

STUDY OF NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (Ngal)
AS A BIOMARKER FOR DETECTION OF LEPTOSPIROSIS ASSOCIATED
ACUTE KIDNEY INJURY IN C57BL/6 MICE

Miss Sarinya Kumpunya



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพ นิวโทรฟิล เจลาตินเนส แอสโซซิเอทเต็ด โกลโกลิน
ในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพ นิวโทรฟิล เจลาติเนส แอสโซซิเอตเต็ด ไลโปคาลิน ในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6
โดย	นางสาวสรินยา คำปัญญา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	นายแพทย์ ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง กนิษฐา ภัทรกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(นายแพทย์ ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง กนิษฐา ภัทรกุล)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม)

สรินยา คำปัญญา : การศึกษาตัวชี้วัดชีวภาพ นิวโทรฟิล เจลาติเนส แอสโซซิเอทเต็ด ไลโปคาลิน ในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 (STUDY OF NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (Ngal) AS A BIOMARKER FOR DETECTION OF LEPTOSPIROSIS ASSOCIATED ACUTE KIDNEY INJURY IN C57BL/6 MICE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: นพ. ญัฐชัย ศรีสวัสดิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. พญ. กนิษฐา ภัทรกุล, 65 หน้า.

บทนำ นิวโทรฟิล เจลาติเนส แอสโซซิเอทเต็ด ไลโปคาลิน (Ngal) เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในระยะเริ่มต้นเมื่อเกิดภาวะไตวายฉับพลัน (Acute Kidney Injury, AKI) อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกเชิงลึกของการเกิดภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสมีความยากเนื่องจากไม่มีแอนติบอดีต่อ Ngal ในหนูแฮมสเตอร์และหนูตะเภา รายงานการศึกษาล่าสุดแสดงว่าหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 อาจมีประสิทธิภาพเป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองของภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของ Ngal เมื่อเกิดภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6

วิธีการศึกษา การทำให้เกิด AKI หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมียจะได้รับการฉีด Cyclophosphamide (Cy) ขนาด 300 mg/kg, i.p. เพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospores ต่อหนู 1 ตัวเมื่อครบ 3, 7, 14 และ 28 วัน ตรวจหาระดับ SCr, sNgal และ uNgal และบริเวณที่มีการแสดงออกของ Ngal ในเนื้อเยื่อไต

ผลการศึกษา หนูกลุ่ม Cy+Lepto ตรวจพบ AKI จากผลการตรวจระดับ serum และ urine Ngal มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่ม Cy control เมื่อครบ 3, 7, 14 และ 28 วัน หลังจากฉีดเชื้อ แต่ระดับ SCr เพิ่มขึ้น 1.5 เท่าในวันที่ 28 และพบว่ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้น คือ มี interstitial nephritis แต่หนูกลุ่ม Cy control มีท่อไตปกติ ไม่มี cell infiltration สอดคล้องไปกับการแสดงออกของ Ngal ที่บริเวณท่อไตส่วนนอกในช่วงเวลาเดียวกัน

สรุปผลการศึกษา Ngal สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการตรวจสอบการเกิด AKI จากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันด้วย cyclophosphamide

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5574169530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: NGAL / ACUTE KIDNEY INJURY / LEPTOSPIROSIS

SARINYA KUMPUNYA: STUDY OF NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (Ngal) AS A BIOMARKER FOR DETECTION OF LEPTOSPIROSIS ASSOCIATED ACUTE KIDNEY INJURY IN C57BL/6 MICE. ADVISOR: NATTACHAI SRISAWAT, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. KANITHA PATARAKUL, Ph.D., 65 pp.

Background: Neutrophil gelatinase associated lipocalin (Ngal) is an early biomarker of Acute Kidney Injury (AKI). However, to study the mechanisms of leptospirosis associated AKI in depth is difficult due to the lack of Ngal antibody to hamsters and guinea pigs. Recent report showed C57BL/6 mice could be a potential model of leptospirosis associated AKI.

Objective: To study of the Ngal as a biomarker for detection of AKI in leptospiral infection in C57BL/6 mice.

Materials and methods: To induce AKI, female C57BL/6 mice were injected with 300 mg/kg Cy for 2 days before injected with 10^8 leptospires/mice and were sacrificed on day 3, 7, 14 and 28 after injection. The SCr, sNal and uNgal levels were measured, and expression of the Ngal in kidney tissue was investigated.

Results: The Cy+Lepto group had serum and urine Ngal levels higher than those in the Cy control group on days 3, 7, 14 and 28 after injection. However, the serum creatinine increased 1.5 fold on days 28. The histopathology in the Cy+Lepto group clearly showed interstitial inflammation. But, the Cy control group showed normal interstitium. Consistent with the expression of the Ngal in the cortex and medulla at the same time.

Conclusion: In this study, we have demonstrated that the Ngal as a biomarker for detect leptospirosis associated AKI in C57BL/6 immunocompromised mice.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ทูลรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์นายแพทย์ ญัฐชัย ศรีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.พญ. กนิษฐา ภัทรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำสั่งสอน แนะนำและช่วยเหลือตลอดมาจนทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมดังเป้าหมาย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์นายแพทย์ อัญญาค์ ลีพวานิชกุล ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ งานวิจัยส่วนสัตว์ทดลองตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณ พ.ท. นพดล แสงจันทร์ ร.ต. ภัทร กองมณี และผู้ช่วยวิจัย ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลืองานวิจัยส่วนสัตว์ทดลองตลอดเวลาที่ผ่านมา ณ กองวิเคราะห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

ขอขอบพระคุณนายปรีชา เรืองเวชวรชัย ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลืองานวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณนายประยูร แซ่ลี ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลืองานวิจัยส่วนการ เตรียมเชื้อเลปโตสไปรา ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านโรคไตในภาวะ วิกฤตฯ และคุณภรจีรา วงศ์เนตร ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ทำวิจัยหลักและช่วยประสาน งานวิจัยเป็นอย่างดีตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ นายวศิน มนุประเสริฐ นาวสาวศศิภา เตชะบุรณ์ และเพื่อนๆที่คอยให้ความ ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้ที่ให้กำลังใจและอยู่เบื้องหลังความสำเร็จ ทุกอย่างของผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ต
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question).....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.5 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย.....	3
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework).....	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI).....	4
2.2 บทบาทของตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ในภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI).....	5
2.3 โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis).....	7
2.3.1 จุลชีววิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา.....	7

2.3.2 ลักษณะทางคลินิก	9
2.3.3 การตรวจวินิจฉัยโรคไตเรื้อรังทางห้องปฏิบัติการ	10
2.4 กลไกที่ทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลันจากโรคไตเรื้อรัง	11
2.5 ชีววิทยาของ Ngal	13
2.5.1 โครงสร้างและการแสดงออกของ Ngal	13
2.5.3 บทบาทของ NGAL ที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในระยะเริ่มต้น (early marker biomarker) ของ AKI	17
2.6 ไซโคลฟอสฟาไมด์ (Cyclophosphamide)	19
2.6.1 เมแทบอลิซึมของไซโคลฟอสฟาไมด์	19
2.6.2 เกล็ดจุลนศาสตร์ของไซโคลฟอสฟาไมด์	20
2.7 การศึกษาผลของการติดเชื้อไตเรื้อรังในหนูเมาส์สายพันธุ์ต่างๆ	23
บทที่ 3	29
วิธีการวิจัย	29
3.1 รูปแบบการวิจัย	29
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	29
3.2.1 การเตรียมเชื้อไตเรื้อรัง	29
3.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง	29
3.2.3 การดำเนินการทดลองในสัตว์ทดลอง	30
3.2.4 การตรวจยืนยันการติดเชื้อไตเรื้อรัง	30
3.2.5 การเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะและอวัยวะ	31
3.2.6 การวัดระดับ Creatinine และ Ngal	31
3.2.7 การวิเคราะห์การเกิด interstitial nephritis และ tubular injury แบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative)	31

3.2.8 การวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี immunohistochemistry.....	32
3.3 การรวบรวมข้อมูล.....	32
3.4 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	32
บทที่ 4	33
ผลการวิจัย	33
4.1 การติดเชื้อเลปโตสไปราซึ่มทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลันในหนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6.....	33
4.2 ระดับของ serum และ urine Ngal ในหนูเม้าส์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราแล้วชักนำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน.....	36
4.3 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ในไตหนูเม้าส์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราแล้วชักนำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน	38
บทที่ 5	43
อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ	43
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	43
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	47
5.3 ข้อเสนอแนะ	47
รายการอ้างอิง	48
ภาคผนวก.....	52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	การจัดจำแนกตามสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปรา.....	9
ตารางที่ 2	แสดงรายการจัดจำแนก lipocalin ที่รู้จักแบ่งเป็นประเภท kernel และ outlier lipocalin	14
ตารางที่ 3	แสดงการเปรียบเทียบของ NGAL ที่ homologue กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น.....	16
ตารางที่ 4	แสดงการตรวจเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธีเพาะเชื้อ (culture) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อไตและวิธี PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของหนูทดลองหลังจากได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ	33
ตารางที่ 5	แสดงค่าเฉลี่ย sCr.....	53
ตารางที่ 6	แสดงค่าเฉลี่ย sCr.....	55

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
รูปที่ 2 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลันตาม RIFLE criteria และ AKIN criteria (11)....	5
รูปที่ 3 แสดง conceptual model ของภาวะไตวายฉับพลัน และ biomarker ต่างๆ (12).....	6
รูปที่ 4 แสดงชนิดของงานวิจัยของ biomarker พบว่าการศึกษาในปัจจุบันจะอยู่ที่ระยะ discovery และ validation เป็นหลัก (13)	7
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของเชื้อเลปโตสไปราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (1).....	8
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรา (14).....	8
รูปที่ 7 แสดงระยะต่างๆหลังจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา (14).....	10
รูปที่ 8 แสดงกลไกของเชื้อเลปโตสไปราต่อการกระตุ้น signaling pathway ที่ renal tubular epithelial cell (19).....	12
รูปที่ 9 แสดงลักษณะของ lipocalin fold (20)	13
รูปที่ 10 แสดงสังเคราะห์ mRNA โดยยีนของ human และ mouse NGAL (20).....	16
รูปที่ 11 เมแทบอลิซึมของไซโคลฟอสฟาไมด์ (31).....	20
รูปที่ 12 แสดงระดับ BUN (33).....	21
รูปที่ 13 แสดงระดับ creatinine (33).....	22
รูปที่ 14 model ของ NGAL trafficking ใน nephron ในสภาวะปกติ (non AKI) และภาวะไตวายฉับพลัน (AKI) (30).....	23
รูปที่ 15 แสดงผลของเวลาการให้ Cy ขนาด 300 mg/kg ในหนูเมาส์สายพันธุ์ Balb/c ที่ฉีดเชื้อ....	24
รูปที่ 16 แสดงผลการย้อม immunohistochemistry ต่อเชื้อเลปโตสไปราในไตของหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/SCID (35)	25
รูปที่ 17 แสดงผลการย้อม H&E ในไตหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ที่มีลักษณะการเกิด tubular injury และ necrosis (35).....	25
รูปที่ 18 แสดงผลการย้อม H&E ในไตหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/SCID ที่มีลักษณะการเกิด tubular injury และ necrosis (35).....	25

รูปที่ 19 แสดงผลการวัดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะต่างๆของหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ, C3H/HeJ-SCID (36).....	26
รูปที่ 20 แสดงภาพระดับการเกิด interstitial nephritis ที่ไตของหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา รูป a,b แสดง nephritisgrade + ที่ขนาด 10^3 leptospire รูป c,d แสดง nephritisgrade ++ ที่ขนาด 10^3 leptospire ที่กำลังขยายกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า (10).....	27
รูปที่ 21 แสดงภาพการตรวจสอบจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในไตด้วยวิธี immunofluorescence จากการทำ imprint sample รูป a หนูเมาส์ที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ รูป b หนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ขนาด 10^3 leptospire รูป c หนูเมาส์สายพันธุ์ CBA ที่ขนาด 10^3 leptospire รูป d หนูเมาส์สายพันธุ์ A ที่ขนาด 10^3 leptospire ที่กำลังขยายกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า (10).....	28
รูปที่ 22 แสดงขั้นตอนการศึกษาในสัตว์ทดลอง.....	30
รูปที่ 23 แสดงระดับความรุนแรงของ tubular injury score ที่ไตของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว (n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) *P < 0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม	34
รูปที่ 24 แสดงลักษณะ interstitial nephritis ในชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว (n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า	35
รูปที่ 25 แสดงระดับ serum creatinine ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว.....	36
รูปที่ 26 แสดงระดับ serum Ngal ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก.....	37
รูปที่ 27 แสดงระดับ urine Ngal ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก.....	38

รูปที่ 28 แสดงค่าระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal โดยประเมินจากระดับความเข้มของการติดสีในเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก..... 39

รูปที่ 29 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ในชิ้นเนื้อไตของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว..... 40

รูปที่ 30 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่บริเวณชิ้นเนื้อไตชั้นนอก renal cortex ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว..... 41

รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่บริเวณชิ้นเนื้อไตชั้นใน renal medulla ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว..... 42

รูปที่ 32 ชิ้นเนื้อไตย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มควบคุมที่กำลังขยายของกล็องจุลทรรศน์ 400 เท่า..... 53

รูปที่ 33 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มทดสอบขนาด 10^3 leptospire ต่อหนู 1 ตัว..... 54

รูปที่ 34 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วย H&E ของหนูกลุ่มทดสอบขนาด 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว 54

รูปที่ 35 ชิ้นเนื้อไตย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide อย่างเดียวเมื่อครบ 14 วันที่กำลังขยายของกล็องจุลทรรศน์ 200 เท่า 55

รูปที่ 36 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^3 leptospire ต่อหนู 1 ตัวเมื่อครบ 14 วัน 56

รูปที่ 37 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว เมื่อครบ 14 วัน..... 56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AKI	=	Acute Kidney Injury
AKIN	=	Acute Kidney Injury Network
AIN	=	Acute interstitial nephritis
ATN	=	Acute tubular necrosis
AUC	=	Area under the curve
CD	=	Collecting duct
Cy	=	Cyclophosphamide
CYP	=	Cytochrome P450
DCT	=	Distal convoluted tubule
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	=	Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris
GFR	=	Glomerular filtration rate
Hap1	=	Haemolysis associated protein 1
H&E	=	Hematoxylin and eosin stain
IL-1 β	=	Interleukin-1 beta
IL-6	=	Interleukin-6
iNOS	=	Inducible NO synthase
kDa	=	KiloDalton
Lcn 2	=	Lipocalin 2
LD ₅₀	=	Median Lethal Dose
MAT	=	Microscopic agglutination test
MCP1	=	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP-9	=	Matrix metalloproteinase-9
NGAL	=	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
OMPs	=	Outer membrane protein
PCR	=	Polymerase chain reaction
ROC	=	Receiver operating characteristic
SCr	=	Serum creatinine

SV-40	=	Simian virus
sNgal	=	Serum Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
TALH	=	Thick ascending limbs of Henle
TLR 2	=	Toll-like receptor 2
TLR 4	=	Toll-like receptor 4
TNF- α	=	Tumor necrosis factor alpha
uNgal	=	Urine Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

1



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์มาสู่คน พบอุบัติการณ์ของโรคสูงในพื้นที่แถบเขตร้อน มีช่วงระบาดหนักในฤดูฝนเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม spirochete โดยเชื้อก่อโรคที่สำคัญคือ *Leptospira interrogans* ซึ่งการติดเชื้อสู่คนส่วนใหญ่สามารถได้รับโดยตรงหรือทางอ้อมจากการสัมผัสปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อและจากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ (1-3) จากข้อมูลเฝ้าระวังโรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทย ตั้งแต่วันที่ 1 ม.ค. - 29 พ.ย. 2555 พบผู้ป่วย 3,673 ราย จาก 73 จังหวัด คิดเป็นอัตราป่วย 5.78 ต่อแสนประชากร เสียชีวิต 51 ราย คิดเป็นอัตราตาย 0.08 ต่อแสนประชากร โดยจังหวัดระนองพบผู้ป่วยสูงสุด 209.07 ต่อแสนประชากร (4) มีรายงานการศึกษาพบว่าการติดเชื้อจะทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI) ร้อยละ 31.4 ในผู้ป่วยที่รับการรักษาในแผนกผู้ป่วยหนัก (5)

ภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis-associated AKI) จะส่งผลให้อัตราการกรองที่ไต (glomerular filtration rate, GFR) ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการสะสมของ nitrogenous waste products ได้แก่ urea และ creatinine จึงตรวจพบระดับ creatinine ในปัสสาวะและเลือดเพิ่มขึ้นมีอาการทางคลินิก คือ มีอาการคล้ายไข้หวัด เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อโดยเฉพาะที่บริเวณน่องและภาวะไตวายส่วนใหญ่เป็นแบบ non-oliguric ผู้ป่วยจะมีภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ (hypokalemia) และมีปัสสาวะออกมากเนื่องจากเกิดความผิดปกติในการดูดกลับโซเดียมได้ลดลงที่บริเวณท่อไตส่วนต้นเป็นผลจากสารพิษของเชื้อเลปโตสไปราและยังส่งผลให้เกิด acute interstitial nephritis ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน (2) ดังนั้น การตรวจพบ AKI ในโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะเริ่มต้นจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยทำให้การรักษาโรคได้รวดเร็วและลดอัตราการตาย วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวินิจฉัย AKI คือ การวัดระดับ serum creatinine (SCr) ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการทำงานของไตที่ลดลงซึ่งมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการตรวจวัดได้แก่ อายุ และมวลกล้ามเนื้อ อีกทั้งการตรวจดังกล่าวยังไม่มีความไวเพียงพอต่อการบ่งบอกว่าเกิดการบาดเจ็บที่ไต (6) ปัจจุบันพบว่า Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในระยะเริ่มต้น (early biomarker) ของ AKI โดยจะมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนเมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ไต (renal injury) หลังจากไตขาดเลือด (ischemic) (7)

การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานพบว่าสัตว์ทดลองแบบจำลอง (animal models) สำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสที่ใช้ในการทดลองอย่างกว้างขวาง คือ หนูแฮมสเตอร์ (Hamster) และ หนูตะเภา (Guinea pig) (8, 9) อย่างไรก็ตามสัตว์ทดลองทั้ง 2 ชนิด ยังมีข้อจำกัดที่จะใช้ศึกษาพยาธิสภาพและกลไกการเกิดโรคในเชิงลึก เช่น มีแอนติบอดีต่อการศึกษาโรคต่างๆน้อย การนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองในการศึกษาระดับยีนต่อโรคที่สนใจมีประสิทธิภาพน้อยกว่าหนูเมาส์ ดังนั้นจึงได้มีการพยายามพัฒนาให้หนูเมาส์มีความไว (susceptible) ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา จากรายงานของ Santos และคณะในปีค.ศ. 2010 พบว่า หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 มีการตอบสนองต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสและมีระดับของ leptospiral load และเกิด interstitial nephritis ในไตที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น (10) ที่สำคัญหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 มีแอนติบอดีต่อ Ngal ซึ่งหนูแฮมสเตอร์และหนูตะเภาไม่มี จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 จะสามารถพัฒนาเป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองเพื่อศึกษา AKI เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรซิสได้หรือไม่ และการศึกษาครั้งนี้ยังได้นำ Ngal เข้ามาร่วมเป็นตัวชี้วัดในการเกิด AKI เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพใดๆ เพื่อช่วยวินิจฉัย AKI เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรซิส

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question)

1.2.1 หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 จะสามารถพัฒนาเป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองของภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสได้หรือไม่

1.2.2 Ngal สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จะตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันในโรคเลปโตสไปโรซิสได้หรือไม่ในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

เมื่อเกิดการบาดเจ็บที่เซลล์ของหน่วยไตจากการติดเชื้อเลปโตสไปราในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 จะเพิ่มการแสดงออกและการหลั่งโปรตีน Ngal ใน serum และ urine มากกว่าภาวะปกติ

1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.4.1 เพื่อพัฒนาให้หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 เป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองของภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส

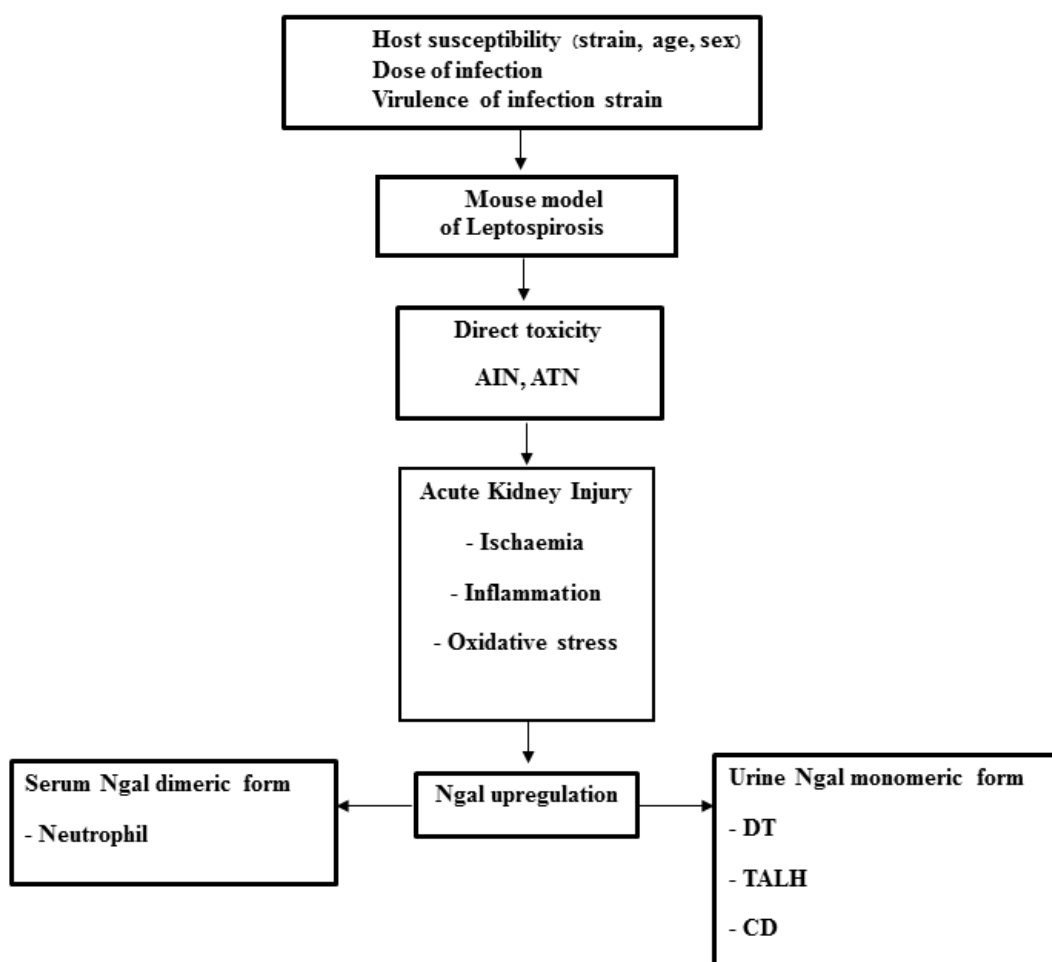
1.4.2 เพื่อศึกษาว่า Ngal สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จะตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันเมื่อเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปราในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6

1.4.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Ngal ในช่วงเวลาที่แตกต่างเมื่อเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปราในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6

1.5 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

ภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI) หมายถึง ภาวะที่เกิดจากการสูญเสียความสามารถของไตอย่างฉับพลันในการขจัดของเสีย เช่น urea creatinine

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จะนำมาใช้เป็นพื้นฐานวิจัยการศึกษากลไกและพยาธิสภาพของ AKI เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรซิส เพื่อปรับปรุงการรักษา AKI ที่ตรงเป้าหมายมากขึ้นและสามารถนำ Ngal มาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเมื่อเกิด AKI เมื่อใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 เป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองของโรคเลปโตสไปโรซิสมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

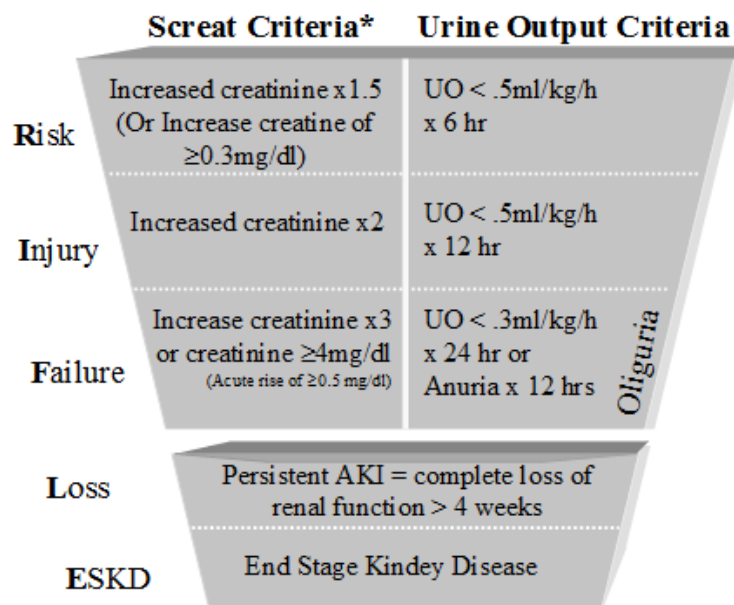
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI)

เกิดจากการสูญเสียความสามารถของไตอย่างฉับพลันในการขจัดของเสีย เช่น urea รวมทั้งการสูญเสียความสามารถในการควบคุมสารน้ำ และ electrolyte ผลที่ตามมาจากภาวะไตวายฉับพลัน ที่พบได้บ่อยเช่น volume overload, metabolic acidosis, hyperkalemia, hypo-hyponatremia และการสะสม nitrogen waste products ต่างๆ ในเลือด ก่อนปี พ.ศ. 2547 ได้มีการให้นิยามและเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลัน ในวารสารทางการแพทย์มากกว่า 35 นิยามสมัยกรีกโบราณ ได้เริ่มมีหลักฐานการกล่าวถึงภาวะไตวายฉับพลัน โดย Galen อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่เป็นระบบต้องรอจนกระทั่งในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 เมื่อ Bywaters และ Beals ได้รายงานการศึกษา ผู้ป่วยไตวายฉับพลัน เนื่องจาก crush injury ถัดมาอีก 10 ปี Homer Smith ได้บัญญัติคำศัพท์ “Acute Renal Failure” ขึ้น “Acute Renal Failure” ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม คำนิยามดังกล่าวไม่ได้มีการระบุเกณฑ์การวินิจฉัยที่ชัดเจน

ผลจากการขาดคำนิยามมาตรฐานนี้ได้ทำให้มีความหลากหลายของผลการศึกษาอุบัติการณ์ของโรค โดยพบอุบัติการณ์ของภาวะไตวายฉับพลันในแต่ละรายงานตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึง 25 และยังทำให้การเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพของมาตรการในการป้องกันและรักษาภาวะไตวายฉับพลัน เป็นไปด้วยความยากลำบาก

ในปี พ.ศ. 2547 คณะผู้เชี่ยวชาญซึ่งประกอบด้วย แพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยวิกฤต (intensivist) และ แพทย์โรคไต (nephrologist) ในนามของ Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) group จึงได้มีการริเริ่มการใช้เกณฑ์มาตรฐานในการวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลันร่วมกันเรียกว่า RIFLE criteria (11) (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับที่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานใน ภาวะ sepsis และ acute respiratory distress syndrome (ARDS) โดยมีการใช้ทั้งค่า glomerular filtration rate (GFR) และปริมาณปัสสาวะในการจัดกลุ่มผู้ป่วยตามความรุนแรงของโรค ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับความรุนแรง ได้แก่ Risk, Injury และ Failure และใช้ระยะเวลาของการสูญเสียการทำงานของไตในการบ่งบอกถึงผลลัพธ์ของโรค ได้แก่ Loss และ End Stage Kidney Disease หลังจากที่ RIFLE criteria ออกมาได้มีการนำไปใช้ศึกษาในผู้ป่วยไตวายฉับพลันในหอผู้ป่วยหนัก มากกว่า 550,000 รายทั่วโลก พบว่าสามารถใช้เกณฑ์ดังกล่าวในการทำนายการเสียชีวิตและความจำเป็นที่ต้องได้รับการบำบัดทดแทนไต ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 2 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลันตาม RIFLE criteria และ AKIN criteria (11)

2.2 บทบาทของตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ในภาวะไตวายฉับพลัน (acute kidney injury, AKI)

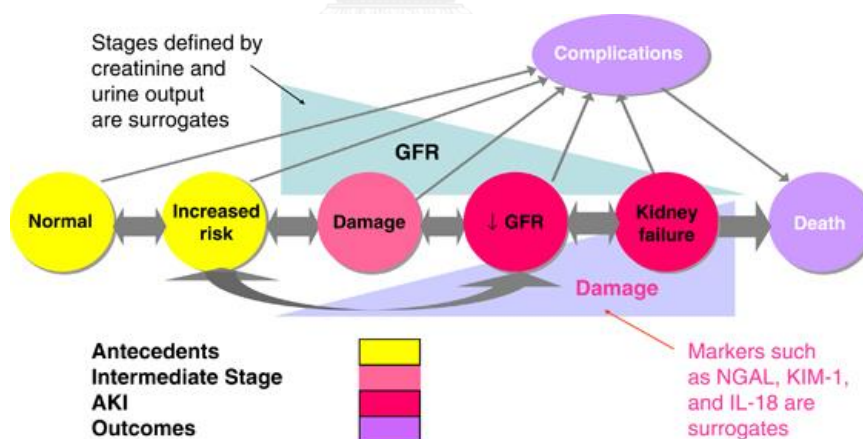
ในระยะเวลา 50 ปีที่ผ่านมา การวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลันยังต้องอาศัยซีรัม creatinine เป็นหลัก เป็นที่ทราบกันดีว่า การเพิ่มขึ้นของซีรัม creatinine จะเกิดภายหลังการลดลงของ GFR นอกจากนี้ จากการที่ได้กล่าวในตอนต้น พยาธิสภาพหลักที่พบในภาวะไตวายฉับพลันเกิดขึ้นที่ renal tubular epithelium ไม่ใช่ที่ glomeruli ทำให้ซีรัม creatinine ที่เป็น marker ของ GFR ไม่น่าจะเป็นตัวแทนที่ดีในการวินิจฉัยภาวะไตวายฉับพลัน และส่งผลให้การรักษาภาวะไตวายฉับพลันได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ ในระยะเวลาประมาณ 5 ปีที่ผ่านมา ได้มีความพยายามค้นหา biomarker ที่สามารถจะเป็นตัวแทนการทำงานของไต ซึ่งมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับ troponin T ที่ช่วยในการวินิจฉัยภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (renal troponin)

ในปี พ.ศ. 2551 Acute Kidney Injury Network (AKIN) ได้เผยแพร่รายงาน Conceptual model of AKI ซึ่งประกอบด้วยระยะ 4 ระยะ ได้แก่ “Antecedent” เป็นระยะก่อนการเกิดภาวะไตวายฉับพลัน “Intermediate stage” ระยะที่ไตเริ่มเข้าสู่ภาวะไตวายฉับพลัน “AKI” ระยะไตวายฉับพลัน และ “Outcome” ผลลัพธ์ที่เกิดจากภาวะไตวายฉับพลัน

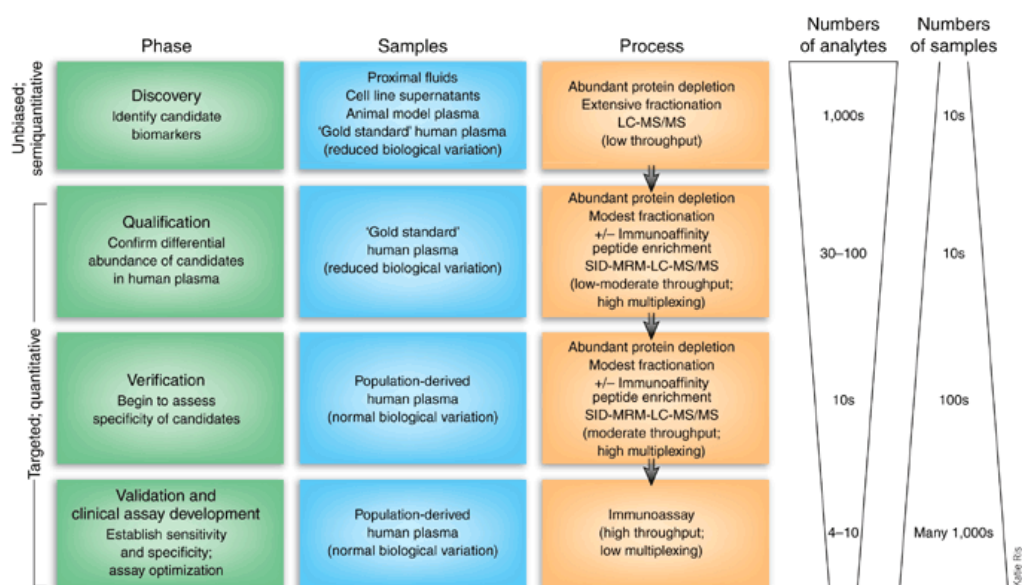
Conceptual model จะช่วยในการกำหนดคำถามวิจัยในการทดสอบ biomarker ในระยะต่างๆของภาวะไตวายฉับพลัน งานวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นที่การวินิจฉัย (diagnosis) และการพยากรณ์โรค (prognosis) เป็นหลัก ในขณะที่งานวิจัยทางด้าน “Outcome” ยังมีการศึกษาน้อยมาก (รูปที่ 3)

ในด้านชนิดของงานวิจัย งานวิจัยส่วนใหญ่ในปัจจุบัน จะมุ่งเน้นกับการค้นหา (discovery) ด้วยเทคนิคต่างๆเช่น proteomic analysis และทดสอบประสิทธิภาพ (validation) ของ biomarker แต่ในด้านของการนำไปใช้ในทางคลินิก (implementation) ยังมีการศึกษาน้อยมาก (รูปที่ 4)

เราสามารถตรวจหา biomarker ได้ทั้งในเลือด และปัสสาวะ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันส่วนใหญ่ จะทำการศึกษา biomarker ในปัสสาวะ เนื่องจากเชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะไตวายฉับพลันที่มากกว่า อย่างไรก็ตามการตรวจ biomarker ในปัสสาวะ ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากผู้ป่วยไตวายฉับพลันมักจะมีปริมาณปัสสาวะที่ลดลง (oliguria, anuria) นอกจากนี้ความเข้มข้นของปัสสาวะ (urine concentration) ยังมีผลต่อค่าของ biomarker ในปัสสาวะ การตรวจหา biomarker ในเลือดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ biomarker เช่นเดียวกัน เช่น การได้รับการบำบัดทดแทนไต ภาวะสมดุลน้ำในร่างกาย



รูปที่ 3 แสดง conceptual model ของภาวะไตวายฉับพลัน และ biomarker ต่างๆ (12)



รูปที่ 4 แสดงชนิดของงานวิจัยของ biomarker พบว่าการศึกษาในปัจจุบันจะอยู่ที่ระยะ discovery และ validation เป็นหลัก (13)

2.3 โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis)

โรคเลปโตสไปโรซิส เป็นโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คน ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก มีอุบัติการณ์ของโรคสูงในพื้นที่แถบเขตร้อนโดยเฉพาะในแถบอเมริกาใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีช่วงระบาดหนักในฤดูฝน เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรียกลุ่ม spirochete โดยเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญ คือ *Leptospira interrogans* การติดเชื้อสามารถได้รับโดยตรงจากการสัมผัส เลือด ปัสสาวะ อวัยวะของสัตว์ที่ติดเชื้อและจากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยที่เชื้อเลปโตสไปราจะแทรกซึมผ่านผิวหนังที่มีบาดแผลและแบ่งตัว แพร่กระจายอย่างรวดเร็วตามกระแสเลือดจนทำให้เกิดภาวะ systemic infection ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันขึ้นกับความรุนแรงของโรค ซึ่งอาการที่พบได้บ่อย คือ มีไข้ขึ้นสูง หนาวสั่น ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะที่บริเวณน่อง

2.3.1 จุลชีววิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา

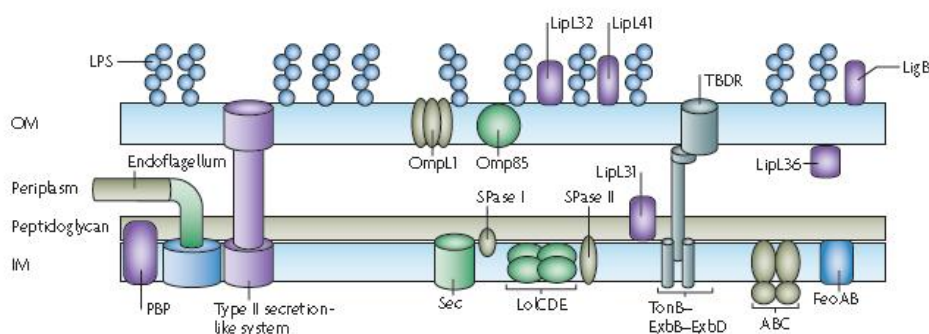
เชื้อเลปโตสไปรา จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Spirochetes ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (obligate aerobic) มีลักษณะเป็นเกลียวบางมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.15-0.25 μm มีความยาว

10-20 μm และมีการร่วมกันของทั้ง Gram-positive และ Gram-negative เมื่อศึกษาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบว่า ที่ส่วนปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างของตัวเชื้อจะมีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ (hooked ends) และมี flagella 1 เส้นอยู่ที่ปลายทั้ง 2 ด้านที่จะช่วยในการไชเข้าสู่เนื้อเยื่อ (1, 14) ดังรูปที่ 5 ซึ่งมีการจัดจำแนกตามสปีชีส์โดยอาศัยความใกล้เคียงของสารพันธุกรรม ดังแสดงในตารางที่ 1

โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปราจะมีทั้งส่วน inner และ outer membrane ประกอบไปด้วย lipoproteins, lipopolysaccharides, endotoxins, peptidoglycan ส่วน outer membrane จะมีโปรตีนสำคัญหลายตัวที่จะเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงซึ่งจะเป็นตัวกลางระหว่างที่เกิด host-leptospire interaction เช่น LipL 32 หรือ haemolysis associated protein 1 (Hap1) แสดงในรูปที่ 6 จะพบในเชื้อที่ก่อโรคเท่านั้นและยังมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเลปโตสไปโรซิส (14)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะของเชื้อเลปโตสไปราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (1)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปรา (14)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกตามสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปรา

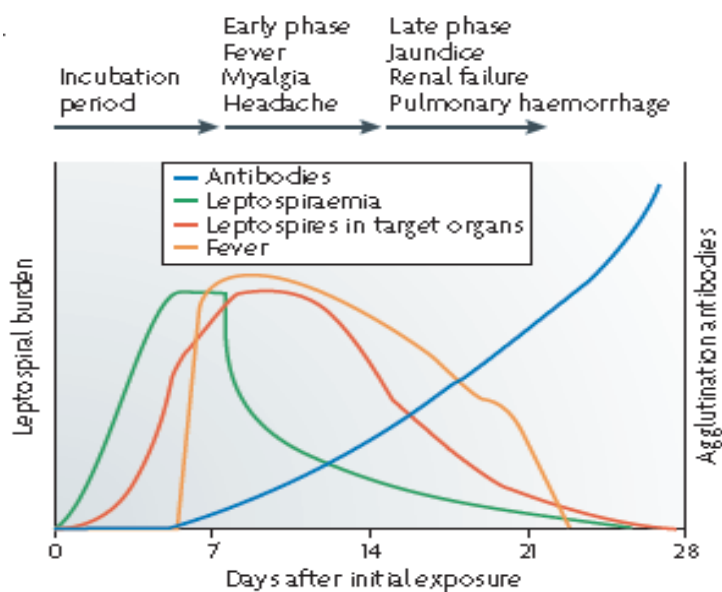
Species	Serovar	Reference strain	Serogroup
Pathogens			
<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico	Australis
	Bratislava	Jez Bratislava	Australis
	Bataviae	Van Tienen	Bataviae
	Canicola	Hond Utrecht IV	Canicola
	Hebdo	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA	Icterohaemorrhagiae
	Copenhageni	M 20	Icterohaemorrhagiae
	Lai	Lai	Icterohaemorrhagiae
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Salinem	Pyrogenes
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus 127	Ballum
	Castellonis	Castellon 3	Ballum
	Javanica	Veldrat	Javanica
		Bataviae 46	
	Sejroe	M 84	Sejroe
	Tarassovi	Perepilitsin	Tarassovi
Saprophytes			
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I	Semarang

ดัดแปลงจาก Bharti และคณะปี ค.ศ. 2003 (1)

2.3.2 ลักษณะทางคลินิก

เมื่อมีการติดเชื้อเลปโตสไปราจนทำให้เกิดภาวะ systemic infection ขึ้นจะส่งผลไปกระตุ้นให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติได้ในหลายอวัยวะที่เป็นเป้าหมายของเชื้อ เช่น ไต ปอด ตับ ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับความรุนแรง จำนวน และการแบ่งตัวของเชื้อ จากการศึกษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส อาการของผู้ป่วยหลังจากติดเชื้อในช่วง 3 วันแรกเป็นช่วง early phase จะทำให้เกิดภาวะ leptospiraemia จึงมีอาการไข้ขึ้นสูง (95.5%) คล้ายไข้หวัด อาจจะหนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวด

กล้ามเนื้อโดยเฉพาะบริเวณน่อง โดยอาการส่วนใหญ่จะหายได้เองภายใน 1 สัปดาห์และพบว่าประมาณ 5-15% ของผู้ป่วยจะพัฒนาอาการที่มีความรุนแรงมากขึ้น เป็นช่วง severe late phase จากการที่เชื้อออกจากกระแสเลือดและแทรกซึมเข้าไปตามอวัยวะเป้าหมายต่างๆ จะพบภาวะไตวายฉับพลัน (86.4%) ตัวเหลือง (63.6%) เลือดออกในปอด (80%) ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งภาวะไตวายฉับพลันที่พบในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมักจะเป็นแบบ non oliguric และพบว่ามีสภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ (41-45%) (14-16)



รูปที่ 7 แสดงระยะต่างๆหลังจากการติดเชื้อเลปโตไปรา (14)

2.3.3 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสจะดูจากลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วย ซึ่งจะต้องวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นที่มีลักษณะอาการทางคลินิกคล้ายกัน เช่น ไข้หวัดใหญ่ ไข้เลือดออก มาลาเรีย จึงต้องตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย ซึ่งจะแบ่งการตรวจได้ดังนี้

1 direct detection

1.1 culture leptospira ทำโดยนำตัวอย่างส่งตรวจเลือดของผู้ป่วยหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ 2-3 หยดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมหลังจากนั้นจึงแบ่งไปตรวจหาเชื้อโดยใช้ dark-field microscopy จะเห็นเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ เคลื่อนไหวรวดเร็ว วิธีนี้ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการดูเชื้อแยกจากสิ่งปลอมปนได้

1.2 polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของโรค โดยตัวอย่างส่งตรวจได้ทั้งจาก เลือด ปัสสาวะ มีความไวและจำเพาะสูง ใช้เวลาไม่นาน แต่มีราคาสูงและต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ

2 indirect detection

2.1 Microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจยืนยันโรคเลปโตสไปโรซิส โดยจะใช้ซีรัมจากผู้ป่วย 2 ตัวอย่างโดยที่ระยะห่างในการเจาะเลือดขึ้นกับระยะเวลาที่มาพบแพทย์และมีอาการโดยจะเจาะครั้งแรก ตั้งแต่ผู้ป่วยมีอาการชัดเจนและเจาะครั้งที่ 2 ห่างกัน 5-7 วันก็เพียงพอที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดี เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ผลการตรวจจะให้ผลบวกเมื่อมีค่าแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่าเมื่อตรวจซีรัม 2 ครั้ง วิธีนี้มีความจำเพาะ สามารถบอกถึง serovar ของเชื้อได้ แต่มีวิธีซับซ้อนต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและต้องอาศัยเวลา 1-2 สัปดาห์จึงจะทราบผล จึงเหมาะที่จะตรวจยืนยันการวินิจฉัย

3 การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา (serology)

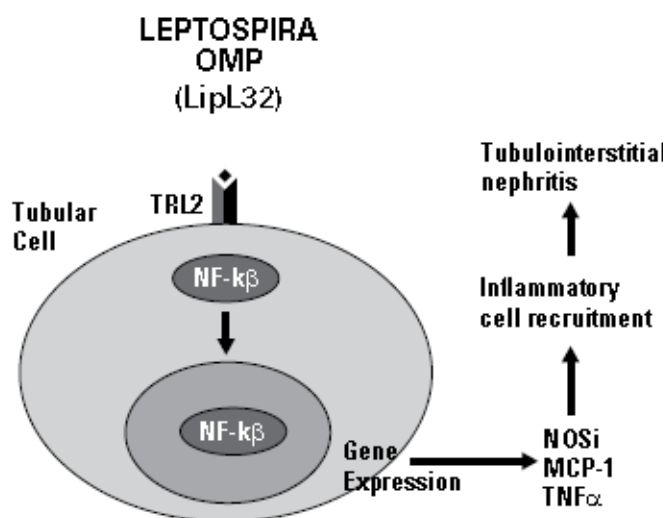
3.1 LEPTO dipstick และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ซึ่งทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว แต่มีความจำเพาะต่ำกว่าวิธี MAT และ PCR

2.4 กลไกที่ทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส

ไตเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักของเชื้อเลปโตสไปรา จากการศึกษาของ Marshall ปีค.ศ. 1975 ในหนูเมาส์เชื้อเลปโตสไปราพบว่า จะแบ่งตัวและแทรกซึมเข้าไปในกระแสเลือดใน 2 วันแรกทำให้เกิด endothelial damage วันที่ 4-8 เชื้อจะเข้าไปที่ interstitial tissue ทำให้เกิด edema neutrophils infiltration และในวันที่ 10 จะเห็นเชื้อเกาะอยู่ที่ epithelial cell ของ proximal tubule ทำให้เกิด proximal tubular injury และเชื้อจะเข้าไปที่ tubular lumen ในวันที่ 14 (16) โปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane protein; OMPs) ของเชื้อเลปโตสไปรา มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพที่ไต ในปี ค.ศ. 2006 Yang และคณะ ได้ทำการศึกษา OMPs ต่อการกระตุ้น Toll like receptor (TLR) ใน PKSV-PR cells ที่แยกได้จาก proximal tubule จากไตของหนูเมาส์และ inoculate OMPs ที่สกัดจาก *Leptospira santarosai* serovar Shermani และ LipL 32 พบว่า มีผลเพิ่มการแสดงออกของ TLR 2, iNOS, MCP-1 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันใน HEK 293 cells (17)

จากการที่ OMPs ของเชื้อเลปโตสไปรา มีผลโดยตรงต่อการเกิดพยาธิสภาพที่ท่อไต ซึ่ง TLR เป็นโมเลกุลเฉพาะที่จะจดจำโครงสร้างของเชื้อต่างๆที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งเป็นด่านแรกในการป้องกัน

ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยมีกลไก คือ เมื่อ OMPs ของเชื้อเลปโตสไปราจับกับ TLR 2 ที่บริเวณ epithelial cells ของ proximal tubule cells จะนำไปสู่การถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน NF- κ B pathway เพิ่มการแสดงออกของ iNOS, TNF- α และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง MCP-1 ซึ่งจะไปชักนำให้เกิดการ recruit inflammatory cells เช่น neutrophils มายังบริเวณที่อักเสบและมีการหลั่ง cytokines จนทำให้เกิด tubulointerstitial nephritis ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่จะทำให้เกิด AKI ดังแสดงในรูปที่ 8 (18)



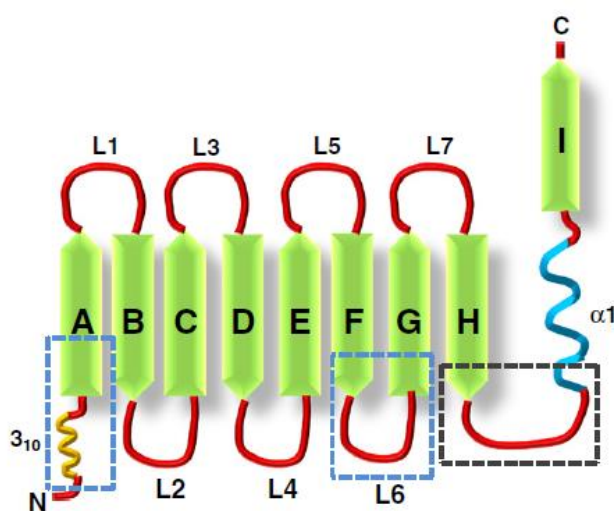
รูปที่ 8 แสดงกลไกของเชื้อเลปโตสไปราต่อการกระตุ้น signaling pathway ที่ renal tubular epithelial cell (19)

เมื่อเกิด proximal tubular injury จากกลไกของเชื้อเลปโตสไปราไปส่งผลกระทบต่อการทำงานที่ผิดปกติที่บริเวณท่อไตส่วนต้นขึ้น จากการศึกษาของ Araujo และคณะในปี ค.ศ. 2010 ด้วยวิธี immunohistochemistry ในผู้ป่วย AKI ในโรคเลปโตสไปโรซิพบว่า มีการแสดงออกของ sodium/NHE3, aquaporin 1, α -Na⁺ K⁺ ATPase ลดลงที่บริเวณ proximal tubule cells ส่งผลทำให้ลดการดูดกลับของโซเดียมและน้ำจึงพบว่ามีภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ ปัสสาวะออกมาก และส่งผลไปเพิ่มการขนส่งโซเดียมและน้ำที่ distal tubule, descending thin limb of the loop of Henle ซึ่งพบว่ามี การแสดงออกของ aquaporin 1 และ α -Na⁺ K⁺ ATPase เพิ่มขึ้นและจะทำให้มีการขับโปแตสเซียมออกมาในปัสสาวะมากขึ้น (18)

2.5 ชีววิทยาของ Ngal

2.5.1 โครงสร้างและการแสดงออกของ Ngal

Lipocalins คือ family ที่มีความหลากหลายของ secreted protein ขนาดเล็กทำหน้าที่เป็นตัวพาในการขนส่งโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็น lipophilic ในปีค.ศ. 2011 ได้มีการค้นพบหน้าที่ของโปรตีนเพิ่มขึ้น ประกอบด้วย การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ เช่น α 1-microglobulin, การเปลี่ยนแปลงของเซลล์และการยึดติดกันระหว่างเซลล์ เช่น Purpurin โปรตีนที่เป็นสมาชิกใน lipocalins family จะมีลำดับของกรดอะมิโนพื้นฐานที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่จะมีส่วนร่วมของลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันน้อยมาก อย่างไรก็ตาม โปรตีนทุกตัวจะมีโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิร่วมกันเป็นลักษณะที่เรียกว่า “lipocalin fold” ประกอบด้วย โครงสร้างที่เรียงตัวแบบ antiparallel ของโปรตีนชนิด N-terminal 3–10 helix ตามด้วย beta sheet 8 สาย ส่งผลให้เกิดช่องแบบ cup-shaped ที่สามารถจับกับ ligand ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยที่จะเชื่อมต่อกันด้วย loop ขนาดเล็ก (L1-L7) ซึ่งที่ loop L1, L3, L5 และ L7 จะเกิดเป็นส่วนปลายเปิดของโมเลกุล เช่น เปิดให้เป็นส่วน ligand binding site ของ NGAL (รูปที่ 9) ซึ่งส่วน ligand binding site นี้พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะแตกต่างกัน จึงทำให้เพิ่มความหลากหลายของ ligand ที่จะมาจับกับโปรตีน lipocalin อย่างไรก็ตามโปรตีน lipocalin จะมีส่วนร่วมของลำดับกรดอะมิโน 3 ตำแหน่งและเป็นโครงสร้างแบบอนุรักษ์ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าว คือ structurally conserved regions หรือ SCRs ซึ่งมีประโยชน์ในการจัดจำแนก lipocalin ได้เป็น 2 ประเภท คือ kernel และ outlier lipocalin ดังในตารางสรุปที่ 2 จึงสรุปได้ว่า lipocalin family มีลักษณะทางโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกัน(20)



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของ lipocalin fold (20)

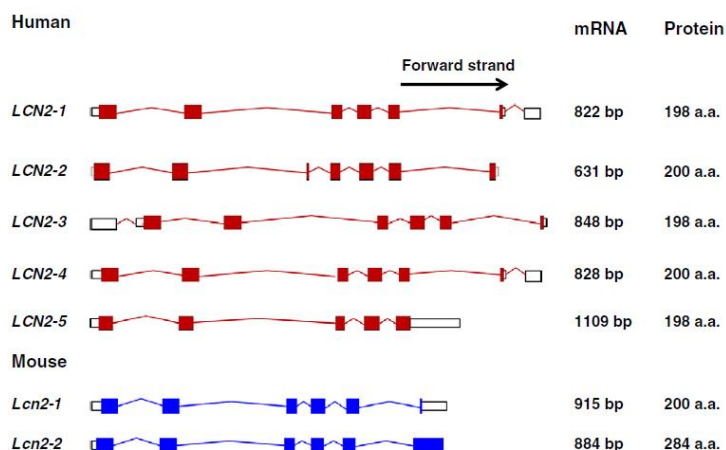
ตารางที่ 2 แสดงรายการจัดจำแนก lipocalin ที่รู้จักแบ่งเป็นประเภท kernel และ outlier lipocalin

Lipocalin (abbreviation)	Molecular weight (kDa)	Properties and function(s)
Kernel lipocalins		
α 1-microglobulin (A1M)	33	Heme Scavenger, an antioxidant and immunoregulator.
Apolipoprotein D (ApoD)	29–32	Member of the HDL, Apo D has binding affinity for cholesterol, progesterone, pregnenolone, bilirubin and arachidonic acid. It is proposed to be involved in maintenance and repair of central and peripheral nervous systems.
α 2-microglobulin (A2U)	18.7	Major urinary protein of the male rat with extensive sequence homology to many lipid binding proteins.
Outlier lipocalins		
α 1-Acid glycoprotein	40	Acute phase serum protein secreted by (AAAG) the liver in response to inflammation, stress, and various malignancies and affects pharmacokinetics of drugs.

ดัดแปลงจาก Chakraborty และคณะปี ค.ศ.2012 (20)

Human Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) มีชื่อเรียกอื่นที่รู้จักกันว่า siderocalin, uterocalin, 24p3 และ human neutrophil lipocalin (HNL) เป็นสมาชิกของ lipocalin family ที่ประกอบด้วย 198 กรดอะมิโนสายยาวของ glycoprotein ที่สังเคราะห์จากยีนบนตำแหน่งโครโมโซมที่ 9q34.11 ยีนของ NGAL มี 7 exon จะสังเคราะห์ได้อย่างน้อยที่สุด 5 mRNA ซึ่งโดยทั่วไปจะสังเคราะห์ได้ 198 กรดอะมิโน secreted protein พบว่า human NGAL แหล่งที่มาที่พบครั้งแรกเป็นโปรตีนที่แยกจาก secondary granules ของ neutrophils มีขนาด 25 kDa ชนิด glycoprotein และมีปฏิสัมพันธ์ผ่านทาง disulfide linkage กับ matrix metalloproteinase-9, MMP-9 เป็นเอนไซม์ gelatinase ที่หลั่งโดย neutrophils ซึ่งจะทำให้เกิดการเสียหายของ basement membrane และ extracellular matrix ประกอบด้วย cartilage proteoglycan, type I gelatin และ collagens type I, IV, V และ XI ในส่วนของหนู mouse มี homologue ของ NGAL เรียกว่า lipocalin 2 (Lcn 2) มีชื่อเรียกอื่นที่รู้จักกันว่า SV-40 induced 24P3 protein, secreted inducible protein 24 และ superinducible protein 24 (SIP24) และสังเคราะห์โดยยีนบนโครโมโซมตำแหน่งที่ 2 27.0 cM ยีนของ Lcn 2 มี 6 exon และสังเคราะห์ได้ 2 mRNA พบว่า แยก Lcn 2 ได้เป็นครั้งแรกจากการ culture ของเซลล์ murine kidney ที่ infect ด้วย simian virus (SV-40) มีขนาด 25 kDa เป็น monomeric ของ MMP-9(20) (รูปที่ 10)

การแสดงออกของ NGAL พบว่ามีระดับที่ต่ำมากใน biological fluid ที่สภาวะปกติ มีประมาณ 20 ng/ml ใน serum และ urine มีประจุบวก (pI>7.4) สามารถพบการแสดงออกของ NGAL ได้ที่ liver, spleen, lung, bladder และ kidney โดยที่ในสภาวะปกติ renal clearance เป็นกลไกหลักในการกำหนดระดับของ NGAL ที่ต้องผ่านการกรองที่ glomeruli จากการที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีประจุบวก ซึ่งที่ glomeruli โมเลกุลใน plasma ที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 70 kDa และมีประจุลบจะไม่ถูกกรอง ในทางทฤษฎีที่ไตจะกรอง NGAL ได้ 3.4–4 mg ต่อวัน (20 ng/ml × 120–140 ml/min glomerular filtration rate, GFR) และ NGAL จะถูกจับที่บริเวณ proximal tubule ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการ endocytosis ที่ด้าน apical cell membrane และถูกย่อยสลายภายใน lysosome ได้เป็น fragment ขนาด 14 kDa (21)



รูปที่ 10 แสดงสังเคราะห์ mRNA โดยยีนของ human และ mouse NGAL (20)

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ NGAL ที่ homologue กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น คน และลิงชิมแปนซีพบว่ามีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนถึง 98% ส่วนในหนู mouse และ rat มีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่าที่ 62% และ 63% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มุ่งเน้นที่หน้าที่ของ NGAL โดยใช้ mouse model แม้ว่าจะมีข้อจำกัดของลำดับกรดอะมิโนแต่ lipocalin family จะมีส่วนร่วมของ SCRs ที่เป็น homologue กันซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยส่วน short stretches ของกรดอะมิโนแบบ hydrophobic ที่มีนัยสำคัญในการตอบสนองต่อ conservation ของ ligand เช่น siderophore ของแบคทีเรีย (20)

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบของ NGAL ที่ homologue กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

Species	Gene symbol	Other aliases	Length of protein (amino acids)	Percent similarity to human LCN2
Human	LCN 2	24p3, MSF1, NGAL	198 a.a.	–
Mouse	Lcn2	24p3, Ngal, SV40-I24p3P	200 a.a.	62%
Rat	Lcn2	Ngal, p25, lipocalin-2	198 a.a.	80%
Chimpanzee	LCN2	NGAL, Oncogene 24p3	198 a.a.	(isoforms 1-3) 98%

ดัดแปลงจาก Chakraborty และคณะปี ค.ศ. 2012 (20)

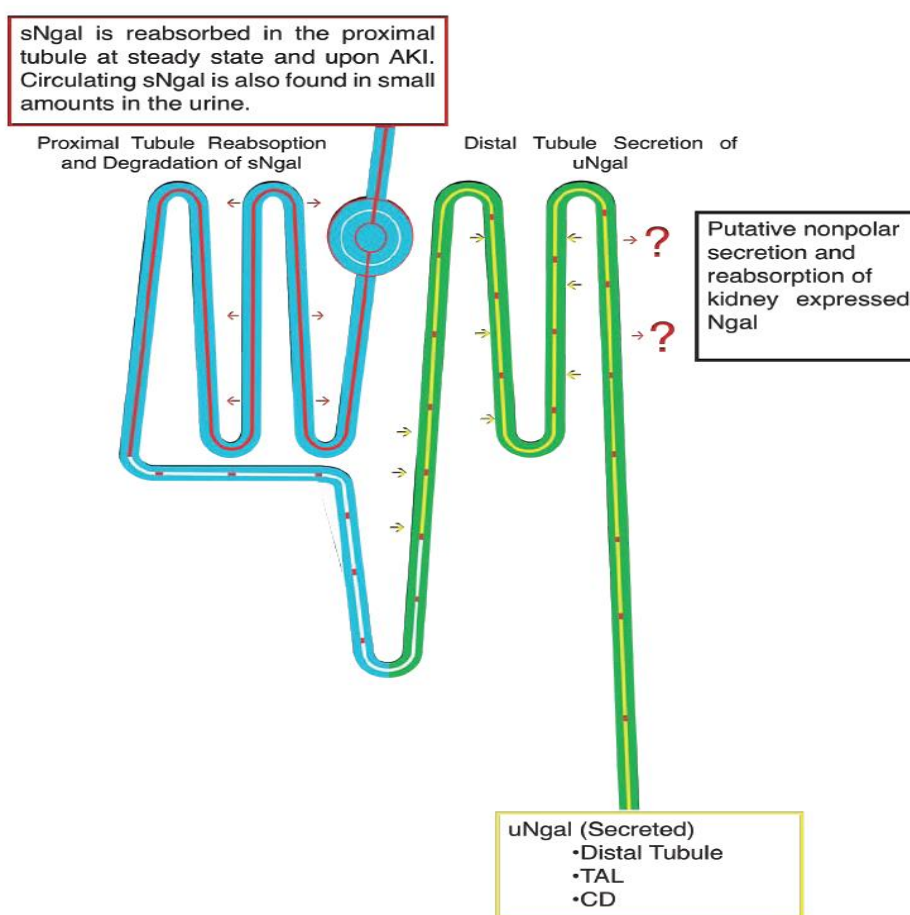
2.5.2 คุณสมบัติที่ต้านแบคทีเรียของ NGAL (antibacterial activity)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ไตจากการติดเชื้อของจุลชีพเช่น แบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียจำเป็นที่จะต้องได้รับ ธาตุเหล็ก (iron) เพื่อใช้ในการเจริญและอยู่รอดภายใน mammalian host ซึ่งมี iron อยู่อย่างจำกัดซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immunity) ที่จะยับยั้งการรุกรานของจุลชีพ จึงทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวและสร้างโปรตีนพิเศษเรียกว่า ซิเดอโรฟอรัส (siderophore) ที่สามารถจับกับ iron (โดยเฉพาะ ferric iron, Fe^{3+}) ภายใน mammalian host ได้ เป็นสารตัวกลาง iron- siderophore complex และขนส่งเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและจะปล่อย iron ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นระบบที่เรียกว่า iron acquisition ของแบคทีเรีย ในส่วนของ mammalian host พบว่า NGAL ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) โดยสามารถจับกับ iron- siderophore ได้เป็น NGAL iron- siderophore complex และจะจับกับ megalin receptor ที่บริเวณ apical surface ของ proximal tubule cell ที่ไตได้อย่างเหนียวแน่นและเกิด endocytosis เข้าสู่ภายในเซลล์ซึ่งพบว่ามี การแสดงออกของ megalin receptor เมื่อเกิดการอักเสบ (22, 23) แบคทีเรียสามารถสร้าง siderophore ได้หลายร้อยชนิดแต่ NGAL จะจับกับ siderophore ได้บางชนิดเท่านั้น เช่น NGAL จับกับ entochelin ซึ่งเป็น siderophore ของ *Escherichia coli* ที่มีโครงสร้างเคมีเป็น catecholate ดังนั้น NGAL จึงเป็น iron sequestration ของ mammalian host (20, 21) เชื้อ leptospira ที่ทำให้เกิด AKI ในโรคเลปโตสไปโรซิส ก็จำเป็นต้องได้รับ iron เพื่อการเจริญ มีรายงาน การศึกษาพบว่า *Leptospira interrogans* Serovar Lai มีการแสดงออกของ hemin-binding protein A (HbpA) ในภาวะที่มี iron จำกัดและได้ตรวจสอบโปรตีนชนิดนี้โดยการทำ sequencing and immunoblotting คือ outer membrane protein LipL41 จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ genome เทียบกับ ferric enterobactin receptor FepA ของ *E. coli* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ iron acquisition พบว่ามี homology ร่วมกันซึ่งจะพบได้ในหลาย serovar ที่ก่อให้เกิดโรค (24, 25)

2.5.3 บทบาทของ NGAL ที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในระยะเริ่มต้น (early marker biomarker) ของ AKI

จากการรายงานของ Mishra และคณะ ปี ค.ศ. 2003 ที่ได้เสนอว่า NGAL เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในระยะเริ่มต้น (early marker) ของ AKI นั้นในปีต่อมาก็ได้มีการศึกษา NGAL เพิ่มมากขึ้น อย่างกว้างขวาง ทั้งใน animal model และ clinical จนกระทั่งปี ค.ศ. 2011 Paragas และคณะ ได้ รายงานผลการศึกษา NGAL ใน mouse model ที่อธิบายถึงการตรวจสอบเมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ไต ไว้อย่างชัดเจนในวารสาร nature medicine โดยการสร้าง *Ngal* reporter mouse จากการใช้

เทคนิค genetic engineering ใส่ double-fusion reporter gene ที่จะสังเคราะห์ luciferase-2 และ mCherry (Luc2-mC) ยีนที่ตำแหน่งระหว่าง 5' UTR และ start codon ของ *Ngal* ได้เป็น *Ngal*-Luc2-mC reporter ซึ่งจะสามารถตรวจสอบการบาดเจ็บในสิ่งมีชีวิตได้ ณ เวลาจริง พบว่า *Ngal*-Luc2-mC reporter จะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ไตทั้งจาก ischemia-reperfusion, cisplatin และ Lipid A แสดงให้เห็นว่ามี sensitive, rapid, dose-dependent และ reversible ซึ่งสัมพันธ์กับระดับของ urine NGAL และยังพบว่า distal tubule เป็นแหล่งของ urine NGAL จากการที่ทำการ cross transplantation ของไตแล้วจึงทำ ischemia-reperfusion (26) แสดงสรุปได้เป็น model จาก 2 ส่วนของไตที่ทำหน้าที่ต่างกัน (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 model ของการดูดกลับ s NGAL และการขับออกของ uNGAL ใน 2 ส่วนของไต (26)

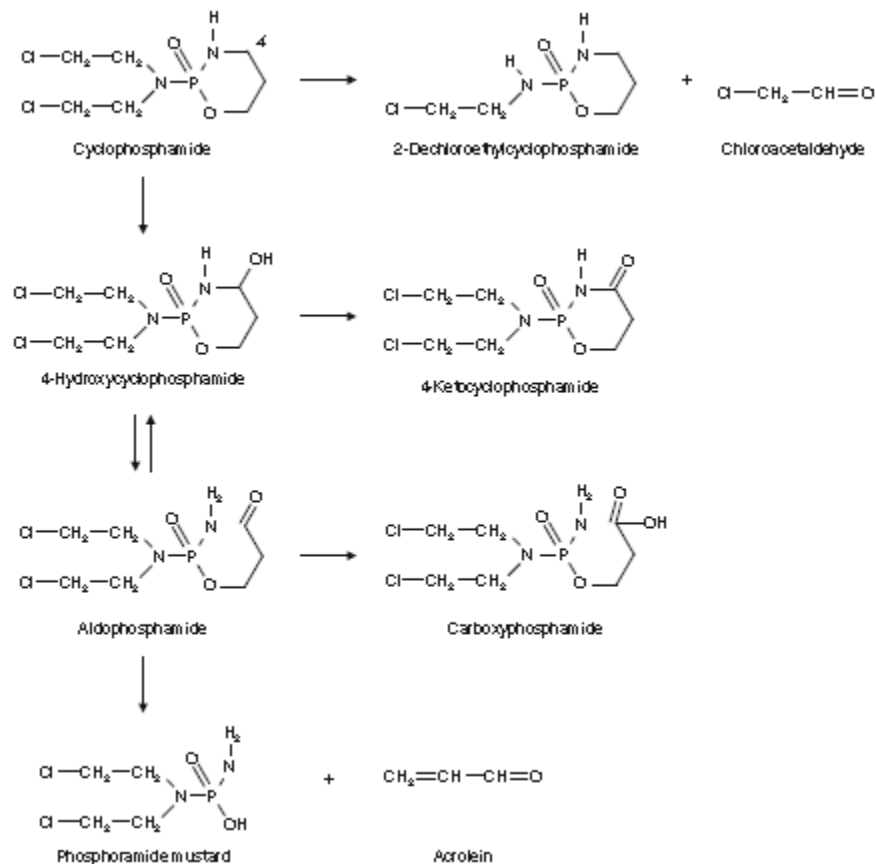
2.6 ไซโคลฟอสฟาไมด์ (Cyclophosphamide)

Cyclophosphamide (Cy) เป็นสารในกลุ่ม alkylating agent อยู่ในรูปสารที่ไม่ออกฤทธิ์ใช้เป็นยาในการรักษาโรคมะเร็ง (anticancer agent) หลายชนิดและใช้สำหรับการกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunosuppressive agent) Cy จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารออกฤทธิ์ได้ คือ cyclophosphamide mustard โดยเอนไซม์ที่ตับ มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการจับและรวมตัวกับดีเอ็นเอ (DNA) จนทำให้เกิด DNA cross link และ DNA-protein cross link ผลที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA และทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งจะมีประสิทธิภาพมากในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็วมากกว่าเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว

Cy มีรูปแบบของยาที่ใช้ได้ทั้งแบบรับประทานและแบบฉีด มีช่วงขนาดยาและระยะเวลาที่ให้ยากว้าง ขึ้นกับโรคนั้นๆ ขนาดยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น leukemia, neuroblastoma, carcinoma เป็นต้น ขนาดยาที่ใช้อยู่ที่ช่วง 2-6 mg/kg bodyweight (low dose) ถึงมากกว่า 6,000 mg/m² body surface area (high dose) จะใช้ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นๆ Cy ขนาด 100-200 mg/day ใช้ในการกดภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อการรักษาโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องแบบเรื้อรัง เช่น rheumatoid arthritis, multiple sclerosis เป็นต้น

2.6.1 เมแทบอลิซึมของไซโคลฟอสฟาไมด์

Cy จะเกิดการสลายตัวเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ที่ตับเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 70-80% ผ่านเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) ได้เป็น 4 hydroxycyclophosphamide จะแพร่เข้าไปในเซลล์ได้อย่างง่ายและไม่มีพิษต่อเซลล์ โดยธรรมชาติแล้ว 4 hydroxycyclophosphamide จะไม่เสถียรและจะสลายตัวได้เป็นสาร phosphoramidate mustard โดยเกิด β -elimination ของ acrolein ซึ่งสาร phosphoramidate mustard เป็นรูปที่ออกฤทธิ์แบบ bi-functional DNA alkylating agent ของ cyclophosphamide ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 11 เมแทบอลิซึมของไซโคลฟอสฟาไมด์ (31)

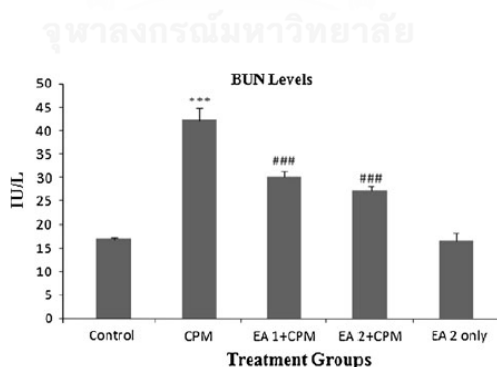
2.6.2 เกสัชจลนศาสตร์ของไซโคลฟอสฟาไมด์

Cy มี half-life อยู่ระหว่าง 5-9 ชั่วโมง พบว่าเด็กและผู้ใหญ่มี plasma half-life สั้นกว่าผู้ใหญ่ที่มีการทำงานของ CPY เพิ่มขึ้น การ clearance ของ Cy โดยรวมอยู่ระหว่าง 4-5 ลิตรต่อชั่วโมงซึ่งส่วนใหญ่ไม่ได้ clearance ที่ไต สารเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสลายตัวของ Cy ทั้ง 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard และ carboxyphosphamide มี half-life สั้นกว่า Cy หลังจากที่ได้ Cy ทางเส้นเลือดดำระหว่าง 5 นาทีถึง 2 ชั่วโมง พบว่าระดับสูงสุดของ 4-hydroxycyclophosphamide และ phosphoramidate mustard อยู่ระหว่าง 0.5-3 ชั่วโมงและ 3-6 ชั่วโมง ตามลำดับ Cy ส่วนใหญ่มีพิษต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น เซลล์ที่สร้างไขกระดูก เซลล์อิมูโนลิมม เซลล์ในท่อทางเดินอาหาร เส้นผม เซลล์สืบพันธุ์ เป็นต้น และเป็นสารก่อมะเร็งด้วย (31)

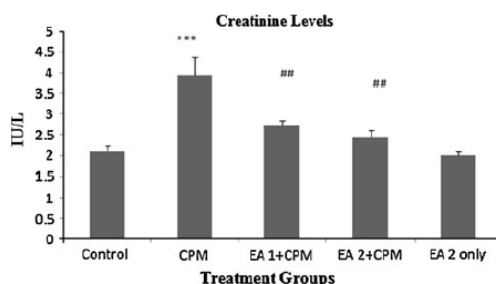
2.6.3 การศึกษาผลของไซโคลฟอสฟาไมด์ต่อการกดภูมิคุ้มกันและความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

Huyan และคณะปี ค.ศ. 2011 ได้ศึกษาผล immunosuppressive ของ Cy ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในหนูเมาส์สายพันธุ์ Balb/c ที่ได้รับการฉีดด้วย Cy 2 ครั้ง คือ วันที่ 1 และ 4 ทางช่องท้อง (intraperitoneal injection, i.p.) ในขนาดต่างๆกัน คือ 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 mg/kg พบว่า จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงในทุกขนาดของ Cy ยกเว้นขนาด 50mg/kg โดยจะลดลงตั้งแต่วันที่ 1 ถึงจุดต่ำสุดวันที่ 4 และกลับขึ้นมาในวันที่ 10 และลดลงอีกครั้งในวันที่ 17 และที่ขนาด 50mg/kg ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ของ cell surface marker ของ T-cells คือ $CD3^+$, $CD4^+$ แต่ที่ขนาด 100 หรือ 150 mg/kg มีผลลด $CD3^+$, $CD4^+$ ในวันที่ 4 และ $CD19^+$ ในวันที่ 10 และมีการเพิ่มขึ้นของ $CD8^+$ ในวันที่ 4 อัตราส่วนของ $CD4^+/CD8^+$ ลดลงในวันที่ 4 (32)

Rehman และคณะปี ค.ศ. 2012 ทำการศึกษาผลของ Ellagic acid (EA) ในการเป็น antigenotoxicity และ antioxidant ในหนูเมาส์สายพันธุ์ swiss albino ที่ถูกกระตุ้นให้เกิด renal oxidative stress ด้วย Cyclophosphamide (CPM) ที่ขนาด 50 mg/kg i.p. 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับ EA ที่ขนาด 50 และ 100 mg/kg ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า กลุ่ม CPM อย่างเดียว มีผลเพิ่มระดับ malondialdehyde (MDA) และลดระดับ antioxidant enzymes ต่างๆ รวมทั้งมีผลต่อการทำงานที่ไตจากการเพิ่มขึ้นของ BUN, creatinine เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14, 15 และพบว่ามีพยาธิสภาพที่ไต คือ necrosis, inflammatory cells recruitment ส่วนกลุ่มที่ให้ EA พบว่า ทั้งสองขนาดของ EA มีผล เพิ่มระดับ antioxidant enzymes ต่างๆ และระดับ BUN, creatinine ลดลงและป้องกันการเกิดพยาธิสภาพที่ไต (33)



รูปที่ 12 แสดงระดับ BUN (33)

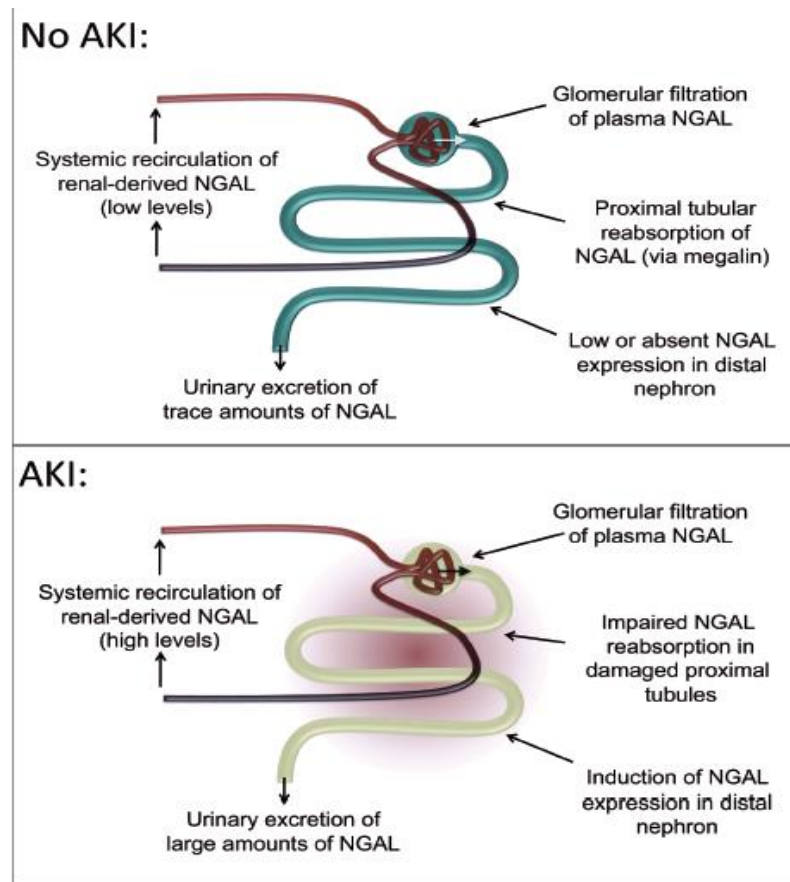


รูปที่ 13 แสดงระดับ creatinine (33)

Han และคณะปี ค.ศ. 2012 รายงานผลการศึกษา NGAL ที่มีการแสดงออกเมื่อเกิด AKI จากการที่ชักนำด้วย LPS ใน rat model พบว่า NGAL mRNA ที่ cortical tubular epithelial จะ upregulate ตั้งแต่ที่ 3 ชั่วโมงและมีการ upregulate สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง พร้อมทั้งการเพิ่มขึ้นของ pNGAL และ uNGAL เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่ง uNGAL มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ NGAL mRNA (27)

การศึกษาทางคลินิกของ Martensson และคณะปี ค.ศ. 2010 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ ใน ICU เพื่อที่จะประเมินการทำนายของ NGAL ทั้งใน plasma และ urine ที่จะตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันระยะเริ่มต้นใน ผู้ป่วยที่มี septic shock จำนวน 45 คน พบว่า uNGAL ทำนาย AKI ได้ดีกว่า pNGAL จากค่า Receiver operating characteristic(ROC) 0.86 และ ROC 0.67 ตามลำดับ(28) สอดคล้องกับผลการศึกษาแบบ cohort study ของ Yang และคณะปี ค.ศ. 2010 ในผู้ป่วย AKI ซึ่ง uNGAL ก็ทำนายการตายและการสูญเสียการทำงานของไตมีค่า area under the curve (AUC) 0.882 ค่า cutoff 298.28 ng/ml และค่า sensitivity 88.2%, ค่า specificity 81.0%(29) จากผลการศึกษาทางคลินิกแสดงให้เห็นว่า uNGAL ให้ผลการทำนาย AKI ได้ดีกว่าใน plasma

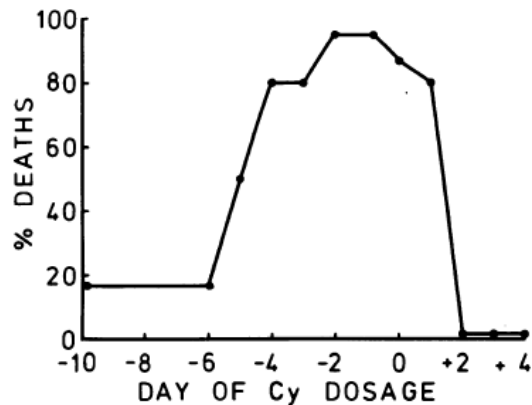
Schmidt-Ott ได้มีการพัฒนา model ของ NGAL trafficking จากผลการวิจัยทั้งใน animal model และ clinical ที่ผ่านมา ซึ่งจะสนับสนุนแนวคิดของระดับ uNGAL และ pNGAL ในการเป็น biosensors เมื่อเกิดการบาดเจ็บที่ไต (รูปที่ 12) อธิบายได้ว่า ในสภาวะปกติที่ไม่เกิด AKI NGAL จะถูกสร้างในระดับต่ำโดยจากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันรวมทั้งที่ distaltubule การไหลเวียนของ NGAL จะถูกกรองที่ glomeruli และดูดกลับที่ proximal tubule ซึ่งจะตรวจพบ uNGAL และ pNGAL ในระดับที่ต่ำ ระหว่างที่เกิด AKI จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ NGAL ที่ distaltubule ส่งผลให้มีระดับของ pNGAL เพิ่มขึ้น และทำให้เสียการดูดกลับที่ proximal tubule จึงทำให้มีการขับออกของ uNGAL มากขึ้น (30)



รูปที่ 14 model ของ NGAL trafficking ใน nephron ในสภาวะปกติ (non AKI) และภาวะไตวายฉับพลัน (AKI) (30)

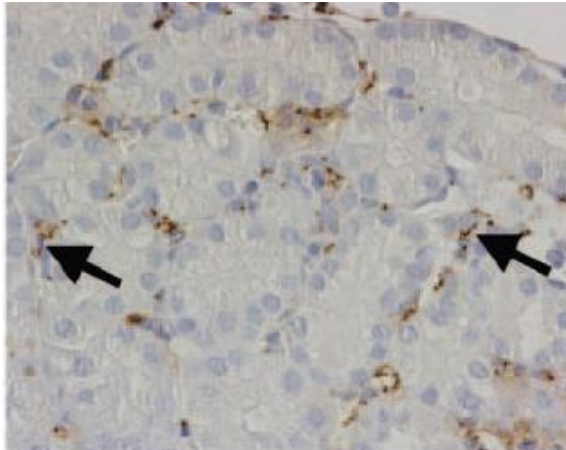
2.7 การศึกษาผลของการติดเชื้อเลปโตสไปราในหนูเมาส์สายพันธุ์ต่างๆ

Adler และ Faine ปีค.ศ. 1976 ได้ทำการศึกษาโดยให้ Cy ไปกอดภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์สายพันธุ์ Balb/c เพื่อทำให้หนูเมาส์มีความไวต่อการติดเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar pomona พบว่า หนูเมาส์ปกติเมื่อฉีดเชื้อ *L.interrogans* serovar pomona ที่ขนาด 10^{10} leptospores ก็ไม่ทำให้เกิดโรคหรือตายได้ แต่ในหนูเมาส์ที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg มีผลทำให้เกิดโรคที่รุนแรงร่วมกับมีอาการดีซ่าน ไตผิดปกติ และตายภายใน 3-8 วัน ผลของ Cy ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราเป็นไปตามช่วงเวลา คือ การให้ Cy ก่อนการติดเชื้อเลปโตสไปรา 2 วัน ทำให้มีอัตราการตายอยู่ระหว่าง 90-100% เมื่อฉีดเชื้อเลปโตสไปราขนาด 2×10^8 leptospores ดังแสดงในรูปที่ 16 โดยที่ขนาดของ Cy ที่เหมาะสมในการทำให้เกิด lethal leptospirosis คือ 300 mg/kg อยู่ระหว่าง 90-100% และมี 50% lethal dose คือ 2×10^7 - 5×10^7 leptospores (34)

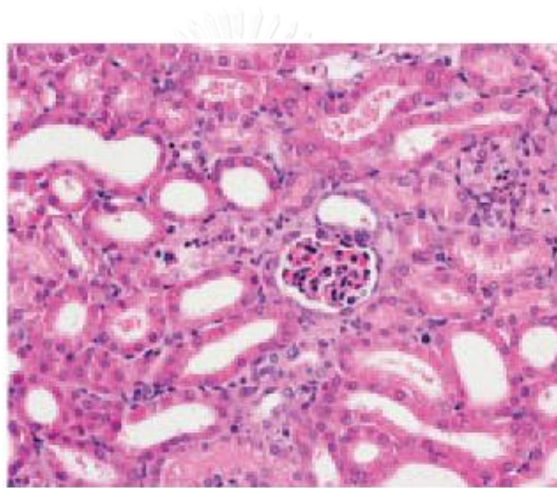


รูปที่ 15 แสดงผลของเวลาการให้ Cy ขนาด 300 mg/kg ในหนูเมาส์สายพันธุ์ Balb/c ที่ฉีดเชื้อ เลปโตสไปราขนาด 2×10^8 leptospire (34)

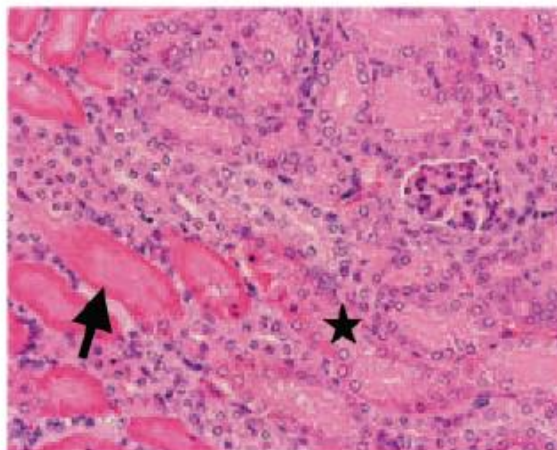
การศึกษาต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Nally และคณะได้ทำการทดลองในหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ที่มี TLR 4 deficient และสายพันธุ์ C3H/SCID ต่อการทำให้เกิด lethal infection โดยฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar Copenhageni RJ16441ที่มีความรุนแรงและใช้ low passage น้อยกว่า 2 ที่ขนาด 10^7 leptospire พบว่า หนูเมาส์ทุกตัวมีความไวต่อการเกิด acute lethal infection มีผลบวกของการทำ spirochetemia จากพลาสมาอยู่ระหว่าง $> 10^5$ leptospire/ml ในหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ถึง $> 10^6$ leptospire/ml ในหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/SCID และจากผลการทำ immunohistochemistry ในไต พบว่า มีเชื้อเลปโตสไปราตรงส่วน interstitium ในหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/SCID ดังแสดงในรูปที่ 17 ส่วนผลจากการย้อมด้วย H&E พบว่า ไตทั้งหมดจากหนูเมาส์ที่ติดเชื้อแสดงให้เห็นว่าเกิด tubular injury และมี necrosis ในช่วงเริ่มต้นทั้งหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ และ C3H/SCID แต่ไม่พบว่ามี inflammatory cells recruitment ดังแสดงในรูปที่ 18, 19 ส่วนการตรวจสอบทำงานของไตของหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ที่ติดเชื้อ พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของระดับ BUN เท่ากับ 106.5 mg/ml (23 mg/ml หนูเมาส์ C3H/HeJ ที่ไม่ติดเชื้อ) และระดับ creatinine เท่ากับ 1.08 mg/ml (0.28 mg/ml หนูเมาส์ C3H/HeJ ที่ไม่ติดเชื้อ) ซึ่งสอดคล้องไปกับผลพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ไต และจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสาเหตุการตายของหนูเมาส์ที่ติดเชื้อ คือ เกิด AKI ทั้งหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ และ C3H/SCID ทำให้เกิด lethal infection และไม่พบว่ามี ภาวะเลือดออกที่ปอด (pulmonary hemorrhage) (35)



รูปที่ 16 แสดงผลการย้อม immunohistochemistry ต่อเชื้อเลปโตไปราไนไตของหนูเม้าส์สายพันธุ์ C3H/SCID (35)

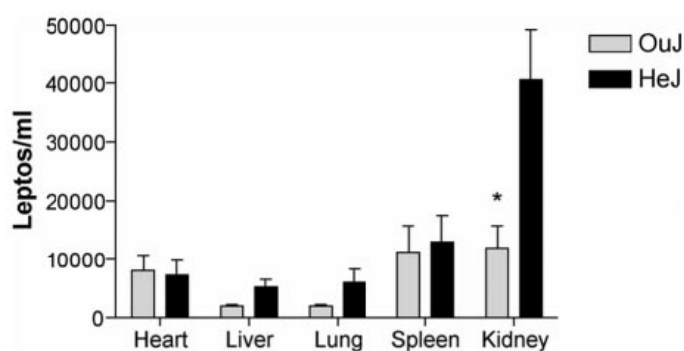


รูปที่ 17 แสดงผลการย้อม H&E ในไตหนูเม้าส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ที่มีลักษณะการเกิด tubular injury และ necrosis (35)



รูปที่ 18 แสดงผลการย้อม H&E ในไตหนูเม้าส์สายพันธุ์ C3H/SCID ที่มีลักษณะการเกิด tubular injury และ necrosis (35)

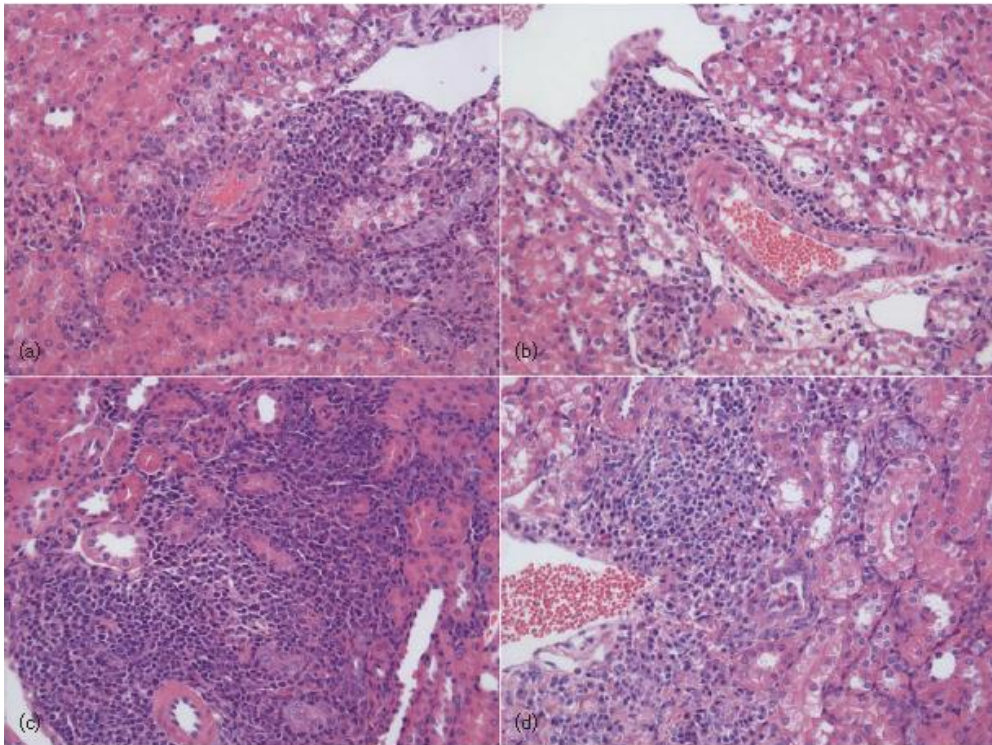
Viriyakosol และคณะปี ค.ศ. 2006 ได้ศึกษาบทบาทของระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immune system) ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยทดลองในหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ, C3H/HeJ-SCID ที่ฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain HAI188 ที่ขนาด 6×10^8 cells low passage น้อยกว่า 2 พบว่า หนูเมาส์มีอาการป่วย มีเลือดออกที่ปอด และมีติชาน และตายภายใน 4-5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาส์ปกติสายพันธุ์ C3H/OuJ ที่รอดชีวิตและมีอาการที่แสดงถึงการเป็นโรค เมื่อครบ 14 วันจึงนำไตจากหนูปกติสายพันธุ์ C3H/OuJ ไปเพาะเชื้อพบว่าให้ผลบวกเช่นเดียวกับหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ, C3H/HeJ-SCID จึงยืนยันได้ว่าการติดเชื้อ แต่เมื่อฉีดเชื้อที่ขนาด 1×10^8 cells พบว่า หนูเมาส์จะรอดชีวิตและเมื่อถึงวันที่ 21 หลังฉีดเชื้อจึงนำอวัยวะต่างๆ ทั้ง หัวใจ ปอด ตับ ม้ามและไตไปหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี real time PCR ผลปรากฏว่าทุกอวัยวะพบเชื้อเลปโตสไปราโดยที่ไตเป็นอวัยวะที่มีจำนวนเชื้อเลปโตสไปรามากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 20(36)



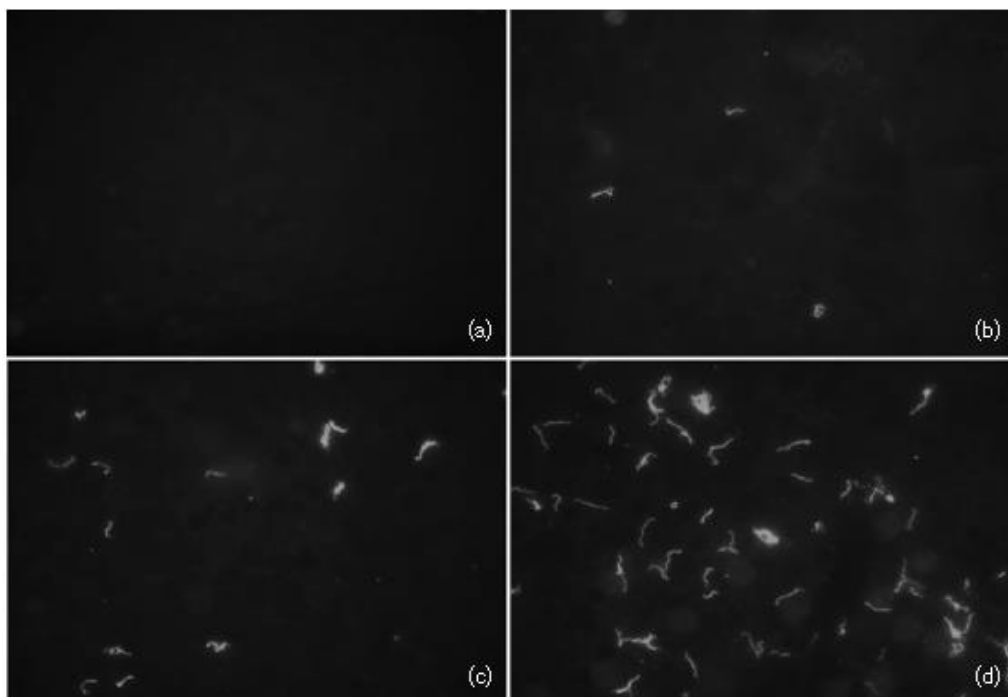
รูปที่ 19 แสดงผลการวัดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะต่างๆของหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ, C3H/HeJ-SCID (36)

การศึกษาล่าสุดของ Santos และคณะ ปี ค.ศ. 2010 ได้ศึกษาถึงผลที่ต่างกันในหนูเมาส์ 4 สายพันธุ์ คือ A, CBA, BALB/c และ C57BL/6 โดยฉีดเชื้อ *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae strain Cop ที่ขนาด 10^3 และ 10^6 leptospores พบว่า หนูเมาส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่แสดงอาการของโรคเลปโตสไปโรซิส เมื่อถึงวันที่ 28 หลังจากฉีดเชื้อจึงนำไตออกมาย้อม H&E เพื่อดูว่าเกิดพยาธิสภาพ คือ interstitial nephritis หรือไม่ พบว่า หนูเมาส์สายพันธุ์ คือ A, CBA และ C57BL/6 แสดงให้เห็นว่ามี interstitial nephritis สูงกว่าหนูเมาส์ที่ไม่ได้ฉีดเชื้อและให้ผลเหมือนกัน ทั้ง 2 ขนาดของเชื้อ โดยที่หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 มีระดับความรุนแรงของการเกิด interstitial nephritis มากกว่าหนูเมาส์สายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 21 การตรวจสอบจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในไตด้วยวิธี immunofluorescence เตรียมตัวอย่างไตจากการทำ imprint sample พบว่า หนู

เมาส์สายพันธุ์ คือ A, CBA และ C57BL/6 มีจำนวนเชื้อเลปโตสไปราสูงกว่า หนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c และไม่พบในหนูเมาส์ที่ไม่ได้ฉีดเชื้อและให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 ขนาดของเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 22 (10)



รูปที่ 20 แสดงภาพระดับการเกิด interstitial nephritis ที่ได้ของหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา รูป a,b แสดง nephritisgrade + ที่ขนาด 10^3 leptospire รูป c,d แสดง nephritisgrade ++ ที่ขนาด 10^3 leptospire ที่กำลังขยายกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า (10)



รูปที่ 21 แสดงภาพการตรวจสอบจำนวนเชื้อเลปโตสไปราในไตด้วยวิธี immunofluorescence จากการทำ imprint sample รูป a หนูเมาส์ที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ รูป b หนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ขนาด 10^3 leptospires รูป c หนูเมาส์สายพันธุ์ CBA ที่ขนาด 10^3 leptospires รูป d หนูเมาส์สายพันธุ์ A ที่ขนาด 10^3 leptospires ที่กำลังขยายกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า (10)

จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การทำให้หนูเมาส์เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบที่มีความไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราจะนำไปสู่การเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสที่รุนแรง เช่น ดีซ่าน เลือดออกที่ ปอด ไตวายฉับพลัน ที่คล้ายคลึงกับความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรซิสในมนุษย์พบว่า มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้ง สายพันธุ์ของหนูเมาส์ ขนาด ความรุนแรง passage และ serovar ของเชื้อเลปโตสไปรา และการกดภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ ซึ่งบทบาทของ TLR 2 และ TLR 4 ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิดต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราแสดงความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและควบคุมปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะเป้าหมายซึ่งจะป้องกันไม่ให้หนูเมาส์ก่อโรคเลปโตสไปโรซิสได้

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study design)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมเชื้อเลปโตสไปรา

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยคือ เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *L.interrogans* serovar Pomona ที่แยกได้จากหนูแฮมเตอร์ และเลี้ยงในอาหาร liquid Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) ที่อุณหภูมิ 29°C น้อยกว่า 5 ครั้ง (low passage) ซึ่งมีค่า median Lethal Dose (LD₅₀) เท่ากับ 10 ทุกการทดลองจะใช้เชื้อปริมาณ 10⁸ leptospores ต่อหนู 1 ตัว อ้างอิงจากการศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 2 (ข้อมูลเพิ่มเติมในภาคผนวก)

3.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัยคือ หนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมีย อายุ 4-5 สัปดาห์ น้ำหนัก 18 - 22 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงหนูทดลองชนิด polycarbonate ขนาด กว้างxยาวxสูง 24x45x20 ซม³ จำนวน 3 ตัวต่อกรงที่ห้องควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 23±1 °C ได้รับความน้ำและอาหารสำเร็จรูปมาตรฐานโดยให้อย่างเต็มที่ (ad libitum) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร โดยที่ผู้วิจัยจะปฏิบัติงานร่วมกับสัตวแพทย์ที่มีความชำนาญและยังมีความพร้อมของห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ได้มาตรฐานซึ่งมีอุปกรณ์พร้อมในการเก็บตัวอย่าง เลือด ปัสสาวะ และอวัยวะ และการอนุมัติจริยธรรมในการวิจัยในสัตว์โดยกรรมการจริยธรรมสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (ARAC 1/57)

ผู้วิจัยจะสังเกตอาการที่แสดงถึงการเจ็บป่วยของหนูทดลองเป็นประจำทุกวันหลังจากที่ฉีดเชื้อเลปโตสไปรา เช่น น้ำหนักลด สูญเสียการเคลื่อนไหว ซึมเศร้า กินอาหารได้น้อยลง

3.2.3 การดำเนินการทดลองในสัตว์ทดลอง

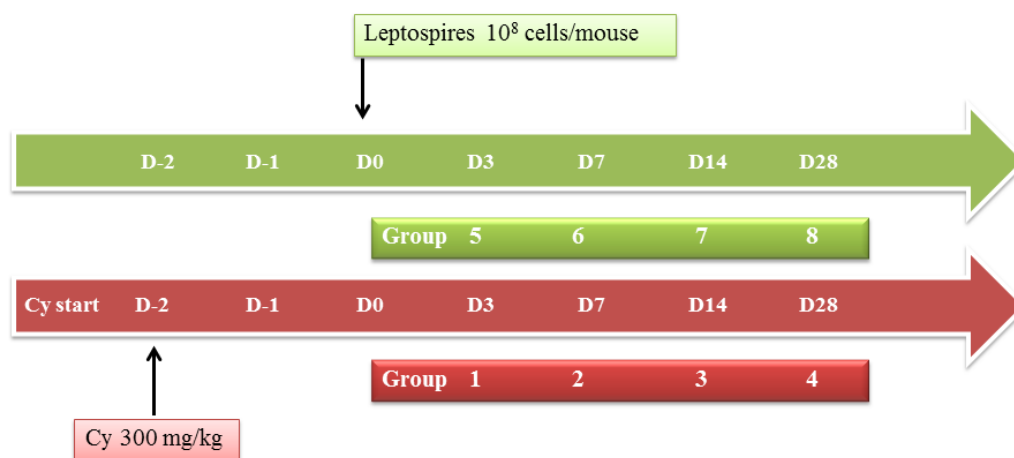
เมื่อหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ได้ปรับตัวในสถานที่เลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว หลังจากนั้นผู้วิจัยจะทำการศึกษาตามลำดับ ดังนี้

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม (กลุ่มละ 6 ตัว)

กลุ่มที่ 1-4 กลุ่ม Cyclophosphamide (Cy) control หนูทดลองจะได้รับการฉีด Cy ขนาด 300 mg/kg, i.p. เพียงครั้งเดียว

กลุ่มที่ 5-8 กลุ่ม Cy+Lepto หนูทดลองจะได้รับการฉีด Cy ขนาด 300 mg/kg, i.p. เพียงครั้งเดียว ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว ความแตกต่างของกลุ่มที่ 5-8 คือ เวลาหลังจากที่ฉีดเชื้อเลปโตสไปราไปแล้วที่ 3, 7, 14 และ 28 วัน ตามลำดับ

เมื่อครบ 3, 7, 14 และ 28 วันจึงทำการรื้อยฆาต โดยการให้ Sodium pentobarbital ในปริมาณ 50 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวแล้วเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ อวัยวะ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนที่กำลังมาข้างหน้าแสดงตามรูปที่ 23



รูปที่ 22 แสดงขั้นตอนการศึกษาในสัตว์ทดลอง

3.2.4 การตรวจยืนยันการติดเชื้อเลปโตสไปรา

3.2.4.1 การตรวจหาเชื้อทำโดยเก็บเลือดจากหัวใจและไตที่บดละเอียดนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร liquid EMJH ที่อุณหภูมิ 29°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้วจึงนำมาดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด dark field

3.2.4.2 การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR นำไตไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Germany) จากนั้นจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ PCR เพื่อตรวจหา ยีน LipL 32

3.2.5 การเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะและอวัยวะ

3.2.5.1 การเก็บปัสสาวะจะทำโดยจับตัวหนวบบนภาชนะที่สะอาดเมื่อหนูปัสสาวะออกมาแล้วจึงเก็บใส่หลอดทดลองขนาดเล็กก่อนจะถึงเวลาสลบหนูในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 หลังฉีดเชื้อแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) คือ urine ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.2.5.1 เก็บเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) ปริมาณ 0.5 ม.ล. และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) คือ serum นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.2.5.1 เก็บชิ้นเนื้อ โดยแบ่งเก็บไต ปอด ตับ ในน้ำยาคงสภาพ 10% Neutral buffered formalin สำหรับการย้อม Hematoxylin and eosin stain (H&E) และ Immunohistochemistry

3.2.6 การวัดระดับ Creatinine และ Ngal

วัดระดับ creatinine ใน serum โดยใช้ Creatinine Colorimetric/Fluorometric assay kit (Quantichrom™, BioAssay Systems, USA) และการวัดระดับโปรตีน Ngal ใน serum และ urine โดยใช้ ELISA kit (Quantikine®, R&D Systems, MN)

3.2.7 การวิเคราะห์การเกิด interstitial nephritis และ tubular injury แบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative)

สำหรับการประเมินพยาธิสภาพจะประกอบด้วย การเกิด interstitial nephritis และ tubular injury ที่บริเวณท่อไตส่วนนอก ซึ่งจะเลือกพื้นที่อย่างสุ่ม 10 field ต่อ 1 สไลด์ ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า จากสไลด์ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E โดยกำหนด score อ้างอิงจากการศึกษาของ Srisawat และคณะ ปีค.ศ. 2008 (37) ดังนี้

score 0 : 0% involvement

score 1 : <10% involvement of the cortex

score 2 : 10-25% involvement of the cortex

score 3 : 26-50% involvement of the cortex

score 4 : >50% involvement of the cortex

3.2.8 การวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี immunohistochemistry

ขั้นตอนที่ 1 ส่องตัวอย่างชิ้นเนื้อไต ที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการย้อมเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Ngal โดยวิธีมาตรฐานและใช้ primary antibody: goat polyclonal anti-mouse Ngal 1:300 (R&D Systems, MN) และ secondary antibody: mouse polyclonal anti-goat 1:1000 (R&D Systems, MN)

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์แบบ semi-quantitative สำหรับการประเมินความเข้มของโปรตีน Ngal ซึ่งจะเลือกพื้นที่อย่างสุ่ม 3 field ต่อ 1 สไลด์ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า และใช้โปรแกรม Image J (NIH) ในการคำนวณความเข้มของโปรตีน Ngal โดยทำการ subtract background ก่อนเพื่อลด error

3.3 การรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวมข้อมูลการทดลองและบันทึกผลการทดลองโดยการจดบันทึก โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมเป็นผู้ควบคุมและให้คำปรึกษา

3.4 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Independent- sample t-test ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 20

บทที่ 4

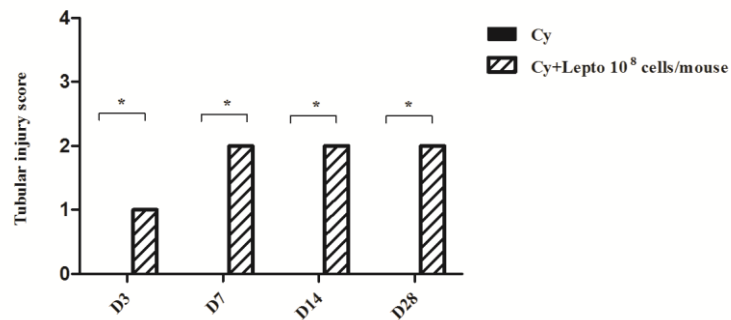
ผลการวิจัย

4.1 การติดเชื้อเลปโตสไปราซึ่มทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลันในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6

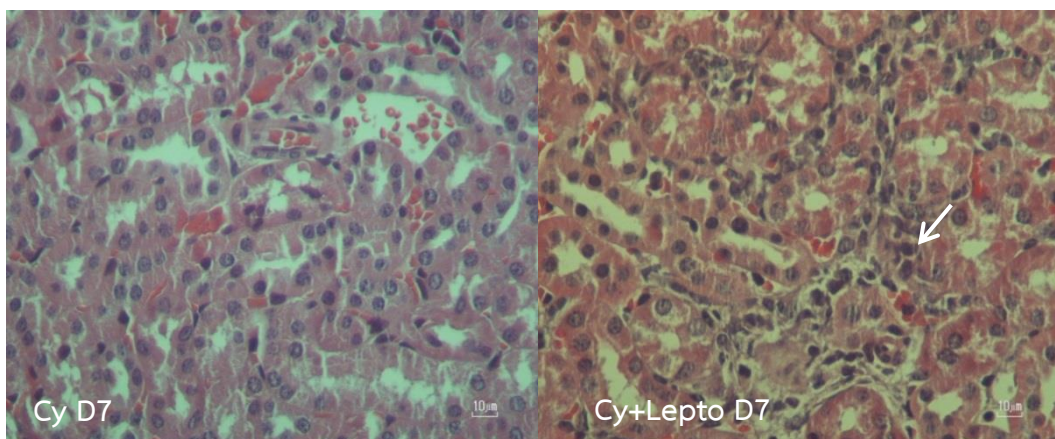
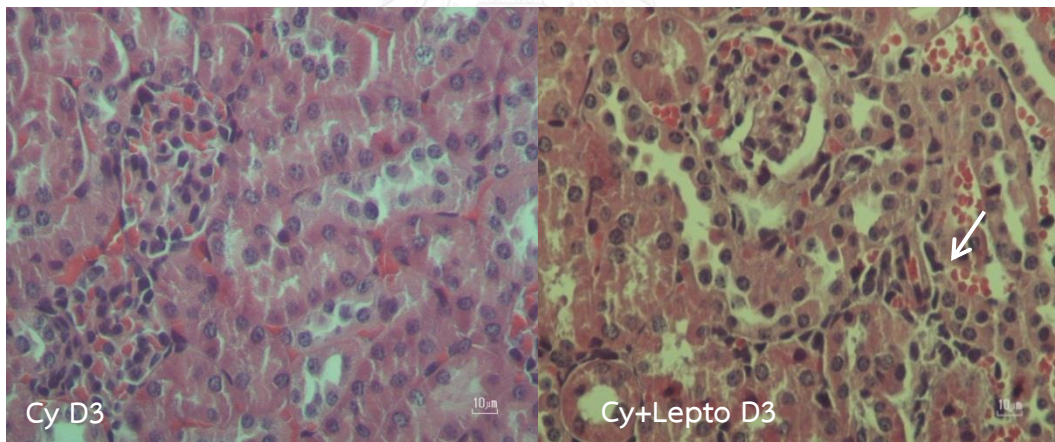
การศึกษาในหัวข้อนี้ ได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันว่าหนูทดลองเมื่อติดเชื้อเลปโตสไปราแล้ว มีผลให้เกิดการบาดเจ็บที่ไตและทำให้เกิด AKI พบว่า เมื่อครบ 3, 7, 14 และ 28 วัน ไม่พบว่า หนูทดลองทั้งกลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) และกลุ่ม 5-8 (Cy+LeptoD3, D7, D14 และ D28) มีอาการที่แสดงถึงการเจ็บป่วยหรือตายและผลจากการเพาะเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มที่ 5-8 (Cy+LeptoD3, D7, D14 และ D28) พบว่า การเพาะเชื้อในเลือดของกลุ่มที่ 5 (Cy+LeptoD3) เท่านั้นที่ให้ผลบวกส่วนการเพาะเชื้อเลปโตสไปราและ PCR ในไตให้ผลลบทุกกลุ่มเช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 การศึกษาต่อไปผู้วิจัยจึงทำการประเมินพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E พบว่ากลุ่มที่ 5-8 (Cy+LeptoD3, D7, D14 และ D28) มี tubular injury score สูงกว่ากลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 24 ซึ่งมี interstitial nephritis และ tubular injury ชัดเจนจัดอยู่ใน score 2 มี cell infiltration involvement ที่ท่อไตส่วนนอก 10-25% ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) ที่มีลักษณะของท่อไตปกติ ไม่มี cell infiltration ดังแสดงในรูปที่ 25

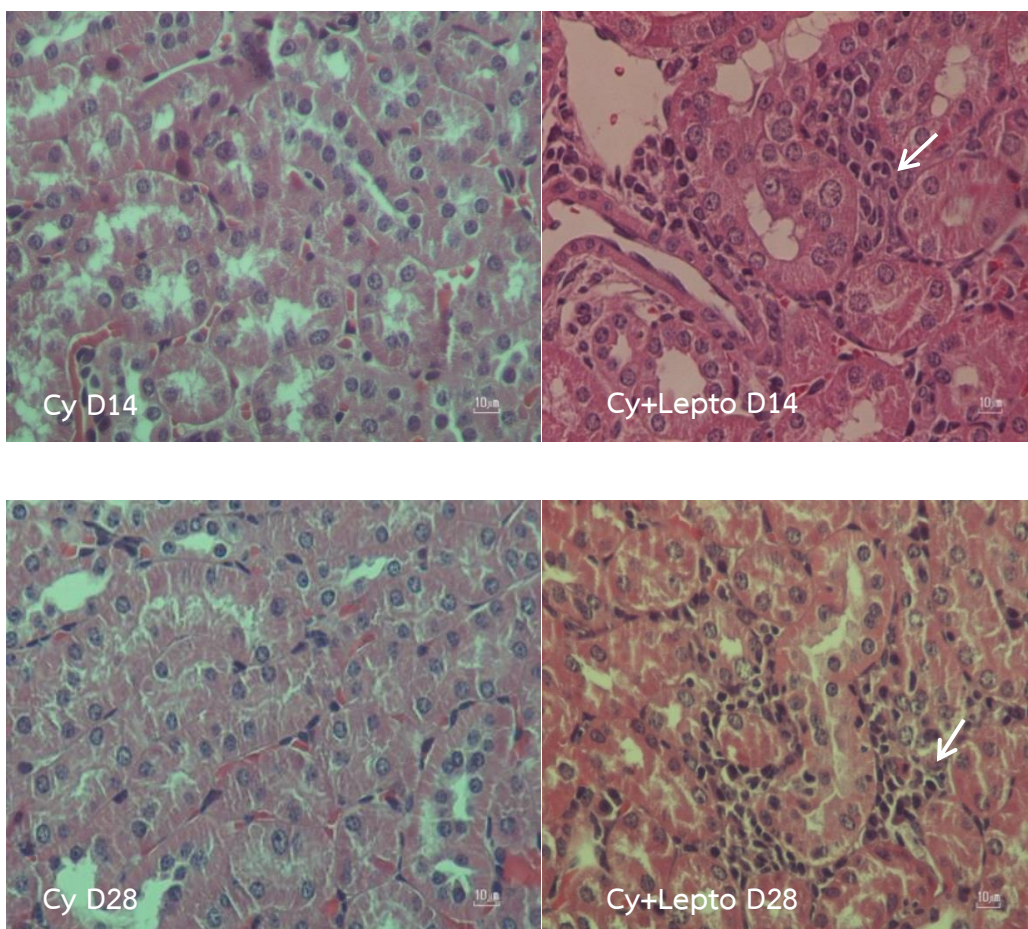
ตารางที่ 4 แสดงการตรวจเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธีเพาะเชื้อ (culture) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อไตและวิธี PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของหนูทดลองหลังจากได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ

	Culture (blood)	Culture (kidney)	PCR (kidney)
Group 4 Cy D28	negative	negative	negative
Group 5 Cy+Lepto D3	positive	negative	negative
Group 6 Cy+Lepto D7	negative	negative	negative
Group 7 Cy+Lepto D14	negative	negative	negative
Group 8 Cy+Lepto D28	negative	negative	negative



รูปที่ 23 แสดงระดับความรุนแรงของ tubular injury score ที่ได้ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว ($n = 6$ ในแต่ละกลุ่ม) * $P < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

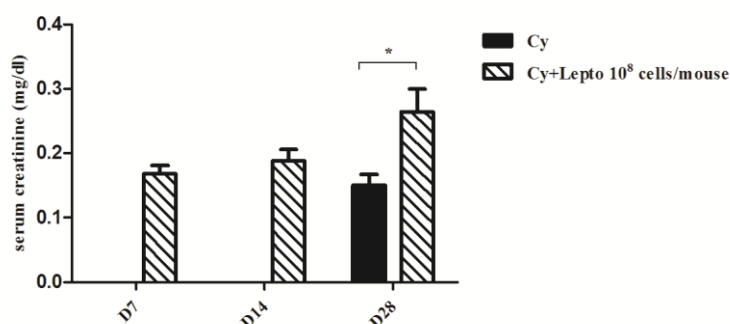




รูปที่ 24 แสดงลักษณะ interstitial nephritis ในชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospores ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว ($n = 6$ ในแต่ละกลุ่ม) ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า ลูกศรชี้แสดงถึงการเกิด inflammatory cells infiltration มาที่บริเวณ interstitium

เมื่อวัดระดับ SCr พบว่า กลุ่มที่ 6-7 (Cy+Lepto D 7 และ D14) มีระดับSCr เท่ากับ 0.17 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 mg/dl ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ 4 (Cy D28) คือ 0.15 ± 0.02 mg/dl แต่ในกลุ่มที่ 8 (Cy+Lepto D28) มีระดับ SCr เท่ากับ 0.26 ± 0.04 mg/dl เพิ่มขึ้น 1.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 4 (Cy D28) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 26

กล่าวโดยสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาของระดับ SCr และพยาธิสภาพที่บริเวณท่อไตจากการที่หนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 ได้รับ Cy ก่อน 2 วัน แล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา ปริมาณ 10^8 leptospores/mice ทำให้หนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 เกิด AKI ได้



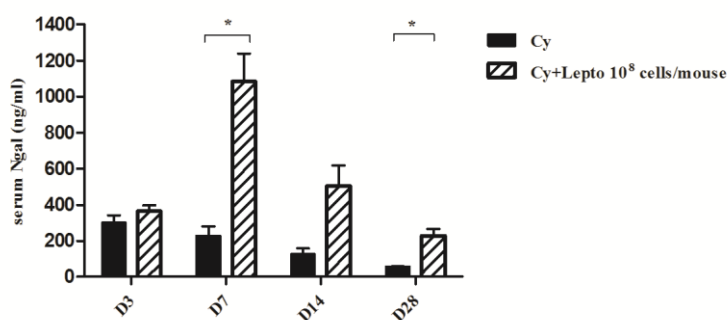
รูปที่ 25 แสดงระดับ serum creatinine ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว เพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลา ต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว (n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) * $P < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

4.2 ระดับของ serum และ urine Ngal ในหนูเมาส์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราแล้วชักนำให้เกิดภาวะ ไตวายฉับพลัน

การศึกษาในหัวข้อนี้ เป็นการศึกษาเพื่อตรวจสอบระดับ Ngal ที่หลั่งออกมาทั้งในซีรัมและ ปัสสาวะในแต่ละช่วงเวลาเมื่อเกิด AKI ขึ้น พบว่าทั้งระดับ sNgal และ uNgal เพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่หนู เมาส์ติดเชื้อเลปโตสไปรา เมื่อเปรียบเทียบระดับ sNgal ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 6 (Cy D7 และ Cy+Lepto D7) เท่ากับ 226.85 ± 52.89 และ 1083.85 ± 155.96 ng/ml ซึ่งมีระดับ sNgal เพิ่มขึ้น 5 เท่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และระหว่างกลุ่มที่ 4 และ 8 (Cy D28 และ Cy+Lepto D28) เท่ากับ 56.72 ± 2.00 และ 227.94 ± 38.29 ng/ml ซึ่งมีระดับ sNgal เพิ่มขึ้น 4 เท่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) พบว่า มีระดับ serum Ngal เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ 1 (Cy D3) และค่อยๆลดลง ตามลำดับในกลุ่มที่ 4 (Cy D28) เท่ากับ 300.99 ± 41.81 , 226.85 ± 52.89 , 125.48 ± 32.56 และ 56.72 ± 2.00 ng/ml ตามลำดับ และกลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3,D7,D14 และ D28) พบว่า มี ระดับ serum Ngal เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ 5 (Cy+Lepto D3) เท่ากับ 364.91 ± 31.90 ng/ml โดยใน กลุ่มที่ 6 (Cy+Lepto D7) มีระดับสูงที่สุดเท่ากับ 1083.85 ± 155.96 ng/ml และเริ่มลดระดับลงใน กลุ่มที่ 7 และ 8 (Cy+Lepto D14 และ D28) เท่ากับ 504.80 ± 114.28 และ 227.94 ± 38.29 ng/ml ดังแสดงในรูปที่ 27

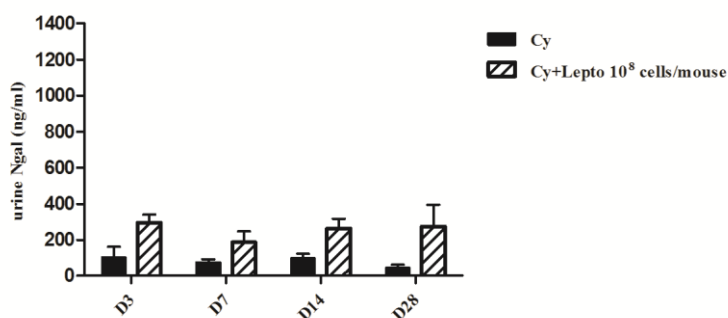
เมื่อเปรียบเทียบระดับ uNgal ระหว่างกลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) กับกลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3,D7,D14 และ D28) ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่มที่ 1-4 (Cy D3, D7, D14 และ D28) มีระดับ uNgal เท่ากับ 103.50 ± 58.11 , 74.80 ± 16.68 , 97.75 ± 23.80 และ 44.63 ± 16.63 ตามลำดับ และกลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3,D7,D14 และ D28) มีระดับ uNgal เท่ากับ 295.98 ± 43.78 , 186.30 ± 61.57 , 263.69 ± 53.04 และ 275.06 ± 119.61 ตามลำดับ ซึ่งมีระดับที่คงที่ในแต่ละช่วงเวลา ดังแสดงในรูปที่ 28

กล่าวโดยสรุปได้ว่าทั้งระดับ sNgal และ uNgal ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละช่วงเวลาในกลุ่มหนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับ Cy ก่อน 2 วัน แล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปราปริมาณ 10^8 leptospores/mice เพิ่มสูงขึ้นสอดคล้องไปกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ไต ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นก่อนที่ระดับ serum creatinine จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 28 แตกต่างจากหนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับ Cy อย่างเดียว



CHULALONGKORN UNIVERSITY

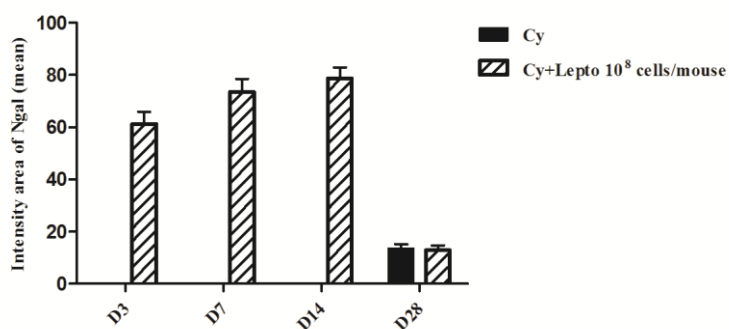
รูปที่ 26 แสดงระดับ serum Ngal ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospores ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก (n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) * $P < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม



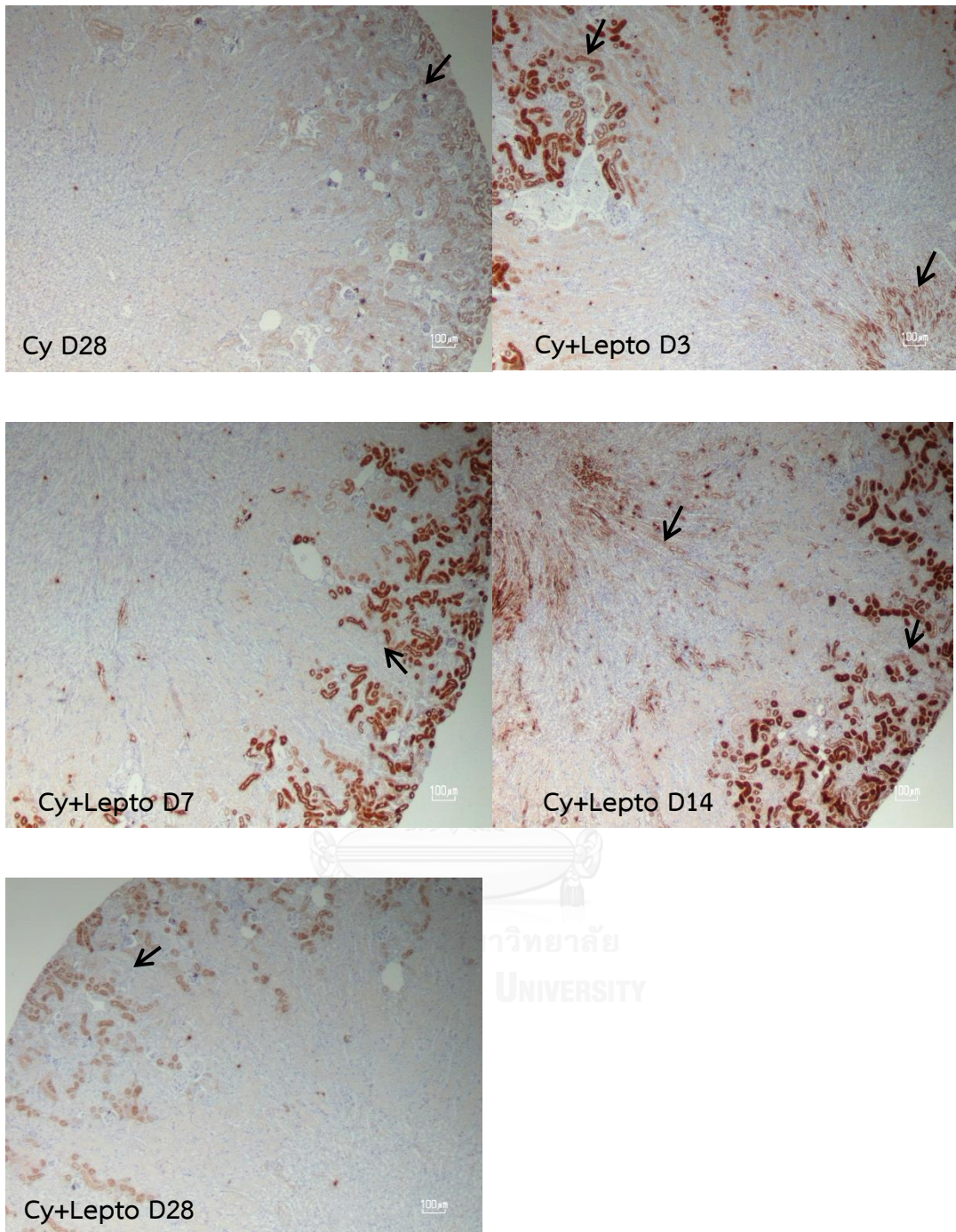
รูปที่ 27 แสดงระดับ urine Ngal ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก (n = 3-6 ในแต่ละกลุ่ม)

4.3 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ในไตหนูเม้าส์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราแล้วชักนำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน

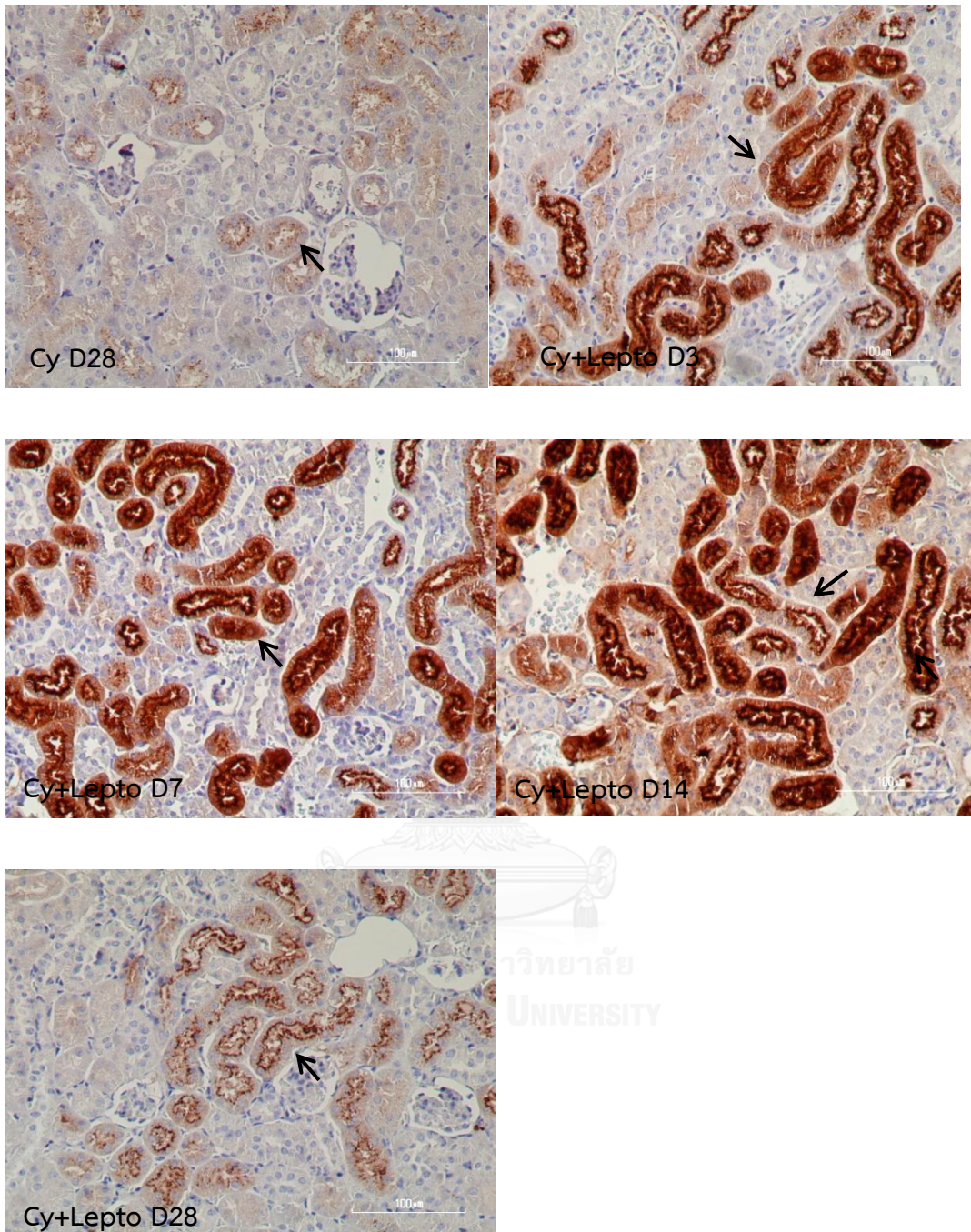
การศึกษาในหัวข้อนี้ เป็นการศึกษาเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ Ngal ในบริเวณส่วนต่างๆภายในไตของหนูทดลองในแต่ละช่วงเวลาเมื่อเกิด AKI ซึ่งเมื่อเซลล์ท่อไตเกิดการบาดเจ็บจะเพิ่มการแสดงออกของ Ngal มากกว่าปกติ พบว่า กลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3,D7,D14 และ D28) มีการแสดงออกของโปรตีน Ngal ทั้งในส่วน cortex และ medulla เท่ากับ 61.24 ± 4.70 , 73.55 ± 4.95 , 78.74 ± 4.11 และ 12.97 ± 1.74 ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal ตามความเข้มข้นของเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลให้ผลบวก) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 4 (Cy D28) เท่ากับ 13.58 ± 1.59 ดังแสดงในรูปที่ 29 และพบว่าบริเวณ apical cell membrane ของเซลล์ท่อไตจะติดสีน้ำตาลเข้มที่สุดและภายใน cytoplasm จะติดสีน้อยกว่าแต่จะไม่ติดสีน้ำตาลที่ nucleus ดังแสดงในรูปที่ 30-32



รูปที่ 28 แสดงค่าระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal โดยประเมินจากระดับความเข้มของการติดสี ในเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10⁸ leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนัก (n = 6 ในแต่ละกลุ่ม)



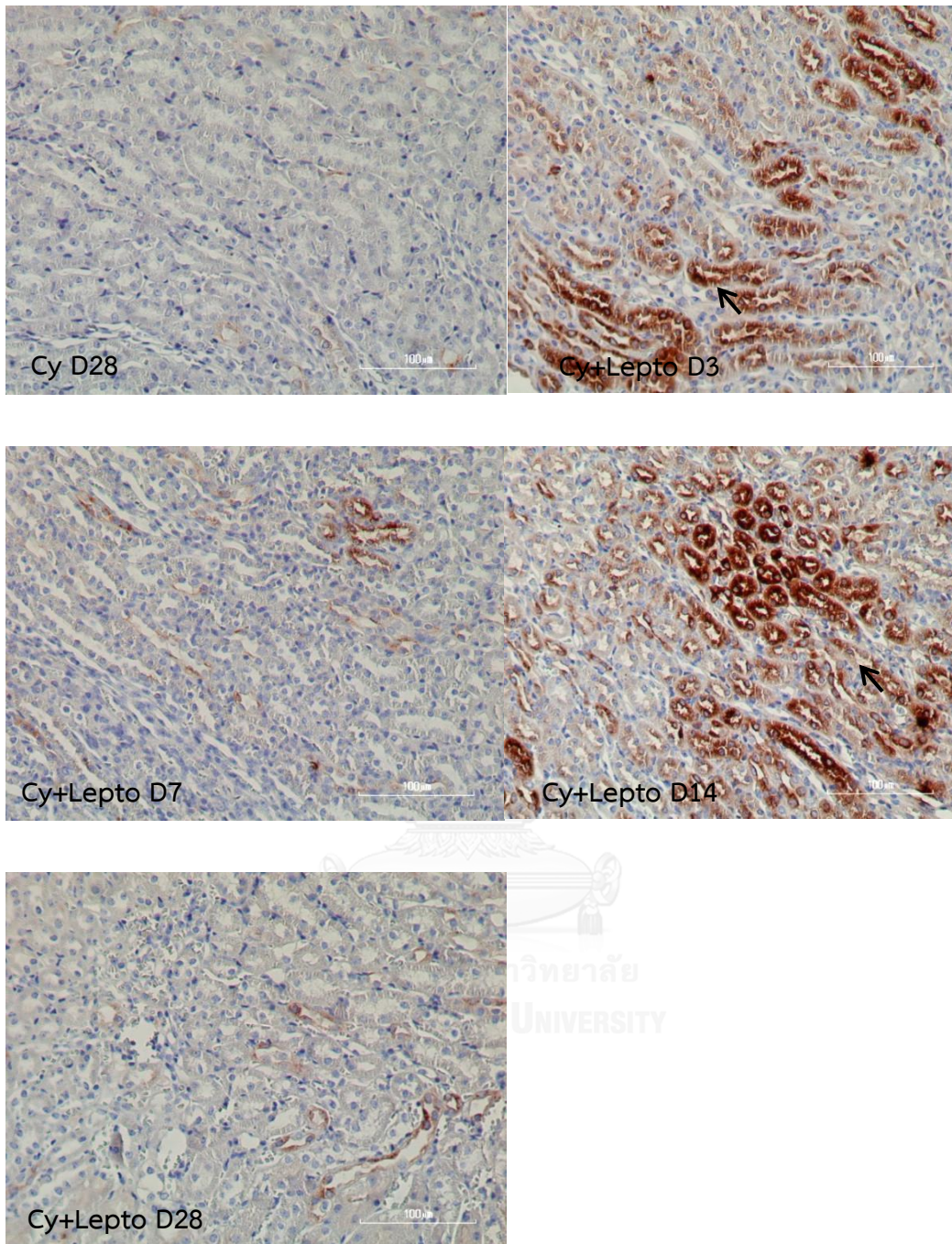
รูปที่ 29 การแสดงออกของโปรตีน Ng2 ในชิ้นเนื้อไตของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospores ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว ($n = 6$ ในแต่ละกลุ่ม) ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 40 เท่า
 ลูกศรชี้แสดงถึงการระดับความเข้มของการติดสีในเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry



รูปที่ 30 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่บริเวณชั้นเนื้อไตชั้นนอก renal cortex ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว

(n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า

ลูกศรชี้แสดงถึงการระดับความเข้มของการติดสีในเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry



รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่บริเวณชั้นเนื้อไตชั้นใน renal medulla ของหนูกลุ่มที่ได้ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้เฉพาะ Cy ขนาด 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว

(n = 6 ในแต่ละกลุ่ม) ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า

ลูกศรชี้แสดงถึงการระดับความเข้มของการติดสีในเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาบทบาทของ Ngal ในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ชักนำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรซิส ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน การศึกษาแรก คือ การศึกษาเบื้องต้น (ข้อมูลเพิ่มเติมในภาคผนวก) มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาให้หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 เป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองในการเกิด AKI จากโรคเลปโตสไปโรซิส ซึ่งการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันระหว่าง host และเชื้อเลปโตสไปรา มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดความรุนแรงของ AKI ในช่วงแรกจะเกิดกระบวนการอักเสบพบว่าการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด เช่น IL-1 β , IL-6, TNF- α ซึ่งหนูเมาส์มีแอนติบอดีต่อโปรตีนเหล่านี้ที่หลากหลายนอกจากหนูแฮมสเตอร์และหนูตะเภาที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบมาตรฐานในการศึกษาโรคเลปโตสไปโรซิส ที่สำคัญแอนติบอดีต่อโปรตีน Ngal ยังไม่มีในหนูแฮมสเตอร์และหนูตะเภาด้วย จึงเป็นข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถศึกษา Ngal กับการเกิด AKI ได้ ดังนั้นจึงได้มีการวิจัยที่พยายามจะพัฒนาหนูเมาส์ให้ มีความไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ สายพันธุ์ของหนูเมาส์ อายุ serogroup และ serovar ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งจะทำให้เกิดพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน จากรายงานของ Santos และคณะในปีค.ศ. 2010 พบว่า หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 มีการตอบสนองต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสและมีระดับของ leptospiral load และเกิด interstitial nephritis ในไตที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น (10) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 มาทำการศึกษาต่อในขั้นตอน การศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 1 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ SCr, sNgal และการเกิดพยาธิสภาพที่ไตของหนูทั้งสองกลุ่ม อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาที่สอดคล้องกันของ Adler ในปีค.ศ. 1976 และ Huyen ในปีค.ศ. 2011 ได้อธิบายว่า ระบบภูมิคุ้มกันเป็นกุญแจสำคัญที่ทำให้หนูเมาส์ มีความต้านทานต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา จึงได้ทำการศึกษาโดยให้สาร Cy ที่ขนาด 300 mg/kg เป็นเวลา 2 วันก่อนฉีดเชื้อเลปโตสไปรา พบว่า จะทำให้หนูเมาส์มีความไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราร้อยละ 90 ถึง 100 (34) และยังพบว่า Cy ไปกดระบบภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ทำให้มีการลดลงของ cell surface marker ของ lymphocyte คือ CD3⁺, CD4⁺ และ CD19⁺ ในวันที่ 4 (32) ผู้วิจัยจึงได้นำสาร Cy มาใช้ในการศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 2 พบว่า หนูกลุ่มทดสอบที่ได้รับเชื้อปริมาณ 10⁸ leptospores/mice เป็นเวลา 14 วัน มีระดับ SCr ไม่แตกต่างกัน แต่มีค่าสูงกว่าการศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 1 มีระดับ sNgal สูงขึ้นและยังพบว่าเกิดพยาธิสภาพ คือมี cell infiltrate ที่บริเวณท่อไตส่วนนอกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมและหนู

กลุ่มทดสอบที่ปริมาณเชื้อ 10^3 leptospores/mice ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจะใช้เป็นตัวบ่งบอกว่ามี AKI เกิดขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการจากการศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 2 มาวิจัยต่อในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาที่สอง มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาว่า Ngal สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จะตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันเมื่อเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปราในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 และการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน Ngal ที่หลั่งออกมาทั้งใน serum และ urine รวมทั้งระดับการแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่ไต ในช่วงเวลาที่ต่างกัน ซึ่ง Ngal จะแสดงบทบาทในการเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (early biomarker) เมื่อเกิด AKI จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ในกลุ่มที่ 8 (Cy+Lepto D28) มีระดับ SCr เพิ่มขึ้น 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 4 (Cy D28) แต่การเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณท่อไตส่วนนอกที่ประกอบด้วย interstitial nephritis, tubular injury รวมทั้งระดับ sNgal, uNgal และระดับการแสดงออกของ Ngal ที่ไตนั้น พบได้ในกลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3, D7, D14 และ D28) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 4 (Cy D28) แสดงให้เห็นว่าเมื่อไตเกิดการบาดเจ็บจึงส่งผลให้มีการเพิ่มการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน Ngal ทั้งใน serum และ urine จากไตเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกคือวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งตรวจพบได้ก่อนที่จะมีการสะสมของ creatinine ในเลือดจากการที่ไตทำงานได้ลดลง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ระดับของ Ngal จะเพิ่มสูงขึ้นทั้งใน serum และ urine ในหนูเมาส์ที่ชักนำให้เกิด AKI จากการทำ ischaemia-reperfusion และ sepsis ก่อนระดับ creatinine จะเพิ่มสูงขึ้น (20, 26, 27) ซึ่งในรายงานของ Santos และคณะในปี ค.ศ. 2010 ไม่ได้มีการวัดระดับ SCr และ sNgal ที่จะบ่งบอกถึงการเกิด AKI อย่งไรก็ตามในกลุ่มที่ 8 (Cy+Lepto D28) ที่มีระดับ SCr เพิ่มสูงขึ้นประกอบกับ tubular injury score ยังอยู่ใน score 2 แต่ระดับ Ngal ลดลงแล้ว อาจจะทำให้เห็นว่า Ngal ใช้บ่งชี้การทำงานของไตที่ผิดปกติได้ในระยะเริ่มต้น ส่วน SCr บ่งชี้การดำเนินโรคจากระยะที่เกิดการบาดเจ็บที่ไตเริ่มเข้าสู่ระยะการทำงานของไตที่ผิดปกติแล้ว

จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นชัดเจนว่า Ngal เป็น early biomarker ที่มีความไวและเฉพาะเจาะจงในการตรวจสอบ AKI ซึ่งจะมีประโยชน์ในการที่จะช่วยประกอบการวินิจฉัยการเกิด AKI ได้ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นช่วยให้การรักษาได้เร็วขึ้นและยังเป็นการศึกษาแรกที่ได้พัฒนาให้หนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับการดัดภูมิคุ้มกันด้วยสาร Cy มาใช้เป็นสัตว์ทดลองแบบจำลองในการศึกษาโรคเลปโตสไปโรซิสที่ชักนำให้เกิด AKI จะทำให้สามารถศึกษาวิจัย AKI ในเชิงลึกต่อไปได้และมีความสะดวกมากขึ้น เนื่องจากหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 เป็นหนูที่ผลิตขายในประเทศไทยและมีราคาที่ถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาส์สายพันธุ์ C3H/HeJ ที่มีรายงานว่าเกิด AKI ได้โดยที่ทำได้ติดเชื้อเลปโตสไปรา *L. interrogans* serovar Copenhageni พบว่าทำให้เกิดการบาดเจ็บที่ท่อไตและมีค่า

BUN และ creatinine เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (35) ซึ่งหนูสายพันธุ์ดังกล่าวจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพงมาก

การศึกษาในครั้งนี้พบข้อมูลที่น่าสนใจ คือ การสร้างและระดับการหลั่งโปรตีน Ngal ในเลือด โดยการตรวจหาระดับ sNgal ระหว่างที่มีการติดเชื้อเลปโตสไปรา อธิบายได้ว่า เมื่อมีการติดเชื้อเลปโตสไปราเชื้อจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วตามกระแสเลือดจนทำให้เกิดภาวะ systemic infection ขึ้นจากผลศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพาะเชื้อเลปโตสไปราจากเลือดในกลุ่มที่ 5 (Cy+Lepto D3) เท่านั้นที่ให้ผลบวกแสดงให้เห็นว่าเชื้อยังอยู่ในกระแสเลือดและไปกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งโปรตีน Ngal จาก neutrophil เป็นส่วนใหญ่ และจากการที่ Ngal มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงทำให้ระดับ Ngal ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติ

โปรตีน Ngal จัดเป็น glycoprotein มีขนาด 25 kDa จะถูกกรองผ่าน glomeruli และจับกับ magalin receptor ที่ด้าน apical ของ proximal tubule แล้วจึงเกิดกระบวนการ endocytosis และถูกย่อยสลายภายใน lysosome ได้เป็น fragment ขนาด 14 kDa(21) ดังนั้นในสภาวะปกติจะตรวจพบ Ngal ใน urine ในระดับต่ำ จากผลศึกษาครั้งนี้พบว่า ระดับของ Ngal ใน urine เพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติในกลุ่มที่ 5-8 (Cy+Lepto D3, D7, D14 และ D28) สอดคล้องกับการศึกษาของ Han และคณะปี 2012 ได้รายงานผลการศึกษา Ngal ที่มีการแสดงออกเมื่อเกิด AKI จากการที่ชักนำให้เกิด AKI ด้วย LPS ใน rat model พบว่า Ngal mRNA ที่ tubular epithelial จะ upregulate ตั้งแต่ที่ 3 ชั่วโมงและมีการ upregulate สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ระดับ pNgal และ uNgal เพิ่มขึ้นสูงสุดของ 5 และ 8 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (27) อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่มที่ 6 (Cy+Lepto D7) ที่มีระดับ serum Ngal สูงที่สุดเท่ากับ 1083.85 ± 155.96 ng/ml แต่ใน urine อยู่ที่ระดับ 186.30 ± 61.57 ng/ml อาจจะทำให้เห็นว่า proximal tubule ไม่ได้เกิดการบาดเจ็บจากการมีเชื้อเลปโตสไปราไปอาศัยอยู่ในบริเวณนั้นจึงทำให้การดูดกลับ Ngal จากในเลือดยังคงปกติแม้ว่าจะมีระดับที่สูงกว่ากลุ่ม Cy ก็ตามซึ่งอาจจะเกิดการกำจัดเชื้อเลปโตสไปราอย่างรวดเร็วจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host จึงทำให้ผลจากการเพาะเชื้อและ PCR จากไตให้ผลลบทั้งหมดทุกช่วงเวลา (38)

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน Ngal ในชิ้นเนื้อไต พบข้อมูลที่ที่น่าสนใจ คือ โปรตีน Ngal มีการแสดงออกที่บริเวณท่อไตทั้งส่วน cortex และ medullar ส่วนใหญ่พบที่ cortex ตรงส่วน proximal tubule และมีการแสดงออกมากที่สุดที่บริเวณ apical cell membrane จากการติดสี immunostaining ต่อโปรตีน Ngal ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่ส่วน proximal tubule นั้นเป็นรูปแบบการ reabsorption ของ Ngal ที่มาจากเลือด เพราะ magalin receptor อยู่ที่ด้าน apical ของ proximal tubule ผลที่ได้จึงไปในแนวทางเดียวกันกับระดับ sNgal แต่การแสดงออกของโปรตีน Ngal ที่ส่วน medullar ในช่วง D3 และ D14 ที่พบเป็นส่วนน้อยจะแสดง

ถึงว่ามี injury เกิดขึ้นที่ไตและจะหลั่ง Ngal ออกมาใน urine จึงพบว่า uNgal นั้นมีระดับการหลั่งที่คงที่ตลอดแม้ว่าจะสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ Cy ก็ตาม ดังนั้นจากผลการศึกษานี้จึงยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนว่า Ngal ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ไตนั้นเกิดจากการที่เชื้อเลปโตสไปราทำให้ไตเกิด injury เนื่องจากการศึกษาของ Paragas และคณะ ปีค.ศ. 2011 ที่ทำใน mouse model โดยการสร้าง *Ngal* reporter mouse จากการใช้เทคนิค genetic engineering ซึ่งจะตรวจพบโปรตีน Ngal แบบ realtime แล้วจึงทำให้ไตเกิด injury ด้วยวิธี ischemia-reperfusion พบว่า โปรตีน Ngal จะแสดงออกที่บริเวณ thick ascending limbs of Henle (TAL), collecting duct (CD) และ distal tubule ซึ่งไม่พบที่บริเวณ proximal tubule (26) และมีรายงานการศึกษาที่สอดคล้องกันของ Kuwabara และคณะปี ค.ศ. 2009 กับ Langelueddecke และคณะปี ค.ศ. 2012 พบว่า โปรตีน Ngal จะมีการแสดงออกบริเวณ cortex เป็นส่วนใหญ่ที่ส่วน distal tubule แต่ไม่พบที่ส่วน proximal tubule และในบริเวณ medullar จะแสดงออกมากที่ CD (39) ในส่วน mouse model ที่ทำให้ไตส่วน distal tubule เกิดการบาดเจ็บด้วยวิธี unilateral ureteral obstruction (UUO) พบว่า โปรตีน Ngal มีการแสดงออกที่บริเวณ TAL, CD และ distal tubule ในส่วน epithelia cells ที่เกิดการบาดเจ็บ (40) ทั้งสองการศึกษานี้ได้ทำการย้อม nephron marker ร่วมด้วยจึงสามารถอธิบายได้ชัดเจนถึงการแสดงออกของโปรตีน Ngal ในแต่ละส่วนที่แตกต่างกันของไตได้ ซึ่งสอดคล้องไปกับกลไกของ NGAL trafficking ที่ได้มีการอธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (30)

ความสัมพันธ์ของระบบภูมิคุ้มกันของ host และสาร Cy ที่ชักนำให้หนูเมาส์ susceptible ต่อการติดเชื้อเลปโตไปราแล้วเกิด AKI นั้นยังไม่มีข้อมูลที่จะสามารถอธิบายถึงกลไกการเกิดโรคได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาที่สอดคล้องกันของ Adler และ Faine ในปีค.ศ. 1976 และ Huyen ในปีค.ศ. 2011 ที่พบว่า การให้สาร Cy ที่ขนาด 300 mg/kg เป็นเวลา 2 วันก่อนฉีดเชื้อเลปโตสไปราจะทำให้หนูเมาส์ susceptible และทำให้มีการลดลงของ cell surface marker ของ lymphocyte คือ $CD3^+$, $CD4^+$ และ $CD19^+$ (32, 34) อาจจะแสดงให้เห็นว่าสาร Cy มีผลกด adaptive immune response ของ host แล้วทำให้ susceptible ต่อการติดเชื้อเลปโตไปรา แต่มีการศึกษาก่อนหน้าที่ได้รายงานว่า หนูเมาส์ C3H/HeJ ที่มี TLR 4 deficient ซึ่ง TLR จัดเป็น pathogen recognition receptors ของ innate immune response ก็ทำให้ susceptible ต่อการติดเชื้อเลปโตไปราที่ high dose (10^7 cells) แล้วเกิด AKI ได้ (35) และจากศึกษาของ Viriyakosol และคณะปี ค.ศ. 2006 ที่ทำให้ หนูเมาส์ C3H/HeJ ติดเชื้อเลปโตไปราโดยใช้เชื้อปริมาณมาก (high dose) คือ 6×10^8 cells พบว่า หนูเมาส์มีอาการป่วย มีเลือดออกที่ปอด และมีดีซ่าน และตายภายใน 4-5 วัน แต่เมื่อทำให้ติดเชื้อเลปโตไปราโดยใช้เชื้อปริมาณน้อยกว่า คือ 1×10^8 cells พบว่า หนูเมาส์จะรอดชีวิตและที่ไตเป็นอวัยวะที่มีจำนวนเชื้อเลปโตไปรามากที่สุดจากการตรวจด้วยวิธี real time PCR (36)

การเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของ Ngal ในการตรวจสอบภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิส จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระดับ sNgal ที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน อาจมีความสัมพันธ์ไปกับกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host ต่อเชื้อเลปโตสไปรามากกว่าเกิดการบาดเจ็บที่ท่อไตและระดับ uNgal ที่คงที่ในแต่ละช่วงเวลาเป็นตัวทำนายการเกิดภาวะไตวายฉับพลันได้ดี แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของแหล่งที่สร้างและหลั่ง Ngal รวมทั้งโครงสร้างโมเลกุลที่ต่างกันของทั้งส่วนซีรั่มและปัสสาวะ ยังมีข้อจำกัดของวิธีที่ใช้วัดระดับ Ngal (ELISA kit) ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถแยกโครงสร้างโมเลกุลที่ต่างกันของ Ngal ได้

5.2 สรุปผลการวิจัย

Ngal สามารถเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการตรวจสอบการเกิดภาวะไตวายฉับพลันจากโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันด้วย cyclophosphamide ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ สามารถนำสัตว์ทดลองแบบจำลองนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษากลไกและพยาธิสภาพของการเกิด AKI เมื่อติดเชื้อเลปโตสไปราในเชิงลึกต่อไปได้และในอนาคตควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจาก nephron marker อื่นๆร่วมด้วย เช่น Kim 1, Uromodulin ที่จะบ่งบอกได้ว่าไตเกิดการบาดเจ็บจริง รวมทั้งศึกษากลไกของสาร Cy ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ทั้ง innate immune response ต่อ TLR 2 และ TLR 4 และ adaptive immune response ต่อ lymphocyte ของ host เมื่อติดเชื้อเลปโตสไปราอาจจะนำไปสู่การศึกษากลไกการเกิด AKI ในหนูเมาส์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ถูกชักนำให้มีความไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา

รายการอ้างอิง

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71.
2. Daher EF, Silva Jr GB, de Abreu KL, Mota RM, Batista DV, Rocha NA, et al. Leptospirosis-associated acute kidney injury: penicillin at the late stage is still controversial. *J Clin Pharm Ther.* 2011.
3. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* 2008;12(4):351-7.
4. สำนักระบาดวิทยา. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง [10 ธันวาคม 2555]. Available from: http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y55/d43_4855.pdf.
5. Lopes JA, Jorge S, Resina C, Santos C, Pereira Á, Neves J, et al. Acute kidney injury in patients with sepsis: a contemporary analysis. *Int J Infect Dis.* 2009;13(2):176-81.
6. Coca SG, Parikh CR. Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury: Perspectives on Translation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(2):481-90.
7. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(10):2534-43.
8. Andrade L, Rodrigues AC, Jr., Sanches TR, Souza RB, Seguro AC. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F586-92.
9. Zhang Y, Lou XL, Yang HL, Guo XK, Zhang XY, He P, et al. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis.* 2012;12:20.
10. Santos CS, Macedo JO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJ, McBride FW, et al. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 9):1101-6.

11. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.
12. Murray PT, Devarajan P, Levey AS, Eckardt KU, Bonventre JV, Lombardi R, et al. A framework and key research questions in AKI diagnosis and staging in different environments. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):864-8.
13. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006;24(8):971-83.
14. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.
15. Marshall RB. The route of entry of leptospires into the kidney tubule. *J Med Microbiol*. 1976;9(2):149-52.
16. Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int*. 2007;72(8):918-25.
17. Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2006;69(5):815-22.
18. Araujo E, Seguro A, Spichler A, Magaldi A, Volpini R, De Brito T. Acute kidney injury in human leptospirosis: an immunohistochemical study with pathophysiological correlation. *Virchows Arch*. 2010;456(4):367-75.
19. Daher Ede F, de Abreu KL, da Silva Junior GB. Leptospirosis-associated acute kidney injury. *J Bras Nefrol*. 2010;32(4):400-7.
20. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-69.
21. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nickolas TL, Devarajan P, Barasch J. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1451-8.
22. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-

associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett.* 2005;579(3):773-7.

23. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005;115(3):610-21.

24. Asuthkar S, Velineni S, Stadlmann J, Altmann F, Sritharan M. Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun.* 2007;75(9):4582-91.

25. Sritharan M, Asuthkar S, Sridhar V. Understanding iron acquisition by pathogenic leptospires: a review. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(4):311-6.

26. Paragas N, Qiu A, Zhang Q, Samstein B, Deng SX, Schmidt-Ott KM, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med.* 2011;17(2):216-22.

27. Han M, Li Y, Liu M, Cong B. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol.* 2012;13:25.

28. Martensson J, Bell M, Oldner A, Xu S, Venge P, Martling CR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2010;36(8):1333-40.

29. Yang HN, Boo CS, Kim MG, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin: an independent predictor of adverse outcomes in acute kidney injury. *Am J Nephrol.* 2010;31(6):501-9.

30. Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury--where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(3):762-4.

31. de Jonge M, Huitema AR, Rodenhuis S, Beijnen J. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(11):1135-64.

32. Huyan X-H, Lin Y-P, Gao T, Chen R-Y, Fan Y-M. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(9):1293-7.

33. Rehman M, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1-2):119-27.
34. Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Serovar pomona. *Infect Immun.* 1976;14(3):703-8.
35. Nally JE, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Infect Immun.* 2005;73(10):7014-7.
36. Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun.* 2006;74(2):887-95.
37. Srisawat N, Manotham K, Eiam-Ong S, Katavetin P, Praditpornsilpa K. Erythropoietin and its non-erythropoietic derivative: do they ameliorate renal tubulointerstitial injury in ureteral obstruction? *Int J Urol.* 2008;15(11):1011-7.
38. Chirathaworn C, Kongpan S. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(1):77-81.
39. Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, Wolff NA, Lee WK, Thevenod F. Lipocalin-2 (24p3/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J Biol Chem.* 2012;287(1):159-69.
40. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009;75(3):285-94.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

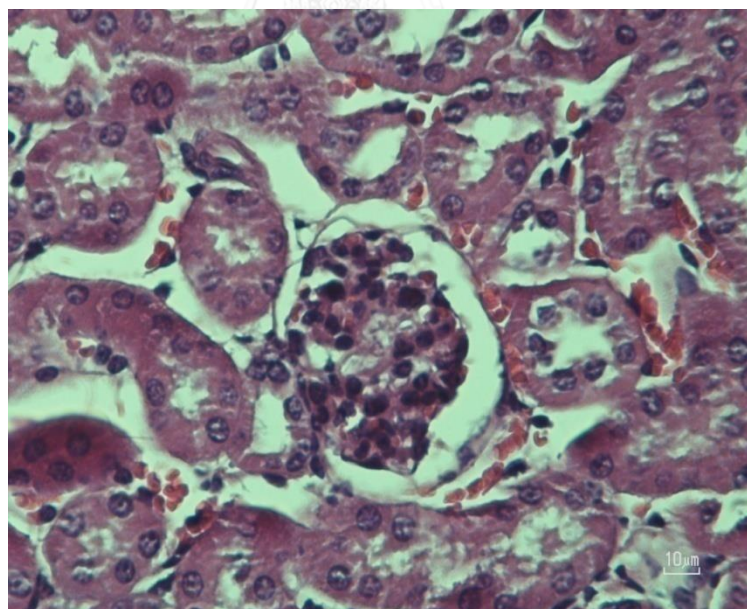
1. การศึกษาเบื้องต้น

เพื่อพัฒนาให้หนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบและหาปริมาณเชื้อเลปโตสไปราที่เหมาะสมในการทำให้เกิด AKI เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่กระทำในหนูเม้าส์สายพันธุ์ C57BL/6 และเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *L. interrogans* serovar Pomona โดยแบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ

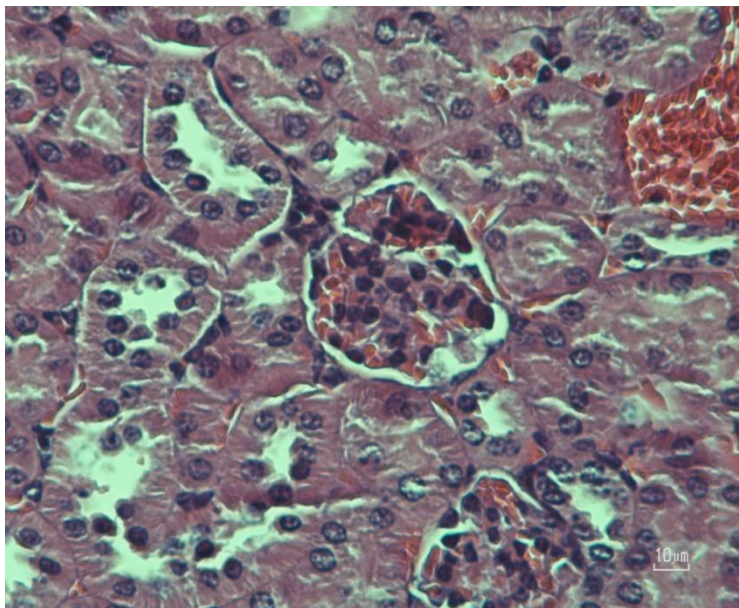
1.1 การศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 1 กลุ่มทดสอบจะเลือกปริมาณเชื้อ 2 ขนาด คือ 10^3 และ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว ฉีดเข้าทางช่องท้องเพียงครั้งเดียว (single intraperitoneal, i.p.) และกลุ่มควบคุมได้รับ sterile EMJH i.p. ขนาดละ 2 ตัวเป็นเวลา 14 วันพบว่า ระดับ serum creatinine ไม่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5 และไม่พบว่ามีพยาธิสภาพที่ไตของหนูทั้งสามกลุ่มดังแสดงรูปที่ 33-35

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย sCr

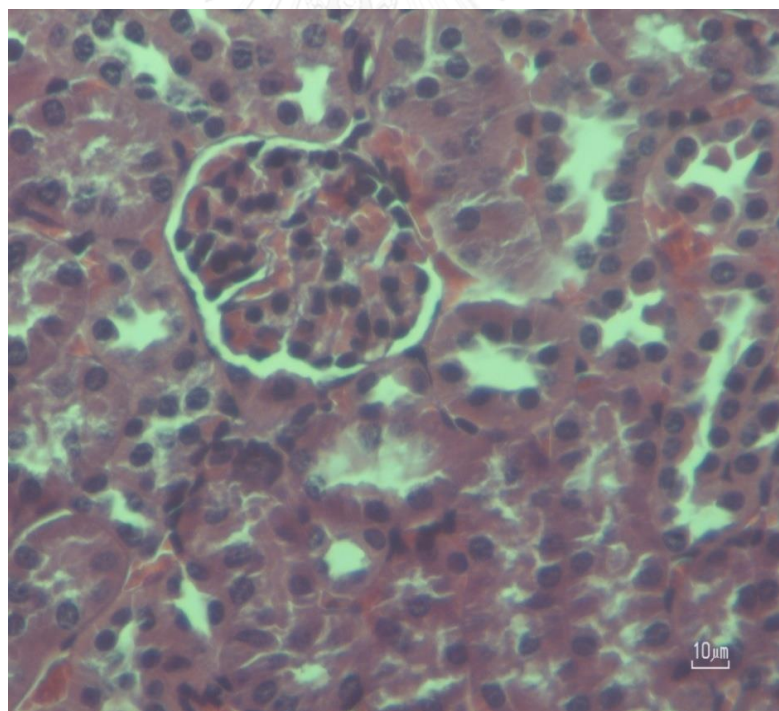
	Cont. group	10^3 group	10^8 group
SrCr (mg/dl)	0.19	0.18	0.18
Kidney culture	negative	negative	negative



รูปที่ 32 ชิ้นเนื้อไตย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มควบคุมที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า



รูปที่ 33 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มทดสอบขนาด 10^3 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า



รูปที่ 34 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วย H&E ของหนูกลุ่มทดสอบขนาด 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า

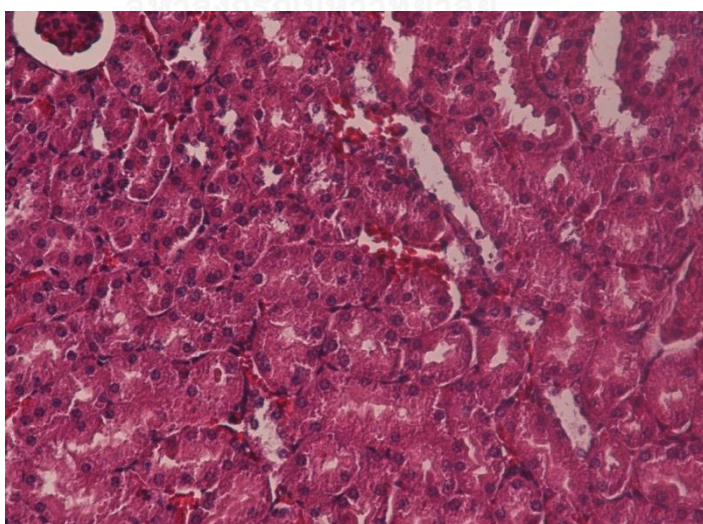
เนื่องจากไม่พบพยาธิสภาพที่ไตของหนูกลุ่มทดสอบ ผู้วิจัยจึงได้สืบค้นเอกสารเพิ่มเติมพบว่ามีการศึกษาของ Adler ในปีค.ศ. 1976 รายงานว่า การให้สาร Cy ที่ขนาด 300 mg/kg เป็นเวลา 2

วันก่อนฉีดเชื้อเลปโตสไปราจะทำให้หนูเมาส์ susceptible ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราร้อยละ 90 ถึง 100 และ Huyen ในปีค.ศ. 2011 พบว่า Cy ไปกดระบบภูมิคุ้มกันของหนูเมาส์ทำให้มีการลดลงของ cell surface marker ของ lymphocyte คือ $CD3^+$, $CD4^+$ และ $CD19^+$ ในวันที่ 4 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำสาร Cy มาใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป

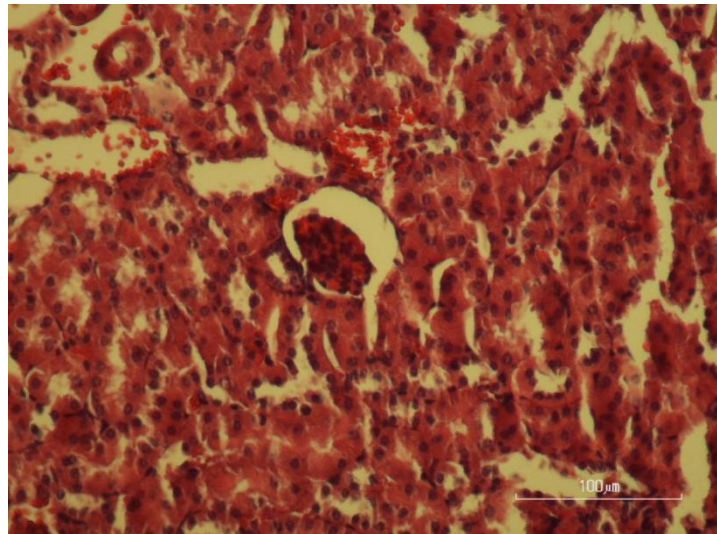
1.2 การศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 2 โดยที่กลุ่มทดสอบจะได้รับการฉีดด้วย Cy 300 mg/kg, i.p. ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อขนาด 10^3 และ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว, i.p. และกลุ่มควบคุมได้รับการฉีดด้วย Cy 300 mg/kg, i.p. อย่างเดียว ขนาดละ 2 ตัวเป็นเวลา 14 วันพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย Cy ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^3 และ 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว มีระดับ sCr ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย Cy อย่างเดียว เมื่อครบ 14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่พบว่า มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่ไตเมื่อย้อมด้วยวิธี H&E คือ มี interstitial nephritis ที่บริเวณท่อไต ในหนูกลุ่ม ที่ได้รับการฉีดด้วย Cy ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว ซึ่งไม่พบพยาธิสภาพในหนูกลุ่ม dose 10^3 leptospire ต่อหนู 1 ตัว และหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย Cy อย่างเดียวดังแสดงในรูปที่ 36-38

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ย sCr

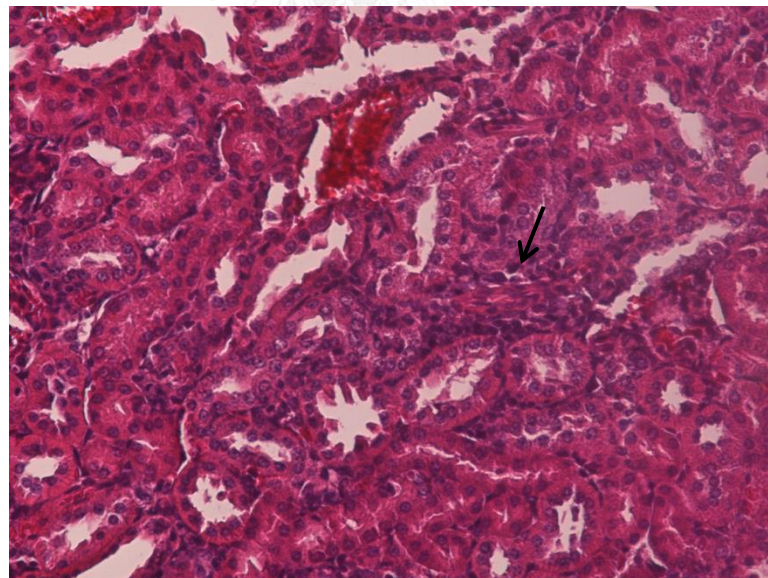
	Cy Cont. group	Cy+ 10^3 group	Cy+ 10^8 group
sCr (mg/dl)	0.29	0.23	0.24
Kidney culture	negative	negative	negative



รูปที่ 35 ชิ้นเนื้อไตย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide อย่างเดียวเมื่อครบ 14 วันที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า



รูปที่ 36 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^3 leptospire ต่อหนู 1 ตัวเมื่อครบ 14 วันที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า



รูปที่ 37 ชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยวิธี H&E ของหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย cyclophosphamide ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปรา dose 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัว เมื่อครบ 14 วันที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า

จากผลการศึกษาเบื้องต้นครั้งที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ Cy ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงฉีดเชื้อเลปโตสไปราขนาด 10^8 leptospire ต่อหนู 1 ตัวสามารถทำให้หนูเมาส์เกิด AKI ได้

2. การเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

2.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

1. เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค *Leptospira interrogans* serovar pomona ที่แยกได้จากหนูแฮมสเตอร์จะถูก freeze ใส่ cryo tubes เก็บอยู่ใน liquid nitrogen ที่อุณหภูมิ -196°C
2. เมื่อจะนำเชื้อเลปโตสไปรามาใช้ให้ทำการ thaw โดยการนำ cryo tubes ออกจาก liquid nitrogen แล้วให้ละลายเชื้อที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว
3. หลังจากเชื้อละลายแล้วจึง mix เบาๆ แล้วดูด 1 ml ของเชื้อใส่ในหลอดอาหาร EMJH broth 4 ml แล้ว mix เบาๆ
4. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 29°C โดยคลายเกลียวหลอดอาหารเล็กน้อย เชื้อเลปโตสไปราจะเจริญโดยเห็นลักษณะอาหารขุ่นขึ้นประมาณ 1-2 สัปดาห์ จึงนำเชื้อไปถ่ายเลี้ยงใช้ในการทดลองได้

2.2 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อเลปโตสไปรา

1. เมื่อเชื้อที่ถ่ายเลี้ยงเจริญมากขึ้นโดยสังเกตจากอาหารที่ขุ่นขึ้นและแบ่งไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด dark field จึงแบ่งไปนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer โดยที่จะนับทั้งหมด 5 ช่องจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเชื้อจากสูตร

$$\frac{N \times \text{dilution factor} \times 2 \times 10^7}{80} = \text{cells/ml}$$

2. เชื้อเลปโตสไปราจะใช้ที่ low passage (<5) ทุกการทดลองเมื่อคำนวณปริมาณเชื้อได้แล้ว จึงนำ stock เชื้อไปปั่นล้างที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีจำนวน 2 ครั้งแล้วจึง resuspend เชื้อในอาหาร EMJHfree ตาม dose ที่ต้องการ

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

1. Albumin fatty acid supplement stock solution

CaCl ₂ + MgCl ₂ 6H ₂ O	0.076 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.04 g
CuSO ₄ H ₂ O	0.03 g
Vitamin B12	0.002 g
Tween 80	1 g
Glycerol	1 g

สารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ -

20°C จนกระทั่งใช้

2. Albumin fatty acid supplement solution, ready to use (50ml)

BSA	5	g
CaCl ₂ + MgCl ₂ 6H ₂ O	750	μl
ZnSO ₄ 7H ₂ O	500	μl
CuSO ₄ H ₂ O	50	μl
FeSO ₄	0.025	g
Sodium pyruvate	0.02	g
Vitamin B12	500	μl
Tween 80	6.25	ml
Glycerol stock	500	μl

สารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.4-7.6 ด้วย HCl แล้ว
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายไปกรองด้วยวิธีปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -
20°C จนกระทั่งใช้

3. Basal Leptospira Media Base EMJH dehydrated 0.23 g

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 90 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อ
ด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

4. EMJH Media

Basal Media	90	ml
Albumin fatty acid supplement solution	10	ml

ผสมสารละลายและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. การศึกษาทาง Immunohistochemistry ของโปรตีน Ngal ในชิ้นเนื้อไต

3.1 ขั้นตอนการทำ

- นำชิ้นเนื้อไตมาคงสภาพด้วย 10% neutral buffered formalin solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน
- นำชิ้นเนื้อไตที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่ชิ้นเนื้อเยื่อและนำไปทำฝังเนื้อเยื่อตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome ใส่บนสไลด์
- อุ่นสไลด์ ในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 60°C 10 นาที
- ทำการแทนที่พาราฟิน (deparaffinize) โดยการ
 - จุ่มสไลด์ในโท Xylene โถละ 5 นาที จำนวน 2 โถ
 - จุ่มสไลด์ในโท absolute alcohol โถละ 10 นาที จำนวน 2 โถ
 - จุ่มสไลด์ในโท 95% alcohol โถละ 10 นาที จำนวน 2 โถ

5. แช่สไลด์ในน้ำกลั่น ประมาณ 5 นาที
6. อุ้มน Citrate Buffer 0.01M (pH 6.0) ด้วยไมโครเวฟ 5 นาที
7. นำสไลด์ ใส่ลงใน Citrate Buffer จากนั้น นำไปอุ้มนด้วยไมโครเวฟ อีก 6 นาที ด้วยไฟอ่อน
8. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
9. แช่สไลด์ในน้ำกลั่น 5 นาที
10. เรียงสไลด์บน rack แล้วล้างด้วย PBS 3 รอบ
11. หยด 3% hydrogen peroxide ลงบนเนื้อเยื่อ incubate ใน moist chamber ประมาณ 5 นาที
12. เท Hydrogen peroxide ออก แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
13. ใส่ Protein Block (1% BSA) ลงบนเนื้อเยื่อ incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
14. เท 1% BSA ออก แล้วหยด primary monoclonal antibody แล้วเขย่า
15. นำสไลด์ใส่ใน moist chamber แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน
16. ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ใส่ secondary antibody incubate 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
17. ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ใส่ substrate incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
18. ล้างสไลด์ด้วย น้ำกลั่น
19. ย้อมสี counterstain ด้วยสี Hematoxylin
20. ล้างสไลด์ ด้วยน้ำกลั่น
21. จุ่มสไลด์ใน 95% alcohol โถละ 10 วินาที จำนวน 2 โถ
22. จุ่มสไลด์ใน absolute alcohol โถละ 10 วินาที จำนวน 2 โถ
23. จุ่มสไลด์ใน xylene โถละ 10 วินาที จำนวน 2 โถ
24. ปิดสไลด์ ด้วย Mounting media

3.2 ผลการย้อม

Cytoplasm

ติดสีน้ำตาล (ผลบวก)

4. การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อไตและ Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อหาเชื้อเลปโตสไปรา

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อไต

1. นำชิ้นเนื้อไตไปชั่งน้ำหนักแล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Germany)

2. นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ PCR เพื่อตรวจหา ยีน LipL 32 ใช้คู่ primer คือ 45F primers (5' AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG3') and 287R primers (5' CGA ACT CCC ATT TCA GCG AT 3') โดยมี PCR reaction ดังนี้

Reaction mix (1 sample)

DW	13.5 μ l
10x Buffer	2.0 μ l
25 mM MgCl ₂	1.2 μ l
10 mM dNTP	0.4 μ l
F primer	0.4 μ l
R primer	0.4 μ l
Taq DNA polymerase	0.1 μ l
DNA template	2.0 μ l
final volume	20 μ l

PCR reactions (40 cycles)

Initial cycle of 94 °C for 10 min

94 °C for 1 min

55 °C for 1 min

72 °C for 1 min

Final extension step at 72 °C for 7 min.

PCR products were run on a 1% agarose gel with ethidium bromide and photographed

4.2 การเตรียมสารสำหรับ agarose gel electrophoresis

1. 50x Tris-Acetate buffer (TAE)

Tris base 424.0 g

Glacial acetic acid 57.1 g

0.5 M EDTA pH 8.0 100 ml

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

2. 10 mg/ml Ethidium bromide

Ethidium bromide	1.0	g
Distilled water	100	ml

ผสมสารละลายและเก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4°C

3. Agarose gel

Agarose	0.5	g (2.5% gel)
1xTAE	20	ml

ละลายสารโดยใช้ความร้อนในเครื่อง microwave และนำออกมาเขย่า

จนกระทั่งได้เป็นสารละลายใส



เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow, MICROFLOW: model ABS 1200 class 2)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (CO₂ incubator, LABWIT)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field, Nikon: model ECLIPSE 50i)
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Dark field, Olympus)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Eppendorf: model 5810R)
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR, Eppendorf: model ABI)
7. เครื่องวัดความเข้มข้นสารละลายด้วยคลื่นแสง (Spectrophotometer, Thermo scientific: model VARIOSKAN FLASH 3001)
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท (microplate reader, BioTek: model EL808)
9. เครื่องล้างไมโครเพลท (microplate washer, BioTek: model ELx50)
10. เครื่องเขย่าสารละลาย (Orbital shaker, Benchmark: model BT1500)
11. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex, VORTEX-GENIE: model K-550-GE)
12. เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block, Biosan: model major science EL-02)
13. ตู้เย็น (Refrigerator, SANYO: 5R-F415)
14. ตู้ -80 องศาเซลเซียส (Freezer -80°C, SANYO: MDF-U74V)
15. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง (4 decimal balance, OHAUS: model Precisa XT220A)
16. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter, ESDO: model Schott)

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. หลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube, corning)
2. หลอดปั่นขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (centrifuge tube, corning)
3. ทิปขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (tip, corning)
4. Slide 25.4x76.2 mm, tick 1-1.2 mm (SALI BRAND)
5. cover slips 22x22 mm (MENZEL-GLASER)
6. หลอดฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร (syringe, Nipro)
7. เข็มฉีดยาขนาด 21 และ 26 นิ้ว (needle, Nipro)
8. ปีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (beaker, Pyrex)
9. ขวดแก้วขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (bottle, Duran)
10. กระบอกตรวจขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (cylinder, Duran)
11. ปิเปตอัตโนมัติขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1,000 มิลลิลิตร (auto pipette, BRAND)
12. ปิเปตอัตโนมัติชนิด 8 ช่องขนาด 100 และ 300 มิลลิลิตร (multichannel pipette, Eppendorf)
13. เครื่องช่วยดูดสารละลายอัตโนมัติ (pipetting aids, BIOHIT)
14. สไลด์นับเซลล์ (haemocytometer, Hausser Scientific)

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการวิจัย

1. PBS (Sigma, product no. SLBJ 3807V)
2. Formaldehyde solution, min 37% (Merck, cat. no. 1.03003.2500)
3. Endoxan Cyclophosphamide powder for injection, 1 g (Baxter)
4. Creatinine assay kit (Bioassay system, cat. no. DICT-500)
5. mouse Lipocalin-2/NGAL antibody polyclonal goat IgG (R&D cat. no. AF1857)
6. Goat IgG Horseradish Peroxidase conjugate antibody polyclonal rabbit IgG (R&D cat. no. HAF07)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสรินยา คำปัญญา

วัน เดือน ปีเกิด 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2531 จังหวัดเพชรบูรณ์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร 2553

ผู้ช่วยวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 2553-2555

กำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงเซลล์
ชีววิทยาและอนุพันธุศาสตร์ของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2555-ปัจจุบัน

