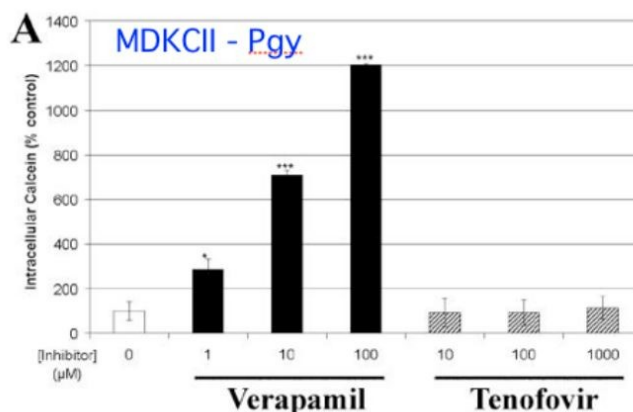


รูปที่ 7 แสดงการเรียงตัว(configuration) ของโปรตีนขนส่ง ABCC บนเซลล์เมมเบรน^[30, 32-35]

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของ ABCC transporter protein บนเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ในมนุษย์^[38]

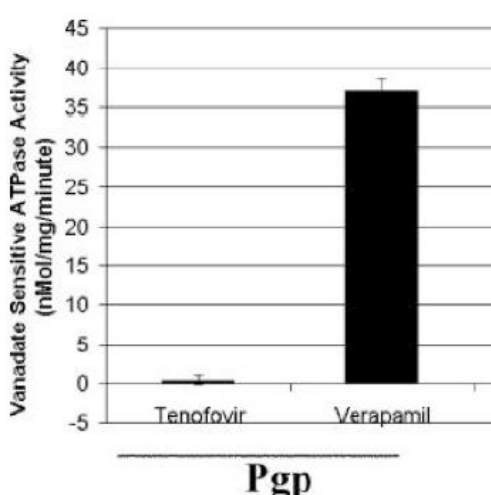
Members: symbol/alias	Location	Transcript length	Protein	Expression
ABCC1/MRP1	16p13.12	5927 bp	1531 AA/ 171,561 Da	Lung, testes, Peripheral Blood Mononuclear Cell, lateral membrane
ABCC2/MRP2/ CMOAT	10q24.2	4930 bp	1545 AA/ 174,191 Da	Liver, intestine, kidney, apical membrane
ABCC3/MRP3/ CMOAT2	17q21.33	5176 bp	1527 AA/ 169,343 Da	Lung, intestine, liver, kidney, lateral membrane
ABCC4/MRP4/ MOATB	13q32.1	5871 bp	1325 AA/ 149,541 Da	Many tissues
ABCC5/MRP5/ MOATC	3q27.1	5851 bp	1437 AA/ 160,660 Da	Many tissues
ABCC6/MRP6/ MOATE/PXE	16p13.12	5111 bp	1503 AA/ 164,904 Da	Kidney, liver, lateral membranes
ABCC7/CFTR	7q31.31	6132 bp	1480 AA/ 168,174 Da	Exocrine tissues, apical membranes
ABCC8/SUR1	11p15.1	4980 bp	1580 AA/ 176,891 Da	Pancreas
ABCC9/SUR2	12p12.1	4670 bp	1549 AA/ 174,260 Da	Skeletal muscle, heart
ABCC10/MRP7	6p21.1	5118 bp	1492 AA/ 161,629 Da	Low in all tissues except pancreas
ABCC11/MRP8	16q12.1	4576 bp	1382 AA/ 154,301 Da	Low in all tissues except kidney, spleen, colon, brain
ABC C12/MRP9	16q12.1	5168 bp	1359 AA/ 152,244 Da	Breast, testes (4.5 kb transcript); brain, skeletal, and ovary (1.3 kb transcript)
ABC C13/PRED6	21q 11.2	Pseudogene	-	-

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนขนส่งที่ทำหน้าที่ขนส่งยา tenofovir นั้น Ray AS และคณะ^[39] ทำการศึกษาทดลองเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีนขนส่ง(Transporter proteins) ชนิด P-glycoprotein โดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยใช้ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) แล้วปลูกถ่าย P-glycoprotein ลงในเซลล์เมมเบรน จากนั้นวัดการทำหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่ง P-glycoprotein ด้วยการวัดปริมาณของแคลซิน(Calcein) ในเซลล์ดังกล่าวในสภาวะที่มี substrate ของตัวโปรตีนขนส่ง P-glycoprotein ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เวอร่าพามิล(Verapamil) เทียบกับยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ซึ่งผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มี substrate ของตัวโปรตีนขนส่งชนิด P-glycoprotein คือ เวอร่าพามิล (Verapamil) นั้นจะมีการสะสมของแคลซิน(Calcein) ในเซลล์ MDKCII เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามปริมาณของ substrate ที่เพิ่มสูงขึ้น แต่ในทางกลับกันไม่พบความแตกต่างการสะสมของแคลซิน(Calcein) ในเซลล์ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) ของการทดลองที่ใช้ยาทีโนโฟเวียร์ในขนาดปริมาณที่แตกต่างกัน(ดังแสดงในรูปที่ 8)



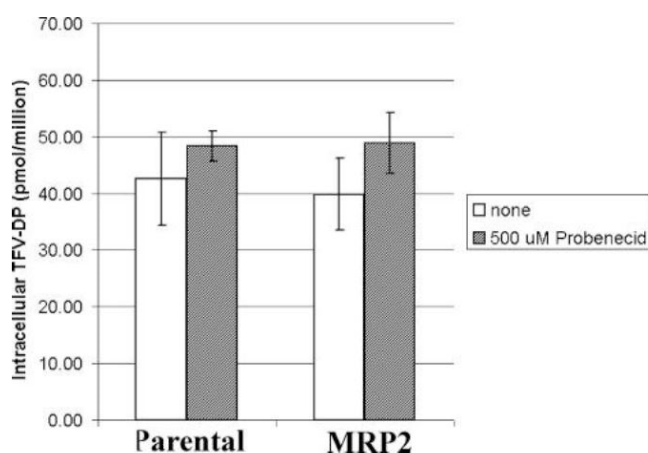
รูปที่ 8 กราฟแท่งแสดงปริมาณของแคลเซียม (Calcein) ภายในเซลล์ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) ในสถานะที่มีเวอร่าพามิล(Verapamil) และทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) เป็น substrate

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเพื่อสนับสนุนการทดลองก่อนหน้า โดยวัดการใช้พลังงาน ATP ในรูปของ ATPase activity ซึ่งจะสูงขึ้นในสถานะที่ตัวโปรตีนขนส่งนั้นมีความเฉพาะเจาะจงกับ substrate ที่ใส่ลงไปในระบบ ซึ่งในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ insect vesicle cell ที่มี over expression ของตัวโปรตีนขนส่งชนิด P-glycoprotein โดยเปรียบเทียบยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) กับยาเวอร่าพามิล(Verapamil) ซึ่งผลการทดลองพบว่ามี ATPase activity สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่มีเวอร่าพามิล(Verapamil) เป็น substrate เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) เป็น substrate กับพบว่า ATPase activity ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ (ดังแสดงในรูปที่ 9) ดังนั้นจากผลการทดลองสรุปได้ว่าโปรตีนขนส่งชนิด P-glycoprotein ไม่มีบทบาทใดๆ เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต



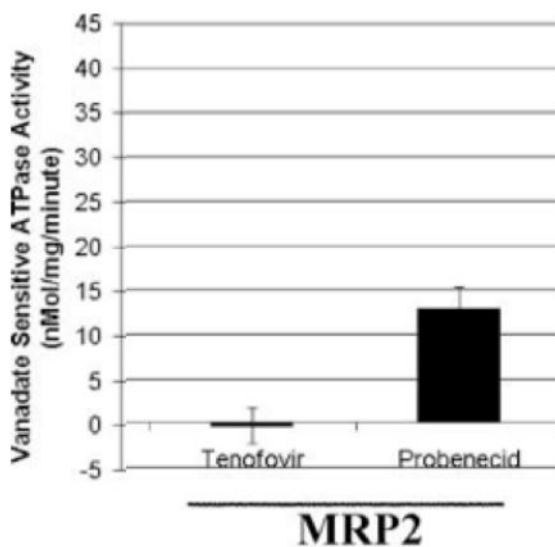
รูปที่ 9 กราฟแท่งแสดง ATPase activity ในสถานะที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir)และยาเวอร่าพามิล (Verapamil) เป็น substrate

ในขณะเดียวกัน Ray AS และคณะ^[39] ทำการศึกษาโดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองบทบาทหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ว่ามีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ท่อไตหรือไม่ โดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยใช้ Mardin darby kidney cell line(MDKCII) แล้วปลูกถ่ายตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ลงในเซลล์เมมเบรนของเซลล์ชนิดดังกล่าว ผู้วิจัยวัดผลการทดลองโดยดูปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ชนิดดังกล่าวในสภาวะที่มีและไม่มีสารยับยั้งการทำงานของตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้โพรเบนเนซิด(Probenecid) เป็นสารยับยั้ง ซึ่งผลการทดลองพบว่าปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ที่มีหรือไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ไม่แตกต่างกัน (ดังแสดงในรูปที่ 11)



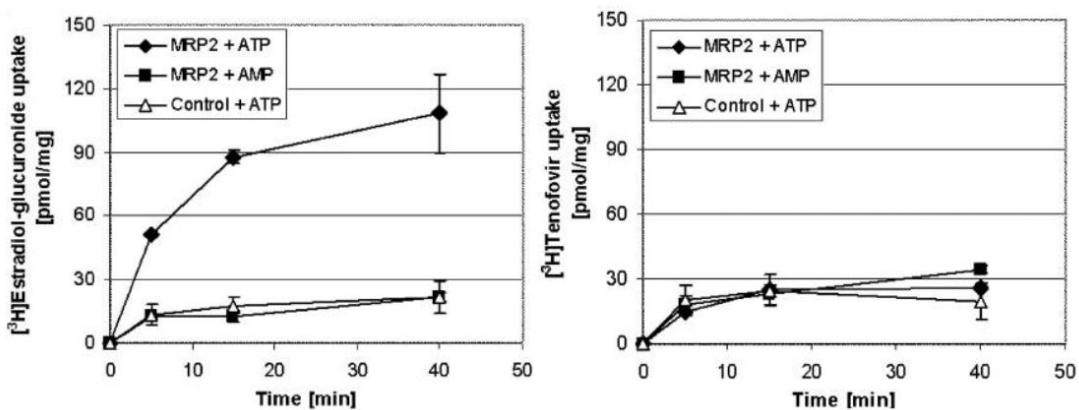
รูปที่ 10 กราฟแท่งแสดงปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์ Mardin darby kidney cellline(MDKCII) ที่มีและไม่มีสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการปลูกถ่ายตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2

นอกจากนี้ที่ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเพื่อสนับสนุนการทดลองโดยวัดการใช้พลังงาน ATP ในรูปของ ATPase activity ซึ่งจะสูงขึ้นในสภาวะที่ตัวโปรตีนขนส่งนั้นมีความเฉพาะเจาะจงกับ substrate ที่ใส่ลงไปในระบบ ซึ่งในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ insect vesicle cell ที่มี over expression ของตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 โดยเปรียบเทียบยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) กับโพรเบนเนซิด(Probenecid) ซึ่งผลการทดลองพบว่า ATPase activity สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่มียาโพรเบนเนซิด(Probenecid) เป็น substrate เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) เป็น substrate กับพบว่า ATPase activity ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ(ดังแสดงในรูปที่ 12) ดังนั้นจากการทดลองสรุปได้ว่าโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ไม่มีบทบาทใดๆ เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต(ดังแสดงในรูปที่ 12) ดังนั้นจากการทดลองสรุปได้ว่าโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ไม่มีบทบาทใดๆ เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต



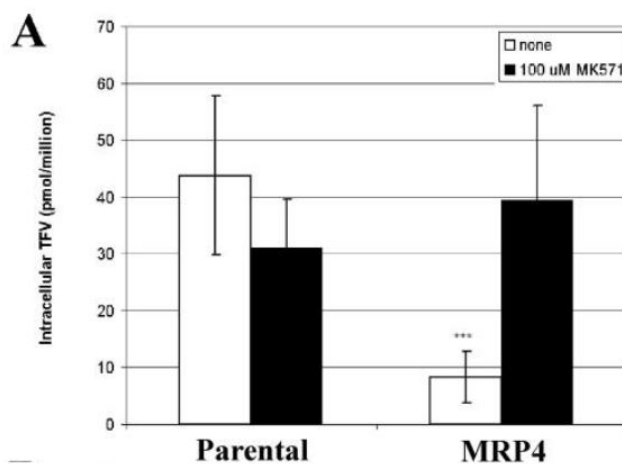
รูปที่ 11 กราฟแท่งแสดง ATPase activity ในสถานะที่มียาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir)และโพรเบนเนซิด(Probenecid) เป็น substrate ในเซลล์ MRP2-overexpressed

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลสรุปที่ได้สรุปเอาไว้ก่อนหน้านี้ว่า MRP2 ไม่ได้ทำหน้าที่ขนส่งยา tenofovir โดยใช้ Sf9 insect vesicle cell ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 โดยวัดผลการทดลองจากอัตราการ uptake ของเอสตราไดออล กลูคูวิโรไนน์(Estradiol-glucuronide) เทียบกับยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ภายใต้สภาวะการทดสอบที่มีหรือไม่มี ATP ซึ่งการทดลองนี้พบว่าอัตราการ uptake ของเอสตราไดออล กลูคูวิโรไนน์(Estradiol glucuronide)เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับในสถานะที่ไม่มี ATP ในทางตรงกันข้ามอัตราการ uptake ยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ไม่แตกต่างกันทั้งในสถานะที่มีหรือไม่มี ATP ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีนขนส่งชนิด MRP2 ไม่ได้มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต(ดังแสดงในรูปที่ 12)



รูปที่ 12 กราฟเชิงเส้นแสดงอัตราการ uptake ของยาเอสตราไดออล กลูคูวิโรไนน์(Estradiol glucuronide) เทียบกับยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในสถานะที่มีหรือไม่มี ATP

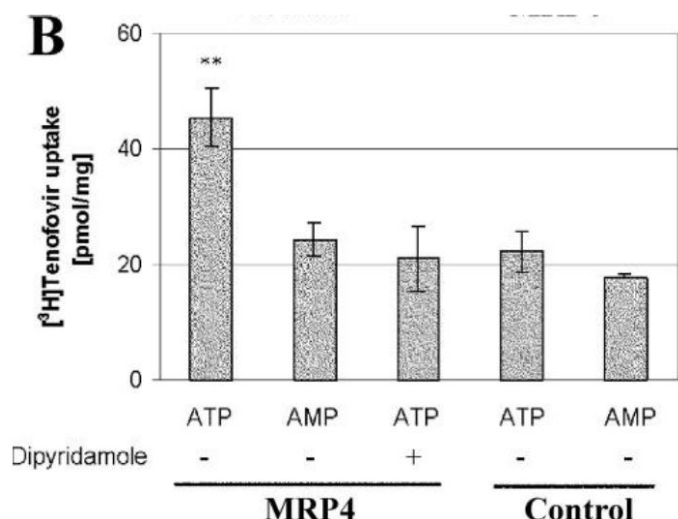
Ray AS. และคณะ^[39] ได้ทำการศึกษาโดยออกแบบการทดลองบทบาทหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 ว่ามีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไตหรือไม่ โดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยใช้เซลล์ CEM-R1 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 โดยวัดปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ภายในเซลล์ดังกล่าวเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีหรือไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่ง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ MK571 เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ MRP4 และเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่มี over expression ของ MRP4 จากผลการทดลองพบว่ามีปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ในเซลล์ดังกล่าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่มี over expression ของ MRP4 และมีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคือ MK571 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์ที่ไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่ง (ดังแสดงในรูปที่ 13)



รูปที่ 13 กราฟแท่งแสดงปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์ CEM-R1 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 ในสถานะที่มีหรือไม่มี MK571 ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4

ผู้วิจัยออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต โดยการนำเซลล์ Sf9 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 และวัดปริมาณการ uptake ของ ทีโนโฟเวียร์ภายใต้สถานะที่มีหรือไม่มี ATP และตัวยับยั้งการทำงานของตัวขนส่งโปรตีนชนิด MRP4 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Dipyridamole เปรียบเทียบกัน จากผลการศึกษานั้นพบว่าเซลล์ Sf9 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 มีปริมาณการ uptake ของยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ Sf9 ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมและเซลล์ Sf9 ที่มี Dipyridamole และ/หรือ ไม่มี ATP (ดังแสดงในรูปที่ 15) จากผลการทดลองเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีน

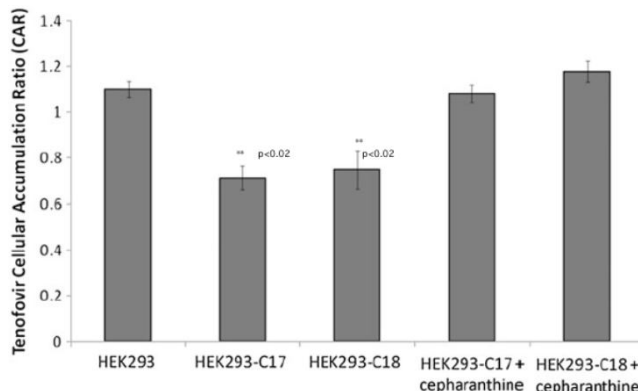
ขนส่งชนิด MRP4 ทั้งสองการศึกษาจะพบว่า MRP4 มีบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต



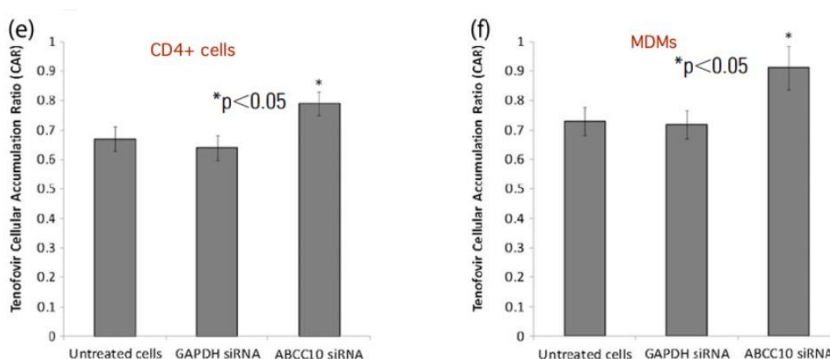
รูปที่ 14 กราฟแท่งแสดงปริมาณการ uptake สะสมของยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ภายในเซลล์ Sf9 insect vesicle cell ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี ATP และ Dipyrindamole ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP4

ในปี 2011 มีการค้นพบโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งชนิดใหม่ที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ออกจากเซลล์ท่อไต ซึ่งการศึกษานี้ Pushpakom SP และคณะ^[8] ได้นำเซลล์ HEK293 มาปลูกถ่ายด้วยโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 จากนั้นนำเซลล์ HEK293 ไป incubate ในสารละลายยาทีโนโฟเวียร์ จากนั้นวัดปริมาณยาทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) สะสมภายในเซลล์ ภายใต้สภาวะที่มีหรือไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ เซฟาแรนทีน (Cepharantine) เปรียบเทียบกัน จากผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ HEK293 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 และมีเซฟาแรนทีน(Cepharantine) จะมีการสะสมของยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ภายในเซลล์สูงกว่าเซลล์ HEK293 ที่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 แต่ไม่มีเซฟาแรนทีน (Cepharantine) และเซลล์ HEK293 ที่ไม่มี over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7(ดังแสดงในรูปที่ 16) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำเซลล์ T-lymphocytes CD4+ และ Monocyte derived macrophage(MDM) มาศึกษาทดลองเนื่องจากพบ over expression ของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ด้วยเช่นกันในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 แต่จะทำการ knockdown โปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ด้วยวิธีการ siRNA แล้ววัดปริมาณสะสมของยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในเซลล์เปรียบเทียบกัน จากการศึกษาทดลองพบว่าเซลล์ที่มีการ knockdown โปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ด้วย siRNA จะพบปริมาณการสะสมของยา

ทีโนโฟเวียร์(T e n o f o v i r) ใน เซลล์ T-lymphocytes(CD4+) และ Monocyte derived macrophage(MDM) สูงกว่าเซลล์ที่ไม่มีการ knockdown โปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ด้วย siRNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(ดังแสดงในรูปที่ 17)

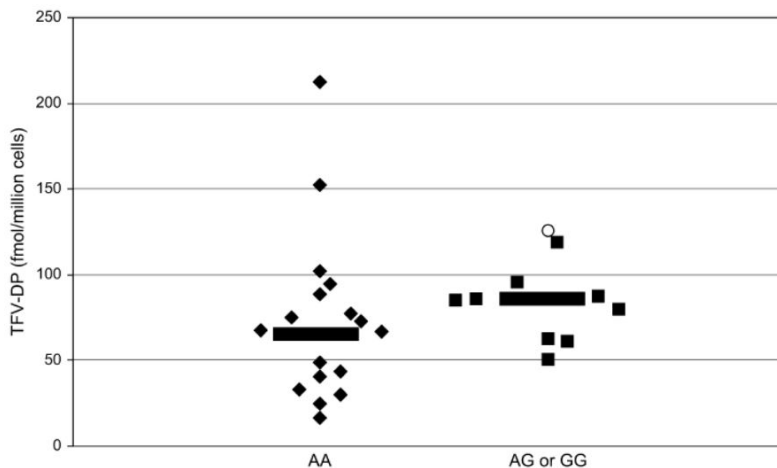


รูปที่ 15 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนของปริมาณสะสมยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในเซลล์ HEK293 ที่มีปลุกถ่ายโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี เซฟาแรนทีน(Cepharanthine) ที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7



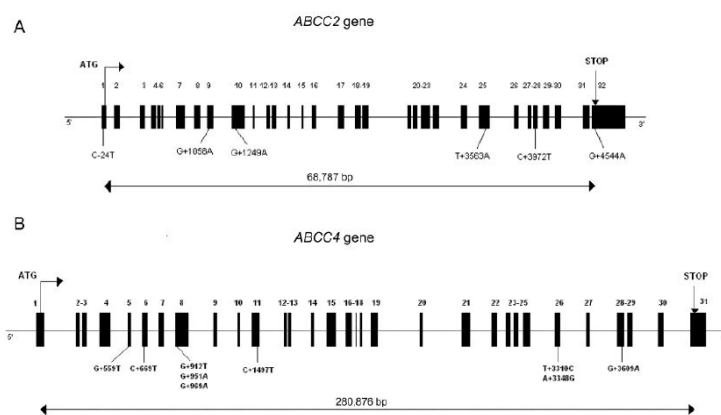
รูปที่ 16 กราฟแท่งแสดงสัดส่วนของปริมาณสะสมยาทีโนโฟเวียร์(Tenofovir) ในเซลล์ HEK293 ที่มีปลุกถ่ายโปรตีนขนส่งชนิด MRP7 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี เซฟาแรนทีน(Cepharanthine) ที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิด MRP7

สำหรับการศึกษาด้าน Genetic Polymorphisms นั้น Kiser JJ. และคณะ^[40] ได้ทำการศึกษา Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) ของยีน SCL22A6, ABCC2 และ ABCC4 ในผู้ป่วยเอชไอวี จำนวน 30 ราย โดยเลือกอัลลีนที่มีการรายงานเอาไว้ว่ามี variant มากกว่า 5% ขึ้นไป ได้แก่ SCL22A6 (728G>A, 453 G>A), ABCC2(-24C>T and 1249G>A)และ ABCC4(3463 A>G,4131T>G) อย่างละ 2 ตำแหน่ง จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มข้นของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ซึ่งผลการศึกษาพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพียงตำแหน่งเดียว คือ ABCC4(3463 A>G) พบ median concentration ของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์สูงกว่า 35% เมื่อเทียบกันระหว่างผู้ป่วยเอชไอวีที่มี variant type กับ wild type(ดังแสดงในรูปที่ 18)



รูปที่ 17 แสดงค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของยาทีโนโฟเวียร์ภายในเซลล์ PBMCs ในผู้ป่วยเอชไอวีที่มี variant type ที่ตำแหน่ง ABCC4(3463 A>G) เทียบกับ wild type

Izzedine H. และคณะ[41] ได้ศึกษาผลของ SNPs ของยีน ABCC2 และ ABCC4 ในผู้ป่วยเอชไอวีจำนวน 30 ราย โดยผู้วิจัยแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่มีการทำงานของไตที่ผิดปกติจำนวน 17 ราย และกลุ่มที่มีการทำงานของไตผิดปกติจำนวน 13 ราย แล้วนำเลือดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมาศึกษา genetic variations โดยเลือกตำแหน่งต่างๆ บนยีน(ดังแสดงในรูปที่ 19) ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า SNPs ของยีน ABCC2 และ ABCC4 ที่ตำแหน่ง 1249 G> A และ 669C>T ตามลำดับ ของแต่ละยีนเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้นที่พบในผู้ป่วยเอชไอวีที่มีการทำงานของไตผิดปกติมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการทำงานของไตปกติ(ดังแสดงตารางที่ 1 และ 2)



รูปที่ 18 แสดงตำแหน่งของ SNPs บนยีน ABCC2 และ ABCC4 ที่ Izzedine H. และคณะ^[40] นำมาศึกษา genetic variations

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs บนยีน ABCC2 ที่ตำแหน่ง 1249 G>A ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย

Gene	Location, polymorphism (dbSNP accession no.)	Amino acid	Genotype or allele	Frequency, no. (%)		P
				Group 1 (n = 13)	Group 2 (n = 17)	
	Exon 10, 1249 G→A (rs2273697)	Val417Ile	Genotype			.02
			GG	3 (23)	11 (64)	
			GA	9 (69)	6 (35)	
			AA	1 (8)	0	
			Allele			
			G	15 (57.7)	28 (82.4)	
			A	11 (42.3)	6 (17.6)	

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs บนยีน ABCC4 ที่ตำแหน่ง 669 C>T ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย

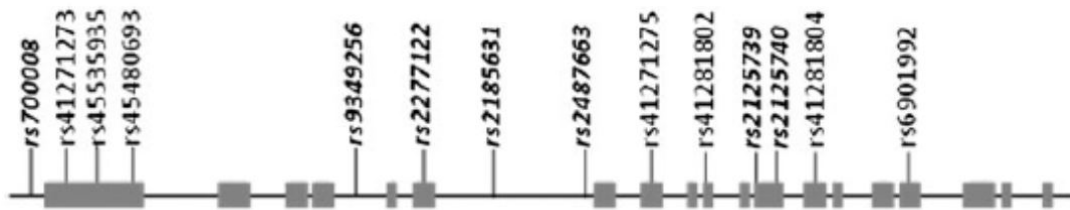
Gene	Location, polymorphism (dbSNP accession no.)	Amino acid	Genotype or allele	Frequency, no. (%)		P
				Group 1 (n = 13)	Group 2 (n = 17)	
ABCC4	Exon 6, 669 C→T (rs899494)	Ile223Ile	Genotype			.04
			CC	6 (46)	14 (82)	
			CT	7 (54)	3 (18)	
			TT	0	0	
			Allele			
			C	19 (73.1)	31 (91.2)	
			T	7 (26.9)	3 (8.8)	

นอกจากนี้ Izzedine H. และคณะ[41] ได้นำ SNPs ของแต่ละตำแหน่งบนยีน ABCC2 มาวิเคราะห์แบบ SNPs haplotype ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าถ้าผู้ป่วยเอชไอวีที่มี haplotypes แบบ CATC บนยีน ABCC2 ที่ตำแหน่ง 5'-UTR/exon 10/exon 25/exon 28 จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อไตสูงกว่าผู้ป่วยเอชไอวีที่มี SNPs haplotype แบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.01$) (ดังแสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs haplotype บนยีน ABCC2 ที่ตำแหน่ง 5'-UTR/exon 10/exon 25/exon 28 ในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย

Haplotype (5'-UTR/exon 10/ exon 25/exon 28)	KTD		no-KTD	
	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2
CATC ^a	11 (40.9)	5 (13.7)		
CGTC	5 (20.2)	10 (30.4)		
CGAC ^a	0	7 (20.2)		
CGTT	5 (18.4)	4 (10.5)		
TGTT	5 (18.8)	7 (19.8)		
CAAC	0	1 (2.6)		

Pushpakom SP และคณะ[8] ทำการศึกษา genetic variations ในผู้ป่วยเอชไอวี จำนวน 115 ราย ผู้วิจัยแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการทำงานของไตผิดปกติ จำนวน 19 รายและการทำงานของไตปกติ 96 ราย และผู้วิจัยเลือกตำแหน่งของยีน ABCC10 จำนวน 14 ตำแหน่งมาวิเคราะห์(ดังแสดงในรูปที่ 20) ซึ่งผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์พบว่าที่ตำแหน่ง 43404511 A>G เพียงตำแหน่งเดียวที่แสดงความสัมพันธ์กับความผิดปกติของการทำงานของไตที่มีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.02$) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ข้อมูลแบบ extended haplotypes ระหว่างยีน ABCC10 และ ABCC2 พบว่า ถ้าผู้ป่วยเอชไอวีมี extended haplotype แบบ GGC-CGTC จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อไตสูงกว่า wild type ถึง 3 เท่า(ดังแสดงตาราง 4)

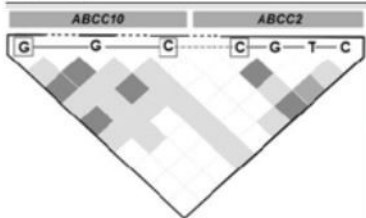


รูปที่ 19 แสดงตำแหน่ง SNPs บนยีน ABCC10 ที่ Pushpakom SP และคณะ ทำการศึกษา genetic variations

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ SNPs haplotype บนยีน ABCC10 ที่ตำแหน่ง rs9349256, rs2125739 และการวิเคราะห์แบบ SNPs haplotype ในผู้ป่วยเอชไอวี 115 ราย

SNP marker/haplotype	Associated Allele	Allele/haplotype frequency, %		OR (95%CI) ^a	P
		Control group (n = 96)	KTD group (n = 19)		
rs9349256 (intron 4)	G	52.6	72.2	2.3 (1.1–5.3)	.02
rs2125739 (exon 12)	C Ile920Thr	23.4	38.8	2.0 (.9–4.4)	.05
		23.0	38.9	2.1 (.9–4.6)	.05

ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษา genetic variation ของ extended SNPs haplotype บนยีน ABCC10 - ABCC2 ในผู้ป่วยเอชไอวี 115 ราย

ABCC10-ABCC2 haplotype ^a	Frequency, %		OR (95% CI) ^b	P
	Control group	KTD group		
	8.4	22.1	3.0 (1.2-7.9)	.01

จากผลการศึกษาข้างต้นเกี่ยวกับการขนส่งยาทีโนโฟเวียร์ในเซลล์หลอดไตฝอยนั้นพบว่า renal organic anion transporter ชนิด 1 และ 3 (hOAT1 และ hOAT3) เกี่ยวข้องกับการขนส่งยา tenofovir เข้าสู่เซลล์ท่อไตส่วนต้นก่อนที่จะขับออก ซึ่งกลัยโคโปรตีน hOAT1 เป็นระบบขนส่งหลักและ hOAT3 เป็นระบบเสริม^[6,29,48] ทำให้มีผลต่อการสะสมยา tenofovir บริเวณเซลล์ท่อไตส่วนต้น(proximal tubules) อาจนำไปสู่ความเป็นพิษต่อเซลล์ไตได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามียกลัยโคโปรตีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการขับออกของยา tenofovir จากเซลล์ท่อไตส่วนต้น เช่น ABCC4(MRP4)^[6] และ ABCC10(MRP7)^[8] ซึ่งเป็นกลัยโคโปรตีนทำหน้าที่ขจัดยา tenofovir จากเซลล์ท่อไตส่วนต้นออกสู่ tubular lumen มีบทบาทสำคัญในการสะสมของยา tenofovir^[6,8,28] ในเซลล์ท่อไต ซึ่งการสะสมของยา tenofovir ในเซลล์ท่อไตส่วนต้นจนทำให้เกิด mitochondria toxicity^[7,29,45-47] เป็นกลไกที่คาดว่าจะก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis เหมือนกับยา Adefovir^[7,29,45] ซึ่งมีโครงสร้างที่คล้ายกัน ในส่วนของการศึกษาที่หาความสัมพันธ์ทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์(SNPs, single nucleotide polymorphism) ของ ABCC transporter protein กับผลการเกิดพิษต่อไตของยา tenofovir นั้น มีมากขึ้นเรื่อยๆ นอกจากการศึกษาข้างต้นแล้ว^[8,40-41] ยังมีการศึกษาอื่นๆ อีก^[42-44] ที่พยายามอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าว แต่ผลการศึกษานั้นยังขัดแย้งกันอยู่เพราะพบทั้งความสัมพันธ์ในเชิงบวกและเชิงลบ แต่ส่วนใหญ่ผลจะออกมาในทางที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ^[42] ซึ่งผู้วิจัยได้ให้ข้อเสนอแนะเอาไว้ว่าสนใจว่า การเกิด SNPs หรือ single nucleotide polymorphism นั้นเท่าที่มีรายงานอาจไม่ใช่ตำแหน่งที่สำคัญ^[42-43] หรืออาจมี pathway อื่นๆ ที่สามารถขับยาทีโนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ท่อไตฝอยได้ เช่น อาจมีตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนชนิดอื่นๆ อีก เป็นต้น ABCC11 หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า MRP8 เป็นกลัยโคโปรตีนขนส่งซึ่งค้นพบใหม่ในกลุ่ม ATP-binding cassette subfamily C^[30,32-34,49-52] โครงสร้างของ transporter protein มีความ คล้ายคลึงกับ ABCC4(MRP4), ABCC5(MRP5) และ ABCC12(MRP9)^[49-51] โดยถ้าเทียบกันระหว่าง ABCC4(MRP4) และ ABCC5(MRP5) โดยดูจากความเหมือนทางด้านโครงสร้างการเรียงตัวของกรดอะมิโนพบว่า ABCC11(MRP8) มีความใกล้เคียงกับ ABCC5(MRP5) อยู่มาก แต่ในขณะเดียวกันกับพบว่ามีความเหมือนกันของ substrate กับ ABCC4(MRP4) มากกว่า^[51-52,54] สำหรับ ABCC11 (MRP8) transporter protein ถูกค้นพบในปี 2001^[52] ซึ่ง encoded โดย abcc11 gene บนโครโมโซมคู่ที่ 16

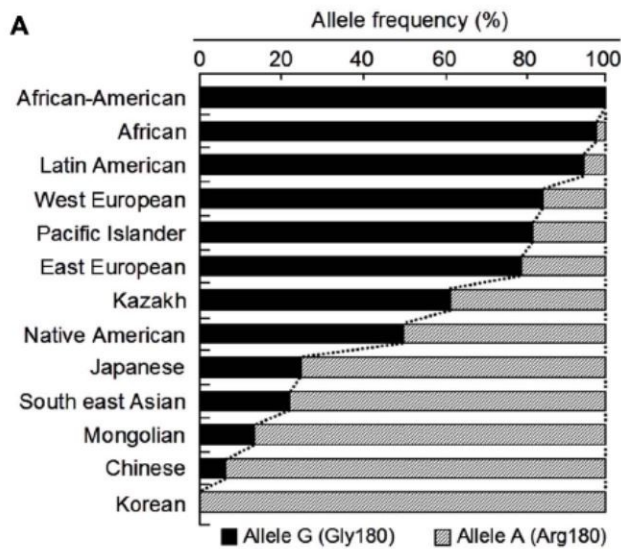
ตำแหน่ง 16q12^[30,32-35,49-52] ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่ encoded MRP9 แต่มีความต่างที่ splicing variance มี 30 exon^[53] และพบว่าถ้าเทียบกันแบบ tail-to-head จะมีความต่างกันระหว่าง MPR8 และ MRP9 อยู่ประมาณ 20 kb ของ nucleotide sequences^[49-51] จากการศึกษาพบว่า ABCC11 transporter protein กระจายอยู่ทั่วไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมนุษย์แต่มีจำนวนน้อยมาก ยกเว้น ในสมอง ตับ ลำไส้ใหญ่ ม้าม ต่อมลูกหมาก อัณฑะและไต^[38, 54-55] ทำหน้าที่ขนส่งสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย เช่น cyclic nucleotides^[49,52,54-56] (cAMP และ cGMP), folic acid, LCT4^[57] หรือ ขนส่งสารบางชนิด^[52, 56-58] เช่น conjugated bilirubin, bile acid, DHEAS, E13S, E217BG นอกจากนี้ยังพบว่ามี ความสามารถในการขับยาบางชนิดออกจากเซลล์ได้ เช่น methotrexate^[57-58], premetrexate^[58], 5-FU^[54,58], FdUMP, ddC, Ara-C และ PMEA^[58] ในส่วนของสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ABCC11 transporter protein ได้แก่ indomethacin, probenecid และ taurocholic acid^[47] (ดังแสดงใน ตารางที่ 6) นอกจากนี้ ABCC11 transporter protein ยังมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาเพื่อหาหน้าที่และความสัมพันธ์ทางด้านคลินิกต่อเนื่องเป็นลำดับ

ตารางที่ 8 ตารางแสดงคุณลักษณะพื้นฐานของ ABCC11 transporter protein[38, 49,52,53-58]

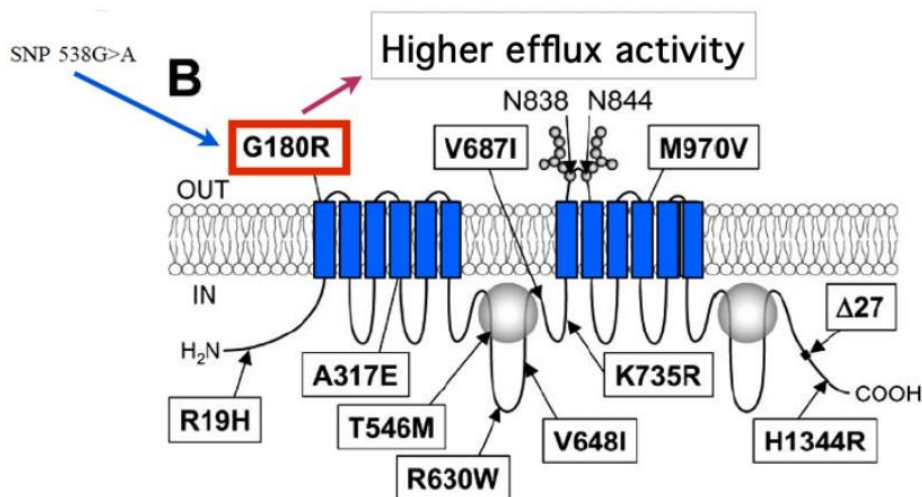
Members: symbol/alias	Location	Transcript length	Expression
ABC C11/MRP8	16q12.1	4576 bp	Low in all tissues except kidney, spleen, colon, brain
Function			
Substrate			
Conjugated bilirubin, Bile acid, Folic acid, cAMP, cGMP, LTC4, DHEAS, E13S, E217BG, MTA, MTX, 5-FU, FdUMP, Ara-C, PMEA, ddC			
Inhibitors			
Indomethacin Probenecid Taurocholic acid			

ABCC11(MRP8) transporter protein เป็น transmembrane transporter มีการจัดเรียงตัวของ โพรตีนบนเซลล์เมมเบรนเหมือนกับ transporter protein ตัวอื่นๆ ที่อยู่ใน subfamily C เดียวกัน คือ ประกอบไปด้วย 2 transmembrane domains และ 2 intracellular nucleotide binding domains ใน แต่ละ transmembrane domain จะประกอบด้วย 6 loop ของสายโพรตีน ABCC11(MRP8) จัดเป็น glycosylate protein ซึ่งมีอยู่ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ 838 และ 844 บน asparagine^[53] ในลำดับของกรดอะมิโน บนสายของโพรตีน(ดังแสดงในรูปที่ 21) ABCC11 transporter protein มี mutation ที่ร้ายแรงเอาไว้ใน หลายตำแหน่ง แต่ตำแหน่งที่ได้รับความสนใจและมีความสำคัญ คือ ตำแหน่งที่ 180 กรดอะมิโน glycine ถูก แทนที่ด้วย arginine พบมากใน African american พบน้อยในเอเชีย(ดังแสดงในรูปที่ 20) การเกิด mutation ที่ตำแหน่งนี้เกิดจาก polymorphism ของ abcc11 encoding gene ที่ตำแหน่ง 538 G>A จากการศึกษา พบว่าการเกิด mutation ที่ตำแหน่งดังกล่าวจะทำให้ transporter activity นั้นเพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับการเกิด

axillary osmidrosis, wet earwax type, colostrum secretion^[53-54] และการดื้อต่อยาบางชนิดที่ใช้รักษา มะเร็งเต้านม เช่น methotrexate และ premetrexate^[55]



รูปที่ 20 แสดง allele frequency distribution ของ ABCC11 SNP538 G>A^[47]



รูปที่ 21 แสดงการเรียงตัว(configuration) และ mutation ของโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11^[53]

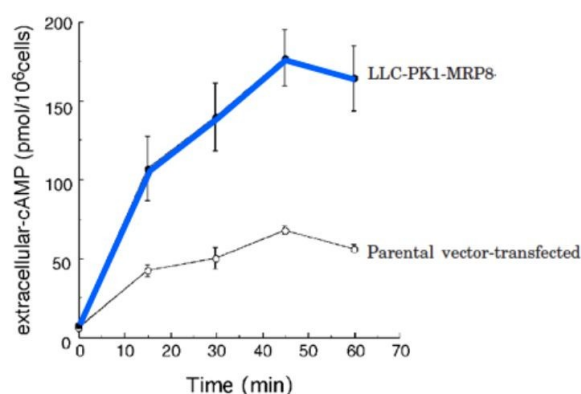
ในส่วนการศึกษาที่เกี่ยวข้องถึงการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนขนส่ง ABCC11 นั้น Guo Y และคณะ^[61] ทำการศึกษาทดลองเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีนขนส่ง(Transporter proteins) ชนิดABCC11 ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง cAMP, cGMP โดยผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยใช้ Pig kidney cell line(LLC-PK1) แล้วปลูกถ่าย ABCC11 ลงในเซลล์เมมเบรน จากนั้นวัดการทำหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่ง ABCC11 ด้วยการวัดปริมาณสะสมของ cAMP ในเซลล์ดังกล่าวในสถานะที่มีและไม่มีForskolin ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพิ่มปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์ ผู้วิจัยวัดปริมาณสะสมของ cAMPด้วยวิธี ELISA จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่มี ABCC11 overexpression มีปริมาณสะสมของcAMP ภายในเซลล์ที่มีหรือไม่มี cAMP stimulant นั้นน้อย

กว่าในเซลล์ควบคุม 28% และ 34% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 8) แต่ในทางกลับกันพบว่าปริมาณของ cAMP ภายนอกเซลล์สูงกว่า (ดังแสดงในรูปที่ 3)

ตารางที่ 9 ตารางแสดงปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี Forskolin ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์

Treatment	LLC-PK1-pcDNA	LLC-PK1-MRP8-1	LLC-PK1-MRP8-2
	<i>pmol/10⁶ cells</i>	<i>pmol/10⁶ cells</i>	<i>pmol/10⁶ cells</i>
None	6.6 ± 3.1	4.7 ± 2.1 ^a	4.3 ± 2.7 ^a
Forskolin	210 ± 110	138 ± 93 ^a	173 ± 98 ^a

^a Values are significantly different ($p < 0.05$) from the corresponding control transfectant values as determined by the two-tailed nonparametric Wilcoxon test.



รูปที่ 22 แสดงปริมาณของ cAMP ภายนอกเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี Forskolin ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์

ตารางที่ 10 ตารางแสดงปริมาณของ cGMP ภายในเซลล์ Pig kidney cell line(LLC-PK1) ในสภาวะที่มี SIN-1A ซึ่งใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณของ cGMP ภายในเซลล์

Treatment	LLC-PK1-pcDNA		LLC-PK1 MRP8-1	
	Intracellular	Extracellular	Intracellular	Extracellular
	<i>pmol/10⁶ cells</i>		<i>pmol/10⁶ cells</i>	
None	2.0 ± 0.8	4.3 ± 1.8	1.3 ± 0.6 ^a	5.0 ± 1.2 ^a
SIN-1A	9.0 ± 4.5	26.1 ± 3.2	5.1 ± 1.8 ^a	32.4 ± 5.1 ^a

^a Values are significantly different ($p < 0.05$) from the corresponding control transfectant values as determined by the two-tailed nonparametric Wilcoxon test.

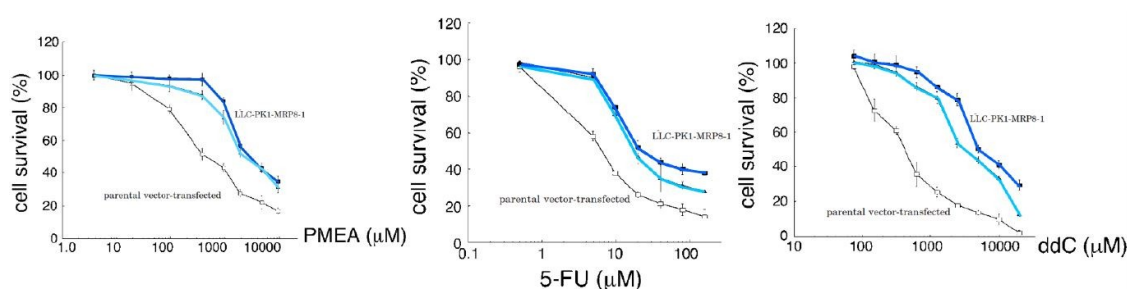
จากนั้นวัดการทำหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่ง ABCC11 ด้วยการวัดปริมาณสะสมของ cGMP ในเซลล์ ดังกล่าวในสภาวะที่มีและไม่มี SIN-1A ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพิ่มปริมาณของ cGMP ภายในเซลล์ ผู้วิจัยวัดปริมาณ

สะสมของ cGMP ด้วยวิธี ELISA จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่มี ABCC11 overexpression มีปริมาณสะสมของ cGMP ภายในเซลล์ที่มีหรือไม่มี cGMP stimulant นั้นน้อยกว่าในเซลล์ควบคุม 35% และ 43% ตามลำดับ แต่ในทางกลับกันพบว่าปริมาณของ cGMP ภายนอกเซลล์สูงกว่า 14% และ 26% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 9) ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 กับ Drug sensitivity โดยใช้ MTT cytotoxic assay เทียบกันระหว่าง Pig kidney cell line (LLC-PK1) ที่มี ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุม จากผลการศึกษาพบว่า LLC-PK1-ABCC11 overexpression ตื้อต่อยา PMEA, ddC, 5-FUra, 5-FdUrd และ 5-dFUrd แต่ไม่พบการตื้อต่อยาชนิดอื่นๆ (ดังแสดงในตารางที่ 10)

ตารางที่ 11 ตารางแสดงความไวต่อยาของ LLC-PK1-ABCC11 overexpression เทียบกับเซลล์ควบคุม

Agent	IC ₅₀		-Fold resistance
	LLC-PK1-pcDNA	LLC-PK1-MRP8-1	
	μM		
PMEA	457 ± 79	2463 ± 386	5.4 ^a
6-TG	500 ± 41	546 ± 100	1.1
CdA	8.1 ± 2.7	8.2 ± 4.6	1.0
DCF	256 ± 52	263 ± 50	1.0
3TC	869 ± 56	1078 ± 48	1.4
AZT	507 ± 86	639 ± 41	1.3
ddC	384 ± 52	2430 ± 155	6.1 ^a
5-FUra	8.8 ± 3.0	26.2 ± 12	2.9 ^a
5-FdUrd	20.3 ± 9.0	105 ± 39	5.2 ^a
5-dFUrd	29.0 ± 8.6	98.7 ± 35	3.4 ^a
VCR	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	1.1
Taxol	0.35 ± 0.07	0.37 ± 0.05	1.1
DOX	0.42 ± 0.03	0.45 ± 0.1	1.1
ETOP	0.92 ± 0.04	1.21 ± 0.10	1.2

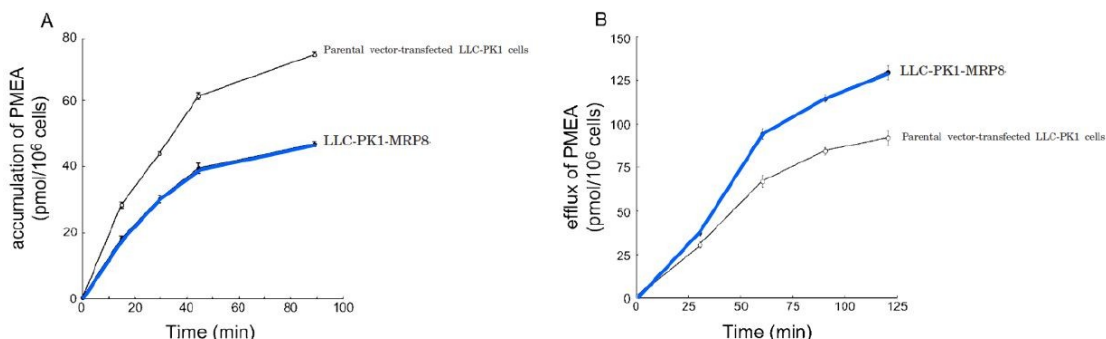
ผู้วิจัยแสดงผลการวิเคราะห์การตื้อต่อยา PMEA, ddC และ 5-FU ของเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression เทียบกับเซลล์ควบคุม โดยพบว่า การตื้อต่อยาต่างๆ ของเซลล์ชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ความแตกต่างจะมีช่วงกว้างขึ้นในความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้นตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 23)



รูปที่ 23 แสดงความไวของ LLC-PK1-ABCC11 overexpression ต่อ PMEA, ddC และ 5-FU ที่ระดับความเข้มข้นของยาต่างๆ กัน

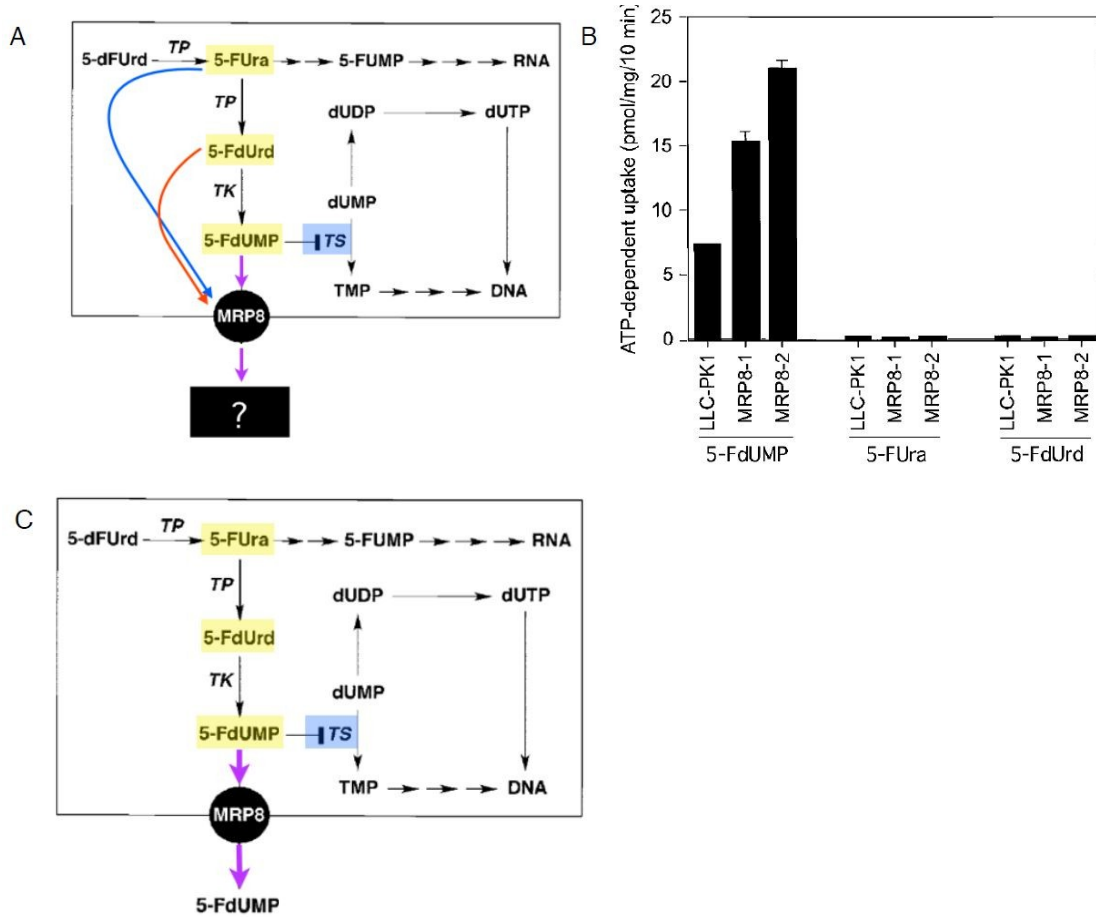
ผู้วิจัยศึกษาผลของตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ต่อการตื้อต่อยา PMEA ในเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression โดยวัดปริมาณสะสมของ ³H-PMEA ภายในและภายนอกเซลล์ เทียบกับเซลล์ควบคุม โดยพบว่าปริมาณสะสมของ ³H-PMEA ภายในเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression มีน้อยกว่าแต่ในขณะที่

ปริมาณสะสมภายนอกเซลล์มีมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 24) ดังนั้นบทบาทของตัวขนส่งโปรตีน ABCC11 ในการดื้อต่อยา PMEA ของเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression เกี่ยวข้องกับการที่ตัวขนส่งโปรตีน ABCC11 สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้



รูปที่ 24 แสดงปริมาณสะสมของ PMEA ภายนอกและภายในเซลล์ LLC-PK1-ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุมที่เวลาต่างๆ กัน(A; intracellular PMEA concentration และ B; extracellular PMEA concentration)

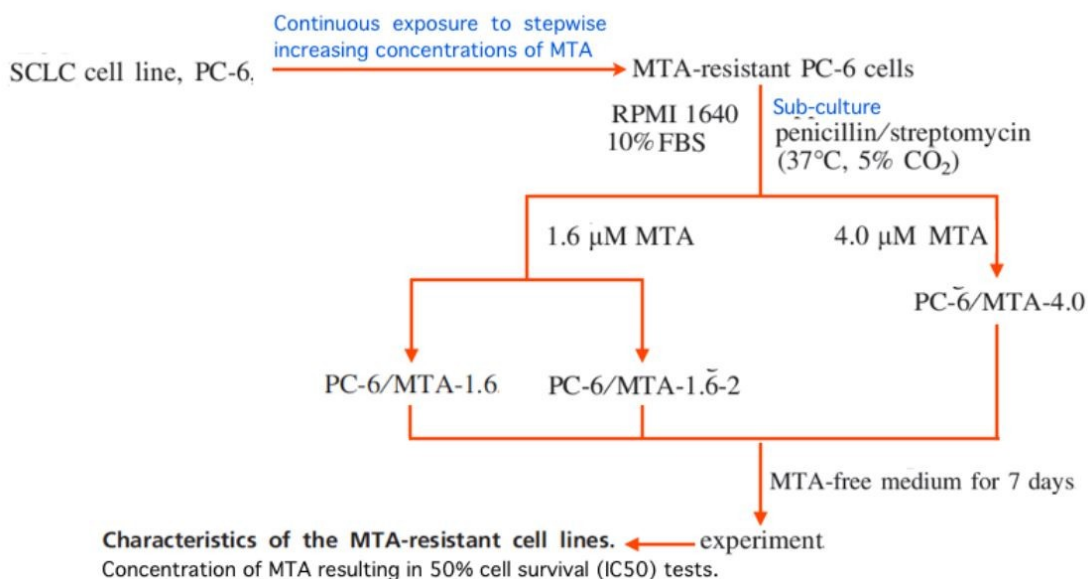
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของตัวขนส่งโปรตีน ABCC11 กับการดื้อต่อยากลุ่ม fluoropyrimidines โดยผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าตัวขนส่งโปรตีนชนิดนี้น่าจะขับเอา active metabolites ตัวใดของยาในกลุ่ม fluoropyrimidines ออกจากเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 25A) โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เตรียม vesicle cell จาก LLC-PK1-ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุมด้วยวิธี nitrogen cavitation method และวัดปริมาณยา ^[3H]5-FdUMP, ^[3H]5-FUra และ ^[3H]5-FdUrd ที่สะสมภายใน vesicle cells ที่เตรียมได้ ภายหลังจากได้ใส่ยาลงไปในระบบ transport systems แล้ว ผลการศึกษาพบว่ายา ^[3H]5-FdUMP เพียงชนิดเดียวที่พบว่าถูก uptake ได้ (ดังแสดงในรูปที่ 25B) จึงสามารถสรุปได้ว่าบทบาทของโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ในการดื้อต่อยากลุ่ม fluoropyrimidines นั้น ตัวขนส่งโปรตีนชนิดนี้ขับเอา 5-FdUMP ออกจากเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 25C)



รูปที่ 25 (A และ C) แสดง schematic diagram บทบาทหน้าที่ของตัวขนส่งโปรตีน ABCC11 ในการต่อต่อยาในกลุ่ม fluoropyrimidines (B) แสดงปริมาณสะสมของ 3H 5-FdUMP, 3H 5-FUra และ 3H 5-FdUrd ใน vesicle transport system ที่เตรียมจาก LLC-PK1-ABCC11 overexpression และเซลล์ควบคุม

Uemura T. และคณะ^[62] ได้ศึกษาบทบาทของตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ในการต่อต่อยา Premetrexate ของเซลล์มะเร็งปอดในหลอดทดลอง ผู้วิจัยพัฒนาเซลล์ที่ต่อต่อยา premetrexate ขึ้นเองในห้องทดลอง โดยการนำเอาเซลล์มะเร็งปอดชนิด PC-6 มาพัฒนาให้เกิด PC-6 ที่ต่อต่อยา premetrexate (ดังแสดงในรูปที่ 26) เมื่อได้เซลล์ PC-6 ที่ต่อต่อยา premetrexate แล้วผู้วิจัยได้นำเอาเซลล์ดังกล่าวไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ premetrexate ในขนาด 1.6 ไมโครโมลาร์ และ 4 ไมโครโมลาร์ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่างๆ PC-6, MTA resistant cells จะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี premetrexate ก่อน 7 วัน ผู้วิจัยได้วิเคราะห์คุณลักษณะของ PC-6, MTA-resistant cells ที่ต่อต่อยา premetrexate และ methotrexate ด้วยการทำให้ MTT cytotoxic assay ผลของการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ PC-6, MTA-resistant มีคุณลักษณะเฉพาะตามที่ต้องการพัฒนาคือ ต่อต่อยา premetrexate และ methotrexate (ดังแสดงในตารางที่ 11) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการวิเคราะห์ mRNA expression ของโปรตีนขนส่งชนิดต่างๆ ในกลุ่ม ATP binding cassette ด้วย northern blot assay พบว่าใน PC-6, MTA-resistant cells มีปริมาณ ABCC11 protein expression มากกว่าเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 27) และผู้วิจัยยังทำการวิเคราะห์ protein expression ของโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ด้วย western blot assay

พบว่าใน PC-6, MTA-resistant cells มีปริมาณ protein expression มากกว่าเซลล์ควบคุม(ดังแสดงในรูปที่ 28)

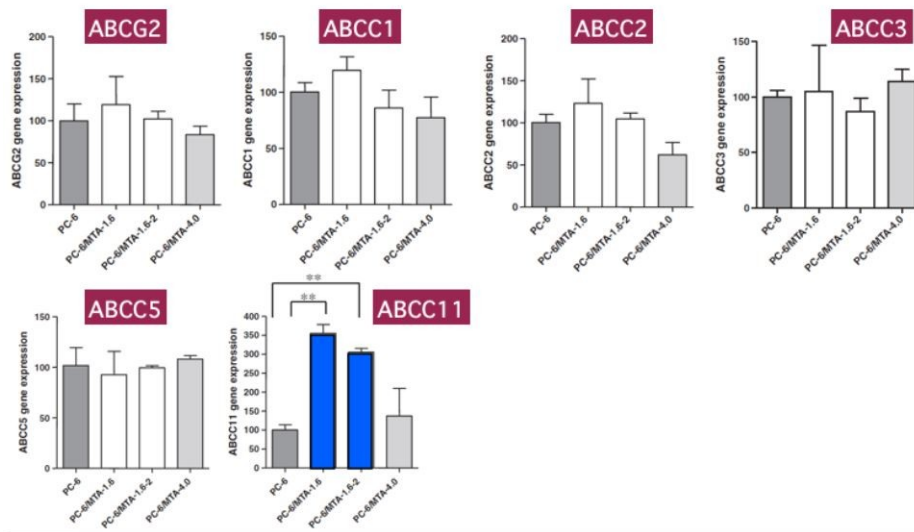


รูปที่ 26 แสดงวิธีการพัฒนา PC-6, MTA-resistant cell lines ในห้องทดลองโดยการ induction ให้เกิด MTA-resistant ด้วย continuous exposure ด้วย premetrexate โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง

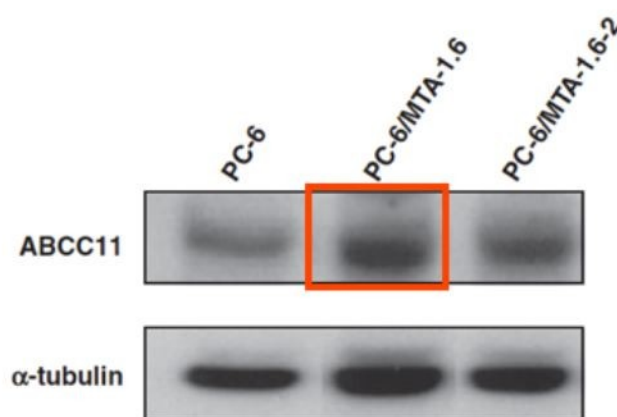
ตารางที่ 12 แสดงผล sensitivity analysis ด้วย MTT cytotoxic assay โดยใช้ PC-6, MTA-resistant cell lines และเซลล์ควบคุม

Cell lines	PC-6		PC-6/MTA-1.6		PC-6/MTA-1.6-2		PC-6/MTA-4.0	
	IC ₅₀ (95% CI)	IC ₅₀ (95% CI)	RR	IC ₅₀ (95% CI)	RR	IC ₅₀ (95% CI)	RR	
Pemetrexed (μM)	0.2253 (0.1689–0.3004)	7.327 (4.156–12.92)	32.52	7.513 (3.599–15.69)	33.4	98.24 (31.11–310.2)	436	
Methotrexate (nM)	2.207 (1.244–3.303)	5868 (1331–25880)	2895	6542 (3591–11920)	3227	21700 (8241–57150)	9832	
Etoposide (nM)	833.6 (542.1–1282)	756.8 (537.8–1065)	0.908	853.8 (581.4–1254)	1.02	652.0 (502.9–845.3)	0.782	
Docetaxel (nM)	1.146 (0.4742–2.767)	1.516 (0.5373–4.279)	1.323	1.216 (0.3262–4.535)	1.06	1.352 (0.7734–2.364)	1.18	
Vinorelbine (pM)	29.11 (18.96–44.69)	19.08 (11.72–31.07)	0.655	23.44 (14.13–38.87)	0.81	36.00 (25.20–51.43)	1.237	
Cisplatin (μM)	30.19 (2.034–395.6)	26.85 (9.783–73.68)	0.889	46.82 (8.081–271.3)	1.55	46.35 (14.33–150.0)	1.535	

MTA, pemetrexed; RR, resistance ratio: (IC₅₀ in resistant subline)/(IC₅₀ in the parental cells).



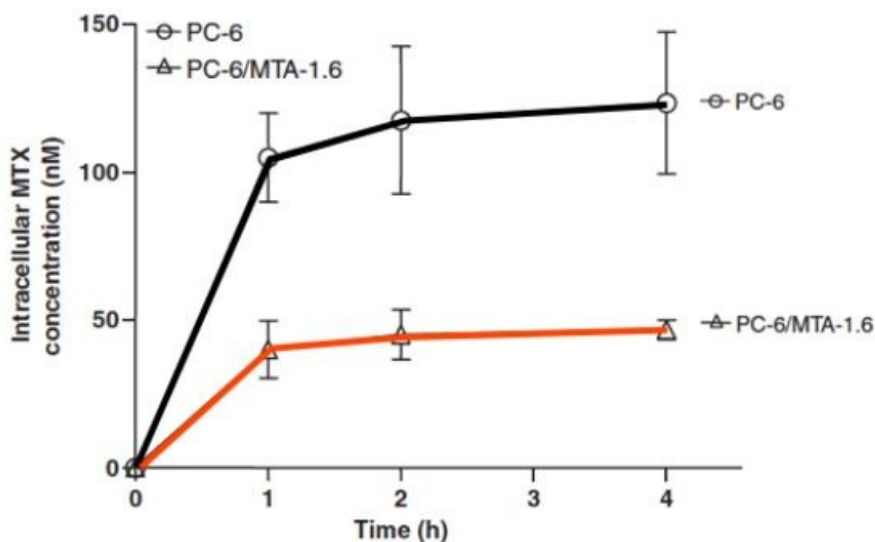
รูปที่ 27 แสดง mRNA expression ของตัวขนส่งโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี western blot analysis ของเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม



รูปที่ 28 แสดง protein expression ของตัวขนส่งโปรตีนชนิด ABCC11 ด้วยวิธี western blot analysis ของเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม

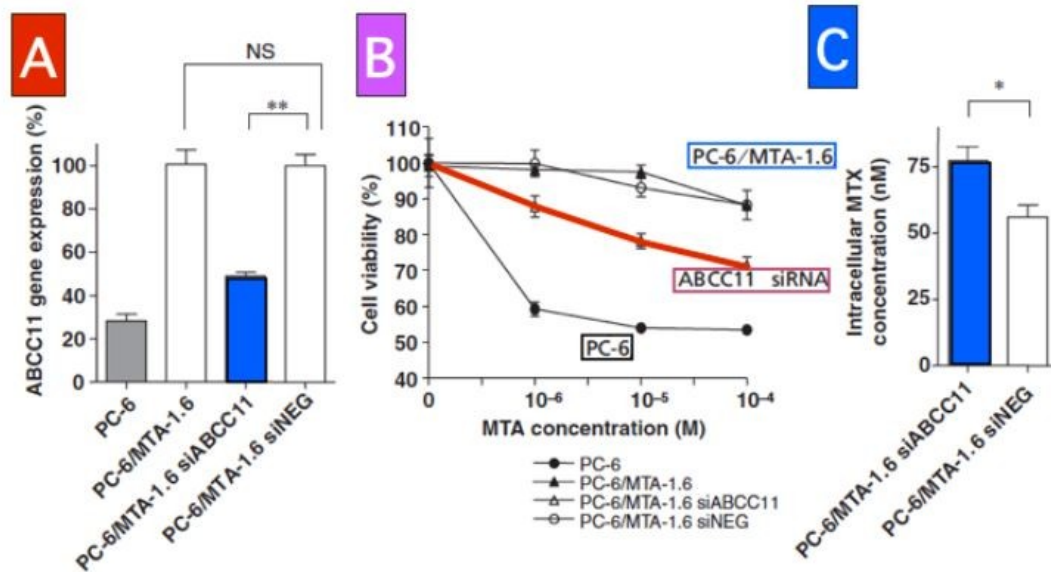
จากผลการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะที่ต้องการในเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม ได้ลักษณะเฉพาะตามที่ต้องการแล้ว ผู้วิจัยได้นำเอาเซลล์ดังกล่าวมาทำการทดลองเพื่อศึกษากลไกที่สัมพันธ์กันระหว่างตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 กับการต่อยา premetrexate และ methotrexate ของเซลล์ PC-6, MTA-resistant cell โดยผู้วิจัยได้นำเอาเซลล์ชนิดดังกล่าวมาศึกษาโดยมีสมมติฐานว่า กลไกที่เซลล์ PC-6, MTA-resistant ต่อต่อยาจะเกี่ยวข้องกับตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ทำหน้าที่ขับยา methotrexate หรือ premetrexate ออกจากเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาบทบาทหน้าที่ของตัวโปรตีนขนส่งชนิดนี้ โดยนำเอาเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุมมา incubate ในสารละลาย methotrexate 80 ไมโครโมลาร์ และวิเคราะห์การสะสมของยาภายในเซลล์ จากผลการศึกษาทดลองพบว่า

ความเข้มข้นของยาในเซลล์ PC-6, MTA-resistant มีค่าน้อยกว่าในเซลล์ควบคุมในทุกๆ จุดของเวลาที่ใช้ในการทดลอง จึงสรุปได้ว่าตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 ทำหน้าที่ขับยา methotrexate ออกจากเซลล์(ดังแสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 29 แสดง intracellular concentration ของ methotrexate ภายในเซลล์ PC-6, MTA-resistant และเซลล์ควบคุม

ผู้วิจัยทำการศึกษาดทดลองเพื่อยืนยันหน้าที่ของตัวขนส่งโปรตีนชนิด ABCC11 เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา premetrexate และ methotrexate ในเซลล์ PC-6, MTA-resistant โดยการเป็น transporter ขับยาดังกล่าวออกจากเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการดัดแปลงการทดลองด้วยการ knockdown ABCC11 transporter protein ในเซลล์ PC-6, MTA-resistant ด้วย siRNA ต่อ ABCC11 และทำการตรวจสอบคุณลักษณะที่ต้องการโดยใช้ northern blot assay จากผลการทดลองพบว่าในเซลล์ PC-6, MTA-resistant cells ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA มี ABCC11 gene expression น้อยกว่า PC-6, MTA-resistant cells และ PC-6, MTA-resistant cells ที่ knockdown ด้วย non-targeted siRNA (ดังแสดงในรูป 30A) จากนั้นผู้วิจัยได้นำเอาเซลล์ดังกล่าวมาศึกษาทดลองต่อโดยทำ sensitivity assay ด้วย MTT cytotoxic assay พบว่าในเซลล์ PC-6, MTA resistant ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA ต่อ ABCC11 มี cell viability เหนือกว่าเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 30B) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาดทดลองเกี่ยวกับกลไกที่เกี่ยวข้องกับตัวโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 กับการดื้อต่อยาของเซลล์ PC-6, MTA-resistant ผู้วิจัยศึกษาปริมาณยาสะสมภายในเซลล์ของ PC-6, MTA-resistant ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA เทียบกับ non-targeted siRNA จากผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ของ PC-6, MTA-resistant ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA มีปริมาณยา methotrexate สะสมอยู่ในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังแสดงในรูปที่ 30C) จึงอาจสรุปได้ว่าการที่เซลล์ PC-6, MTA-resistant มี ABCC11 transporter protein ทำหน้าที่ขับยา methotrexate ออกจากเซลล์



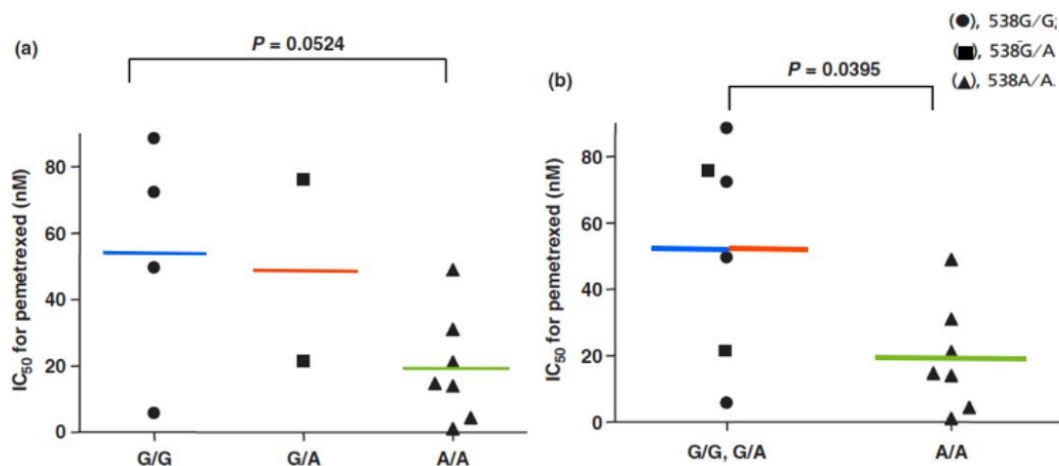
รูปที่ 30 (A) แสดง ABCC11 gene expression level (B) แสดงผล MTT cytotoxic assay (C) แสดง intracellular concentration ของ methotrexate ภายในของเซลล์ PC-6, MTA-resistant ที่ knockdown ABCC11 ด้วย siRNA และเซลล์ควบคุม

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP 538 G>A และ drug sensitivity ของเซลล์มะเร็งปอดจำนวน 13 ชนิด(ดังแสดงในตารางที่ 11) โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าถ้าABCC11 encoded gene มี SNP538 G>A จะมี transport activity เพิ่มมากขึ้น ผู้วิจัยได้นำเอาข้อมูลต่างๆ ที่แสดงในตาราง มาวิเคราะห์หาความเกี่ยวข้องกัน โดยที่ผู้วิจัยแยกวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ดังกล่าวในแต่ละ genotype ไม่พบความสัมพันธ์กัน(ดังแสดงในรูป 31A) แต่ถ้านำเอาผลของmutant type มาวิเคราะห์เทียบกับ wild type จะพบความสัมพันธ์ว่า mutant genotype(G/G, G/A) มีความเสี่ยงที่เซลล์มะเร็งปอดจะดื้อต่อยามากกว่า wild type(A/A) (ดังแสดงในรูป 31B)

ตารางที่ 13 แสดง ABCC11 genotype และ IC50 ของ 13 adenocarcinoma cell lines

	SNP538	IC ₅₀ for MTA (nM)	95% CI	
Higher transport activity	NCI-H23	G/G ↑	72.16	45.08-115.5
	SK-LC-10	G/G	5.648	4.175-7.639
	VMRC-LCF	G/G	88.38	36.94-211.4
	SK-LC-1	G/G	49.48	36.51-67.06
	VMRC-LCD	G/A	21.39	14.78-30.96
	ACC-LC-314	G/A	75.88	49.16-117.1
Lower transport activity	ACC-LC-M5	A/A ↓	31.01	19.39-49.60
	ACC-LC-176	A/A	1.102	0.8365-1.453
	NCU-LC-201	A/A	4.394	3.552-5.436
	ACC-LC-94	A/A	21.19	16.87-26.63
	PC-14	A/A	14.74	11.14-19.51
	RERF-LC-MT	A/A	48.94	33.91-70.63
	PC-9	A/A ↓	14.01	12.51-15.69

MTA, pemetrexed.



รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ABCC11 genotype และ median IC₅₀ concentration ของ 13 adenocarcinoma cell lines

จากการทบทวนวรรณกรรมทั้งหมดจะเห็นได้ว่าความเป็นพิษต่อไตของยา tenofovir มีอัตราอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในชาวไทยและยุโรป ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดพิษต่อไตของยา Tenofovir ได้แก่ ระดับยาในเลือด ระยะเวลาการได้รับยา น้ำหนักของผู้ป่วยและค่าการชำระครีตินีนพื้นฐานของผู้ป่วย ในหลายการศึกษาพบว่า การขนส่งยา tenofovir เข้าและออกจากเซลล์จำเป็นต้องอาศัยตัวขนส่งกลัยโคโปรตีน เช่น OAT1, OAT3, MRP4 และ MRP7 ยังพบอีกว่าถ้ามีความผิดปกติของการนำส่งยาโดยตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนดังกล่าวจะทำให้เกิดการสะสมของยาในเซลล์มากขึ้น จนทำให้เกิดการบาดเจ็บและตายของเซลล์หลุดไต่อผลย จนนำไปสู่การเกิดพิษต่อไต ในขณะที่ผลการศึกษาทางด้าน SNPs ของตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องยังไม่พบว่ามีนัยสำคัญทางด้านคลินิกในการทำให้เกิดพิษต่อไตอย่างชัดเจน ซึ่งในบางการศึกษาได้ให้ข้อคิดเห็นไว้ว่า ตำแหน่งของ SNPs ที่มีรายงานและนำมาศึกษานั้นไม่ใช่ตำแหน่งที่สำคัญหรืออาจจะมีตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนชนิดอื่นๆ อีก ที่มีหน้าที่ขนส่งยา tenofovir เข้าและออกจากเซลล์ไต่อผลย จึงทำให้เมื่อตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนชนิดหนึ่งทำหน้าที่ผิดปกติไป ก็ยังมีกลัยโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งยังคงสามารถทำหน้าที่แทนได้ ประกอบกับการศึกษาเกี่ยวกับ ABCC11 หรือ MRP8 ซึ่งเป็นกลัยโคโปรตีนซึ่งค้นพบใหม่ในกลุ่ม ATP-binding cassette subfamily C[มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ABCC4 และ ABCC5 มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับ ABCC5 มากที่สุด แต่ในทางกลับกันพบว่า substrate ของ MRP8 มีความใกล้เคียงกับ MRP4 มากกว่า และยังพบว่า MRP8 กระจายอยู่ทั่วไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมนุษย์แต่มีจำนวนน้อยมาก ยกเว้นในสมอง ลำไส้ใหญ่ ม้ามและไต ทำหน้าที่ขนส่งสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย เช่น cyclic nucleotides(cAMP และ cGMP), folic acid, LCT4 หรือ ขนส่งสารบางชนิด เช่น conjugated bilirubin, bile acid, DHEAS, E₁₃S, E₂17BG นอกจากนี้มีบางการศึกษายังพบว่า ABCC11(MRP8) มีความสามารถในการขับยาบางชนิดออกจากเซลล์ได้ เช่น methotrexate, pemetrexate, 5-FU, FdUMP, ddC, Ara-C, Adefovir และ PMEA และยังพบว่ายาหรือสารเคมีบางชนิด เช่น indomethacin, probenecid, MK571 และ taurocholic acid มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของตัวขนส่งกลัยโค

โปรตีนชนิด ABCC11 ได้ดีอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นอาจทำให้เชื่อได้ว่า ABCC11(MRP8) น่าจะมีความสามารถในการขนส่งยาที่มีโครงสร้างเป็น cyclic nucleotides ซึ่ง tenofovir ก็เป็นยาที่มีโครงสร้างในกลุ่มดังกล่าวและยังพบอีกว่ากลัยโคโปรตีนขนส่งชนิดนี้มากบริเวณ proximal tubular region ในขณะเดียวกันจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ยังไม่มีการศึกษาถึงบทบาทหน้าที่ของ ABCC11 ว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยา tenofovir ในเซลล์ท่อไตฝอยส่วนต้นหรือไม่ ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจในการค้นหาบทบาทหน้าที่ดังกล่าวซึ่งอาจเป็นแนวทางในการหลีกเลี่ยงการเกิดพิษต่อไตซึ่งเป็นผลอันไม่พึงประสงค์จากยา tenofovir ที่สำคัญในผู้ป่วยเอชไอวีต่อไปได้ในอนาคต โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) มีบทบาทต่อการขนส่งยา Tenofovir ในเซลล์ท่อไตฝอยส่วนต้นหรือไม่และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ท่อไตฝอยจากยา tenofovir นั้นเกี่ยวข้องกันหรือไม่ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ LLC-PK1 นำมาปลูกถ่ายตัวกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11 หรือ MRP8 ผ่าน Lentivirus ซึ่งเป็น vector ที่นิยมใช้ จากนั้นจะดำเนินการทดลองดังนี้ ขั้นแรกจะดำเนินการตรวจ characteristic ของเซลล์ LLC-PK1 ก่อนว่ามีคุณสมบัติตามที่ต้องการหรือไม่โดยใช้เทคนิค rtPCR และตามด้วย Immunofluorescences เพื่อแสดงว่ามีเยื่อโปรตีนที่ต้องการหรือไม่ จากนั้นผู้วิจัยจะทำการทดลองด้วยเทคนิคที่เรียกว่า MTT assay, Uptake assay และ Transport assay ดังจะกล่าวโดยละเอียดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาและขอบเขตของการวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- ศึกษาหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) มีบทบาทต่อการขนส่งยา Tenofovir ในเซลล์ท่อไตฝอยส่วนต้นหรือไม่
- ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ท่อไตฝอยจากยา Tenofovir นั้นเกี่ยวข้องกันหรือไม่

1.2.2 ขอบเขตของการวิจัย

- ศึกษาหน้าที่การทำงานของกลัยโคโปรตีน ABCC11(MRP8) กับการขนส่งยา tenofovir disoproxil fumarate ในเซลล์ท่อไตฝอยในหลอดทดลอง โดยใช้ LLC-PK1 cell line แล้ว overexpression ด้วย pcDNA-MRP8 เพื่อจำลองสภาพของเซลล์ท่อไตฝอยบริเวณ proximal tubular cell

1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

1.3.1 สมมติฐานงานวิจัย

H₀: กลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ส่งผลต่อระดับยา tenofovir ในเซลล์หลอดไตฝอยส่วนต้นไม่แตกต่างกัน

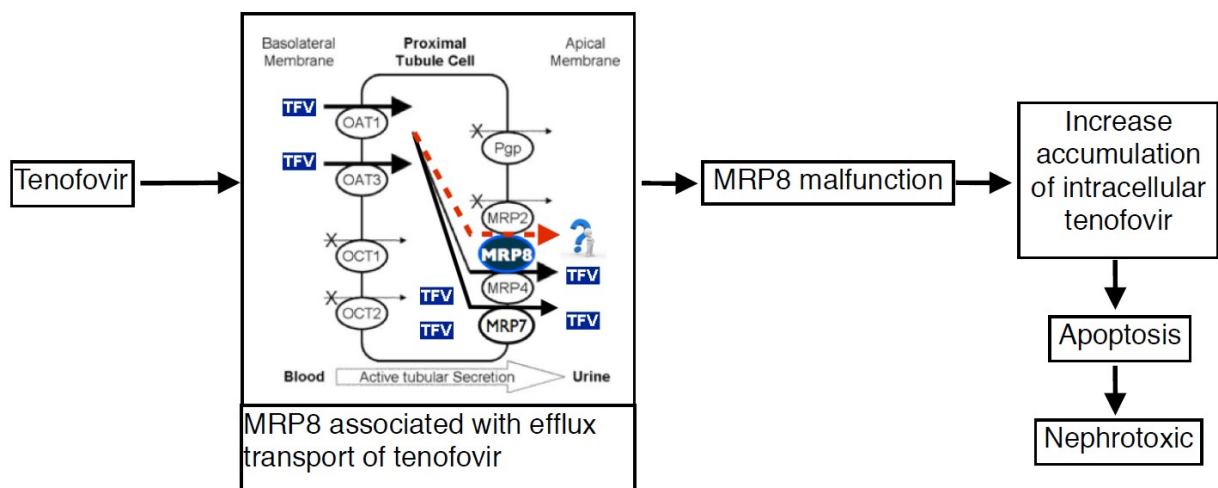
H₁: กลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ส่งผลต่อระดับยา tenofovir ในเซลล์หลอดไตฝอยส่วนต้นแตกต่างกัน

H₀: ยา Tenofovir ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์หลอดไตฝอยส่วนต้นที่มีกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ไม่แตกต่างกัน

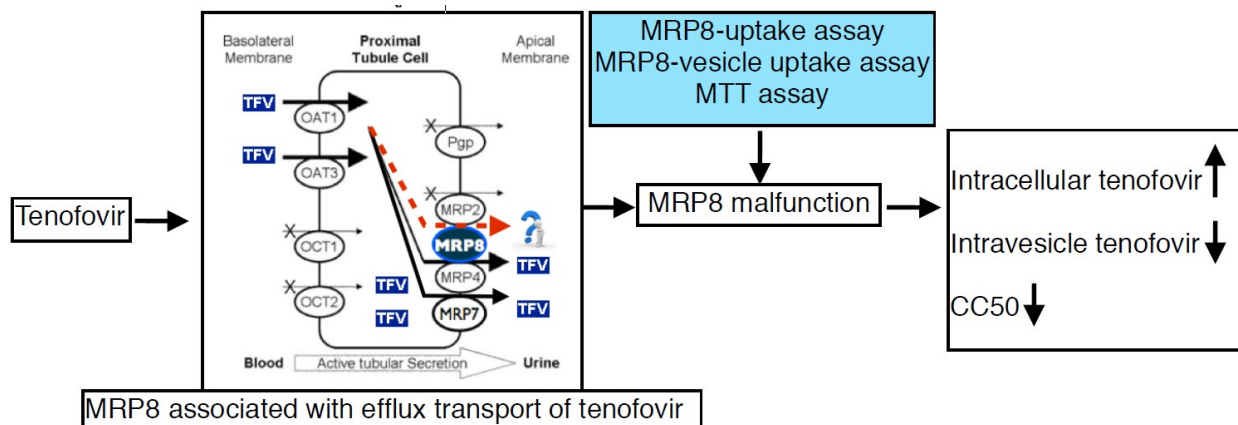
H₁: ยา Tenofovir ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์หลอดไตฝอยส่วนต้นที่มีกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) แตกต่างกัน

1.3.2 กรอบแนวความคิด (Conceptual Framework)

- ถ้า ABCC11(MRP8) ทำหน้าที่ขนส่งยา tenofovir ในเซลล์หลอดไตฝอย ถ้า MRP8 ทำงานผิดปกติ ปริมาณยาในเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์และขยายเป็นวงกว้างขึ้นจนพัฒนากลายเป็นพิษต่อไต



- ถ้า ABCC11(MRP8) ทำหน้าที่ขนส่งยา tenofovir ในเซลล์หลอดไตฝอย เมื่อมีภาวะการทำงานของ ABCC11(MRP8) ลดลง จะทำให้ปริมาณยา tenofovir ในเซลล์จะต้องเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณยาใน inside-out vesicle จะลดลงและมี CC50 เพิ่มสูงขึ้น



1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนชนิดใหม่ว่ามีบทบาทต่อการสะสมของยา Tenofovir ในเซลล์หลอดไตฝอยส่วนต้น
- 1.4.2 ทราบถึงบทบาทที่สำคัญของกลัยโคโปรตีนชนิดใหม่ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ท่อไตส่วนต้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาหาวิธีการป้องกันการเกิดพิษต่อท่อไตส่วนต้นของยาทีโนโฟเวียร์ ต่อไป
- 1.4.3 ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) กับการตายของเซลล์หลอดไตฝอยจากยา Tenofovir

บทที่ 2

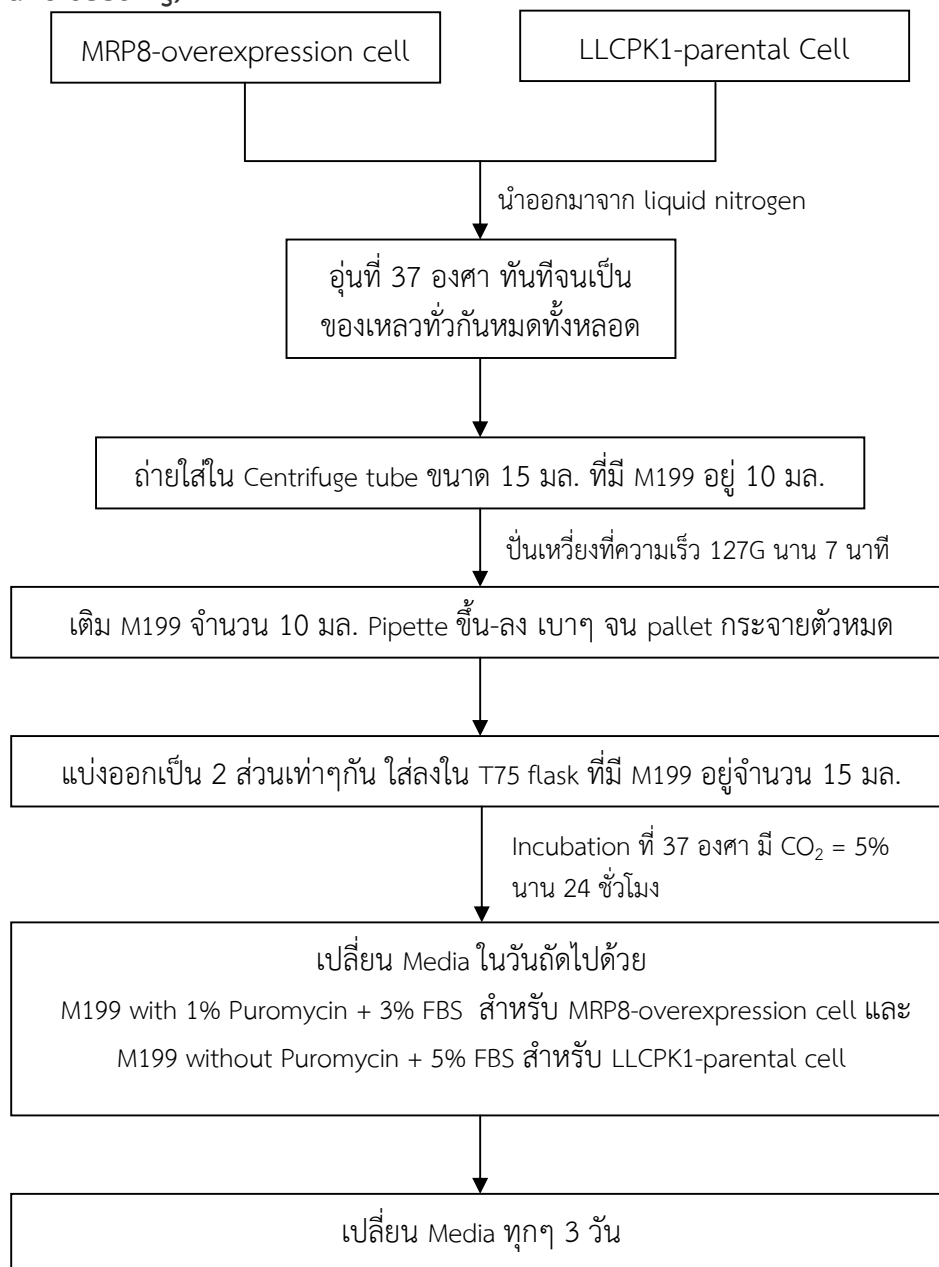
วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย(Material and Method)

2.1 วัสดุ สารเคมีและอุปกรณ์

DEPC-treated water(AMBION, USA), SS III platinum SYBR green one step QRT PCR(Gibco, Invitrogen[®]), Purelink™ RNA mini purification kit((Gibco, Invitrogen[®])), M199(Gibco, Invitrogen[®]), FBS(Gibco, Invitrogen[®]), Sodium pyruvate(Gibco, Invitrogen[®]), Pencicillin-Streptomycin(Gibco, Invitrogen[®]), 0.25% Trypsin-EDTA(Gibco, Invitrogen[®]), Alexa flour® 488 Phallo, 4',6-Diamidino-2-Phenylin(Gibco, Invitrogen[®]), D-PBS magnesium and phosphate(Gibco, Invitrogen[®]), D-PBS without magnesium and phosphate(Gibco, Invitrogen[®]), Human MRP8 vesicle, Mouse serum(Gibco, Invitrogen[®]), ABCC11(MRP8)-Primer base(Forward primer =AGTATGATGCTGCCTTGA , Reverse primer = GGTGAGGTAGGAGAACAG) (Gibco, Invitrogen[®]), β -actin Primer base(Forward primer = AACTACCTTCAACTCCATCA , Reverse primer = ATCTCCTTCTGCATCCTG) (Gibco, Invitrogen[®]), Control ABC transporter vesicle(Gibco, Invitrogen[®]), Puromycin dihydrochloride(Gibco, Invitrogen[®]), MRP8 antibody(Gibco, Invitrogen[®]), Alexa flour® 488 Goat anti-mouse serum IgM(Gibco, Invitrogen[®]), Triton-X100(Sigma-Aldrich), Paraformaldehyde(Sigma-Aldrich), Methanol(Sigma-Aldrich), DAPI(Gibco, Invitrogen[®]), Tenofovir disoproxil fumarate(Santa cruz, USA), Tenofovir(Santa cruz, USA), MK-571(Merk, Germany), Methotrexate anhydrate(Sigma-Aldrich), MRP8-overexpression cell(Genscript[®]), LLC-PK1- parental cell(Genscript[®], ATCC No.123546), GM3010 MRPs-BCRP Vesicular Transport Assay Reagent Set(Gibco, Invitrogen[®]), PrestoBlue[®] (Gibco, Invitrogen[®]), Tris(Merk, Germany), MOPH(Merk, Germany), KCl(Merk, Germany), MgCl₂(Merk, Germany), Na₂ATP(Merk, Germany), Na₂AMP(Merk, Germany)

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

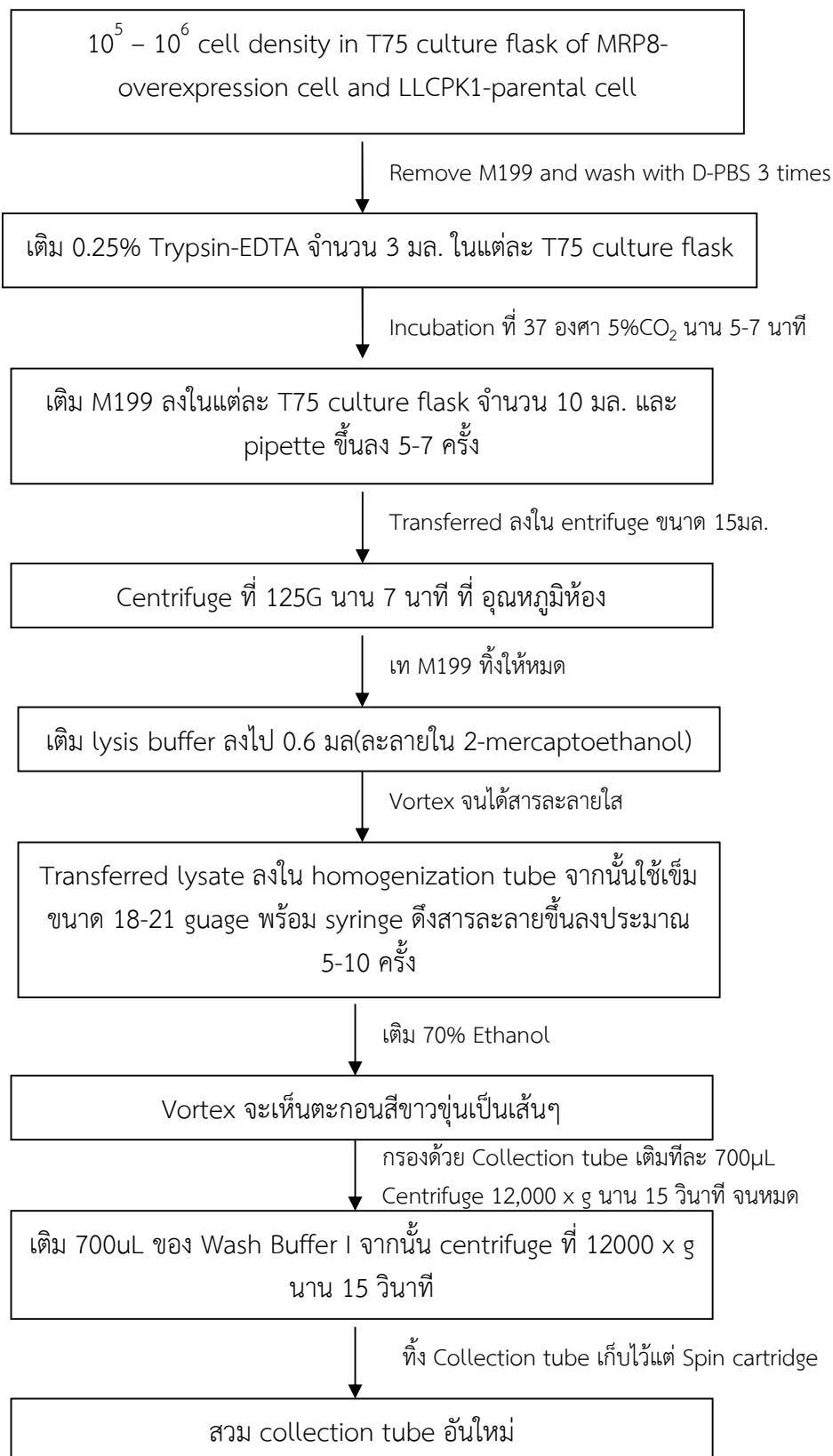
2.2.1 การเลี้ยงเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์(MRP8-overexpression and parental cell recovered and seeding)

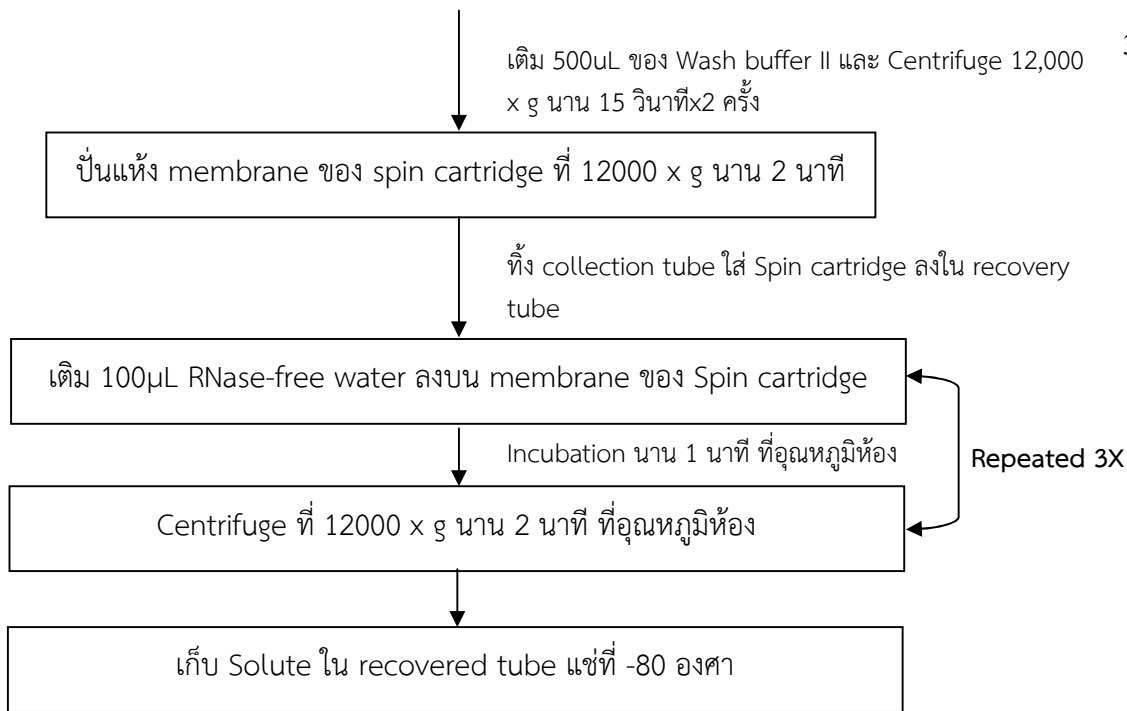


2.2.2 Cell characterization

2.2.2.1 การตรวจปริมาณการแสดงออกของ MRP8-gene expression ด้วยวิธี rt-PCR

2.2.2.1.1 การสกัด RNA(RNA isolation)





2.2.2.1.2 การวัดปริมาณ MRP8 gene expression ด้วยวิธี rt-PCR แสดงเป็น relative quantification เทียบกับปริมาณของ β -actin ที่เป็น house keeping gene เตรียม reaction rt-PCR ดังนี้

MRP8-overexpression cell	/reaction(µL)	x 4 reaction(µL)	β -actin on MRP8-overexpression cell	/reaction(µL)	x 4 reaction(µL)
RNA template(MRP8-overexpression cell line)	5	20	RNA template(MRP8-overexpression cell line)	5	20
SuperScript [®] III Platinum [®] SYBR [®] Green One –Step qRT-PCR Kit	1	4	SuperScript [®] III Platinum [®] SYBR [®] Green One –Step qRT-PCR Kit	1	4
2X SYBR [®] Reaction Mix	25	100	2X SYBR [®] Reaction Mix	25	100
Magnesium Chloride	1	4	Magnesium Chloride	1	4
Forward Primer ABCC11(MRP8)	0.5	2	Forward Primer β -actin	0.5	2
Reward Primer ABCC11(MRP8)	0.5	2	Reward Primer β -actin	0.5	2
DEPC-treated water qs. to	50	200	DEPC-treated water qs. to	50	200
LLCPK1-parental cell	/reaction(µL)	x 4 reaction(µL)	β -actin on LLCCK1-parental cell	/reaction(µL)	x 4 reaction(µL)
RNA template(MRP8-overexpression cell line)	5	20	RNA template(MRP8-overexpression cell line)	5	20
SuperScript [®] III Platinum [®] SYBR [®] Green One –Step qRT-PCR Kit	1	4	SuperScript [®] III Platinum [®] SYBR [®] Green One –Step qRT-PCR Kit	1	4
2X SYBR [®] Reaction Mix	25	100	2X SYBR [®] Reaction Mix	25	100
Magnesium Chloride	1	4	Magnesium Chloride	1	4
Forward Primer ABCC11(MRP8)	0.5	2	Forward Primer β -actin	0.5	2
Reward Primer ABCC11(MRP8)	0.5	2	Reward Primer β -actin	0.5	2
DEPC-treated water qs. to	50	200	DEPC-treated water qs. to	50	200

วัดค่าด้วยเครื่อง rt-PCR
ยี่ห้อ qTower 2.2[®] Analytik Jena AG.

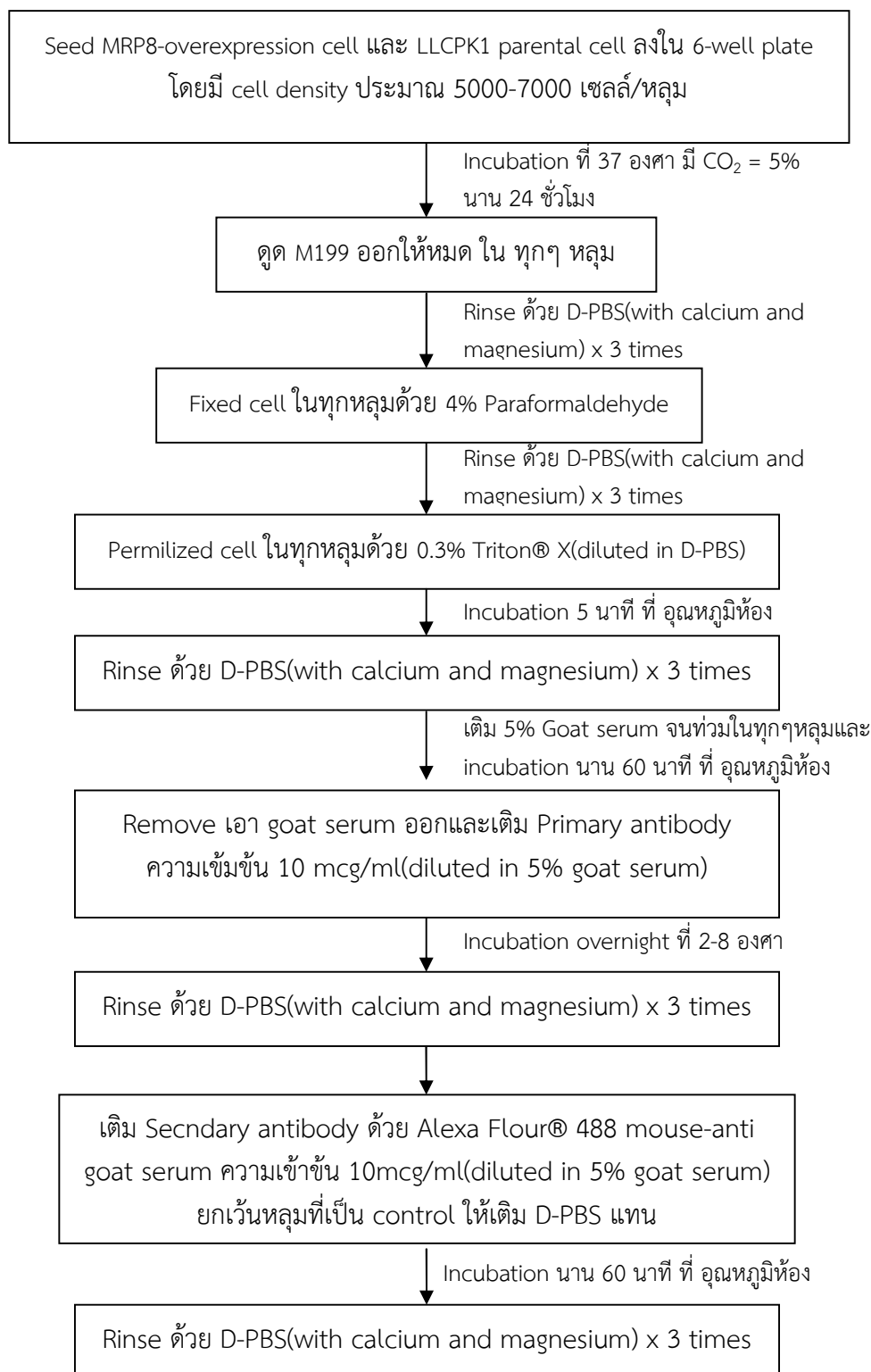
Standard cycling program:

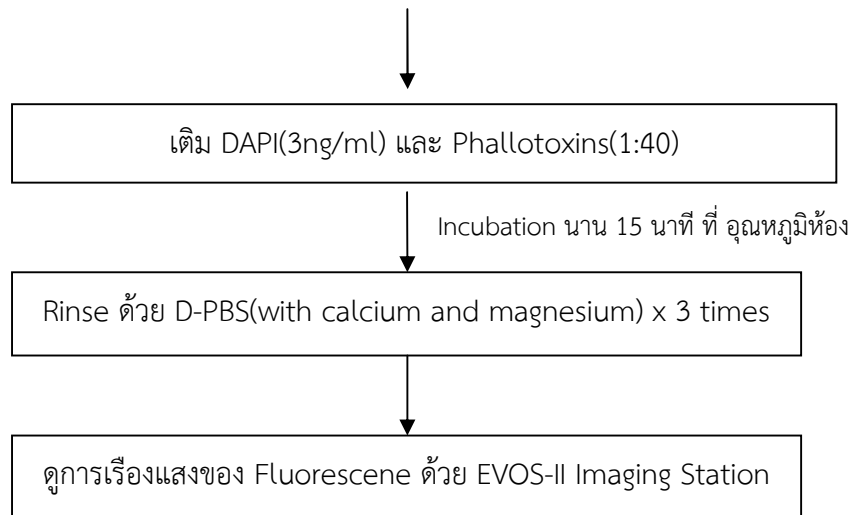
48°C for 30 minutes - cDNA synthesis
95°C for 5 minutes – Initial denaturation

40 cycles of :

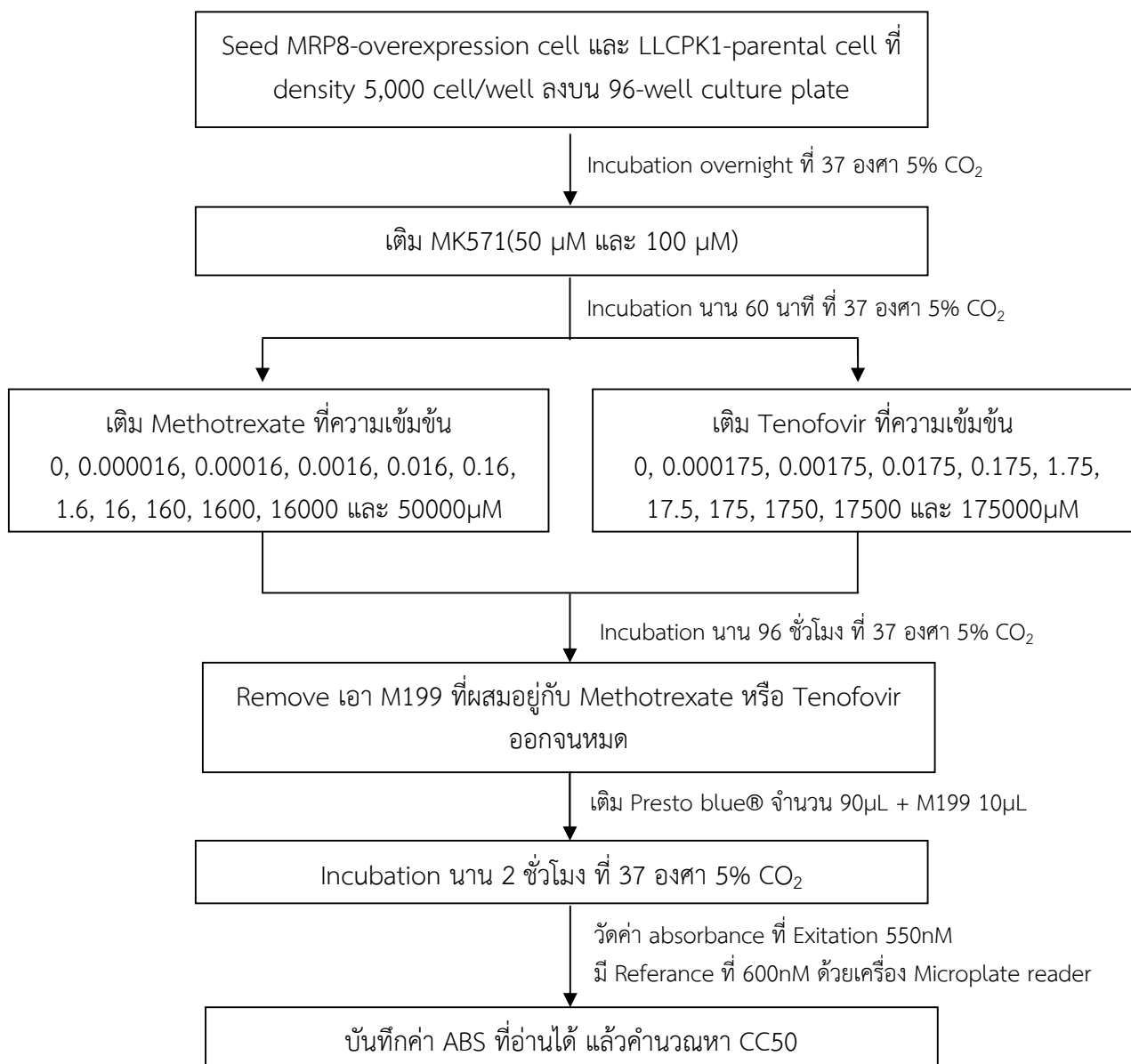
95°C for 15 seconds - Denaturation
60°C for 60 seconds – Annealing and Primer extension
40°C for 1 minutes

2.2.2.2 การตรวจการแสดงออกของ MRP8-protein ด้วยวิธี Immunofluorescence





2.2.3 MTT assay



2.2.4 Vesicular uptake assay with specific inhibitors

2.2.4.1 เตรียมสารละลาย Stock solution สำหรับ Transport Assay

Solution	Preparation	Storage
1.7M Tris	ละลาย Tris 20.594 กรัม (hydroxymethyl aminomethane มี นน.โมเลกุล 121.14 กรัม/โมล ใน DI หรือ Ultrapure water 100 มิลลิลิตร	4 องศา
100mM MOPS-Tris	ละลาย MOPS 2.093 กรัมใน DI หรือ ultrapure water 90 มิลลิลิตร ปรับ pH = 7.2 ด้วย 1.7M Tris และ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร	4 องศา
1M KCL	ละลาย KCL 7.455 กรัม ใน DI หรือ ultrapure water จำนวน 100 มิลลิลิตร	4 องศา
1M MgCl ₂	ละลาย MgCl ₂ จำนวน 10.165 กรัม ใน DI หรือ ultrapure water จำนวน 50 มิลลิลิตร	RT
200mM MgATP	ละลาย Na ₂ ATP 2.21 กรัม ด้วย DI หรือ ultrapure water จำนวน 10 มิลลิลิตร และเติม 4 มิลลิลิตรของ 1M MgCl ₂ ปรับ pH = 7 ด้วย 1.7M Tris แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI หรือ ultrapure water จนครบ 20 มิลลิลิตร	แบ่งออกเป็นส่วนๆ เอาไว้แค่พอใช้ที่ เหลือ freeze ที่ -20 องศา
250mM Na ₂ AMP	ละลาย Na ₂ AMP 1.97 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของ DI หรือ ultrapure water จากนั้นปรับ pH = 7 ด้วย 1.7M Tris ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 มิลลิลิตร	แบ่งออกเป็นส่วนๆ เอาไว้แค่พอใช้ที่ เหลือ freeze ที่ -20 องศา
200uM MK-571	ละลาย MK-571 2.1483 กรัม ใน DI or ultrapure water จำนวน 20 มิลลิลิตร	แบ่งออกเป็นส่วนๆ เอาไว้แค่พอใช้ที่ เหลือ freeze ที่ -20 องศา

2.2.4.2 เตรียมสารละลาย Reaction solution

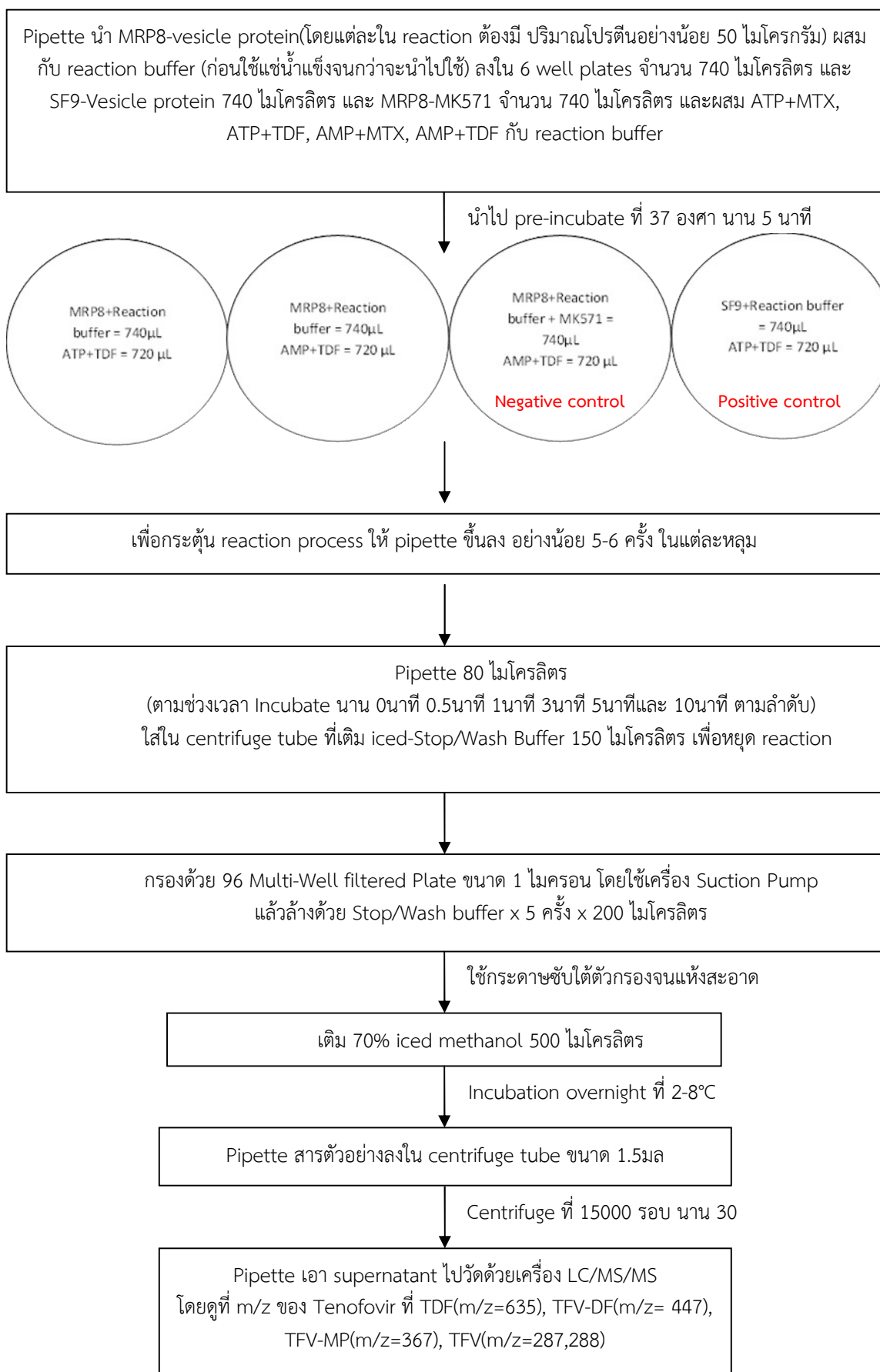
Solution	Amount added	Final Concentration
100mM MOPS-Tris	32 ml	40mM
1M KCL	4 ml	50mM
1M MgCl ₂	800 uL	10mM
DI or ultrapure water qs.	80 มิลลิลิตร	

2.2.4.3 เตรียมสารละลาย STOP/WASH solution

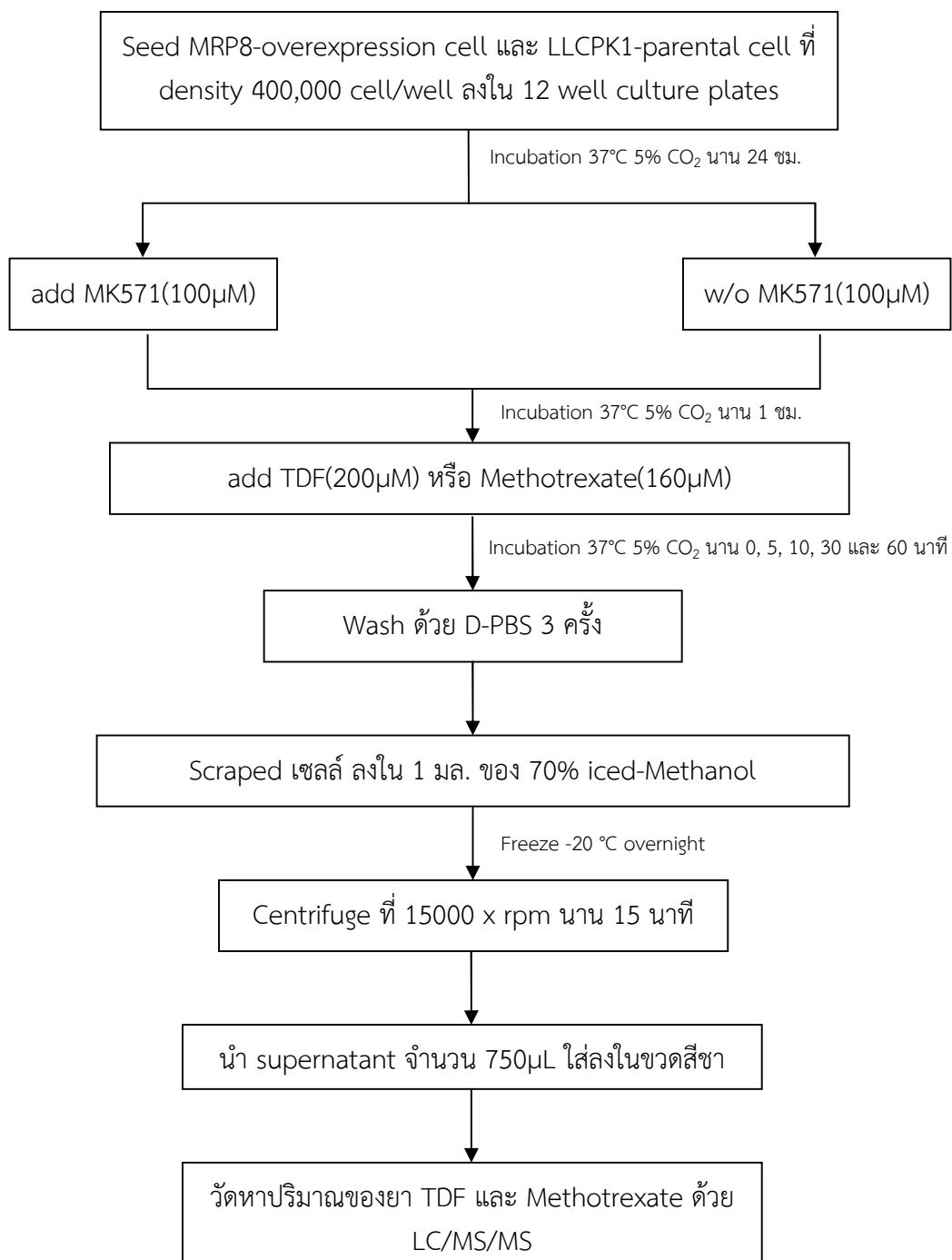
Solution	Amount added	Final Concentration
100mM MOPS-Tris	400 ml	40mM
1M KCL	70 ml	70mM
DI or ultrapure water qs.	1000 มิลลิลิตร	

2.2.4.4 เตรียมสารละลายอื่นๆ

- เตรียมสารละลาย 5mM ATP(C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃, Mw = 507.18) จาก 200mM MgATP มา 250 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรจนครบจำนวน 10 มิลลิลิตร โดยใช้ Transport buffer เป็นตัวทำละลาย(เตรียมใหม่ๆ เท่านั้น)
- เตรียมสารละลาย 5mM AMP(C₁₀H₁₄N₅O₇P, Mw = 347.22) จาก 250mM MgATP มา 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรจนครบจำนวน 10 มิลลิลิตร โดยใช้ Transport buffer เป็นตัวทำละลาย(เตรียมใหม่ๆ เท่านั้น)
- เตรียมสารละลาย 100uM ของ MK571 ใช้ Stock solution 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย Transport buffer จนครบ 1 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย 200uM Tenofovir(Mw = 287.213) จำนวน 50 มิลลิลิตร และ 160uM MTX(Mw=454.44) จำนวน 50 มิลลิลิตร ละลายใน Transport buffer
 - โดยชั่ง Tenofovir จำนวน 1.4361 มิลลิกรัม ผสมลงใน Transport Buffer ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร เตรียมเสร็จเอามา aliquot ไว้ ที่เหลือ freez ที่ -80
 - โดยชั่ง MTX จำนวน 1.8178 มิลลิกรัม ผสมลงใน Transport Buffer ผสมลงใน Transport Buffer ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร เตรียมเสร็จเอามา aliquot ไว้ ที่เหลือ freez ที่ -80
- เตรียมสารละลาย 70% Methanol จำนวน 100 มิลลิลิตร

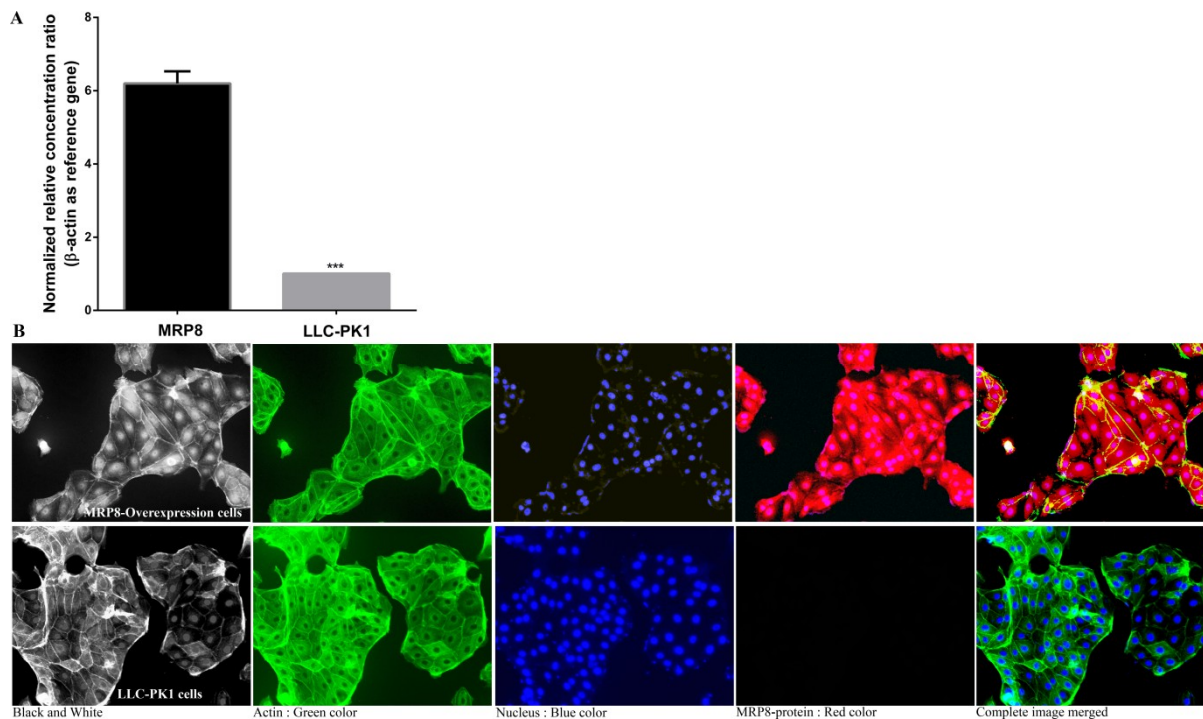


2.2.5 Cellular transport assay with specific inhibitors



2.3 ผลการวิจัย(Results)

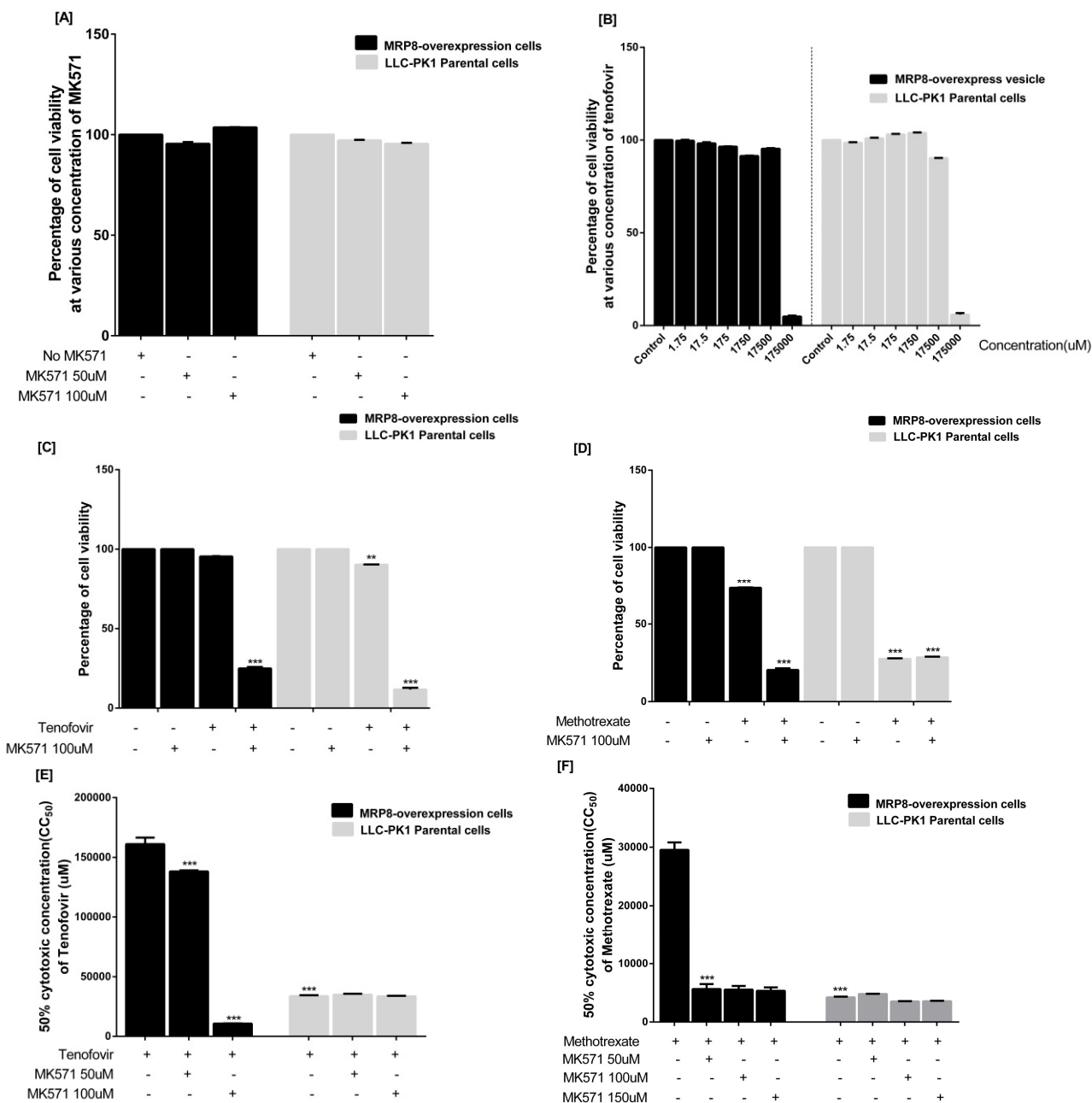
2.3.1 การแสดงออกของ *abcc11* หรือ *mrp8* gene และ ABCC11- transporter protein(*abcc11*(*mrp8*) gene and ABCC11(MRP8) protein expression)



รูปที่ 32 A) กราฟแท่งแสดงปริมาณของ *abcc11* gene expression ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell B) แสดงการย้อมติดสีของ ABCC11 protein ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell ด้วยวิธี Secondary หรือ Indirect immunofluorescences

จากการ characterized เซลล์ LLC-PK1 ที่ได้ทำการปลูกถ่าย *abcc11* gene ด้วย lentivirus เพื่อหวังผลให้แสดงโปรตีนชนิด ABCC11-transporter นั้น พบว่า เซลล์ที่ได้รับการปลูกถ่าย *abcc11* gene จะได้รับการตรวจการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี real time PCR จากผลการตรวจนั้นพบว่าเซลล์ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเป้าหมายมีการแสดงออกของยีนเป้าหมายมากกว่าเซลล์ควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน(ดังแสดงตามรูปที่ 32A)ในทางเดียวกันการย้อมโปรตีนชนิด ABCC11-transporter ด้วยเทคนิค secondary หรือ indirect immunofluorescence assay นั้น ก็พบว่าเซลล์ที่ได้รับการปลูกถ่าย *abcc11* gene จะมีการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายซึ่งย้อมติดสีแดง ในขณะที่เซลล์ควบคุมไม่มี(ดังแสดงตามรูปที่ 32B)

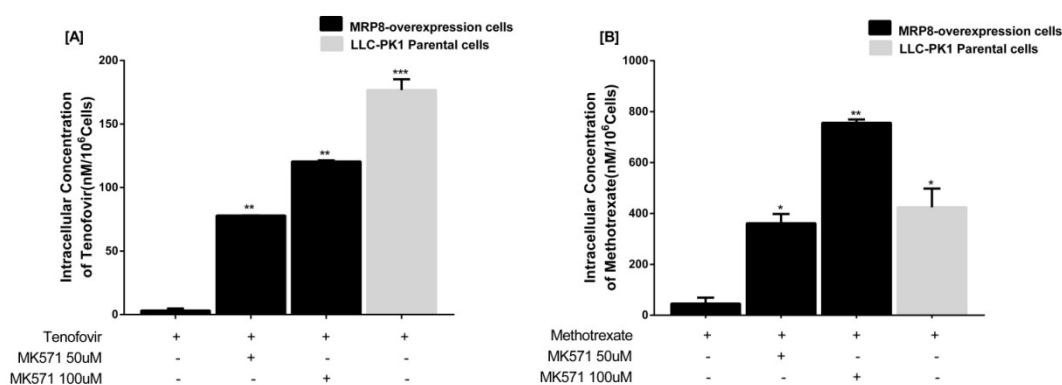
2.3.2 ระดับความเข้มข้นของ Tenofovir และ Methotrexate ที่เป็นพิษต่อเซลล์(Tenofovir and Methotrexate Cytotoxic concentration (CC₅₀))



รูปที่ 33 (A) กราฟแห่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK₁-parental cell ของสารยับยั้ง MK571 โดยแสดงเป็น % viability ; (B) กราฟแห่งแสดง ผลของยาทีโนโฟเวียร์ ต่อ Percentage of cell viability ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p-value < 0.0001)) (C) กราฟแห่งแสดงความเป็นพิษของยาทีโนโฟเวียร์ต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK₁-parental cell โดยแสดงเป็น % viability ; (D)กราฟแห่งแสดงความเป็นพิษของยา Methotrexate ต่อเซลล์ ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK₁-parental cell โดยแสดงเป็น % viability E)กราฟแห่งแสดง Tenofovir cytotoxic concentration(CC₅₀)ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p-value < 0.0001)) F)กราฟแห่งแสดง Methotrexate cytotoxic concentration(CC₅₀)ของเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p-value < 0.0001))

จากการผลการศึกษาหา cytotoxic concentration (CC₅₀) ของ Tenofovir ต่อ ABCC11-overexpression cell โดยใช้ Methotrexate เป็นสารควบคุม (known substrate, ดังแสดงในรูปที่ 33) นั้นพบว่าเซลล์ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเป้าหมาย (*abcc11* gene) และมีการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย (ABCC11-transporter) มีค่าของ CC₅₀ มากกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p value < 0.0001)) (ดังแสดงตามรูปที่ 33E และ F) และยังพบอีกว่าในสภาวะที่มีสาร MK571 ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของ ABCC11-transporter protein นั้นจะยิ่งทำให้ค่าของ CC₅₀ นั้นต่ำลงไปอีกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p value < 0.0001)) เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ ในทางกลับกันผลของสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนเป้าหมายไม่ได้ส่งผลใดๆ ต่อค่า CC₅₀ ของเซลล์ควบคุม

2.3.3 ปริมาณสะสมของ Tenofovir และ Methotrexate ภายในเซลล์ (Intracellular accumulation of Tenofovir and Methotrexate)

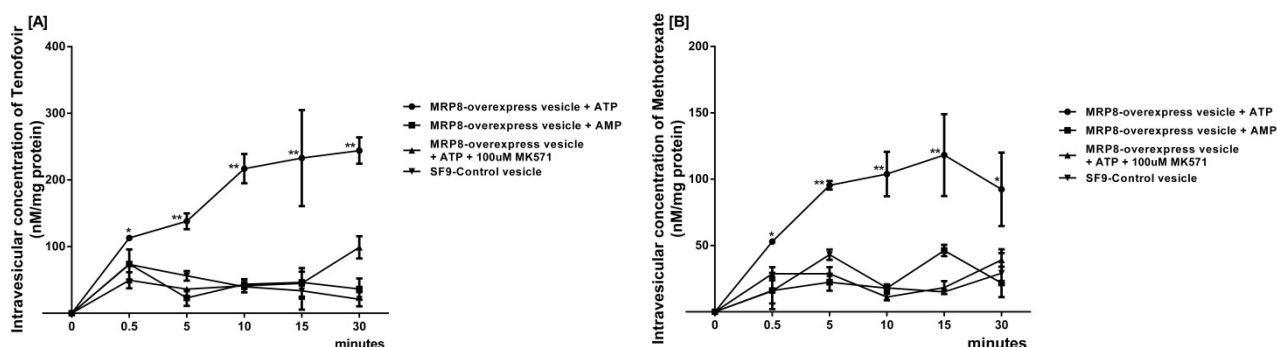


รูปที่ 34 A) กราฟแท่งแสดง Intracellular accumulation ของ Tenofovir ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell (2-way ANOVA, multiple comparison (**, p-value < 0.001 and ***, p-value < 0.0001)) ในสภาวะที่มีสาร MK-571 ที่ยับยั้งการทำงานของ ABCC11 transporter B) กราฟแท่งแสดง Intracellular accumulation ของ Methotrexate ในเซลล์ ABCC11-overexpression cell เทียบกับ LLC-PK₁-parental cell (2-way ANOVA, multiple comparison (*, p-value < 0.01 และ **, p-value < 0.001)) ในสภาวะที่มีสาร MK-571 ที่ยับยั้งการทำงานของ ABCC11 transporter

จากผลการศึกษาปริมาณสะสมของยา Tenofovir ในเซลล์ที่มี ABCC11 (MRP8) transporter protein overexpression เทียบกับเซลล์ควบคุมชนิด LLC-PK₁-parental cell โดยใช้ Methotrexate เป็นตัวควบคุม (known substrate) ดังแสดงในรูปที่ 34B นั้นพบว่า เซลล์ที่มี ABCC11-transporter protein overexpression มีปริมาณสะสมของยา Tenofovir น้อยกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-way ANOVA, multiple comparison (***, p-value < 0.0001)) ในทางกลับกันถ้าเพิ่มสาร MK-571 ซึ่งเป็นสาร

ยับยั้งการทำงานของ transporter protein ชนิด ABCC11 (MRP8) ลงไป กลับพบว่ามีปริมาณสะสมของยา Tenofovir เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของสาร MK-571 ที่เพิ่มขึ้น(2-way ANOVA, multiple comparison (**, p-value < 0.001) ดังแสดงในรูปที่ 34A

2.3.4 ปริมาณสะสมของ Tenofovir และ Methotrexate ภายใน vesicle (Intravesicular accumulation of Tenofovir and Methotrexate)



รูปที่ 35 A) กราฟเส้นแสดง Intravesicular accumulation ของ Tenofovir ใน ABCC11-overexpression vesicle เทียบกับ SF9 parental vesicle (2-way ANOVA, multiple comparison (*, p-value < 0.01)) ในสภาวะแตกต่างกันและที่เวลาในแต่ละจุดที่แตกต่างกัน (Paired t-test (*, p-value < 0.01)) B) กราฟเส้นแสดง Intravesicular accumulation ของ Methotrexate ใน ABCC11-overexpression vesicle เทียบกับ SF9 parental vesicle (2-way ANOVA, multiple comparison (*, p-value < 0.01)) ในสภาวะแตกต่างกันและที่เวลาในแต่ละจุดที่แตกต่างกัน (Paired t-test (*, p-value < 0.01))

จากผลการศึกษาปริมาณสะสมของยา Tenofovir ใน inside-out vesicle ที่มี ABCC11 (MRP8) transporter protein overexpression เทียบกับ control vesicle ควบคุมชนิด SF9 โดยใช้ Methotrexate เป็น known substrate ดังแสดงในรูปที่ 35B นั้นพบว่าใน inside-out vesicle ที่มี ABCC11-transporter protein overexpression และมี ATP เป็นแหล่งพลังงาน มีปริมาณสะสมของยา Tenofovir มากกว่าระบบอื่นๆ รวมถึง control vesicle ควบคุมชนิด SF9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-way ANOVA, multiple comparison (*, p-value < 0.01)) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าถ้าพิจารณา ณ จุดเวลาที่ได้ สุ่มตัวอย่างออกมาวัดเพื่อหาปริมาณสะสมของยา Tenofovir ใน vesicle ที่สภาวะแตกต่างกัน ก็พบว่ามี ปริมาณยาสะสมใน ABCC11-transporter protein overexpression vesicle ที่มีแหล่งพลังงาน ATP ใน ระบบมากกว่าระบบอื่นๆ ในทุกๆ จุดเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Paired t-test (*, p-value < 0.01)) ในทาง กลับกันถ้าเพิ่มสาร MK571 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ transporter protein ชนิด ABCC11 (MRP8) ลง ไป หรือ งดให้พลังงานกับระบบการทดลองโดยใช้ AMP แทน ATP กลับพบว่ามีปริมาณสะสมของยา Tenofovir ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-way ANOVA, multiple comparison (*, p-value < 0.01) ดังแสดงในรูปที่ 35A

บทที่ 3

สรุปผลและอภิปรายผล(Discussion)

จากการทดลองจะเห็นว่าผลของ MK-571 ซึ่งยับยั้งการทำงานของ ABCC11(MRP8)-transporter protein ได้นั้น จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง ABCC11-overexpression cell และ LLC-PK₁ parental cell ในทุกความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 34(A) แต่ผลของสารดังกล่าวกลับเพิ่มความเป็นพิษของยา Tenofovir ต่อเซลล์ ABCC11(MRP8)-overexpression ตามความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ไม่ส่งผลใดๆต่อเซลล์ควบคุม โดยสามารถดูได้จากค่า CC₅₀ ที่มีค่าลดลงเป็นลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 35(B) ซึ่งในการทดลองหาความเป็นพิษต่อเซลล์ของยา Tenofovir นั้น ใช้ความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงสุดแค่ระดับ 100µM เพราะเป็นค่าความเข้มข้นที่สูงสุดของการยับยั้งด้วยสารดังกล่าวโดยดูจากค่า CC₅₀ ของ Methotrexate นั้นจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งจาก 100µM ไปเป็น 150µM ดังแสดงในรูปที่ 34(B) นอกจากนี้ถ้าพิจารณาจากรูป 34(B) เทียบกับ 35(B) จะเห็นว่าความเป็นพิษของยา Tenofovir เทียบกับ Methotrexate จะพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ABCC11-overexpression ของ Methotrexate มีมากกว่ายา Tenofovir โดยพิจารณาจากค่า CC₅₀ ซึ่งสอดคล้องกับหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ด้านเภสัชวิทยาที่ทราบกันอยู่แล้วโดยทั่วไป^[63-65] แต่ในทางกลับกันกับพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ LLC-PK₁ parental ของยา Tenofovir นั้นกลับมีค่ามากกว่า Methotrexate อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เซลล์ LLC-PK₁ parental นั้นมีกลไกการขับยา Methotrexate ออกจากเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ หรือมี transporter protein ชนิดอื่นๆ^[66-69] ที่สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้ จึงทำให้ปริมาณยาในเซลล์ลดลง ความเป็นพิษของยาต่อเซลล์ก็จะลดลงเช่นกัน

นอกจากนี้ผลการศึกษาปริมาณยาสะสมของยา tenofovir ในเซลล์ที่มี ABCC11(MRP8) transporter protein overexpression เทียบกับเซลล์ควบคุมชนิด LLC-PK₁ parental cell โดยใช้ methotrexate เป็น known substrate ดังแสดงในรูปที่ 36 และ รูปที่ 37 พบว่า เซลล์ที่มี ABCC11-transporter protein overexpression จะมีปริมาณสะสมของยา Tenofovir ภายในเซลล์น้อยกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในทางกลับกันถ้าใส่สาร MK-571 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ transporter protein ชนิดนี้ลงไป กลับพบว่าปริมาณสะสมของยา Tenofovir เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามความเข้มข้นของสาร MK-571 ที่เพิ่มสูงขึ้น และยังพบว่าปริมาณสะสมของยา Tenofovir ใน inside-out vesicle ที่มี ABCC11(MRP8) transporter protein overexpression และมี ATP เป็นแหล่งพลังงานเทียบกับระบบอื่นๆ รวมถึง control vesicle ดังแสดงในรูปที่ 38 และรูปที่ 39 นั้นพบว่าใน inside-out vesicle ที่มี ABCC11(MRP8) transporter protein overexpression และมี ATP เป็นแหล่งพลังงานมีปริมาณสะสมของยา Tenofovir มากกว่าระบบอื่นๆ รวมถึง SF9-control vesicle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกๆช่วงเวลา ในทางกลับกันถ้าใส่สาร MK-571 ลงไป หรือ งดให้พลังงานกับระบบโดยใช้ AMP แทน ATP กลับพบว่าปริมาณสะสมของยา Tenofovir ใน ABCC11-transporter protein overexpression inside-out vesicle ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการทำงานของ ABCC11(MRP8) transporter protein นั้น เป็น efflux transporter ที่เรียงตัวอยู่บนเซลล์เมมเบรน^[30, 32-35, 38] ดังที่มีรายงาน

มาแล้วก่อนหน้าและสามารถสรุปได้ว่ายา Tenofovir เป็น substrate ชนิดใหม่ของ ABCC11(MRP8) transporter protein

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสารหลายตัวที่เป็น substrate ของ ABCC11(MRP8) ได้แก่ cyclic nucleotides(cAMP และ cGMP)^[49,52,54-56], folic acid^[57], LCT4^[57], conjugated bilirubin, bile acid, DHEAS, E13S, E₂17-βG, methotrexate^[57-58], premetrexate^[58], 5-FU^[54,58], FdUMP^[58], ddC^[58], Ara-C^[58], Adefovir^[58] และ PMEPA^[52, 56-58] ซึ่งจากการค้นพบในครั้งนี้จึงสามารถตอบคำถามในบางประเด็นได้ว่า ความเป็นพิษต่อไตของยา tenofovir ที่มีอัตราอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในชาวไทยและยุโรป^[6,28] นั้น นอกจากจะเกิดจากปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดพิษต่อไตของยา Tenofovir ได้แก่ ระดับยาในเลือด ระยะเวลาการได้รับยา น้ำหนักของผู้ป่วยและค่าการชำระครีตินินพื้นฐานของผู้ป่วยแล้ว ในระดับเซลล์ก็มีการศึกษาพบว่าการขนส่งยา tenofovir เข้าและออกจากเซลล์จำเป็นต้องอาศัยตัวขนส่งกลัยโคโปรตีน เช่น OAT1, OAT3^[6,29,48], MRP4^[6] และ MRP7^[8] ซึ่งพบว่าถ้ามีความผิดปกติของการนำส่งยาโดยตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนดังกล่าวจะทำให้เกิดการสะสมของยาในเซลล์มากขึ้น จนทำให้เกิดการบาดเจ็บและตายของเซลล์หลอดไตฝอย จนนำไปสู่การเกิดพิษต่อไต ในขณะที่เดียวกันผลการศึกษาทางด้าน SNPs ของตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องเช่น MRP7 ยังไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจนจนมีนัยสำคัญทางด้านคลินิกในการทำให้เกิดพิษต่อไต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตำแหน่งของ SNPs ที่มีรายงานและนำมาศึกษานั้นไม่ใช่ตำแหน่งที่สำคัญ^[42-43] หรืออาจจะมีตัวขนส่ง กลัยโคโปรตีนชนิดอื่นๆ อีก ที่มีหน้าที่ขนส่งยา tenofovir เข้าและออกจากเซลล์ท่อไตฝอย จึงทำให้เมื่อตัวขนส่งกลัยโคโปรตีนชนิดหนึ่งทำหน้าที่ผิดปกติไป ก็ยังมีกลัยโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งยังคงสามารถทำหน้าที่แทนได้ ดังนั้น กลัยโคโปรตีนชนิดอื่นๆ ในอีกหลายๆ ชนิดที่อาจเกี่ยวข้องกับการขนส่ง Tenofovir ออกจากเซลล์คือ ABCC11(MRP8) โดยพบว่า MRP8 กระจายอยู่ทั่วไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมนุษย์แต่มีจำนวนน้อยมาก ยกเว้น ในสมอง ลำไส้ใหญ่ ม้ามและไต^[38, 54-55] ในไตพบว่า ABCC11(MRP8) กระจายอยู่ทั่วไปแต่จะมีมากและหนาแน่นบริเวณ proximal tubular ดังนั้นถ้ามีการรบกวนการทำงานของกลัยโคโปรตีนชนิดนี้ ไม่ว่าจะเป็นการเกิด mutation, SNPs, Drug interaction ที่ส่งผลลดการทำงานลงจนเกิดการสะสมของยา Tenofovir ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น จนทำให้เกิดการบาดเจ็บและตายของเซลล์หลอดไตฝอย ก็สามารถนำไปสู่การเกิดพิษต่อไตจากยาดังกล่าวได้เช่นกัน

บทที่ 4

สรุปผล และข้อเสนอแนะ(Suggestion)

ยาทีโนโฟเวียร์เป็น substrate ของ MRP8 transporter การศึกษาต่อไปคือต้องพิสูจน์ทราบถึงกระบวนการตาย(Apoptosis) ว่าเกิดผ่านกลไกใดและถ้ามีโครงสร้างของยาชนิดอื่นๆ เช่น เกลืออลาพินาไมด์ จะมีผลต่อการทำงานของ MRP8 transporter protein ชนิดนี้หรือไม่อย่างไร

บทที่ 5

ผลผลิต(Output)

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

อยู่ในระหว่างการส่ง Official manuscript ให้กับวารสารนานาชาติ

5.2 การจัดสิทธิบัตร

-

5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์

-

5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ

ได้ทราบถึงว่ายังมีกลัยโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งยังคงสามารถทำหน้าที่ขนส่งยาที่โนโฟเวียร์ออกจากเซลล์ได้คือ ABCC11(MRP8) โดยพบว่า MRP8 กระจายอยู่ทั่วไปในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมนุษย์แต่มีจำนวนน้อยมาก ยกเว้น ในสมอง ลำไส้ใหญ่ ม้ามและไต องค์ความรู้นี้จะเป็พื้นฐานให้กับงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

รายงานสรุปการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3100602182178 สัญญาเลขที่ 5/2558

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาหน้าที่ของกลัยโคโปรตีนขนส่งชนิด ABCC11(MRP8) ในการขนส่งยา tenofovir disoproxil fumarate(TDF) บนเซลล์ท่อไตฝอยในหลอดทดลอง
Determination of ABCC11-glycoprotein(MRP8) transporter function on Tenofovir disoproxil fumarate(TDF) transport in renal tubular cells, In vitro Study.

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนเภสัชกร รศ.ดร.สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย....

ชื่อผู้ร่วมและดำเนินการวิจัยเภสัชกร อ.วิศิษฐ์ ต้นหยง.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี)..1..ตุลาคม..2557..ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี)...30..กันยายน..2558

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) ..1..ตุลาคม...2557.....

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)424,000..... บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....14.พฤศจิกายน..2558..

งวดที่ 2 (40%)339,200..... บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....6.กุมภาพันธ์...2558....

งวดที่ 3 (10%)84,800..... บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี..... 30.กันยายน....2558....

รวม848,000.....

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	10,000	10,000	-
2. ค่าจ้าง	120,000	48,000	+ 72,000
3. ค่าวัสดุ			
- ค่าวัสดุสำนักงาน	10,000	11,200	- 1,200
- ค่าสารเคมี	250,000	257,900	- 7,900
- ค่าอุปกรณ์การทดลอง	215,200	215,200	-
- ค่าเซลล์ LLC-PK1 และ Medium	80,000	80,000	-
- ค่าเซลล์ SF9-MRP8 overexpression	60,000	60,000	-
4. ค่าใช้สอย			
- ค่าเบี้ยเลี้ยง ค่าเช่าที่พัก ค่าพาหนะ	8,000	8,000	-
- ค่าถ่ายเอกสาร	10,000	10,000	-
- ค่าสาธารณูปโภค (ร้อยละ 10)	84,800	84,800	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ			
- ค่าตรวจวัดปริมาณสารด้วย LC/MS/MS	-	76,000	-76,000
รวม	848,000	861,100	-13,100

(.....)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

(.....)
ลงนามผู้ร่วมและดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization[Internet]. Switzerland: HIV/AIDS[update 2012; cite 2013 Aug 12]. Available from: http://www.who.int/hiv/data/2011_epi_core_en.png
2. สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์[Internet]. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2554.[วันที่อ้างอิง 12 สิงหาคม 2556]. ที่มา: <http://www.aidsthai.org/article/3>
3. Amanda M and Lundgren JD. Starting highly active antiretroviral therapy: why, when and response to HAART. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 54:10–13.
4. Sungkanuparph S and Powderly WG. WHY Should We Have Tenofovir in Thailand ? [letter]. *J Infect dis antimicrob agents*. 2004 April 19 ; 21:75-77.
5. Lyseng-Williamson KA, Reynolds NA and Plosker GL. Tenofovir Disoproxil Fumarate: A review of its Use in the Management of HIV infection.*Drug* . 2005; 65(3):413-432.
6. Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, Tong L, Vela JE, Fuller MD, et al. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3297–304.
7. Fernandez-Fernandez B, Montoya-Ferrer A, Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Poveda J, et al. Tenofovir nephrotoxicity: 2011 update. *AIDS Res Treat*. 2011;2011:354908.
8. Pushpakom SP, Liptrott NJ, Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, Soriano V, Albalater M, et al. Genetic variants of ABCC10, a novel Tenofovir transporter, are associated with kidney tubular dysfunction. *J. Infect. Dis*. 2011 Jul 1;204(1):145–53.
9. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, Dejesus E, Miller MD, Suleiman JMAH, et al. Efficacy and safety of Tenofovir DF vs Stavudine in combination therapy in Antiretroviral-Naïve patients : A 3-year Randomized Trail. *JAMA*. 2004; 292(2):191-201.
10. Gallant JE, Parish MA, Keruly JC and Richard D. Changes in renal function associated with tenofovir disoproxil fumarate treatment, compared with nucleoside reverse-transcriptase inhibitor treatment. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1194-8.

11. Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, D'avolio A, Barreiro P, Albalade M, Vispo E, et al. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS*. 2010 Apr 24;24(7):1064–6.
12. Harris M, Yip B and Zalunardo N. Increases in creatinine during therapy with tenofovir DF [abstract 55]. In: Program and abstracts of the 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (Paris, France). 2003. Available at: <http://www.iasociety.org>. Accessed 15 March 2009
13. Verhelst D, Monge M, Meynard JL, Fouqueray B, Mougnot B, Girard PM, et al. Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: a first case report. *Am J of Kidney Dis* 2002;40:1331-33.
14. Peyriere H, Reynes J, Rouanet I, Daniel N, Mauboussin JM, Leray H, et al. Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy. *J Acquir Immune Defic Syndrome*. 2004; 35(3):269-73.
15. Kearney BP, Yale K, Shah J, Zhong L and Flaherty JF. Pharmacokinetics and dosing recommendations of tenofovir disoproxil fumarate in hepatic or renal impairment. *Clin Pharmacokinet*.2006; 45: 1115-24.
16. James DS, Peter RW, Robert KB and Bill G. Serious renal impairment occurs rarely with use of tenofovir DF. *HIV Clin Trials* 2006; 7:55-58.
17. Winston A, Amin J, Mallon PWG, Marriott D, Carr A, Cooper DA, et al. Minor changes in calculated creatinine clearance and anion-gap are associated with tenofovir disoproxil fumarate-containing highly active antiretroviral therapy. *HIV medicine*.2006; 7: 105-11.
18. Labarga P, Barreiro P, Martin-Carbonero L, Rodríguez-Novoa S, Solera C, Medrano J, et al. Kidney tubular abnormalities in the absence of impaired glomerular function in HIV patients treated with tenofovir. *AIDS*. 2009 Mar 27;23(6):689–96.
19. Madeddu G, Bonfanti P, De Socio GV, Carradori S, Grosso C, Marconi P, et al. Tenofovir renal safety in HIV-infected patients: results from the SCOLTA Project. *Biomed. Pharmacother*. 2008 Jan;62(1):6–11.
20. Buchacz K, Brooks JT, Tong T, Moorman AC, Baker RK, Holmberg SD, et al. Evaluation of hypophosphataemia in tenofovir disoproxil fumarate (TDF)- exposed and TDF-unexposed HIV-infected out-patients receiving highly active antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2006 Oct;7(7):451–6.

21. Izzedine H, Isnard-Bagnis C, Hulot JS, Vittecoq D, Cheng A, Jais CK, et al. Renal safety of tenofovir in HIV treatment-experienced patients. *AIDS*. 2004 Apr 30;18(7):1074–6.
22. Cooper RD, Wiebe N, Smith N, Keiser P, Naicker S, Tonelli M. Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Clin. Infect. Dis*. 2010 Sep 1;51(5):496–505.
23. Gupta SK. Tenofovir-associated Fanconi syndrome: review of the FDA adverse event reporting system. *AIDS Patient Care STDS*. 2008 Feb;22(2): 99–103.
24. Cooper RD, Wiebe N, Smith N, Keiser P, Naicker S, Tonelli M. Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Clin. Infect. Dis*. 2010 Sep 1;51(5):496–505.
25. Coca S, Perazella MA. Rapid communication: acute renal failure associated with tenofovir: evidence of drug-induced nephrotoxicity. *Am. J. Med. Sci*. 2002 Dec;324(6):342–4.
26. Goicoechea M, Liu S, Best B, Sun S, Jain S, Kemper C, et al. Greater tenofovir-associated renal function decline with protease inhibitor-based versus nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based therapy. *J. Infect. Dis*. 2008 Jan 1;197(1):102–8.
27. Chaisiri K, Bowonwatanuwong C, Kasettrat N, Kiertiburanakul S. Incidence and risk factors for tenofovir-associated renal function decline among Thai HIV-infected patients with low-body weight. *Curr HIV Res*. Oct 2010;8(7): 504-509.
28. Kiertiburanakul S, Chaisiri K, Kasettrat N, Visuttimak P, Bowonwatanuwong C. Monitoring of Renal Function among HIV-Infected Patients Receiving Tenofovir in a Resource-Limited Setting. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2011 Oct;10(5):297–302.
29. Herlitz LC, Mohan S, Stokes MB, Radhakrishnan J, D’Agati VD, Markowitz GS. Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities. *Kidney Int*. 2010 Dec;78(11):1171–7.
30. Kelly L, Fukushima H, Karchin R, Gow JM, Chinn LW, Pieper U, et al. Functional hot spots in human ATP-binding cassette transporter nucleotide binding domains. *Protein Sci*. 2010 Nov;19(11):2110–21.

31. Côté HCF, Magil AB, Harris M, Scarth BJ, Gadawski I, Wang N, et al. Exploring mitochondrial nephrotoxicity as a potential mechanism of kidney dysfunction among HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther (Lond)*. 2006;11(1):79–86.
32. Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(201):299–323.
33. Gottesman MM, Ambudkar SV. Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2001 Dec;33(6):453–8.
34. Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:123–42.
35. Stefková J, Poledne R, Hubáček JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*. 2004;53(3): 235–43.
36. Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Meth. Enzymol*. 2005;400:409–29.
37. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, et al. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol* ;63(5):1094–103.
38. Gillet J-P, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun; 1775(2):237–62.
39. Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, Tong L, Vela JE, Fuller MD, et al. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3297–304.
40. Kiser JJ, Aquilante CL, Anderson PL, King TM, Carten ML, Fletcher CV. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2008 Mar 1;47(3):298–303.
41. Izzedine H, Hulot J-S, Villard E, Goyenvalle C, Dominguez S, Ghosn J, et al. Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *J. Infect. Dis*. 2006 Dec 1;194(11):1481–91.
42. Rodríguez-Novoa S, Labarga P, Soriano V. Pharmacogenetics of Tenofovir treatment. *Pharmacogenomics*. 2009 Oct;10(10):1675–85.
43. Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, Soriano V, Egan D, Albalater M, Morello J, et al. Predictors of kidney tubular dysfunction in HIV-infected patients treated with tenofovir: a pharmacogenetic study. *Clin. Infect. Dis*. 2009 Jun 1;48(11):e108–116.

44. Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, Takano M, Tsuchiya K, Hayashida T, et al. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 associate with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(11):1558–67.
45. Kohler JJ, Hosseini SH. Subcellular renal proximal tubular mitochondrial toxicity with tenofovir treatment. *Methods Mol Biol*. 2011;755:267–77.
46. Rodriguez-Nóvoa S, Alvarez E, Labarga P, Soriano V. Renal toxicity associated with tenofovir use. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Jul;9(4):545–59.
47. Côté HCF, Magil AB, Harris M, Scarth BJ, Gadawski I, Wang N, et al. Exploring mitochondrial nephrotoxicity as a potential mechanism of kidney dysfunction among HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Antivir. Ther. (Lond.)*. 2006;11(1):79–86.
48. Cihlar T, Ho ES, Lin DC, Mulato AS. Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001 Jul;20(4-7):641–8.
49. G.D. Kruh, Y. Guo, E. Hopper-Borge, M.G. Belinsky, Z.S. Chen, ABCC10, ABCC11, and ABCC12, *Pflugers Arch*. 453 (5) (2007) 675–684.
50. Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, et al. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene*. 2001 Jul 25;273(1):89–96.
51. H. Yabuuchi, H. Shimizu, S. Takayanagi, T. Ishikawa, Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 288 (2001) 933–939.
52. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):849–99.
53. Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K-I, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genet*. 2009;10:42.

54. Inoue Y, Mori T, Toyoda Y, Sakurai A, Ishikawa T, Mitani Y, et al. Correlation of axillary osmidrosis to a SNP in the ABCC11 gene determined by the Smart Amplification Process (SmartAmp) method. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Aug;63(8):1369–74.
55. Toyoda Y, Ishikawa T. Pharmacogenomics of human ABC transporter ABCC11 (MRP8): potential risk of breast cancer and chemotherapy failure. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010 Oct 1;10(8):617–24.
56. Oguri T, Bessho Y, Achiwa H, Ozasa H, Maeno K, Maeda H, et al. MRP8/ ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol Cancer Ther*. 2007 Jan;6(1):122–7.
57. Gillet J-P, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun; 1775(2):237–62.
58. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen Z-S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*. 2012 Feb;31(2): 58–72.
59. M. Bortfeld, M. Rius, J. König, C. Herold-Mende, A.T. Nies, D. Keppler, Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system, *Neuroscience* 137 (2006) 1247–1257.
60. Z.S. Chen, Y. Guo, M.G. Belinsky, E. Kotova, G.D. Kruh, Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11), *Mol. Pharmacol*. 67(2005) 545–557.
61. Y. Guo, E. Kotova, Z.S. Chen, K. Lee, E. Hopper-Borge, M.G. Belinsky, G.D. Kruh, MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 29509–29514.
62. Uemura T, Oguri T, Ozasa H, Takakuwa O, Miyazaki M, Maeno K, et al. ABCC11/MRP8 confers pemetrexed resistance in lung cancer. *Cancer Sci*. ;101(11):2404–10.
63. Taylor IW, Tattersall MH. Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer Res*. 1981 Apr;41(4):1549–58.
64. Nagiah S, Phulukdaree A, Chuturgoon AA. Mitochondrial and oxidative stress response in HepG2 cells following acute and chronic exposure to antiretroviral drugs. *J Cell Biochem*. 2015 Mar 4;

65. Venhoff N, Setzer B, Melkaoui K, Walker UA. Mitochondrial toxicity of tenofovir, emtricitabine and abacavir alone and in combination with additional nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther (Lond)*. 2007;12(7):1075–85.
66. Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, Nielsen M, Verroust P, Christensen EI. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Oct;9(10):1767–76.
67. Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):15181–5.
68. Raggars RJ, van Helvoort A, Evers R, van Meer G. The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J Cell Sci*. 1999 Feb;112 (Pt 3):415–22.
69. Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro*. 1976 Oct;12(10):670–7.