

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง  
เป็นเวลา 6 เดือน ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต



นายเกียรติศักดิ์ วัฒนชาติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFECTS OF URINES FROM NEPHROLITHIASIS PATIENTS BEFORE AND AFTER  
6-MONTHS TREATMENT WITH LIME POWDER REGIMEN ON OXIDATIVE STRESS AND  
INFLAMMATION IN RENAL TUBULAR CELLS



Mr. Kiattisak Vanijajiva

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงเป็นเวลา 6 เดือน ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

โดย

นายเกียรติศักดิ์ วัฒนชาติ

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. นายแพทย์รัฐสิณัส ดิษยบุตร

ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โทสุขโขวงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภากาศ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฐฐ์ ประพันธ์วัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. นายแพทย์รัฐสิณัส ดิษยบุตร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โทสุขโขวงศ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม)

เกียรติศักดิ์ วัฒนชาติ : ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วย  
 สูตรมะนาวผงเป็นเวลา 6 เดือน ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ  
 ในเซลล์บุผิวท่อไต. (EFFECTS OF URINES FROM NEPHROLITHIASIS PATIENTS  
 BEFORE AND AFTER 6-MONTHS TREATMENT WITH LIME POWDER REGIMEN ON  
 OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN RENAL TUBULAR CELLS) อ.ที่ปรึกษา  
 วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชาญชัย บุญหล้า, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. นพ.รัฐสิณัส  
 ดิษยบุตร, ศ. ปิยะรัตน์ โทสุขโขวงศ์, 72 หน้า.

การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าการอักเสบจากออกซิเดชันและการอักเสบเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย  
 โรคนี้ไต และเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง (LPR) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถลด  
 ภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีกรรายงานที่ sialic acid บนผิวเซลล์ทำหน้าที่  
 เป็นตัวรับจับกับฟลิกแคลเซียมได้ ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรค  
 นี้ไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงหรือยาหลอก (placebo) ต่อการกระตุ้นภาวะ  
 เครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต  
 (HK-2 cells) เก็บสารตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผงจำนวน 5 ราย  
 และผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยาหลอกจำนวน 5 ราย ทดสอบผลของปัสสาวะที่ได้จากผู้ป่วยโรคนี้ไตแต่ละราย  
 กับเซลล์บุผิวท่อไต ใช้ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ TNF- $\alpha$  เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการ  
 อักเสบตามลำดับ วิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ตรวจวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งใช้ตัวบ่งชี้  
 protein carbonyl, intracellular reactive oxygen species (ROS) production, total  
 antioxidant status (TAS) และ catalase activity ตรวจวัดการอักเสบของเซลล์ท่อไต โดยอาศัยการ  
 วัดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B และวัดระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต ผลการศึกษาพบว่า ปัสสาวะของ  
 ผู้ป่วยโรคนี้ไตความเข้มข้น 20% (v/v), 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์บุ  
 ผิวท่อไต ระดับ protein carbonyl และการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ TAS ลดลง  
 อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของกลุ่ม  
 ผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR มีระดับ protein carbonyl การสร้าง ROS และระดับ sialic acid  
 ลดลง และระดับ TAS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR ไม่พบการเปลี่ยนแปลง  
 ของการกระตุ้น NF- $\kappa$ B ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับการรักษา ทั้งใน  
 กลุ่ม LPR และ placebo จึงสรุปได้ว่าปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR สามารถ  
 ลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตได้ ขณะที่ปัสสาวะจากผู้ป่วย  
 โรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย placebo ไม่สามารถทำได้ ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลระดับเซลล์ที่  
 สนับสนุนว่าการรักษาด้วยสูตรมะนาวผงน่าจะสามารถป้องกันหรือความเสี่ยงที่จะเกิดนิ่วซ้ำได้

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

# # 5474178030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: NEPHROLITHIASIS / HK-2 CELL

KIATTISAK VANIJAJIVA: EFFECTS OF URINES FROM NEPHROLITHIASIS PATIENTS BEFORE AND AFTER 6-MONTHS TREATMENT WITH LIME POWDER REGIMEN ON OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN RENAL TUBULAR CELLS. ADVISOR: ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., CO-ADVISOR: THASINAS DISSAYABUTRA, Ph.D., PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, 72 pp.

We previously reported increases in oxidative damage and inflammation in stone-containing kidneys of nephrolithiasis patients, and the patients 6-months-treated with lime powder regimen (LPR) showed significantly decrease in oxidative stress. Sialic acid has been proposed as a cell surface binding molecule for calcium crystals. In this study, we investigated the effect of urine from nephrolithiasis patients before and after treatment with LPR or placebo on oxidative stress induction, inflammatory activation and change of sialic acid content in human renal proximal tubular (HK-2) cells. Pre- and post-treatment 24-hr urine samples were collected from 5 LPR-treated patients and 5 placebo-treated patients. HK-2 cells were challenged with urine from each subject. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  treatments were used as positive controls for inductions of oxidative stress and inflammation, respectively. Protein carbonyl, intracellular reactive oxygen species (ROS), total antioxidant status (TAS), catalase activity, NF- $\kappa$ B activation and sialic acid content in the urine-challenged cells were measured. Viability of HK-2 cells exposed to 20% (v/v) urine, 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10 ng/mL TNF- $\alpha$  did not significantly alter. Protein carbonyl content and intracellular ROS generation were significantly increased, while TAS was significantly decreased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells compared with the untreated cells. Post-LPR-treated urine significantly caused decreases in protein carbonyl and intracellular ROS, and increase in TAS compared with the pre-LPR-treated urine. Sialic acid content was significantly decreased in cells exposed to the post-LPR-treated urine. Change of NF- $\kappa$ B activation was not found in cells exposed to pre- vs. post-treatment urine in both PLR and placebo groups. Conclusion, urine from LPR-treated patients, but not from placebo-treated patients, was capable of reducing oxidative stress and sialic acid content in renal tubular cells. This cellular evidence supports a beneficial effect of LPR treatment for preventing recurrent formation of kidney calculi.

Department: Biochemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายฝ่าย ผู้จัดทำขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ฐิติณัฐ ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ชี้แนะ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอน อบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำต่างๆ ทั้งความรู้และการพัฒนากระบวนการคิดอันเป็นส่วนสำคัญทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เฉลิมศักดิ์ กาญจนบุษย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในคำชี้แนะต่างๆที่ผลักดันให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม ในการเรียนตลอดหลักสูตรรวมถึงเพื่อนมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องการจัดทำเอกสาร การออกจดหมาย การเตรียมสถานที่ และอำนวยความสะดวกตลอดการเรียนในหลักสูตร

ขอขอบพระคุณทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้สนับสนุนทุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบุพการี ผู้เป็นแรงบันดาลใจอันสำคัญของผู้จัดทำนำมาซึ่งความสำเร็จครั้งนี้ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และ เพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณสำหรับกำลังใจดีๆ ที่มีให้ผู้จัดทำตลอดโครงการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
ประชากรตัวอย่างและสารตัวอย่าง.....	16
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	18
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	20
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการมีชีวิต (Cell viability) ของเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) ที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง.....	28
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	33

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	36
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	38
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ catalase (catalase activity) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	41
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	42
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells).....	45
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต.....	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	50
สรุปผลการวิจัย .....	50
อภิปรายผลการวิจัย .....	52
ข้อเสนอแนะ .....	55
รายการอ้างอิง .....	57
ภาคผนวก.....	63
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	68
ภาคผนวก ค.....	69
ภาคผนวก ง .....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	72



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	18
ตารางที่ 2: สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	19
ตารางที่ 3: ตารางแสดงวิธีการในการเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ.....	21
ตารางที่ 4: ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo.....	28
ตารางที่ 5: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไทต์ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	29
ตารางที่ 6: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไทต์ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	30
ตารางที่ 7: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไทต์ที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$ และปัสสาวะของผู้ป่วยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	32
ตารางที่ 8: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไทต์ที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	32
ตารางที่ 9: การสร้าง ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	34
ตารางที่ 10: ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	37
ตารางที่ 11: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	39
ตารางที่ 12: การทำงานเอนไซม์ catalase (catalase activity) เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	41
ตารางที่ 13: การกระตุ้นการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$ และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	43
ตารางที่ 14: ระดับของ sialic acid เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไทต์ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	45

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1: การจับกันของ sialic acid บนผิวเซลล์กับผลึก COM ในเซลล์บุผิวไต (MDCK cells).....	9
ภาพที่ 2: การสร้าง ROS ที่เซลล์บุผิวไต .....	12
ภาพที่ 3: กราฟมาตรฐาน %AA และความเข้มข้นมาตรฐานของวิตามินซี .....	25
ภาพที่ 4: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10 – 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 3 ชั่วโมง .....	29
ภาพที่ 5: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10 – 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	31
ภาพที่ 6: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$ , 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง.....	33
ภาพที่ 7: การสร้าง ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo .....	35
ภาพที่ 8: การสร้าง ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย และ placebo 5 ราย.....	36
ภาพที่ 9: ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo .....	37
ภาพที่ 10: ระดับ protein carbonyl ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย และ placebo 5 ราย .....	38
ภาพที่ 11: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	40
ภาพที่ 12: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย และ placebo 5 ราย .....	40
ภาพที่ 13: การทำงานเอนไซม์ catalase (catalase activity) เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	42
ภาพที่ 14: การกระตุ้นการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$ และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo .....	44
ภาพที่ 15: ระดับของ sialic acid เมื่อเซลล์ได้รับ 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo.....	46

ภาพที่ 16: ผลการย้อม WGA lectin cytochemistry ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และ  
 ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้่วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ..... 47

ภาพที่ 17: ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตและคนปกติในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชัน  
 และการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต ..... 49



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (kidney stone disease หรือ nephrolithiasis) เป็นปัญหาสำคัญของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อยทั่วโลก (1) ในประเทศแถบตะวันตกพบความชุกร้อยละ 5-16 ประเทศแถบเอเชียพบความชุกร้อยละ 5-10 (2) ประเทศสหรัฐอเมริกาพบความชุกของโรคนิ่วไตสูงถึงร้อยละ 8.8 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (3) ในประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรคนิ่วไตพบสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณร้อยละ 10-17 (4) อีกทั้งโรคนิ่วไตยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง ภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่ว (lithotripsy) หรือการผ่าตัด (surgery) (5-7) ผู้ป่วยที่เป็นนิ่วซ้ำบ่อยๆ จะมีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคไตวายเรื้อรังตามมา ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรโลกรวมถึงประชากรไทย

กลไกการเกิดนิ่วในปัสสาวะเริ่มจากภาวะอิ่มตัววยดียง (supersaturation) ของสารก่อนิ่ว (stone promoters) ในปัสสาวะ ทำให้เกิดการตกผลึกของสารก่อนิ่ว (crystal nucleation) ในปัสสาวะ ผลึกนิ่วที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นผลึกแคลเซียมออกซาลेट (calcium oxalate, CaOx) และแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate, CaP) ผลึกนิ่วส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กและถูกขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะ ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตผลึกนิ่วที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะโตขึ้น (crystal growth) เร็วและรวมกลุ่มกันมากขึ้น (crystal aggregation) ทำให้ผลึกมีขนาดใหญ่และคงค้างหรือติดค้างในไต (crystal retention) หลายงานวิจัยรายงานว่าผลึกนิ่วสามารถกระตุ้นการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) (8-10) และการอักเสบ (inflammation) (11-14) ในเซลล์บุผิวท่อไต (renal tubular epithelial cells) ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและทำลายเซลล์มากขึ้น (renal tubular injury) มีเซลล์ตายและมีการสร้างเซลล์ใหม่มาทดแทนมากขึ้น ตำแหน่งบาดเจ็บที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตำแหน่งเกาะติดของผลึกนิ่ว ทำให้มีผลึกนิ่วคงค้างในไตมากขึ้น สะสมนานขึ้น ขนาดใหญ่ขึ้น เกิดเป็น nidus และกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าขั้นตอนที่สำคัญของการเกิดนิ่ว คือ การติดค้างของผลึกในท่อไต ซึ่งขั้นตอนนี้ถูกส่งเสริมให้เกิดง่ายขึ้นและมากขึ้นโดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ ดังนั้นหากสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบลงได้ โดยการให้สารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านการอักเสบตามลำดับ น่าจะสามารถลดการคงค้างของผลึกในไตและลดโอกาสการเกิดนิ่วได้ การศึกษาในหนูที่ได้รับสาร ethylene glycol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของออกซาลेट พบว่าหนูเกิดภาวะออกซาลेटในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) พบภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไต และมีการติดค้างของผลึกแคลเซียมออกซาลेट (CaOx crystal deposit) ในไตมากกว่าหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ ethylene glycol อย่างมีนัยสำคัญ (15) และเมื่อหนูได้รับวิตามินอีร่วมกับ ethylene glycol พบว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไตลดลง และที่สำคัญปริมาณ crystal deposit ในไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (16, 17) แสดงให้เห็นว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว

ผลงานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัย ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์และคณะ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต มีระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตสูงกว่ากลุ่มคนปกติ (18, 19) และเมื่อตรวจสอบพยาธิสภาพในไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต พบว่า เนื้อเยื่อไตข้างที่มีนิ้วอยู่มีระดับการอักเสบและการเกิดพังผืด (renal fibrosis) สูงกว่าเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ไม่มีนิ้ว และระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดพังผืด interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ transforming growth factor-beta 1 ในไตข้างที่มีนิ้วสูงขึ้นกว่าในไตที่ไม่มีนิ้ว และสัมพันธ์กับการทำงานของไตที่เสื่อมลง (20, 21) จากนั้น ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์และคณะได้พัฒนาสูตรมะนาวผง (lime powder regimen, LPR) จากน้ำมะนาวสด ซึ่งมีสารยับยั้งนิวซิเทรตและสารต้านอนุมูลอิสระสูง สำหรับนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันการเกิดนิ้วซ้ำภายหลังการผ่าตัดเอานิ้วออก ผลการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ้วไตพบว่า การได้รับ LPR สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ้วได้เทียบเท่ากับยาโพแทสเซียมซิเทรตที่ใช้ในปัจจุบัน โดยการเพิ่มระดับสารยับยั้งนิวซิเทรตในปัสสาวะ และเพิ่มความเป็นด่างของปัสสาวะ และที่สำคัญ LPR ยังสามารถลดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตได้อย่างมีนัยสำคัญ (22) อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลระดับเซลล์และระดับโมเลกุลที่สนับสนุนและยืนยันว่า ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตภายหลังได้รับการรักษาด้วย LPR แล้ว มีความสามารถในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไตลดลงจริง เมื่อเทียบกับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนได้รับการรักษาด้วย LPR

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปัสสาวะต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (HK-2 cells) โดยเปรียบเทียบระหว่างปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วย LPR และจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยยาหลอก (placebo) ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตภายหลังได้รับการรักษาด้วย LPR แล้ว น่าจะลดการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไตได้เมื่อเทียบกับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนได้รับการรักษาด้วย LPR และลดได้มากกว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย placebo ผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดนิ้วมากขึ้น โดยเฉพาะอิทธิพลของปัสสาวะในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไต และทราบถึงแนวทางที่จะลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ้วไต ซึ่งจะนำไปสู่การลดโอกาสหรือความเสี่ยงที่จะเกิดนิ้วซ้ำได้

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ placebo ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

### ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ้วไต แต่ไม่ได้ทำการรวบรวมกลุ่มตัวอย่างเอง เนื่องจากไม่ได้ทำการศึกษาโดยตรงกับกลุ่มตัวอย่างกลุ่มนี้ เป็นเพียงการคัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง และดูผลการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยง
2. กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต เป็นผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยของ “โครงการวิจัยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ้วไต” ซึ่งทำการรวบรวมที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยจะทำการขออนุญาตใช้ปัสสาวะจากเจ้าของสารตัวอย่างก่อนการทำวิจัย และการศึกษานี้จะคัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมงหลังการผ่าตัดเอานิ้วออกหรือสลายนิ้ว จากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย placebo จำนวน 5 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย LPR จำนวน 5 ราย

### ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือที่ใช้ทดสอบนั้นๆ
2. ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้มาจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ้วไตของ “โครงการวิจัยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ้วไต” ซึ่งทำการรวบรวมที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยจะทำการขออนุญาตใช้ปัสสาวะจากเจ้าของสารตัวอย่างก่อนการทำวิจัย

### ข้อจำกัดในการวิจัย

1. ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้มาจากกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ้วไต จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นเพียงกลุ่มตัวแทนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่านั้น จึงอาจเป็นข้อจำกัดในการแปลผลงานวิจัยนี้ไปสู่ผู้ป่วยโรคนิ้วไตในภูมิภาคอื่นๆ
2. การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการศึกษาที่ได้ อาจจะไม่สามารถนำไปอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้นจริงทั้งหมดในร่างกายหรือในเซลล์ไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไตได้ แต่จะใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนในการอธิบายกลไกการเกิดนิ้วและการตอบสนองของเซลล์ไตในผู้ป่วยโรคนิ้วไต ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลได้

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Kidney stone disease หรือ nephrolithiasis คือ โรคนิ่วไต เกิดจากการตกตะกอนหรือตกผลึกของแร่ธาตุหรือสารประกอบต่างๆ ในปัสสาวะ สะสมรวมกันอยู่ในรูปของของแข็งและอยู่ในไต เกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด ถ้าก้อนนิ่วนั้นมีขนาดใหญ่มากจะไปอุดตันอยู่ในท่อไต จึงทำให้เกิดอาการของโรคนิ่วขึ้น
2. Oxidative stress คือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งเป็นภาวะที่มีสารออกซิไดซ์มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระหรือเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างสารออกซิไดซ์และสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ เกิดขึ้น เมื่อเกิดมากขึ้นและเรื้อรังจะนำไปสู่การตายของเซลล์ได้
3. Inflammation คือ การอักเสบ ซึ่งเป็นการตอบสนองทางชีวภาพที่ซับซ้อนของร่างกายต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย เช่น เชื้อโรค เซลล์ที่เสื่อมสภาพ และการระคายเคือง เป็นต้น ซึ่งเป็นความพยายามของสิ่งมีชีวิตที่จะกำจัดหรือทำลายสิ่งกระตุ้นนั้นๆ ออกไป สัญญาณของการอักเสบ ได้แก่ ปวด บวม แดง และร้อน ในระดับโมเลกุลสารกระตุ้นการอักเสบจะส่งสัญญาณภายในเซลล์นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน NF- $\kappa$ B ซึ่ง NF- $\kappa$ B ทำหน้าที่เป็น transcription factor ไปกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น interleukins, monocyte chemoattractant protein 1 และ transforming growth factor beta-1 เป็นต้น
4. Lime powder regimen (LPR) คือ สูตรมะนาวผง ทำการแปรรูปน้ำมะนาวให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด บรรจุในซองอลูมิเนียม ซองละ 5 กรัม ในหนึ่งซองมีปริมาณโพแทสเซียม เท่ากับ 21 มิลลิอิกวาเลนท์ และซีเทรต เท่ากับ 63 มิลลิอิกวาเลนท์ สูตรมะนาวผงนี้คิดค้นและผลิตโดย ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โดสุโขวงศ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาติ ไซสวัสดิ์
5. HK-2 cells คือ cell line ของเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้นที่แยกได้จากมนุษย์ (human proximal tubular epithelial cell) ชื่อมาจาก ATCC®

### ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบกลไกการเกิดนิ่วในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลมากขึ้น โดยเฉพาะการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไตโดยปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR
2. ทราบถึงแนวทางการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ซึ่งจะนำไปสู่การลดโอกาสหรือความเสี่ยงที่จะเกิดนิ่วซ้ำได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบ experimental analytical study โดยใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เก็บไว้จากโครงการวิจัย เรื่อง “โครงการวิจัยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ซึ่งทำการรวบรวมที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

การศึกษานี้จะคัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดเอานิ่วออกหรือสลายนิ่ว และในไตของผู้ป่วยไม่มีนิ่วเหลืออยู่ (stone-free condition) ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยก่อนและหลังการได้รับการรักษาด้วยยาหลอก เป็นเวลา 6 เดือน จำนวน 5 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง เป็นเวลา 6 เดือน จำนวน 5 ราย โดยจะเปรียบเทียบผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลังได้รับสูตรมะนาวผงหรือยาหลอก ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

ปัสสาวะที่ได้จากผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้ง 2 กลุ่มทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cells วิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ตรวจวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยใช้ตัวบ่งชี้ Protein carbonyl, total antioxidant status (TAS), catalase activity และ Intracellular reactive oxygen species (ROS) production และตรวจวัดภาวะการอักเสบของเซลล์ท่อไต โดยอาศัยการวัดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B

## ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. คัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูลวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง
2. จัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ และจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) ในหัวข้อเรื่อง “Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen” เพื่อนำเสนอแบบ Oral presentation ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ the 5<sup>th</sup> Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 14 – 18 ตุลาคม 2556 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ผลงานวิจัยนี้ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์เป็น proceeding ในวารสาร KRU Research Journal, October, 2013, Vol. 18, Special issue, for the 5<sup>th</sup> annual conference for Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (5<sup>th</sup> ACGG) (ภาคผนวก ค)



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### โรคนิ่วไต (Nephrolithiasis)

โรคนิ่วไต คือโรคที่เกิดจากการตกผลึกของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ก่อตัวเป็นก้อนนิ่วในไตหรือกรวยไต ผลึกนิ่วส่วนใหญ่จะเป็นผลึกแคลเซียมออกซาลेट รองลงมาเป็นผลึกแคลเซียมฟอสเฟต ผลึกกรดยูริก และผลึกของสารอื่นๆ ถ้าผลึกหรือก้อนนิ่วที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก จะสามารถหลุดออกมาจากร่างกายได้เอง ผ่านทางการไหลของปัสสาวะ คือ ผ่านจากไต กรวยไต ลงมาที่ท่อไต ต่อเนื่องลงมาจนถึงกระเพาะปัสสาวะ และผ่านออกทางท่อปัสสาวะ แต่ถ้าผลึกหรือก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่กว่าทางเดินปัสสาวะ จะไปอุดตันอยู่ในระบบทางเดินปัสสาวะส่วนใดส่วนหนึ่ง ไม่สามารถผ่านออกมาได้ จึงทำให้เกิดอาการของโรคนิ่วขึ้น โรคนิ่วไตจัดว่าเป็นปัญหาสำคัญของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้บ่อยทั่วโลก (1) ยกตัวอย่างเช่น ประเทศแถบตะวันตกมีความชุกร้อยละ 5-16 ประเทศแถบเอเชียมีความชุกร้อยละ 5-10 (2) ประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่ามีความชุกร้อยละ 8.8 และในปัจจุบันเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ (3) สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีอุบัติการณ์การเป็นโรคนิ่วไตสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบประมาณร้อยละ 10-17 (4) นอกจากอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงแล้ว โรคนิ่วไตยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่วหรือการผ่าตัด (5-7) ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดไตวายเรื้อรังและโรคไตระยะสุดท้ายตามมา

ชนิดของนิ่วแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของผลึกในก้อนนิ่ว คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 80 ซึ่งอาจเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลेट หรือนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต หรือนิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาลेटกับฟอสเฟต หรือแคลเซียมออกซาลेटกับกรดยูริก ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) พบได้ประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และนิ่วซิสทีน (cystine stone) เป็นต้น

ปัสสาวะประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ มากมาย ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยสารก่อนิ่วที่มีอยู่ในปัสสาวะตามปกติ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาลेट กรดยูริก ในภาวะที่มีปริมาณผิดปกติและสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย สารเหล่านี้สามารถรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็งและมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่างๆ ของทางเดินปัสสาวะ สำหรับสารที่ป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะเรียกว่า สารยับยั้งนิ่ว ที่สำคัญได้แก่ ซิเตรต โปแทสเซียม และแมกนีเซียม

โรคนิ่วไตจัดเป็น multifactorial disease มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยภายใน (intrinsic risk factors) ปัจจัยภายนอก (extrinsic risk factors) และปัจจัยทางเมแทบอลิก (metabolic risk factors) ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่ออุบัติการณ์การเกิดโรคนิ่วซ้ำและความชุกของโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ

ปัจจัยเสี่ยงภายในที่ส่งผลต่อการเกิดโรคนิ่วไต ได้แก่

- พันธุกรรม ถ้ามีประวัติครอบครัวเป็นโรคนิ่วไตจะมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรค (23)
- เพศและอายุ เพศชายพบอุบัติการณ์ของนิ่วมากกว่าเพศหญิง และพบในเด็กน้อยกว่าผู้ใหญ่
- ดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเพิ่มขึ้นในคนที่มีค่า BMI สูง (24)
- เชื้อชาติ หลายงานวิจัยรายงานว่าอุบัติการณ์ของการเกิดนิ่วในคนผิวขาวสูงกว่าในคนผิวดำ

ปัจจัยเสี่ยงภายนอกที่ส่งผลต่อการเกิดโรคนิ่วไต ได้แก่

- อาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วมากที่สุด การบริโภคอาหารและการดื่มน้ำมีผลให้มีการเพิ่มหรือลดของสารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของนิ่ว
- ภูมิอากาศ พบอุบัติการณ์โรคนิ่วไตมากขึ้นในบริเวณที่มีภูมิอากาศร้อน
- อาชีพ ผู้ที่ทำงานในสภาพอากาศที่ร้อน ทำให้มีภาวะขาดน้ำจากการเสียเหงื่อมากจะพบอุบัติการณ์ของนิ่วไตเพิ่มขึ้น (25)
- ยา การรับประทานยาบางชนิดมีผลต่อการขับสารก่อนิ่วออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น เช่น การได้รับวิตามินซีในปริมาณสูงเป็นประจำ ทำให้ออกซาเลตในเลือดและในปัสสาวะสูง(26)

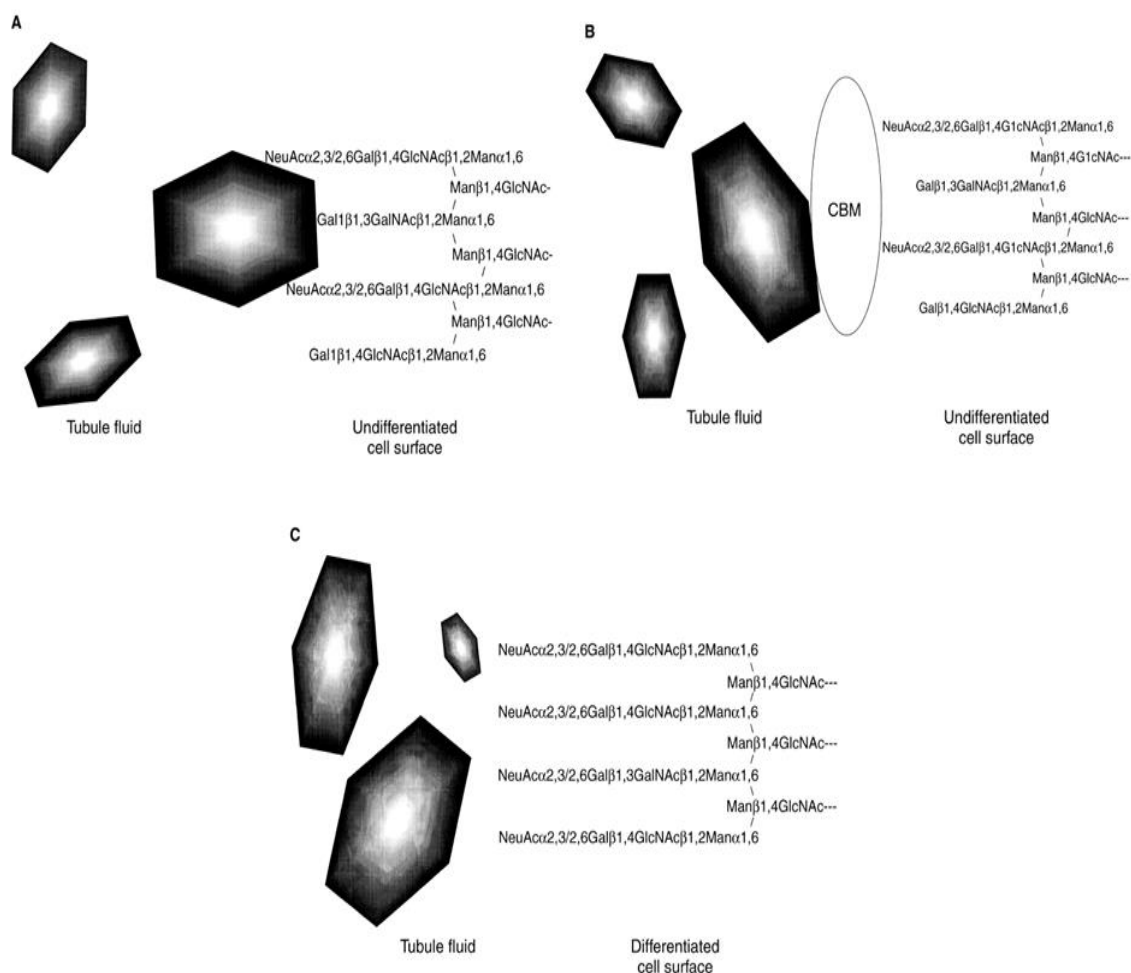
ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่ส่งผลต่อการเกิดนิ่วไต ได้แก่

- ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะ (Hyperoxaluria)
- ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะ (Hypercalciuria)
- ภาวะกรดยูริกสูงในปัสสาวะ (Hyperuricosuria)
- ภาวะฟอสเฟตสูงในปัสสาวะ (Hyperphosphaturia)
- ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia)
- ภาวะผิดปกติของสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่เป็นโมเลกุล (abnormal inhibitory macromolecules)
- ภาวะปัสสาวะเข้มข้นเนื่องจากการขาดน้ำ (Dehydration)
- ภาวะปัสสาวะเป็นกรดหรือต่างมากเกินไป (Low/high urinary pH)

การเกิดนิ่ว (stone/calculi formation) เป็นผลมาจากการเกิดผลึก (crystal formation) ในปัสสาวะ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดผลึกในปัสสาวะคือภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ของสารก่อนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัสสาวะมีสารอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ดังนั้นการเกิดผลึกจึงไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารก่อนิ่วในปัสสาวะเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับสารที่สามารถจับหรือมีปฏิสัมพันธ์กับสารก่อนิ่วหรือผลึกเหล่านี้ด้วย สารที่ช่วยลดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ลดโอกาสการเกิดผลึก หรือลดการเกาะติดของผลึกที่เซลล์บุท่อไต เรียกว่า สารยับยั้งการก่อนิ่ว ซึ่งมีทั้งสาร

โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ซิเทรต แมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) เป็นต้น และสารโมเลกุลขนาดใหญ่ จำพวกสารชีวโมเลกุล เช่น glycosaminoglycans (GAGs), Tamm-Horsfall protein (THP), nephrocalcin, urinary prothrombin fragment-1 (UPTF1), osteopontin (OPN), bikunin (BK) และ albumin เป็นต้น โดยสารบางตัวอาจทำหน้าที่ทั้งช่วยเพิ่มและลดการเกิดนิ่วได้ และนอกจากนี้ไกลโคโปรตีนที่มีประจุลบ (sialic acid-containing glycoproteins) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดกันระหว่างผลึกกับเซลล์ (cell-crystal interaction) มีการศึกษาใน renal epithelial cells พบว่า ผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) สามารถจับกับ sialic acid ที่ผิวเซลล์ได้ และการจับกันระหว่างผลึกกับเซลล์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วย lectin ซึ่ง lectin ที่จำเพาะกับ sialic acid มีหลายชนิด เช่น Weat germ agglutinin (WGA), Maackia Amurensis II (MALII) และ Sambucus Nigra (SNA) เป็นต้น เนื่องจาก lectin จะไปแย่งจับกับ sialic acid ที่ผิวเซลล์ (27, 28) จะเห็นได้ว่าในปัสสาวะมีทั้งสารที่เพิ่มและลดปัจจัยการเกิดนิ่วทั้งภาวะอิมมูโนตัววยดิ่งและการเกาะติดกันระหว่างผลึกกับผลึก หรือระหว่างผลึกกับเซลล์ ทั้งนี้การจะเกิดนิ่วหรือไม่เกิดนิ่วนั้น ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งการก่อนิ่ว ถ้าในปัสสาวะมีสารก่อนิ่วมากกว่าตัวยับยั้งก็มีโอกาสเสี่ยงจะเกิดนิ่วได้ง่าย และในทางตรงกันข้าม ถ้ามีตัวยับยั้งมากกว่าสารก่อนิ่วก็จะลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วได้เช่นกัน

จากที่กล่าวไปข้างต้นเกี่ยวกับการจับกันระหว่างผลึกกับเซลล์ ซึ่งเชื่อว่าเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดค้างของผลึกในไตและทำให้เกิดนิ่วขึ้น ซึ่ง sialic acid บนผิวเซลล์ เป็นตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทต่อการจับกันกับผลึก sialic acid เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งมีประจุลบ ทำให้เซลล์มีลักษณะเป็นประจุลบจำนวนมาก และหน้าที่ของ sialic acid เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นตัวรับ (receptor) ต่อสารต่างๆ เช่น สารพิษ ฮอรโมน สารสื่อประสาท เป็นต้น และมีหลายการศึกษาที่ศึกษาบทบาทของ sialic acid ต่อการจับกันกับผลึก โดยการศึกษาของ Verkoelen และคณะ (28) ที่ทำการศึกษารูปแบบของ sialic acid บนผิวเซลล์ต่อการจับกับผลึก COM ทดลองในเซลล์เยื่อบุท่อไตชนิด Madin-Darby canine kidney (MDCK cells) พบว่า sialic acid บนผิวเซลล์ในระยะ undifferentiated ส่งผลต่อการจับกันกับผลึก COM ได้ดีกว่าเซลล์ระยะ differentiated แสดงรูปการจับกันของผลึกกับเซลล์ ดังภาพที่ 1a และ c เนื่องจากในเซลล์ระยะ differentiated นั้นอาจมีไกลโคโปรตีนอื่นๆ บนผิวเซลล์ ที่เซลล์ในระยะ undifferentiated ไม่มี จึงส่งผลให้จับกันได้ดีกว่าและการจับกันยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างสามมิติของ sialic acid บนผิวเซลล์ด้วย และในการทดลองนี้เชื่อว่าอาจมี crystal binding molecule (CBM) เป็นตัวช่วยในการจับกันระหว่างผลึกกับเซลล์ระยะ undifferentiated (ภาพที่ 1b) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า sialic acid มีบทบาทสำคัญต่อการจับกันกับผลึก COM นำไปสู่การติดค้างของผลึกในไตและส่งผลต่อการเกิดนิ่วในที่สุด



ภาพที่ 1: การจับกันของ sialic acid บนผิวเซลล์กับผลึก COM ในเซลล์บุผิวไต (MDCK cells) (a) การจับกันของ sialic acid บนผิวเซลล์ระยะ undifferentiated กับผลึก COM (b) การจับกันของ sialic acid บนผิวเซลล์ระยะ undifferentiated กับผลึก COM โดยมี crystal binding molecule (CBM) เป็นตัวช่วยในการจับกันระหว่างผลึกกับเซลล์ (c) sialic acid บนผิวเซลล์ระยะ differentiated พบว่าไม่มีผลต่อการจับกันของผลึก COM (28)

ภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ คือ ความสามารถของสารละลายในปัสสาวะที่ยังสามารถละลายได้หรือยังไม่ตกผลึกขณะที่เลยจุดอิ่มตัวของสารนั้นแล้ว โดยมีอุณหภูมิและ pH ที่คงที่ และพร้อมที่จะตกผลึก (crystal nucleation) ได้ทันที เมื่อมีตัวกระตุ้นหรือนิวเคลียสเริ่มต้น (nucleator) ซึ่งปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไวโตจะอยู่ในภาวะความอิ่มตัวยิ่งยวดเป็นเวลานาน (chronic supersaturation) ทำให้มีปริมาณสารก่อนิ่วและผลึกสูงมาก ผลึกที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นหรือเป็นนิวเคลียสเริ่มต้นให้เกิดผลึกของอีกสารหนึ่งได้ ผลึกจะโตขึ้นเรื่อยๆ และอาจรวมตัวกันเป็นก้อนหรือกลุ่มผลึกขนาดใหญ่ขึ้น ผลึกขนาดใหญ่หรือกลุ่มผลึกบางส่วนจะติดค้างที่เซลล์บุผิวท่อไต

ผลึกขนาดเล็กสามารถขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะได้ ผลึกส่วนหนึ่งจะถูกนำเข้าสู่เซลล์บุท่อไต (internalization/endocytosis) และนำไปกำจัดในไลโซโซมหรือบางส่วนอาจขนส่งต่อไปยัง renal interstitium ทั้งสารก่อนิ่วในปัสสาวะและผลึกที่เกิดขึ้นสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และ ROS ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย ซึ่งจะส่งเสริมการติดค้างของผลึกในท่อไต นอกจากนี้สารก่อนิ่วและผลึกยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสังเคราะห์และหลั่งสารตัวกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น ไซโตไคน์ (cytokines) และเคโมไคน์ (chemokines) ต่างๆ เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น monocytes และ macrophages ให้เข้ามาเก็บกินผลึกที่ติดค้างใน renal interstitium ส่งผลให้เกิดการอักเสบและภาวะ renal fibrosis ตามมา (29) ดังนั้นสรุปได้ว่า การเกิดนิ่วไตเป็นผลจากการก่อตัวของผลึกในปัสสาวะ (30) และผลึกสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต (renal tubular epithelial cells) ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและทำลายเซลล์มากขึ้น (renal tubular injury) มีเซลล์ตายและมีการสร้างเซลล์ใหม่มาทดแทนมากขึ้น ตำแหน่งบาดเจ็บที่เกิดขึ้นนี้จะเป็แหล่งเกาะติดของผลึกนิ่วทำให้มีผลึกนิ่วคั่งค้างในไตมากขึ้น สะสมมากขึ้น ขนาดใหญ่ขึ้น จนกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด

### ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และโรคนิ่วไต

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (31) คือ ภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดสารออกซิไดซ์และกระบวนการป้องกันอันตรายจากสารออกซิไดซ์ในเซลล์โดยเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้มีสารอนุมูลอิสระและสารที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยา เช่น ROS ในปริมาณที่สูงมากเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานได้ ส่งผลให้เซลล์ เนื้อเยื่อ เยื่อหุ้มต่างๆ บาดเจ็บและถูกทำลายจากการถูกออกซิไดซ์ ซึ่งการตรวจวัดตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ทำได้ 2 ทาง คือตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหรือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระหรือเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หรือ เอนไซม์ catalase หรืออาจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยรวม (total antioxidant capacity, TAS) และตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดจากการทำลายสารชีวโมเลกุลโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น malondialdehyde (MDA) จากการทำลายไขมัน (lipid peroxidation), 8-Hydroxyguanosine (8-OHdG) จากการทำลายดีเอ็นเอ และ protein carbonyl ผลผลิตจากการทำลายโปรตีน

ภาวะการอักเสบ (32) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อ ต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย เช่น เชื้อโรค เซลล์ที่เสื่อมสภาพ การระคายเคือง หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งร่างกายจะตอบสนองโดยพยายามนำสิ่งกระตุ้นดังกล่าวออกไปและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย สัญญาณของการอักเสบ ได้แก่ ปวด บวม แดง และร้อน โดยในกระบวนการอักเสบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ และส่งสัญญาณภายในเซลล์ เพื่อกระตุ้นการทำงานของโปรตีน NF- $\kappa$ B นำไปสู่การหลั่งสารต่างๆ ออกมาบริเวณที่เกิดการอักเสบ เช่น interleukin-6 และ TNF- $\alpha$  เป็นต้น

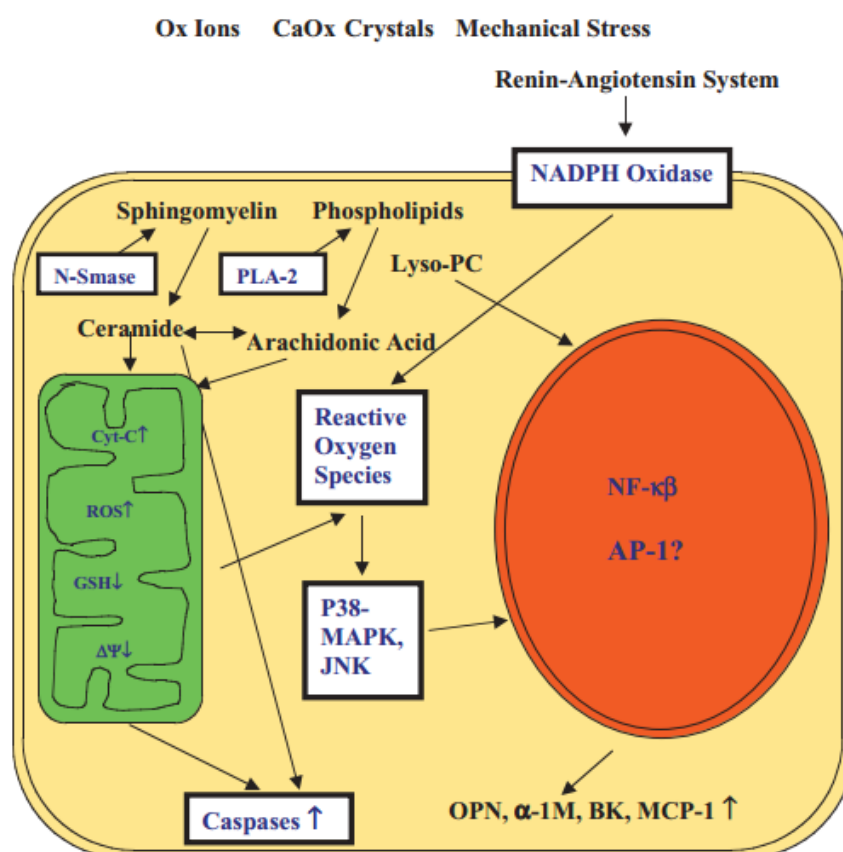
หลายการวิจัยที่ผ่านมาศึกษาเกี่ยวกับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบต่อกระบวนการเกิดนิ่ว มีทั้งการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) การศึกษาในสัตว์ทดลอง (animal model) และการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไต จากการศึกษาของ Aihara และคณะ (33) พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์บุผิวท่อไตด้วยออกซาเลตและผลึกนิ่ว (CaOx, CaP และ uric acid) เซลล์บุท่อไตจะสร้าง ROS เช่น superoxide anion ( $O_2^-$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เพิ่มขึ้น มีการหลั่ง lactate dehydrogenase (LDH) และ N-Acetyl glucosaminidase (NAG) ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นและสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์บุผิวท่อไตด้วยสารก่อนิ่วหรือผลึกทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

การศึกษาของ Thamilselvan และคณะ (15) โดยศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะการอักเสบในสัตว์ทดลองในหนูที่ได้รับสาร ethylene glycol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของออกซาเลต พบว่าหนูเกิดภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) พบภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไต และมีการติดค้างของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในไตปริมาณมากกว่าหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ ethylene glycol อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อหนูได้รับวิตามินอีร่วมกับ ethylene glycol พบว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไตลดลง และที่สำคัญปริมาณ crystal deposit ในไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (16, 17) แสดงให้เห็นว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว

การศึกษภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคนิ่วไตโดยการศึกษาของ เกรียง ตั้งสง่าและคณะ (18) พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับของ MDA ในเลือดและปัสสาวะ ระดับ NAG activity ในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ ขณะที่ระดับของ glutathione (GSH) และ glutathione peroxidase (GPx) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปริมาณต่ำ และระดับ protein thiol และ vitamin E ในเลือดต่ำลงด้วย แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและมีการทำลายของเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติ การศึกษาของ ชาญชัย บุญหล้าและคณะ (19) พบว่า ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ 8-OHdG สูงกว่าคนปกติ แสดงให้เห็นถึงการทำลาย DNA จากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และปริมาณของ 8-OHdG ที่สูงขึ้นยังสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าโรคนิ่วไตสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการบาดเจ็บของเซลล์บุผิวท่อไตที่สูงขึ้น และได้มีการศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (20) พบว่า ทั้ง MCP-1 และ IL-6 มีการแสดงออกมากขึ้นบ่งบอกถึงภาวะการอักเสบที่เซลล์บุท่อไต และเมื่อตรวจสอบพยาธิสภาพในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าเนื้อเยื่อไตข้างที่มีนิ่วอยู่มีระดับการอักเสบและการเกิดพังผืด (renal fibrosis) สูงกว่าเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ไม่มีนิ่ว (21) แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและมีการทำลายของเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติ

จากการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง รวมถึงการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไต จะเห็นได้ว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว ซึ่ง Khan (12) ได้อธิบายเกี่ยวกับกลไกการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไตที่สูงขึ้นภายหลังได้รับออกซาเลตหรือผลึกนิ่ว CaOx โดยสรุปจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง และผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าการสร้าง ROS ในเซลล์บุท่อไตอาจเกิดจาก 2 กลไก (ภาพที่ 2) คือ

- 1) การกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ให้ทำงานมากขึ้น โดยผ่านระบบ renin-angiotensin system ออกซาเลตและผลึกจะกระตุ้นการสร้าง angiotensin II ในไตสูงขึ้น จากนั้น angiotensin II จะจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ มีผลไปกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ส่งผลให้มีการสร้าง superoxide ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น
- 2) การกระตุ้นการทำงานของ phospholipase A-2 (PLA-2) ทำให้เกิดผลผลิตของไขมันสูงขึ้น ได้แก่ arachidonic acid, lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) และ ceramide ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลนำสัญญาณ (signaling molecule) มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยลด mitochondrial membrane potential ส่งผลให้มีการสร้าง ROS สูงขึ้นและหลัง cytochrome-C จากไมโทคอนเดรีย ซึ่ง ceramide และ cytochrome-C จะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนกลุ่ม caspases ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด



ภาพที่ 2: การสร้าง ROS ที่เซลล์บุผิวท่อไต (12)

สำหรับ ROS ที่สูงขึ้น จะไปกระตุ้นวิถีส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) p38-MAPK และ JNK ส่งผลกระตุ้นการทำงานของ transcription factors คือ Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) และ AP-1 ซึ่งทั้ง NF- $\kappa$ B และ AP-1 จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น stone modulators (OPN, BK,  $\alpha$ -1-microglobulin), chemokines

(MCP-1), cytokines (IL-6) และ growth factors (PDGF, TGF- $\beta$ ) เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการอักเสบขึ้นตามมา

จากการศึกษาต่างๆ ดังที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่ว ซึ่งหากผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้รับการรักษาหรือบริโภคอาหารที่สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ่วไต จะนำไปสู่การลดโอกาสหรือความเสี่ยงที่จะเกิดนิ่วซ้ำได้

### การรักษาโรคนิ่วไตและสูตรมะนาวผง

การรักษาโรคนิ่วไตมีหลายวิธี ทั้งวิธีทางศัลยกรรมและการรักษาทางยา รวมถึงการควบคุมการรับประทานอาหารและปรับปรุงพฤติกรรมกรรมการบริโภค ซึ่งการรักษาโรคนิ่วไตต้องอาศัยระยะเวลาและความต่อเนื่อง ในการติดตามรักษา ป้องกัน การเกิดนิ่วซ้ำ และสร้างเสริมให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและสมบูรณ์ในที่สุด การรักษาโรคนิ่วไตด้วยวิธีทางศัลยกรรม ปัจจุบันมีวิธีการรักษาให้เลือกหลายวิธี เช่น การใช้คลื่นเสียงกระแทกเพื่อสลายนิ่ว (Extracorporeal shockwave lithotripsy; ESWL) การผ่าตัดเปิด (Open stone surgery; OSS) การผ่าตัดผ่านกล้องส่องเข้าสู่ไต (Percutaneous nephrolithotripsy; PCNL) และการนำนิ่วออกผ่านการใช้กล้องที่ส่องเข้าสู่ไต (Ureterorenoscopic stone removal; URS) เป็นต้น ทั้งนี้การเลือกวิธีขึ้นกับขนาดและชนิดของนิ่ว (34) แม้ว่าการรักษาด้วยวิธีทางศัลยกรรมจะสามารถกำจัดก้อนนิ่วได้ แต่ผู้ป่วยก็ยังสามารถกลับมาเป็นนิ่วซ้ำได้อีก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องการรักษาทางยาควบคู่กันไปกับการรักษาทางศัลยกรรม ยาที่ใช้รักษาโรคนิ่วไตซึ่งอยู่ในรูปสารสังเคราะห์ (35) ได้แก่ เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟต และเกลือโพแทสเซียมซิเตรต ออโธฟอสเฟต (orthophosphate) ไตรโพนิน (triponin) และ กรดอะซิโตไฮโดรซามิก (acetohydroxamic acid) และในรูปสารในธรรมชาติ เช่น น้ำส้ม น้ำผลไม้แครนเบอร์รี่ และสูตรมะนาวผง เป็นต้น

การบริโภคผลไม้และสารต้านอนุมูลอิสระนอกจากมีบทบาทต่อการรักษาโรคต่างๆ ทั้งโรคเมเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคนิ่วไต เนื่องจากในผลไม้ นั้นมีทั้งสารต้านอนุมูลอิสระทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ได้แก่ เบตาแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ กรดไฟติก เป็นต้น ช่วยในการปกป้องการทำลายของเซลล์บุท่อไตจากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ผลไม้ยังมีปริมาณสารยับยั้งการก่อนิ่วซิเตรตสูงมาก และยังมีโพแทสเซียม แมกนีเซียมอีกด้วย ดังนั้นการรักษาด้วยอาหาร หรือ dietary therapy จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตและป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำร่วมด้วย

สารยับยั้งการก่อนิ่ว เช่น ซิเตรต ซึ่งมีประจุลบสามารถจับกับแคลเซียมที่เป็นประจุบวก ส่งผลให้ยับยั้งการก่อตัวของผลึกและลดปริมาณของแคลเซียมในปัสสาวะได้ (36) ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้สารยับยั้งการก่อนิ่วซิเตรตที่มีในอาหาร ที่เชื่อว่าจะสามารถลดการก่อตัวของผลึกและเพิ่มปริมาณซิเตรตในปัสสาวะมาใช้ในรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไต การศึกษาของ Kurtz และคณะ (37) ได้รวบรวมการรายงานศึกษาการรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะซิเตรตต่ำในปัสสาวะด้วยอาหารที่มีซิเตรตสูง เช่น น้ำมะนาว (lemonade, limeade) น้ำส้ม (orange juice) และแครนเบอร์รี่ (cranberry juice) พบว่า



การรักษาผู้ป่วยด้วย lemonade สามารถเพิ่มระดับซิเทรตในปัสสาวะได้ (38-40) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณปัสสาวะที่ขับออกได้ (urine volume) ทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นของสารต่างๆ ลดลง ลดโอกาสการก่อตัวของผลึกได้ แต่ยังคงขาดการศึกษาผลข้างเคียงในการรักษาด้วย lemonade ควบคู่ไปกับการรักษาทางยา การรักษาด้วย orange juice พบว่าสามารถเพิ่มระดับซิเทรตในปัสสาวะได้เช่นกัน (41, 42) แต่ปริมาณซิเทรตที่พบใน orange juice น้อยกว่าใน lemonade และนอกจากนี้ต้องระมัดระวังในการรับประทาน orange juice ในปริมาณที่สูง เนื่องจากพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ การรักษาด้วย cranberry juice ในผู้ป่วยโรคนี้ไต พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมและออกซาเลต แต่ไม่มีผลต่อการขับซิเทรตออกมากับปัสสาวะ (43) ขณะที่มีการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า cranberry juice สามารถเพิ่มปริมาณซิเทรตในปัสสาวะได้ (44) ซึ่งการรักษาด้วย cranberry juice ยังไม่เป็นที่นิยมมากเนื่องจากมีข้อเสียหลายอย่าง เช่น เพิ่มปริมาณสารก่อเนื้องอกทั้งแคลเซียมและออกซาเลต รวมถึงยังพบว่าส่วนประกอบของ cranberry juice มีคาร์โบไฮเดรตสูง ซึ่งอาจไม่เป็นที่ต้องการของผู้ป่วยที่ต้องควบคุมอาหารควบคู่ไปกับการรักษา สรุปผลการศึกษาที่ผ่านมา lemonade และ limeade น่าจะมีคุณสมบัติที่ดีที่สุดในการรักษาโรคนี้ไต

ผลงานวิจัยที่ผ่านมาของศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และคณะ (22) ทำการศึกษาผู้ป่วยโรคนี้ไตในการรักษาด้วยสูตรมะนาวผง LPR พบว่า ผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ผ่านการรักษาทางศัลยกรรมเมื่อรับประทานมะนาวผง เป็นระยะเวลา 3 เดือน ในอัตราส่วน โพแทสเซียม 21 มิลลิกรัม วาเลนท์ ต่อซิเทรต 63 มิลลิกรัมวาเลนท์ สามารถเพิ่มปริมาณซิเทรตหรือสารต้านการก่อเนื้องอกในปัสสาวะและเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงการเกิดเนื้องอก รวมถึงลดความเครียดจากออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถปกป้องการทำลายเซลล์บุท่อไตได้ เมื่อเปรียบเทียบการรับประทานยาโพแทสเซียมซิเทรตกับสูตรมะนาวผงพบว่า การรับประทานสูตรมะนาวผงสามารถใช้แทนโพแทสเซียมซิเทรตในการเพิ่มซิเทรตได้จริง และยังพบว่าการเสริมด้วยสูตรมะนาวผงทำให้ประสิทธิภาพของปัสสาวะในการต้านทานออกซาเลตในหลอดทดลองเพิ่มขึ้น และระดับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น จะเห็นว่าการศึกษาที่ผ่านมายังขาดข้อมูลระดับเซลล์และระดับโมเลกุลที่สนับสนุนและยืนยันว่า ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตภายหลังได้รับการรักษาด้วย LPR แล้ว มีความสามารถในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไตลดลงจริง เมื่อเทียบกับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนได้รับการรักษาด้วย LPR ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตภายหลังได้รับการรักษาด้วย LPR แล้ว น่าจะลดการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไตได้เมื่อเทียบกับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนได้รับการรักษาด้วย LPR และลดได้มากกว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย placebo ในการศึกษาครั้งนี้จะพิสูจน์สมมุติฐานนี้โดยการทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cells ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด proximal tubular cell line แยกได้จากไตของคนปกติ โดยถูกนำมา immortalized โดยการ transfect กับ human papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 protein ซึ่งมีการศึกษาพบว่าโปรตีนนี้สามารถรักษาคุณสมบัติและลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นี้ได้ทำให้เซลล์ไม่ตายหรือมีชีวิตรอยู่ได้นาน (45) โดยผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดเนื้องอกมากขึ้น โดยเฉพาะ

การกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุท่อไตโดยปัสสาวะ และทราบถึง  
แนวทางที่จะลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การลด  
โอกาสหรือความเสี่ยงที่จะเกิดน้ำขุ่นได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### ประชากรตัวอย่างและสารตัวอย่าง

การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไต แต่ไม่ได้ทำการรวบรวมกลุ่มตัวอย่างเอง เนื่องจากไม่ได้ทำการศึกษาโดยตรงกับกลุ่มตัวอย่างกลุ่มนี้ เป็นเพียงการคัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง และดูผลการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยง ในด้านภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ โดยกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตเป็นผู้ร่วมโครงการวิจัย “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” ซึ่งทำการรวบรวมที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยจะทำการขออนุญาตใช้ปัสสาวะจากเจ้าของสารตัวอย่างก่อนการทำวิจัย

การศึกษานี้จะคัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดหรือสลายนิ่วและไม่มีนิ่วหลงเหลือในไต (post-operative stone-free nephrolithiasis patients) ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย placebo จำนวน 5 ราย (placebo-treated nephrolithiasis patients) และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย LPR จำนวน 5 ราย (LPR-treated nephrolithiasis patients) โดยเกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria) และเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ในโครงการวิจัยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต เป็นดังนี้

#### เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

- ผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งเพศชายและหญิง อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
- มีก้อนนิ่วในไตหรือกรวยไตหรือท่อไต
- เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมหรือกรดยูริก
- มีภาพถ่ายทางรังสียืนยันการพบก้อนนิ่ว
- ติดตามผลหลังการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้ว 1 เดือน ผู้ป่วยไม่มีนิ่วเหลือหรือมีนิ่วเหลือขนาดเล็กมากกว่า 4 มิลลิเมตร
- ผลการตรวจปัสสาวะเป็นปกติ
- เข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

#### เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

- ผู้ป่วยเป็นนิ่วชนิด magnesium ammonium phosphate หรือ struvite
- ผู้ป่วยโรคมะเร็งทุกชนิด

- ติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะเรื้อรังและเกิดซ้ำๆ
- ผู้ป่วยโรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune disease) อาจมีผลต่อการทำงานของไต เช่น systemic lupus erythematosus
- ผู้ป่วยปลูกถ่ายไต
- นิ้วที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผลมาจากโรคทางพันธุกรรม อาทิเช่น hereditary hypercalciuria เป็นต้น
- ไตผิดปกติ เช่น medullary sponge kidney หรือ ภาวะวิภาคของไตผิดปกติอื่นๆ เช่น horseshoe kidney
- โรคระบบทางเดินอาหารที่มีผลต่อการดูดซึมออกซาเลต เช่น การอักเสบของลำไส้
- ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงจากความผิดปกติของฮอร์โมนหรือโรคกระดูก เช่น hyperparathyroidism, sarcoidosis และ Paget's disease
- มีภาวะ Renal tubular acidosis
- ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น โรคเอดส์
- ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ได้รับยา indinavir โดยตรวจสอบเฉพาะจากประวัติการรักษาของผู้ป่วยและไม่มีการตรวจเพิ่มเติม

ในโครงการวิจัยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ของ lime powder regimen ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ผู้ป่วยที่คัดเลือกเข้าศึกษาจะถูกสุ่มให้ได้รับการรักษาด้วย LPR หรือ Placebo (Lactose) การให้การรักษาเป็นแบบ double-blinded ยาที่ให้ทั้ง 2 ชนิด เป็นผงปริมาณ 5 กรัม บรรจุในซองกันแสง ผู้ป่วยจะได้คำแนะนำให้ละลายผงยาในน้ำดื่มสะอาดปริมาตร 250 ml หรือ 1 แก้ว แล้วดื่มให้หมดภายใน 5 นาที ดื่มทุกวัน วันละ 1 ซอง หลังอาหารเย็น หรือ ก่อนนอน ใน 1 ซองของ LPR มีปริมาณซิเทรตและโพแทสเซียม อยู่ในช่วง 57-63 และ 19-23 มิลลิอิกิวาเลนท์ ตามลำดับ ส่วน Placebo เป็นน้ำตาลแล็กโตสมีรสหวานเล็กน้อยและไม่มีการแต่งกลิ่นและรสเพิ่มเติม โดยได้รับการรักษาทั้งสองกลุ่มเป็นเวลา 6 เดือน

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวนตัวอย่างจึงกำหนดจากจำนวนตัวอย่างที่นิยมใช้ในงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว ที่มีรูปแบบการทดลองคล้ายคลึงกับการศึกษานี้ โดยในการศึกษานี้กำหนดสารตัวอย่างกลุ่มละ 5 ตัวอย่าง โดยจะพิจารณาและคัดเลือกปัสสาวะจากข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคนิ่วไตของทั้งสองกลุ่มให้มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด ทั้งจำนวน อายุ เพศ และค่า pH ของปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยใช้ thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เก็บปัสสาวะที่ -80 °C สำหรับรอการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cells เพื่อตรวจวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและตรวจวัดภาวะการอักเสบของเซลล์บุผิวท่อไต

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1: เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
Autoclave	Hirayama, Saitama, Japan
Autopipette 10, 100, 200, 1000 $\mu$ L และ tips	Biorad, California, USA
Cell culture flasks 25 $\text{cm}^2$	Corning , New York, USA
Cell culture flasks 75 $\text{cm}^2$	Corning, New York, USA
Cell culture plates: 6-,24-,96-well	Corning, New York, USA
Chemiluminescence detection system	Bio-rad, California, USA
Class II biohazard safety cabinet	Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA
CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Cryotube	SPL lifescience, Gyeonggi-do, South Korea
Cuvettes (Plastic and Quartz)	Perkin Elmer, USA
Distilled water maker	Labconco, Missouri, USA
Freezer (-20 <sup>o</sup> C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Freezer (-80 <sup>o</sup> C)	Sanyo Electric, Osaka, Japan
Horizontal electrophoresis system	Bio-rad, California, USA
Membranes filter nylon 47 mm. 0.22 $\mu$ m.	Ageia Technologies, USA
Microcentrifuge	Axygen, California, USA
Microplate reader	Tecan, Mannedorf, Switzerland
pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
Refrigerated high speed centrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
Sonicator	Sonics, Newtown, USA
Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
Sterile pipette 10 ml	Corning, New York, USA
Syringe filter nylon 13mm. 0.22 $\mu$ m.	Ageia Technologies, USA
Vortex mixer	VORTEX-2 GENIE, USA
Water bath	GFL, Burgwedel, Germany

ตารางที่ 2: สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)	Calbiochem, Darmstadt, Germany
2, 2- azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)	Calbiochem, Darmstadt, Germany
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
40% acrylamide/Bis solution 19:1	Bio-rad, California, USA
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Coomassie brilliant blue dye	Bio-rad, California, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Carlo Erba, Val De Reuil, France
Dinitrophenylhydrazine (DNPH)	Riedel-de Haen, Hannover, Germany
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Scientific, Ohio, USA
Ethanol	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Ethyl acetate	BDH, Dorset, England
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fetal bovine serum	Gibco, California, USA
Glycerol	Carlo Erba, Val De Reuil, France
Hydrochloric acid	MERK, Darmstadt, Germany
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Vidhyasom, Bangkok, Thailand
Isopropanol	Merk Millipore, Massachusetts, USA
N-acetyl glucosaminidase substrate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NF-κB p65 antibody	Santa Cruz, Texas, USA
p-NF-κB p65 antibody (Ser 276)	Santa Cruz, Texas, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco, California, USA
Phosphate buffer saline (PBS)	Sigma--Aldrich, Missouri, USA
Resorcinol	Sigma--Aldrich, Missouri, USA
Sodium chloride (NaCl)	MERK, Darmstadt, Germany
Sodium dodecyl sulfatate (SDS)	Carlo Erba, Val De Reuil, France
Sodium hydroxide	Merk Millipore, Massachusetts, USA
Tert-butyl alcohol	Carlo Erba, Val De Reuil, France

สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma--Aldrich, Missouri, USA
Thymol	Merk Millipore, Massachusetts, USA
TNF- $\alpha$	Gibco, California, USA
Trichloroacetic acid	BDH, Dorset, England
Tris base	Merk Millipore, Massachusetts, USA
Triton X-100	Sigma--Aldrich, Missouri, USA
Trypsin with EDTA	Gibco, California, USA

## การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

### 1. เซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cells

HK-2 cells เป็นเซลล์ชนิด proximal tubular cell line แยกได้จากไตของคนปกติ โดยถูกนำมา immortalized โดยการ transfect กับ human papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 protein ซึ่งมีการศึกษาพบว่าโปรตีนนี้สามารถรักษาคุณสมบัติและลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นี้ได้ ทำให้เซลล์ไม่ตายหรือมีชีวิตอยู่ได้นาน โดยโปรตีนสองตัวนี้สามารถจับได้กับ p53 และ Rb proteins ที่ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน (45) และเซลล์ยังสามารถใช้กลูโคสได้ โดยผ่านทาง  $\text{Na}^+$ -dependent glucose transport นอกจากนี้เซลล์ยังตอบสนองต่อ parathyroid hormone แต่ไม่ตอบสนองต่อ antidiuretic hormone ซึ่ง HK-2 cells สามารถนำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ และ subculture ต่อไปเรื่อยๆได้ ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และ supplement คือ 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% Penicillin Streptomycin (Pen-Strep) (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) และนำไปทำการทดลองต่าง ๆ ต่อไปหรืออาจ subculture ต่อได้ โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) และทำการ trypsinization โดยเติมเอนไซม์ trypsin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  5-10 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ 90% DMEM, 10% FBS และ 1% Pen-Strep นำไปปั่นที่ 1,000 rpm 5 นาที นำตะกอนที่ได้ไป re-suspend ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง นับเซลล์ด้วย hemacytometer และ seed เซลล์ลงภาชนะเลี้ยงเซลล์อันใหม่ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ  $2 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ สองวันหรือเมื่อสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยน ขั้นตอนการเก็บเซลล์คือ หลังจากการ trypsinization แล้ว re-suspend ด้วย 90% FBS และเติม 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นเก็บที่ -80 °C 1 วัน และย้ายไปเก็บที่ไนโตรเจนเหลว สำหรับข้อมูลและวิธีการในการเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3: ตารางแสดงวิธีการในการเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ

ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์	ปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อหลุม (mL)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น (cells/mm <sup>3</sup> )	เวลาในการเลี้ยงเซลล์จนเจริญเต็มหลุม (วัน)	สำหรับการวิเคราะห์
6 well plate	2	$5 \times 10^5$	2	Protein carbonyl, TAS, catalase activity, sialic acid, NF- $\kappa$ B และ lectin cytochemistry
96 well plate	0.2	$3 \times 10^4$	1	Cell viability และ ROS

## 2. การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability)

วิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) โดยใช้วิธี MTT assay (46) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในการรีดักชันสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งในเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase และ cofactor ที่จะรีดิวซ์ MTT (สีเหลือง) ให้กลายเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วง โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อ คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แต่ละหลุมเริ่มต้นที่ 30,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นทำการวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยแบ่งเป็น 2 การทดสอบ

- 1) เซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เตรียม 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และทำการเจือจางปัสสาวะให้มีความเข้มข้น 20% (v/v) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตรรวม 200  $\mu$ L ต่อหลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในการแปลผลสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B

- 2) เซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียม 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และทำการเจือจางปัสสาวะให้มีความเข้มข้น 20% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตรรวม 200  $\mu$ L ต่อหลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในการแปลผลสำหรับการวิเคราะห์ protein carbonyl, TAS, catalase activity, sialic acid และ lectin cytochemistry



หลังจากเซลล์ได้รับสารต่างๆ แล้ว เติมสารละลาย MTT (ภาคผนวก ก) 100  $\mu$ L แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO 100  $\mu$ L และเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

การคำนวณหา % cell viability คำนวณดังนี้

$$\% \text{Cell viability} = \frac{(\text{OD}_{\text{test}} \times 100)}{\text{OD}_{\text{control}}}$$

OD<sub>test</sub> = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง  
OD<sub>control</sub> = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

### 3. การสกัดโปรตีน

#### 3.1 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี (chemical method)

การสกัดโปรตีนรวมจากเซลล์ (whole cell proteins) โดยใช้ Radio-Immunoprecipitation (RIPA) buffer (47) ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate และ 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (ภาคผนวก ก) โดยวิธีการสกัดคือ ใส่ RIPA buffer 300  $\mu$ L ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์หลังจากทำการ treat เซลล์แล้ว เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4  $^{\circ}$ C ขูดเซลล์โดยใช้ scraper จากนั้นเปิดใส่ microcentrifuged tube และปั่นเหวี่ยง 10,000  $\times$  g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4  $^{\circ}$ C จะได้ส่วน supernatant สำหรับตรวจวัดระดับ total protein, protein carbonyl, TAS และ sialic acid ต่อไป หรือถ้ายังไม่ทดสอบในทันที ให้เก็บ supernatant ไว้ที่ -80  $^{\circ}$ C

การสกัดแยกเป็นโปรตีนส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytosolic proteins) และโปรตีนส่วนที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear proteins) สกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ต่างกันคือ buffer A และ buffer C (ภาคผนวก ก) (48) การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B สกัดโปรตีนส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมโดยใช้ buffer A 400  $\mu$ L ประกอบด้วย 10 mM N-(2-Hydroxy ethyl)-Piperazine ethane Sulfonic acid (HEPES), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM Dithiothreitol (DTT) และ 0.2 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) โดย incubate 15 นาที ที่ 4  $^{\circ}$ C แล้วเติม Triton X-100 20  $\mu$ L ปั่นเหวี่ยง 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4  $^{\circ}$ C จะได้ส่วน supernatant ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม จากนั้นนำตะกอนที่เหลือมาสกัดโปรตีนส่วนที่อยู่ในนิวเคลียส โดยใช้ buffer C 50  $\mu$ L ประกอบด้วย 20 mM HEPES, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 mM DTT และ PMSF โดย incubate ที่ 4  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 14,000  $\times$  g ที่ 4  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วน supernatant ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส

#### 3.2 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีทางกายภาพ (physical method)

การสกัดโปรตีนด้วยการใช้คลื่นความถี่สูงหรือ sonication ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ catalase โดยหลังจากเซลล์ได้รับสารต่างๆ แล้ว ขูดเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์และปี

เปตลงใน microtube จากนั้นทำการ sonicate (Sonics, Newtown, USA) โดยใช้ 20% amplitude จุ่มปลาย probe ลงใน microcentrifuge tube 15 วินาที นำ probe ออก ทิ้งไว้ 15 วินาที และจุ่มปลาย probe ลงใน microcentrifuge tube อีกครั้ง ทำซ้ำ 3 รอบ การสกัดโปรตีน ด้วยวิธีนี้จะเกิดความร้อนจาก sonication เพราะฉะนั้นระหว่างการทดสอบต้องแช่ microcentrifuge tube ไว้ในกล่องน้ำแข็งตลอดเวลา

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณ Proteins ในเซลล์

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเซลล์หลังจากสกัดโปรตีนแล้วโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue (CBB) หรือ Bradford assay (49) โดยใช้ supernatant 12.5  $\mu$ L ทำปฏิกิริยากับ CBB 625  $\mu$ L จะเกิดสารประกอบสีน้ำเงิน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับโปรตีน (Bovine Serum Albumin, BSA) มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

#### 5. การตรวจวัดตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress markers)

##### 5.1 การวิเคราะห์ Protein carbonyl ในเซลล์

วิเคราะห์การเกิด protein oxidation ในเซลล์ โดยวัดระดับ protein carbonyl ด้วยวิธี spectrophotometric 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay (50) นำตัวอย่างสารสกัดจากเซลล์ 62.5  $\mu$ L มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10 mM DNPH 250  $\mu$ L (ภาคผนวก ก) incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ในที่มืด สำหรับ blank control ใช้ตัวอย่างสารสกัดจากเซลล์ 62.5  $\mu$ L ผสมกับ 2 N HCl 250  $\mu$ L แทนการเติมสารละลาย DNPH จากนั้นตกตะกอนด้วย cold 20% TCA 300  $\mu$ L เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C แล้วปั่นเหวี่ยง 10,000  $\times$  g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °C ปิเปต supernatant ทิ้งไป ล้างตะกอนด้วย ethanol : ethyl acetate (1:1, v/v) 625  $\mu$ L แล้วละลายตะกอนด้วย 6 M guanidinium chloride (GdmCl) 300  $\mu$ L จากนั้น incubate เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 °C และ sonicate (Sonics, Newtown, USA) ในน้ำ โดยใช้ 20% pulse เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร ระดับ protein carbonyl ในเซลล์ (nmol/mg of protein) คำนวณได้จากสมการ protein carbonyl content (nmol/mg of protein) =  $OD_{375\text{ nm}} \times 45.45 / \text{mg of protein}$

##### 5.2 การวิเคราะห์การสร้าง ROS ในเซลล์

วิเคราะห์การสร้าง ROS ในเซลล์โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (51) โดย ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ DCFH-DA แล้วถูกเปลี่ยนเป็น dichloro-dihydrofluorescein (DCF) ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยปริมาณการเรืองแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ ROS ในเซลล์ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยสังเขป คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แต่ละหลุมเริ่มต้นที่ 30,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นเติมสารละลาย 0.5 mM DCFH-DA (ภาคผนวก ก) ที่ละลายด้วย DMEM serum-free หลุมละ 100  $\mu$ L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 30 นาที ใส่ตัวอย่างปัสสาวะที่ทำการเจือจางความเข้มข้นของปัสสาวะเป็น 20% ใน DMEM serum-free (หลุมละ 100  $\mu$ L) จากนั้นนำไปวัด

fluorescent intensity ที่เวลา 0 นาที และ 60 นาที โดยกำหนด excitation ที่ 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 535 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) ดังนี้

$$\text{DCF fluorescence (AFU)} = \frac{\text{Fluorescence intensity ที่เวลา 60 นาที (T}_{60}\text{)}}{\text{Fluorescence intensity ที่เวลาเริ่มต้น (T}_0\text{)}}$$

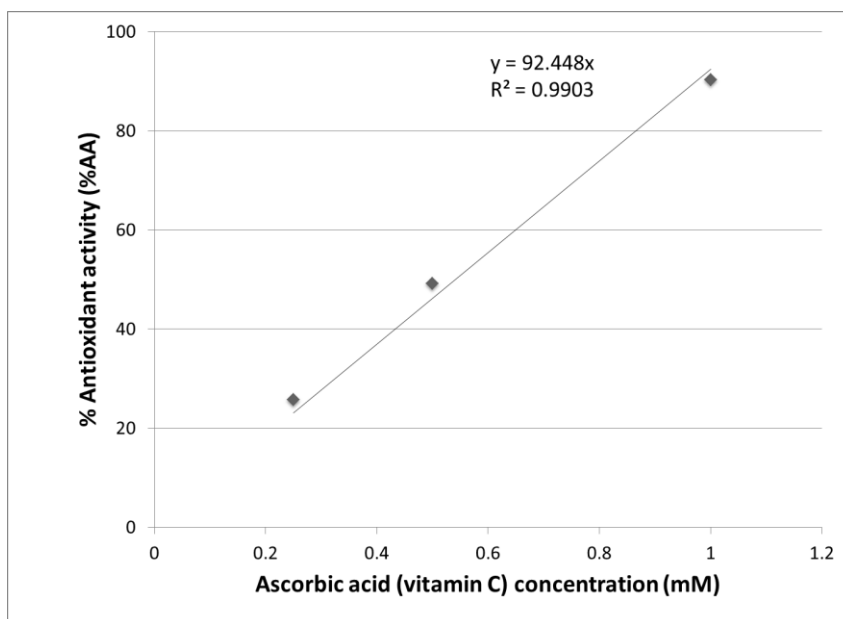
### 5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant capacity) ในเซลล์

วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี ABTS radical scavenging capacity assay (52) เป็นวิธีวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมโดยใช้สาร 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ซึ่งทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการออกซิไดซ์ด้วย 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ให้กลายเป็น  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีสีฟ้า-เขียว เมื่อเติมสารทดสอบที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้ปริมาณ  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง วิธีทดสอบคือ ตัวอย่างสารสกัดจากเซลล์ 10  $\mu\text{L}$  (ใช้น้ำกลั่นสำหรับหลอด blank) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (ภาคผนวก ก) 490  $\mu\text{L}$  incubate 10 นาที 37  $^{\circ}\text{C}$  วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ผลการวิเคราะห์คำนวณเป็นค่าที่เทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity, VCEAC) จากกราฟมาตรฐาน %AA และความเข้มข้นมาตรฐานของวิตามินซี (ภาพที่ 3) คำนวณได้จาก

$$\% \text{ antioxidant activity (\%AA)} = \left[ \frac{\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

$$\text{VCEAC (mM)} = \% \text{AA} / \text{slope ของกราฟมาตรฐาน \%AA และความเข้มข้นมาตรฐานของวิตามินซี}$$

$$\text{VCEAC (nmol/mg of protein)} = \frac{\text{VCEAC (mM)} \times 1,000}{\text{mg of protein}}$$



ภาพที่ 3: กราฟมาตรฐาน %AA และความเข้มข้นมาตรฐานของวิตามินซี

#### 5.4 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ catalase ในเซลล์ (Catalase activity)

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ catalase ในเซลล์ โดยอาศัยความสามารถของ catalase ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านภาวะออกซิไดซ์ ในการสลาย  $H_2O_2$  ให้กลายเป็นน้ำ (53) วิธีการทดสอบคือ สารตัวอย่างสกัดโปรตีน 10  $\mu$ L ผสมกับ 20 mM  $H_2O_2$  (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0 นาที และ 2 นาที ที่ 240 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงสัมพันธ์กับ catalase activity ที่เพิ่มขึ้น คำนวณได้จาก specificity activity (Units/mg of protein/min) =  $\Delta A_{240nm}(2 \text{ min}) \times 1,000/0.872 \times \text{mg of protein}$

#### 6. การวิเคราะห์การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B

ตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ใน HK-2 cells ด้วยวิธี Western blot (54) โดยสกัดโปรตีนจากเซลล์ แยกเป็นโปรตีนส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytosolic proteins) และโปรตีนส่วนที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear proteins) จากนั้นแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยอาศัยหลักการสารตัวอย่างโปรตีนอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นต่างและประกอบด้วย SDS ซึ่งเป็น anionic detergent ที่สามารถ denature โปรตีนให้มีโครงสร้างเป็นแท่งและมีประจุลบ และมี  $\beta$ -mercaptoethanol เป็น reducing agent เพื่อทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน โปรตีนจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก โดยอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล วิธีทดสอบคือ ผสมสารละลาย 10% polyacrylamide (ภาคผนวก ก) แล้วเทใส่พิมพ์สำหรับทำเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำเจลไปประกอบกับขั้วไฟฟ้าในชุด vertical electrophoresis system โดยใช้ Tank buffer (ภาคผนวก ก) ใส่สารสกัดโปรตีนที่จะทำการแยก โดยผสมสารสกัดโปรตีน 20  $\mu$ L กับ loading dye 4  $\mu$ L บีบลงในช่องของเจล จากนั้นให้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 60 volts เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้เพิ่มความต่างศักย์เป็น 120 volts เป็น

เวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE มาทำการย้ายโปรตีนที่แยกตามน้ำหนักโมเลกุลแล้ว ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยประกบแผ่นเจลที่ได้กับชุด blotting modules ใน Towbin buffer ซึ่งประกอบด้วย 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS 20%(v/v) methanol และน้ำกลั่น และผ่านกระแสไฟฟ้าเพื่อให้เกิดการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน โดยให้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 40 volts เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน 5% non-fat dried milk ใน Tris buffer saline-Tween (TBS-T) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (non-specific binding blocking) จากนั้นล้างเมมเบรน 3 ครั้งๆละ 5 นาที ด้วย TBS-T และนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NF- $\kappa$ B/p65 (total NF- $\kappa$ B) (rabbit polyclonal IgG, product code: SC-109, Santa Cruz Biotechnology) หรือ phosphorylated NF- $\kappa$ B (active form) (p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>), rabbit polyclonal IgG, product code: SC-101749, Santa Cruz Biotechnology) dilution 1:250 ใน 5% non-fat dried milk ใน TBS-T จากนั้น incubate ไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างด้วย 3 ครั้งๆละ 5 นาที ด้วย TBS-T และย้อมด้วย secondary antibody คือ anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (product code: #70745) dilution 1:1000 ใน 5% non-fat dried milk ใน TBS-T เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง 2 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วย้อมด้วย chemiluminescence detector kit (Bio-Rad) โดยนำ HRP substrate Luminal reagent ผสมกับ HRP substrate peroxide solution ในอัตราส่วน 1:1 ตรวจวัดการเรืองแสง chemiluminescence และความเข้มของ band วัดโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจลและเมมเบรนด้วยเทคนิค chemiluminescence detection (ChemiDoc, Bio-rad, USA) และโปรแกรม the Quantity One software

ในการย้อมแอนติบอดี จะทำการย้อมแอนติบอดี p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (active form) ก่อน หลังจากนั้นทำ membrane stripping คือการทำให้แอนติบอดีตัวแรกหลุดออกจากแผ่นเมมเบรนโดยใช้ stripping buffer (ภาคผนวก ก) แล้วทำการย้อมแอนติบอดีตัวที่สองคือ NF- $\kappa$ B/p65 (total NF- $\kappa$ B) วิธีการคือ หลังจากย้อมแอนติบอดีตัวแรกแล้ว ล้างเมมเบรน 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ด้วย TBS-T จากนั้นใส่ stripping buffer ให้ท่วมแผ่นเมมเบรน นำไป incubate 30 นาที ใน water bath 70°C แล้วล้างเมมเบรน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน 5% non-fat dried milk ใน TBS-T ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (non-specific binding blocking) แล้วย้อมแอนติบอดีตามขั้นตอนที่กล่าวไปข้างต้น สำหรับแผ่นเมมเบรนที่ได้จากโปรตีนในไซโตพลาสซึมนั้น จะทำการ normalization ด้วยการย้อม GAPDH (dilution 1:5,000) ซึ่งจะทำให้การ stripping อีกครั้งด้วย stripping buffer และย้อม GAPDH ซึ่งมีขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับการย้อม NF- $\kappa$ B

## 7. การวิเคราะห์ปริมาณ sialic acid ในเซลล์

วิเคราะห์ระดับ sialic acid ในเซลล์ด้วยวิธี periodate/resorcinol method (55, 56) โดยนำสารตัวอย่างสกัดโปรตีน 125  $\mu$ L ไปออกซิไดซ์ด้วย 0.4 M periodic acid 2.5  $\mu$ L โดย incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C แล้ว เติมสารละลาย resorcinol (ภาคผนวก ก) 250  $\mu$ L นำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ตู้เย็นหรือล่อน้ำแข็งเป็นเวลา 3

นาที่ ละลายตะกอนด้วย *tert*-butyl alcohol 250  $\mu$ L และปั่นเหวี่ยง 8,000  $\times$  g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C จากนั้นนำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร เทียบกับสาร *N*-acetyl neuraminic acid มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

## 8. การย้อม lectin cytochemistry

ย้อม lectin cytochemistry ในเซลล์ด้วย biotinylated lectin และ biotin-avidin system (57, 58) หลังจากเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plate และ treat เซลล์แล้ว ทำการ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ใน PBS ปริมาตร 1 mL เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้น permeabilize เซลล์ด้วย 0.1% Triton-X100 ใน PBS ปริมาตร 1 mL เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้น block non-specific binding ด้วย 0.5% periodate treated bovine serum albumin (BSA) ใน PBS 1 mL เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างเซลล์อีกครั้ง จากนั้น incubate ด้วย biotinylated WGA lectin ใน PBS (dilution 1:500) 1 mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง incubate ด้วย HRP-conjugated streptavidin ใน PBS (dilution 1:100) 1 mL เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง และทำให้เกิดสีโดยย้อมเซลล์ด้วย 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)-substrate solution 1 mL (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มีด ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และย้อมด้วยสี hematoxylin 1 mL เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งจน background ใส ขั้นตอนสุดท้ายทำการ dehydrate เซลล์ที่ถูกย้อมด้วย 70% ethanol 1 mL เซลล์ที่มี sialic acid หรือมี sugar epitope ที่จำเพาะกับ WGA lectin จะย้อมติดสีน้ำตาล ตรวจสอบการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) หรือค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement, SEM) โดยนำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังนี้

- The paired t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสองกลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน โดยเปรียบเทียบระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์ระหว่างก่อนและหลังได้รับ LPR หรือ placebo
- The unpaired t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยเปรียบเทียบระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์ระหว่างเซลล์ที่ได้รับ  $H_2O_2$  หรือ TNF- $\alpha$  หรือ untreated control กับเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะ

โปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, California, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ P value < 0.05

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา

การศึกษานี้คัดเลือกปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากผู้ป่วยจำนวน 10 ราย หลังจากการผ่าตัดเอาเนื้องอกหรือสลายเนื้องอก ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย LPR จำนวน 5 ราย (เพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 3 ราย) และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย placebo จำนวน 5 ราย (เพศชาย 3 ราย และเพศหญิง 2 ราย) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคนิวไตกลุ่ม LPR เท่ากับ  $42.6 \pm 2.25$  ปี กลุ่ม placebo เท่ากับ  $42.4 \pm 5.22$  ปี ค่า pH ของผู้ป่วยโรคนิวไตกลุ่ม LPR ก่อนและหลังได้รับ LPR เท่ากับ  $6.87 \pm 0.28$  และ  $6.94 \pm 0.53$  ตามลำดับ ( $P = 0.822$ ) และค่า pH ของกลุ่ม placebo ก่อนและหลังได้รับ placebo เท่ากับ  $6.65 \pm 0.65$  และ  $6.57 \pm 0.37$  ตามลำดับ ( $P = 0.682$ ) ซึ่งการศึกษานี้พิจารณาและคัดเลือกปัสสาวะจากข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคนิวไตของทั้งสองกลุ่มให้มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด ทั้งจำนวน อายุ เพศ และค่า pH ของปัสสาวะ แสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4: ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคนิวไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo

ข้อมูลพื้นฐาน	LPR	Placebo	P-value
n	5	5	
Males : Females	2:3	3:2	
Age	$42.6 \pm 2.25$	$42.4 \pm 5.22$	0.973
Pre-treatment urine pH	$6.87 \pm 0.12$	$6.65 \pm 0.29$	0.507
Post-treatment urine pH	$6.94 \pm 0.24$	$6.57 \pm 0.17$	0.241

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการมีชีวิต

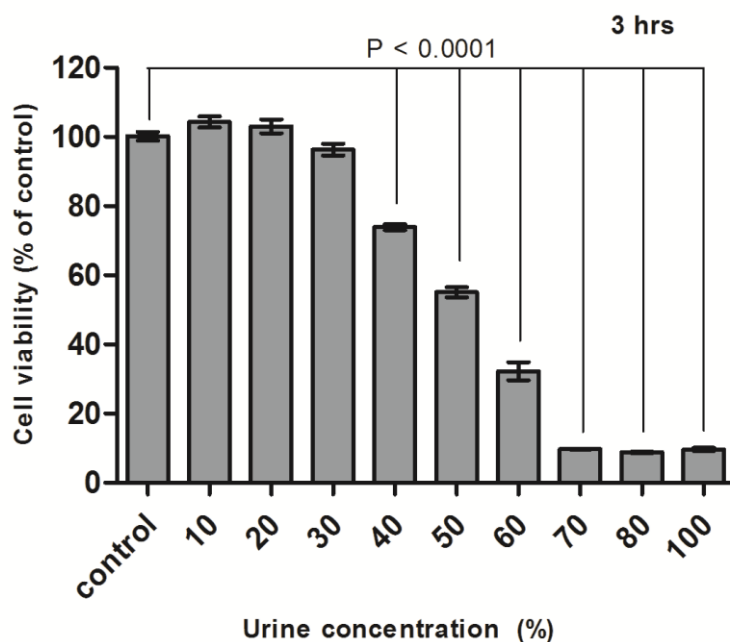
(Cell viability) ของเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) ที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไต 10 – 100% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ในสภาวะที่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไตความเข้มข้น 10 – 30% จำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไต (serum-free DMEM) (ภาพที่ 4) ขณะที่เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของปัสสาวะ 40 – 100% พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (% viability น้อยกว่า 75%,  $P < 0.0001$ ) คำนวณค่า half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิวไตได้เท่ากับ 43.26% แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 5 จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไตที่

ความเข้มข้น 30% หรือน้อยกว่า ปลอดภัยหรือไม่เป็นพิษต่อเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) นั่นคือไม่ส่งผลให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองต่อไปเกี่ยวกับการกระตุ้นการอักเสบ เลือกใช้ความเข้มข้นของปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ 20% เพื่อไม่ให้มีปัจจัยด้านการตายของเซลล์มากระทบต่อผลการทดลอง

ตารางที่ 5: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Urine conc. (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	100
Cell viability (%)										
Mean	100.0	104.3	103.1	96.4	73.9	55.1	32.2	9.7	8.8	9.7
SD	-	4.81	5.92	5.14	2.48	4.39	7.82	0.36	0.88	1.29
SEM	-	1.61	1.97	1.71	0.83	1.46	2.61	0.12	0.29	0.43



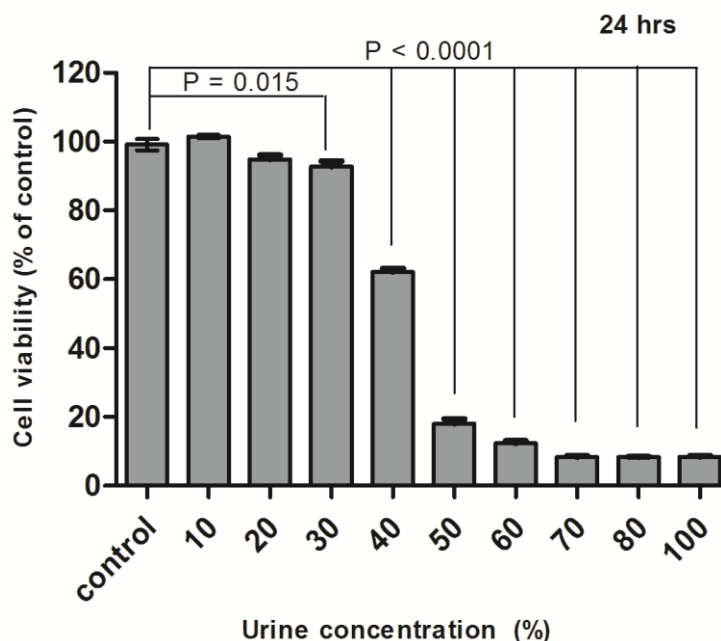
ภาพที่ 4: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10 - 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.0001$ ) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40% ขึ้นไป (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)



เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต 10 – 100% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ในสถานะที่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตความเข้มข้น 10 – 20% จำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต (ภาพที่ 5) ที่ความเข้มข้นของปัสสาวะ 30% พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (% viability น้อยกว่า 93%,  $p = 0.015$ ) และส่งผลให้เซลล์ตายลงอย่างมากตั้งแต่ความเข้มข้น 40 ขึ้นไป (% viability น้อยกว่า 63%,  $p < 0.0001$ ) คำนวณค่า  $IC_{50}$  ของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตได้เท่ากับ 50.49% แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 6 จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ความเข้มข้น 20% หรือน้อยกว่า ปลอดภัยต่อเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) หรือไม่ส่งผลให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองต่อไปเกี่ยวกับการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เลือกใช้ความเข้มข้นของปัสสาวะผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ 20% เพื่อไม่ให้มีปัจจัยด้านการตายของเซลล์มากระทบต่อผลการทดลอง

ตารางที่ 6: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Urine conc. (%) \ Cell viability (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	100
Mean	100.0	101.5	94.9	92.8	62.2	18.1	12.3	8.4	8.4	8.5
SD	-	1.42	3.63	4.82	2.93	4.05	2.01	1.12	0.23	0.67
SEM	-	0.47	1.21	1.61	0.98	1.35	0.67	0.37	0.08	0.22



ภาพที่ 5: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10 – 100% ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปัสสาวะที่ความเข้มข้น 30% เริ่มทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.015$ ) และเซลล์ตายลงอย่างมากที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40% ขึ้นไป ( $P < 0.0001$ ) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)

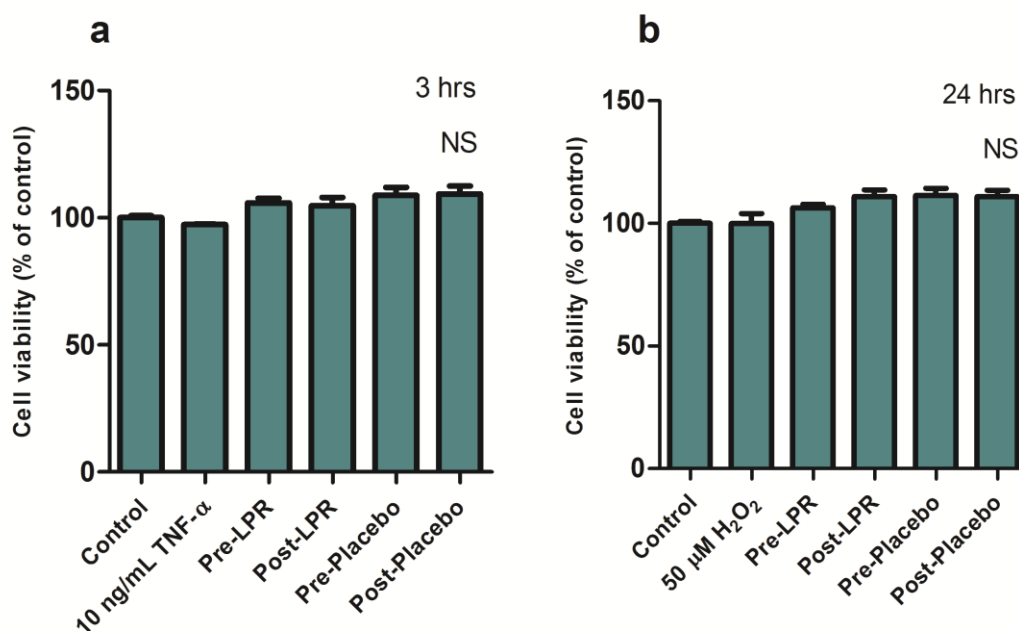
เมื่อเลือกความเข้มข้นของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตได้แล้ว จากนั้นวิเคราะห์ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells โดยเมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไต ดังภาพที่ 6a และเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตเช่นกัน (ภาพที่ 6b) แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 7 และ 8 ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ 20% และ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับศึกษาผลของปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตต่อการกระตุ้น NF- $\kappa$ B และเลือกใช้ความเข้มข้นของปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ 20% และ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับศึกษาผลของปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและวิเคราะห์ปริมาณ sialic acid

ตารางที่ 7: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Urine conditions / Cell viability (%)	Control	10 ng/mL TNF- $\alpha$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
Mean	100.0	97.27	105.8	104.7	108.9	109.3
SD	-	0.23	7.98	14.59	12.63	13.82
SEM	-	0.17	1.94	3.26	3.06	3.17

ตารางที่ 8: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Urine conditions / Cell viability (%)	Control	50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
Mean	100.0	99.95	106.3	110.9	111.5	110.9
SD	-	8.22	6.35	12.37	10.79	10.08
SEM	-	4.11	1.50	2.77	2.88	2.69



ภาพที่ 6: ความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อ HK-2 cells (a) เซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต (b) เซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM) NS: non-significant.

### ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)

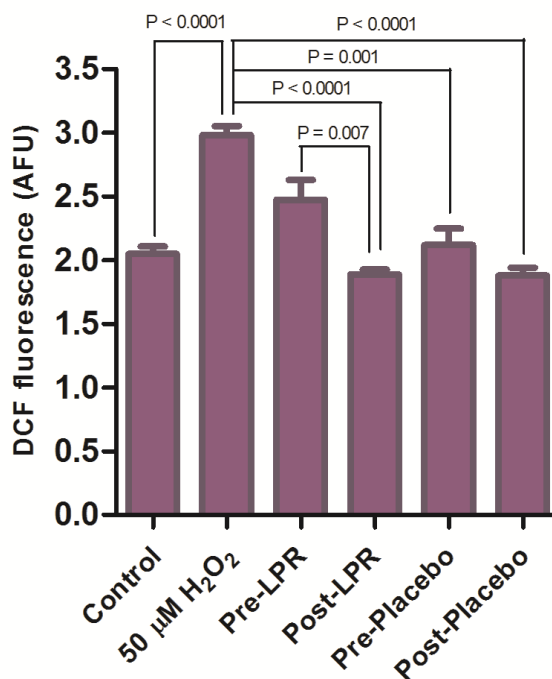
การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อภาวะ oxidative stress โดยวัดระดับการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ระดับของการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.0001$ ) แต่เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับ LPR และ placebo ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้าง ROS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM ดังภาพที่ 7

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ระดับการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.007$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่า

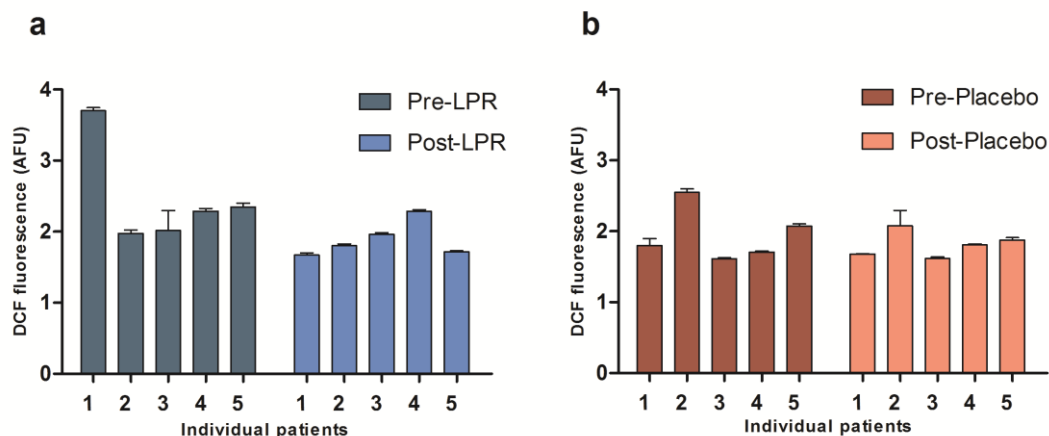
ระดับการสร้าง ROS ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.084$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR สามารถลดระดับสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไตได้ แต่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่ส่งผลต่อการลดการสร้าง ROS ในเซลล์หรือลดลงเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 8 แสดงผลของการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตแต่ละราย ทั้งในกลุ่ม LPR (8a) และ placebo (8b) แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9: การสร้าง ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

Urine conditions DCF fluorescence (AFU)	Control	50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre- Placebo	Post- Placebo
Mean	2.05	2.98	2.47	1.89	2.12	1.88
SD	0.14	0.21	0.79	0.23	0.69	0.30
SEM	0.06	0.07	0.16	0.04	0.13	0.06



ภาพที่ 7: การสร้าง ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ระดับของการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.0001$ ) แต่เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตที่ได้รับ LPR และ placebo ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับการสร้าง ROS เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ระดับการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.007$ ) ขณะที่ระดับการสร้าง ROS ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.084$ ) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคนี้วไตในแต่ละกลุ่ม และ error bar แสดงค่า SEM)



ภาพที่ 8: การสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย (a) และ placebo 5 ราย (b) ที่ความเข้มข้น 20 % (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)

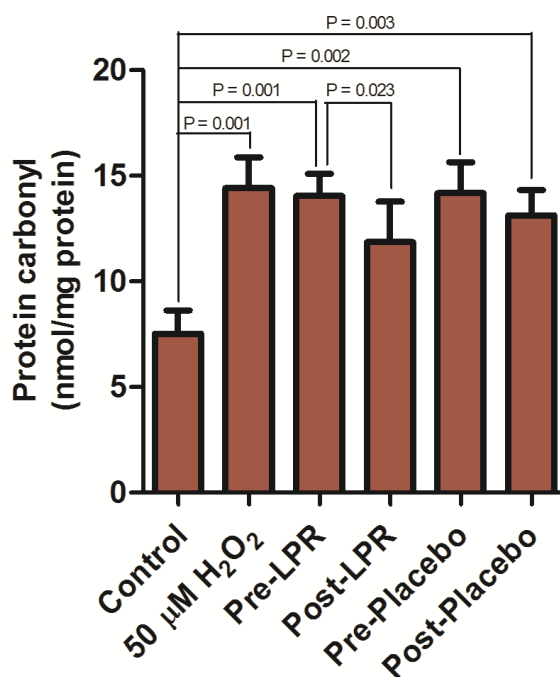
### ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงภาวะ oxidative stress โดยวัดระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่าระดับ protein carbonyl ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเซลล์ที่ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตก่อนได้รับ LPR ก่อนได้รับ placebo และหลังได้รับ placebo เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ( $P = 0.001, 0.001, 0.002$  และ  $0.003$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเซลล์ได้รับ DMEM serum-free ขณะที่ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR ไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับ protein carbonyl ในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.053$ ) (ภาพที่ 9)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.023$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่า ระดับ protein carbonyl ของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.915$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR สามารถลดการเกิด protein oxidation ได้ แต่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่ส่งผลต่อการลดการเกิด protein oxidation หรือลดลงเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตแต่ละราย ทั้งในกลุ่ม LPR (10a) และ placebo (10b) แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 10

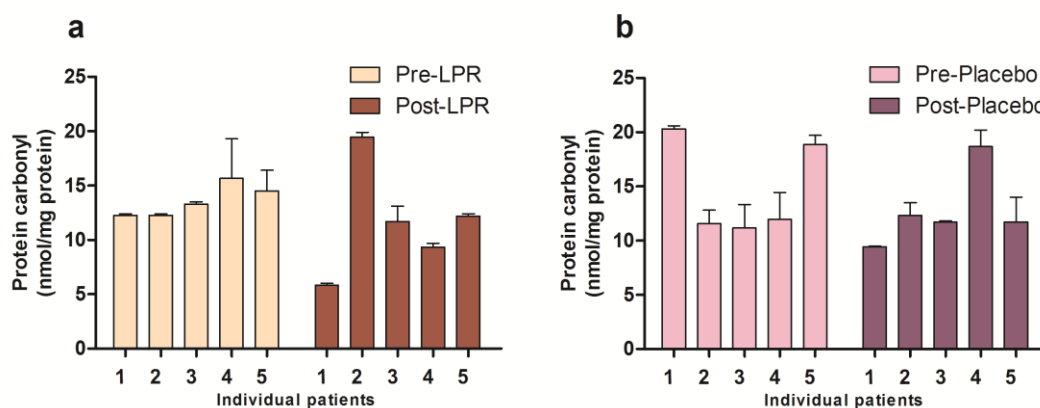
ตารางที่ 10: ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต  
ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

Urine conditions	Control	50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
Protein carbonyl (nmol/mg protein)						
Mean	7.53	14.42	14.04	11.85	14.18	13.13
SD	3.46	4.58	3.06	3.97	4.89	3.61
SEM	1.09	1.45	1.05	1.93	1.46	1.19



ภาพที่ 9: ระดับ protein carbonyl เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตไต  
ก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับ protein  
carbonyl เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตไตก่อนได้รับ LPR ก่อน  
ได้รับ placebo และหลังได้รับ placebo เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P = 0.001, 0.001,$   
 $0.002$  และ  $0.003$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตไต  
ก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ระดับ protein  
carbonyl ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.023$ ) ระดับ  
protein carbonyl ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง  
(Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.915$ ) (แท่งกราฟแสดง  
ค่าเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคไตไตในแต่ละกลุ่ม และ error bar แสดงค่า SEM)





ภาพที่ 10: ระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย (a) และ placebo 5 ราย (b) ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)

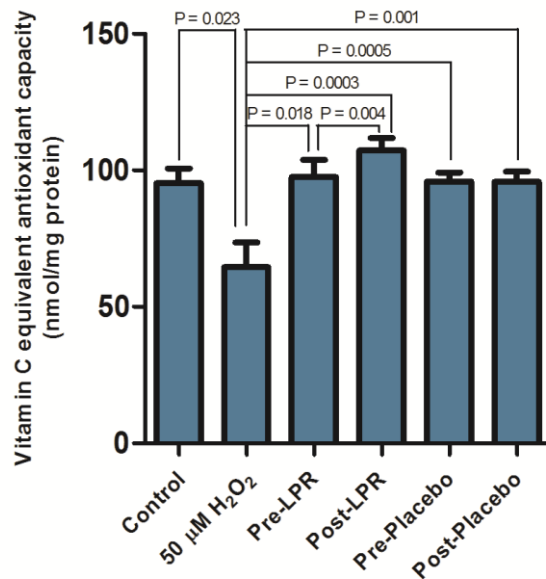
การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity, VCEAC) พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.023$ ) แต่เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเซลล์ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 11)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.004$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.950$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR สามารถเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ได้ แต่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต ภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ

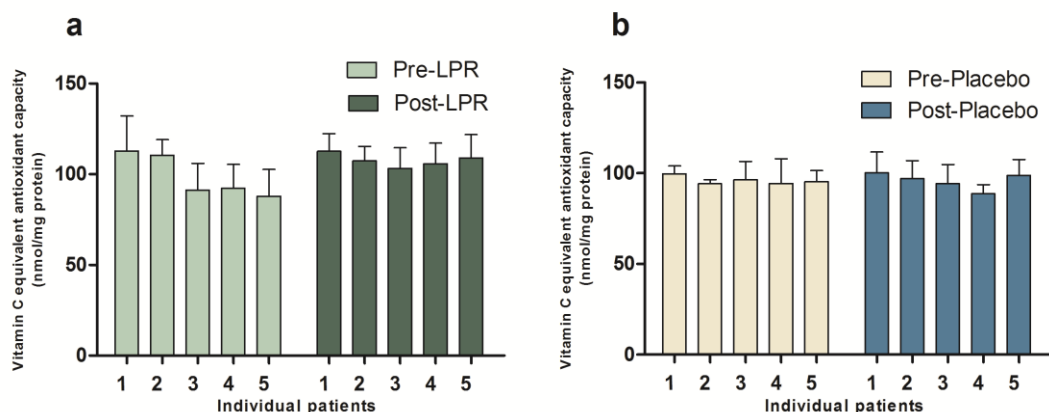
ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตแต่ละราย ทั้งในกลุ่ม LPR (12a) และ placebo (12b) แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

Urine conditions	Control	50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
Vitamin C equivalent Antioxidant capacity (nmol/mg protein)						
Mean	95.26	64.60	97.54	107.33	95.95	95.77
SD	10.91	19.91	26.39	19.12	12.47	14.46
SEM	5.46	8.90	6.22	4.51	3.22	3.73



ภาพที่ 11: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) เมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $P = 0.023$ ) แต่เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับ LPR และ placebo ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.004$ ) ขณะที่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ placebo ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.950$ ) (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)



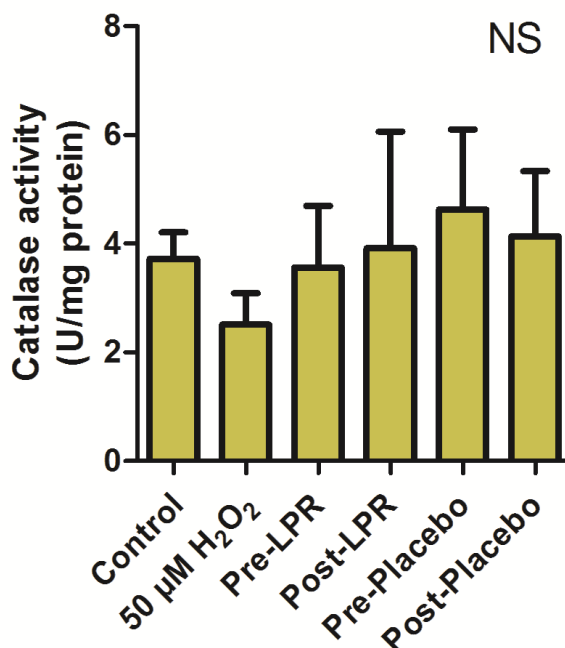
ภาพที่ 12: ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR 5 ราย (a) และ placebo 5 ราย (b) ที่ความเข้มข้น 20% (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM)

ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ catalase (catalase activity) ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลง catalase activity ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  และได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลัง LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับ catalase activity ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเซลล์ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 13) แต่พบแนวโน้มการลดลงของ catalase activity ในเซลล์ที่ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ระดับ catalase activity เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลังได้รับ LPR ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันในกลุ่มที่ได้รับ placebo ระดับ catalase activity เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลังได้รับ placebo ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องจากปัสสาวะที่ใช้ในการทดสอบนี้ เป็น pooled urine คือนำปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตในแต่ละกลุ่มมาผสมรวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน (5 รายรวมกัน) ทำให้จำนวนที่ทำซ้ำน้อยเกินไป (ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้ง) แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12: การทำงานเอนไซม์ catalase (catalase activity) เมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

Urine conditions Catalase activity (U/mg protein)	Urine conditions					
	Control	$50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
Mean	3.73	2.51	3.56	3.92	4.63	4.14
SD	0.97	1.15	1.96	3.71	2.55	2.07
SEM	0.49	0.58	1.13	2.14	1.47	1.20



ภาพที่ 13: การทำงานเอนไซม์ catalase (catalase activity) เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  และ ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% (pooled urine) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทำงานของเอนไซม์ catalase ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (แท่งกราฟแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงค่า SEM) NS: non-significant.

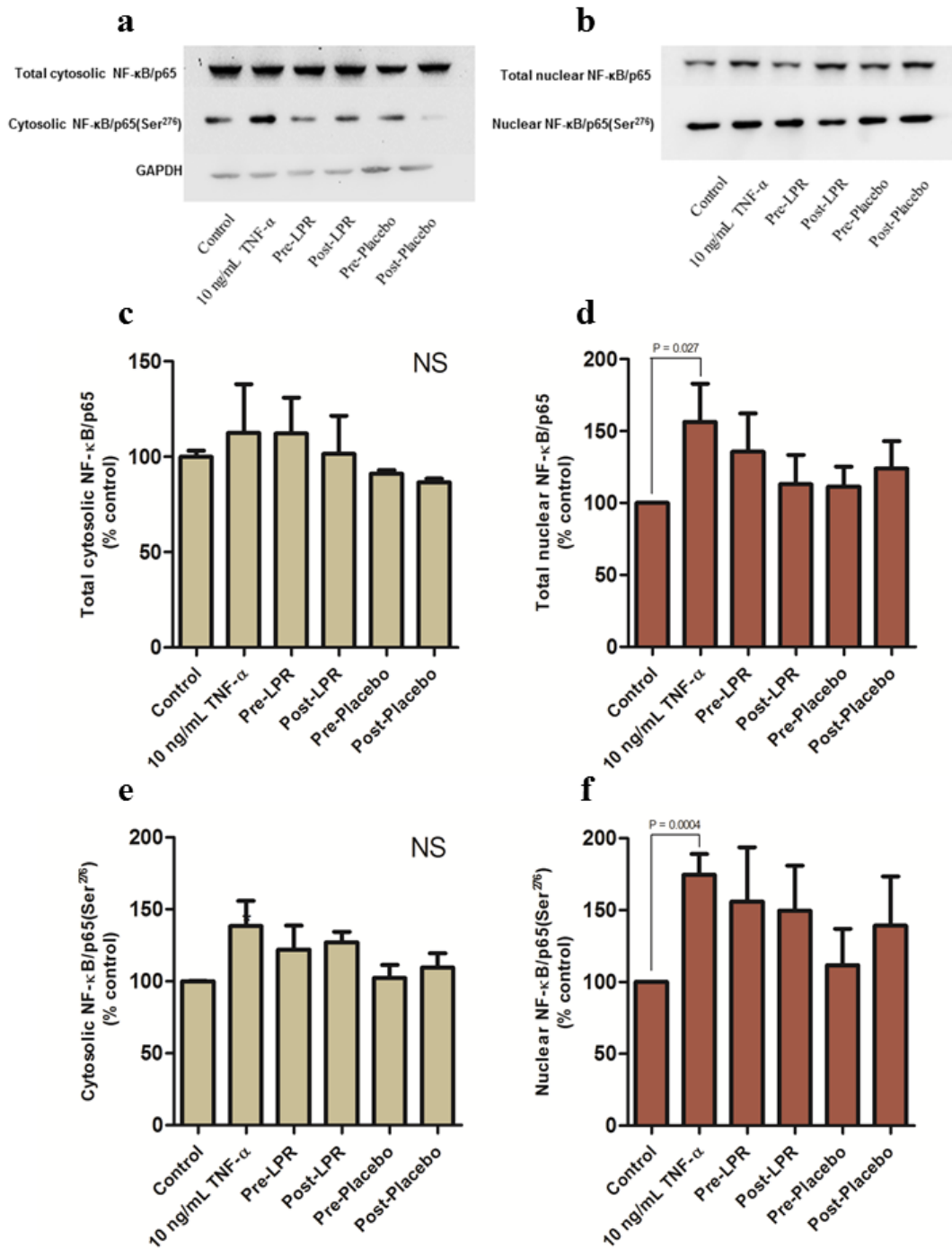
**ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)**

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์บุผิวท่อไต โดยวิเคราะห์การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม พบว่า ระดับการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในไซโตพลาสซึม ทั้ง NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (active form) ในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 14a, c และ e) แต่ในทางตรงกันข้าม ปริมาณของ NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียส ในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในรูปของ NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (P = 0.027 และ P = 0.0004 ตามลำดับ) แต่ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 14b, d และ f) อย่างไรก็ตามพบแนวโน้มการลดลงของทั้ง NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF-

$\kappa\text{B/p65(Ser}^{276})$  ในนิวเคลียส ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตหลังได้รับ LPR เมื่อเทียบกับก่อนได้รับ LPR บ่งชี้ว่าน่าจะมีการลดลงของการกระตุ้นการอักเสบ แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13: การกระตุ้นการแสดงออกของ NF- $\kappa\text{B}$  เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

NF- $\kappa\text{B}$ activation	Urine conditions	Control	10 ng/mL TNF- $\alpha$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
	% of control						
Nuclear NF- $\kappa\text{B/p65(Ser}^{276})$	Mean	100.00	174.57	155.91	149.65	111.60	139.31
	SD	-	25.18	65.51	54.25	50.74	59.03
	SEM	-	14.54	37.82	31.32	25.37	34.08
Total nuclear NF- $\kappa\text{B/p65}$	Mean	100.00	156.36	135.75	113.13	111.40	124.00
	SD	-	46.05	59.57	40.43	19.66	32.96
	SEM	-	26.58	26.64	20.22	13.90	19.03
Cytosolic NF- $\kappa\text{B/p65(Ser}^{276})$	Mean	100.00	138.49	122.09	127.13	102.47	109.59
	SD	-	30.28	28.90	12.69	15.44	16.90
	SEM	-	17.48	16.68	7.33	8.92	9.76
Total cytosolic NF- $\kappa\text{B/p65}$	Mean	100.00	112.51	112.18	101.54	91.13	86.70
	SD	-	57.18	42.28	34.59	3.31	2.69
	SEM	-	25.57	18.91	19.97	1.91	1.90



ภาพที่ 14: การกระตุ้นการแสดงออกของ NF-κB เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF-α และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตัวอย่างผลของ Western blot แสดงการแสดงออกของ NF-κB/p65 (total NF-κB) และ p-NF-κB/p65(Ser276) ในไซโตพลาสซึม (a) และนิวเคลียส (b) กราฟแสดงความเข้มของ band จากการแสดงออกของ NF-κB/p65 (c) และ p-NF-κB/p65(Ser276) (e) ในไซโตพลาสซึม normalized ด้วยการแสดงออกของ GAPDH กราฟแสดงความเข้มของ band จากการแสดงออกของ NF-κB/p65 (d) และ p-NF-κB/p65(Ser276) (f) ในนิวเคลียส

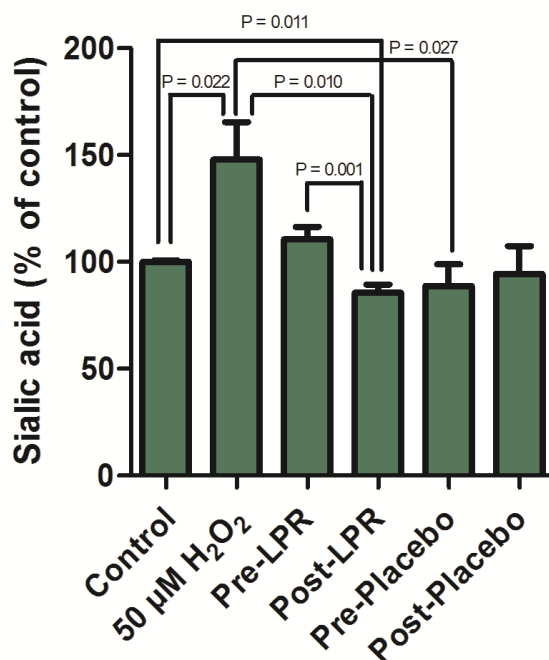
ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells)

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ระดับของ sialic acid ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.022$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 15) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ( $P = 0.001$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่า ระดับ sialic acid ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.131$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR สามารถลดระดับ sialic acid ได้ แต่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่ส่งผลต่อระดับ sialic acid หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แสดงค่า Mean, SD และ SEM ดังตารางที่ 14 เนื่องจาก sialic acid มีบทบาทเป็น crystal binding receptor ทำให้มีการจับกันของผลึกกับเซลล์บุผิวท่อไต ดังนั้นการลดลงของ sialic acid หลังได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR นั้น อาจส่งผลต่อการลดการติดค้างของผลึกในไตและลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วซ้ำได้

ตารางที่ 14: ระดับของ sialic acid เมื่อเซลล์ได้รับ  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo

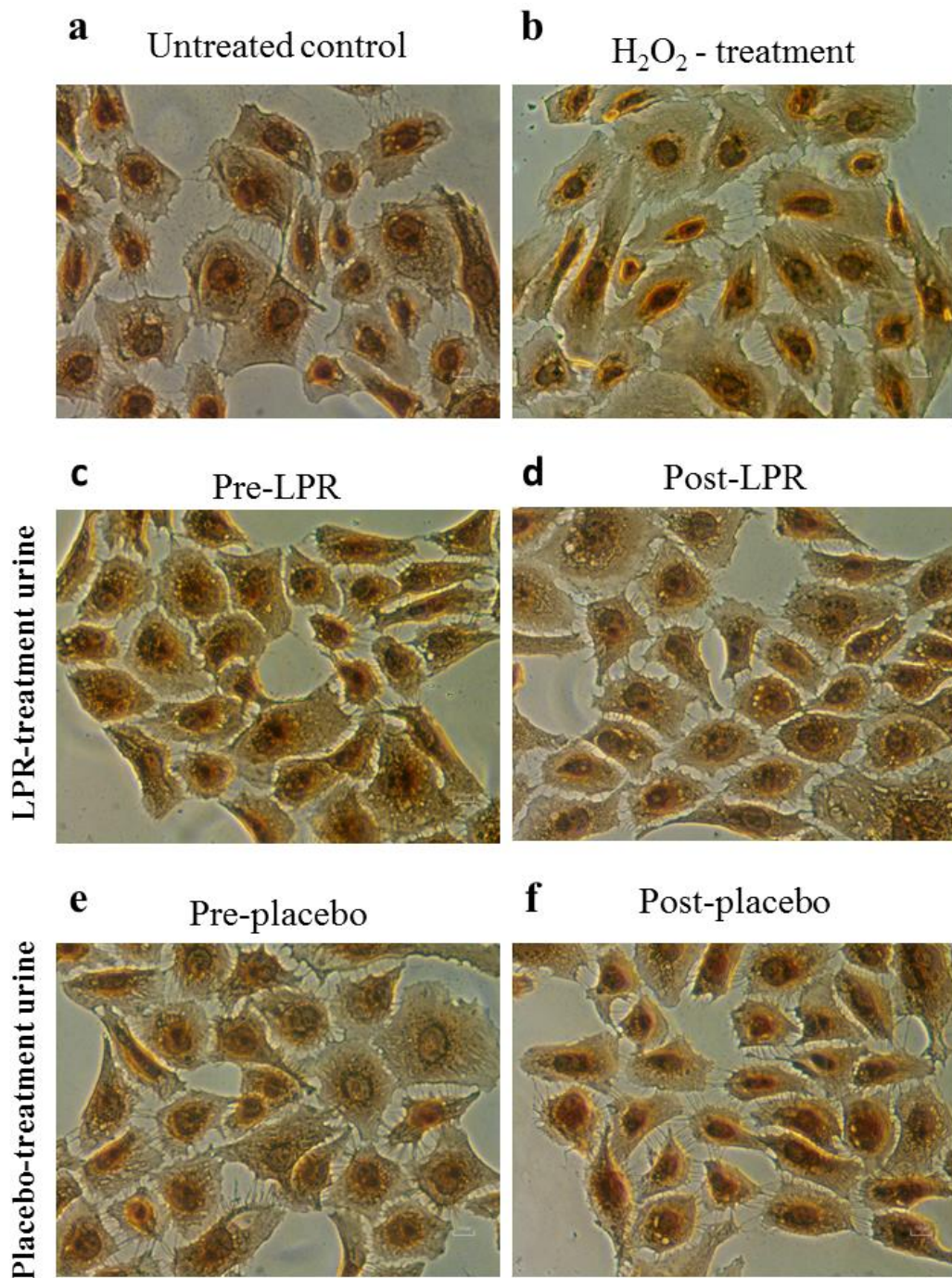
Urine conditions Sialic acid (% of control)	Control	$50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$	Pre-LPR	Post-LPR	Pre-Placebo	Post-Placebo
	Mean	100.00	147.90	110.55	85.66	88.78
SD	-	30.37	11.77	7.64	20.39	25.85
SEM	-	17.53	5.88	3.82	10.19	12.93





ภาพที่ 15: ระดับของ sialic acid เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับของ sialic acid ในเซลล์ที่ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (P = 0.022) ระดับ sialic acid ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) (P = 0.001) ขณะที่ระดับ sialic acid ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ placebo ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับ sialic acid (P = 0.131)

เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ sialic acid ในเซลล์ที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR จึงทำการศึกษากายภาพแสดงออกของ sialic acid บนผิวเซลล์ด้วยการย้อม lectin cytochemistry โดย lectin ที่ใช้คือ wheat germ agglutinin (WGA) ซึ่งสามารถจับจำเพาะได้กับ sialic acid และ N-acetylglucosamine บนผิวเซลล์ (เซลล์ย้อมติดสีน้ำตาล) ผลการศึกษาพบว่าผลการย้อมเซลล์ด้วย lectin cytochemistry มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ sialic acid ในเซลล์ (ภาพที่ 15) เมื่อในเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> พบเซลล์ที่ให้ผลบวกของ WGA lectin มากกว่าเซลล์ควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM (ภาพที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ความเข้มของสีลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่า การย้อมติดสีของ WGA lectin ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อน (Pre-Placebo) และหลัง (Post-Placebo) ได้รับ placebo ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 16: ผลการย้อม WGA lectin cytochemistry ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์ที่ได้รับ 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> พบว่าย้อมติดสีน้ำตาลของ WGA lectin บนผิวเซลล์เข้มกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตหลังได้รับ LPR (Post-LPR) ความเข้มของสีลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR (Pre-LPR) ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับ placebo พบว่าการย้อมติดสีของ WGA lectin ไม่แตกต่างกัน

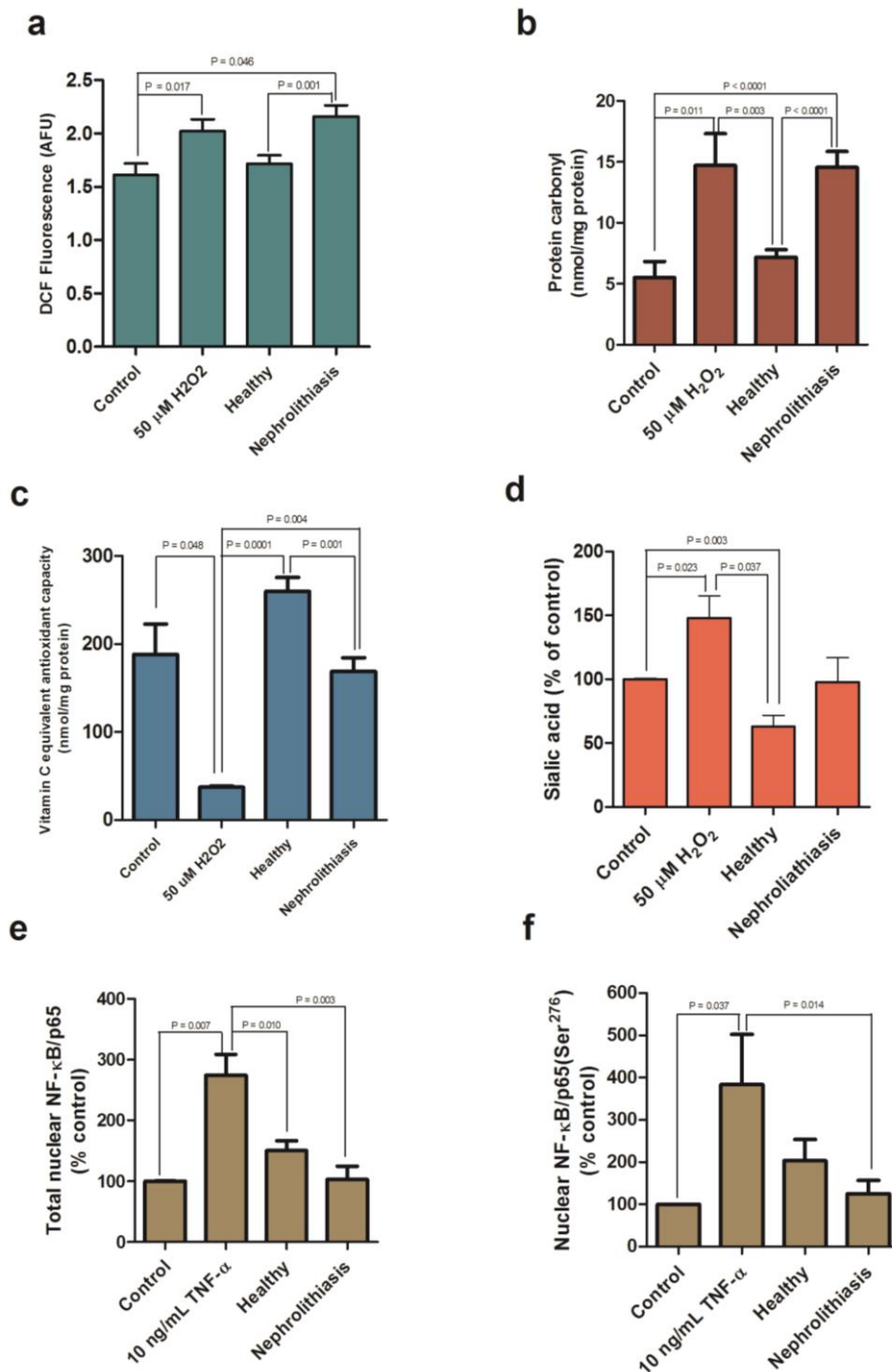
### ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต

นอกจากผลการศึกษาข้างต้นแล้ว ในการทำงานวิจัยนี้ยังศึกษาว่าปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตสามารถกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต ได้มากกว่าปัสสาวะจากคนปกติหรือไม่ ผลการศึกษาพบว่า การสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM ( $P = 0.017$  และ  $P = 0.011$ ) ดังภาพที่ 17a และ b และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติ พบว่า การสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ( $P = 0.001$  และ  $P < 0.0001$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตสามารถกระตุ้นการสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไตได้

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM ( $P = 0.048$ ) ดังภาพที่ 17c และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติ พบว่า ปริมาณ TAS ในเซลล์บุผิวท่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับคนปกติ ( $P = 0.048$ ) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตสามารถลดปริมาณ TAS ได้

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ระดับของ sialic acid ในเซลล์ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM ( $P = 0.023$ ) ดังภาพที่ 17d และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติ พบว่า ระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตของเซลล์บุผิวท่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับคนปกติ แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องจากปัสสาวะที่ใช้ในการทดสอบนี้ เป็น pooled urine ทำให้จำนวนที่ทำซ้ำน้อยเกินไป (ทำการทดลองนี้ซ้ำ 2 ครั้ง)

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติต่อการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่า ระดับการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในไซโตพลาสซึม ทั้ง NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (active form) ในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ serum-free DMEM แต่ในทางตรงกันข้าม ปริมาณของ NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียส ในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในรูปของ NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) ( $P = 0.007$  และ  $P = 0.037$  ตามลำดับ) ดังภาพที่ 17e และ f แต่ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตนั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับคนปกติ แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตไม่ส่งผลต่อภาวะการอักเสบของเซลล์บุผิวท่อไต



ภาพที่ 17: ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต กราฟแสดงการสร้าง ROS (a) ระดับ protein carbonyl (b) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAS) (c) ระดับ sialic acid (d) ในเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ กราฟแสดงความเข้มของ band จากการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B/p65 (e) และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (f) ในนิวเคลียส เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ในการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

ผลการศึกษาความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตต่อเซลล์บุผิวท่อไต HK-2 cell พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30% หรือน้อยกว่า ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ และค่า  $IC_{50}$  ของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตเท่ากับ 43.26% และเมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 20% หรือน้อยกว่า ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 50.49%

เมื่อเซลล์ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  และปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR และ placebo ที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

จากการศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยวัดระดับการสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่า การสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ระดับ TAS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR ระดับการสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์บุผิวท่อไตลดลง ขณะที่ระดับ TAS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR ในกลุ่ม placebo พบว่าการสร้าง ROS ระดับ protein carbonyl และระดับ TAS ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ placebo ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR สามารถลดระดับ oxidative stress ในเซลล์ได้ แต่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่สามารถลดระดับ oxidative stress หรือลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับก่อนการรักษาด้วย LPR และ placebo ตามลำดับ



จากการศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการอักเสบ โดยวัดการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่าการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียสในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้ง NF- $\kappa$ B/p65 (total form) และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) (active form) แสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นของ NF- $\kappa$ B หรือมีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังการรักษาทั้งในกลุ่ม LPR และ placebo ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของทั้ง NF- $\kappa$ B/p65 และ p-NF- $\kappa$ B/p65(Ser<sup>276</sup>) ในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม แสดงว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง ปัสสาวะก่อนและหลังการรักษาของผู้ป่วยโรคนิ้วไตทั้งสองกลุ่มไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

จากการศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ระดับของ sialic acid ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการย้อม lectin cytochemistry ที่ย้อมติดสี WGA lectin เข้มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR ระดับ sialic acid ในเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR เช่นเดียวกับผลการย้อม lectin cytochemistry ที่พบการย้อมติดสีลดลง ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตก่อนและหลังได้รับ placebo ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ sialic acid ในเซลล์และผลการย้อม lectin cytochemistry ไม่แตกต่างกันเช่นกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับ LPR สามารถลดปริมาณ sialic acid ได้ ขณะที่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต

การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตและคนปกติในการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต พบว่า การสร้าง ROS และระดับ protein carbonyl ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตเพิ่มสูงขึ้น ระดับ TAS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของคนปกติ สำหรับระดับ sialic acid ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไต การศึกษานี้ไม่พบการกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตเทียบกับเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของคนปกติ

การศึกษานี้สรุปได้ว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตหลังได้รับการรักษาด้วย LPR สามารถลดการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตได้ ขณะที่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย placebo ไม่สามารถลดการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตได้ ซึ่งเป็นข้อมูลระดับเซลล์ที่สนับสนุนว่ารักษาด้วย LPR น่าจะช่วยป้องกันการเกิดนิ้วซ้ได้ และผลการศึกษาในเซลล์ยังแสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตสามารถกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไตและคนปกติ ทำให้ทราบกลไกการเกิดนิ้วในระดับเซลล์และโมเลกุลมากขึ้น

## อภิปรายผลการวิจัย

### การศึกษาความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตต่อเซลล์บุผิวท่อไต

จากการศึกษาความเป็นพิษของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตต่อเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) พบว่า ความเข้มข้นของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตตั้งแต่ 40% ขึ้นไป ส่งผลให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะ 3 ชั่วโมง และความเข้มข้นของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตตั้งแต่ 30% ขึ้นไป ส่งผลให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ได้รับปัสสาวะ 24 ชั่วโมงนั้น อาจเกิดจากความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกับเซลล์ในร่างกาย โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าในปัสสาวะมีสารเคมีมากมายที่ร่างกายขับออกมา พบว่า 95% เป็นน้ำ 2.5% เป็นยูเรีย และอีก 2.5% เป็นสารอื่นๆ เช่น เอนไซม์ เมแทบอลิท์ และฮอร์โมนต่างๆ ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้โดยเฉพาะเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษ เช่น oxalate อาจส่งผลทำให้เซลล์ทดลองตายได้ (59) ขณะที่เซลล์ในร่างกายนั้นจะสามารถทนต่อสารหรือภาวะเหล่านี้ได้ดีกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์มีการสร้างใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายไป และนอกจากนี้ยังมีกลไกการป้องกันการถูกทำลายจากสารต่างๆ เช่น มีการดูดกลับหรือหลั่งสารบางอย่าง หรือเซลล์มีชั้นเมือกห่อหุ้มช่วยป้องกันอันตรายจากสารต่างๆ ในปัสสาวะในการทำลายเซลล์ได้

### การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างสารออกซิไดซ์กับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเกิดจากมีสารออกซิไดซ์ในปริมาณที่สูงและมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณต่ำ สารออกซิไดซ์ ROS ถูกสร้างขึ้นในสภาวะปกติผลจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย รวมถึงเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอาจถูกสร้างขึ้นในปริมาณที่ต่ำจากสภาวะอื่นๆ ได้อีก และจะถูกสร้างมากกว่าปกติเมื่อเกิดความผิดปกติในร่างกายหรือเกิดพยาธิสภาพเกิดขึ้น (60) และยังพบว่า ROS ถูกสร้างมากขึ้นในภาวะขาดสารต้านอนุมูลอิสระ (61) สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระหรือสารออกซิไดซ์ได้ มีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione และวิตามินซี เป็นต้น หากมีระดับของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำจะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ เกิดการทำลายโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ภาวะเครียดจากออกซิเดชันนี้สามารถตรวจได้จากสารออกซิไดซ์ ROS หรือตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระ และตรวจวัดการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ (62) การทดลองในครั้งนี้ทำการตรวจวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  พบการสร้าง ROS ที่สูงขึ้น และพบปริมาณ TAS ลดต่ำลง ก่อให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ทำการตรวจวัดการทำลายโปรตีนโดยพบปริมาณ protein carbonyl สูงขึ้น บ่งชี้ว่า  $\text{H}_2\text{O}_2$  การกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันขึ้น ผลการ

เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตก่อนและหลังได้รับ LPR พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตหลังได้รับ LPR พบการสร้าง ROS ลดลง ปริมาณ TAS สูงขึ้น และส่งผลให้ระดับ protein carbonyl ลดลงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มก่อนได้รับ LPR ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตหลังได้รับ LPR สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากเมื่อผู้ป่วยได้รับ LPR เป็นเวลา 6 เดือน จะเห็นว่า pH ของปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 4) และอาจมีการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ในปัสสาวะ เช่น มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น มีปริมาณสารก่อเนื้องอกลดลง หรือมีปริมาณสารยับยั้งเนื้องอกเพิ่มขึ้น เพื่อยืนยันว่าการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้นเกิดจากปัจจัยใดในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตหลังได้รับ LPR ควรทำการศึกษาต่อไปเพื่อตรวจสอบสารในปัสสาวะ เช่น ออกซาเลต ซิเทรต และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

#### การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้วไตที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อภาวะการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

โปรตีน NF- $\kappa$ B เป็น transcription factor ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนหลายยีน เช่น ในกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบ (inflammatory responses) การพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน (immune system development) และการตายแบบ apoptosis (63) เป็นต้น กลไกการทำงานของ NF- $\kappa$ B โดยปกติจะอยู่ในไซโตพลาสซึมจับอยู่กับตัวยับยั้งคือ NF- $\kappa$ B inhibitor protein (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (64) แต่เมื่อมีตัวกระตุ้น เช่น TNF- $\alpha$ , Lipopolysaccharide (LPS), หรือสภาวะเครียดจากออกซิเดชันอื่นๆ (65) จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น I $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ K) ที่จะไปเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับ I $\kappa$ B $\alpha$  และปล่อย NF- $\kappa$ B และเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ต่อไป ผลการศึกษานี้พบว่าในเซลล์ที่ได้รับ 10 ng/mL TNF- $\alpha$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (66) มีปริมาณของ NF- $\kappa$ B ในนิวเคลียสมากขึ้น แต่ในไซโตพลาสซึมไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- $\alpha$  แล้ว NF- $\kappa$ B เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสดังที่กล่าวไปข้างต้น และมีการสร้างใหม่เพิ่มเติม ทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ไซโตพลาสซึม ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า TNF- $\alpha$  กระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B และน่าจะส่งผลให้เกิดการอักเสบตามมา ในขณะที่ เซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตทั้งก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo กลับไม่พบการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม บ่งชี้ว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมง ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้วไตยังไม่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ อาจเกิดจากการที่ใช้เวลากระตุ้นน้อยเกินไป หรืออาจเป็นไปได้ว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตนั้นมีทั้งสารที่กระตุ้นและยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B เช่น ยารักษาอาการอักเสบต่างๆ เช่น aspirin และ salicylate สามารถยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B ได้ (67) โดยจะยับยั้ง I $\kappa$ K ทำให้ I $\kappa$ B $\alpha$  ไม่ถูกเติมฟอสเฟต ส่งผลให้ NF- $\kappa$ B ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีการสังเคราะห์ตัวยับยั้ง (I $\kappa$ B $\alpha$ )



มากขึ้น โดยมีการรายงานว่าการแสดงออกที่มากขึ้นของ NF- $\kappa$ B (overexpression) สามารถกระตุ้นการสร้าง I $\kappa$ B $\alpha$  ทำให้การแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ลดลง (Negative feedback) (68, 69) ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้แต่เกิดการกระตุ้นทำให้มีการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B มากขึ้น เกิด negative feedback ไปที่ I $\kappa$ B $\alpha$  จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ NF- $\kappa$ B เพื่อยืนยันสมมุติฐานนี้ ควรทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ I $\kappa$ B $\alpha$  ในไซโตพลาสซึม หากมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น น่าจะสรุปได้ว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ NF- $\kappa$ B ในเซลล์ที่ได้รับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้แต่นั้น เกิดจากมีตัวยับยั้งต่อ NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) มากขึ้นนั่นเอง หรือทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ I $\kappa$ K ในไซโตพลาสซึม หากมีการแสดงออกลดลง แสดงว่ามีสารบางอย่างยับยั้งการแสดงออกของ I $\kappa$ K ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B

### การศึกษาผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ที่ได้รับการรักษาด้วย LPR และ placebo ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ sialic acid ในเซลล์บุผิวท่อไต

หลายการศึกษารายงานว่าระดับของ sialic acid ที่ผิวเซลล์สัมพันธ์กับการจับกับกับผลึกนิ้ว (28, 70) sialic acid พบที่ผิวเซลล์ของเซลล์ทั่วไป เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาล neuraminic acid มีประจุเป็นลบ ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของสารหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ส่วนใหญ่จะตรวจวัดปริมาณของ sialic acid ในรูปของ total sialic acid (TSA) ซึ่งจะพบมากในระบบไหลเวียนเลือดของผู้ป่วยมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม (71) มะเร็งลำไส้ (72) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (73) และยังพบ TSA ในปัสสาวะสูงในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (74) ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับ TSA ส่วนใหญ่จะศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็ง และอาจกล่าวได้ว่าเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการอักเสบของโรคมะเร็ง สำหรับ sialic acid กับโรคนี้ไว้แต่นั้น มีหลายการศึกษาที่ศึกษาการแสดงออกของ sialic acid บนผิวเซลล์ต่อการจับกับของผลึก เพื่อดูว่าระดับ sialic acid บนผิวเซลล์นั้นส่งผลต่อการจับกับผลึกอย่างไร หลายการศึกษาพบว่า sialic acid ที่ผิวเซลล์ทำหน้าที่คล้ายเป็น receptor ต่อผลึก เช่น การศึกษาของ Verkoelen และคณะ (28) พบว่า sialic acid บนผิวเซลล์ในระยะ undifferentiated ส่งผลต่อการจับกับกับผลึก COM ได้ดีกว่าเซลล์ระยะ differentiated (ภาพที่ 1) และการศึกษาของ Lieske และคณะ (27) พบว่า sialic acid บนผิวเซลล์ทำหน้าที่เป็น receptor ต่อผลึก COM และจะถูกยับยั้งการจับกันของ sialic acid กับ COM ด้วย lectin ชนิด WGA เนื่องจาก lectin นี้จะจับจำเพาะกับ sialic acid แสดงให้เห็นว่า sialic acid บนผิวเซลล์ที่สูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการจับกับกับผลึกมากขึ้น โอกาสเกิดนิ่วง่ายขึ้น การศึกษาในครั้งนี้พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ระดับของ sialic acid ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เมื่อพิจารณาถึงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันดังที่กล่าวไป แสดงให้เห็นว่านอกจาก H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันแล้ว อาจส่งผลต่อการเพิ่มระดับ sialic acid (75) ทำให้ผลึกจับกับเซลล์ได้ง่ายขึ้น การติดค้างที่ไตก็ง่ายขึ้นเช่นกัน และผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้หลังจากได้รับ LPR สามารถลดระดับ sialic acid ในเซลล์ได้ แสดงว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ LPR นอกจากลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันแล้วยังสามารถลดระดับ sialic acid ได้อีกด้วย เนื่องจาก sialic acid ที่ตรวจวัดในการศึกษานี้เป็น TSA อาจจะไม่จำเพาะต่อ

กลไกการจับกันกับผลึก อาจมี free sialic acid ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งในการศึกษาของ Verkoelen พบว่า free sialic acid ไม่มีผลต่อการจับกันกับผลึก และ lectin ที่ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นชนิด WGA ซึ่งจับได้กับทั้ง sialic acid และ N-acetylglucosamine ผลการย้อม cytochemistry ที่ได้จึงไม่ได้จำเพาะกับ sialic acid เพียงอย่างเดียว การศึกษาเพื่อยืนยันต่อไปจึงควรใช้ lectin ที่จำเพาะกับ sialic acid เช่น การศึกษาของ Verkoelen (28) ใช้ Maackia Amurensis II (MALII) และ Sambucus Nigra (SNA) ซึ่งจำเพาะกับ sialic acid ที่มีพันธะจับกับ galactose แบบ  $\alpha 2,3$  และ  $\alpha 2,6$  และการศึกษาของ Kramer และคณะ (76) ที่พบว่า sialic acid ที่มีพันธะจับกับ galactose แบบ  $\alpha 2,3$  สามารถลดหรือป้องกันการจับกันกับผลึก ขณะที่ sialic acid ที่มีพันธะจับกับ galactose แบบ  $\alpha 2,6$  เพิ่มการจับกันของผลึกได้

### ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจวัดความเป็นพิษของ  $H_2O_2$  และ TNF- $\alpha$  ต่อเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) โดยตรง เป็นเพียงการอ้างอิงจากการทดลองก่อนหน้านี้เท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ที่สุดอาจทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ  $H_2O_2$  และ TNF- $\alpha$  ต่อเซลล์บุผิวท่อไต

สารต่างๆ ในปัสสาวะอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดลองภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ ควรมีการทดสอบตรวจวัดสารต่างๆ ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่อาจส่งผลได้ต่อภาวะนี้ เช่น oxalate, citrate, creatinine, protein และ TAS เป็นต้น เพื่อใช้ประกอบในการแปลผลการทดลองให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การเปรียบเทียบผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต นอกจากจะเปรียบเทียบในกลุ่มก่อนและหลังได้รับ LPR หรือ placebo แล้ว ควรทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลของปัสสาวะจากคนปกติ เพื่อวิเคราะห์ว่าผลระหว่างคนปกติกับผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับ LPR หรือ placebo แตกต่างหรือเปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติหรือไม่

การศึกษาระดับ sialic acid ในเซลล์ เนื่องจากการทดลองนี้ระดับ sialic acid ที่ตรวจวัดเป็น TSA อาจจะไม่จำเพาะต่อกลไกการจับกันกับผลึก และในการทดลอง cytochemistry ใช้ WGA lectin ซึ่งนอกจากจะจับกับ sialic acid แล้วยังจับกับ N-acetylglucosamin ได้ด้วย การศึกษาต่อไปควรใช้ MALII และ SNA lectin ซึ่งจำเพาะกับ sialic acid ที่มีพันธะ  $\alpha 2,3$  และ  $\alpha 2,6$  ตามลำดับ

การศึกษาระดับการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B อาจต้องเพิ่มเวลาหรือต้องศึกษาเป็น kinetic หรือ time dependent เพื่อหาเวลาในการกระตุ้นการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ที่แน่นอนมากยิ่งขึ้น และนอกจากนี้การศึกษาภาวะการอักเสบ อาจทำการทดสอบตัวบ่งชี้การอักเสบอื่นๆ เช่น MCP-1 เป็นต้น

การศึกษานี้ทำการศึกษาในเซลล์เพียงชนิดเดียว เพื่อยืนยันผลการทดลองจึงควรทำการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นด้วย เช่น LLC-PK1, MDCK และ NRK-52E cell lines และอาจต้องเพิ่มขนาดของตัวอย่างปัสสาวะ (sample size) ที่ใช้ศึกษา เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องมากที่สุด



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## รายการอ้างอิง

1. Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol*. 2000 Nov-Dec;13 Suppl 3:S45-50.
2. Romero V, Akpınar H, Assimos DG. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol*. 2010 Spring;12(2-3):e86-96.
3. Scales CD, Jr., Smith AC, Hanley JM, Saigal CS, Urologic Diseases in America P. Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur Urol*. 2012 Jul;62(1):160-5.
4. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol*. 1997 Nov;4(6):537-40.
5. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med*. 2002 Jan 10;346(2):77-84.
6. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S. Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *J Med Assoc Thai*. 2007 Apr;90(4):688-98.
7. Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet*. 2001 Aug 25;358(9282):651-6.
8. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol*. 1998 Mar-Apr;11 Suppl 1:66-9.
9. Khan SR, Thamilselvan S. Nephrolithiasis: a consequence of renal epithelial cell exposure to oxalate and calcium oxalate crystals. *Mol Urol*. 2000 Winter;4(4):305-12.
10. Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res*. 2003 Mar;31(1):3-9.
11. Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. *Kidney Int*. 2002 Jan;61(1):105-12.
12. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol*. 2004 Jun;8(2):75-88.
13. Habibzadegah-Tari P, Byer KG, Khan SR. Reactive oxygen species mediated calcium oxalate crystal-induced expression of MCP-1 in HK-2 cells. *Urol Res*. 2006 Feb;34(1):26-36.

14. Umekawa T, Tsuji H, Uemura H, Khan SR. Superoxide from NADPH oxidase as second messenger for the expression of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal epithelial cells exposed to calcium oxalate crystals. *BJU Int.* 2009 Jul;104(1):115-20.
15. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol.* 1997 Mar;157(3):1059-63.
16. Thamilselvan S, Menon M. Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. *BJU Int.* 2005 Jul;96(1):117-26.
17. Huang HS, Chen J, Chen CF, Ma MC. Vitamin E attenuates crystal formation in rat kidneys: roles of renal tubular cell death and crystallization inhibitors. *Kidney Int.* 2006 Aug;70(4):699-710.
18. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res.* 2005 Feb;33(1):65-9.
19. Bamrungphon W, Prempracha N, Bunchu N, Rangdaeng S, Sandhu T, Srisukho S, et al. A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2007 Mar 18;247(2):301-8.
20. Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. *BJU Int.* 2008 May;101(9):1170-7.
21. Boonla C, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Spittau B, Predanon C, et al. Fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in the kidneys of patients with staghorn calculi. *BJU Int.* 2011 Oct;108(8):1336-45.
22. Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, Boonla C, et al. Citruric, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. *Urol Res.* 2008 Aug;36(3-4):149-55.
23. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Oct;8(10):1568-73.
24. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA.* 2005 Jan 26;293(4):455-62.
25. Borghi L, Meschi T, Amato F, Novarini A, Romanelli A, Cigala F. Hot occupation and nephrolithiasis. *J Urol.* 1993 Dec;150(6):1757-60.

26. Urivetzky M, Kessar D, Smith AD. Ascorbic acid overdosing: a risk factor for calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol.* 1992 May;147(5):1215-8.
27. Lieske JC, Leonard R, Swift H, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 2):F192-9.
28. Verkoelen CF, van der Boom BG, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney Int.* 2000 Mar;57(3):1072-82.
29. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res.* 2006 Apr;34(2):86-91.
30. Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1450-82.
31. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No:179-94.
32. Weiss U. Inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):427.
33. Aihara K, Byer KJ, Khan SR. Calcium phosphate-induced renal epithelial injury and stone formation: involvement of reactive oxygen species. *Kidney Int.* 2003 Oct;64(4):1283-91.
34. Miller NL, Lingeman JE. Management of kidney stones. *BMJ.* 2007 Mar 3;334(7591):468-72.
35. Pak CY. Etiology and treatment of urolithiasis. *Am J Kidney Dis.* 1991 Dec;18(6):624-37.
36. Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol.* 1996 Sep;156(3):907-9.
37. Kurtz MP, Eisner BH. Dietary therapy for patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *Nat Rev Urol.* 2011 Mar;8(3):146-52.
38. Kang DE, Sur RL, Haleblan GE, Fitzsimons NJ, Borawski KM, Preminger GM. Long-term lemonade based dietary manipulation in patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *J Urol.* 2007 Apr;177(4):1358-62; discussion 62; quiz 591.
39. Khan A, Housami F, Melotti R, Timoney A, Stickler D. Strategy to control catheter encrustation with citrated drinks: a randomized crossover study. *J Urol.* 2010 Apr;183(4):1390-4.
40. Aras B, Kalfazade N, Tugcu V, Kemahli E, Ozbay B, Polat H, et al. Can lemon juice be an alternative to potassium citrate in the treatment of urinary calcium stones in patients with hypocitraturia? A prospective randomized study. *Urol Res.* 2008 Dec;36(6):313-7.

41. Odvina CV. Comparative value of orange juice versus lemonade in reducing stone-forming risk. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;1(6):1269-74.
42. Wabner CL, Pak CY. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. *J Urol*. 1993 Jun;149(6):1405-8.
43. Gettman MT, Ogan K, Brinkley LJ, Adams-Huet B, Pak CY, Pearle MS. Effect of cranberry juice consumption on urinary stone risk factors. *J Urol*. 2005 Aug;174(2):590-4; quiz 801.
44. McHarg T, Rodgers A, Charlton K. Influence of cranberry juice on the urinary risk factors for calcium oxalate kidney stone formation. *BJU Int*. 2003 Nov;92(7):765-8.
45. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*. 1994 Jan;45(1):48-57.
46. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986 Nov 20;94(1-2):57-63.
47. Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. xiii, 726 p. p.
48. Shirakawa F, Mizel SB. In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol*. 1989 Jun;9(6):2424-30.
49. Harlow E, Lane D. Bradford assay. *CSH Protoc*. 2006;2006(6).
50. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003 Mar;329(1-2):23-38.
51. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999 Sep;27(5-6):612-6.
52. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*. 2011;24(7):1043-8.
53. Bai J, Cederbaum AI. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4660-7.
54. Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M, et al. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost*. 1997 Apr;77(4):772-82.

55. Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R. The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* 2005 Sep 12;579(22):5079-83.
56. Jourdain GW, Dean L, Roseman S. The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem.* 1971 Jan 25;246(2):430-5.
57. Peruzzo B, Rodriguez EM. Light and electron microscopical demonstration of concanavalin A and wheat-germ agglutinin binding sites by use of antibodies against the lectin or its label (peroxidase). *Histochemistry.* 1989;92(6):505-13.
58. Taraszewska A, Matyja E. Lectin binding pattern in meningiomas of various histological subtypes. *Folia Neuropathol.* 2007;45(1):9-18.
59. Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Oxalate is toxic to renal tubular cells only at supraphysiologic concentrations. *Kidney Int.* 2005 Oct;68(4):1660-9.
60. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000 May 15;28(10):1456-62.
61. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14.
62. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006 Apr;52(4):601-23.
63. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
64. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I(kappa)B-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science.* 2002 Nov 8;298(5596):1241-5.
65. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
66. Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science.* 2005 Sep 16;309(5742):1854-7.
67. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature.* 1998 Nov 5;396(6706):77-80.



68. Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 15;90(6):2532-6.
69. Scott ML, Fujita T, Liou HC, Nolan GP, Baltimore D. The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes Dev*. 1993 Jul;7(7A):1266-76.
70. Lieske JC, Toback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int*. 2001 Nov;60(5):1784-91.
71. Patel PS, Baxi BR, Adhvaryu SG, Balar DB. Evaluation of serum sialic acid, heat stable alkaline phosphatase and fucose as markers of breast carcinoma. *Anticancer Res*. 1990 Jul-Aug;10(4):1071-4.
72. Feijoo C, Paez de la Cadena M, Rodriguez-Berrocal FJ, Martinez-Zorzano VS. Sialic acid levels in serum and tissue from colorectal cancer patients. *Cancer Lett*. 1997 Jan 30;112(2):155-60.
73. Hobarth K, Hofbauer J, Fang-Kircher S. Plasma sialic acid in patients with prostate cancer. *Br J Urol*. 1993 Nov;72(5 Pt 1):621-4.
74. Akcay T, Konukoglu D, Erosenci A, Ataus S, Dirican A, Uygur C. Urinary excretion of sialic acid in patients with superficial bladder tumors. *Cancer Lett*. 1994 Apr 1;78(1-3):7-9.
75. Goswami K, Nandeeshha H, Koner BC, Nandakumar DN. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2007;10(4):356-9.
76. Kramer G, Steiner GE, Prinz-Kashani M, Bursa B, Marberger M. Cell-surface matrix proteins and sialic acids in cell-crystal adhesion; the effect of crystal binding on the viability of human CAKI-1 renal epithelial cells. *BJU Int*. 2003 Apr;91(6):554-9.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมสารเคมี

1. TNF- $\alpha$  (10 ng/mL ใน serum-free DMEM)

- เตรียม stock ของ TNF- $\alpha$  ความเข้มข้น 1000 ng/mL ละลาย TNF- $\alpha$  1 mg ใน serum-free DMEM 1 mL
- ปิเปิด stock ของ TNF- $\alpha$  10  $\mu$ L ลงใน serum-free DMEM 9.9 mL

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M ใน serum-free DMEM)

- เตรียม 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> โดยปิเปิด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ L ลงใน PBS 90  $\mu$ L
- เตรียม 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> โดยปิเปิด 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ L ลงใน PBS 990  $\mu$ L
- เตรียม 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> โดยปิเปิด 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ L ลงใน serum-free DMEM 2.85 mL

## 3. ปัสสาวะ (20 % ใน serum-free DMEM)

- กรองปัสสาวะด้วยตัวกรองขนาด 0.2 micron 25 mm (Syringe Filter) ด้วยวิธี sterile technique
- ปิเปิดปัสสาวะที่กรองแล้ว 4 mL ผสมกับ serum-free DMEM 16 mL

## 4. RIPA buffer

- ชั่ง Tris 0.6 g, NaCl 0.87 g, Sodium dodecyl sulphate 0.1 g และ Triton-X 100 ปริมาตร 1 ml
- เติมน้ำกลั่น 90 ml แล้วปรับ pH เป็น 7.4
- ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เก็บไว้ที่ 4°C
- ก่อนนำมาใช้ให้แบ่งตามปริมาตรที่ต้องการใช้จริง นำมาเติม stock phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM หมายถึง Stock PMSF สามารถเตรียมได้โดยละลาย PMSF ลงใน Propan-2-ol แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 10-20 mM เพื่อความสะดวกในการตวงเมื่อนำมาใช้

## 5. Buffer A และ Buffer C

- Buffer A: ชั่ง HEPES 23.83 mg, MgCl<sub>2</sub> 3.04 mg, KCl 7.46 mg, DTT 0.76 mg และ PMSF 0.34 mg และเติมน้ำกลั่น 10 mL

- Buffer C: ชั่ง HEPES 23.83 mg,  $MgCl_2$  1.52 mg, KCl 7.46 mg, NaCl 122.72 mg, EDTA 0.29 mg, DTT 0.38 mg, PMSF 0.17 mg และ glycerol 1.25 ml
- เติมน้ำกลั่น 5 mL

#### 6. Phosphate buffered saline (1x PBS)

- ละลาย PBS 10 เม็ด ลงในน้ำกลั่น 1 L
- นำ PBS ที่ละลายแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

#### 7. MTT solution

- เตรียม stock MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL โดยชั่ง MTT 0.025 g
- ละลายใน 1xPBS 5 ml แบ่งใส่หลอดๆ ละ 1 mL เก็บไว้ที่ -20°C
- เตรียม working MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL โดย เติม stock MTT 1 mL ลงใน serum-free DMEM 9 mL

#### 8. Dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH ใน 2 N HCl)

- เติม HCl เข้มข้น ปริมาตร 197 ml ลงในน้ำกลั่น 1 L แล้วชั่ง DNPH 1.98 g ละลายใน สารละลาย HCl ที่เตรียมไว้

#### 9. DCFH-DA solution

- เตรียม stock DCFH-DA ความเข้มข้น 50 mM โดยชั่ง DCFH-DA 0.122 g
- ละลายใน DMSO 5 ml แบ่งใส่หลอดๆ ละ 1 mL เก็บไว้ที่ -20 °C
- เตรียม working DCFH-DA ความเข้มข้น 0.5 mM โดย เติม stock DCFH 0.1 mL ลงใน serum-free DMEM 9.9 mL

#### 10. ABTS<sup>+</sup> solution

- ABTS<sup>+</sup> เป็นส่วนผสมระหว่าง 5 mM ABTS และ 2 mM AAPH ใน 1xPBS (v/v)
- ชั่ง ABTS 0.0686 g ละลายใน 1xPBS 25 mL
- ชั่ง AAPH 0.0542 g ละลายใน 1xPBS 100 mL
- ผสม ABTS และ AAPH ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปต้มที่ 68 °C 40 นาที
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นลง แล้วกรองผ่าน syringe filter 1 รอบ

#### 11. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM ใน 1xPBS)

- ปิเปต 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> มา 0.1 mL ผสมลงใน 1xPBS 0.9 mL จะได้ stock ของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- ปิเปต stock H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL ผสมลงใน 1xPBS 9.8 mL

## 12. Resorcinol (6 % ใน 44 % HCl)

- เติมน้ำ HCl 44 mL ลงในน้ำกลั่น 56 mL
- ชั่ง resorcinol 6 g และ  $\text{CuSO}_4$  0.062 g เติมน้ำลงในสารละลาย HCl

## 13. DAB-substrate solution

- เตรียม 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6 โดย ชั่ง Tris base 6.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 ml ปรับ pH 7.6 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 L
- เตรียม stock ของ DAB โดยชั่ง DAB 1 g ละลายในน้ำกลั่น 40 ml เก็บไว้ที่  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- เตรียม working ของ DAB โดย เติมน้ำ stock ของ DAB 0.2 mL และ 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{L}$  ลงใน 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6 ปริมาตร 10 ml

## 14. Towbin buffer

- ชั่ง Tris base 3 g, glycine 14.4 g, SDS 1 g และตวง methanol 200 mL
- เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 L

## 15. Tank buffer

- ชั่ง Tris base 3 g, glycine 14.4 g และ SDS 1 g ละลายในน้ำกลั่น 1 L

## 16. Stripping buffer

- ชั่ง Tris base 1.5 g, SDS 4 g และตวง  $\beta$ -mercaptoethanol 1.6 mL
- ละลายในน้ำกลั่น 100 mL
- ปรับ pH 7.6 ด้วย HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 mL

## 17. Polyacrylamide gel (10% W/v)

เตรียมเจล 2 แบบ คือ เจลชั้นล่าง resolving และเจลชั้นบน stacking โดยผสมสารเคมีเหล่านี้ตามปริมาตรที่ระบุ โดยเติม ammoniumpersulfate และ TEMED เป็นสองอย่างสุดท้าย แล้วรีบเทสารละลายใส่ในพิมพ์ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวสมบูรณ์อย่างน้อย 45 นาที

## (1) Resolving gel

สารเคมี	ปริมาณ (สำหรับเจล 2 แผ่น)
40% Acrylamide:Bisacrylamide 19:1	5 ml
1.5 M Tris-HCl buffer	5 ml
น้ำกลั่น	8.6 ml
10% SDS	200 $\mu$ L
10% (w/v) Ammoniumpersulfate	200 $\mu$ L
TEMED	20 $\mu$ L

## (2) Stacking gel

สารเคมี	ปริมาณ (สำหรับเจล 2 แผ่น)
40% Acrylamide:Bisacrylamide 19:1	1 ml
0.5 M Tris-HCl buffer	3.5 ml
น้ำกลั่น	4.9 ml
10% (w/v) SDS	100 $\mu$ L
10% (w/v) Ammoniumpersulfate	100 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L



## ภาคผนวก ค

## เอกสารรับรองโครงการวิจัย (Certificate of Approval)



COA No. 075/2013

IRB No. 517/55

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

## เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

**ชื่อโครงการ** : ผลของปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไตก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยสูตรเมฆนาผงเป็นเวลา 6 เดือน ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์บุผิวท่อไต

**เลขที่โครงการวิจัย** : -

**ผู้วิจัยหลัก** : นายเกียรติศักดิ์ วัฒนชีวะ

**สังกัดหน่วยงาน** : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

**วิธีบทวน** : คณะกรรมการเต็มชุด

**รายงานความก้าวหน้า** : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

**เอกสารรับรอง** :

1. โครงการวิจัย Version 3.0 Date 24 January 2013
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 1.0 Date 4 December 2012
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 3.0 Date 24 January 2013
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Date 7 January 2013
5. แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย Version 1.0 Date 7 January 2013
6. ประวัตินักวิจัย

ลงนาม ..... 

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์อรณพ ใจสำราญ)  
รองประธานปฏิบัติหน้าที่แทนประธาน  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

ลงนาม ..... 

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์อภิชัย วสุรัตน์)  
กรรมการและเลขานุการ  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

**วันที่รับรอง** : 31 มกราคม 2556

**วันหมดอายุ** : 30 มกราคม 2557

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)





COA No. 075/2013

IRB No. 517/55

### INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

#### Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

**Study Title** : Effects of urines from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen on oxidative stress and inflammation in renal tubular cells

**Study Code** : -

**Principal Investigator** : Mr.Kiattisak Vanijajiva

**Study Center** : Department of Biochemistry,  
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

**Review Method** : Full board

**Continuing Report** : At least once annually or submit the final report if finished.

**Document Reviewed** :

1. Protocol Version 3.0 Date 24 January 2013
2. Protocol Synopsis Version 1.0 Date 4 December 2012
3. Information sheet for research participant Version 3.0 Date 24 January 2013
4. Consent Form Version 2.0 Date 7 January 2013
5. Case Record form (CRF) Version 1.0 Date 7 January 2013
6. Principal investigator

Signature:..... Signature:.....

(Associate Professor Unnop Jaisamrarn MD, MHS) (Assistant Professor Apichai Vasuratna MD)

Vice-Chairman, Acting Chairman

Member and Assistant Secretary

The Institutional Review Board

The Institutional Review Board

**Date of Approval** : January 31, 2013

**Approval Expire Date** : January 30, 2014

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

### ภาคผนวก ง

ผลงานวิทยานิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ ในหัวข้อเรื่อง “Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen” นำเสนอแบบ Oral presentation ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ the 5<sup>th</sup> Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 14 – 18 ตุลาคม 2556 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น



#### Acceptance letter

September 10, 2013

Mr. Kiattisak Vanijajiva  
Chulalongkorn University, Thailand  
Email: Kiattisak.V@student.chula.ac.th

Dear Mr. Kiattisak Vanijajiva

On behalf of the Organizing Committee, I am pleased to inform you that your manuscript

**Title:** Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen

has been accepted for publication as a proceeding in KKU Research Journal, October, 2013, Vol. 18, Special issue, for the 5<sup>th</sup> annual conference for Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (5<sup>th</sup> ACGG) to be held from 14-18 October, 2013 at Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

Thank you and we look forward to your participation.

Sincerely,

Sopit Wongkham  
Chairman, 5<sup>th</sup> ACGG organizing committee

5<sup>th</sup> ACGG Conference Secretariat  
123 Mittrarp Highway, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University,  
Thailand, 40002. Fax/Phone: +66 43 348386 Email: [5thacgg@gmail.com](mailto:5thacgg@gmail.com).

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายเกียรติศักดิ์ วัฒนชาติชะ
วัน เดือน ปีเกิด	2 ธันวาคม 2528
สถานที่ติดต่อ	1177 หมู่ 10 ต.ช่องสามหมอ อ.แก้งคร้อ จ.ชัยภูมิ 36150
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (พ.ศ. 2548-2552)
ผลงานวิจัย	ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ: Vanijajiva K, Keawkong W, Waropastrakul S, Sirijaichingkul S, Wongpratoom W. Evaluation of SD BIOLINE Syphilis 3.0 for syphilis diagnosis. Journal of medical technology and physical therapy. 2008; 20(3): 188-94 Poster presentation: Kiattisak Vanijajiva, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Wattanachai Ungjaroenwathana, Thavorn Supaprom, Kaew Udomsirichakorn, Chanchai Boonla. Oxidative protein damage and NF-kappa B activation in renal proximal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients and healthy individuals. 52nd Annual Scientific Meeting, 18-21 June, 2013, Bangkok, Thailand. Oral presentation and proceedings: Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen. 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology, 14-18 October 2013 Khonkaen, Thailand
ทุนการศึกษา	ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่น 22
ประวัติการทำงาน	ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพญาไทศรีราชา ชลบุรี (พ.ศ. 2552-2554) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ (นอกเวลา) โรงพยาบาลเพชรเวช กรุงเทพฯ (พ.ศ. 2554-2556)