

การควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ภายใต้ภาวะเอื้อต่อการ  
เกิดนิ่ว และภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว

นางสาวณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

Regulation of NaDC-1 expression in human proximal tubular cells under lithogenic and  
anti-lithogenic condition

Miss. Natthaya Chuaypen

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ภายใต้ภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่ว และภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว
โดย	นางสาวณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. นายแพทย์. สุสินันต์ ดิษยบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์. สุสินันต์ ดิษยบุตร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ซาลิส่า หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ฐเนศพวงศ์ธรรม)

ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ: การควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ภายใต้ภาวะเอื้อต่อการเกิดนิ่ว และภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว. (Regulation of NaDC-1 expression in human proximal tubular cells under lithogenic and anti-lithogenic condition) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. นพ. วุฒิวัฒน์ ดิษยบุตร, ผ.ศ. ดร. ชาญชัย บุญหล้า, 80 หน้า.

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย โดยปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ คือ ภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะ การดูดกลับซีเทรตที่ไตอาศัยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ซึ่งแสดงออกมากที่เซลล์ท่อไตส่วนต้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับระดับซีเทรตและความเป็นกรดในปัสสาวะ รวบรวมกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวน 24 ราย เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตเพื่อศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 โดยวิธี immunohistochemistry เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง วัดค่า pH ในปัสสาวะ และวัดระดับซีเทรตในปัสสาวะด้วยวิธี HPLC ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ที่อยู่ในภาวะต่างๆ โดยวิธี Western blot ศึกษาผลของภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่วและภาวะต่อต้านการเกิดนิ่วต่อการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay วัดระดับการสร้าง reactive oxygen species (ROS) และปริมาณ protein carbonyl ใน HK-2 เซลล์ โดยวิธี DCFH-DA และ DNPH ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีการแสดงออกของ NaDC-1 สูง บริเวณด้าน apical membrane ของ proximal tubular cells แต่ไม่พบการแสดงออกบริเวณ glomerulus และหลอดเลือด และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อระดับ pH ในปัสสาวะต่ำลง แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับระดับซีเทรตในปัสสาวะ ผลการศึกษาในเซลล์ HK-2 ที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ภาวะกรด (pH 6.8) และผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตลดลง มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (pH 7.4) ความผิดปกติดังกล่าวดีขึ้นเมื่อได้รับสูตรมะนาวผง สำหรับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ในภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และภาวะกรด พบว่าสูงขึ้น และลดลงเมื่อเซลล์ในภาวะที่ได้รับผลึก COM และภาวะกรด ได้รับสูตรมะนาวผง ร่วม จากการศึกษาสรุปได้ว่า การแสดงออกของ NaDC-1 ใน HK-2 cell มีความสัมพันธ์กับความเครียดทางออกซิเดชันและความเป็นกรดในปัสสาวะ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการให้สูตรมะนาวผง นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ NaDC-1 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตโดยสัมพันธ์กับความเป็นกรดของปัสสาวะ

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อ.....  
 สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา...2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5374681230: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : NEPHROLITHIASIS/NaDC-1/ HYPOCITRATURIA/ LITHOGENIC CONDITION/ ANTI-LITHOGENIC CONDITION/ OXIDATIVE STRESS/ URINARY CITRATE/ HK-2 CELLS/ CALCIUM OXALATE MONOHYDRATE/ LIME POWDER REGIMEN

NATTAYA CHUAYPEN : REGULATION OF NaDC-1 EXPRESSION IN HUMAN PROXIMAL TUBULAR CELLS UNDER LITHOGENIC AND ANTI-LITHOGENIC CONDITION. ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, CO-ADVISORS : THASINAS DISSAYABUTRA, M.D.,Ph.D., ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., 80 pp.

Nephrolithiasis is a multifactorial condition, and one of the major risk factors hypocitraturia. The renal reabsorption of citrate is principally responsible by sodium dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1). This study aimed to investigate the expression of NaDC-1 in kidney tissues of nephrolithiasis patients and evaluate the correlation between NaDC-1 expression and urinary citrate or acidification. Twenty-four nephrolithiasis patients' kidney biopsies and twenty-four-hour urine samples were investigated. Urinary citrate level was determined by HPLC. NaDC-1 protein expression in acid-treated HK-2 cells was determined by Western blot. Viability of HK-2 cells in various conditions was determined by MTT assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyl content in conditioned HK-2 cells were determined by DCFH-DA and DNPH methods, respectively. Immunohistologically, stained NaDC-1 was detected mainly at apical membrane of proximal tubular cells in all nephrolithiasis patients, but cannot detect at glomerular region. The degree of NaDC-1 expression was inversely correlated with urine pH, and no association with urinary citrate level was observed. In HK-2 cell culture, the exposure with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acid and calcium oxalate monohydrate (COM), and acidosis (pH 6.8) resulted in decreased cell viability and increased ROS production, which could be alleviated by adding lime powder regimen (LPR). Regarding to NaDC-1, over-expression was observed in HK-2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and acidosis, and decreased expression in COM-treated cells that could not be corrected by LPR. In conclusion, NaDC-1 was principally expressed in renal proximal tubular cells of kidneys of nephrolithiasis patients, and over-expression was associated with low urine pH. HK-2 cells under oxidative stress and acidified conditions showed increased expression of NaDC-1, and ROS production, which ameliorated by LPR. Our study showed that both urinary pH and oxidative stress regulate NaDC-1 expression.

Department : ...Biochemistry..... Student's Signature.....  
Field of Study : ..Medical Biochemistry... Advisor's Signature.....  
Academic Year : .....2011..... Co-advisor's Signature.....  
Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขไขวรงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นายแพทย์. สุทธิณัฐ ดิษยบุตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำและคำสั่งสอน ตั้งแต่การทำการทดลอง รวบรวมข้อมูล การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ อีกทั้งยังให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ที่ยินดีเป็นประธานสอบ และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธนศพงศ์ธรรม ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆและอบรมสั่งสอนคุณธรรมจริยธรรมเพื่อนำมาใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ปรีชา เรืองเวชวรชัยและขอขอบพระคุณพี่ๆภาคพยาธิวิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือในการย้อมชิ้นเนื้อ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พูนลาภ ชีพสุนทร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง microplate reader ในการทำการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องถ่ายภาพ immunohistology ในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่อง การออกจดหมาย การจัดทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ และการเบิกใช้สิ่งของต่างๆ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยสอนระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง อาจารย์และพี่ๆ เพื่อนๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาและให้กำลังใจเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	5
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
1.4 สมมติฐาน.....	6
1.5 ขอบตกลงเบื้องต้น.....	6
1.6 ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	6
1.7 คำสำคัญ.....	6
1.8 คำนิยามเชิงปฏิบัติการ.....	7
1.9 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	8
1.10 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	8
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 โรคนี้ไวไต.....	9
2.2 ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไต.....	12
2.3 ความสำคัญของซิเทรต.....	13
2.4 โปรตีนขนส่ง sodium-dicarboxylate 1 (NaDC-1) .....	15
2.5 กลไกการขนส่งซิเทรตเข้าสู่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น.....	17

	หน้า
2.6 การรักษานิว.....	19
2.7 การรักษานิวด้วยมะนาวผง.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 รูปแบบของการวิจัย.....	21
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	21
3.3 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	22
3.3.1 การเก็บปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคนี้ไต.....	22
3.3.2 การศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตโดยวิธี immunohistochemistry.....	22
3.3.3 วิเคราะห์ปริมาณของซีเทรตในปัสสาวะโดยใช้เครื่อง HPLC.....	23
3.3.4 การวัดการมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้ MTT assay.....	24
3.3.5 วัดการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับ protein ในเซลล์บุท่อไตโดยวิธี Western Blot.....	26
3.3.6 การตรวจวัดระดับ ROS ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ.....	27
3.3.7 การวัดปริมาณ protein carbonyl โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay.....	28
3.3.8 การวัดปริมาณ total protein โดยวิธี dye binding method (Bradford assay).....	29
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	30
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	30
3.6 ปัญหาทางจริยธรรม.....	31
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	32
4.1 กลุ่มประชากรตัวอย่าง.....	32
4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต.....	33
4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 กับ pH ในปัสสาวะ..	38
4.4 ศึกษาความสัมพันธ์ชนิดของนิวกับระดับ pH ในปัสสาวะ.....	41
4.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 กับซีเทรตในปัสสาวะ	42
4.6 ผลการศึกษาการมีชีวิต (cell viability) ของเซลล์ HK-2.....	45



4.7 ผลการศึกษาของ COM, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> และ acid ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจาก ออกซิเดชันในเซลล์ HK-2.....	49
4.8 ผลการศึกษาระดับ protein carbonyl ใน HK-2 เซลล์.....	51
4.9 ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2.....	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	55
สรุปผลการวิจัย.....	55
อภิปรายผลการวิจัย.....	56
ข้อเสนอแนะ.....	61
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	76
ภาคผนวก ค.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	80

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปัจจัยการเกิดนิวไต.....	11
2	ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิวไต.....	33
3	แสดงข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคนิวไตแต่ละรายและผลการศึกษาการ แสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต.....	34

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลของซีเทรต.....	14
2	โครงสร้างสองมิติของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 .....	16
3	แสดงกระบวนการขนส่งซีเทรตผ่าน NaDC-1 ด้าน apical membrane และ NaDC-3 ด้าน basolateral membrane (BLM).....	18
4	แสดง chromatogram ของซีเทรตในปัสสาวะ.....	23
5	แสดง standard curve ของซีเทรต.....	24
6	หลักการการวัดการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay.....	24
7	หลักการการวัด ROS ในเซลล์โดยวิธี DCFH-DA assay.....	27
8	แสดงหลักการวัด protein carbonyl.....	28
9	แสดง standard curve ของ BSA.....	30
10	การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต.....	36
11	การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต .....	37
12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตกับระดับ pH ในปัสสาวะ.....	39
13	เปรียบเทียบระดับ pH ในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับต่ำ (low expression = 1+ รวมกับ 2+) และ กลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับสูง (high expression = 3+).....	40
14	แสดงระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยนิ่วชนิด CaOx เปรียบเทียบกับผู้ป่วยนิ่วชนิด UA .....	41
15	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตทั้ง 3 ระดับ (weak, intermediate และ high).....	42
16	แสดงระดับซีเทรตในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตต่ำและสูง.....	43
17	Scatter plots แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะในหน่วย mg/L (B) และ mg/day (A) กับระดับ pH ในปัสสาวะ .....	44
18	แสดงผลของ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ต่อ viability ของเซลล์ HK-2 เซลล์ได้รับ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	45

ภาพที่		หน้า
19	แสดง viability ของเซลล์ HK-2 เมื่ออยู่ในสภาวะต่างๆ ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง.....	46
20	แสดง viability ของเซลล์ HK-2 เมื่ออยู่ในสภาวะต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง .....	48
21	แสดงระดับ ROS production (AFU) ในเซลล์ HK-2.....	50
22	แสดงระดับ protein carbonyl ในเซลล์ HK-2 เมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ๆ.....	52
23	การแสดงผลของโปรตีน NaDC-1 โดยวิธี Western blot ในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	54

**คำย่อ**

CaCO <sub>3</sub>	calcium carbonate
CaOx	calcium oxalate
CaP	calcium phosphate
COM	calcium oxalate monohydrate
HK-2 cells	human renal proximal tubular cells
MAP	magnesium ammonium phosphate
NaDC-1	sodium-dicarboxylate cotransporter type 1
NaDC-3	sodium-dicarboxylate cotransporter type 3
ROS	reactive oxygen species
LPR	lime powder regimen
UA	uric acid

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญ

โรคนิ่วไต (nephrolithiasis) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบบ่อยทั่วโลก อุบัติการณ์โรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสัมพันธ์กับพฤติกรรมการบริโภคอาหารในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไปจากอดีต ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคนิ่วไตสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณร้อยละ 10-16 [1] นอกจากนี้ โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูง การศึกษาอัตราการกลับเป็นซ้ำหลังสลายนิ่วที่โรงพยาบาลขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 39 ภายหลังจากผ่าตัดเอานิ่วออกไปแล้ว 2 ปี [2] และการศึกษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตภาคกลางพบอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงถึงร้อยละ 25 ภายหลังจากการสลายนิ่วแล้ว 3 ปี แสดงให้เห็นว่าการเกิดนิ่วซ้ำเป็นปัญหาสำคัญของผู้ป่วยโรคนิ่วไต นอกจากนี้การเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะยังส่งผลให้ภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การทำงานของไตเสื่อมลง และอาจร้ายแรงจนถึงเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง ทำให้ทั้งผู้ป่วยและภาครัฐต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคนิ่วซ้ำสูงมาก นับว่าโรคนิ่วไตเป็นปัญหาสุขภาพที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทยเป็นอย่างยิ่ง ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไต เกี่ยวข้องทั้งความผิดปกติของปัจจัยภายใน (intrinsic factors) และความผิดปกติจากปัจจัยภายนอก รวมถึงสิ่งแวดล้อม (extrinsic factors) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมในปัสสาวะ (Metabolic abnormality หรือ metabolic risk factor) ทำให้มีสารก่อนิ่ว เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก ในปัสสาวะสูง หรือสารยับยั้งนิ่ว เช่น ซีเทรตโพแทสเซียม และแมกนีเซียม ในปัสสาวะต่ำ [3] รายงานวิจัยของ พันธุ์ทิพย์ ยังเจิมจันทร์และคณะ ในปี 2006 พบว่าภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (Hypokaliuria) เป็นปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยโรคนิ่วไตชาวไทย โดยเฉพาะผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพบบ่อยกว่าร้อยละ 90 และมากกว่าร้อยละ 70 ตามลำดับ [4] เนื่องจากซีเทรตสามารถรวมกับผลึกแคลเซียมกลายเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำและขับออกทางปัสสาวะได้ง่าย ซีเทรตจึงเป็นสารยับยั้งนิ่วที่มีศักยภาพสูงมาก (potent stone inhibitor) ดังนั้นภาวะ hypocitraturia จึงจัดเป็นปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่สำคัญที่สุดของการเกิดนิ่วซ้ำในคนไทย อย่างไรก็ตามกลไกการเกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ การดูดกลับซีเทรตซึ่งเกิดขึ้นที่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น

(renal proximal tubular cells) ทั้งด้าน brush border membrane หรือ apical membrane และด้าน basolateral membrane โดยอาศัยโปรตีนขนส่ง sodium-dicarboxylate cotransporter type 1 (NaDC-1) และ type 3 (NaDC-3) ตามลำดับ [5,6] การขนส่งซิเตรตเข้าเซลล์จะขนส่งร่วมกับ  $\text{Na}^+$  โดย NaDC-3 จะขนส่ง citrate<sup>3-</sup> จากเลือดเข้าสู่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น ขณะที่ NaDC-1 ขนส่งในรูป citrate<sup>2-</sup> เป็นส่วนใหญ่จากปัสสาวะเข้าสู่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น ดังนั้น ภาวะไตก็ตามที่ เป็นผลให้ NaDC-1 ทำงานเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ citrate<sup>2-</sup> ถูกดูดกลับเข้าเซลล์บุท่อไตด้าน apical membrane มากขึ้น ผลที่ตามมาคือซิเตรตในปัสสาวะลดลงและก่อให้เกิดภาวะ hypocitraturia การศึกษาการขนส่งซิเตรตโดยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ในหนูที่มีภาวะกรดเกิน (metabolic acidosis) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้นบริเวณเซลล์บุท่อไตด้าน apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น และการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าโปรตีน NaDC-1 มีการทำงาน (activity) สูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรด รายงานวิจัยในหนูที่เป็นนิวซึ่งมีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturic urolithic rats) พบระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA และ NaDC-1 protein สูงขึ้นเช่นเดียวกัน [7] ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต และความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 ในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตกับภาวะที่ปัสสาวะเป็นกรดหรือภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ

นอกจากผู้ป่วยโรคนี้ไตจะมีระดับซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่าในคนปกติแล้ว ผู้ป่วยยังมีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) สูงกว่าคนปกติด้วย [8] ซึ่งเชื่อว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการเกิดนิ่ว คณะผู้วิจัยได้วิจัยและพัฒนาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคนี้ไต โดยผลิตสูตรมะนาวผง (Lime powder regimen, LPR) ผลการศึกษาในผู้ป่วยโรคนี้ไต พบว่าสูตรมะนาวผงมีฤทธิ์เพิ่มระดับซิเตรตและโพแทสเซียมในปัสสาวะ (citraturic and alkalinizing actions) และสามารถลดระดับความเครียดจากออกซิเดชันได้ จึงน่าจะใช้เป็นยาป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำได้ [9]

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นภาวะที่เป็นผลมาจากความไม่สมดุลของการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมากเกินไปสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลในเซลล์จนสูญเสียหน้าที่ไป ส่งผลให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังหลอดเลือด และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ขึ้นได้ [10] รายงานการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตด้วยออกซาเลต หรือ ผลึกแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (calcium oxalate monohydrate, COM) จะทำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เพิ่มขึ้นจนทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน [11] และถ้ามีการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตมาก

ขึ้น จะส่งเสริมให้มีการติดค้างของผลึกในท่อไตสูงขึ้น ในปี 2010 รายงานการศึกษาของ Tosco และคณะ พบว่า ภาวะ acidosis สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) หรือ การเกิดอนุมูลอิสระส่งผลให้เซลล์หลายชนิดถูกทำลาย นอกจากนั้นยังสร้าง ROS ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบอีกด้วย [12] นอกจากนี้การศึกษาของ Stelmashuk และคณะ พบว่าภาวะกรด (pH 6.5 และ pH 6.0) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้เซลล์ (cerebellar granule cells) มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (pH 7.2) [13] งานวิจัยของ Rustom และคณะ พบว่าภาวะกรด pH 6.7 ส่งผลให้ระดับ glutathione ในเซลล์ (LLC-PK1 cells) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (pH 7.4) [14] และจากการศึกษาของ Srinivasan และคณะ พบว่าระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคนี้ไต่สูงกว่าคนสุขภาพดี [15] รายงานการศึกษาของ Lo และคณะ ในเซลล์ MDCK พบว่า  $H_2O_2$  ส่งผลให้ระดับ ROS สูงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น [16] เนื่องจากภาวะเป็นกรดกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุผิวท่อไตมากขึ้น และภาวะเป็นกรดทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชันหรือมี ROS สูงขึ้น นอกจากนี้มีรายงานการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายยีนผ่านทาง ROS [17,18,19] ดังนั้น จึงน่าสนใจที่จะศึกษาว่า กรดกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ผ่านทาง ROS หรือเป็น ROS-mediated mechanism หรือไม่

นอกจากสมมุติฐานที่เสนอว่าการแสดงออกของ NaDC-1 น่าจะผ่านทาง ROS (ROS-mediated gene expression) แล้วยังมีรายงานการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกที่มากขึ้น (overexpression) ของ NaDC-1 จะทำให้ ซีเทรตถูกขนส่งเข้าเซลล์ ไปยังสู่มิตochondria เพื่อผลิตพลังงานมากขึ้น ในกระบวนการการผลิตพลังงานจากไมโทคอนเดรีย (electron transport chain) มักเกิดผลผลิตที่ควบคู่กันมาคือ ROS แต่ในภาวะปกติร่างกายมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นในภาวะที่ปัสสาวะเป็นกรดหรือภาวะที่ร่างกายขาดพลังงาน protons จะไปกระตุ้น ATP citrate lyase และ mitochondrial aconitase enzymes ในไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้ซีเทรตภายในเซลล์ถูกนำไปใช้ผลิตพลังงานมากขึ้น [20] อีกทางหนึ่งหากซีเทรตภายในเซลล์ลดลง NaDC-1 ก็จะถูกดูดกลับซีเทรตเข้าสู่เซลล์มากขึ้น ทำให้เกิดภาวะ hypocitraturia นอกจากนี้การทำงานที่มากขึ้นของ NaDC-1 จึงน่าจะทำให้เซลล์ผลิต ROS มากขึ้น และส่งผลให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้เช่นกัน

ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต่ น่าจะสูงและมีความสัมพันธ์กับภาวะกรดในปัสสาวะ และการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (HK-2 cells) ในภาวะที่เชื้อต่อการเกิดโรค ได้แก่ ภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM หรือ  $H_2O_2$  หรือ low pH 6.8 จะเพิ่มขึ้นสูงกว่าในเซลล์บุท่อไตในภาวะปกติ ขณะที่ภาวะ



ต่อต้านการเกิดเนื้องอก (ภาวะที่เซลล์ได้รับสูตรมะนาวผง) น่าจะสามารถลดการแสดงออกของ NaDC-1 ได้ ผู้วิจัยคาดว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ NaDC-1 และสูตรมะนาวผงซึ่งสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ น่าจะทำให้การแสดงออกของ NaDC-1 ลดลง ซึ่งจะส่งผลให้มีการขับซีเทรตออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น

### คำถามการวิจัย (Research questions)

1. การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเป็นอย่างไร
2. การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตมีความสัมพันธ์กับระดับ pH และซีเทรตในปัสสาวะหรือไม่
3. สภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่ ภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM หรือ  $H_2O_2$  หรือ low pH 6.8 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ได้หรือไม่
4. การกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ผ่านทาง ROS หรือไม่
5. สูตรมะนาวผง (LPR) สามารถยับยั้งหรือลดการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ที่อยู่ภายใต้สภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่วได้หรือไม่

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตกับและระดับ pH และซีเทรตในปัสสาวะ
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ภายใต้สภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่ ภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยผลึก COM หรือ  $H_2O_2$  หรือ low pH 6.8
4. เพื่อศึกษาผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชันต่อปริมาณการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2
5. เพื่อศึกษาผลของ LPR ต่อการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ที่อยู่ภายใต้สภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่ว

### สมมุติฐานการวิจัย (Hypotheses)

1. การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับที่แตกต่างกันในแต่ละคน
2. ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไตน่าจะมีความสัมพันธ์กับระดับ pH และซีเทรตในปัสสาวะ
3. การแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ภายใต้สภาวะเอื้อต่อการเกิดนี้ว น่าจะเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับในสภาวะปกติ
4. การแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 น่าจะเกี่ยวข้องหรือถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชัน หรือ ROS (ROS-induced gene expression)
5. สูตรระบรวมน่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง ROS และการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ที่อยู่ในสภาวะเอื้อต่อการเกิดนี้ว

### ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumptions)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำ

### ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitations)

เนื่องจากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้ อาจจะไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลที่เกิดขึ้นได้ในมนุษย์โดยตรง ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับโปรตีน โดยไม่ได้ศึกษาถึงกลไกในการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 โดยตรง

ศึกษาในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไต โดยไม่มีเนื้อเยื่อไตของคนสุขภาพดีที่จะนำมาใช้ในกลุ่มควบคุม

### คำสำคัญ (Keywords)

Nephrolithiasis, kidney stone, NaDC-1, hypocitraturia, lithogenic, oxidative stress, ROS, acidosis, urinary citrate, HK-2 cell, calcium oxalate monohydrate, lime powder regimen

## คำนิยามเชิงปฏิบัติการ (Operational Definitions)

- Nephrolithiasis หรือ Kidney stone หรือ Renal stone คือ โรคนิ่วในไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งที่สูงกว่าหลอดกรวยไต (renal pelvis) ขึ้นไป
- NaDC-1 คือ โปรตีนขนส่ง sodium-dependent dicarboxylate transporter มีบทบาทในการขนส่งซิเตรตเข้าสู่เซลล์บุท่อไต พบที่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น บริเวณเยื่อด้านที่สัมผัสกับปัสสาวะ (apical membrane)
- Hypocitraturia คือ ภาวะที่มีซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 320 mg/day ในชาวตะวันตก หรือ ภาวะที่มีซิเตรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 mg/day ในคนไทย
- Lithogenic condition คือ ภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่ว เป็นภาวะที่มีสารก่อนิ่วและผลึกสูง เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก และผลึกแคลเซียมออกซาเลต เป็นต้น
- Anti-lithogenic condition คือ ภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว เป็นภาวะที่มีสารยับยั้งนิ่วสูง เช่น ซิเตรต แมกนีเซียม ไพรอเฟสเฟต ยาโพแทสเซียมซิเตรต สารต้านอนุมูลอิสระ และมะนาวผง เป็นต้น
- Oxidative stress หรือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา
- Urinary citrate คือ ปริมาณซิเตรตในปัสสาวะ
- HK-2 Cells คือ cell line ของเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (human renal proximal tubular cells) จากมนุษย์
- Calcium oxalate monohydrate (COM) คือ สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วย แคลเซียม ออกซาเลต และ น้ำ อย่างละ 1 โมเลกุล
- Lime powder regimen (LPR) คือ สูตรมะนาวผง ที่คิดค้นโดย ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชาติ ไชยสวัสดิ์ และผลิตที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยแปรรูปน้ำมะนาว และเติมสารให้มีอัตราส่วนโพแทสเซียมให้ได้ 21 mEq และซิเตรต 63 mEq ต่อซอง (5 กรัม) และทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method)

### ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Anticipated outcomes)

1. ทราบการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตกับระดับ pH และซีเทรตในปัสสาวะ
3. ทราบถึงระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุท่อไตส่วนต้นในภาวะเอื้อต่อการเกิดนิ่วและในภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว
4. ทราบกลไกการควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุท่อไตส่วนต้นโดย oxidative stress
5. ทราบถึงผลของสูตรมะนาวต่อการแสดงออกของ NaDC-1 ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้นในภาวะเอื้อต่อการเกิดนิ่ว
6. เป็นหลักฐานการยืนยันกลไกการเกิดนิ่วในระดับโมเลกุลสำหรับการหาวิธีป้องกันหรือลดภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะ เพื่อลดการเกิดโรคไต

### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดำเนินการเก็บตัวอย่างเซลล์ เตรียมเนื้อเยื่อไตและเก็บปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต
3. ตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตและในเซลล์ วิเคราะห์ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน
4. วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย เขียนรายงานผลการวิจัย
5. จัดทำบทความวิจัยจากบางส่วนของวิทยานิพนธ์ เพื่อตีพิมพ์และนำเสนอผลงานวิจัย

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### โรคนิ่วไต (Kidney stone disease หรือ nephrolithiasis)

นิ่วไต เกิดจากการตกตะกอนเป็นผลึก (crystallization) ของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำในทางเดินปัสสาวะ โดยผลึกเล็กๆ จะรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ และเกิดภาวะแทรกซ้อนจากก้อน (mass effect) อันได้แก่ การกีดขวางเนื้อเยื่อ หรืออุดกั้นช่องทางผ่านปัสสาวะ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วไตที่สำคัญ คือ การมีปริมาณของสารก่อนิ่วไตในปัสสาวะสูง อันได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต และยูเรต ทำให้สามารถรวมตัวกันเป็นตะกอนได้ง่ายขึ้น

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลกและมีแนวโน้มจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ประเทศในแถบยุโรปพบอุบัติการณ์การเกิดร้อยละ 5-9 อเมริกาเหนือร้อยละ 13 เอเชียร้อยละ 1-5 [21] และประเทศไทยพบอุบัติการณ์เกิดประมาณร้อยละ 2-16.9 [22] ซึ่งพบอุบัติการณ์สูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคนิ่วไตร้อยละ 26-53 ใน 10 ปี [23] และร้อยละ 75 ภายใน 20 ปี [24,25] การรักษาประกอบด้วยทำให้ยาละลายนิ่ว การสลายนิ่ว (lithotripsy) หรือการผ่าตัด (surgery) มีการศึกษาอัตราการกลับเป็นซ้ำหลังสลายนิ่วที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีผู้ป่วยจากทั่วประเทศพบอัตราการกลับเป็นซ้ำหลังสลายนิ่วสูงถึงร้อยละ 25 ภายหลังจากสลายนิ่วแล้ว 3 ปี และที่โรงพยาบาลขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 39 ภายหลังจากการผ่าตัดเอานิ่วออกไปแล้ว 2 ปี [2]

นิ่วไตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของก้อนนิ่ว คือ

1. นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟตหรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก ซึ่งพบมากที่สุดประมาณร้อยละ 70-80 [26] รายงานวิจัยพบว่าชนิดของนิ่วที่พบมากที่สุดทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต [1, 27] และผลึกนิ่วที่พบมากที่สุดที่เป็นองค์ประกอบของก้อนนิ่ว คือ calcium oxalate monohydrate (COM)

2. นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบพบประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และนิ่วซีสทีน เป็นต้น

นิ่วที่มีโอกาสกลับเป็นซ้ำสูงกว่านิ่วชนิดอื่น คือ นิ่วกรดยูริก และนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต

ปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดนิ่วไต คือ การมีสารก่อนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และกรดยูริก ในปัสสาวะสูงเกินกว่าระดับสารยับยั้งนิ่วจะต้านทานการเกิดนิ่วได้ ร่วมกับปัจจัยเสริมคือ ปริมาตรของปัสสาวะน้อย [4] ส่งผลให้เกิดภาวะอิ่มตัวของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ (supersaturation) จึงเกิดการตกผลึกที่ไม่ละลายน้ำขึ้น (crystallization) เช่น ผลึกแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) และผลึกแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) [28, 29] การตกผลึก (crystal nucleation) ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและการตายของเซลล์บุท่อไต ตำแหน่งที่ถูกทำลายนี้จะเป็นพื้นที่ให้ผลึกนิ่วเกาะยึด (crystal adherence) ผลึกมีขนาดโตขึ้น (crystal growth) เรื่อยๆ จากนั้นผลึกจะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม (crystal aggregation) จนในที่สุดกลุ่มผลึกจะติดค้างอยู่ในทางเดินปัสสาวะ (crystal retention) เกิดการสะสมของผลึกนิ่วเป็นเวลานานจนกลายเป็นก้อนนิ่วได้ในที่สุด ในคนปกติที่มีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะสูงเพียงพอจะสามารถยับยั้งการก่อตัวของผลึกนิ่วได้ โดยสารเหล่านี้จะไปแย่งจับกับสารก่อนิ่ว เช่น ซิเทรตจับกับแคลเซียม หรือแมกนีเซียมจับกับออกซาเลต ทำให้เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี และขับออกไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะ ทำให้ปริมาณสารก่อนิ่วในปัสสาวะลดลง และไม่สามารถรวมตัวกันเป็นผลึกนิ่วได้

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นการเกิดนิ่วสามารถเกิดได้จากปัจจัยหลายประการ อาทิ เช่น ปัจจัยภายใน ปัจจัยภายนอก และปัจจัยอื่นๆ (ตารางที่ 1) รวมถึงภาวะสมดุลของกรดต่างๆ ที่ผิดปกติ มีความสำคัญอย่างมากในการก่อนิ่ว ซึ่งอาจพบความผิดปกติภาวะเดียวหรือหลายภาวะร่วมกันก็ได้ [3]

ตารางที่ 1 ปัจจัยการเกิดนิ่วไต

ปัจจัยการเกิดนิ่วไต
<p><b>ปัจจัยภายใน (intrinsic factors)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- พันธุกรรม</li> <li>- เพศ (ส่วนใหญ่พบในเพศชาย)</li> <li>- อายุ</li> <li>- ดัชนีมวลกาย</li> <li>- เชื้อชาติ</li> <li>- ความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic factors)               <ul style="list-style-type: none"> <li>ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria)</li> <li>ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria)</li> <li>ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria)</li> <li>ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (hyperphosphaturia)</li> <li>ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia)</li> <li>ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria)</li> <li>ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria)</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>ปัจจัยภายนอก (extrinsic factors)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- การบริโภคอาหารและน้ำ เช่นอาหารที่มีซิเตรตต่ำหรือดื่มน้ำน้อย</li> <li>- การรับประทานยาบางชนิด</li> <li>- ภูมิอากาศ เช่น อากาศร้อน</li> <li>- อาชีพ</li> <li>- ความเครียด</li> </ul>
<p><b>ปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน</li> <li>- การอักเสบ</li> </ul>



### ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบในไต

ภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันถือเป็นภาวะที่ผิดปกติซึ่งเป็นผลมาจากความไม่สมดุลของการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยปกติร่างกายมีกระบวนการที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็ว หรือมากเกินไปร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงส่งผลต่อการเสียประสิทธิภาพการทำงานของสารชีวโมเลกุลในร่างกาย โดยทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) เพิ่มขึ้น เช่น superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เป็นต้น และทำให้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant หรือ ROS scavengers) ทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) และได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ลดลง [30] ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (DNA damage) และการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) การศึกษาผลของนิวไตต่อการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress พบว่าผลิตภัณฑ์ COM กระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) สังเคราะห์ ROS เพิ่มมากขึ้น [31] จากการศึกษาของ Cuttle และคณะพบว่า  $H_2O_2$  ส่งผลให้ % cell death ของเซลล์บุท่อไต (HK-2 and MDCK cells) สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [32] สอดคล้องกับรายงานการศึกษา  $H_2O_2$  ต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า  $H_2O_2$  ส่งผลให้เซลล์บุท่อไต (MDCK-cells) สังเคราะห์ ROS สูงขึ้นด้วยเช่นกัน [16] นอกจากนี้การศึกษากาวยกรวดในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตลดลง และยังส่งผลให้ระดับ glutathione ลดลงด้วย [13,14] ไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์คือ ไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ได้ผลิตภัณฑ์ผิดปกติจากชีวโมเลกุลอื่น อาทิเช่น protein carbonyl, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) เรียกว่าเกิด oxidative damage และเมื่อเกิด oxidative damage มากขึ้นจะส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บและตายในที่สุด ภาวะเครียดทางออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับการเกิดนิวไตเช่นกัน ดังรายงานการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบว่าผู้ป่วยโรคไตมีระดับของ 8-OHdG ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติ ซึ่งแสดงถึงการเกิด oxidative damage ของ DNA จากภาวะเครียดออกซิเดชัน และปริมาณ 8-OHdG ในปัสสาวะที่สูงขึ้นนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย [36] เกரியงและคณะ รายงานว่า ผู้ป่วยโรคไตมีระดับ N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) ในปัสสาวะ MDA ในเลือดและปัสสาวะสูง

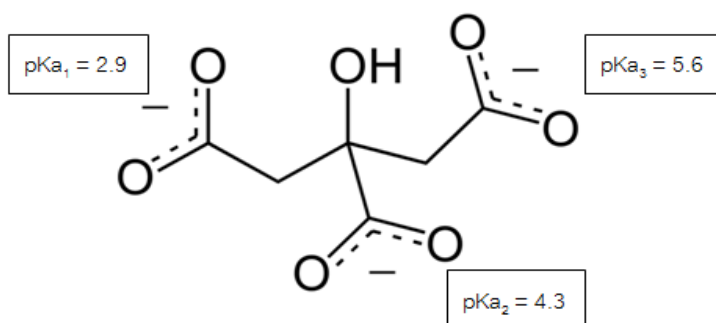
เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ขณะที่ระดับของ glutathione (GSH) และ glutathione peroxidase (GPx) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงต่ำ และระดับ protein thiol และ vitamin E ในเลือดต่ำลงด้วย [33]

ความสัมพันธ์ของความเครียดทางออกซิเดชันกับโรคหัวใจสามารถอธิบายจากการที่ผลึกนิวสามารถก่อให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมาก เกิดภาวะ oxidative stress และปฏิกิริยาการอักเสบแก่เซลล์รอบข้าง เป็นผลทำให้ชีวโมเลกุลของเซลล์ทำงานบกพร่อง เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ เป็นผลให้เซลล์สลายหลุดลอกไป เกิดเป็นช่องว่างที่ basement membrane ทำให้ความสามารถในการป้องกันผลึกนิวมาเกาะสูญเสียไป ผลึกสามารถเกาะและไม่ถูกกำจัดออกไปกับปัสสาวะ ผลึกที่ค้างอยู่นี้จะเป็นแกนให้ผลึกเล็กๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังมาเกาะ รวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่และกลายเป็นก้อนนิวในที่สุดได้

นอกจากนี้การเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันส่งผลให้เซลล์เยื่อผิวท่อไตและเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มการสังเคราะห์สารตัวกลางของการอักเสบมากขึ้น เช่น interleukin (IL-6), prostaglandin E2, osteopontin [34] และยังพบระดับ mRNA ของ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคหัวใจที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลงและเกิดการบาดเจ็บของไตเพิ่มขึ้น [35] Nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) เป็น transcription factor เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและภูมิคุ้มกันของร่างกาย เหนียวนาให้เกิดไซโตไคน์และฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต Keiichi และคณะ รายงานผลการศึกษาในเซลล์ HK-2 ที่กระตุ้นด้วยผลึกออกซาลेटพบว่า inhibitory  $\kappa$ B protein (*I $\kappa$ B*) หรือยีนที่ยับยั้งการแสดงออกของ NF- $\kappa$ B ลดลงที่เวลา 30 นาทีและ 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เกิด Osteopontin โปรตีนที่มีบทบาทในการเหนียวนาการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेटมากขึ้น จากนั้นเมื่อเติม N-acetyl-L-cysteine (NAC) แก่เซลล์ที่กระตุ้นด้วยผลึกออกซาลेट พบว่า *I $\kappa$ B* เพิ่มขึ้น ที่ 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ [36] แสดงว่าภาวะ oxidative stress กระตุ้นให้เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และส่งเสริมการอักเสบให้มากขึ้น

### ความสำคัญของซิเตรต

ซิเตรต (ภาพที่ 1) เป็นเกลือของกรดซิตริก มีน้ำหนักโมเลกุล 192 ดาลตัน ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) 3 หมู่ (tricarboxylate) และมีหมู่ไฮดรอกซี 1 หมู่ (monohydroxy) แต่ละหมู่มีการแตกตัวให้โปรตอนไม่เท่ากันคือ มีค่า  $pK_{a1} = 2.9$ ,  $pK_{a2} = 4.3$ ,  $pK_{a3} = 5.6$  เนื่องจากในพลาสมามีค่า pH 7.35-7.45 ซิเตรตจะอยู่ในรูป citrate<sup>3-</sup> ในปัสสาวะมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0-8.0 ดังนั้นซิเตรตจะอยู่ทั้งในรูป citrate<sup>3-</sup> และอยู่ในรูปที่แตกตัว คือ citrate<sup>2-</sup>



**ภาพที่ 1** แสดงถึงโครงสร้างโมเลกุลของซิเทรต มวลโมเลกุล (MW) 192 ดาลตัน ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) 3 หมู่ ซึ่งแต่ละหมู่มีค่า  $pK_a$  แตกต่างกันดังนี้  $pK_{a1} = 2.9$ ,  $pK_{a2} = 4.3$ ,  $pK_{a3} = 5.6$  และหมู่ไฮดรอกซี (OH) 1 หมู่

โดยหลักแล้วซิเทรตจะอยู่ในรูปที่จับรวมกับสารประจุบวกต่างๆ เป็น complex เช่น โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการละลายน้ำได้ดีมาก และถูกกรองผ่านโกลโมรูลัสโดยอิสระ [37] ซิเทรตในปัสสาวะที่กรองจากพลาสมาผ่านโกลโมรูลัส ประมาณร้อยละ 70 ถูกดูดกลับทางเยื่อด้าน apical membrane ที่เซลล์บุไตส่วนต้น ที่เหลือร้อยละ 30 จะถูกขับออกมาในปัสสาวะ

ซิเทรตเป็นสารตัวแรกที่สร้างขึ้นจากวัฏจักรเครบส์ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันระหว่างสารออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) กับอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ citrate synthase ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เมื่อมีซิเทรตในไมโทคอนเดรียมากและเซลล์ผลิตพลังงาน ATP เพียงพอ ซิเทรตส่วนหนึ่งจะถูกส่งเข้าสู่ไซโทพลาสซึม และถูกสลายโดยเอนไซม์ citrate lyase เป็น acetyl-CoA กับ oxaloacetate ส่วนใหญ่ของ oxaloacetate ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxylase เปลี่ยนเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างกลูโคส ส่วน acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นของการสร้างกรดไขมัน (fatty acid) และโคเลสเตอรอล [38]

ซิเทรตมีความเป็นกรดอ่อนๆ ได้รับมาจากอาหาร และถูกผลิตขึ้นภายในร่างกาย โดยผ่านวัฏจักรเครบส์ ค่าเฉลี่ยของซิเทรตที่ขับออกมาในปัสสาวะอยู่ที่ 640 mg/day ในคนสุขภาพดี [39] แต่ถ้าต่ำกว่า 320 mg/day (ค่าซิเทรตในปัสสาวะที่ใช้เป็นสากล) แสดงว่าเกิดภาวะซิเทรตต่ำในปัสสาวะ (ในคนไทย ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ คือ มีการขับซิเทรตทางปัสสาวะน้อยกว่า 200 mg/day) แสดงว่าเกิดภาวะซิเทรตต่ำในปัสสาวะ เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบมากส่วนใหญ่ในผู้ป่วยโรคนี้ทั่วโลก

ประมาณร้อยละ 40-60 [44] และพบสูงถึงร้อยละ 90 ในผู้ป่วยโรคนี้วไตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ซึ่งผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะส่วนมากจะได้รับการรักษาด้วยยาโพแทสเซียมซีเทรต เพื่อเพิ่มการขับซีเทรตออกทางปัสสาวะมากขึ้น เป็นผลให้ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้วซ้ำได้ [40] ด้วยเหตุนี้จึงมีการแนะนำให้ผู้ป่วยได้รับซีเทรตเสริม (Citrate supplementation) เช่น การรับประทานยาโพแทสเซียมซีเทรต หรือน้ำผลไม้ที่มีปริมาณซีเทรตสูง ภายหลังการรักษาทางศัลยกรรม เพื่อช่วยลดโอกาสเกิดเป็นนี้วซ้ำได้

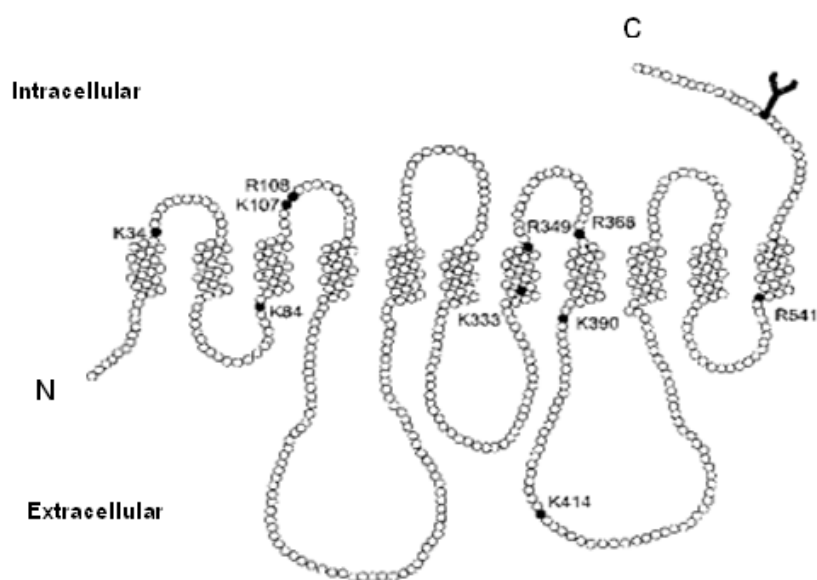
### โปรตีนขนส่ง sodium-dicarboxylate cotransporter-1 (NaDC-1)

โปรตีนขนส่งซีเทรตจัดอยู่ใน SLC13 (solute carrier13) gene family ซึ่ง SLC13 gene family เป็น sodium-coupled transporters แทรกอยู่ใน plasma membrane ประกอบด้วย ยีนสมาชิก 5 ชนิด ได้แก่ *NaS1*, *NaS2* จับกับซัลเฟต เช่น sulfate, selenate และ thiosulfate และชนิดที่เป็นตัวขนส่ง di-carboxylate และ tri-carboxylate ประกอบด้วย succinate, citrate และ  $\alpha$ -ketoglutarate ได้แก่ *NaDC-1*, *NaDC-3* และ *NaCT* [41]

โปรตีนขนส่งซีเทรตชนิด *NaDC-3* พบอยู่ทางด้าน basolateral membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น brush border membrane ของรก (placenta) ในสมองบริเวณ synaptosome และในตับ [41] แต่โปรตีนขนส่งซีเทรตที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้วไต คือ *NaDC-1* ซึ่งพบแสดงออกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) และผนังลำไส้เล็ก ซึ่งทำหน้าที่ดูดกลับซีเทรตจากปัสสาวะและดูดซีเทรตในลำไส้

ยีน *NaDC-1* ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซมที่ 17 ประกอบด้วย 12 exons ความยาวของ mRNA เท่ากับ 1952 เบส (NM\_003984) ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 593 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3) มีหน้าที่ขนส่งสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ โดยเฉพาะซีเทรตในรูป citrate<sup>2-</sup> *NaDC-1* แทรกอยู่ทางด้าน apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น และลำไส้เล็ก [42] ในภาวะปกติที่ pH ของร่างกายมีค่าประมาณ 7.35-7.45 ซีเทรตจะอยู่ในรูป tricarboxylate (citrate<sup>3-</sup>) ซึ่งจะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์บุท่อไตผ่านทางโปรตีนขนส่ง *NaDC-3* ด้วยอัตราคงที่มีค่า  $k_m$  ประมาณ 0.05-0.3mM [43] แต่ pH ในปัสสาวะอยู่ที่ประมาณ 5.0-8.0 ซีเทรตจะอยู่ทั้งในรูป citrate<sup>3-</sup> และ citrate<sup>2-</sup> ที่ pH 7.5 ซีเทรตจะถูกดูดกลับโดยเซลล์บุท่อไตด้วยอัตราคงที่มีค่า  $k_m$  ประมาณ 1.2 mM และที่ pH 5.5 ซีเทรตจะถูกดูดกลับด้วยอัตราคงที่ประมาณ 7 mM [44] ผ่านทางโปรตีนขนส่ง *NaDC-1* ร่วมกับโซเดียม ( $Na^+$ ) ในสัดส่วน 1 citrate<sup>2-</sup> : 3  $Na^+$  ผลรวมสุทธิของประจุเท่ากับประจุบวก 1 ต่อ 1 cycle [45] เป็นที่ทราบดีว่ายีน *NaDC-1* จะถูกกระตุ้นให้ทำงานเพิ่มขึ้นในสภาวะที่

เป็นกรด [7] ภาวะพร่องโพแทสเซียม (potassium depletion) [46] และภาวะอดอาหาร (starvation) [47] ในภาวะเป็นกรดในเซลล์ โปรตีนขนส่งจะทำงานเพิ่มขึ้น โดยขนส่งซิเตรตที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเข้าไมโทคอนเดรียและเข้าสู่กระบวนการ oxidative phosphorylation ได้ผลผลิตเป็นสารอนุมูลอิสระ ส่งผลทำให้ระดับ Oxidative stress สูงขึ้น อีกทั้งยังดึงเอาซิเตรตจาก tubular lumen โดยผ่านโปรตีนขนส่ง NaDC-1 บริเวณเซลล์บุท่อไตส่วนต้น กลับเข้าเซลล์มากขึ้น (reabsorption) อีกด้วย ส่งผลทำให้ซิเตรตในปัสสาวะลดลง เกิดภาวะ hypocitraturia ตามมา NaDC-1 จะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อจับกับลิเทียม (lithium) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโซเดียม โดยลิเทียมเข้าจับแทนที่โซเดียม แล้วเหนี่ยวนำให้โครงสร้างของโปรตีนขนส่งเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้การขนส่งซิเตรตถูกยับยั้งได้ [48]



**ภาพที่ 2** โครงสร้างสองมิติของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 เป็น transmembrane protein มีจำนวนกรดอะมิโน 593 ตัว และมี 11 transdomains ปลาย N- และ C-terminal อยู่บน extracellular side และ intracellular side ตามลำดับ [45]

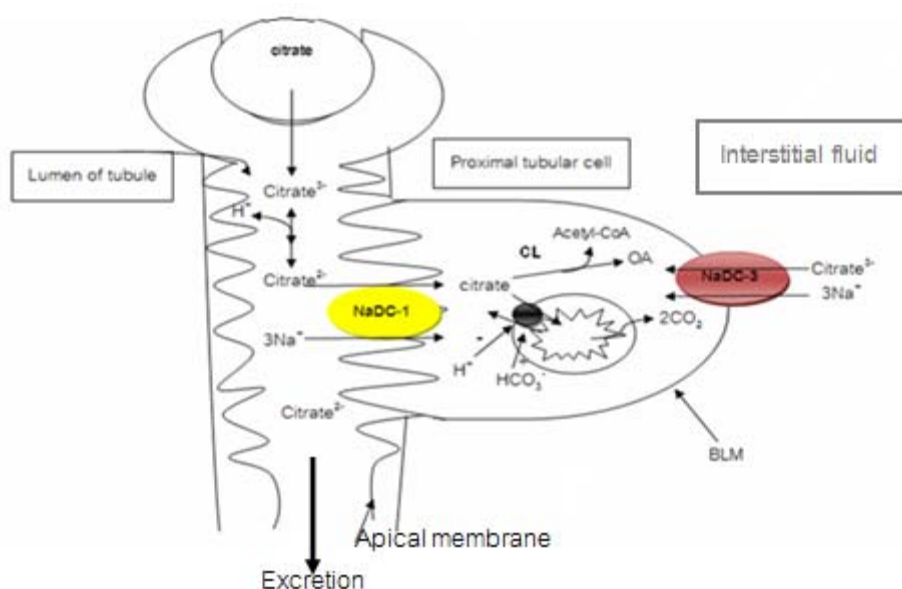
การเปลี่ยนแปลงของระดับซิเตรตในปัสสาวะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ แต่อย่างไรก็ตามค่า pH เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด ภาวะที่ pH ปกติซิเตรตยังคงอยู่ในรูป citrate<sup>3-</sup> แต่เมื่อภาวะที่มี pH ในท่อไตลดลงจะทำให้ซิเตรตเปลี่ยนเป็น citrate<sup>2-</sup> ทำให้โปรตีนขนส่ง NaDC-1 สามารถขนส่งซิเตรตกลับเข้าสู่เซลล์บุท่อไตเพิ่มขึ้น ผลก็คือซิเตรตในปัสสาวะลดต่ำลง ในทาง

กลับกันซีเทรทจะถูกขับเพิ่มขึ้นเมื่อปัสสาวะเป็นด่าง [39] ปัจจัยที่ทำให้ NaDC-1 ทำงานเพิ่มขึ้นส่งผลให้ระดับซีเทรตต่ำในปัสสาวะ ได้แก่ ภาวะร่างกายมีกรดเพิ่ม ภาวะอดอาหารและพร่องโพแทสเซียม กลุ่มอาการท้องร่วงเรื้อรัง การได้รับยาบางชนิด เช่น ยาขับปัสสาวะ acetazolamide ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carbonic anhydrase เป็นต้น ส่วนปัจจัยที่เพิ่มซีเทรตได้ในปัสสาวะคือ การรับประทานอาหารที่มีซีเทรตสูง ภาวะมีด่างเพิ่ม วิตามินดี หรือสารไดคาร์บอกซิเลตที่เป็นสารตัวกลางของวัฏจักรเครบส์เพิ่มขึ้น รวมทั้งการได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมของซีเทรตใน เช่น fluorocitrate และ hydroxycitrate เป็นต้น การศึกษาของ Cheung และคณะพบว่า เซลล์ Chinese Hamster Ovary ที่มีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* สูง และเซลล์ Human embryonic kidney 293 cell line ที่กระตุ้นด้วย ponasterone ให้อยู่ในภาวะที่มีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้น เมื่อให้สารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ พบว่า ระดับ oxidative stress สูงขึ้น [49]

### กลไกการขนส่งซีเทรตเข้าสู่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น

กระบวนการขนส่งซีเทรตแสดงในภาพที่ 3 โดย citrate<sup>3-</sup> จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์บุท่อไตในอัตราคงที่ผ่านทาง NaDC-3 ด้าน basolateral membrane ภาวะใดก็ตามที่เป็นผลให้ NaDC-1 ทำงานเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ citrate<sup>2-</sup> ถูกดูดกลับเข้าเซลล์บุท่อไตด้าน apical membrane มากขึ้น ผลที่ตามมาคือซีเทรตในปัสสาวะลดลงและก่อให้เกิดภาวะ hypocitraturia การศึกษาการขนส่งซีเทรตโดยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ในหนูที่มีภาวะกรดเกิน (metabolic acidosis) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้นบริเวณเซลล์บุท่อไตด้าน apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น และการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าโปรตีน NaDC-1 มีการทำงาน (activity) สูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรด รายงานวิจัยในหนูที่เป็นนิวซึ่งมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturic urolithic rats) พบระดับการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA และ NaDC-1 protein สูงขึ้นเช่นเดียวกัน [7] และจากการศึกษาของ Wang และคณะ พบการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแสดงออกที่ด้าน apical membrane ในขณะที่ NaDC-3 แสดงออกด้าน basolateral membrane [50] เช่นเดียวกับการวิจัยในหนูทดลอง จากการศึกษาของ Pajor และคณะ ศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ COS-7 ที่ transfect ด้วย human NaDC-1 (hNaDC-1) พบระดับการแสดงออกของ hNaDC-1 แบบ glycosylated forms ประมาณ 75 kDa และแบบ core-glycosylated forms ประมาณ 47 kDa [51] แต่ยังไม่มียางานการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างภาวะที่ปัสสาวะเป็นกรดหรือภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในมนุษย์ เพราะฉะนั้นจากรายงานวิจัยในหนูดังที่กล่าวมาจึงทำให้เชื่อได้

ว่าในสภาวะที่ NaDC-1 ทำงานเพิ่มขึ้น อาทิเช่น ความเป็นกรดในเซลล์บุท่อไตเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำได้ มีรายงานวิจัยพบว่า Lithium สามารถยับยั้งการทำงานของ NaDC-1 ในการนำสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle intermediates) เข้าสู่เซลล์บุท่อไตได้ [52] นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกและการทำงานของยีน *NaDC-1* ถูกกระตุ้นโดย cyclosporin A ส่งผลให้ผู้ป่วยที่เปลี่ยนถ่ายไตที่ได้รับยา cyclosporin A มีภาวะ hypocitraturia [53] ดังนั้นเมื่อกระบวนการดูดกลับซีเทรตผ่านทาง NaDC-1 ถูกยับยั้ง จึงส่งผลทำให้ระดับซีเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น และการแสดงออกของยีน *NaDC-1* น่าจะมีความสัมพันธ์กับระดับซีเทรตที่ขับออกทางปัสสาวะและน่าจะสัมพันธ์กับระดับ pH ในปัสสาวะ



**ภาพที่ 3** แสดงถึงกระบวนการขนส่งซีเทรตผ่าน NaDC-1 ด้าน apical membrane และ NaDC-3 ด้าน basolateral membrane (BLM) โดยการทำงานของ NaDC-1 ขนส่ง citrate<sup>2-</sup> เข้าสู่เซลล์ท่อไตส่วนต้น และถูกนำไปใช้โดยไมโทคอนเดรียเพื่อผลิต ATP ต่อไปซีเทรตบางส่วนในไซโตพลาสซึมจะถูกสลายด้วย ATP citrate lyase (CL) ได้เป็น oxaloacetate (OA) และ acetyl-CoA สำหรับนำไปใช้ในกระบวนการ gluconeogenesis และ fatty acid synthesis ตามลำดับ

## การรักษานิ้ว

การรักษาโรคนิ้วไตประกอบด้วยการรักษาโดยการผ่าตัดเอานิ้วออก หรือการให้ยาเพื่อละลายนิ้ว ลดขนาดของนิ้ว ทำให้ร่างกายสามารถขับนิ้วออกมาได้เอง ยาจะช่วยเพิ่มระดับซีเทรตในปัสสาวะจึงสามารถลดความความเสี่ยงต่อการเกิดนิ้วซ้ำได้ โดยยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษา คือ เกลือซีเทรต อาทิเช่น โฟแทสเซียมซีเทรต โฟแทสเซียมแมกนีเซียมซีเทรต โซเดียมแมกนีเซียมซีเทรต โดยพบว่าเมื่อมีการเสริมโฟแทสเซียมซีเทรตในผู้ป่วยโรคนิ้วไต ด้วยอัตราส่วนของโฟแทสเซียมที่ 42 mEq และซีเทรตที่ 63 mEq ตามลำดับ จะสามารถทำให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้นพร้อมกับเพิ่มการขับซีเทรตทางปัสสาวะได้อย่างมีนัยสำคัญ [40] นอกจากนี้รายงานการศึกษาในเซลล์หนูท่อไต ยังพบว่าซีเทรตสามารถปกป้องเซลล์หนูท่อไตจากการบาดเจ็บโดยการลดอนุมูลอิสระ และยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของไขมันที่ผิวเซลล์ได้ด้วย [54]

## การรักษานิ้วด้วยมะนาวผง (Lime powder regimen)

รายงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่พบว่า การบริโภคผลไม้และสารต้านอนุมูลอิสระนอกจากมีบทบาทต่อการรักษาโรคต่าง ๆ ทั้งโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด แล้วยังสามารถป้องกันโรคนิ้วไตได้อีกด้วยเนื่องจากในผลไม้เหล่านั้นมีทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ อันได้แก่  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin C และ flavonoids เป็นต้น นอกจากนี้ผลไม้บางชนิดยังมีซีเทรตในปริมาณสูงดังนั้นการบริโภคผลไม้ที่มีซีเทรตปริมาณสูงนั้น สามารถช่วยแก้ไขภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะได้

มะนาว (Lime, *Citrus aurantifolia* Swing) เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญของไทย ที่มีปริมาณซีเทรต (citrate) สูงมาก (4920 มิลลิกรัม/ 100 กรัม) เมื่อเทียบกับผลไม้รสเปรี้ยว (citrus fruits) ชนิดอื่น นอกจากนี้ซีเทรตแล้วในมะนาวยังประกอบด้วยเกลือแร่ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันนิ้ว เช่น โฟแทสเซียม (149 มิลลิกรัม/ 100 กรัม) และแมกนีเซียม (28 มิลลิกรัม/100 กรัม) [30] และมะนาวยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกหลายชนิด อาทิเช่น vitamin C, vitamin E, beta-carotenes, polyphenols และ flavonoids เป็นต้น ด้วยเหตุนี้มะนาวจึงถูกเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคนิ้วไต

Kang และคณะ (2007) รายงานผลการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะด้วยน้ำมะนาว โดยให้ผู้ป่วยบริโภคน้ำมะนาววันละ 2 ลิตร (โดยใช้น้ำมะนาวกล่องเข้มข้น 120 มิลลิลิตรเจือจางในน้ำเปล่าจนเป็น 2 ลิตร) เป็นเวลา 42 เดือน พบว่ามีการขับซีเทรตในปัสสาวะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 144 เทียบเท่ากับการให้ยาโฟแทสเซียมซีเทรต (40 mEq/day) [55] เช่นเดียวกับการศึกษาของ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์และคณะ ที่พบว่าผู้ป่วยที่นิ้วไตที่ผ่านการรักษาทางศัลยกรรม



เมื่อรับประทานสูตรมะนาวผง (Lime powder regimen หรือ LPR) ที่คิดค้นโดยศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ผลิตที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีโดยแปรรูปน้ำมะนาว และเติมสารให้มีอัตราส่วนโพแทสเซียมให้ได้ 21 mEq และซีเทรต 63 mEq ต่อซอง (5 กรัม) และทำให้อยู่ในรูปของผงมะนาวโดยวิธีการอบแห้งแบบแช่แข็งหรือการอบแห้งโดยการระเหิด (freeze-dried method) [9] ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสูตรมะนาวผงต่อสัตว์ทดลอง พบว่าขนาดของ LPR ที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 ( $LD_{50}$ ) ควรมีค่ามากกว่า 10.0 กรัม/กิโลกรัม และจากผลการให้ LPR พบว่าหนูกลุ่มทดลองทุกตัวหลังได้รับ LPR 3 นาที มีอาการคล้ายคลื่นไส้ และอาการเหล่านี้กลับสู่ภาวะปกติหลังได้รับตัวอย่าง 24 ชั่วโมง และหนูทุกมีชีวิตรอดจนครบกำหนด ผลการผ่าชันสูตรศพ ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหพยาธิวิทยาของหนูกลุ่มทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 3 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณซีเทรตหรือโพแทสเซียมและสารต้านอนุมูลอิสระในปัสสาวะ ลดความเสี่ยงการเกิดนิ่ว รวมถึงลดความเครียดจากออกซิเดชัน ได้อย่างมีนัยสำคัญ [9] นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการทำลายเซลล์บุท่อไตได้ และยังพบว่าสูตรมะนาวผงมีฤทธิ์ alkalinizing และ citraturic actions และสามารถยืดระยะเวลาการเกิดนิ่วซ้ำ (Recurrence-free period) และลดระดับความเครียดจากออกซิเดชันได้ [56] ส่งผลช่วยให้ไตทำงานได้ดีขึ้นเป็นข้อดีของสูตรมะนาวผงที่เหนือกว่ายาโพแทสเซียมซีเทรต ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า ผลไม้เป็นแหล่งซีเทรตธรรมชาติที่มีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิดนิ่วอย่างแท้จริง นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยสูง เพราะมะนาวเป็นผลไม้พื้นบ้านของประชากรทั่วโลก มะนาวผงจึงน่าจะสามารถใช้แทนยาโพแทสเซียมซีเทรตในการรักษาโรคไตได้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบของการวิจัย (Research design)

การศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาโดยการสังเกต (Observational descriptive study)

การศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ภายใต้สภาวะต่างๆ เป็นการวิจัยทดลองเชิงวิเคราะห์โดยการทดลอง (Experimental analytical study)

#### ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อไต (Human renal proximal tubular cells, HK-2 cells)

HK-2 เป็นเซลล์ปกติที่ได้มาจากไตส่วน proximal tubule (American Type Culture Collection (ATCC)) เลี้ยงด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (DMEM/high glucose) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% penicillin/streptomycin ใน flask สำหรับเลี้ยงเซลล์ บ่มที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> นาน 24 ชั่วโมง หรือ เพาะเลี้ยง HK-2 cell จนเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานเพาะเลี้ยง (confluent) และต้องเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุกๆ 2 วัน

2. กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Nephrolithiasis patients)

2.1 ขนาดประชากรตัวอย่าง

สไลด์เนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษาผ่าตัดเอานิ่วออก ณ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น แพทย์ศัลยกรรมทางเดินปัสสาวะที่ทำการตัดชิ้นเนื้อ คือ นายแพทย์สมบัติ บวรผดุงกิตติ และ นายแพทย์จักรพันธ์ ปรีदानนท์ จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 24 ราย เป็นเพศชายจำนวน 9 ราย (37.50%) เพศหญิงจำนวน 15 ราย (62.50%)

2.2 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

2.2.1 มีก้อนนิ่วในไตยืนยันการวินิจฉัยจากภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัดเปิดเอานิ่วออก

2.2.2 เพศชายหรือหญิงอายุ 18 ปีขึ้นไป

### 2.3 เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

2.3.1 ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไต และความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นๆ เช่น horseshoe kidneys, polycystic kidneys, ureteral/bladder calculi, neurogenic bladder, renal tubular acidosis และ any malignancies เป็นต้น

2.3.2 ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้

### การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

#### 1. วิธีการเก็บสารตัวอย่างปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะของผู้ป่วยเป็นปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยให้ผู้ป่วยปัสสาวะทิ้งในครั้งแรก และเก็บต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง จนถึงเวลาที่เริ่มเก็บครั้งแรก ตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์

2. การศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในชิ้นเนื้อไตโดยวิธี immunohistochemistry

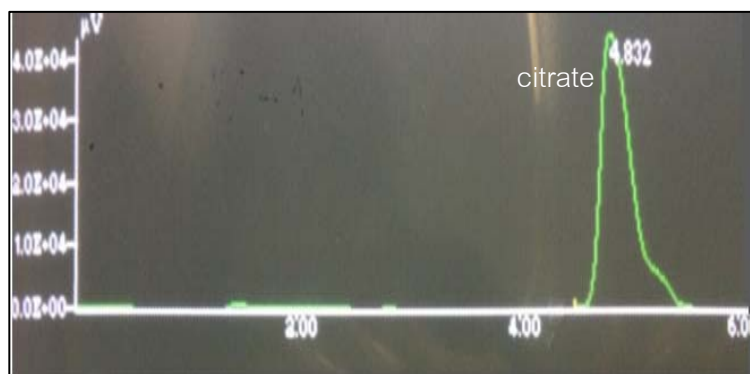
นำสไลด์ชิ้นเนื้อไตมาผ่านขั้นตอน deparaffinization ด้วย xylene จากนั้นนำมา rehydrate ด้วย serial alcohol จากความเข้มข้นสูงไปยังความเข้มข้นต่ำ ประกอบด้วย xylene 3 โถๆ ละ 5 นาที ตามด้วย Absolute alcohol 2 โถๆ ละ 3 นาที 95%, 80%, และ 70% alcohol อย่างละโถๆ ละ 3 นาที และน้ำกลั่น 3 นาที นำสไลด์ชิ้นเนื้อไตมาทำ antigen retrieval ด้วย citrate buffer pH 6.0 ใน plastic jar โดยเรียงสไลด์ใส่ใน plastic rack และเท buffer ให้ท่วมสไลด์จนเกือบเต็ม plastic jar จากนั้นนำเข้า microwave โดยใช้ความร้อน high power 3 นาที ต่อด้วย medium power 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จุ่มสไลด์ในโถ 1X PBS ทำการ block endogenous peroxidase activity โดย incubate slides ใน 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จุ่มสไลด์ในโถ 1X PBS 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที เช็ดรอบ sections และวางด้วย DAKO PEN จากนั้น block nonspecific background ในกล่องความชื้นด้วย diluents (DAKO) 10 นาที เคาะออกแล้ว incubate ด้วย rabbit polyclonal anti-SLC13A2 or NaDC-1 (GeneTex) dilution 1:2000 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4°C จากนั้นล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที incubate ด้วย secondary antibody (DAKO) ในกล่องความชื้น 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ต่อไปเป็นขั้นตอนการย้อมสีด้วย 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) ผสมกับ nickel โดยหยดลงบนชิ้นเนื้อ incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที counterstain ด้วย Mayer's hematoxylin 4-5 วินาที หรือ

nuclear fast red 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายคือการ rehydrate ด้วย serial alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง ประกอบด้วย 70%, 80%, 95% และ absolute alcohol อย่างละ 1 โถๆ ละ 3 นาที และ xylene 3 โถๆละ 3 นาที ทำการ mounting สไลด์ด้วย Consul-Mount ปิดทับชิ้นเนื้อด้วย cover slip ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง overnight

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณของซีเทรตในปัสสาวะโดยใช้เครื่อง HPLC

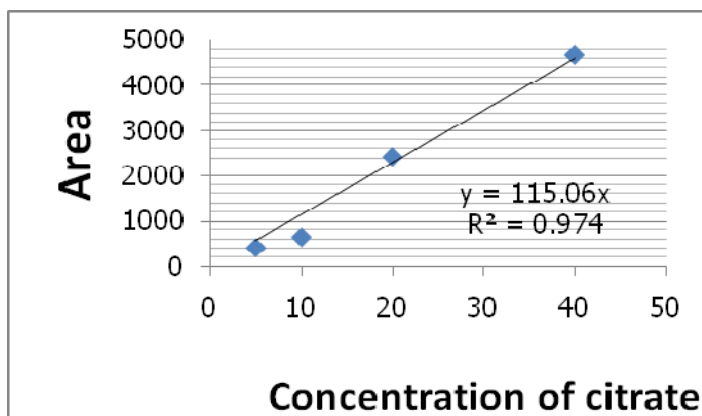
ใช้หลักการของ Khaskhali และคณะ (31) โดยการนำปัสสาวะมา 1 ml นำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่าน filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แล้วนำสารละลายส่วนใสฉีดเพื่อวิเคราะห์ซีเทรตด้วยเครื่อง HPLC (Jasco, Japan)

เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เป็น reversed-phase โดยเลือกใช้ C18 column 150x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$  (GRACE) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 25 mM potassium phosphate monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 2.5 ฉีดสารตัวอย่าง (injection volume) ที่ 20  $\mu\text{l}$  ใช้ flow rate 1ml/min เวลาที่ใช้ run แต่ละครั้งนาน 10 นาที และ retention time ของ citrate อยู่ที่ นาทีที่ 4.83 ผลที่ได้จะออกมาเป็น chromatogram (ภาพที่ 4 )



ภาพที่ 4 แสดง chromatogram ของซีเทรตในปัสสาวะ

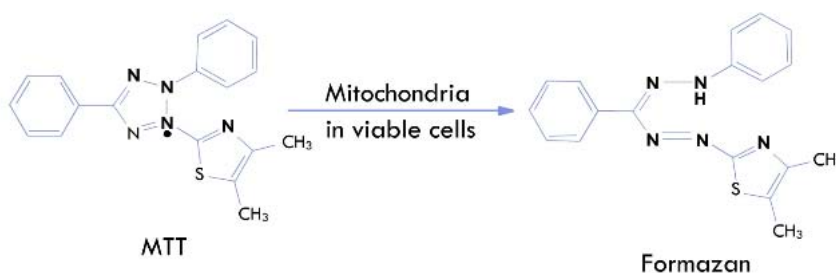
การคำนวณค่าซีเทรตโดยเปรียบเทียบจาก standard curve ในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดง standard curve ของ citrate [mM]

$$\text{Citrate [mg/L]} = \frac{\text{Area} \times \text{molecular weight (MW=192)}}{\text{Slope}}$$

#### 4. การวัดการมีชีวิตของเซลล์ โดยวิธี MTT assay



ภาพที่ 6 หลักการการวัดการมีชีวิตของเซลล์ โดยวิธี MTT assay

หลักการวัดการมีชีวิตของเซลล์วิธีนี้ เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย เช่น mitochondrial reductase, succinate dehydrogenase, ATPase ของเซลล์ที่มีชีวิต เอนไซม์ดังกล่าวนี้จะเปลี่ยน 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ไปเป็น formazan salt ที่มีสีม่วง (ภาพที่ 6)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HK-2 โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่ 10,000 เซลล์ ปมที่ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> นาน 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตเต็มจานเพาะเลี้ยง (confluence) พร้อมทั้งจะนำไป

ทำการทดลองในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 สภาวะประกอบด้วย

4.1 สภาวะปกติด้วย pH 7.4

4.2 สภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิว ที่มีทั้งหมด 3 conditions ดังนี้ คือภาวะที่กระตุ้นด้วยผลึก COM ที่ความเข้มข้น  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ให้เกิดภาวะที่มีผลึกแคลเซียมออกซาลเลตสูง, ภาวะ oxidative stress โดยกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่ความเข้มข้น  $50 \mu\text{M}$  และภาวะ acidosis โดยกระตุ้นด้วยการให้ acidic pH (pH 6.8)

4.3 สภาวะต่อต้านการเกิดนิว คือภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่  $50 \text{mg}\%$  จะได้ pH ประมาณ 7.35

4.4 ภาวะที่เอื้อต่อการนิวแต่ละ condition มาเติมสารที่ต้านการเกิดนิว มีทั้งหมด 3 conditions

4.4.1 ภาวะที่กระตุ้นด้วยผลึก COM  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  เติมสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่  $50 \text{mg}\%$

4.4.2 ภาวะที่กระตุ้นด้วย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น  $50 \mu\text{M}$  เติมสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่  $50 \text{mg}\%$

4.4.3 ภาวะ acidosis (pH 6.8) เติมสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่  $50 \text{mg}\%$

นำไปป่มที่  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  นาน 6 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ละลายใน serum-free DMEM) ลงไปหลุมละ  $100 \mu\text{l}$  นำไปป่มที่  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  นาน 2 ชั่วโมง เติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไปหลุมละ  $100 \mu\text{l}$  จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง microplate reader ที่ 570 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การคำนวณหา % cell viability คำนวณดังนี้

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

$\text{OD}_{\text{test}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้สารตัวอย่างต่างๆ

$\text{OD}_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม

## 5. วัดการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับ protein ในเซลล์บุท่อไตโดยวิธี

### Western blot

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HK-2 ใน 6-well plate โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม incubate  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  24 ชั่วโมงจนเซลล์ confluence จากนั้นทำการทดลอง 4 สภาวะเหมือนกับการทดลองในข้อ 1 นำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  6 และ 24 ชั่วโมง

### 5.2 การสกัดโปรตีนจาก HK-2 เซลล์

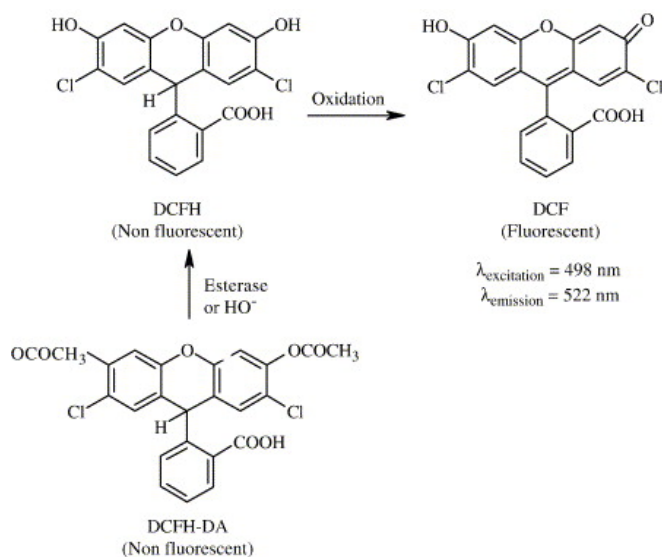
นำ HK-2 เซลล์ที่บ่มตาม condition ครบ 6 และ 24 ชั่วโมงจาก ข้อ 4 ใน 6-well plate มาทำการสกัดโปรตีนโดยใช้ RIPA Buffer + 1 mM PMSF โดยดูดอาหารที่เลี้ยงเซลล์ (DMEM) ออกจาก 6-well plate ล้างด้วย cold PBS 2 รอบ เติม RIPA Buffer + 1 mM PMSF well ละ  $150 \mu\text{l}$  ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 15 นาที (ระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งให้ swirling plate ไปด้วย) จากนั้นใช้ปิเปตค่อยๆ ดูดขึ้น-ลง ค่อยๆ ให้เซลล์มากองรวมกัน แล้วถ่ายใส่ microcentrifuge tube ใหม่ นำไป sonicate 30 วินาที ที่ 30% pulse จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $14,000 \text{ xg}$  ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลารีบถ่าย supernatant ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ นำไปเก็บที่  $-80^{\circ}\text{C}$  ทันที

5.3 การแยกโปรตีนด้วย Sodium dodecyl sulfate polyarylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมโปรตีนตัวอย่าง คือการสกัดโปรตีนที่ต้องการจากเซลล์ HK-2 จาก ข้อ 5.2 นำมาทำ gel electrophoresis เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างตามขนาดโมเลกุล โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่ 10% acrylamide เตรียม resolving gel (40% acrylamide 2.5 ml เติม 1.5 M Tris (pH 8.8) 2.5 ml เติม 10% SDS 100  $\mu\text{l}$  และ distilled water 4.3 ml) เมื่อได้ส่วนผสมดังกล่าวให้รีบเติม 10% ammonium persulphate (APS) 100  $\mu\text{l}$  และ 1,2 Bis (dimethylamino) ethane (TEMED) 10  $\mu\text{l}$  load ลงบนแผ่นกระจกสำหรับทำ SDS-PAGE ที่ทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที จากนั้นเตรียม stacking gel (40% acrylamide 0.5 ml เติม 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.75 ml เติม 10% SDS 50  $\mu\text{l}$  และ distilled water 2.45 ml) เมื่อได้ส่วนผสมดังกล่าวให้รีบเติม 10% APS 50  $\mu\text{l}$  และ TEMED 5  $\mu\text{l}$ ) load ลงบนแผ่นกระจกต่อจาก resolving gel ที่ทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที ให้เจลแข็งตัวสมบูรณ์ จากนั้นนำ SDS-PAGE ใสลงในเครื่อง Gel Electrophoresis unit ที่มี Tank buffer อยู่ นำโปรตีนที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g}$  ผสม 6x Laemmli sample buffer (1 : 5  $\mu\text{l}$  ของโปรตีน) ต้ม  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น load โปรตีนที่ได้ลง SDS-PAGE เสร็จแล้ว run electrophoresis โดยใช้กำลังไฟที่ 60 volts เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วย 130 volts เป็นเวลา 2

ชั่วโมง ต่อจากนั้นเป็นขั้นตอนการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer) โดยย้ายโปรตีนที่ผ่านการแยกจาก electrophoresis ย้ายสู่เมมเบรนที่มีประจุบวกคือ PVDF membrane (Millipore Corporation, Billerica, USA) โดยวิธี wet-transfer overnight (16 ชั่วโมงเป็นต้นไป) โดยใช้กระแสไฟที่ 40 mA เมื่อครบเวลานำ membrane มาล้างด้วย 1X TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ขั้นตอนต่อไปเป็นการ blocking คือการป้องกันการเกิด non-specific จากโปรตีนที่ไม่ต้องการโดยใช้ 5% non-fat dry milk ใน 1X TBS-T เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ membrane ที่ได้มาล้างด้วย 1X TBS-T 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที แล้ว incubate ด้วย primary antibody rabbit anti-SLC13A2 (NaDC-1)(GeneTex) dilution 1:1,000 ที่ 4°C overnight จากนั้นทำการล้าง non-specific binding ออกไปด้วย 1X TBS-T 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วใช้ Secondary antibody (peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP (dilution 1:5,000) (DAKO, Carpinteria, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง membrane ด้วย 1X TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที การวิเคราะห์ผล (Analysis) ด้วยวิธี chemiluminescent detection ด้วย ECL (Millipore Corporation, Billerica, USA) 5 นาที โดยดูการเรืองแสงและถ่ายภาพด้วยเครื่อง ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

6. การตรวจวัดระดับ ROS ในเซลล์ โดยวิธี 2',7'-Dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)



ภาพที่ 7 หลักการการวัด ROS ในเซลล์โดยวัดการเกิด fluorescent ของ 2',7'-Dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)

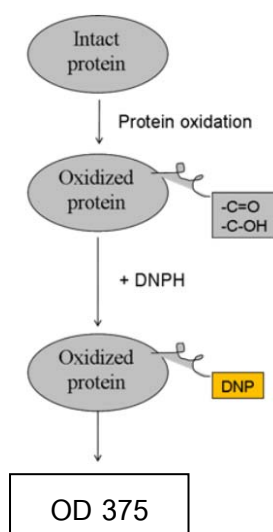


หลักการวัด ROS โดยใช้สาร DCFH-DA ที่ไม่เรืองแสง ซึมผ่านเมมเบรนเข้าสู่เซลล์ และถูกเอนไซม์ esterase เปลี่ยนเป็น DCFH เมื่อไหร่ก็ตามที่ในเซลล์มีการสร้าง ROS เกิดขึ้น DCFH จะถูกออกซิไดส์และเปลี่ยนเป็น DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสง

เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงดำขนาด 96 หลุม ( 96-well black plate) ให้ได้ประมาณ 90% confluence แล้วเติม DCFH-DA 0.1 มิลลิโมลาร์ (ละลายใน serum-free DMEM) หลุมละ 100  $\mu$ l จากนั้นใส่สารละลายที่จะทำการทดลองทั้งหมด 4 สภาวะ (ตั้งข้อที่ 1) นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37°C, 5% CO<sub>2</sub> จากนั้นนำไปวัด fluorescent intensity ด้วยเครื่อง Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Vermont, USA) โดยกำหนด excitation ที่ 485 nm และ emission ที่ 535 nm ที่เวลา 0 และ 60 นาที คำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) จากการนำค่า fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ (t<sub>x</sub>) หารด้วยค่า fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น (t<sub>0</sub>) ค่า AFU ที่สูงขึ้นแสดงถึงปริมาณการสร้าง ROS ที่มากขึ้น การคำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{AFU} = \frac{\text{fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ (t}_x\text{)}}{\text{fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น (t}_0\text{)}}$$

7. การวัดปริมาณ protein carbonyl โดยวิธี spectrophotometric 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay เป็นการวัดอนุพันธ์ของ carbonyl group คือ DNP ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงหลักการวัด protein carbonyl

นำสารสกัดโปรตีนจาก HK-2 เซลล์ในข้อ 5.2 มาเจือจาง 1:5 ด้วย 1X PBS จากนั้นนำสารโปรตีนตัวอย่างที่ได้ 30  $\mu$ l เติม 1X PBS 570  $\mu$ l ในหลอด microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยก supernatant ใส่หลอดสารตัวอย่าง (sample) 250  $\mu$ l และหลอดควบคุม (blank) 250  $\mu$ l (โดยแต่ละสารตัวอย่างจะมีหลอด blank 1 หลอด) เติม DNPH 10 mM (ละลายใน 2 N HCl) ลงในหลอดสารตัวอย่าง 1 ml และเติม 2 N HCl ในหลอด blank 1 ml นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 10 นาที หลังจากนั้นเติม cold 20% trichloroacetic acid (TCA) 1.2 ml วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูด supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยการเติม ethanol : Ethyl acetate (1:1) 2.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทำแบบนี้ซ้ำกัน 3 ครั้ง เมื่อครบครั้งที่ 3 เท supernatant ทิ้ง เติม 6 M guanidinium chloride (GdmCl) 1 ml นำไปอุ่นใน water bath ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำสารตัวอย่างมาวัด OD 375 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometry (Thermo scientific, USA)

การคำนวณค่า protein carbonyl เมื่อใช้ cuvette ขนาดความกว้าง 1 cm คำนวณได้ดังนี้

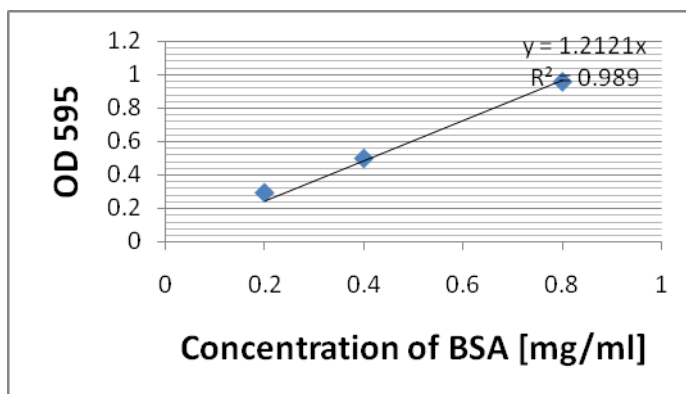
$$\text{Protein carbonyl [M]} = ((\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank sample}}) / 22,000 \text{ M}^{-1}) \times \text{dilution factor}$$

$$\text{Protein carbonyl [nmol/ml]} = ((\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank sample}}) \times 45.45 \times \text{dilution factor})$$

$$\text{Protein carbonyl [nmol/mg protein]} = \frac{\text{Protein carbonyl [nmol/ml]}}{\text{Total protein [mg/ml]}}$$

#### 8. การวัดปริมาณ total protein โดยวิธี dye binding method (Bradford assay)

เจือจาง Bradford reagent (Bio-Rad laboratories, California, USA) ในอัตราส่วน Dye 1 ส่วน : DW 4 ส่วน ปริมาตร 1.25 ml จากนั้นใส่สารตัวอย่าง 25  $\mu$ l เขย่าผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดที่ OD 595 nm คำนวณความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 9) โดยใช้ค่า OD ที่ได้หารด้วยค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน และรายงานผลในหน่วย mg/ml



ภาพที่ 9 แสดง standard curve ของ BSA [mg/ml] โดยวิธี Bradford assay

#### การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยการจดลงสมุดบันทึก บันทึกภาพ และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์

#### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล โดยแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) หรือ interquartile range (IQR) สำหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ความถี่และร้อยละสำหรับตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) โดยนำเสนอในรูปแบบของกราฟหรือตาราง
- สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูล การศึกษานี้ใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

- Kruskal-Wallis test ใช้ทดสอบความแตกต่างของตัวแปรต่อเนื่องระหว่างกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน สามกลุ่มขึ้นไป

- Mann-Whitney test ใช้ทดสอบความแตกต่างของตัวแปรต่อเนื่องระหว่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน

- Spearman rank correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวแปร

โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ STATA version 8 และ SPSS version 18.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

### ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

การวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลการทดลองโดยการนำเสนอปัจจัยเข้าไปยังสิ่งแวดล้อมของ เซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงไม่มีผลกระทบต่อปัญหาจริยธรรมในด้านความเคารพในตัวตน (Respect of person) การก่อประโยชน์และการไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/non-maleficence) และความยุติธรรม (Justice) ต่อผู้เข้าร่วมโครงการ

สำหรับการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตสำหรับการวิจัย ได้รับคำยินยอมจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่านด้วยความสมัครใจ ไม่พบปัญหาหรือภาวะแทรกซ้อนใดๆ กับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งระหว่างและภายหลังการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มประชากรตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตสำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยา

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต จำนวน 24 ราย เป็นเพศชาย จำนวน 9 ราย (37.50%) เพศหญิงจำนวน 15 ราย (62.50%) อายุตั้งแต่ 24 ถึง 73 ปี (อายุเฉลี่ย  $50.61 \pm 13.30$  ปี) มีค่า body mass index (BMI) ตั้งแต่ 17.98 ถึง  $38.81 \text{ kg/cm}^2$  (เฉลี่ย  $23.88 \pm 5.66 \text{ kg/cm}^2$ ) ปริมาตรของปัสสาวะ 24 ชั่วโมง 600-3,300 มิลลิลิตรต่อวัน (เฉลี่ย  $1,382.61 \pm 617.66$  มิลลิลิตรต่อวัน)

จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต 24 ราย สามารถระบุชนิดของนิ่วได้ 17 ราย เป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลेट จำนวน 11 ราย (65.00%) ประกอบด้วยนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेटบริสุทธิ์ (pure CaOx) จำนวน 1 ราย (5.90%) นิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेटผสมแคลเซียมฟอสเฟต (CaOx+CaP) จำนวน 7 ราย (41.40%) นิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेटผสมแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนต (CaOx+CaP+CaCO<sub>3</sub>) จำนวน 1 ราย (5.90%) นิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेटผสมนิ่วติดเชื้อหรือแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (CaOx+MAP) จำนวน 1 ราย (5.90%) นิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेटผสมแคลเซียมฟอสเฟตผสมนิ่วติดเชื้อ (CaOx+CaP+MAP) จำนวน 1 ราย (5.90%) เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) จำนวน 1 ราย (6.00%) ส่วนนิ่วที่ไม่ใช่แคลเซียม แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่มนิ่วกรดยูริก จำนวน 4 ราย (23.00%) ประกอบด้วย นิ่วกรดยูริก (UA) จำนวน 3 ราย (17.30%) นิ่วกรดยูริกผสมแคลเซียมฟอสเฟต (UA+CaP) จำนวน 1 ราย (5.70%) และ 2) กลุ่มนิ่วติดเชื้อ จำนวน 1 ราย (6.00%) และผู้ป่วยที่เหลืออีก 7 ราย ไม่สามารถระบุชนิดของนิ่วได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไต

Characteristics of patients	Frequency / Range	Mean $\pm$ SD / %
Gender (males/females)	9 / 15	
Age (years)	24-73	50.61 $\pm$ 13.30
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	17.98-38.81	23.88 $\pm$ 5.66
Urine volume (ml)	600-3300	1382.61 $\pm$ 617.66
Stone types:		
Calcium oxalate	11	65%
CaOx	1	
CaOx+CaP	7	
CaOx+CaP+CaCO <sub>3</sub>	1	
CaOx+MAP	1	
CaOx+CaP+MAP	1	
Calcium phosphate	1	6%
Uric acid stone	4	23%
UA	3	
UA+CaP	1	
Magnesium ammonium phosphate	1	6%
Unidentified	7	

MAP = แมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต, CaOx = แคลเซียมออกซาเลต, CaP = แคลเซียมฟอสเฟต, UA = กรดยูริก, CaCO<sub>3</sub> = แคลเซียมคาร์บอเนต

#### ผลการศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต

การศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตจำนวน 24 ราย โดยเทคนิคทาง immunohistochemistry ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 โดยพิจารณาจากความเข้มของการย้อมติดในเนื้อเยื่อไต โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1+ = ย้อมติดน้อยถึงน้อยมาก (weak expression, <10%) 2+ = ย้อมติดปานกลาง (intermediate expression, 10-50%) และ 3+ = ย้อมติดเข้มเห็นขอบเขตชัดเจน (high expression, >50%) (ภาพที่ 6 และ 7) ข้อมูลผู้ป่วยและผลการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตแสดงในตารางที่ 3

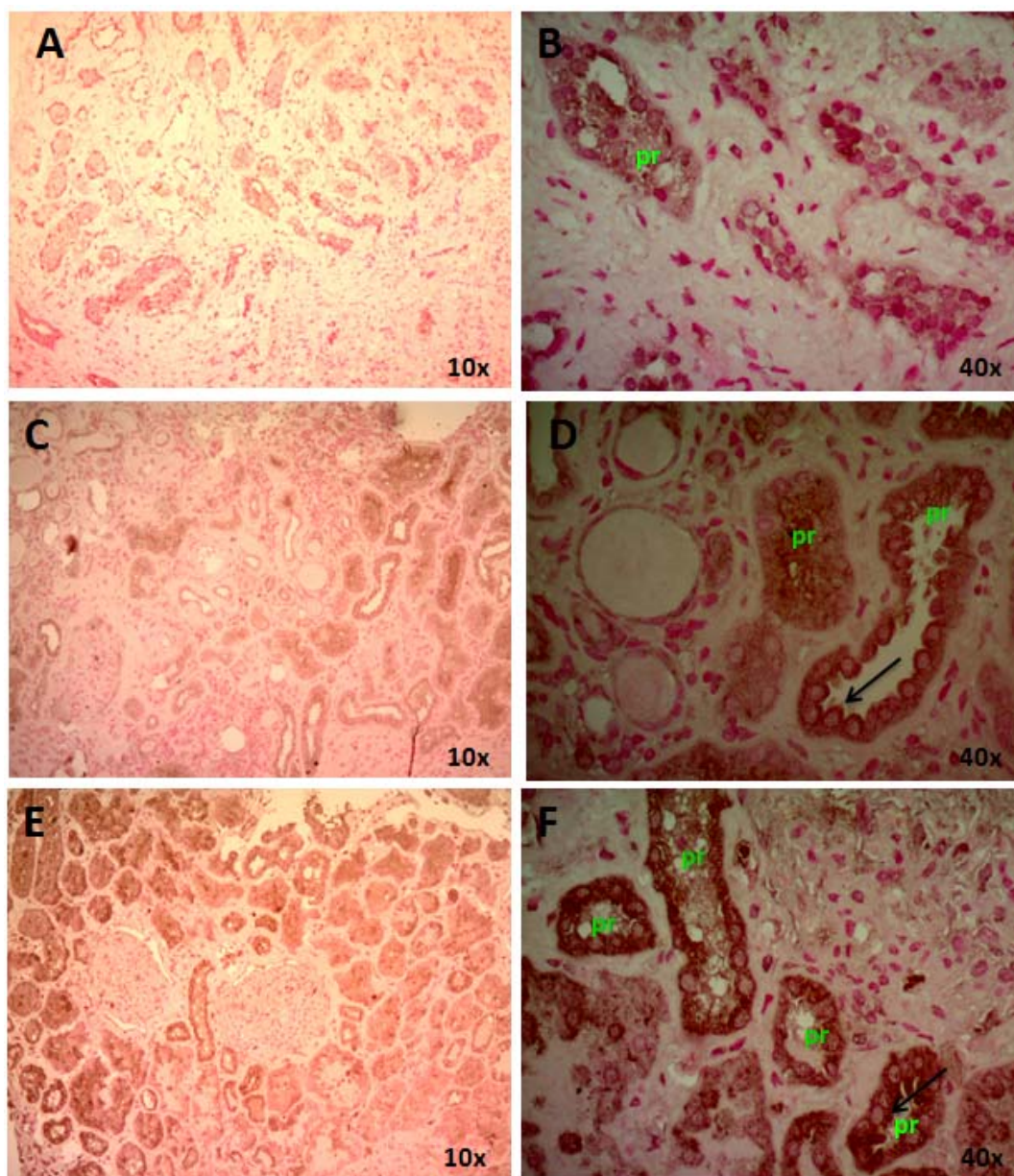
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคนิ่วไตแต่ละราย และผลการศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต

No	Cases	Age	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Stone type	U-pH	U-volume(L)	U-citrate	U-citrate (mg/day)	NaDC-1 expressio
1	RKT109	49	36.20	MAP	8.38	1.2	ND	ND	1+
2	RKT116	71	20.45	UA	7.55	0.6	545.16	327.10	2+
3	RKT117	73	24.97	ND	6.45	1.1	113.82	125.2	3+
4	RKT119	26	21.78	UA+CaP	6.9	2.1	96.49	202.63	2+
5	RKT122	40	18.92	CaP	7.37	2.7	65.19	176.02	3+
6	RKT123	41	17.98	CaOx+CaP	7.3	1	190.7	190.7	2+
7	RKT124	65	28.96	ND	6.96	1	258.82	258.82	2+
8	RKT130	53	ND	ND	5.78	0.9	604.99	544.49	3+
9	RKT134	72	15.57	CaOx+CaP	7.25	1.5	160.2	240.3	3+
10	RKT148	49	21.30	CaOx+CaP+MAP	7.18	1.2	263.12	315.74	2+
11	RKT149	48	23.11	CaOx	7.68	2.2	216.18	475.60	1+
12	RKT154	56	ND	ND	6.27	1	121.98	121.98	3+
13	RKT155	52	19.14	ND	7.05	1.2	200.41	240.49	1+
14	RKT165	53	23.81	CaOx+CaP+CaCO <sub>3</sub>	7.45	1.1	304.44	334.89	3+
15	RKT166	47	24.44	CaOx+MAP	8.1	3.3	67.08	221.37	2+
16	RKT168	54	26.22	CaOx+CaP	6.84	1.2	112.72	135.26	2+
17	RKT172	24	23.61	ND	7.02	1.2	147.09	176.50	2+
18	RKT173	58	24.75	UA	6.16	1.3	249.65	324.54	2+
19	RKT174	49	38.81	CaOx+CaP	5.96	1.2	220.52	264.62	3+
20	RKT175	36	26.63	ND	7.6	1.2	107.90	129.48	1+
21	RKT176	63	21.76	CaOx+CaP	8.18	1	552.67	552.67	1+
22	RKT177	60	37.78	UA	6.57	1.2	108.69	130.43	1+
23	RKT181	42	22.31	CaOx+CaP	7.82	1.2	92.12	110.55	2+
24	RKT182	ND	ND	CaOx+CaP	6.56	1.1	316.11	347.72	3+

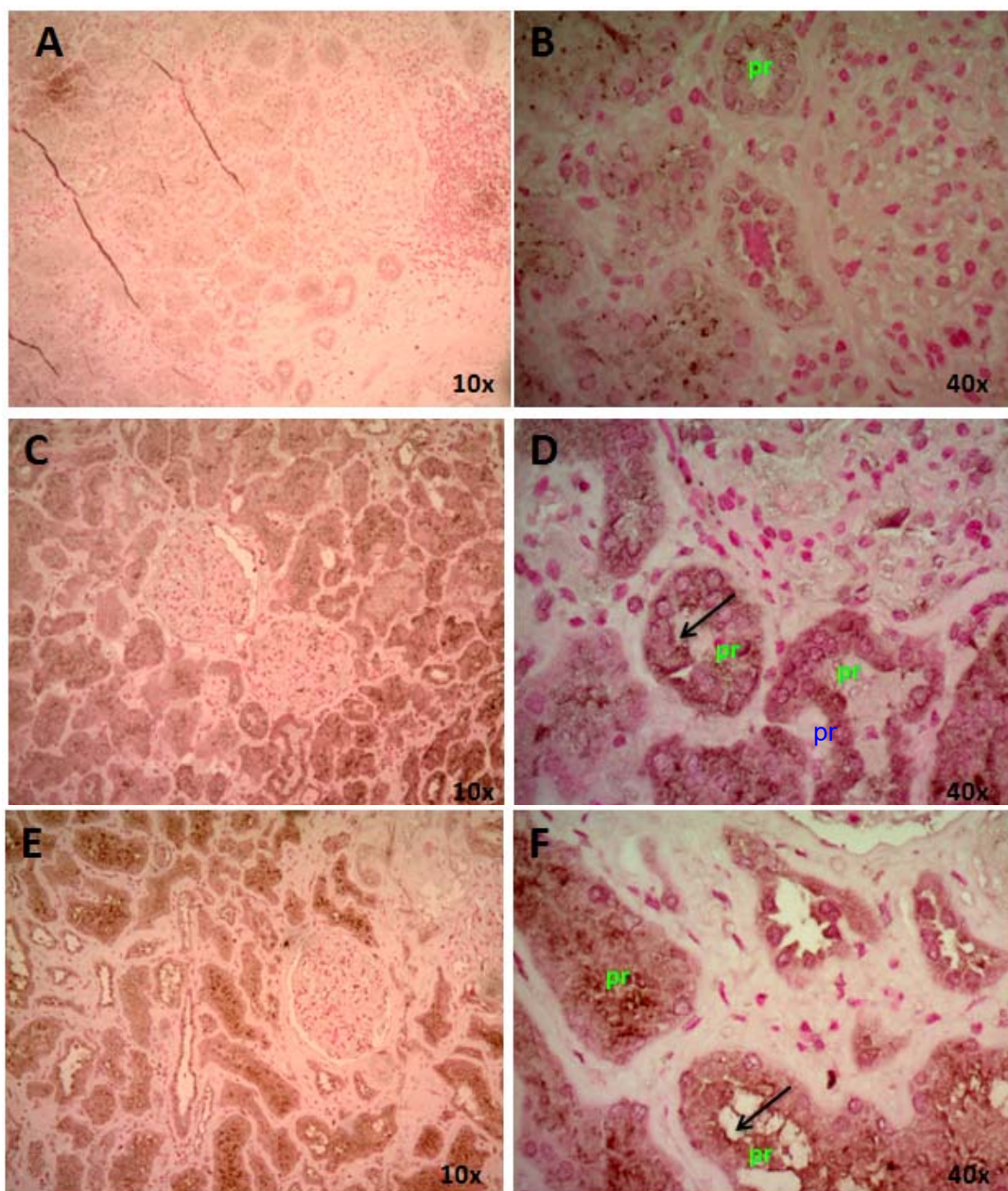
ND = ไม่มีข้อมูล, MAP = แมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต, CaOx = แคลเซียมออกซาเลต, CaP = แคลเซียมฟอสเฟต, UA = กรดยูริก, CaCO<sub>3</sub> = แคลเซียมคาร์บอเนต, 1+ = การแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับต่ำ, 2+ = การแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับปานกลาง และ 3+ = การแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับสูง

ผลการศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 พบว่าทุกตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยมีการแสดงออกของ NaDC-1 แต่แสดงออกในระดับที่ต่างกัน โดยพบการแสดงออกระดับ 1+ จำนวน 6 ราย (25.00%) บริเวณ cortex ของเนื้อไต (ภาพที่ 10A, 10B, 11A และ 11B) ตำแหน่งที่แสดงออกของ NaDC-1 คือที่เซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (proximal tubular cell หรือ pr) บริเวณผิวเซลล์ด้านปัสสาวะ (apical membrane/ apical surface staining) การแสดงออกระดับ 2+ พบจำนวน 10 ราย (41.67%) (ภาพที่ 10C, 10D, 11C และ 11D) และระดับการแสดงออก 3+ พบจำนวน 8 ราย (33.33%) (ภาพที่ 10E, 10F, 11E และ 11F) ไม่พบการแสดงออกของ NaDC-1 ที่ glomerulus หรือหลอดเลือด เนื่องจาก NaDC-1 มีการแสดงออกมากในด้าน apical membrane จึงน่าจะศึกษาความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของสารในปัสสาวะของผู้ป่วย โดยเฉพาะระดับซิทเทรต





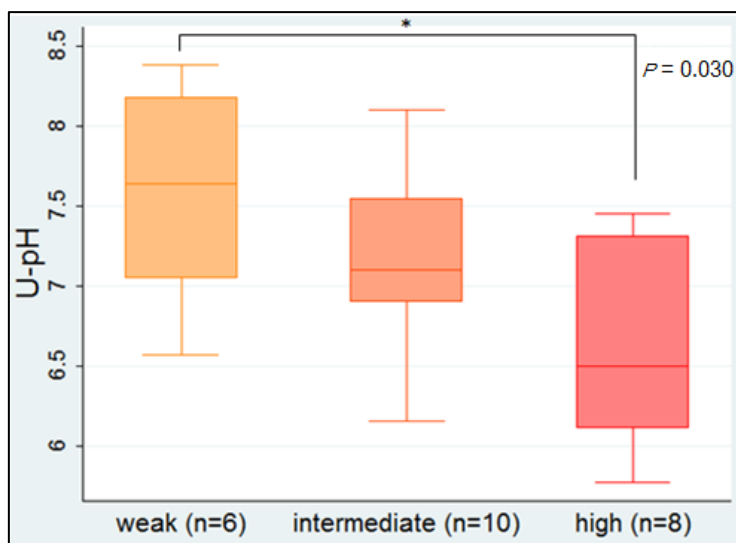
ภาพที่ 10 ตัวอย่างการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต มีการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับต่ำ หรือ weak expression รหัส case RKT175 (A และ B) แสดงออกในระดับปานกลาง หรือ intermediate expression รหัส case RKT168 (C และ D) และ แสดงออกในระดับสูง หรือ high expression รหัส case RKT130 (E และ F) โดยย้อมติดสีที่ บริเวณ apical membrane (arrows) ของ proximal tubular cell (pr) (ภาพ A, C และ E กำลังขยาย 100 เท่า, ภาพ B, D, F กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 11 ตัวอย่างการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต มีการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับต่ำ หรือ weak expression รหัส case RKT176 (A และ B) แสดงออกในระดับปานกลาง หรือ intermediate expression รหัส case RKT181 (C และ D) และ แสดงออกในระดับสูง หรือ high expression รหัส case RKT174 (E และ F) โดยย้อมติดสีที่ บริเวณ apical membrane (arrows) ของ proximal tubular cell (pr) (ภาพ A, C และ E กำลังขยาย 100 เท่า, ภาพ B, D, F กำลังขยาย 400 เท่า)

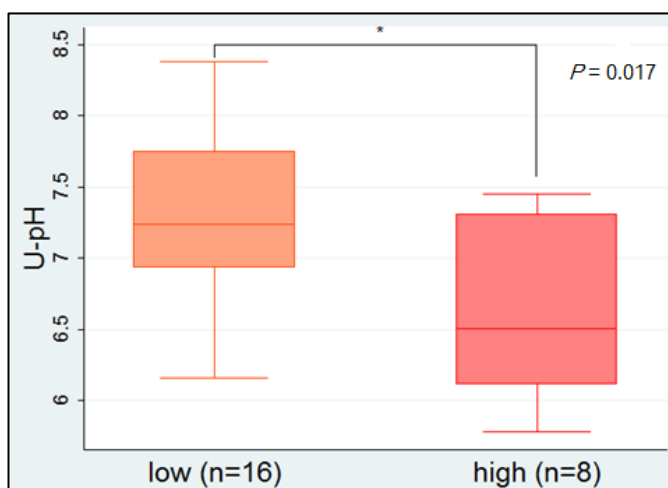
### ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 กับ pH ในปัสสาวะ

หลายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าภาวะกรดเกิน (acidosis) ส่งผลให้มีการแสดงออกของ NaDC-1 สูงขึ้นในไตของหนูทดลอง และในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าภาวะเป็นกรดสามารถกระตุ้นการทำงานของ NaDC-1 ให้เพิ่มขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้ป่วยโรคนี้ไว้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตกับค่า pH ในปัสสาวะ พบว่าระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับค่า pH ในปัสสาวะที่ต่ำลง (ภาพที่ 12) ค่า median (IQR) ของผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ต่ำ (weak) ปานกลาง (intermediate) และสูง (high) เท่ากับ 7.64 (1.13), 7.10 (0.65) และ 6.51 (1.20) ตามลำดับ (Kruskal-Wallis test,  $P = 0.047$ ) (Spearman's rho = -0.516,  $P = 0.010$ ) ระดับ pH ในปัสสาวะ median (IQR) ของผู้ป่วยผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 1+ (weak) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ pH ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 2+ (intermediate) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 3+ (high) พบว่าระดับ pH ในปัสสาวะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.030$ ) ในขณะที่ระดับ pH ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 2+ (intermediate) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 3+ (high) ดังนั้น การศึกษานี้สรุปว่า ระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ มีความสัมพันธ์กับ pH ในปัสสาวะที่ลดลง ผลการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้กับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วย



ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตกับระดับ pH ในปัสสาวะ พบว่าระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับระดับ pH ในปัสสาวะที่ลดลง (Kruskal-Wallis test,  $P = 0.047$ ) (Spearman's rho = -0.516,  $P = 0.010$ ) โดยระดับ pH ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 3+ (high) ต่ำกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น 1+ (weak) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.030$ )

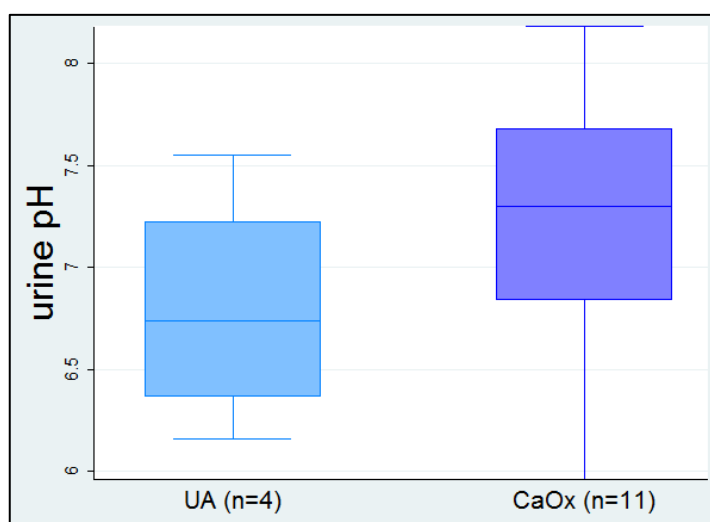
เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยใหม่ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับต่ำ (low expression = 1+ รวมกับ 2+) และ กลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับสูง (high expression = 3+) แล้วเปรียบเทียบค่า pH ในปัสสาวะพบว่า ระดับ pH ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับต่ำ มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับสูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IRQ): 7.24 (0.82) vs. 6.51 (1.20), Mann-Whitney test:  $P = 0.017$ ) ดังแสดงในภาพที่



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบระดับ pH ในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับต่ำ (low expression = 1+ รวมกับ 2+) และ กลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับสูง (high expression = 3+) ระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับสูงต่ำกว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 ระดับต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.017$ )

### ศึกษาความสัมพันธ์ของชนิดของนิ่วกับระดับ pH ในปัสสาวะ

ศึกษาระดับ pH ของปัสสาวะ ในกลุ่มตัวอย่างระหว่างนิ่ว 4 ชนิด ประกอบด้วย MAP (n=1), CaP (n=1), CaOx (n=11) และ UA (n=4) พบว่าค่า pH ในปัสสาวะ (median(IQR)) เท่ากับ 8.30(0), 7.37(0), 7.30(0.84) และ 6.74(0.86) ตามลำดับ เนื่องจากนิ่วชนิด MAP และ CaP มีจำนวนละ 1 ราย ดังนั้นจึงหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของนิ่ว CaOx และ UA กับค่า pH ในปัสสาวะ ผลการศึกษาพบว่าระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยนิ่วชนิด CaOx สูงกว่าในผู้ป่วยนิ่วชนิด UA แต่ยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.250$ ) อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างน้อย ดังแสดงในภาพที่ 14

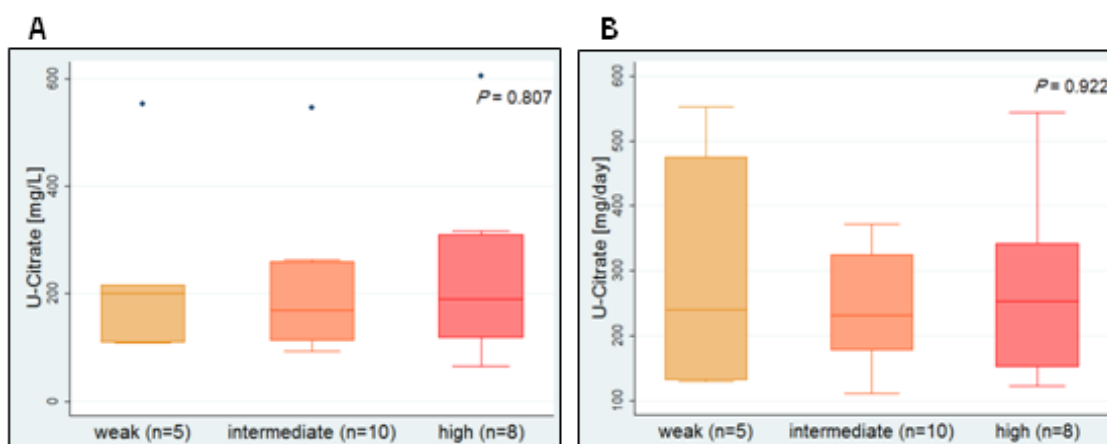


**ภาพที่ 14** แสดงระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยนิ่วชนิด CaOx เปรียบเทียบกับผู้ป่วยนิ่วชนิด UA พบแนวโน้มระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยนิ่วชนิด CaOx สูงกว่าในผู้ป่วยนิ่วชนิด UA แต่ยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.250$ )

### ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตกับระดับซีเทรตในปัสสาวะ

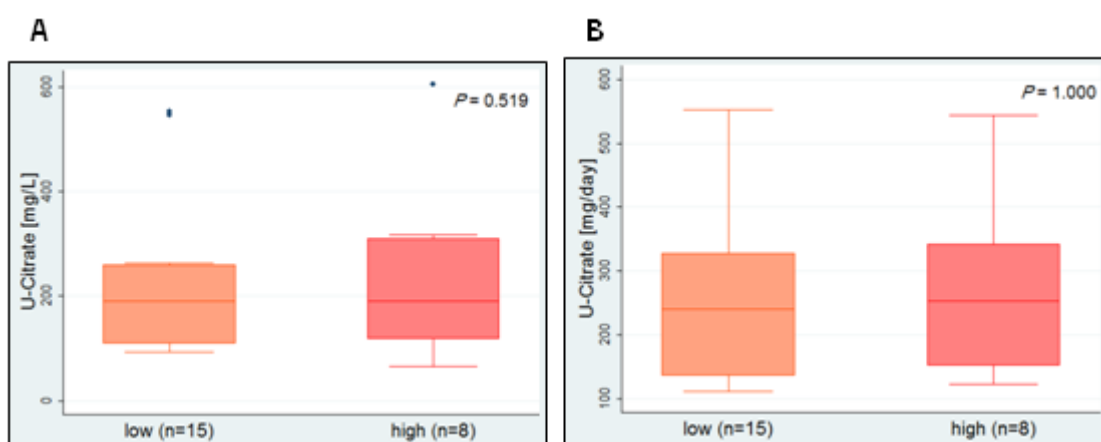
ศึกษาระดับซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตกับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต ทั้ง 3 ระดับ คือ weak, intermediate และ high (ตารางที่ 3) พบค่าความเข้มข้นของซีเทรตในปัสสาวะ medians (IQRs) ในหน่วย mg/L เท่ากับ 200.41 (107.50), 168.90 (146.35) และ 190.40 (192.38) mg/L ตามลำดับ และปริมาณการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง medians (IQRs) ในหน่วย mg/day เท่ากับ 240.49 (345.17), 230.73 (148.04) และ 252.46 (190.70) mg/day ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตทั้ง 3 ระดับ ผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ NaDC-1 กับระดับซีเทรตในปัสสาวะ ในหน่วย mg/L (ภาพที่ 15A) และหน่วย mg/day (ภาพที่ 15B) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.807$ ,  $P = 0.922$  ตามลำดับ)



ภาพที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตทั้ง 3 ระดับ (weak, intermediate และ high) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มระดับซีเทรตในปัสสาวะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในหน่วย mg/L (A) ( $P = 0.807$ ) และ mg/day (B) ( $P = 0.922$ )

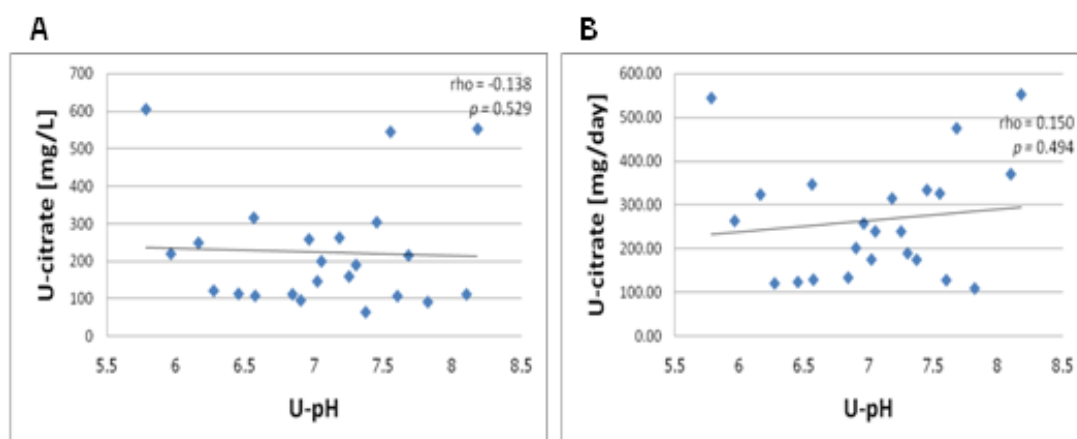
เมื่อแบ่งระดับการแสดงผลของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต เป็นกลุ่มการแสดงผลต่ำ (low) และกลุ่มที่มีการแสดงผลสูง (high) พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะ medians (IQRs) เท่ากับ 190.70 (150.13) และ 190.36 (192.38) mg/L ตามลำดับ และ 240.50 (191.84) และ 252.46 (190.70) mg/day ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะ ในหน่วย mg/L ( $P = 0.519$ ) (ภาพที่ 16A) และหน่วย mg/day ( $P = 1.000$ ) (ภาพที่ 16B) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงผลของ NaDC-1 ต่ำและสูงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 16 แสดงระดับซีเทรตในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงผลของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตต่ำและสูง พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ทั้งในหน่วย mg/L (A) ( $P = 0.519$ ) และ mg/day (B) ( $P = 1.000$ )



เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับ pH ในปัสสาวะทั้งในหน่วย mg/L (Spearman's  $\rho = -0.138$ ,  $P = 0.529$ ) และ mg/day (Spearman  $\rho = 0.150$ ,  $P = 0.494$ ) พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับ pH ในปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 17

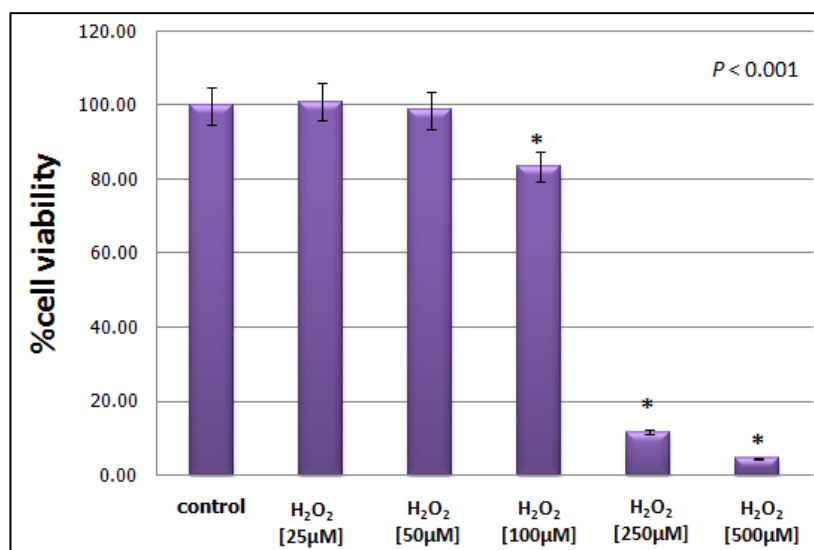


ภาพที่ 17 Scatter plots แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะในหน่วย mg/L (B) และ mg/day (A) กับระดับ pH ในปัสสาวะ พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะทั้งในหน่วย mg/L (B) และ mg/day (A) ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ pH ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### ผลการศึกษาค่าการมีชีวิต (cell viability) ของเซลล์ HK-2

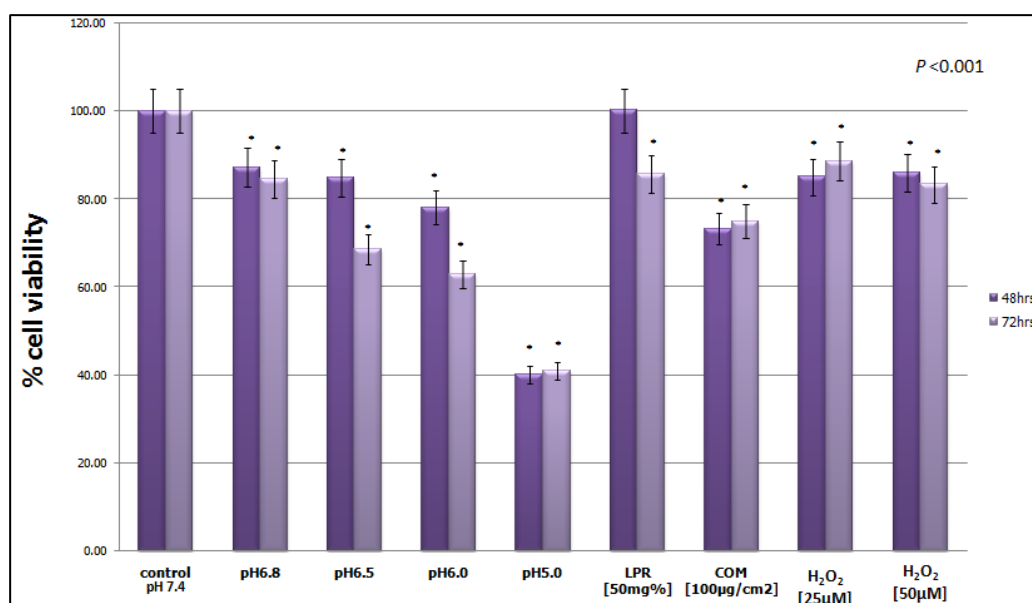
ผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่าการแสดงออกของ NaDC-1 ถูกกระตุ้นจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือไม่ จึงทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 (human renal proximal tubular cells) ภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะเป็นกรดเสมือนเกิด acidosis แล้ววัดการแสดงออกของ NaDC-1 protein และเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่จะทำการทดลองในเซลล์ HK-2 ผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของภาวะต่างในการทำการวิจัยแบบ time-dependent และ dose dependent

ผลการศึกษา  $H_2O_2$  (oxidative stress stimulating agent) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ต่อ viability ของเซลล์ HK-2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ที่ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงต่อ % cell viability แต่เมื่อความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  สูงขึ้นที่ 100, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงผลของ  $H_2O_2$  ต่อ viability ของเซลล์ HK-2 เซลล์ได้รับ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ที่ 100, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ )

ผลการศึกษากวาระกรดของอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อ viability ของเซลล์ HK-2 ที่ pH 6.8, 6.5, 6.0 และ pH 5.0 เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ตามลำดับ ผลของสูตรมะนาวผง (LPR) ที่ความเข้มข้น 50 mg% ที่เวลา 48 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการลดลงของ % cell viability แต่ที่ 72 ชั่วโมง พบว่า % cell viability เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ผลของผลึก COM ความเข้มข้น  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ตามลำดับ เช่นเดียวกัน  $\text{H}_2\text{O}_2$  ความเข้มข้น ที่ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19

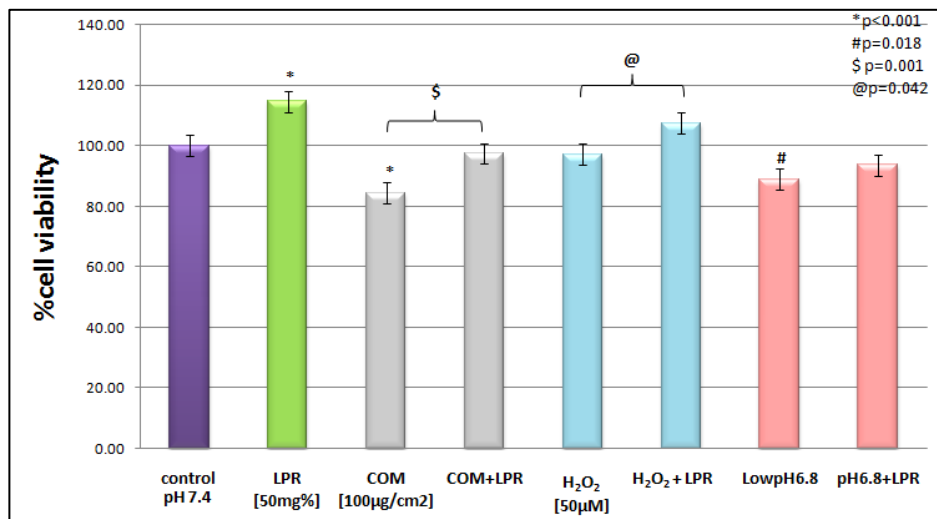


ภาพที่ 19 แสดงผลของ acid, COM, LPR และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ต่อ viability ของเซลล์ HK-2 ในภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด (pH 6.8, pH 6.5 และ pH 6.0) ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผง (Lime powder regiment or LPR) ที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับผลึก COM  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  และภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ viability ของเซลล์ HK-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (\*: ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับ controls)

จากผลการศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยออกแบบทดลอง เพื่อเปรียบเทียบผลในเซลล์ HK-2 ระหว่าง 5 สภาวะ ได้แก่ 1) สภาวะปกติ (pH 7.4) 2) สภาวะกรด (pH 6.8) 3) สภาวะที่ได้รับ ผลึก COM  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  4) สภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครโมลาร์ และ 5) สภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผง (LPR) ที่ความเข้มข้น 50 mg% ที่เวลา 6 ชั่วโมง

ผลการศึกษาสูตรมะนาวผงต่อ viability ของเซลล์ HK-2 ความเข้มข้น 50 mg% ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ผลการศึกษาผลของผลึก COM ความเข้มข้นที่  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) แต่เมื่อเซลล์ได้รับ COM  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผง 50 mg% พบว่า % cell viability เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ COM  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.001$ ) ผลการศึกษาผลของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผง 50 mg% ที่เวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ % cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ในเซลล์ที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผง 50 mg% จะมี % cell viability สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ 50 ไมโครโมลาร์เพียงอย่างเดียว ( $P = 0.042$ ) และผลการศึกษาของภาวะกรดที่ pH 6.8 ที่เวลา 6 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P = 0.018$ ) แต่ภาวะกรด pH 6.8 ที่ให้ร่วมกับสูตรมะนาวผง 50 mg% ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่า % cell viability ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่อยู่ในภาวะกรดเพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 20

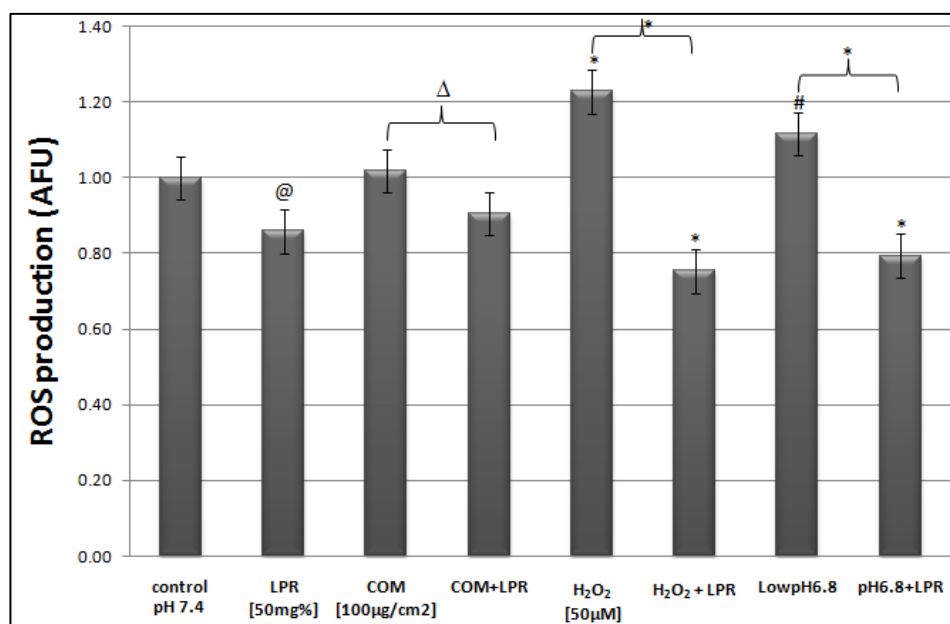
ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าผลึก COM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ acid (pH 6.8) ส่งผลให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลง และสูตรมะนาวผงสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์มีชีวิตได้ ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาต่อไปว่าสภาวะดังกล่าวส่งผลกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือไม่ แล้วส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้น



ภาพที่ 20 แสดง viability ของเซลล์ HK-2 ที่เวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างสภาวะปกติ pH 7.4 ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 50 mg% ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 50 mg% ภาวะกรด pH 6.8 และภาวะกรด pH 6.8 ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้น 50 mg% พบว่า COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ acid (pH 6.8) ส่งผลให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลง และสูตรมะนาวผงสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์มีชีวิตได้อย่างมีนัยสำคัญ

## ผลการศึกษาผลของ COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ acid ต่อการกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ HK-2

การศึกษาค้นคว้าผลของ COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acid และ LPR ต่อการสร้าง ROS ในเซลล์ HK-2 พบว่าภาวะเชื้อต่อการเกิดนิว คือ ภาวะที่เซลล์ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS ในเซลล์ HK-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตรงข้ามกับในภาวะที่เซลล์ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และภาวะกรด pH 6.8 ส่งผลให้ fluorescence intensity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$  และ  $P = 0.023$  ตามลำดับ) แสดงว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS ในเซลล์ HK-2 เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับในภาวะต่อต้านการเกิดนิวที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ส่งผลให้ fluorescence intensity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P = 0.002$ ) แสดงว่า LPR สามารถลดการสร้าง ROS ในเซลล์ HK-2 เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ในภาวะที่เซลล์ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ส่งผลให้ fluorescence intensity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> เพียงอย่างเดียว ( $P = 0.016$ ) ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% และภาวะกรด pH 6.8 ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ส่งผลให้ fluorescence intensity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และภาวะกรด pH 6.8 เพียงอย่างเดียว ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงในภาพที่ 21 ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าภาวะเชื้อต่อการเกิดนิวโดยเฉพาะ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ acid ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และสูตรมะนาวผงสามารถต่อต้านการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ในทุกกลุ่มการทดลอง



ภาพที่ 21 แสดงระดับ ROS production ในเซลล์ HK-2 ในภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด (pH 6.8) และภาวะที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรดร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% (\*:  $P < 0.001$ , @:  $P = 0.002$ , Δ:  $P = 0.016$  และ #:  $P = 0.023$ ) ระดับ Arbitrary fluorescence unit (AFU) ที่สูงขึ้นบ่งชี้ถึงการสร้าง ROS ในเซลล์ที่มากขึ้น

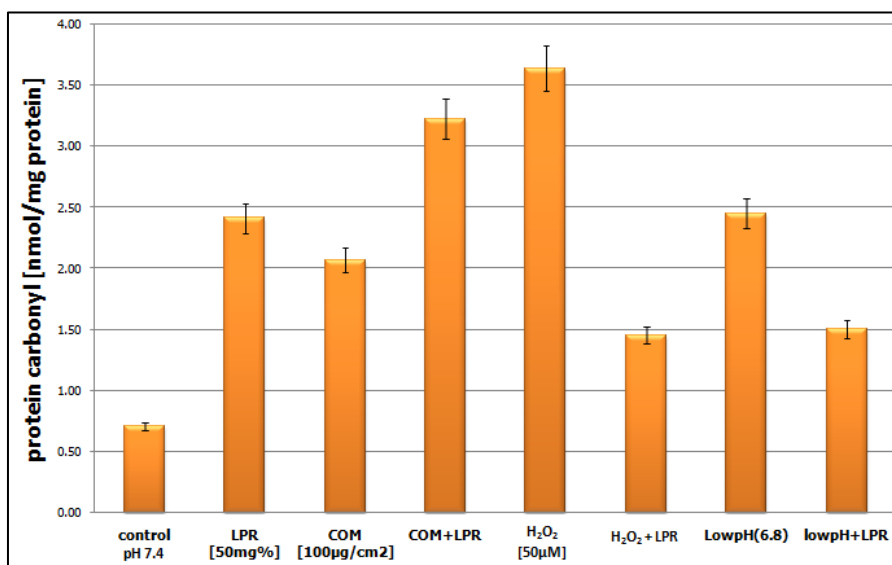
### ผลการศึกษาระดับโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) ใน HK-2 เซลล์

เนื่องจากผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 น่าจะเกี่ยวข้องหรือถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชัน หรือ ROS จึงทำการวิเคราะห์โปรตีนคาร์บอนิล ซึ่งเป็น by-product ของ protein oxidation หรือใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิด oxidative protein damage

ผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ HK-2 ในภาวะต่างๆ ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าระดับโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ HK-2 ในภาวะควบคุม (pH 7.4) มีค่าเท่ากับ 0.71 nmol/mg protein เซลล์กลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 2.41 nmol/mg protein ภาวะที่เซลล์ที่ได้รับผลึก COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  มีค่าเท่ากับ 2.07 nmol/mg protein ภาวะที่ได้รับ COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 3.22 nmol/mg protein ภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 3.64 nmol/mg protein ภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 1.46 nmol/mg protein เซลล์ที่อยู่ในภาวะกรด (pH 6.8) มีค่าเท่ากับ 2.45 nmol/mg protein ภาวะกรด (pH 6.8) ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 1.50 nmol/mg protein ดังแสดงในภาพที่ 22

เมื่อเปรียบเทียบระดับโปรตีนคาร์บอนิลระหว่างแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีระดับโปรตีนคาร์บอนิลสูงกว่ากลุ่มควบคุม (pH 7.4) คือกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% กลุ่มที่ได้รับผลึก COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  กลุ่มที่ได้รับ COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% กลุ่มที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% กลุ่มที่อยู่ในภาวะกรด (pH 6.8) และกลุ่มที่ได้รับภาวะกรด (pH 6.8) ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลสูงกว่ากลุ่มควบคุม 3.40, 2.92, 4.54, 5.13, 2.05, 3.45 และ 2.12 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากแต่ละกลุ่มการทดลองมีเพียง 2 ค่าการทดลอง





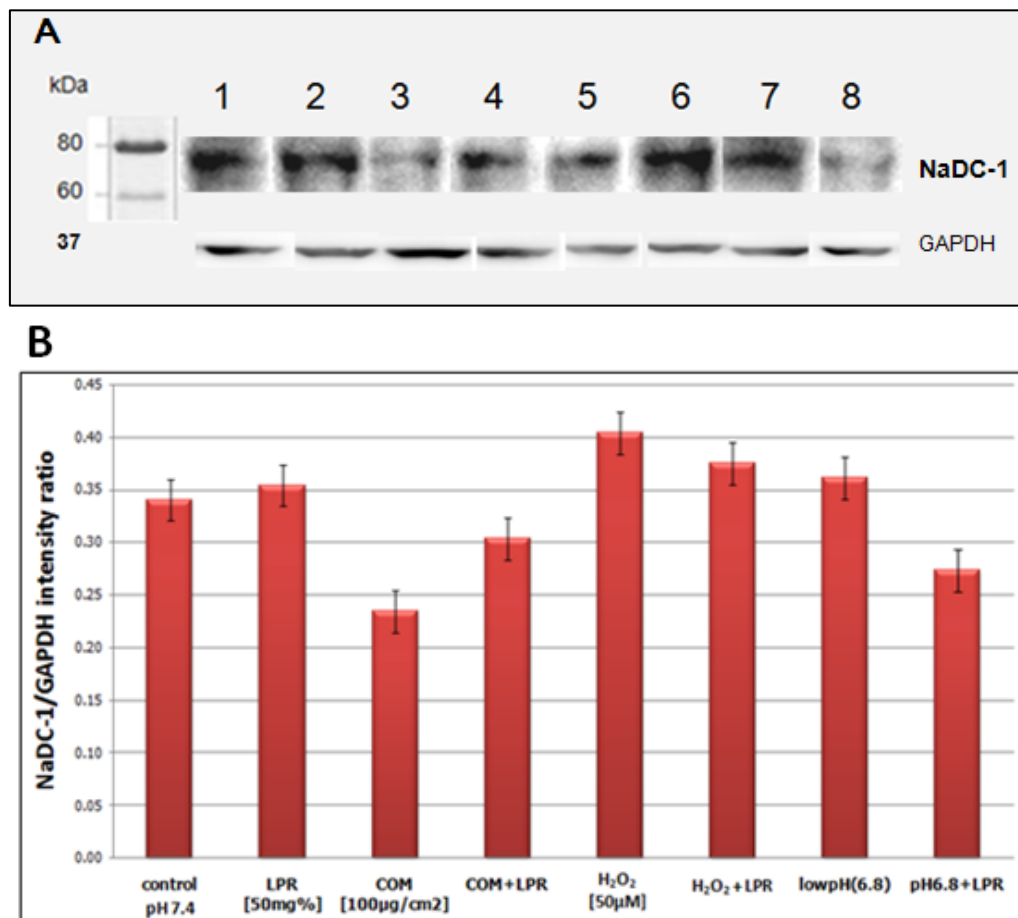
ภาพที่ 22 แสดงระดับ protein carbonyl ในเซลล์ HK-2 เมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะปกติ (pH 7.4) ภาวะที่ได้รับสูตรเมฆความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100 µg/cm<sup>2</sup> ร่วมกับสูตรเมฆความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรเมฆความเข้มข้นที่ 50 mg% ภาวะกรด pH 6.8 และภาวะกรด pH 6.8 ร่วมกับสูตรเมฆความเข้มข้นที่ 50 mg% ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าทุกสภาวะทำให้เกิด protein oxidation ได้มากกว่าภาวะปกติ โดยเฉพาะภาวะที่เซลล์ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ใน HK-2 เซลล์

เนื่องจากผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบการแสดงออกของ NaDC-1 สูงขึ้นในเซลล์บุผิวท่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและมีความสัมพันธ์กับ pH ที่ลดลงในปัสสาวะ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ในภาวะเอื้อต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่ ภาวะที่ได้รับผลึก COM ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  และภาวะกรด (pH 6.8) น่าจะเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับในภาวะที่อุดมไปด้วยสารต้านการเกิดนิ่ว คือ ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผง (LPR) และสภาวะปกติ (pH 7.4) จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ที่เวลา 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี Western blot โดยโปรตีน NaDC-1 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 75 kDa และใช้โปรตีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal control ซึ่ง GAPDH มีขนาด 37 kDa ผลของ western blot แสดงในภาพที่ 23A แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละสภาวะ ขณะที่ระดับการแสดงออกของโปรตีน GAPDH ในแต่ละสภาวะค่อนข้างคงที่

ระดับการแสดงออกคำนวณจาก NaDC-1/GAPDH intensity ratio พบว่าเซลล์กลุ่มที่อยู่ในกลุ่มควบคุม (pH 7.4) NaDC-1/GAPDH intensity ratio มีค่าเท่ากับ 0.34 ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่า 0.35 ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  มีค่าเท่ากับ 0.23 ภาวะที่ได้รับผลึก COM 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 0.30 ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 0.40 ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 0.38 ภาวะที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด pH 6.8 มีค่าเท่ากับ 0.36 ภาวะที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด pH 6.8 ร่วมกับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% มีค่าเท่ากับ 0.27

เมื่อเปรียบเทียบ NaDC-1/GAPDH intensity ratio กับกลุ่มควบคุม พบว่า ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงเพียงอย่างเดียว ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  ร่วมกับสูตรมะนาวผง และภาวะกรด pH6.8 มี NaDC-1/GAPDH intensity ratio สูงกว่ากลุ่มควบคุม คิดเป็น 1.04, 1.19, 1.10 และ 1.06 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ในภาวะที่ได้รับผลึก COM ภาวะที่ได้รับผลึก COM ร่วมกับสูตรมะนาวผง และภาวะกรด pH6.8 ร่วมกับสูตรมะนาวผง มี NaDC-1/GAPDH intensity ratio ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม คิดเป็น 0.69, 0.89 และ 0.80 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 23B)



ภาพที่ 23 การแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 โดยวิธี Western blot ในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง A: ผล western blot ในแต่ละสภาวะ Lane 1: control, Lane 2: LPR [50mg%], Lane 3: COM100 µg/cm<sup>2</sup> Lane 4: COM 100 µg/cm<sup>2</sup>+LPR [50mg%], Lane 5: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50µM], , Lane 6: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50µM] + LPR [50mg%], Lane 7: Low pH 6.8 and Lane 8: Low pH 6.8 + LPR [50mg%] โปรตีน NaDC-1 มีขนาด ~ 75 kDa B: แสดงค่า NaDC-1/GAPDH intensity ratio ในแต่ละสภาวะ

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยนิ่วไต พบว่า เซลล์ที่มีการแสดงออกของ NaDC-1 สูง คือ เซลล์ทิวบูลไตส่วนต้น (proximal tubular cells) และ ตำแหน่งของการแสดงออกส่วนใหญ่อยู่ที่ผิวเซลล์ด้านปัสสาวะ (apical surface) และพบว่าระดับ การแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยนิ่วไตสัมพันธ์กับค่า pH ในปัสสาวะ โดยผู้ป่วย ที่มีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตสูงปัสสาวะเป็นกรดมากกว่าผู้ป่วยที่มีระดับการ แสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตต่ำอย่างมีนัยสำคัญ นั่นคือเมื่อระดับ pH ในปัสสาวะลดลง จะพบการแสดงออกของ NaDC-1 มากขึ้น อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ระดับซีเทรต ในปัสสาวะ ของผู้ป่วยโรคนี้พบว่ามีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต และไม่พบความสัมพันธ์กับระดับ pH ในปัสสาวะ

เซลล์ HK-2 เมื่ออยู่ในสภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่ ได้รับ COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ acid มีผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทั้งสามสภาวะนี้กระตุ้นให้เกิด ภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ HK-2 ได้ ขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงร่วมด้วย จะ สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ HK-2 ได้ ดังนั้นสภาวะที่เอื้อต่อ การเกิดนิ่วเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว เช่น ได้รับสูตรมะนาวผง สามารถ ยับยั้งความเป็นพิษได้ และส่งผลดีต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ได้

ภาวะเอื้อต่อการเกิดนิ่วทั้งการได้รับ COM (100 µg/cm<sup>2</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 ไมโครโม ลาร์) และ acid (pH 6.8) สามารถกระตุ้นการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ HK-2 ได้ โดยพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของ intracellular ROS production และ cellular protein carbonyl content ซึ่งพบว่า COM กระตุ้นการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ HK-2 ได้น้อยกว่า acid และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> อย่างไรก็ตาม สูตรมะนาวผง (50 mg%) สามารถลด intracellular ROS production ในภาวะที่เซลล์ได้รับ COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ acid ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 พบว่าโปรตีน NaDC-1 เพิ่มขึ้นในสภาวะที่เซลล์ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acid และ สูตรมะนาวผง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (pH 7.4) ขณะที่ใน COM-treated HK-2 cells พบการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ลดลง แต่ ในภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> หรือ acid ร่วมกับสูตรมะนาวผง ระดับการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> หรือ acid เพียงอย่างเดียวตามลำดับ

## อภิปรายผลการวิจัย

แม้ว่าสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนี้วไตจะมีหลายปัจจัย ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกที่พบมากที่สุดและผู้ป่วยโรคนี้วไตไทย โดยเฉพาะผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (Hypokaliuria) โดยพบมากกว่าร้อยละ 90 และมากกว่าร้อยละ 70 ตามลำดับ [4] สาเหตุของการมีระดับซีเทรตในปัสสาวะต่ำเกี่ยวข้องกับทั้งการได้รับซีเทรตจากอาหาร การดูดซึมซีเทรตที่ลำไส้ เมแทบอลิซึมของซีเทรตในร่างกาย และการดูดกลับของซีเทรตที่ไต ซึ่งการดูดกลับซีเทรตส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่เซลล์บุท่อไตส่วนต้น (renal proximal tubular cells) ด้าน brush border membrane หรือ apical membrane โดยอาศัยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ส่วนทางด้าน basolateral membrane การขนส่งซีเทรตจากเลือดเข้าสู่เซลล์จะอาศัยโปรตีนขนส่ง NaDC-3 [5,6] การขนส่งซีเทรตเข้าสู่เซลล์โดย NaDC-1 จะขนส่งร่วมกับ  $\text{Na}^+$  ในอัตราส่วน 1 Citrate :  $3\text{Na}^+$  และซีเทรตที่ขนส่งได้ดีจะอยู่ในรูปของ citrate<sup>2-</sup> ดังนั้นการทำงานของ NaDC-1 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ citrate<sup>2-</sup> ในปัสสาวะ เมื่อเกิดภาวะกรดในปัสสาวะจะทำให้เกิด citrate<sup>2-</sup> มากขึ้น NaDC-1 จึงดูดกลับซีเทรตเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ส่งผลให้ซีเทรตในปัสสาวะลดลง ในทางกลับกันเมื่อเกิดภาวะด่างในปัสสาวะจะทำให้มี citrate<sup>3-</sup> มาก การทำงานของ NaDC-1 จะดูดกลับ citrate<sup>3-</sup> ได้ช้ากว่า citrate<sup>2-</sup> ส่งผลให้ไม่เกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำหรือเกิดได้ช้ากว่า ดังนั้นภาวะด่างก็ตามที่ทำให้ NaDC-1 ทำงานเพิ่มขึ้นหรือมีการแสดงออกมากขึ้น จะทำให้ซีเทรตถูกดูดกลับเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ซีเทรตในปัสสาวะลดลงและเกิดภาวะ hypocitraturia

การศึกษาการขนส่งซีเทรตโดยโปรตีนขนส่ง NaDC-1 ในหนูที่ทำให้เกิดภาวะกรดเกินเรื้อรัง (chronic metabolic acidosis) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *NaDC-1* เพิ่มขึ้นบริเวณเซลล์บุท่อไตส่วนต้น apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น [7] และการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า ในภาวะที่อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกรดจะทำให้ *NaDC-1* activity เพิ่มขึ้น [7] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของ *NaDC-1* ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไต การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก พบว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไตทุกรายมีการแสดงออกของ *NaDC-1* แต่อยู่ในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งพบการแสดงออกของ *NaDC-1* มากบริเวณ apical membrane ของ proximal tubules ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการดูดกลับของซีเทรตผ่านทาง *NaDC-1* น่าจะเกิดที่ renal proximal tubules เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหนูที่ทำให้เกิดภาวะกรด พบการแสดงออกของ *NaDC-1* ที่ apical membrane ของเซลล์บุท่อไตส่วนต้น [7] และสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Wang และคณะ ที่พบการแสดงออกของ *NaDC-1* ในเนื้อเยื่อไต

ของคนสูงอายุ แสดงออกที่ด้าน apical membrane [50] ในผู้ป่วยที่มีระดับ pH ในปัสสาวะต่ำจะพบระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตสูง ขณะที่ในผู้ป่วยที่มีระดับ pH ในปัสสาวะสูง จะพบการแสดงออกของ NaDC-1 ในระดับต่ำ ดังนั้น งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการแสดงออกของ NaDC-1 ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ว่าสัมพันธ์กับภาวะกรดในปัสสาวะของผู้ป่วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในหนูที่อยู่ในภาวะ chronic metabolic acidosis และพบการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA และ protein สูงขึ้น [7] และในหนูที่ได้รับกรด  $\text{NH}_4\text{Cl}$  แบบเรื้อรัง (chronic acid ingestion) พบว่าทำให้ปัสสาวะเป็นกรด มีการแสดงออกของ NaDC-1 mRNA เพิ่มขึ้น และระดับซีเทรตในปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกุ่มควบคุม [57] นอกจากนี้ในหนูที่เป็น chronic  $\text{K}^+$  depletion พบว่าการมีภาวะกระตุ้นการขนส่งซีเทรตเข้าเซลล์มากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ NaDC-1 mRNA และ protein [58] ดังนั้นผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า ในสภาวะเรื้อรังใดๆ ที่ทำให้ปัสสาวะเป็นกรด น่าจะกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ให้สูงขึ้น แล้วส่งผลให้เกิดภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำตามมา อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วัดกับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต และระดับ pH ในปัสสาวะ และในปี 2012 รายงานวิจัยของ Strohmaier และคณะ พบว่าของระดับซีเทรตกับระดับ pH ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วัด ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [59] ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการควบคุมระดับซีเทรตในปัสสาวะน่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นอีกหลายปัจจัย นอกเหนือจาก ระดับ pH ในปัสสาวะ ยกตัวอย่างเช่น พฤติกรรมการรับประทานอาหารที่มีซีเทรตของผู้ป่วย ซึ่งควบคุมได้ยาก การออกกำลังกายอย่างหนักทำให้เสียเหงื่อมาก ส่งผลให้ร่างกายขาดโพแทสเซียม ทำให้เกิดภาวะกรดในปัสสาวะ ทำให้การทำงานของ NaDC-1 สูงขึ้นดูดกลับซีเทรตมากขึ้น นอกจากนี้เนื่องจาก NaDC-1 ขนส่งสารหลายชนิดได้ และดูดกลับ succinate ได้ดีกว่าซีเทรต จึงทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับการแสดงออกของ NaDC-1 [45] หรืออาจเป็นไปได้ว่าซีเทรตอาจจะดูดกลับเข้าสู่เซลล์ผ่านโปรตีนขนส่งตัวอื่นได้ที่ปัจจุบันยังไม่ทราบ [5,6] อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้และของ Strohmaier และคณะ มีขนาดตัวอย่างค่อนข้างน้อย จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับระดับ pH ในปัสสาวะและการแสดงออกของ NaDC-1 จึงควรทำการศึกษากลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

จากผลการวิจัยที่พบว่าผู้ป่วยที่มีค่า pH ในปัสสาวะต่ำ จะมีระดับการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อไตสูง ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่าภาวะเป็นกรดกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ในเซลล์บุท่อไตส่วนต้นได้อย่างไรหรือผ่านกลไกใด โดยทำการศึกษาใน

เซลล์ HK-2 ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ NaDC-1 สูงขึ้นในภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิวไ้ได้แก่ ภาวะที่ได้รับ  $H_2O_2$  และภาวะกรด (pH 6.8) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในหนูที่มีภาวะกรดเกิน (metabolic acidosis) และการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าโปรตีน NaDC-1 มีการทำงาน (activity) สูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรด [7] จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ HK-2 อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือมี ROS สูงขึ้น จะส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน NaDC-1 สูงขึ้น ซึ่งน่าจะควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 น่าจะผ่านทาง ROS หรือมี ROS เป็นตัวกลางในการไปกระตุ้นให้เกิด transcription และ translation ของยีน *NaDC-1* (ROS-mediated gene expression) หลายงานวิจัยรายงานว่า มียีนหลายชนิดที่ถูกควบคุมการแสดงออกผ่านทาง ROS (ROS-mediated mechanism) โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น *NF- $\kappa$ B*, *AP-1* และ *TNF- $\alpha$*  [17, 18, 19] เป็นต้น และจากผลการศึกษาที่พบว่า เมื่อเซลล์ HK-2 ได้รับกรดแล้วจะมีการสร้าง ROS และเกิด protein oxidation มากขึ้น นั่นคือ กรดกระตุ้นให้เซลล์ HK-2 เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ดังนั้น ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ NaDC-1 ในเซลล์ HK-2 ภายใต้สภาวะกรด (acid-induced NaDC-1 expression in HK-2 cells) ที่พบในการศึกษานี้ น่าจะมีกลไกการควบคุมผ่านทาง ROS คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kawai และ Arinze ที่พบว่า กรดวาลโปรอิก (valproic acid) กระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆ ผ่านทาง ROS pathway [19] เพื่อตรวจสอบสมมุติฐานนี้ ควรยับยั้ง ROS ด้วย antioxidants แล้วตรวจสอบการแสดงออกของ NaDC-1 หากการแสดงออกของ NaDC-1 ลดลงภายหลังได้รับ  $H_2O_2$  และกรด ร่วมกับ antioxidants ก็น่าจะเป็นข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมว่า กลไกการควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 เป็น ROS-mediated mechanism

แต่อย่างไรก็ตามในภาวะที่เซลล์ได้รับผลึก COM กลับมีการแสดงออกของ NaDC-1 ลดลง อาจเป็นเพราะว่าผลึก COM อาจจะไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ได้ ณ เวลา 6 ชั่วโมง (เวลาที่พบการแสดงออกของ NaDC-1 ที่ ขนาด 75 kDa ได้ชัดเจนที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง) หรือปริมาณ COM ที่ใช้ยังน้อยเกินไป จึงไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการแสดงออกของ NaDC-1 ได้ ซึ่งคงต้องศึกษาเพื่อพิสูจน์ต่อไป ในภาวะต่อต้านการเกิดนิวไ้ คือ ภาวะที่เซลล์ได้รับสูตรมะนาวผง พบการแสดงออกของ NaDC-1 เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจสรุปได้ว่าองค์ประกอบในสูตรมะนาวผงอาจส่งผลต่อการแสดงออกของ NaDC-1 ณ เวลา 6 ชั่วโมง หากระยะเวลาเพิ่มขึ้นการแสดงออกของ NaDC-1 อาจลดลงได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า องค์ประกอบในสูตรมะนาวผงบางอย่างกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน แล้วส่งผลต่อการแสดงออกของ NaDC-1

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระหรือ ROS สูงขึ้น ส่งผลให้เซลล์บุท่อไตถูกทำลาย จากการศึกษาภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่วและภาวะต่อต้านการเกิดนิ่วต่อการสังเคราะห์ ROS ในเซลล์ HK-2 พบว่า ภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่ว คือ ภาวะที่ได้รับผลึก COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และภาวะกรด (pH 6.8) ส่งผลให้ปริมาณ ROS สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตที่ถูกกระตุ้นด้วยออกซาลेटหรือผลึกแคลเซียมออกซาลेट จะทำให้เซลล์สร้าง ROS เพิ่มมากขึ้นจนทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน [11] และรายงานการศึกษาของ Lo และคณะ ในเซลล์ MDCK พบว่า H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ส่งผลให้ระดับ ROS สูงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น [16] ในขณะที่ภาวะต่อต้านการเกิดนิ่ว คือ ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงเพียงอย่างเดียว และภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่วที่ได้รับสูตรมะนาวผงร่วมด้วย พบว่าระดับ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทุกกลุ่ม การทดลอง ยกเว้นภาวะกรด (pH 6.8) ที่ได้รับสูตรมะนาวผงร่วมด้วยซึ่งมี pH 3.7 เพราะฉะนั้น อาจเกิดจากความเข้มข้นกรดมากเกินไปส่งผลให้เซลล์ตายได้

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันจะทำให้เกิด protein oxidation และส่งผลให้ระดับโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) เพิ่มขึ้นและจากการศึกษาของ Srinivasan และคณะ พบว่าระดับโปรตีนคาร์บอนิลในพลาสมาของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าคนสุขภาพดี [15] การศึกษาในเซลล์ HK-2 ครั้งนี้พบว่าภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่ว คือ ภาวะที่ได้รับผลึก COM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และภาวะกรด (pH 6.8) ส่งผลให้ระดับโปรตีนคาร์บอนิลสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในภาวะที่เซลล์ได้รับสูตรมะนาวผงเพียงอย่างเดียว และภาวะเชื้อต่อการเกิดนิ่วร่วมกับสูตรมะนาวผง ก็พบระดับโปรตีนคาร์บอนิลสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน ยกเว้นแต่ในภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ร่วมกับสูตรมะนาวผง ส่งผลให้ระดับโปรตีนคาร์บอนิลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เพียงอย่างเดียว แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสูตรมะนาวผงอาจช่วยลดระดับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่เซลล์ได้รับโดยตรงได้จริง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองภาวะที่ได้รับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ได้รับสูตรมะนาวผงร่วมด้วย ที่พบว่า %cell viability สูงขึ้นและปริมาณ ROS ลดลง แต่ในภาวะอื่นที่มะนาวผงไม่สามารถลดระดับโปรตีนคาร์บอนิลได้ อาจเป็นเพราะที่เวลา 6 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของมะนาวผงยังไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เต็มที่ ซึ่งยังคงต้องศึกษาต่อไปในอนาคต โดยเพิ่มระยะเวลาที่เหมาะสม และเลือกใช้สาร antioxidants เช่น วิตามินอี หรือ วิตามินซี เป็นกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผงด้วย อย่างไรก็ตามสูตรมะนาวผงสามารถกระตุ้นให้เกิดโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ได้ด้วยแต่ในระดับต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะดังที่



กล่าวมา (ยกเว้นกลุ่มควบคุม) แสดงว่ามีความเป็น oxidant น้อยที่สุด หรือมีสมบัติเป็น antioxidants ร่วมด้วย

ผลการทดสอบภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิวและภาวะต่อต้านการเกิดนิวต่อ viability ของ HK-2 cell พบว่า ภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิว ประกอบด้วย ภาวะที่ได้รับผลึก COM ความเข้มข้น  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  และภาวะกรด pH 6.8 ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Stelmashuk และคณะ พบว่า ภาวะกรด (pH 6.5 และ pH 6.0) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้เซลล์ (cerebellar granule cells) มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (pH 7.2) [13] แต่ภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 ไมโครโมลาร์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 6 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิวเป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลให้เซลล์ตายได้ในที่สุด ภาวะต่อต้านการเกิดนิว คือ ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% ร่วมด้วย พบว่า ภาวะที่ได้รับสูตรมะนาวผงความเข้มข้นที่ 50 mg% เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ % cell viability สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ เช่นเดียวกับการให้สูตรมะนาวผงร่วมกับภาวะที่ได้รับผลึก COM ภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ส่งผลให้ % cell viability สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสูตรมะนาวผง ดังนั้นสูตรมะนาวผงในปริมาณที่ใช้ทดสอบนี้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และยังสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่เอื้อต่อการเกิดนิวได้อีกด้วย ยกเว้นภาวะกรด pH 6.8 ที่พบว่ามะนาวผงไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์จากความเป็นพิษของกรดได้ ซึ่งภาวะนี้อาจมีความเป็นกรดมากไป ส่งผลให้เซลล์ตายได้

สรุปว่าพบการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตโตมากบริเวณ apical membrane ของ proximal tubules และมีความสัมพันธ์กับค่า pH ในปัสสาวะต่ำ ภาวะเอื้อต่อการเกิดนิวส่งผลให้เซลล์ HK-2 เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ NaDC-1 ดังจะเห็นได้จากภาวะที่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  และภาวะกรด (pH 6.8) แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าผลึก COM มีความสัมพันธ์อย่างไรกับการแสดงออกของ NaDC-1 ถึงแม้ว่าสูตรมะนาวผงจะสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสูตรมะนาวผงสามารถลดการแสดงออกของ NaDC-1 ได้อย่างไร การศึกษานี้ยังคงต้องดำเนินต่อไปในอนาคต เพื่อศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของ NaDC-1 ในเชิงลึกอีกต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

ศึกษาการแสดงออกของ NaDC-1 ในเนื้อเยื่อไต ไม่สามารถนำเนื้อเยื่อไตของกลุ่มคนสุขภาพดีที่จะนำมาใช้เป็นกลุ่มควบคุม ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปควรเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากคนที่มีสุขภาพดีด้วย และควรเพิ่มขนาดประชากรของกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ศึกษาให้มากขึ้น เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์หรือหาความแตกต่างทางสถิติได้เพิ่มขึ้น หากต้องการศึกษาการทำงานของ NaDC-1 การวัดระดับซีเทรตในปัสสาวะอาจไม่เพียงพอ ควรวัดระดับ succinate ด้วย เนื่องจาก succinate เป็น substrate ของโปรตีนขนส่ง NaDC-1 เช่นกัน นอกจากนี้ในการศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันควรเลือกใช้สารที่เป็น antioxidants เป็นกลุ่มควบคุมด้วย เช่น วิตามินอี และ วิตามินซี เป็นต้น

## รายการอ้างอิง

- [1] Boonla C, Thummaborworn T, Tosukhowong P. Urolithiasis in Udon Thani Hospital: A rising prevalence of uric acid stone. *Chula Med J.* 2006; 50(2): 77-90.
- [2] สมบัติ บวรผดุงกิตติ, พจน์ ศรีบุญลือ และเกรียง ตั้งสง่า. อัตราการเกิดนิ่วใหม่ภายหลังการผ่าตัดนิ่วไตในโรงพยาบาลขอนแก่น. *ขอนแก่นเวชสาร* 17(พฤษภาคม – สิงหาคม 2536): 13-19.
- [3] ชาญชัย บุญหล้า. โรคนิ่วไต: จากกลไกการเกิดนิ่วระดับโมเลกุลสู่การป้องกัน. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: <http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/Fkn.htm> [15 สิงหาคม 2554]
- [4] Youngjermchan P, Pumpaisanchai S, Ratchanon S, Pansin P, Tosukhowong P, Tungsanga K, Boonla C. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J.* 2006; 50(9):605-621.
- [5] Pajor AM. Citrate transport by the kidney and intestine. *Semin Nephrol.* 1999; 19(2):195-200.
- [6] Hentschel H, Burckhardt BC, Scholermann B, Kuhne L, Burckhardt G, Steffgen J. Basolateral localization of flounder Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *Pflugers Arch.* 2003; 446(5):578-584.
- [7] Aruga S, Wehrli S, Kaissling B, Moe OW, Preisig PA, Pajor AM, et al. Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney. *Kidney Int.* 2000; 58(1):206-215.
- [8] Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. *Urol Res* 2007; 35(4): 185-191.
- [9] Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, Boonla C, et al. Citraturic, alkalinizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. *Urol Res.* 2008; 36

- (3-4):149-155.
- [10] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17(10):1195-1214.
- [11] Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res*. 2003; 31(1):3-9.
- [12] Tosco M, Porta C, Sironi C, Laforenza U, Orsenigo MN. Acute and chronic acidosis influence on antioxidant equipment and transport proteins of rat jejunal enterocyte. *Cell Biol Int*. 2011; 35(4):345-353.
- [13] Stelmashuk E, Belyaeva E, Isaev N. Effect of acidosis, oxidative stress, and glutamate toxicity on the survival of mature and immature cultured cerebellar granule cells. *Neurochemical Journal*. 2007; 1(1):66-69.
- [14] Rustom R, Wang B, McArdle F, Shalamanova L, Alexander J, McArdle A, et al. Oxidative stress in a novel model of chronic acidosis in LLC-PK1 cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2003; 95(1):e13-23.
- [15] Srinivasan S, Kalaiselvi P, Sakthivel R, Pragasam V, Muthu V, Varalakshmi P. Uric acid: an abettor or protector in calcium oxalate urolithiasis? Biochemical study in stone formers. *Clin Chim Acta*. 2005; 353(1-2):45-51.
- [16] Lo JF, Sinkala E, Eddington DT. Oxygen gradients for open well cellular cultures via microfluidic substrates. *Lab Chip*. 2010; 10(18):2394-2401.
- [17] Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286(2):L344-353.
- [18] Long H, Shi T, Borm PJ, Maatta J, Husgafvel-Pursiainen K, Savolainen K, et al. ROS-mediated TNF-alpha and MIP-2 gene expression in alveolar macrophages exposed to pine dust. *Part Fibre Toxicol*. 2004; 1(1):3.

- [19] Kawai Y, Arinze IJ. Valproic Acid–Induced Gene Expression through Production of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res.* 2006; 66(13):6563-6569.
- [20] Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol.* 2009; 11(3):134-144.
- [21] Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol.* 1997; 4(6):537-540.
- [22] Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, Rovera F, Montanari E, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol.* 1999; 162(1):27-30.
- [23] Ahlstrand C, Tiselius HG. Recurrences during a 10-year follow-up after first renal stone episode. *Urol Res.* 1990; 18(6):397-399.
- [24] Sutherland JW, Parks JH, Coe FL. Recurrence after a single renal stone in a community practice. *Miner Electrolyte Metab.* 1985; 11(4):267-269.
- [25] Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest.* 2005; 115(10):2598-2608.
- [26] Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. *Asian Biomed.* 2010; 1(1):87-95.
- [27] Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12(10):1161-1208.
- [28] Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res.* 2006; 34(2):86-91.
- [29] Khan SR, Glenton PA. Calcium oxalate crystal deposition in kidneys of hypercalciuric mice with disrupted type IIa sodium-phosphate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294(5):F1109-1115.

- [30] Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol*. 1996; 156(3):907-909.
- [31] 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; 34(1):26-36.
- [32] Cuttle L, Zhang XJ, Endre ZH, Winterford C, Gobé GC. Bcl-XL translocation in renal tubular epithelial cells in vitro protects distal cells from oxidative stress. *Kidney Int*. 2001; 59(5):1779-1788.
- [33] 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; 33(1):65-69.
- [34] Khan SR. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol*. 2004; 98(2):e55-60.
- [35] 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; 101(9):1170-1177.
- [36] Tozawa K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, et al. NF-kappaB activation in renal tubular epithelial cells by oxalate stimulation. *Int J Urol*. 2008; 15(10):924-928.
- [37] Brennan TS, Klahr S, Hamm LL. Citrate transport in rabbit nephron. *Am J Physiol*. 1986; 251(4 Pt 2):F683-689.
- [38] Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res*. 2002; 30(1):35-47.
- [39] Lerma EV. *Clinical Presentation of Nephrolithiasis*. [Online]. 2012. Available from : <http://emedicine.medscape.com/article/437096-clinical> [2012, Jan 20]
- [40] Soygur T, Akbay A, Kupeli S. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower

- caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial. *J Endourol.* 2002; 16(3):149-152.
- [41] Pajor AM. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch.* 2006; 451(5):597-605.
- [42] Pajor AM, Gangula R, Yao X. Cloning and functional characterization of a high-affinity Na(+)/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280(5):C1215-1223.
- [43] Minisola S, Rossi W, Pacitti MT, Scamecchia L, Bigi F, Carnevale V, et al. Studies on citrate metabolism in normal subjects and kidney stone patients. *Miner Electrolyte Metab.* 1989; 15(5):303-308.
- [44] Pajor A, Sun N. Functional differences between rabbit and human Na (+)-dicarboxylate cotransporters, NaDC-1 and hNaDC-1. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 2):F1093-1099.
- [45] Pajor AM. Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61:663-682.
- [46] Levi M, McDonald LA, Preisig PA, Alpern RJ. Chronic K depletion stimulates rat renal brush-border membrane Na-citrate cotransporter. *Am J Physiol.* 1991; 261(5 Pt 2):F767-773.
- [47] Pajor AM. Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. *J Membr Biol.* 2000; 175(1):1-8.
- [48] Pajor AM, Hirayama BA, Loo DD. Sodium and lithium interactions with the Na+/Dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem.* 1998; 273(30):18923-18929.
- [49] Cheung K. *The role of human sodium dicarboxylate cotransporter in oxidative stress.* [online]. 2004. Available from : <http://hub.hku.hk/handle/10722/31213> [2011,Aug 15]
- [50] Wang J, Chen X, Zhu H, Peng L, Hong Q. Relationship between aging and renal high-affinity sodium-dependent dicarboxylate cotransporter-3 expression

- characterized with antifusion protein antibody. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003; 58(10):B879-888.
- [51] Pajor AM, Valmonte HG. Expression of the renal Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1, in COS-7 cells. *Pflugers Arch.* 1996; 431(4):645-651.
- [52] Pajor AM. Sequence and functional characterization of a renal sodium/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem.* 1995; 270(11):5779-5785.
- [53] Bergeron MJ, Burzle M, Kovacs G, Simonin A, Hediger MA. Synthesis, maturation, and trafficking of human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter NaDC1 requires the chaperone activity of cyclophilin B. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11242-11253.
- [54] Kalantar-Zadeh K, Balakrishnan VS. The kidney disease wasting: inflammation, oxidative stress, and diet-gene interaction. *Hemodial Int.* 2006; 10(4):315-325.
- [55] Kang DE, Sur RL, Haleblian GE, Fitzsimons NJ, Borawski KM, Preminger GM. Long-term lemonade based dietary manipulation in patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *J Urol.* 2007; 177(4):1358-1362.
- [56] Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol.* 2000; 13 Suppl 3:S45-50.
- [57] Okamoto N, Aruga S, Matsuzaki S, Takahashi S, Matsushita K, Kitamura T. Associations between renal sodium-citrate cotransporter (hNaDC-1) gene polymorphism and urinary citrate excretion in recurrent renal calcium stone formers and normal controls. *Int J Urol.* 2007; 14(4):344-349.
- [58] Pajor AM, Sun N. Protein kinase C-mediated regulation of the renal Na<sup>(+)</sup>/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1420(1-2):223-230.



- [59] Strohmaier WL, Seilnacht J, Schubert G. Urinary Stone Formers with Hypocitraturia and 'Normal'Urinary pH Are at High Risk for Recurrence. *Urol Int.* 2012; 88(3):294-297.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
การเตรียมสารเคมี

## เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง แสดงอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ	ผลิตภัณฑ์
Autoclave	HVE-25, Dublin, Ireland
Autopipette 2, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ l and tips	Bio-Rad laboratories, California, USA
Centrifuge	Kokusan, Tokyo, Japan
Centrifuge tubes	Jet Biochemicals, Guangzhou , China
Class II biohazard safety cabinet	Thermo Fisher Scientific, Ohio, USA
CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Scientific, Ohio, USA
Cryotube	Corning, New York, USA
Cuvettes (Plastic and Quartz)	Perkin Elmer, USA
Electrophoresis power supply	GE Health Care, Pewaukee, USA
Glass tube 15 ml	Centrifuge, Japan
Gel Electrophoresis unit	Amersham Biosciences Corp., USA
Light microscope	Olympus, New Jersey, USA
Microtube 250 $\mu$ l and 1.5 ml	LioPette, Bangkok, Thailand
Microplate reader	BioTek, Vermont, USA
pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
Refrigerators and deep freezers	SANYO, Osaka, Japan
Sonicator	Severn Sales, Bristol, UK
Spectrophotometer	Thermo scientific, USA
Tissue culture flasks 25 cm <sup>2</sup>	Corning, New York, USA
Tissue culture flasks 75 cm <sup>2</sup>	Corning, New York, USA
Tissue culture plate : 6, 96- well	Corning, New York, USA

Transfer blotting	Bio-Rad laboratories, California, USA
Vortex mixer	Scientific Industries, San Diego, USA
Water bath	GFL, Burgwedel, Germany

สารเคมี	
Absolute Alcohol	MERK, Darmstadt, Germany
40% Acrylamide	Bio-Rad Laboratories, California, USA
Ammonium persulfate	SIGMA, Steinheim, Germany
Calcium oxalate monohydrate	MERK, Darmstadt, Germany
Citrate buffer pH 6.0	-
Coomassie brilliant blue (CBB)	Kodak, Rochester, USA
Column	Grace, Deerfield, USA
DAB (3, 3'-diaminobenzidine)	VECTOR LABORATORIES, California, U.K.
Diluents antibody	DAKO, Carpinteria, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Scientific, Ohio, USA
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)	Analytical reagent, Haryana, India
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	CARLO ERBA, Italy
95% ethanol	Hyclone Laboratories, Inc., Utah, USA
Fetal bovine serum (FBS)	GIBTHAI, Bangkok, Thailand
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-
Hydrochloric acid (HCl)	MERK, Darmstadt, Germany
Ladder protein marker	Biolabs, Ipswich, USA

Methanol	MERK, Darmstadt, Germa
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA, Steinheim, Germany
PBS (phosphate buffer saline)	SIGMA, Steinheim, Germany
Penicillin-Streptomycin solution	SIGMA, Steinheim, Germany
Phosphoric acid	MERK, Darmstadt, Germany
Phenylmethylsulfonyl floride (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Primary antibody (SLC13A2 or NaDC-1)	DAKO, Carpinteria, USA
PVDF membrane	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
RIPA Buffer	-
Secondary antibody (peroxidase- conjugated anti-rabbit antibody)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Trypsin/EDTA	GIBTHAI, Bangkok, Thailand
1,2-Bis(dimethylamino)ethane (TEMED)	SIGMA, Steinheim, Germany
Xylene	Chemekit, Bangkok, Thailand

1. การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะ  
CBB reagent
  - Bradford reagent 1 part : Distued water 4 parts
  - ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรอง 1 รอบก่อนใช้
2. การเตรียมสารเคมีในการย้อมimmunohistochemistry
  - 2.1 citrate buffer pH 6.0
    - ชั่ง citric acid (MW=294.1) 10.5 g
    - บีเบตต์ 2N NaOH 65 ml
    - ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 5 L
  - 2.2 Phosphate Buffer Saline (20X PBS), pH 7.2
    - ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MW=141.982) 1.48 g
    - ชั่ง NaCl (MW=58.44) 7.2 g
    - ชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MW=136.09) 0.43 g
    - ปรับ pH ให้เป็น 7.2 แล้วละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L
3. การเตรียมสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HK-2 cells
  - 3.1 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)
    - DMEM 1 ซอง ละลายในน้ำ distued water claved 1 ลิตร
    - ใส่ 100U/ml penicillin/streptomycin ลงไป 10 ml (1% penicillin/streptomycin)
    - กรองผ่าน filter ขนาด 0.22 um
    - แบ่งใส่หลอดขนาด 50 ml เก็บที่  $-80^\circ\text{C}$
    - ใส่ 10 % fetal bovine serum (FBS) ก่อนใช้
4. การเตรียม 10% acrylamide gel
  - 4.1 เตรียม resolving gel
    - 40% acrylamide 2.5 ml
    - เต็ม 1.5 M Tris (pH 8.8) 2.5 ml
    - เต็ม 10%SDS 100  $\mu\text{l}$  และ distued water 4.3 ml
    - เมื่อได้ส่วนผสมดังกล่าวให้รีบเติม 10% ammonium persulphate (APS) 100  $\mu\text{l}$  และ 1,2-Bis(dimethylamino)ethane (TEMED) 10  $\mu\text{l}$  load ลงบนแผ่นกระจกสำหรับทำ SDS-PAGE ทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที

#### 4.2 เตรียม stacking gel

- 40% acrylamide 0.5 ml
- เติม 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.75 ml
- เติม 10% SDS 50  $\mu$ l และ distilled water 2.45 ml

เมื่อได้ส่วนผสมดังกล่าวให้รีบเติม 10% ammonium persulphate (APS) 50  $\mu$ l และ 1,2-Bis(dimethylamino)ethane (TEMED) 5  $\mu$ l ที่ทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที จากนั้นนำ SDS-PAGE ใส่ลงในเครื่อง Gel Electrophoresis unit ใน Tank buffer

#### 5. การเตรียม Tank buffer

- Tris 6.056 g
- Glycine 28.826 g
- SDS 2 g
- เติมน้ำจนครบปริมาตร 2 L

#### 6. การเตรียมสารเคมีในการวัด protein carbonyl

##### 6.1 20% TCA (trichloroacetic acid)

- TCA 12.28 ml
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml

##### 6.2 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (10mM DNPH ใน 2N HCl)

- HCl 98.5 ml ในน้ำ 500 ml
- ชั่ง DNPH 0.991 g. ละลายใน HCl ที่เตรียมไว้ด้านบน

##### 6.3 Ethanol: ethyl acetate (1:1)

- ผสม 95% Ethanol 500 ml. กับ ethyl acetate 500 ml

##### 6.4 6M guanidinium chloride (GdmCl) และ 0.5 M potassium phosphate

monobasic ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 2.5

- ชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  34.023 g. และ GdmCl 286.6 g.
- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml.
- ปรับ pH ให้ได้ 2.5 แล้วเติมน้ำให้ครบปริมาตร 500 ml



ภาคผนวก ข  
ปัญหาที่พบระหว่างการทดลอง

## การตรวจวัดระดับ ROS ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2',7'-Dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)

เนื่องจากการทดลองต้องทดสอบภาวะกรดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาภาวะกรดแก่ HK-2 เซลล์ จึงทำการทดสอบตั้งแต่ pH 6.8, 6.5, 6.0, 5.0 พบว่าภาวะที่เหมาะสมแก่การทดลองคือภาวะกรด pH 6.8 หากเลือกใช้ภาวะที่ pH ต่ำกว่านี้ อาจทำให้เซลล์ตายเกินกว่าที่จะนำมาทำ experiment ได้ ซึ่งจากการทดสอบ viability โดย MTT assay เมื่อ pH ลดลง ส่งผลให้ % cell viability ลดลงเช่นกัน เพราะฉะนั้น intracellular ROS ต้องสูงขึ้นเมื่อ pH ลดลง แต่เมื่อนำ pH 6.5, 6.0 และ 5.0 มา treated เซลล์ แล้วพบว่า intracellular ROS กลับลดลงตามระดับ pH ที่ลดลง ดังแสดงในภาพ ก นั้นหมายความว่าภาวะกรด อาจ interfere กับปฏิกิริยาของ DCFH-DA เพราะฉะนั้นผู้วิจัยที่จะต้องการทดสอบภาวะกรดในเซลล์ ควรเลี่ยงไปใช้วิธีอื่นในการวัดระดับ intracellular ROS

ภาคผนวก ค



ASIAN  
BIOMEDICINE

RESEARCH  
REVIEWS  
AND NEWS

---

Editorial office: 5<sup>th</sup> Floor Ananda Mahidol Building, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University, Rama 4, Bangkok 10330 Thailand  
Tel: 662-256-4000 ext. 3270 Fax: 256-4455 ext. 17  
E-mail: [chulamed@md.chula.ac.th](mailto:chulamed@md.chula.ac.th) Website: <http://www.asianbiomed.org>

May 21, 2012

Dear Professor Piyaratana Tosukhowong,

We are glad to inform that your manuscript entitled 'Increased intrarenal expression of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 nephrolithiasis patients associates with acidic urine pH'. It has been reviewed and accepted for publication in Asian Biomedicine. It will be scheduled for the next available issue.

We will keep you informed of further progress and you will be provided with a final proof copy. If you need any further information, please do not hesitate to contact us. Thank you once again for submitting your manuscript to us.

Best regards,

Editor-in-Chief  
Asian Biomedicine (Research Reviews and News)

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

## 1. ชื่อ-นามสกุล

(ภาษาไทย) นางสาวณัฐธยาน์ ช้วยเพ็ญ

(ภาษาอังกฤษ) Miss. Natthaya Chuaypen

เพศ  ชาย  หญิง      อายุ 24 ปี      สถานภาพสมรส  โสด  สมรส  หย่าร้าง

## 2. ที่อยู่ 1/1 หมู่ 1 ตำบลคลองตาล อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย 64120

เบอร์โทรศัพท์ (089)444-9186      E-mail : m\_pk\_nonentity@hotmail.com

## 3. การทำงาน :-

## 4. ประวัติการศึกษา

จบมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสวรรคค่อนันตวิทยา จังหวัดสุโขทัย

จบปริญญาตรีสาขา วท.บ. (วิทยาศาสตร์การแพทย์) มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปัจจุบันกำลังศึกษาปริญญาโทสาขา วท.ม. (ชีวเคมีทางการแพทย์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย