

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการลดการอักเสบ  
ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดนิ่วในไต  
Study the effect of unpolished black sticky rice and unpolished Sungyod sticky rice  
extracts on anti-inflammation in kidney stone forming rat

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญาพร หนูอุไร  
สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์  
คณะสหเวชศาสตร์  
รหัสโครงการ AHS๒/๒๕๖๒

ผู้ร่วมวิจัย  
ดร.วิฑูร ขาวสุข  
ดร.ทิษฎญา เสมาเงิน

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562  
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
กันยายน/2563

|              |   |
|--------------|---|
| หัวข้อวิจัย  | การศึกษาสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการลดการอักเสบในหนูขาวที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดนิ่วในไต<br>Study the effect of unpolished black sticky rice and unpolished Sungyod sticky rice extracts on anti-inflammation in kidney stone forming rat |
| ชื่อผู้วิจัย | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญพร หนูอุไร   |
| หน่วยงาน     | คณะสหเวชศาสตร์  |
| ปีงบประมาณ   | 2562  |

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการลดการอักเสบและพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตในหนูขาวที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดนิ่วในไต การทดลองใช้หนูแรทเพศผู้ แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเป็นหนูที่ให้อาหารและน้ำปกติ ไม่มีการเหนียวน้ำให้เกิดนิ่วในไต กลุ่มที่ 2 หนูถูกเหนียวน้ำให้เกิดภาวะนิ่วในไต โดยการให้ดื่มน้ำปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% ethylene glycol (EG) (v/v) อีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 เป็นหนูที่กิน potassium citrate ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่ให้หนูกินสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดตามลำดับ ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG 2 สัปดาห์ โดยทุกสัปดาห์จะทำการเก็บน้ำปัสสาวะมาหาค่า pH และปริมาณผลึก COM เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาค่า BUN และ creatinine เก็บเนื้อเยื่อไตเพื่อนำมาศึกษาพยาธิสภาพด้วยวิธีการย้อมสี H&E ศึกษาตำแหน่งและปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$  ด้วยวิธี immunohistochemistry และ Western immunoblotting ผลของค่า pH ในน้ำปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่มพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ potassium citrate หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีค่า pH เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 ( $p < 0.05$ ) และมีค่า pH ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ก่อนการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 และมีปริมาณผลึก COM น้อยและไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในแต่ละสัปดาห์ ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวมีค่า pH ลดลง และมีปริมาณผลึก COM ในน้ำปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้น ( $p < 0.05$ ) ส่วนค่า BUN และ creatinine ในหนูทุกกลุ่มจะอยู่ในเกณฑ์ปกติเมื่อเปรียบเทียบกับ ค่า BUN และ creatinine อ้างอิง พบลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไตของหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวเกิดพยาธิสภาพรุนแรงที่สุด โดยพบเยื่อหุ้มท่อไตส่วนปลายขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen กว้าง และมีความหนาของผนังลดลง มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์เยื่อหุ้ม และนิ่วเคลือบติดสีเข้มขึ้น นอกจากนี้พบแถบโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 และ IL-6 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11 และ 21kDa ตามลำดับและพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวมีการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 และ IL-6 เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดพบการแสดงออกของ MCP-1 ลดลง เช่นเดียวกับการให้สาร potassium citrate และไม่พบการแสดงออกของ TGF- $\beta$  ในเนื้อเยื่อไตของทุกกลุ่มการทดลอง การทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถลด cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบและพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตในหนูขาวที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดนิ่วในไตได้

คำสำคัญ ข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ ข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด ลดการอักเสบ นิ่วในไต

## Abstract

This study was investigated the effects of unpolished black sticky rice and unpolished Sungyod sticky rice extracts on ethylene glycol-induced inflammation and renal pathology in rats. In vivo experiment, male rats were divided into five groups: group1; the control group received normal drinking water for four weeks, group 2; the ethylene glycol group received normal drinking water for two weeks, group 3 was daily fed potassium citrate at the dose of 100 mg/kg by gastric intubation for two weeks, group 4 and 5 were daily fed black sticky rice and Sungyod sticky rice, respectively at the dose of 200 mg/kg by gastric intubation for two weeks. After two weeks, 0.5% ethylene glycol was administered in groups of 2-5 for two weeks. The urine samples were weekly collected for pH and calcium oxalate analyses. The serum samples were weekly collected for BUN and creatinine analyses. At the end of the experiment, the kidney tissues were collected for histological and cytokine detection analyses. The potassium citrate, black sticky rice and Sung Yod sticky rice treated groups were exhibited significantly increased the pH levels at week 3 compared to the ethylene glycol group. The amount of calcium oxalate crystals in urine sample was reduced by treatment with black sticky rice and Sung Yod sticky rice extracts. The levels of BUN and creatinine in the serum of all groups were normal ranges, as compared with standard. Pathological changes of the kidney including distal tubule dilation, the flattened renal tubular cells and their nuclear condensation in rat were reduced by treatment with black sticky rice and Sung Yod sticky rice extracts. MCP-1 and IL-6 were detected in the kidney tissue at the molecular weight of 11 and 21 kDa, respectively. The expression of MCP-1 and IL-6 decreased in black sticky rice and Sung Yod sticky rice treated group, as compared with the ethylene glycol group. The expression of TGF- $\beta$  was not detected in this study. These findings demonstrate that the black sticky rice and Sung-Yod sticky rice extracts have a reduction effect on the ethylene glycol-induced inflammation and renal pathology. These extracts might be beneficial in preventing the cause of kidney stone.

**Keywords** unpolished black sticky rice, unpolished Sungyod sticky rice, anti-inflammation, kidney stone

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือและครุภัณฑ์ในการทำการวิจัยให้ลุล่วงและสำเร็จได้ด้วยดี

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....  | ก    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....   | ข    |
| กิตติกรรมประกาศ.....  | ค    |
| สารบัญ.....   | ง    |
| สารบัญภาพ.....  | จ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....   | 1    |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....   | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....  | 2    |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....  | 2    |
| 1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....  | 3    |
| บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....  | 4    |
| 2.1 โรคนิวโมไต.....   | 4    |
| 2.2 การศึกษาสมุนไพรมัวยับยั้งการเกิดโรคนิวโมไต.....   | 7    |
| 2.3 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด.....  | 7    |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....   | 10   |
| 3.1 การสกัดสารจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด<br>ด้วย 75% ethanol.....   | 10   |
| 3.2 การเตรียมสัตว์ทดลองและการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวกล้องข้าว<br>เหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดในสัตว์ทดลองที่เหนียวทำให้เกิด<br>ภาวะนิวโมไต..... | 10   |
| 3.3 การวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณของผลึก CaOx ในน้ำปัสสาวะ.....  | 10   |
| 3.4 การวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine ในเลือด.....   | 10   |
| 3.5 การศึกษาพยาธิสภาพและปริมาณการสะสมผลึก CaOx ด้วยวิธีการย้อมสี H&E  | 11   |
| 3.6 ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลและปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ<br>TGF- $\beta$ ด้วยวิธี Western immunoblotting.....  | 11   |
| 3.7 ศึกษาตำแหน่งและการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$ ด้วยวิธี<br>immunohistochemistry.....  | 12   |
| 3.8 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล.....   | 12   |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....   | 13   |
| 4.1 ผลการทดลอง.....   | 13   |
| 4.2 อภิปรายผลการทดลอง.....  | 22   |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....  | 25   |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย.....   | 25   |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ.....   | 25   |
| บรรณานุกรม.....   | 26   |
| ภาคผนวก.....  | 33   |

## สารบัญภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| ภาพที่ 1 : ค่าเฉลี่ย pH ในน้ำปัสสาวะของหนูในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกับในแต่ละกลุ่ม  | 13   |
| ภาพที่ 2 : ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึก COM ต่อหนึ่งบริเวณที่กำลังขยาย 40x ของหนูในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกับในแต่ละกลุ่ม.....                | 14   |
| ภาพที่ 3 : การเปรียบเทียบค่า BUN ของแต่ละกลุ่มในแต่ละสัปดาห์.....   | 15   |
| ภาพที่ 4 : ค่า BUN ใน serum ของสัตว์ทดลองเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์   | 15   |
| ภาพที่ 5 : การเปรียบเทียบค่า Creatinine ของแต่ละกลุ่มในแต่ละสัปดาห์.....  | 16   |
| ภาพที่ 6 : ค่า Creatinine ระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์.....   | 16   |
| ภาพที่ 7 : ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไตของหนูแต่ละกลุ่มที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin.....                                    | 17   |
| ภาพที่ 8 : ค่าเฉลี่ยความหนาของเยื่อหุ้มและเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen ของท่อไตส่วนปลายในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม.....            | 18   |
| ภาพที่ 9 : น้ำหนักโมเลกุลและการแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม  | 19   |
| ภาพที่ 10 : เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม.....  | 19   |
| ภาพที่ 11 : น้ำหนักโมเลกุลและการแสดงออกของ IL-6 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม...   | 20   |
| ภาพที่ 12 : เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ IL-6 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม.....   | 20   |
| ภาพที่ 13 : Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S (กำลังขยาย 40X)..... | 21   |
| ภาพที่ 14 : Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S (กำลังขยาย 40X).....  | 21   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วในไตเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ในประเทศไทยมีความชุกของการเกิดโรคประมาณ 16.9% (1) จากข้อมูลสถิติผู้ป่วยโรคนิ่วในไตในปี พ.ศ. 2555 พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 58,258 คน ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2554 เป็นต้นมา โดยส่วนใหญ่พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (2) ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค ได้แก่ ความผิดปกติของไต พันธุกรรม สภาพภูมิอากาศ โภชนาการ และพฤติกรรม การบริโภคเป็นต้น พบว่าเพศชายเป็นโรคนิ่วมากกว่าเพศหญิง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะติดขัด ปวดบริเวณเอว ปัสสาวะขุ่นมีเลือดปน อาจเกิดการติดเชื้อ ทำให้ไตวายได้ ผู้ที่เคยเป็นนิ่วในไตแล้วมักจะเกิดเป็นซ้ำอีกใน 7-10 ปี สำหรับก้อนนิ่วที่พบมากที่สุด ในผู้ป่วยประมาณร้อยละ 80 คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (Calcium oxalate, CaOx) ชนิดโมโนไฮเดรต (Calcium oxalate monohydrate, COM) กลไกการเกิดโรคนิ่วในไตเริ่มจากการจับกันของแคลเซียมไอออนกับออกซาเลตไอออนที่มีความเข้มข้นสูงอย่างยิ่งแล้วเกิดการตกผลึกบริเวณท่อไตส่วนปลาย โดยผลึกที่เกิดขึ้นในครั้งแรกจะทำหน้าที่เป็นแกนและมีการตกผลึกซ้ำๆ เกิดเป็นก้อนผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นผลึกจะเกิดการเกาะเกี่ยวกัน จนในที่สุดไปเกาะจับกับเซลล์เยื่อบุท่อไต จนมีขนาดใหญ่ขวางกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดและแสดงอาการ การเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลายนั้นเป็นขั้นตอนวิกฤตสำคัญในการเกิดนิ่วในไต โดยผลึก COM จะจับกับเยื่อบุผิวเซลล์ท่อไตทางด้าน apical surface และถูกนำเข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบขึ้น มีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมาก ทำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเปลี่ยนแปลง เกิดภาวะเครียด เซลล์เกิดความเสียหายและเกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนั้นผลึก COM สามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสร้างและหลั่ง inflammatory mediators ได้ เช่น MCP-1, OPN, IL-6 และ Ang II สารเหล่านี้ทำให้เกิดการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาใน renal interstitium และส่งผลให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น เซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้น และส่งเสริมการเกิดโรคนิ่วในไตให้รุนแรงขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกการดึงดูดเซลล์อักเสบต่างๆ เข้ามาใน renal interstitium ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานว่าเซลล์บุท่อไตจะสังเคราะห์ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ interleukin-6 (IL-6) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่วและออกซาเลต และพบการแสดงออกของ MCP-1 ในเซลล์บุท่อไตของหนูที่เป็นนิ่ว ดังนั้น MCP-1 และ interleukin-6 (IL-6) น่าจะมีบทบาทหลักในการดึงดูดเซลล์ที่เกิดการอักเสบเข้าสู่ renal interstitium เพื่อกระตุ้นการอักเสบในโรคนิ่วในไต นอกจากนี้มีรายงานพบว่าสารที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาวจะกระตุ้นให้เซลล์ fibroblast เปลี่ยนเป็นเซลล์ myofibroblast และหลั่ง profibrotic cytokine เช่น TGF- $\beta$  ทำหน้าที่ในกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลและสร้าง extracellular matrix (ECM) proteins จนเกิดเป็นพังผืดที่ไต (renal fibrosis) ตามมา ทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืด จะส่งเสริมให้ renal interstitium และท่อไตถูกทำลาย ซึ่งเป็นตำแหน่งให้ผลึกเข้าเกาะยึดได้ดีขึ้น เศษเซลล์ที่ถูกทำลายและสารชีวโมเลกุลที่หลั่งออกมาจะกระตุ้นการเกิดผลึกใหม่และการรวมกลุ่มของผลึกได้ดีขึ้น จนเกิดเป็น stone nidus สำหรับเจริญเป็นก้อนนิ่วต่อไป

ปัจจุบันการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติหรือสมุนไพรเพื่อนำมาทดลองหาฤทธิ์ในการรักษาและยับยั้งการเกิดโรค โดยเฉพาะสารสกัดกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากอนุมูลอิสระจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด (oxidative stress) ทำให้เซลล์เสื่อมถอยและส่งผลกระทบ

ต่อกลไกการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ, โรคมะเร็ง, โรคหลอดเลือดสมอง และโรคซรา เป็นต้น ตัวอย่างสมุนไพรที่มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดนิวไนด์ เช่น หล้าหนวดแมว (*Orthosiphon grandiflorum*), ต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*), น้ำผลไม้ที่มีซีตริสสูง เช่น น้ำมะนาว, น้ำส้ม และน้ำมะเขือเทศ จากรายงานการศึกษาศาสตร์สกัดจากข้าวมีสีพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญปริมาณมาก เช่น วิตามินอี, แกมมาโอไลเซนอล, ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานิน ที่มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ลด cholesterol, triglyceride และเพิ่มระดับของ HDL ในเลือด และลดการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ นอกจากนี้แอนโทไซยานินชนิด cyanidin-3-glucoside ที่มีปริมาณถึง 93% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด มีคุณสมบัติลดความเสี่ยงโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โดยยับยั้งการรวมตัวของออกซิเจนกับ LDL และเพิ่มปริมาณ HDL และมีการรายงานผลของ peonidin, peonidin-3-glucoside และ cyanidin-3-glucoside ที่เป็นอนุพันธ์ที่สำคัญของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากข้าวสีดำ มีผลในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งหลายชนิด นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาศาสตร์สกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ ข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด และรำข้าวเหนียวดำ พบปริมาณ anthocyanin สูง และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี สามารถยับยั้งการเกิด และการเกาะเกี่ยวกันของผลึกนิว calcium oxalate ในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวทั้งสองชนิดในการลดการอักเสบในหนูขาวที่ถูกเหนียวนำไปให้เกิดพยาธิสภาพนิวไนด์ ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษา เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และมีการค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดอาจจะสามารถลดการอักเสบในไตของหนูขาวที่เหนียวนำไปให้เกิดภาวะนิวไนด์ โดยอาจมีผลลดการแสดงออกของ inflammatory cytokines และ profibrotic cytokine ในเซลล์เยื่อปิวท่อไต ส่งผลให้ลดการกระตุ้นกลไกการอักเสบของเนื้อเยื่อไต และสามารถลดการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตได้มากที่สุด หากพบว่าสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ และสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถลดการอักเสบและลดการเกิดพยาธิสภาพในการเกิดนิวไนด์ได้ อาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดโรคนิวไนด์ต่อไปในอนาคต อีกทั้งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวกล้องเหนียวสังข์หยดหรือที่ชาวบ้านเรียกว่าข้าวเหนียวแดงซึ่งเป็นหนึ่งในข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ที่มีการเพาะปลูกอยู่เฉพาะพื้นที่ในเขตจังหวัดสงขลา และยังไม่มียางานข้อมูลทางวิชาการ หากการศึกษาได้ข้อมูลสำคัญจะส่งผลให้มีการพัฒนาการเพาะปลูกและส่งเสริมการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการแสดงออกของ inflammatory cytokines ได้แก่ MCP-1 และ interleukin-6 (IL-6) และพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตหนูขาวที่ถูกเหนียวนำไปเกิดนิวไนด์
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการแสดงออกของ profibrotic cytokine ได้แก่ TGF- $\beta$  และพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตหนูขาวที่ถูกเหนียวนำไปเกิดนิวไนด์

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นผลการศึกษาครั้งแรกในการนำสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมาทดสอบฤทธิ์ในการลดการอักเสบซึ่งเป็นการทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง ซึ่งถ้าหากการวิจัยแล้วเสร็จ จะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยระดับนานาชาติได้ออย่างน้อย 1 เรื่อง



และสามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปเผยแพร่ให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเช่น กรมวิชาการเกษตรเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าวให้เหมาะแก่การเพาะปลูก และเป็นข้อมูลวิจัยอ้างอิงในการส่งเสริมการเพาะปลูกข้าวชนิดนี้มากขึ้น หรือร่วมมือกับองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่นในการพัฒนาหรือแปรรูปเป็นสินค้า OTOP ของชุมชน ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตร และเป็นการสร้างรายได้เพิ่มให้กับชุมชนและประเทศในอนาคต นอกจากนี้ข้อมูลการวิจัยนี้อาจนำไปสู่การศึกษาพัฒนาสารสกัดในด้านต่างๆ เช่น การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ความคงตัวของเคมีและฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดในการป้องกันหรือรักษาโรค โดยทำการวิจัยร่วมกับแพทย์เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดนิ่วในไตในผู้ป่วยต่อไป ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น หรือต่อยอดทำวิจัยร่วมกับหน่วยงานภายนอกเช่น องค์กรเภสัชกรรม หรือหน่วยงานเอกชนอื่น เพื่อทำการพัฒนาสารสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ หรืออาหารเสริม ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพที่ดีขึ้น

#### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการลดการอักเสบในหนูขาวที่ถูกเหนียวทำให้เกิดพยาธิสภาพนิ่วในไต การทดลองเริ่มจาก 1) ทำการสกัดสารจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดด้วยแอลกอฮอล์ 2) การเตรียมสัตว์ทดลอง ทำการเหนียวหนูขาวให้เกิดภาวะนิ่วในไต ด้วย ethylene glycol และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการลดการอักเสบในพยาธิสภาพของหนูขาวที่เป็นโรคนิ่วในไต 3) นำปัสสาวะของหนูมาวิเคราะห์ค่า creatinine และปริมาณของผลึก 4) นำเลือดมาวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine 5) นำเนื้อเยื่อไตของหนูมาวิเคราะห์พยาธิสภาพและการสะสมของผลึกด้วยวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin 6) ศึกษาตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุล และปริมาณการแสดงออกของ inflammatory cytokines ได้แก่ MCP-1 และ interleukin-6 (IL-6) และ profibrotic cytokine ได้แก่ TGF- $\beta$  ในเนื้อเยื่อไตหนูขาวด้วยวิธี immunohistochemistry และ Western immunoblotting ตามลำดับ

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โรคนิ่วในไต

โรคนิ่วในไตเป็นโรคเรื้อรังที่พบได้ทั่วโลก ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค ได้แก่ ความผิดปกติของไต พันธุกรรม สภาพภูมิอากาศ โภชนาการ และพฤติกรรม การบริโภคเป็นต้น พบว่าเพศชายเป็นโรคมมากกว่าเพศหญิง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะติดขัด ปวดบริเวณเอว ปัสสาวะขุ่นมีเลือดปน อาจเกิดการติดเชื้อ ทำให้ไตวายได้ ผู้ที่เคยเป็นนิ่วในไตแล้วมักจะเกิดเป็นซ้ำอีกใน 7-10 ปี สำหรับก้อนนิ่วที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยประมาณร้อยละ 80 คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลตชนิดโมโนไฮเดรต (COM)

##### 2.2.1 กลไกการเกิดนิ่วในไต

เริ่มจากการตกผลึกของแคลเซียมกับออกซาเลตไอออนที่มีความเข้มข้นสูงแบบยิ่งยวดบริเวณท่อไตส่วน distal collecting duct เพราะเป็นบริเวณที่มีการดูดน้ำกลับของหน่วยไต โดย nuclei ที่เกิดขึ้นนั้นมีแนวโน้มที่จะโตขึ้นและจับกลุ่มกัน ในสภาวะ hypertonic ของ tubular fluid ซึ่งจะไปจับกับผิวเซลล์ ติดอยู่ในส่วนที่แคบของท่อไตทำให้ไม่สามารถหลุดออกไปกับปัสสาวะได้ เมื่อคริสตัลจับกับผิวเซลล์แล้วยังคงโตต่อไปเรื่อยๆ จนกลายเป็นก้อนนิ่วขนาดใหญ่อุดตันทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดหรือปัสสาวะไม่ออก (3-5) ก้อนนิ่วที่แยกได้จากผู้ป่วย ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึกคริสตัล 80 เปอร์เซ็นต์ อีก 2-5 เปอร์เซ็นต์เป็น Organic matrices ที่แทรกอยู่ในเนื้อผลึก ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน โกลโคอะมิโนไกลแคน และแร่ธาตุ (6) ผลึกคริสตัลที่พบในก้อนนิ่วมากที่สุดคือ แคลเซียมออกซาเลต (CaOx) โดยปกติผลึก CaOx มีโครงสร้างสามแบบตามปริมาณโมเลกุลของน้ำที่มีอยู่ในโมเลกุล ได้แก่ ชนิดโมโนไฮเดรต (COM หรือ whewellite) ซึ่งมีรูปร่างหกเหลี่ยม, ชนิดไดไฮเดรต (COD หรือ weddellite) มีรูปร่างเป็นพีระมิดสองอันประกบกัน, และชนิดไตรไฮเดรต (COT or caoxite) มีรูปร่างคล้ายเข็ม (7) COM เป็นผลึกที่พบในก้อนนิ่วมากที่สุดและพบมากในปัสสาวะของผู้ป่วย ในขณะที่ผลึก COD มักจะพบในปัสสาวะของคนปกติ และแทบจะไม่พบผลึก COT ในก้อนนิ่วหรือในปัสสาวะเลย ผลึก COM นั้นมีความคงตัวมากที่สุด ในสภาวะที่มี Stone inhibitors เช่นในปัสสาวะของคนปกติ ผลึก COM จะถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนรูปร่างไปเป็นผลึก COD ซึ่งมีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า (8)

จากการวัดความสามารถในการยึดจับของผลึกคริสตัลด้วยวิธี Atomic force microscopy พบว่าผลึก COM มีความสามารถในการยึดจับสูงกว่าผลึก COD ถึง 15 เท่า (9) ทั้งนี้เนื่องมาจากการเรียงตัวของแคลเซียมและออกซาเลตไอออนบนผิวหน้าของผลึกที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญสนับสนุนว่าผลึก COM นั้นมีความรุนแรงในการก่อโรคนิ่วในไต โดย COM สามารถจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์เยื่อท่อไตด้วย adhesion force มากกว่า COD จากการศึกษาค้นพบว่าผลึกคริสตัลนั้นมีประจุบวกของแคลเซียมไอออนที่ผิวหน้าซึ่งสามารถ interact กับโมเลกุลในระบบทางเดินปัสสาวะที่แสดงประจุลบได้แก่ โปรตีนที่มี acidic amino acids เช่น aspartic acid (Asp) และ glutamic acid (Glu) หลายโมเลกุล หรือโมเลกุลที่มีหมู่ phosphate, sulfate, sulfonate, carboxylate-enriched polysaccharides และ phospholipids (10,11) ผลึกคริสตัลมีการจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์อย่างจำเพาะ ได้แก่ ไฮยารูโรแนน, CD44, Osteopontin (OPN), Annexin II, Nucleolin-related protein, Phosphatidylserine และ Sialic acid-containing glycoprotein เป็นต้น (12-16) นอกจากนี้มีการศึกษาชิ้นเนื้อไตของหนูทดลองที่ถูก

เหนี่ยวนำให้เป็นนิ่วในไตมาด้วยเทคนิค immunohistochemistry พบบริเวณ distal collecting duct มีการเกาะจับของผลึก CaOx กับไฮยาลูโรแนนและ CD44 โมเลกุล

### 2.2.2 สาเหตุของการเกิดนิ่วในไต

การเกิดนิ่วในไตนั้นเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ โครงสร้างของไตผิดปกติทำให้การไหลของ Tubular fluid ไม่ดี ง่ายต่อการคั่งของผลึกคริสตัล, การทานอาหารที่มีออกซาเลตไอออนสูง, อากาศร้อนทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นมากส่งเสริมการตกผลึก, ความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น primary hyperoxaluria, primary calciuria, renal tubular acidosis เป็นต้น (17) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่าในปัสสาวะนั้นมีโมเลกุลที่เรียกว่า Stone modulators แบ่งออกเป็น Stone promoters คือโมเลกุลที่ช่วยส่งเสริมการเกิดนิ่ว โดยส่งเสริมให้มีการตกผลึกคริสตัลหรือส่งเสริมการ growth หรือ aggregation หรือ adhesion อีกกลุ่มหนึ่งคือ Stone inhibitors คือโมเลกุลที่ช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดนิ่ว ได้แก่ ยับยั้งการเกิดผลึกคริสตัลหรือยับยั้งการ growth หรือ aggregation หรือ adhesion รวมทั้งทำให้เกิดการ transformation ของผลึกจาก COM ไปเป็น COD ที่มีความรุนแรงน้อยกว่า มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วในไตนั้นมีการแสดงออกของ stone inhibitors น้อยกว่าคนปกติ ทำให้เกิดการตกผลึกจำนวนมากและพัฒนามากลายเป็นโรคนิ่ว โดยโมเลกุลที่จัดเป็น stone promoters สำคัญ ได้แก่ calcium และ oxalate ions ซึ่งหากมีปริมาณสูง จะทำให้โอกาสเกิดการตกผลึกสูงขึ้นตามไปด้วย (18,19) โมเลกุล Stone inhibitors นั้นมักมีประจุลบเพื่อจะ interact กับผลึกคริสตัลที่มีประจุบวกที่ผิวหน้า ตัวอย่างโมเลกุลที่พบในปัสสาวะของคนปกติคือ citrate ions, Nephrocalcin, OPN, Inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI), Bikunin, Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1), Tamm-Horsfall protein (THP), Orosomucoid และ Trefoil factor 1 (TFF1) (20-27) Nephrocalcin เป็นไกลโคโปรตีน สามารถยับยั้งการเกิด nucleation, growth, aggregation และ adhesion ได้ citrate, OPN และ Bikunin จับบนผิวผลึก COM และป้องกันการ adhesion ของผลึกกับเซลล์ท่อไต (28-30) บางโมเลกุลมีบทบาทเป็นทั้ง promoter และ inhibitor ขึ้นกับระยะของการเกิดนิ่วในไต เช่น THP ยับยั้งการ aggregation แต่ส่งเสริมการเกิด adhesion เป็นต้น (31)

### 2.2.3 การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุท่อไตในภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก CaOx

ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วอยู่ในภาวะความอึดด้วยเวลายังเป็นเวลานาน ทำให้มีปริมาณสารก่อนิ่วและผลึกสูงมาก ผลึกบางส่วนสามารถขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะได้ ขณะที่ส่วนหนึ่งถูกนำเข้าสู่เซลล์ท่อไตภายในเซลล์ผลึกอาจนำไปกำจัดในไลโซโซม หรือบางส่วนอาจขนส่งต่อไปยัง renal interstitium ทั้งสารก่อนิ่วและผลึกสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และ ROS ที่เกิดขึ้นจะทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย และหลุดลอก เป็นแหล่งให้ผลึกเข้าไปเกาะบนฐานเซลล์และใน interstitium และส่งเสริมการติดค้างของผลึกในท่อไต นอกจากนี้สารก่อนิ่วและผลึกยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสังเคราะห์และหลั่งสารตัวกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น ไซโตไคน์ และเคโมไคน์ ต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น monocytes และ macrophages ให้เข้ามาเก็บกินผลึกที่ติดค้างใน renal interstitium ส่งผลให้เกิดการอักเสบและภาวะ renal fibrosis ตามมา (32) นอกจากนี้ผลึกสามารถกระตุ้นให้เซลล์ท่อไตสร้างและหลั่ง inflammatory mediators ได้ เช่น monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), osteopontin (OPN), interleukin-6 (IL-6) และ angiotensin II (Ang II) สารเหล่านี้จะดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาใน renal interstitium และก่อให้เกิดการอักเสบ ผลึกนิ่วเกิดขึ้นใน

ท่อไตจะเคลื่อนเข้าสู่ renal interstitium เพื่อดึงดูดเซลล์อักเสบต่างๆ เข้ามาใน intersitium ส่งผลกระทบต่อ การอักเสบ เซลล์เหล่านี้จะหลั่ง proteolytic enzymes chemokines และ cytokines ทำให้การอักเสบ เพิ่มมากขึ้นและเซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้น (33,34) ถึงแม้กลไกการดึงดูดเซลล์อักเสบต่าง ๆ เข้ามาใน renal intersitium จะยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานว่าเซลล์บุท่อไตจะสังเคราะห์ MCP-1 และ IL-6 หลังจากถูกกระตุ้นด้วยผลึกนิ่วและออกซาเลต และพบการแสดงออกของ MCP-1 ในเซลล์บุท่อไตของหนูที่เป็นนิ่ว ดังนั้น MCP-1 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการดึงดูดเซลล์อักเสบเข้าสู่ renal intersitium เพื่อกระตุ้น การอักเสบในโรคนิ่วไต ในขณะที่เกิดกระบวนการอักเสบ ร่างกายจะผลิต anti-inflammatory cytokine เช่น IL-10 และ IL-13 ซึ่ง IL-10 ผลิตจาก monocytes, macrophages, dendritic cells และ Th2 cells ทำหน้าที่ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบ โดยกดการแสดงออก ของ Th1 cytokines เช่น IL-12 ลดการแสดงออกของ costimulator และ class II MHC molecules บนผิวเซลล์แมคโครฟาจ IL-10 สามารถยับยั้ง NF-KB activity และควบคุม JAK-STAT signaling pathway ส่วน IL-13 สร้างจาก Th2 cells มีฤทธิ์ยับยั้ง microbicidal activities ของ macrophage นอกจากนี้ IL-13 สามารถกระตุ้น fibroblast ให้เพิ่มการสังเคราะห์ collagen และเกิด fibrosis (35)

มีการศึกษาในหนูที่เป็นนิ่วพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ stone modulators ได้แก่ OPN, THP, prothrombin (PT), inter- $\alpha$ -inhibitor และ heparan sulfate (HS) การพบ HS บ่งชี้ว่ามีการสังเคราะห์ extracellular matrix มากขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าในไตของหนูที่เป็นนิ่วเกิดภาวะ renal fibrosis สูงขึ้น สำหรับ OPN นอกจากทำหน้าที่เป็น stone modulator แล้ว มีหลักฐานว่า OPN สามารถทำหน้าที่เป็น monocyte chemoattractant คล้ายกับ MCP-1 ได้ (36) สารที่หลังจากเม็ดเลือดขาวจะกระตุ้นให้เซลล์ fibroblast (F) เปลี่ยนเป็นเซลล์ myofibroblast ทำหน้าที่ในกระบวนการซ่อมแซมขนาดแผลและสร้าง extracellular matrix (ECM) proteins จนเกิด renal fibrosis ตามมา ทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และ fibrosis จะส่งเสริมให้ renal interstitium และท่อไตถูกทำลาย เป็นตำแหน่งให้ผลึกเข้า เกาะยึดได้ดีขึ้น เศษเซลล์ที่ถูกทำลายและสารชีวโมเลกุลที่หลั่งออกมาจะกระตุ้นการเกิดผลึกใหม่และการ รวมกลุ่มของผลึกได้ดีขึ้น จนเกิดเป็น stone nidus สำหรับเจริญเป็นก้อนนิ่วต่อไป (33,34) การศึกษาใน เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์บุท่อไตด้วยออกซาเลต (Ox) และผลึกนิ่ว (CaOx, CaP และ UA) เซลล์บุท่อไตจะสร้าง ROS เช่น superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เพิ่มขึ้น มีการหลั่ง lactate dehydrogenase (LDH) และ NAG ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นและสัมพันธ์กับการตายของ เซลล์ที่สูงขึ้น กลไกการสร้าง ROS ที่สูงขึ้นนี้อาจเกิดจาก 2 กลไก คือ การกระตุ้น NADPH oxidase ให้ ทำงานมากขึ้น โดยผ่านระบบ rennin-angiotensin system ออกซาเลตและผลึกจะกระตุ้นการสร้าง Ang II ในไตสูงขึ้น จากนั้น Ang II จับกับรีเซปเตอร์บนผิวเซลล์ แล้วมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ส่งผลให้มีการสร้าง superoxide ในเซลล์สูงขึ้น และการกระตุ้นการทำงานของ phospholipase A-2 (PLA-2) แล้วทำให้เกิดผลผลิตของไขมัน ได้แก่ arachidonic acid (AA), lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) และ ceramide สูงขึ้น ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลนำสัญญาณ (signaling molecule) มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยไปลด mitochondrial membrane potential ส่งผลให้มีการสร้าง ROS สูงขึ้นและหลั่ง cytochrome-C จากไมโทคอนเดรีย ซึ่ง ceramide และ cytochrome-C จะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนกลุ่ม caspases เซลล์จึงเข้าสู่วิถีการตายแบบ apoptosis สำหรับ ROS ที่สูงขึ้น จะไปกระตุ้นวิถีส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) p38-MAPK และ JNK ส่งผลกระตุ้นการทำงานของ transcription factors NF-KB และ AP-1 ซึ่งทั้ง NF-KB และ AP-1 จะ

ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนหลายชนิด เช่น stone modulators (OPN, BK,  $\alpha$ -1-microglobulin), chemokines (MCP-1), cytokines (IL-6) และ growth factors (PDGF, TGF- $\beta$ ) เป็นต้น (33)

## 2.2 การศึกษาสมุนไพรที่ยับยั้งการเกิดโรคนิ่วในไต

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติที่มีประวัติการใช้ในการรักษาโรคนิ่วในไต เพื่อนำมาทดลองหาฤทธิ์ในการรักษาหรือยับยั้งการเกิดโรคนิ่วในไต Grases และคณะทำการศึกษาสมุนไพรเจ็ดชนิดของยุโรป คือ นังดั่งล่าง (*Verbena officinalis*), *Lithospermum officinale*, แตนดิไลออน (*Taraxacum officinale*), หญ้าถอดปล้อง (*Equisetum arvense*), *Arctostaphylos uva-ursi*, โกโบ้ (*Arctium lappa*) และ *Silene saxifraga* พบว่าสมุนไพรเหล่านี้ สามารถลดภาวะความเสี่ยงที่ส่งเสริมการเกิดนิ่วได้ เช่น citraturia, calciuria, phosphaturia และ diuresis (35) และพบว่าสามารถป้องกันการเกาะจับของผลึกที่บริเวณท่อไตได้ ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่ว (38) Atmani และ Khan ศึกษาสารสกัดจากต้น *Herniaria hirsute* พบว่าสารสกัดส่งเสริมการตกผลึกของคริสตัล แต่ผลึกที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดเล็กและเป็นชนิด COD ซึ่งไม่มีความรุนแรงในการก่อโรค และพบว่าในสารสกัดนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งการ aggregation ของผลึกคริสตัลได้ (39,40) Barros และคณะทำการศึกษาสารสกัดจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง crystal growth และ aggregation และยับยั้ง endocytosis ของผลึกคริสตัลเข้าสู่เซลล์ (41) Al-Ghamdi และคณะทำการศึกษาสารสกัดจากตะไคร้ โดยให้หนูทดลองที่เกิด oxalate nephrotoxicity ดื่มน้ำสารสกัดพบว่าอาการดีขึ้นในขณะที่หนูที่ไม่ได้ดื่มน้ำสารสกัดนั้นตาย โดยสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon schoenanthus*) นั้นมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ (42) Wootisin และคณะ ศึกษาพบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*) ช่วยลดปริมาณของ oxalate ในซีรัมของหนูทดลองที่มีภาวะ hyperoxaluria ได้ และพบว่าสารสกัดลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ช่วยเพิ่มปริมาณของ citrate ที่ทำหน้าที่ stone inhibitor ในปัสสาวะของหนูทดลองได้ และเมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณท่อไตของหนูทดลองมาตรวจดูการเกิดนิ่วพบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและลูกใต้ใบนั้นสามารถลดการเกาะจับของผลึกคริสตัลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ท่อไตได้เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (43) Akanai และคณะศึกษาสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon grandiflorum*) พบว่าสามารถลดการบาดเจ็บของเซลล์จากความเป็นพิษของ oxalate และยับยั้งการคั่งของผลึกที่ท่อไตของหนูทดลองได้ (44)การเกิดนิ่วในไตนั้นสามารถป้องกันได้เช่นกัน หากเพิ่มปริมาณ Stone inhibitors ในปัสสาวะได้ ตัวอย่างเช่น การเพิ่มปริมาณ Citrate excretion โดยให้ผู้ป่วยดื่มน้ำผลไม้ที่มี citrus เช่น น้ำมะนาว น้ำส้ม, น้ำมะเขือเทศสด (45,46)

## 2.3 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

ข้าวเหนียวดำ คือข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงแดงจนถึงสีดำรวมทั้งการที่มีรงควัตถุที่ปรากฏในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้ รงควัตถุที่มีสีส่วนใหญ่พบในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก ยกเว้น embryo หรือ endosperm ลักษณะเด่นของข้าวเหนียวดำ คือการติดกันเหมือนกาวของเมล็ดข้าวที่สุกแล้ว และมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์มากกว่าข้าวเหนียวขาว (47) เนื่องจากข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำมีปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol และสามารถสังเคราะห์สาร anthocyanin ได้มากกว่าข้าวขาว ในทางการแพทย์จึงได้มีการนำคุณสมบัตินี้มาใช้ประโยชน์โดย พบว่าสาร  $\gamma$ -oryzanol จะช่วยกระตุ้น growth Hormone ทำให้ร่างกายทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ร่างกายจึงสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ หรือบำบัดอาการของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ด้วยตัวเอง โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม ด้านมะเร็ง อัมพฤกษ์ โรคหัวใจ ความดันโลหิต ลด cholesterol เส้นเลือดตีบ โรคเก๊าท์ ไมเกรน ลดความเครียด ช่วยให้อ่อนหลับ แก้ปัญหาวัยทอง ปวดประจำเดือน และสมรรถภาพเพศชาย (48) ใน

ต่างประเทศได้มีการนำสาร GABA ที่พบในข้าวกล้องงอกของข้าวเหนียวดำมาใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับประสาท เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ และโรคลมชัก เพราะสาร GABA จัดอยู่ในกลุ่มกรดโปรตีนที่ช่วยบำรุงเซลล์ประสาท ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายป้องกันการทำลายสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสูญเสียความทรงจำหรืออัลไซเมอร์ และสาร anthocyanin ชนิด cyanidin-3-glucoside ที่พบในข้าวเหนียวดำ ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดในข้าวเหนียวดำยังมีคุณสมบัติช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง สร้าง villi ในผนังลำไส้เล็กทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายเจริญเติบโตและแข็งแรงยิ่งขึ้น (49)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวตอกโลกในการก่อโรคในไตนั้น มีน้อยมาก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าส่วนของรำข้าว (Rice bran) ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินบี วิตามินอี, Tocopherol, Tocotrienol และ Gamma-oryzanol สามารถป้องกันการเกิดโรคเมเร็ง, hyperlipidemia, fatty liver, ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria), โรคหัวใจในไต และโรคหัวใจได้ (50) มีรายงานพบว่ารำข้าวสามารถลดการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตซ้ำในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypercalciuria และลด calcium excretion ในปัสสาวะได้ (51,52) สำหรับข้าวเหนียวดำนั้นมีสีม่วงแดงของ Anthocyanin pigments เป็นเอกลักษณ์ มีสารอาหารและมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือมี Anthocyanin สูงกว่าข้าวดำและข้าวแดง (53) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ลดระดับไขมันในเลือด และ hypoglycemic effects (54-56) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ ข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด และรำข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วย 75% ethanol พบว่ามี anthocyanin ในปริมาณสูง และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี สามารถยับยั้งการเกิด และการเกาะเกี่ยวกันของฟลิกนิน calcium oxalate ในหลอดทดลองแบบ dose dependent ได้อย่างมีนัยสำคัญ (57) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาความสามารถของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดที่สกัดด้วย 75% ethanol ในการป้องกันพยาธิสภาพของไตในหนูขาวที่ถูกเหนียวนำด้วยเอทิลีน ไกลคอล พบว่าเนื้อเยื่อไตดังกล่าวมีการแสดงออกของ free radical ลดลง และมีระดับของเอนไซม์ catalase และ SOD-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (58,59) และพบว่าการเกิดพยาธิสภาพของไตลดลง คือพบ glomerulus glomerular space proximal convoluted tubule และ distal tubule มีลักษณะปกติ และไม่มีเลือดคั่งในเนื้อเยื่อไต เมื่อให้สารสกัดเมล็ดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ (58) และ ไม่พบถุงน้ำในเนื้อไตชั้น cortex ลักษณะของ glomerulus มีขนาดเท่าๆกัน Bowman's capsule มีเยื่อหุ้มลักษณะปกติ proximal convoluted tubules มีเซลล์เยื่อหุ้มววมเล็กน้อยและ lumen ขนาดเล็กลง เมื่อให้สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด (59) จากการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการกระตุ้นการทำงานของ superoxide dismutase และ catalase โดยทำการศึกษาในเซลล์ HepG2 และหนูสายพันธุ์ C57BL/6 ซึ่งผลจากการทดลองในเซลล์พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำจะมีปริมาณของ superoxide anions และ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) โดยเพิ่มขึ้นถึง 161.6% และ 73.4 % ตามลำดับ โดยคาดว่าองค์ประกอบสำคัญที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคือ cyaniding-3-O-glucoside chloride และ peonidin-3-O-glucoside chloride ส่วนในการทดลองในหนู ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำจะมีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzymes ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (60)

จากการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำ, cyanidin-3-O-beta-D-glycosidea, cyanidin และ protocatechuic acid ในการต้านการอักเสบในเซลล์ lipopolysaccharide-induced

RAW 264.7 และ หนู BALB/c ที่ถูกกระตุ้นให้อักเสบด้วย air pouches carrageenan ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าทั้งสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, cyanidin และ protocatechuic acid สามารถยับยั้งการสร้าง proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , inflammatory mediators ต่างๆรวมถึง MCP-1, NO และ prostaglandin E2 รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 ใน RAW 264.7 cells ยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IKK $\alpha$  นอกจากนี้สารเหล่านี้ยังสามารถลดจำนวนของ leukocyte, TNF-alpha, PGE2, COX-2 และ NF-KB ใน ที่ถูกกระตุ้นให้อักเสบด้วย air pouches carrageenan โดยพบว่า protocatechuic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้ง inflammatory mediators มากที่สุด (61) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบระหว่างสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเอทานอลกับสกัดด้วยน้ำ โดยทำการทดสอบในเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งทดสอบในสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งทำการทดลองเป็นเวลา 3 วัน โดยพบว่า ทั้งสารสกัดข้าวเหนียวดำจากการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำมีผลในการต้านการอักเสบ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  ของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์กว้างมากที่สุด โดยเพิ่มจำนวน regular T cell ลดการทำงานของ NF-KB บน CD4+, CD8+ T cells ลดการสร้าง TNF- $\alpha$  ของ CD4+ T cells และลดการสร้าง IL-6 และ IFN- $\gamma$  ของ macrophages. (62) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาสารสกัดจากข้าวที่มีผลเกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบของเนื้อเยื่อไตที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดนิ่ว

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การสกัดสารจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดด้วย 75% ethanol

นำข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดปริมาณ 1 กิโลกรัมมาบดให้ละเอียด แล้วนำมาสกัดด้วย 75% ethanol ปริมาตร 2 ลิตร นำไปบดในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรอง นำข้าวที่ผ่านการสกัดแล้วไปทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และเครื่อง lyophilizer แล้วเก็บที่  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

#### 3.2 การเตรียมสัตว์ทดลองและการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดในสัตว์ทดลองที่เหนียวทำให้เกิดภาวะนิ่วในไต

การทดลองใช้ตามวิธีการของ Akanae และคณะ (63) และ Semangoen และคณะ (59) โดยปรับรูปแบบดังนี้ใช้หนูแรทเพศผู้ จำนวน 25 ตัว สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม มาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพื่อปรับสภาพให้เกิดความเคยชินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นแบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 หนูที่ให้อาหารและน้ำปกติ ไม่มีการเหนียวทำให้เกิดนิ่วในไต (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 หนูถูกเหนียวทำให้เกิดภาวะนิ่วในไต คือมีการสะสมผลึก แคลเซียมออกซาลेट ( $\text{CaOx}$ ) ในเนื้อไตโดยการให้ดื่มน้ำปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% ethylene glycol (EG) (v/v) อีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่ม positive control ที่ให้หนูกิน potassium citrate (KCit) ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม โดยใช้ gastric intubation วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเหนียวทำให้เกิดการสะสมผลึก  $\text{CaOx}$  โดยดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG (v/v) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่ให้หนูกินสารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดตามลำดับ ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม โดยใช้ gastric intubation วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเหนียวทำให้เกิดการสะสมผลึก  $\text{CaOx}$  โดยดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG (v/v) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยทุกสัปดาห์จะทำการวัดค่า pH และเก็บตัวอย่างปัสสาวะและเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูแต่ละกลุ่มถูกทำให้ตายอย่างสงบ จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อไตเพื่อนำมาศึกษาพยาธิสภาพและการสะสมผลึก  $\text{CaOx}$  ด้วยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin ศึกษาตำแหน่งและปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ  $\text{TGF-}\beta$  ด้วยวิธี immunohistochemistry และ Western immunoblotting ตามลำดับ

#### 3.3 การวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณของผลึก $\text{CaOx}$ ในน้ำปัสสาวะ

ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่มในทุกสัปดาห์มาหาค่า pH โดยใช้ชุดทดสอบ และนับจำนวนผลึก  $\text{CaOx}$  ชนิด COM โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Polarized microscope นับแบบสุ่ม 5 บริเวณต่อ 1 ตัวอย่าง และทำซ้ำจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วย image J

#### 3.4 การวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine ในเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณปลายหางในทุกสัปดาห์ และในสัปดาห์สุดท้ายเก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที และ เก็บ serum เพื่อไปวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine โดยใช้ชุดทดสอบ



### 3.5 การศึกษาพยาธิสภาพและปริมาณการสะสมผลึก CaOx ด้วยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin

ทำการตัดเนื้อเยื่อตับและเนื้อเยื่อไต 1 ซ้างของหนูแต่ละกลุ่มนำมารักษาสภาพด้วย 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน 0.1 M PBS, pH 7.4 เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS, pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาขจัดน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 30 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 30 นาที infiltrate และฝังเนื้อเยื่อลงใน paraffin จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตัดด้วยเครื่อง microtome ความหนาประมาณ 5  $\mu\text{m}$  จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อไปขจัด paraffin ออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการเติมน้ำ (rehydrate) ในแผ่นชิ้นเนื้อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำ ดังนี้ 100% (3 ครั้ง), 95% (2 ครั้ง), 90%, 80%, 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที ล้างด้วยน้ำประปา แล้วจุ่มลงใน 1% acid alcohol ประมาณ 10 วินาที จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อแช่ลงใน 90% และ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละประมาณ 10 วินาที แล้วย้อมด้วยสี eosin เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำแผ่นชิ้นเนื้อมาขจัดน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 5 นาที แล้วปิด mount สไลด์ด้วย per mount จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เปรียบเทียบพยาธิสภาพของตับและไตที่เกิดขึ้น และนับจำนวนผลึก CaOx ในเนื้อเยื่อไตโดยนับแบบสุ่มจำนวน 5 บริเวณของเนื้อเยื่อไต และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J

### 3.6 ศึกษาหน้าหมักโมเลกุลและปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$ ด้วยวิธี Western immunoblotting

#### 3.6.1 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อไต

นำเนื้อเยื่อไต 1 ซ้างของหนูแต่ละกลุ่มมาทำการบดให้ละเอียดในสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, และ 1% SDS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ supernatant ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

#### 3.6.2 แยกตัวอย่างโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blotting

นำโปรตีนที่ผ่านการวัดปริมาณแล้วปริมาณ 10  $\mu\text{g}$  ผสมกับ loading dye (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, bromophenol blue) นำไปต้มประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE หลังจากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยวิธี semidried transfer

#### 3.6.3 Immunoblotting

นำแผ่น nitrocellulose membrane มาล้างด้วย PBS จากนั้นนำไป block nonspecific binding ด้วย 5% Skimmed milk ที่ละลายใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่น nitrocellulose membrane บ่มด้วย primary antibody (anti MCP-1 หรือ IL-6 หรือ TGF- $\beta$  antibody) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง แล้วบ่มใน secondary antibody (goat anti-mouse IgG HRP-conjugated หรือ goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้น

นำแผ่น nitrocellulose มา develop ด้วย TMB substrate kit เพื่อตรวจดูน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณของโปรตีน MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$  จากนั้นนำแถบโปรตีนมาวิเคราะห์ความเข้มและเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม Image J

### 3.7 ศึกษาตำแหน่งและการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$ ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำแผ่นชิ้นเนื้อไปขจัด paraffin ออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการเติมน้ำ (rehydrate) ในแผ่นชิ้นเนื้อด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำ ดังนี้ 100% (3 ครั้ง), 95% (2 ครั้ง), 90%, 80%, 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ 1% saturated lithium carbonate ( $\text{LiCo}_3$ ) ที่ผสมอยู่กับ 70% ethanol ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อไปกำจัด endogenous peroxidase โดยการแช่ใน 0.3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่ผสมอยู่ใน 30% methanol เป็นเวลา 30 นาที และนำไปล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย สารละลาย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่เติม 0.4% Triton X-100 จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ด้วย 0.1% glycine ในสารละลาย 0.1 M PBS เป็นเวลา 5 นาที และกำจัด non-specific binding ด้วยการเติม blocking solution (4% BSA และ 0.4% Triton X-100 ในสารละลาย 0.1 M PBS, pH 7.4) ตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. หลังจากนั้นจึงใส่ primary antibody (anti MCP-1 หรือ IL-6 หรือ TGF- $\beta$  antibody) ที่อัตราส่วนประมาณ 1:100-1:500 (v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นจึงล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่เติม 0.4% Triton X-100 แล้วใส่ secondary antibody (goat anti-mouse IgG HRP-conjugated หรือ goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated) อัตราส่วน 1:500 (v/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออก จากนั้นจึงตรวจหาการจับกันระหว่างโปรตีนกับแอนติบอดี โดยใช้ AEC substrate Kit solution ซึ่งแสดงผลการติดสีส้มแดง และหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำกลั่น จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อไปย้อมสี hematoxylin เพื่อดูลักษณะของนิวเคลียสซึ่งติดสีน้ำเงินเข้ม จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อทั้งหมดไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 3.8 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้แต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 12 ค่าจริงที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่ากลางบวกหรือลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากลาง ( $\pm$  S.D. หรือ S.E.M.) จากนั้นนำค่ามาหาค่าความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การทดสอบ Tukey HSD test ที่ระดับ  $p < 0.05$  ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

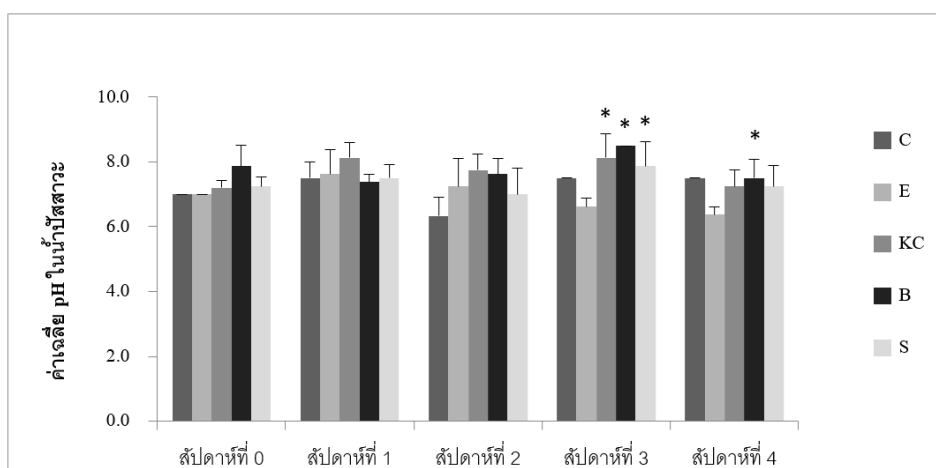
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการทดลอง

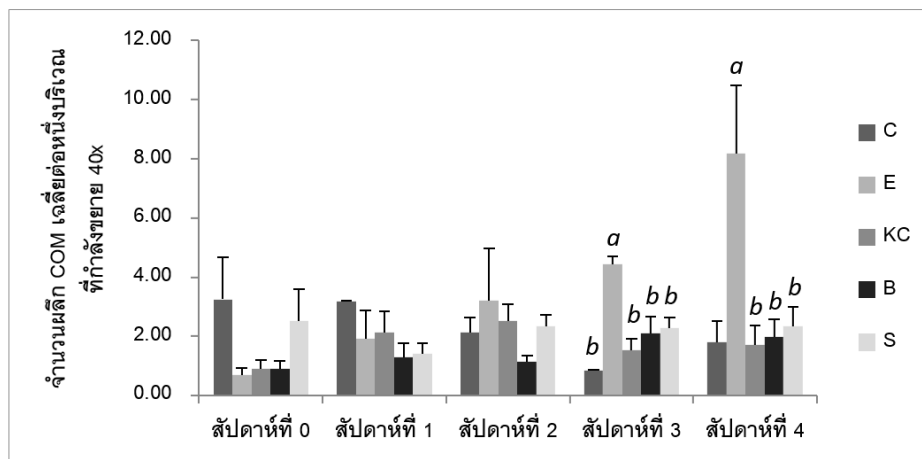
##### 4.1.1 การวิเคราะห์ค่า pH และจำนวนผลึก CaOx ในปัสสาวะ

ผลการเก็บข้อมูลค่า pH ในน้ำปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่มพบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ก่อนการทดลอง หนูแต่ละกลุ่มมีค่า pH ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วงประมาณ 7-7.2 ยกเว้นหนูกลุ่มที่ให้สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ (B) มีค่า pH ประมาณ 7.9 เมื่อทำการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียว (E) มีค่า pH ลดลง อยู่ที่ประมาณ 6.4-6.6 ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ส่วนค่า pH ในหนูกลุ่ม KC ,กลุ่ม B และหนูกลุ่มที่ให้สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด (S) เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 ( $p < 0.05$ ) และมีค่า pH ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ก่อนการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย pH (Mean  $\pm$  S.D.) ในน้ำปัสสาวะของหนูในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม E,  $p < 0.05$ )

ผลการเก็บข้อมูลจำนวนผลึก CaOx ในการทดลองได้ทำการนับจำนวนผลึก CaOx ในรูปของ COM ในน้ำปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่มพบว่า หนูกลุ่ม E มีปริมาณผลึก COM เพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ( $p < 0.05$ ) ส่วนหนูกลุ่ม KC และหนูกลุ่ม B และ S มีปริมาณผลึก COM น้อยกว่าหนูกลุ่ม E ( $p < 0.05$ ) และมีปริมาณผลึกไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในแต่ละสัปดาห์ (ภาพที่ 2)

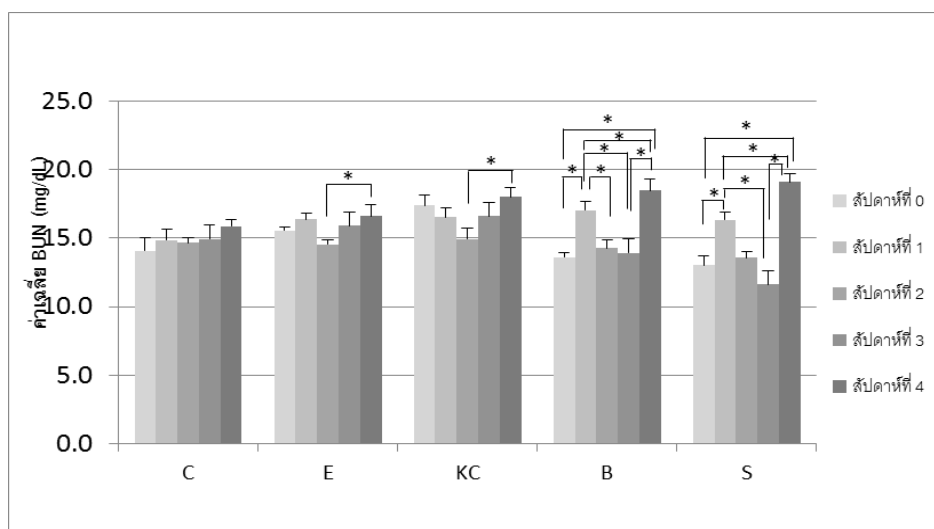


ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนผลึก COM (Mean  $\pm$  S.D.) ต่อหนึ่งบริเวณที่กำลังขยาย 40x ของหนูในแต่ละสัปดาห์เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม (a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม C และ E ตามลำดับ,  $p < 0.05$ )

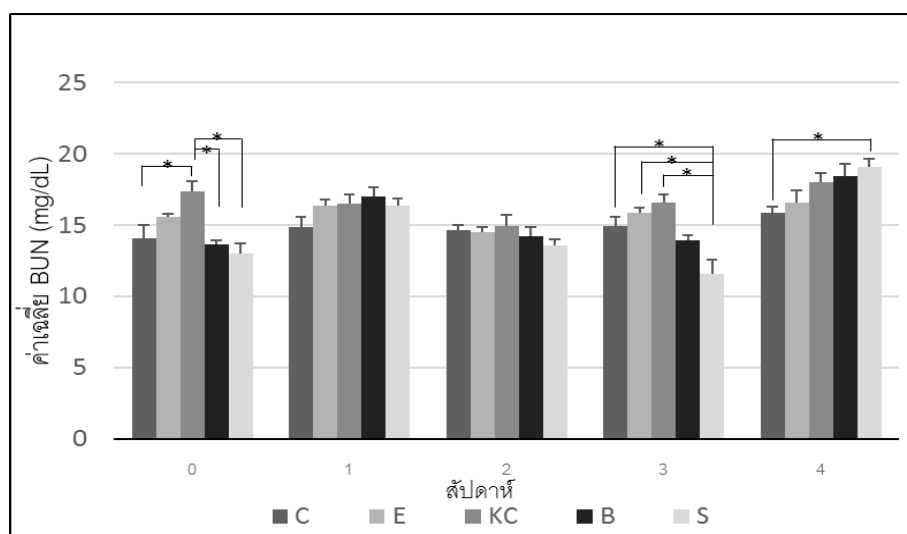
#### 4.1.2 การวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine ในเลือด

การเปรียบเทียบค่า BUN ระหว่างสัปดาห์ในแต่ละกลุ่ม (ภาพที่ 3) พบว่ากลุ่ม C ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนกลุ่ม E ค่า BUN เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรกและลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 ค่า BUN มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกลุ่ม KC ค่า BUN มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 2 แต่เมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 ค่า BUN มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งค่า BUN ในสัปดาห์ที่ 4 มีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่ม B ค่า BUN เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรก และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 ค่า BUN มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่สัปดาห์ที่ 4 ค่า BUN เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 3 ส่วนกลุ่ม S ค่า BUN เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรก และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 ค่า BUN ลดลงจากสัปดาห์ที่ 2 และมีความแตกต่างทางสถิติกับสัปดาห์ที่ 1 ในขณะที่สัปดาห์ที่ 4 ค่า BUN มีการเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 3

การเปรียบเทียบค่า BUN ระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ สัปดาห์ที่ 0 (ภาพที่ 4) พบว่าค่า BUN ของหนูในแต่ละกลุ่ม (C, E, KC, B และ S) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $17.4 \pm 0.8$ ,  $14.1 \pm 1$ ,  $13.6 \pm 0.3$  และ  $13 \pm 0.73$  mg/dL ตามลำดับ และพบว่าค่า BUN ของหนูทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งทั้ง 2 สัปดาห์ค่า BUN ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในสัปดาห์ที่ 3 มีการกระตุ้นให้เกิดนิ่วในไตโดยการให้สารเอทิลีนไกลคอล พบว่าค่า BUN ในหนูกลุ่ม E และ KC มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่หนูกลุ่ม B และ S มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจากสัปดาห์ที่ 1 (โดยที่กลุ่ม S จะมีค่า BUN ต่ำสุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสัปดาห์ที่ 4 ค่า BUN ของหนูทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยกลุ่มที่มีการเพิ่มขึ้นสูง คือ กลุ่ม S และ B ซึ่งกลุ่ม S จะมีค่า BUN สูงสุด ในขณะที่สัตว์ทดลองกลุ่ม C มีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการศึกษา



ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่า BUN (Mean  $\pm$  S.E.M) ของแต่ละกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ,  $p < 0.05$ )

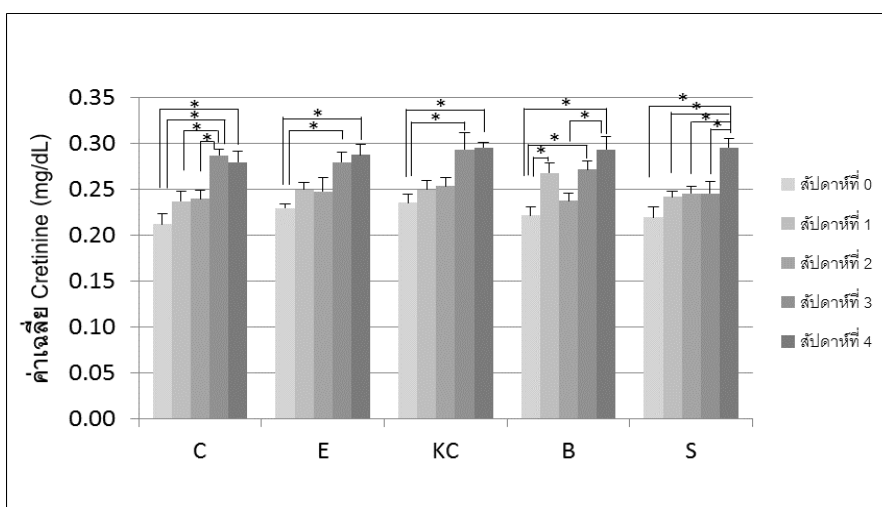


ภาพที่ 4 แสดงค่า BUN (Mean  $\pm$  SEM) ใน serum ของสัตว์ทดลองเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ,  $p < 0.05$ )

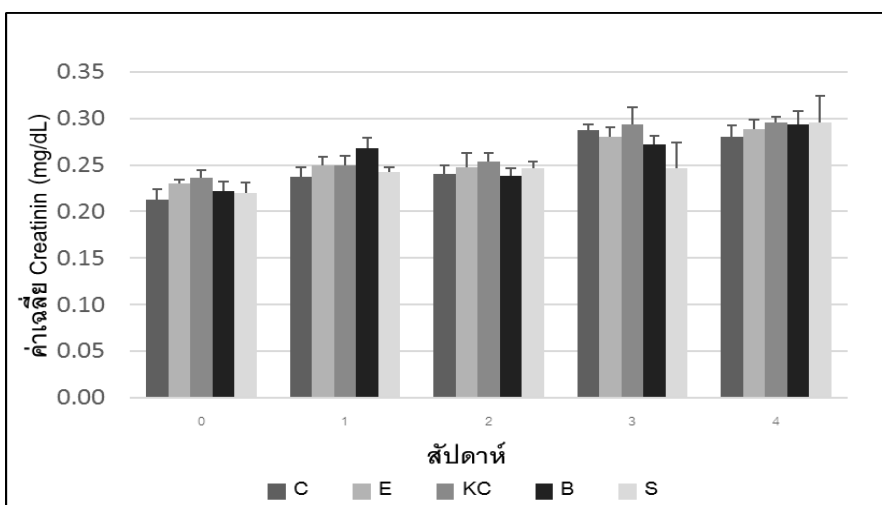
ผลการเปรียบเทียบค่า Creatinine ระหว่างสัปดาห์ในแต่ละกลุ่ม (ภาพที่ 5) พบว่ากลุ่ม C ค่า Creatinine เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรกและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ค่า Creatinine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และลดลงในสัปดาห์ที่ 4 ในกลุ่ม E ค่า Creatinine เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรกและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ค่า Creatinine มีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก และมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 4 ในกลุ่ม KC ค่า Creatinine เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรกและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ค่า Creatinine มีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก และมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 4 ผลการทดลองกลุ่ม B พบว่า Creatinine เพิ่มขึ้นอย่างมากในสัปดาห์แรก และลดลงในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อได้รับสารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 และ 4

พบว่าค่า Creatinine เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่ม S ค่า Creatinine มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ในขณะที่สัปดาห์ที่ 4 มีค่า Creatinine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับสัปดาห์ที่ 0, 1, 2 และ 3

ผลการเปรียบเทียบค่า Creatinine ระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ สัปดาห์ที่ 0 (ภาพที่ 6) ค่า Creatinine ของหนูแต่ละกลุ่ม (C, E, KC, B และ S) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.21± 0.01, 0.23± 0.01, 0.24± 0.01, 0.22± 0.01 และ 0.22± 0.01 mg/dL ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 1 ค่า Creatinine ทุกกลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และ สัปดาห์ที่ 2 ค่า Creatinine กลุ่ม C, E, KC และ S มีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่ค่า Creatinine กลุ่ม B มีแนวโน้มลดลง เมื่อให้สารเอทิลีนไกลคอลในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าค่า Creatinine ของหนูกลุ่ม C, E, KC และ B มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่ม S creatinine มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ผ่านมา นอกจากนี้พบว่าค่า creatinine ของกลุ่ม B และ S ในสัปดาห์ที่ 3 มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม C, E และ KC ส่วนในสัปดาห์ที่ 4 ค่า Creatinine กลุ่ม C ลดลง ในขณะที่กลุ่ม E, KC, B และ S มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่า Creatinine (Mean ± S.E.M) ของแต่ละกลุ่มในแต่ละสัปดาห์ (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, p < 0.05)

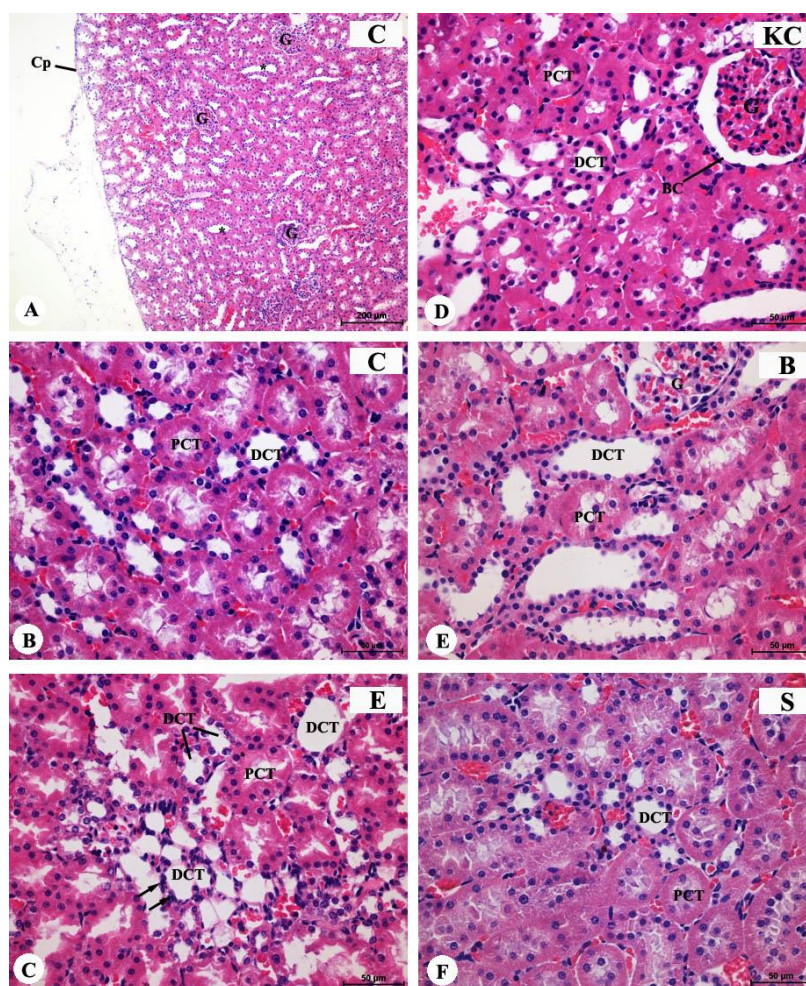


ภาพที่ 6 แสดงค่า Creatinine (Mean ± SEM) ระหว่างกลุ่มในแต่ละสัปดาห์

4.1.3 การศึกษาพยาธิสภาพและปริมาณการสะสมผลึก CaOx ในเนื้อเยื่อไต ด้วยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin

เมื่อทำการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม C มีเนื้อเยื่อไตลักษณะปกติ (ภาพที่ 7A และ B) ส่วนหนูกลุ่ม E พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อไตชั้นนอก โดยพบท่อไตส่วนปลาย DCT มีลักษณะขยายใหญ่ขึ้น และพบเซลล์เยื่อบุท่อไตแบนลง มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของ เซลล์เยื่อบุผิวจาก simple cuboidal epithelium เป็น squamous epithelium ภายในเซลล์พบนิวเคลียสติดสีเข้มขึ้น ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีจางลง (ภาพที่ 7C) ในขณะที่หนูกลุ่ม KC และหนูกลุ่ม B และ S พบลักษณะของเนื้อเยื่อไตค่อนข้างปกติ ซึ่งมีลักษณะเนื้อเยื่อไตใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอล (ภาพที่ 7D-F)

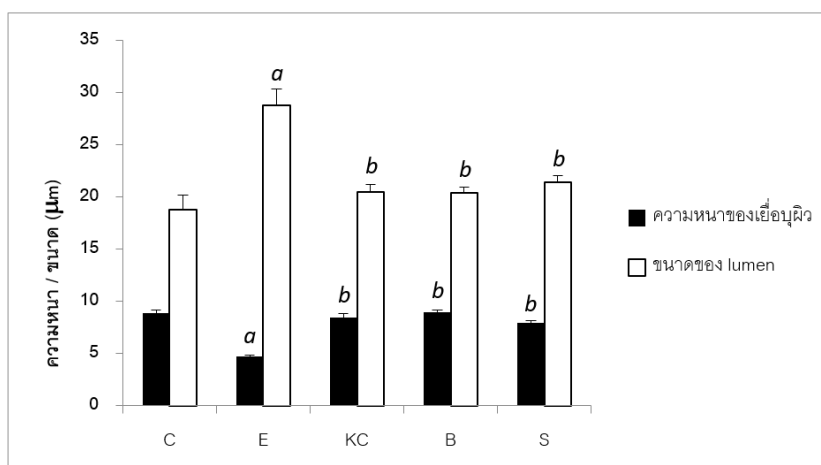
จากการวัดความหนาของเยื่อบุผิวและเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen ของท่อไตส่วนปลายของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าหนูกลุ่ม E มีความหนาของเยื่อบุผิวท่อไตส่วนปลายลดลงมากที่สุด และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen กว้างที่สุด ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ส่วนหนูกลุ่ม KC, B และ S มีความหนาของเยื่อบุผิวท่อไตส่วนปลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen ไม่แตกต่างจากกลุ่ม C แต่มีความหนาของเยื่อบุผิวท่อไตส่วนปลายมากกว่าและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen แคบกว่าเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม E (ภาพที่ 8) ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไตของหนูแต่ละกลุ่ม (C, E, KC, B และ S) ที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin

- A) แสดงเนื้อเยื่อไตชั้น cortex ของกลุ่ม C (กำลังขยาย 10X) ประกอบด้วย หลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลัส (G) และท่อหน่วยไต (ดอกจัน) จำนวนมาก
- B) แสดงเนื้อเยื่อไตของกลุ่ม C (กำลังขยาย 40X) พบท่อไตส่วนต้น (PCT) และท่อไตส่วนปลาย (DCT) จำนวนมาก
- C) แสดงเนื้อเยื่อไตของกลุ่ม E (กำลังขยาย 40X) พบท่อไตส่วนปลาย ที่มีลักษณะผิดปกติ lumen ขยายใหญ่ขึ้น ลูกศรแสดงลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่แบนลงและนิวเคลียสติดสีเข้ม
- D) แสดงเนื้อเยื่อไตของกลุ่ม KC (กำลังขยาย 40X) พบลักษณะท่อไตส่วนต้น และท่อไตส่วนปลายค่อนข้างปกติ
- E) แสดงเนื้อเยื่อไตของกลุ่ม B (กำลังขยาย 40X) พบลักษณะท่อไตส่วนต้น และท่อไตส่วนปลายค่อนข้างปกติ
- F) แสดงเนื้อเยื่อไตของกลุ่ม S (กำลังขยาย 40X) พบลักษณะท่อไตส่วนต้น และท่อไตส่วนปลายค่อนข้างปกติ

(Cp, Capsule; G, glomerulus; BC, Bowman's capsule; PCT, proximal convoluted tubule; DCT, distal convoluted tubule)



ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยความหนาของเยื่อบุผิวและเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen (Mean  $\pm$  SEM) ของท่อไตส่วนปลายในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม (a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม C และ E ตามลำดับ,  $p < 0.05$ )

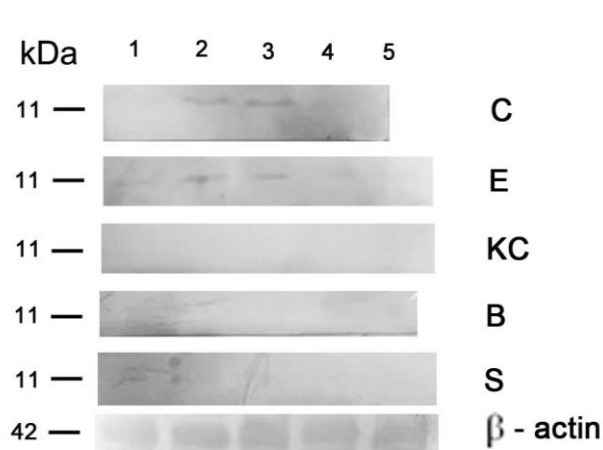
#### 4.1.4 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$ ด้วยวิธี Western immunoblotting

ผลการศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11 kDa (ภาพที่ 9) ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม โดยพบแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดเจนในหนูกลุ่ม C และ E เมื่อวัดความเข้มของแถบโปรตีนและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงถึงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 พบว่า กลุ่ม E มีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ที่ 121.41 ซึ่งมีค่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่ม C ประมาณ 20% ส่วนกลุ่ม KC, B และ S มีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ที่ 13.23, 33.21 และ 42.49 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าการแสดงออกลดลงกว่ากลุ่ม C ประมาณ

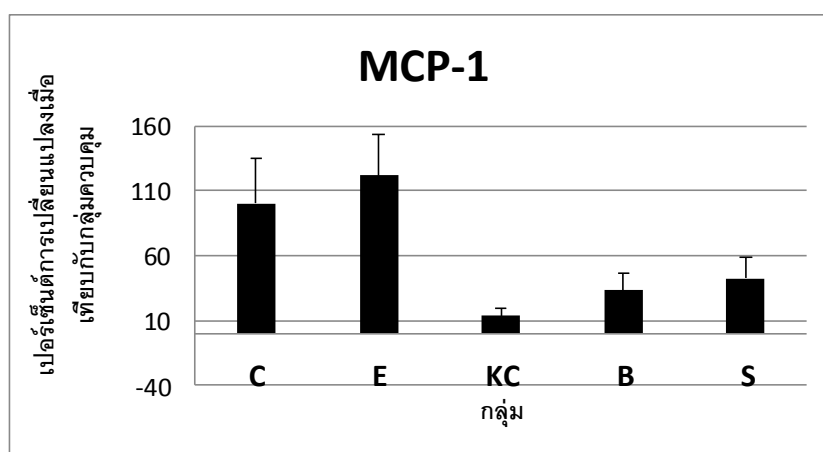


87%, 67% และ 58% ตามลำดับ (ภาพที่ 10,  $p > 0.05$ ) นอกจากนี้พบว่ากลุ่ม KC, B และ S มีค่าการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม E

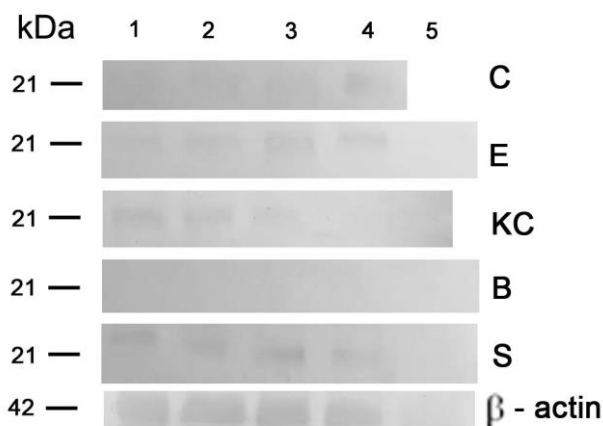
ผลการศึกษาการแสดงออกของ IL-6 พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa (ภาพที่ 11) ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม โดยพบแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดเจนในหนูกลุ่ม C, E, KC และ S เมื่อวัดความเข้มของแถบโปรตีนและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงถึงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน IL-6 พบว่า กลุ่ม E KC และ S มีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ที่ 211.51, 339.31 และ 208.49 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่ม C ประมาณ 110%, 239% และ 108% ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม B มีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ที่ 41.94 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าการแสดงออกลดลงกว่ากลุ่ม C ประมาณ 59%, (ภาพที่ 12,  $p > 0.05$ ) นอกจากนี้พบว่ากลุ่ม B และ S มีค่าการแสดงออกของโปรตีน IL-6 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม E ส่วนผลการศึกษาการแสดงออกของ TGF- $\beta$  ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่มไม่พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 kDa ในทุกกลุ่มการทดลอง



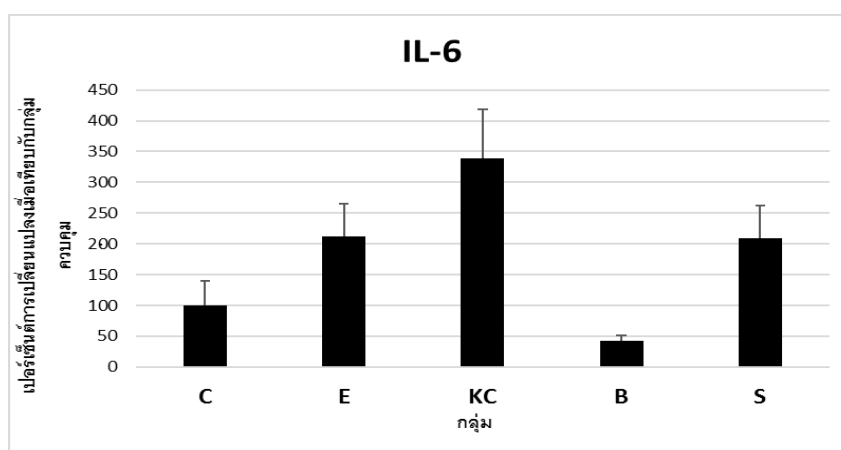
ภาพที่ 9 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและการแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม (Mean  $\pm$  SEM)



ภาพที่ 11 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและการแสดงออกของ IL-6 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม



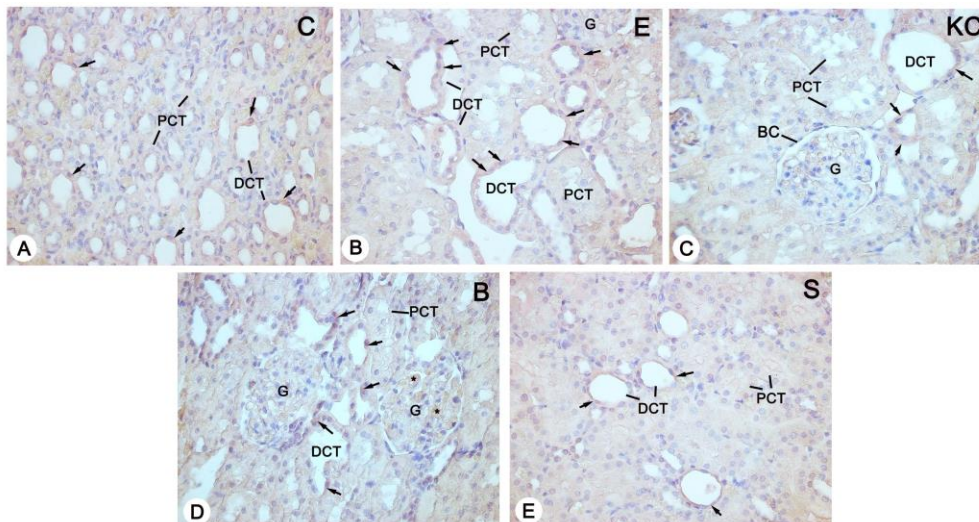
ภาพที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ IL-6 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่ม (Mean  $\pm$  SEM)

#### 4.1.5 การศึกษาตำแหน่งและการแสดงออกของ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$ ด้วยวิธี immunohistochemistry

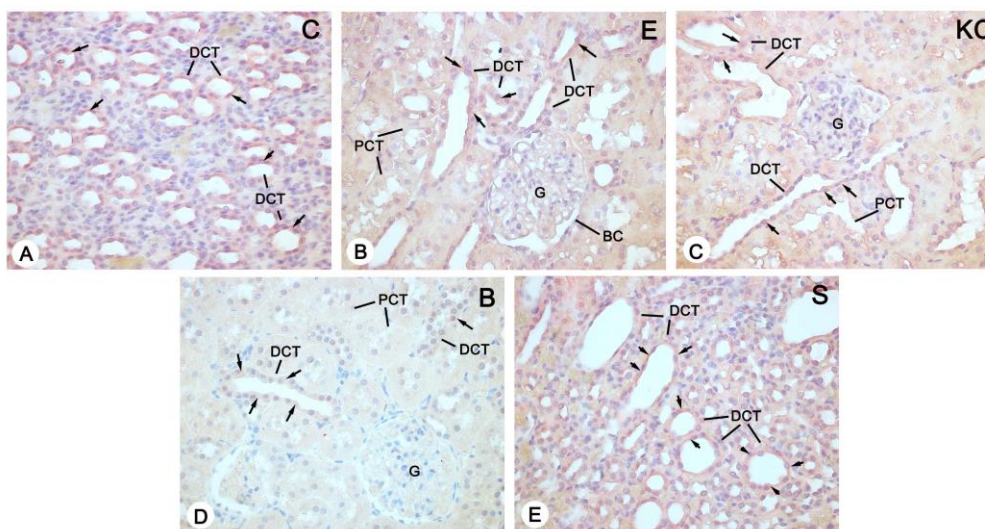
ผลการศึกษาดำเนินการและการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S พบตำแหน่งของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลาย กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นคอร์เทกซ์ ซึ่งมีลักษณะการติดสีเข้มและจางและมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยกลุ่มที่พบปริมาณการติดสีเข้มและชัดเจนคือกลุ่ม C และ E (ภาพที่ 13A และ B) ส่วนกลุ่ม KC, B และ S พบปริมาณการติดสีจางและค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 13C-E) นอกจากนี้ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในเซลล์เยื่อบุของโกลเมอรูลัส และเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนต้นของทุกกลุ่มการทดลอง

ผลการศึกษาดำเนินการและการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S พบตำแหน่งของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลาย กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นคอร์เทกซ์ ซึ่งมีลักษณะการติดสีเข้มและจางและมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยกลุ่มที่พบปริมาณการติดสีเข้มและชัดเจนคือกลุ่ม C, E, KC และ S (ภาพที่ 14A-C และ

E) ส่วนกลุ่ม B พบปริมาณการติดสีจางและค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 14D) นอกจากนี้ไม่พบการการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในเซลล์เยื่อหุ้มของโกลเมอรูลัส และเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตส่วนต้นของทุกกลุ่มการทดลอง



ภาพที่ 13 แสดง Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S ดังภาพ A-E ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X) พบการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตส่วนปลาย (ลูกศร) (G, glomerulus; BC, Bowman's capsule; PCT, proximal convoluted tubule; DCT, distal convoluted tubule; \*, เซลล์เม็ดเลือดแดง)



ภาพที่ 14 แสดง Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในไตของหนูกลุ่ม C, E, KC, B และ S ดังภาพ A-E ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X) พบการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย IL-6 ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตส่วนปลาย (ลูกศร) (G, glomerulus; BC, Bowman's capsule; PCT, proximal convoluted tubule; DCT, distal convoluted tubule)

#### 4.2 อภิปรายผลการทดลอง

ผลการเก็บข้อมูลค่า pH ในน้ำปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่มพบว่า ในช่วงก่อนการทดลอง หนูแต่ละกลุ่มส่วนใหญ่มีค่า pH ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วงประมาณ 7-7.2 เมื่อทำการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวมีค่า pH ลดลง ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 น่าจะเป็นผลมาจากเอทิลีนไกลคอลเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอ็นไซม์ในตับ ได้เป็น glycoaldehyde จากนั้นจะถูก oxidized เป็น oxalate ซึ่งมีความเป็นกรด (64) ส่งผลให้ค่า pH ในปัสสาวะลดลงและมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ potassium citrate แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเอทิลีนไกลคอลมีค่า pH ยังคงเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และมีค่า pH ใกล้เคียงกับค่า pH ก่อนการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 อาจเป็นผลมาจาก potassium citrate มีฤทธิ์เป็นด่างและเป็นสารยับยั้งการก่อนิ่วซึ่งเกลือซิเตรทจะจับกับแคลเซียมในปัสสาวะ ทำให้เกิดสารที่ละลายน้ำและไม่ตกตะกอนเป็นก้อนนิ่ว และมีผลเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือค่า pH ในปัสสาวะ (65) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีค่า pH เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และมีค่า pH ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ก่อนการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลของการศึกษาในหนูที่ได้รับ potassium citrate แสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถป้องกันการลดลงของค่า pH ของปัสสาวะได้ ใกล้เคียงกับสาร potassium citrate ซึ่งจะลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในไตได้

ผลการเก็บข้อมูลจำนวนผลึก COM ในน้ำปัสสาวะของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวมีปริมาณผลึก COM เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เอทิลีนไกลคอลถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอ็นไซม์ในตับและถูก oxidized เป็นออกซาเลต ซึ่งออกซาเลตจะจับกับแคลเซียมในกระแสเลือดได้เป็นผลึกแคลเซียม ออกซาเลต และถูกขับออกทางปัสสาวะ (64) ซึ่งการเกิดนิ่วในไตเริ่มจากการตกผลึกของแคลเซียมกับออกซาเลตไอออนในท่อไตส่วนปลายจนผลึกมีขนาดโตเกาะเกี่ยวกันและจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ท่อไตส่วนปลาย เช่น CD44, sialic acid- containing glycoprotein, osteopontin เป็นต้น (66-70) ขั้นตอนวิกฤตคือการจับกันระหว่างผลึก COM ซึ่งเป็นผลึกที่มีความรุนแรงและมีแรงยึดจับกับเซลล์ท่อไตมากกว่าผลึกชนิดไดไฮเดรต COD ถึง 15 เท่า มักพบปนออกมากับปัสสาวะจำนวนมาก (crystalluria) ในผู้ป่วยนิ่วในไต โดยผลึกที่ยึดจับกับเซลล์ท่อไตจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดตันทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการปัสสาวะไม่ออกและมีเลือดออกปนมากับปัสสาวะ (71) ซึ่งผลการศึกษาปริมาณผลึก COM ในปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับ potassium citrate และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณผลึก COM น้อยกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวและมีปริมาณผลึกไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในแต่ละสัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าสาร potassium citrate สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยด มีฤทธิ์ลดการจับกันระหว่างแคลเซียมกับออกซาเลตซึ่งอาจส่งผลป้องกันการเกิดเป็นผลึกนิ่วในไตได้

การศึกษาค่า BUN และ Creatinine ในซีรัมมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำงานของไต ซึ่ง BUN เป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโปรตีน และ Creatinine เป็นของเสียที่เกิดจากการสลายกล้ามเนื้อ ซึ่งทั้ง 2 ตัว จะถูกขับออกทางไต หากไตมีการทำงานที่ผิดปกติจะส่งผลต่อระดับ BUN และ Creatinine ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นได้ ดังนั้นการตรวจวัดค่าของ BUN และ Creatinine ในเลือดจึงสามารถบ่งบอกการทำงานของไต (72) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้หนูเกิดนิ่วในไตด้วย 0.75 % Ethylene glycol ร่วมกับ 2% ammonium chloride มีผลทำให้ค่า BUN และ Creatinine สูงกว่าค่าปกติ (73) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการให้ 0.5% ethylene glycol เพียงอย่างเดียว และให้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์พบว่าค่า BUN และ creatinine ในหนูทุกกลุ่มจะอยู่ในเกณฑ์ปกติเมื่อเปรียบเทียบกับ ค่า BUN

และ creatinine อ่างอิงของหนู Sprague Dawley อายุประมาณ 5-10 สัปดาห์ คือ 10-30 mg/dL และ 0.25-0.85 mg/dL (74, 75) ซึ่งปริมาณและระยะเวลาดังกล่าวอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไตที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ BUN และ Creatinine ได้ นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การให้น้ำทับทิมซึ่งมี antioxidant สูงแก่หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดนิ่วด้วย ethylene glycol โดยมีการให้น้ำทับทิมปริมาณ 50  $\mu$ l และ 100  $\mu$ l เป็นเวลา 10 และ 45 วัน พบว่าในวันที่ 45 ค่า BUN และ Creatinine ยังคงอยู่ในระดับที่ปกติ (76) ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบผลการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตในระยะยาว อาจจะต้องให้สารสกัดและสารเอทิลีน ไกลคอลแก่สัตว์ทดลองนานกว่า 2 สัปดาห์

เมื่อทำการศึกษาลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไตของหนูแต่ละกลุ่มพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารเอทิลีน ไกลคอลเพียงอย่างเดียวเกิดพยาธิสภาพรุนแรงที่สุด โดยพบเยื่อบุท่อไตส่วนปลายขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen กว้าง และมีความหนาของผนังลดลง มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์เยื่อบุ และนิวเคลียสติดสีเข้มขึ้น และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณเยื่อบุท่อไตส่วนปลาย อาจเนื่องมาจากเป็นบริเวณที่ผลึกแคลเซียม ออกซาเลตเกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด ผลึกจะไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อไตเกิดการอักเสบและถูกทำลาย ซึ่งผลการศึกษารังนี้ไม่พบผลึกนิ่วในเนื้อเยื่อไต ซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาหรือความเข้มข้นของการได้รับเอทิลีนไกลคอลน้อยเกินไป ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ potassium citrate และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีผลลดการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทิลีน ไกลคอลได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Khawsuk et al. และ Semangoen et al. (58, 59) โดยอาจเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดสามารถลดการจับกันของแคลเซียมและออกซาเลต ส่งผลให้ลดการเกิดผลึกนิ่วในไต และการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตได้

จากการศึกษาการแสดงออกของ cytokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แก่ MCP-1 IL-6 และ TGF- $\beta$  ด้วยวิธี Western immunoblotting และ immunohistochemistry พบแถบโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย MCP-1 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11 kDa และพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวมีการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดพบการแสดงออกของ MCP-1 ลดลง เช่นเดียวกับการให้สาร potassium citrate ซึ่ง MCP-1 ในมนุษย์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 76 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุล 13kDa เป็น chemokine สำคัญ ช่วยในการเคลื่อนที่ของ monocyte หรือ macrophage ให้เคลื่อนที่ผ่านผนังหลอดเลือด ไปยังเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บหรือเสียหายเพื่อตอบสนองต่อการอักเสบ โดย MCP-1 ถูกหลั่งออกมาได้จากเซลล์หลากหลายชนิด เช่น endothelial, fibroblasts, epithelial, smooth muscle, mesangial, astrocytic, monocytic, and microglial cells และสามารถถูกกระตุ้นการสร้างได้จากการเกิด oxidative stress, cytokines, และ growth factors (77) มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไต (NRK52E) พบว่ามีระดับการแสดงออกของ MCP-1 mRNA และโปรตีน MCP-1 สูงขึ้นและแปรผันตามความเข้มข้นของผลึก COM และ oxalate ion ที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ catalase สามารถลดการแสดงออกของ MCP-1 ได้ (78) มีรายงานการศึกษาปริมาณ MCP-1 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease) พบว่าผู้ป่วยไตเรื้อรังระยะที่ 1-2 มีค่า MCP-1 สูงถึง 183.0 pg/mL ซึ่งมีค่ามากกว่าผู้ที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรังที่มีค่า MCP-1 ปริมาณ 164.7 pg/mL (79)

จากการศึกษาการแสดงออกของ IL-6 พบแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ซึ่งเปรียบเทียบกับ IL-6 ที่พบในมนุษย์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลที่เกิดจาก

กระบวนการไกลโคซิเลชันมีขนาด 21–26 kDa (80) IL-6 ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ที่บาดเจ็บหรือติดเชื้อและส่งสัญญาณไปทั่วร่างกาย จากการกระตุ้นของเชื้อ (pathogen-associated molecular patterns: PAMP) เป็นการกระตุ้นการทำงานของ pathogen-recognition receptors (PRRs) การตอบสนองต่อเชื้อของเซลล์ภูมิคุ้มกันเช่น monocytes และ macrophage โดยบนผิวของ PRRs เหล่านี้ประกอบด้วยตัวรับสัญญาณ Toll-like (TLRs), retinoic acid-inducible gene-1-like receptors, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, and DNA receptors ซึ่งจะกระตุ้น pathway ที่เกี่ยวกับ NF- $\kappa$ B และเพิ่มจำนวน mRNA ของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , และ IL-1 $\beta$  ซึ่ง TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ยังมีส่วนในการกระตุ้นเพิ่มจำนวน IL-6 (81)

จากผลการทดลองพบปริมาณการแสดงออกของโปรตีน IL-6 เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับเอทิลีนไกลคอลเพียงอย่างเดียวส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดมีการแสดงออกของ IL-6 ลดลง มีการศึกษาการแสดงออกของ IL-6 ภายหลังได้รับออกซาเลตในเซลล์ HK-2 พบว่าปริมาณการแสดงออกของ IL-6 ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับออกซาเลต ซึ่งการแสดงออกของ IL-6 ที่เพิ่มขึ้นและความสามารถในการหลั่ง IL-6 โดยเซลล์เยื่อบุผิวของไตอาจมีบทบาทสำคัญในการเกิด โรคนิวไนด์ที่เกิดจากภาวะ hyperoxaluria (82)

จากผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของ TGF- $\beta$  ในทุกกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของ TGF- $\beta$  ที่แสดงออกมามีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถตรวจเจอ หรือระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจหา หรืออาจเกิดจากระยะเวลาของการได้รับสารเอทิลีนไกลคอลน้อยเกินไปที่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงของพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต

ซึ่งจากผลการทดลองอาจอธิบายกลไกการเกิดนิวไนด์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบกล่าวคือนิวไนด์เกิดจากการอิมตัวของสารเมตาบอลิท์และของเสียในปัสสาวะ ทำให้เกิดการตกตะกอนและรวมตัวเป็นผลึกเข้ายึดเกาะและทำลายเนื้อไต ทำให้เซลล์บุท่อไตได้รับบาดเจ็บ และปลดปล่อยสารอนุมูลอิสระและจะกลายเป็นที่ยึดเกาะของผลึกนี้ขนาดเล็ก และกลายเป็น nidus ซึ่งเป็นจุดของการเกิดก้อนนิวไนด์ เมื่อ nidus รวมกันมากขึ้น และร่างกายมีสารขับหรือยับยั้งนิวไนด์ลดลง จะทำให้มีการตกค้างของผลึกนี้มากขึ้นและพัฒนาเป็นก้อนนิวไนด์ (83) ผลึก CaOx จะไปกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการสร้าง MCP-1 และ IL-6 มากขึ้น ซึ่งเป็นตัวกลางในการเกิดการอักเสบ ซึ่ง MCP-1 และ IL-6 จะกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น neutrophil monocyte macrophage ให้เข้ามาช่วยกำจัดผลึกนี้มากขึ้น เนื่องจากการเกิดผลึกนี้จะทำให้เซลล์เกิด oxidative stress และหลังสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ส่งผลให้เนื้อเยื่อไตเสียหายและเกิดการอักเสบ (84) cytokine จากเม็ดเลือดขาวจะมีการกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตและ fibroblast มีการหลั่ง TGF- $\beta$ 1 มากขึ้น เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่เสียหาย โดยการสร้าง fibrous tissue มาทดแทนส่วนที่ถูกทำลาย ทำให้ไตสูญเสีย nephron ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง (85) จากการทดลองในครั้งนี้เมื่อให้สารสกัดทั้ง 2 ชนิดแก่สัตว์ทดลองก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดนิวไนด์ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดเช่น phenolic compound และ anthocyanin อาจมีบทบาทสำคัญในการลดการเกิดผลึกนิวไนด์ในปัสสาวะและลดระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยผลึกนิวไนด์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด oxidative stress ช่วยกระตุ้นการทำงานของ antioxidant enzyme และลดการสร้างสาร cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งอาจส่งผลให้การอักเสบลดลงและลดการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตได้ (58, 59)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวกล้องข้าวเหนียวสังข์หยดปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมมีผลลดการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และมีผลลด การเกิดผลึกนิวในปัสสาวะและลดการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเอทิลีน ไกลคอล

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับระยะเวลาของการได้รับสารเอทิลีนไกลคอลที่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงของพยาธิ สภาพของเนื้อเยื่อไตเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจได้เห็นผลการเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ชัดเจนขึ้น
2. ควรวางแผนการตรวจหา cytokine อื่นๆ เพิ่มเติมและตรวจหาในระดับยีนเพื่อให้ผลที่แม่นยำ

### บรรณานุกรม

1. Yanakawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol* 1997;4: 537-40.
2. สำนักงานสถิติแห่งชาติ. (2555). จำนวนผู้ป่วยใน จำแนกตามกลุ่มสาเหตุป่วย 75 โรค จากสถานบริการสาธารณสุข ของกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2546 - 2555 [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://service.nso.go.th/nso/web/statseries/statseries09.html> สืบค้นเมื่อ [19/03/2562]
3. Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol.* 1978 May;15(6):442-8.
4. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):602-5.
5. Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int.* 1990 Jan;37(1):51-6.
6. Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2062-72.
7. Ogbuji LU, Finlayson B. Crystal morphologies in whewellite stones: electron microscopy. *Invest Urol.* 1981 Nov;19(3):182-6.
8. Burns JR, Finlayson B. Changes in calcium oxalate crystal, morphology as a function of concentration. *Invest Urol.* 1980 Sep;18(2):174-7.
9. Tomazic BB, Nancollas GH. The dissolution of calcium oxalate kidney stones. A kinetic study. *J Urol.* 1982 Jul;128(1):205-8.
10. Sheng X, Jung T, Wesson JA, Ward MD. Adhesion at calcium oxalate crystal surfaces and the effect of urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 11;102(2):267-72.
11. Sheng X, Ward MD, Wesson JA. Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jul;16(7):1904-8.
12. Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Dec;14(12):3155-66.
13. Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS. Surface exposure of phosphatidylserine increases calcium oxalate crystal attachment to IMCD cells. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 2):F55-62.
14. Kumar V, Farell G, Deganello S, Lieske JC. Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Feb;14(2):289-97.



15. Sorokina EA, Wesson JA, Kleinman JG. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Aug;15(8):2057-65.
16. Verkoelen CF, van der Boom BG, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney Int*. 2000 Mar;57(3):1072-82.
17. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2598-608.
18. Ryall RL. Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World J Urol*. 1997;15(3):155-64.
19. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257(1 Pt 2):F99-106.
20. Atmani F, Khan SR. Role of urinary bikunin in the inhibition of calcium oxalate crystallization. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Nov;10 Suppl 14:S385-8.
21. Chutipongtanate S, Nakagawa Y, Sritippayawan S, Pittayamateekul J, Parichatikanond P, Westley BR, et al. Identification of human urinary trefoil factor 1 as a novel calcium oxalate crystal growth inhibitor. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3613-22.
22. Grover PK, Resnick MI. Evidence for the presence of abnormal proteins in the urine of recurrent stone formers. *J Urol*. 1995 May;153(5):1716-21.
23. Grover PK, Ryall RL. Inhibition of calcium oxalate crystal growth and aggregation by prothrombin and its fragments in vitro: relationship between protein structure and inhibitory activity. *Eur J Biochem*. 1999 Jul;263(1):50-6.
24. Hess B. The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and Nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning Microsc*. 1991 Sep;5(3):689-95; discussion 96.
25. Hoyer JR. Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab*. 1994;20(6):385-92.
26. Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):1159-66.
27. Ryall RL, Grover PK, Stapleton AM, Barrell DK, Tang Y, Moritz RL, et al. The urinary F1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine in vitro. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Nov;89(5):533-41.
28. Ebisuno S, Nishihata M, Inagaki T, Umehara M, Kohjimoto Y. Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate crystal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Nov;10 Suppl 14:S436-40.

29. Okuyama M, Yamaguchi S, Yachiku S. Identification of bikunin isolated from human urine inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *Int J Urol*. 2003 Oct;10(10):530-5.
30. Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jan;14(1):139-47.
31. Knorle R, Schnierle P, Koch A, Buchholz NP, Hering F, Seiler H, et al. Tamm-Horsfall glycoprotein: role in inhibition and promotion of renal calcium oxalate stone formation studied with Fourier-transform infrared spectroscopy. *Clin Chem*. 1994 Sep;40(9):1739-43.
32. Greene EL, Farell G, Yu S, Matthews T, Kumar V, Lieske JC. Renal cell adaptation to oxalate. *Urol Res* 2005; 33(5): 340-8.
33. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8(2): 75-88.
34. Jonassen JA, Cao LC, Honeyman T, Scheid CR. Mechanisms mediating oxalate-induced alterations in renal cell functions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13(1): 55-72.
35. DeWater, *Toxicology of the Kidney*, Third Edition; 1999 [cited 2017 July 19]
36. Umekawa T, Hatanaka Y, Kurita T, Khan SR. Effect of angiotensin II receptor blockage on osteopontin expression and calcium oxalate crystal deposition in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3): 635-44
37. Grases F, Melero G, Costa-Bauza A, Prieto R, March JG. Urolithiasis and phytotherapy. *Int Urol Nephrol*. 1994;26(5):507-11.
38. Grases F, Prieto RM, Gomila I, Sanchis P, Costa-Bauza A. Phytotherapy and renal stones: the role of antioxidants. A pilot study in Wistar rats. *Urol Res*. 2009 Feb;37(1):35-40.
39. Atmani F, Farell G, Lieske JC. Extract from *Herniaria hirsuta* coats calcium oxalate monohydrate crystals and blocks their adhesion to renal epithelial cells. *J Urol*. 2004 Oct;172(4 Pt 1):1510-4.
40. Atmani F, Khan SR. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU Int*. 2000 Apr;85(6):621-5.
41. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol Res*. 2003 Feb;30(6):374-9.
42. Al-Ghamdi SS, Al-Ghamdi AA, Shammah AA. Inhibition of calcium oxalate nephrotoxicity with *Cymbopogon schoenanthus* (Al-Ethkher). *Drug Metab Lett*. 2007 Dec;1(4):241-4.

43. Woottisin S, Hossain RZ, Yachantha C, Sriboonlue P, Ogawa Y, Saito S. Effects of *Orthosiphon grandiflorus*, *Hibiscus sabdariffa* and *Phyllanthus amarus* extracts on risk factors for urinary calcium oxalate stones in rats. *J Urol.* Jan;185(1):323-8.
44. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res.* Apr;38(2):89-96.
45. Goldfarb DS, Coe FL. Beverages, diet, and prevention of kidney stones. *Am J Kidney Dis.* 1999 Feb;33(2):398-400; discussion 1-3.
46. Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F, Zrara I, Eljahiri Y, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urol.* 2007;7:18.
47. ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง. (2012). ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://zawadios.exteen.com/20120725/entry-2/สืบค้นเมื่อ16/03/2556>
48. ธวัชชัย แถวถาทำ. (2547). Effect of Gamma Oryzanol in Purple Glutinous Rice Bran on Immune Response in Male Mice (*Mus musculus*). เอกสารประกอบการประชุม First Agriculture Biotechnology โรงแรมรีเจนท์ กรุงเทพฯ.
49. วรณช ศรีเกษฎารักษ์. 2550. การผลิตสารประกอบทางชีวภาพจากข้าวกล้องงอก. ใน: จดหมายข่าวมหาวิทยาลัยขอนแก่น 5 ก.พ. 2552. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://202.12.97.4/kkunews/index/สืบค้นเมื่อ17/03/2556>
50. Jariwalla RJ. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res.* 2001;27(1):17-26.
51. Ebisuno S, Morimoto S, Yoshida T, Fukatani T, Yasukawa S, Ohkawa T. Rice-bran treatment for calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria. *Br J Urol.* 1986 Dec;58(6):592-5.
52. Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J Urol.* 1984 Dec;132(6):1140-5.
53. Kim MK, Kim HA, Koh K, Kim HS, Lee YS, Kim YH. Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. *Nutr Res Pract.* 2008 Spring;2(1):46-9.
54. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M, et al. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007 Mar;62(1):1-6.
55. Xia X, Ling W, Ma J, Xia M, Hou M, Wang Q, et al. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2006 Aug;136(8):2220-5.

56. Sangkitikomol W, Tencomnao T and Rocejanasaroj A. Antioxidant effects of anthocyanins-rich extract from black sticky rice on human erythrocytes and mononuclear leukocytes. *African J Biotechnol.* 2010; 9(48): 8222-8229.
57. กิตตินันท์ ขำสอาด (2560). ฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำ รำข้าวเหนียวดำ และข้าวสังข์หยดในการยับยั้งการเติบโตและรวมกลุ่มกันของฟลิกแคลเซียมออกซาเลต และความเป็นพิษต่อเซลล์ MDCK. คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
58. Khawsuk, W., Semangern, T., Nuurai, P., Kruaytong, R., Tongsum, O., Pongkan, B., Srikang and Keawpoome, A. Protective effect of unpolished black sticky rice extract on the rat kidney pathology induced by polyethylene glycol. *Proceeding of the 40<sup>th</sup> annual conference of the Anatomy Association of Thailand, Ravindra Beach Resort and Spa, Sattahip, Chonburi, Thailand, May 17-19, 2017.*
59. Semangoen T, Khawsuk W, Simanon N, Soiphet T, Homjai W, Boonchaleaw B, Seangchan P, Nuurai P. Antioxidant effect of unpolished Sung-Yod sticky rice prevent ethylene glycol-induced renal pathology in rats. *Chula Med J* 2018;62: 451-464.
60. Chiang AN, Wu HL, Yeh HI, Chu CS, Lin HC, Lee WC. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids* 2006;41(8):797-803.
61. Min SW, Ryu SN, Kim DH: Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-d-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int Immunopharmacol* 2010;10: 959-66.
62. Hartatia FK, Widjanarkoc SB, Widyaningsihc TD, Rifa'I M. Anti-Inflammatory evaluation of black rice extract inhibits TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 cytokines produced by immunocompetent cells. *Food Agric Immunol* 2017;28(6):1116-25.
63. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res* 2010;38: 89-96.
64. สุนันท์ วงศ์วิชะกร จารุวรรณ ศรีอาภา อัจฉรา ทองภู อูมาพร สดับธรรมารักษ์. (2006). น้ำยาหล่อเย็นและผลิตภัณฑ์ป้องกันการแข็งตัวของหม้อน้ำ. *P&D Information Bulletin* 2006; 14(2): 21-24.
65. Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3155-66.
66. Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS. Surface exposure of phosphatidylserine increases calcium oxalate crystal attachment to IMCD cells. *Am J Physiol.* 1997;272(1 Pt 2):F55-62.

67. Kumar V, Farell G, Deganello S, Lieske JC. Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(2):289-97.
68. Sorokina EA, Wesson JA, Kleinman JG. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2057-65.
69. Verkoelen CF, van der Boom BG, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney Int.* 2000;57(3):1072-82.
70. Tomazic BB, Nancollas GH. The dissolution of calcium oxalate kidney stones. A kinetic study. *J Urol.* 1982;128(1):205-8.
71. วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ. ผลแลปจากการตรวจเลือด...มีความหมายว่าอย่างไร [Online]. แหล่งเข้าถึง: <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/442/> [สืบค้นเมื่อ 6/04/2563]
72. Veeramani VP, *et al.* Evaluation of protective effects of diosmin (a citrus flavonoid) in chemical-induced urolithiasis in experimental rats. *Pharmaceutical Biology.* 2016;54(9):1513-21.
73. Alemáan CL, *et al.* Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Laboratory Animals* 1998;32(4):457-66.
74. Han Z, *et al.* Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Laboratory Animal Research.* 2010;26(2):153-64.
75. Tugcu V, *et al.* Protective Effect of a Potent Antioxidant, Pomegranate Juice, in the Kidney of Rats with Nephrolithiasis Induced by Ethylene Glycol. *Journal of endourology.* 2008;22(12):2723-32.
76. Deshmane S, *et al.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2009;29(6):313-26.
77. Umekawa T, *et al.* Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. *Kidney international.* 2002;61(1):105-12.
78. Gregg P, *et al.* Association of Monocyte Chemoattractant Protein-1 with Death and Atherosclerotic Events in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology.* 2018;47(6):395-405.
79. Simpson R, *et al.* Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein science.* 1997;6:929-55.
80. Tanaka T, *et al.* IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2014;6(10):a016295.
81. Huang MY, *et al.* Oxalate stimulates IL-6 production in HK-2 cells, a line of human renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney International.* 2005;68(2):497-503.

82. ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์, และคณะ. โรคนิ่วไต : พยาธิสรีระวิทยา การรักษาและการสร้างเสริมสุขภาพ. Chula Med J. 2549;50(2):103-23.
83. ชาญชัย บุญหล้าและคณะ.โรคนิ่วไต: จากกลไกการเกิดนิ่วระดับโมเลกุลสู่การป้องกัน [Online]. 2550. แหล่งข้อมูล <http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/pdf/Kidney%20Stone-%20From%20Molecular%20Lithogenesis%20to%20Stone%20Prevention.pdf>. [สืบค้นเมื่อ 10/4/2563]
84. ชนุดรา หุณาปเทศ. การแสดงออกของยีนโมโนไฮดรอกซีเคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1, อินเทอร์ลิวคิน-6 และทรานสเฟอร์มีนิงโกรสแฟคเตอร์-บีต้า ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต. วิทยาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี , คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.