



## การแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีกวานโนซีนในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต และความเป็นพิษของฟลักแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อเซลล์บุผิวท่อไต

อุไรวรรณ ไทวัจิตร\*, ชานุชัย บุญหล้า\*, วิภาวี กิตติโกวิท\*\*,  
 สุพจน์ รัชชานนท์\*\*\*, สมบัติ บวรพคุณกิตติ\*\*\*\*,  
 ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์\*

### บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาการแสดงออกของ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียมออกซาลेटและศึกษาผลของฟลักแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อการมีชีวิตและการผลิตสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species : ROS) ของเซลล์บุผิวท่อไต (Human renal epithelial cell line : HK-2 cell)

**กลุ่มศึกษาและวิธีดำเนินการศึกษา:** ศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตโดยวิธี immunohistochemistry จำนวน 10 ราย ศึกษาผลของฟลักแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อการมีชีวิตของเซลล์ และปริมาณการผลิต ROS โดยวิธี MTT assay และ Spectrofluorometric assay ตามลำดับ

**ผลการศึกษา:** พบการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต ขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตควบคุม การศึกษาใน HK-2 cell พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับฟลักแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตจะมีปริมาณเซลล์มีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและเวลาของการได้รับฟลักแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต

**สรุป:** การศึกษานี้พบการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียมออกซาลेट แสดงว่าการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคไต นอกจากนี้ยังพบว่าใน HK-2 cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วยฟลักของแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต จะมีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษส่งผลให้เซลล์ตายมากขึ้น ดังนั้นแนวทางการรักษาโรคไตควรให้สารต้านอนุมูลอิสระหรือวิธีการใดๆ เพื่อลดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งอาจสามารถป้องกันการเกิดไตได้

**คำสำคัญ:** แคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน อนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว 8-ไฮดรอกซีดีออกซีกวานโนซีน

\* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\*\* หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ ภาควิชาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

\*\*\*\* หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ ภาควิชาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลขอนแก่น

## Expression of 8-hydroxydeoxyguanosine in Nephrolithiatic Renal Tissues and Toxicity of Calcium Oxalate Monohydrate to Human Kidney Cell Line.

Uraiwan Waiwijit\*, Chanchai Boonla\*  
Wipawee Kitikowit\*\*, Supoj Ratchanon\*\*\*  
Sombat Borwornpadungkitti\*\*\*\*, Piyaattana Tosukhowong\*

---

### Abstract

**Objective:** To explore expression of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage) in renal tissues obtained from calcium oxalate nephrolithiasis patients, and to investigate the effects of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals on viability of human proximal renal tubular cells (HK-2) and intracellular reactive oxygen species (ROS) production.

**Design:** Observational analytical study.

**Methods:** Expression of 8-OHdG in paraffin-embedded nephrolithiatic renal sections (n=10) was explored by immunohistochemical staining. MTT assay was used to assess viability of HK-2 cells after exposed to COM in both dose and time-dependent experiments. The effect of COM on intracellular ROS production in HK-2 cells was determined using dichlorofluorescein method.

**Results:** In stone-containing renal tissues, 8-OHdG was strongly expressed in renal tubular cells. There was no expression of 8-OHdG in normal renal tissues. COM decreased viability of HK-2 cells in both dose- and time-dependent manners. Intracellular ROS generation was increased in HK-2 cells after treated with COM.

**Conclusions:** 8-OHdG was overexpressed in the kidneys of nephrolithiasis patients suggested that oxidative stress involved in the progress of kidney stone disease. COM was injurious to renal tubular cells. A decreased cell survival after treatment with COM may be mediated via ROS toxicity. Attenuation of oxidative damage by antioxidants is recommended for medical management of stone patients.

**Keywords:** Calcium oxalate monohydrate, oxidative stress, reactive oxygen species, 8-hydroxydeoxyguanosine

---

---

\* Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

\*\* Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

\*\*\* Division of Urology, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital.

\*\*\*\* Division of urology, Department of Surgery, Khonkaen Hospital

## บทนำ

นิ่วไต (kidney stone, nephrolithiasis) เป็นโรคที่พบบ่อยในระบบทางเดินปัสสาวะ อุบัติการณ์ของโรคนี้ไตมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลกและเป็นโรคที่มีโอกาสเป็นซ้ำสูง (highly recurrent condition) หากไม่ได้ป้องกันและรักษาตามปัจจัยเสี่ยง จะทำให้เกิดนิ่วซ้ำๆ ต่อเนื่อง จนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไตเรื้อรังตามมา ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เกิดจากโรคนี้ไตจำนวนมาก โดยเฉพาะในชุมชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ทำให้ภาครัฐต้องใช้งบประมาณจำนวนมากในการดูแลและรักษาผู้ป่วยเหล่านี้

ชนิดของนิ่วแบ่งตามแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในก้อนนิ่ว นิ่วที่พบบ่อยที่สุดคือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต พบประมาณร้อยละ 70-80 รองลงมาคือ แคลเซียมฟอสเฟต (ร้อยละ 12) นิ่วกรดยูริก (ร้อยละ 9) และนิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (ร้อยละ 2)[1] กลไกการเกิดนิ่วเริ่มจากการตกผลึกของสารก่อนิ่ว (stone promoters) ในปัสสาวะที่อิ่มตัววยดียง (supersaturated urine) สารก่อนิ่วที่สำคัญคือ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก เมื่อเกิดผลึกปริมาณมากและเกิดอย่างเรื้อรัง จะทำให้ผลึกรวมกลุ่มกัน (crystal aggregation) เจริญใหญ่ขึ้น (crystal growth) และติดค้างในท่อไต (crystal retention) เกิดเป็น nidus ซึ่งจะกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด[2,3] ผลึกที่สำคัญที่สุดในกระบวนการเกิดนิ่ว คือ ผลึกแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งมี 3 รูปแบบ ได้แก่ แคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (calcium oxalate monohydrate, COM) แคลเซียมออกซาเลตไดไฮเดรต (calcium oxalate dihydrate, COD) และแคลเซียมออกซาเลตไตรไฮเดรต (calcium oxalate trihydrate) ที่พบได้บ่อยในปัสสาวะคือผลึก COM และ COD[4] รายงานการศึกษาพบว่าทั้งผลึก COM และ COD มีคุณสมบัติในการจับกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตได้ แต่ผลึก COM มีความสามารถในการจับมากกว่า และยังทำให้เกิดการบาดเจ็บ (injury) ของเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตอีกด้วย[5] การศึกษาของ Hackett และคณะ ในเซลล์ Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) พบว่าเมื่อได้รับผลึก COM เซลล์มีจำนวนลดลง (decreased cell viability) และพบปริมาณ intracellular enzymes ในอาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้น แสดงว่า COM ทำให้เซลล์ MDCK ตายมากขึ้น[6,7] การศึกษาของ Schepers และคณะ พบ

ว่าเซลล์ LLC-PK1 (porcine renal proximal tubular cell line) และ MDCK-II เมื่อได้รับ COM จะเกิดการบาดเจ็บและมีการสร้างสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species, ROS) ภายในเซลล์มากขึ้น[8,9] ดังนั้นผลึก COM สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเซลล์ตายในที่สุด[10]

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ ภาวะความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระ (radical species) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) อาจมีสารอนุมูลอิสระมากขึ้นหรือมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะ ROS จะทำลาย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ และโมเลกุลอื่นๆ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่ง Oxidative damage molecules ที่เกิดขึ้น จะไม่สามารถทำงานได้ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายและตายไป การประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันนิยมใช้ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีกวานโนซีน (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) ซึ่งเป็น Oxidative damage DNA เกิดจาก ROS ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเบส deoxyguanosine บน DNA [11,12]

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตชนิดแคลเซียมออกซาเลตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม และศึกษาผลของผลึก COM ต่อการมีชีวิตและ ปริมาณการสร้าง ROS ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2 cells) จากการทบทวนวรรณกรรมของผู้วิจัยพบว่า ยังไม่มีรายงานการศึกษาแบบนี้มาก่อน

## กลุ่มศึกษาและวิธีดำเนินการศึกษา

### กลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตและการเก็บสารตัวอย่าง

คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนี้ไต จำนวน 10 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นนิ่วไตและเข้ารับการผ่าตัดเอานิ่วออก ณ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ผู้ป่วยทุกรายเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (วิเคราะห์โดยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy) ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (kidney biopsy) ที่ตำแหน่งใกล้กับก้อนนิ่ว ใส่ลงในหลอดที่มี 10% formalin buffer 15 ml กระบวนการทำ paraffin-embedded tissues

และตัดชิ้นเนื้อลงบนสไลด์ทำ ณ หน่วยพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

## การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

### การแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของ ผู้ป่วยโรคไต

นำสไลด์ชิ้นเนื้อ มา deparaffinize แล้ว rehydrate จากนั้นทำ antigen retrieval โดยใช้ citrate buffer pH 6.0 แล้วนำไปใส่ใน microwave โดยใช้กำลังไฟสูงสุดเป็นเวลา 2 นาทีจำนวน 6 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำลาย endogenous peroxidase activity โดย incubate สไลด์ใน 3%  $H_2O_2$  เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว incubate ด้วย 3% normal horse serum เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด anti-8-OHdG dilution 1:200 (Clone N45.1, JaiCA) ลงบนสไลด์แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่  $4^{\circ}C$  นำมาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วหยด secondary antibody และ incubate เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ขั้นตอนการย้อมสี หยดสารละลาย DAB ลงไปแล้ว incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที counterstain ด้วย Mayer's hematoxylin solution 4-5 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จากนั้น dehydrate และ mount สไลด์ การแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไต รายงานผลการย้อมโดยพยาธิแพทย์ โดยเกณฑ์การ grading คือ มีพื้นที่ที่ย้อมให้ผลบวก 0-25% เป็น 1+, 25-50% เป็น 2+, 50-75% เป็น 3+ และ 75-100% เป็น 4+

### การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ (Human proximal tubular cell line, HK-2 cells) โดยนำ HK-2 cells มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/high glucose ที่มี 10% fetal bovine serum และ 0.1% streptomycin/penicillin ในตู้บ 37°C, 5%  $CO_2$  โดยต้องเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทุก 2 วัน

### วัดการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี MTT assay

หลักการเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ succinate

dehydrogenase ในไมโทคอนเดรีย โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan salt ซึ่งเป็นสารสีม่วง วิธีทำโดยย่อ คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้นที่ 10,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (90% confluence) จากนั้นเตรียมสารละลาย COM สำหรับใส่ในแต่ละหลุมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (serum-free condition) หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ 37°C, 5%  $CO_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเติม MTT 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายใน serum-free DMEM) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรและนำไปบ 37°C, 5%  $CO_2$  เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไป 100 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่า 5-10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) สำหรับ time-dependent experiment เลี้ยงเซลล์ตามที่กล่าวข้างต้น เติมผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร แล้ว incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนที่กล่าวข้างต้น

### การวัดปริมาณการผลิต ROS ใน HK-2 cells โดยวิธี spectrofluorometric assay

วัดปริมาณการผลิต ROS โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดย ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะเปลี่ยน DCFH-DA เป็น DCF ซึ่งเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นบ่งถึงปริมาณ ROS ในเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well black plate) ที่มีเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ ให้ได้ประมาณ 90% confluence แล้วเติม DCFH-DA 0.1 มิลลิโมลาร์ (ละลายใน serum-free DMEM) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (serum-free condition) หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ 37°C, 5%  $CO_2$  เป็นเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นนำไปวัด fluorescent intensity โดยกำหนด excitation ที่ 485

นาโนเมตร และ emission ที่ 535 นาโนเมตร คำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) จากการนำค่า fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ ( $t_x$ ) หาค่าด้วยค่า fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น ( $t_0$ )

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD และ mean $\pm$ SE) โดยนำเสนอในรูปแบบกราฟแท่ง และใช้ One-way ANOVA test สำหรับทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง 3 กลุ่มขึ้นไป ตามด้วย Bonferroni's multiple comparison test โปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS เวอร์ชัน 16.0 (Chicago, IL) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  แบบ two-tailed

### ผลการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ศึกษาในผู้ป่วยโรคไตที่เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตจำนวน 10 ราย อายุเฉลี่ย 54.90 $\pm$ 8.75 ปี เป็นเพศชาย จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 20) เพศหญิง จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 80) ปริมาตรของปัสสาวะเฉลี่ย 1.50 $\pm$ 0.50 ลิตรต่อวัน อัตราการกรองของไตเฉลี่ย 55.03 $\pm$ 16.06 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะเฉลี่ย 545.94 $\pm$ 329.85 มิลลิกรัมต่อวัน (ตารางที่ 1)

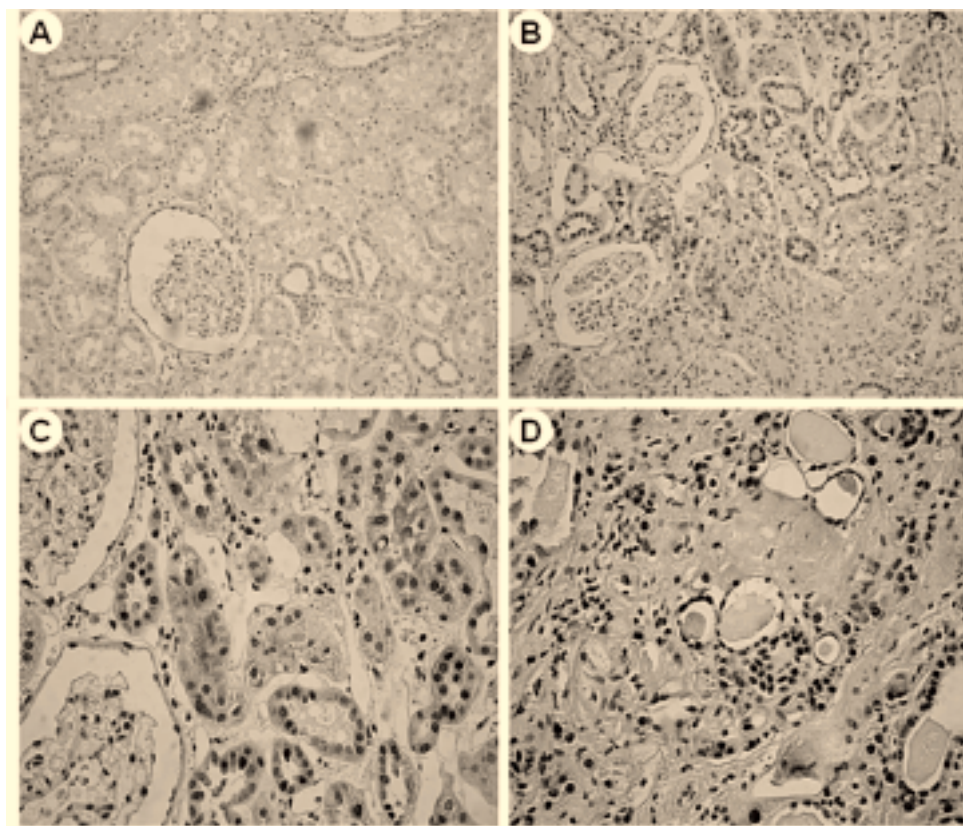
ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อไตที่ได้จากผู้ป่วยโรคไต มีการแสดงออกของ 8-OHdG สูง และตำแหน่งแสดงออกคือที่นิวเคลียสของเซลล์บุผิวท่อไต (รูปที่ 1B-D) ผู้ป่วยที่ให้ผล 1+ มีจำนวน 1 ราย ผล 3+ จำนวน 2 ราย และผล 4+ จำนวน 7 ราย (ตารางที่ 1) สำหรับในเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerous region ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG หรือแสดงออกในระดับต่ำ (รูปที่ 1A) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

ผลการทดลอง cell viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์มีชีวิต (% cell viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ , ANOVA test) ในทุกความเข้มข้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ COM (100%) เป็น 75.47 $\pm$ 3.34% ( $p < 0.001$ ), 69.02 $\pm$ 2.27% ( $p < 0.001$ ), 54.00 $\pm$ 0.86% ( $p < 0.001$ ), 53.46 $\pm$ 0.74% ( $p < 0.001$ ) และ 47.31 $\pm$ 1.48% ( $p < 0.001$ ) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 1) แสดงว่า COM มีผลต่อการตายของ HK-2 cells แบบ dose-dependent manner

เมื่อศึกษาผลของ COM ต่อ HK-2 cell viability แบบ time-dependent manner พบว่า ณ เวลา 24, 48 และ 72

**ตารางที่ 1** แสดงข้อมูลเพศ อายุ ปริมาณปัสสาวะ อัตราการกรองไต ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและปริมาณการแสดงออกของ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียมออกซาเลต

|    | Sex    | Age<br>(years) | Urine volume<br>(L) | eGFR<br>(ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) | Urine protein<br>(mg/day) | 8-OHdG<br>Grading |
|----|--------|----------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 1  | Female | 48             | 2.2                 | 73.9                                  | 217.58                    | 1+                |
| 2  | Female | 63             | 1.2                 | 56.7                                  | 646.95                    | 3+                |
| 3  | Male   | 72             | 1.5                 | 69                                    | 802.42                    | 3+                |
| 4  | Male   | 52             | 2.2                 | 72.8                                  | 1212.90                   | 4+                |
| 5  | Female | 53             | 2.2                 | 22.6                                  | 510.11                    | 4+                |
| 6  | Female | 54             | 1.2                 | 36.3                                  | 327.27                    | 4+                |
| 7  | Female | 49             | 1.2                 | 53.2                                  | 756.92                    | 4+                |
| 8  | Female | 63             | 1.0                 | 60.1                                  | 338.46                    | 4+                |
| 9  | Female | 42             | 1.2                 | 50.7                                  | 563.08                    | 4+                |
| 10 | Female | 53             | 1.1                 | 55                                    | 83.75                     | 4+                |



**รูปที่ 1** การแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตชนิดเคลเซียมออกซาลเลต เนื้อเยื่อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerous region ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG หรือแสดงออกในระดับต่ำ (A) มีการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (B-D) โดยให้ผลบวกที่นิวเคลียสของเซลล์บุผิวท่อไต (ภาพ A และ B กำลังขยาย 20x, ภาพ C และ D กำลังขยาย 40x)

ชั่วโมง HK-2 cells ที่ได้รับ COM 1 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร มี % cell viability ลดลงเป็น  $69.77 \pm 2.07\%$  ( $p < 0.001$ ),  $61.51 \pm 4.44\%$  ( $p < 0.001$ ) และ  $53.40 \pm 1.94\%$  ( $p < 0.001$ ) ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ control (100%) และที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่า % cell viability ลดลงเป็น  $61.09 \pm 2.67\%$  ( $p < 0.001$ ),  $50.13 \pm 3.09\%$  ( $p < 0.001$ ) และ  $49.96 \pm 3.38\%$  ( $p < 0.001$ ) ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 3)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต ROS ใน HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ณ เวลา 30 และ 60 นาที พบว่า HK-2 cells เมื่อได้รับผลึก COM ปริมาณมากขึ้น

จะให้ค่า Fluorescence intensity (บ่งชี้การสร้าง ROS) เพิ่มขึ้น แสดงว่า COM มีผลต่อการผลิต ROS ใน HK-2 cells แบบ dose-dependent เมื่อเทียบกับ control (ไม่ได้รับ COM) ค่า AFU ของ COM-treated HK-2 cells ณ เวลา 30 นาที เพิ่มขึ้นจาก  $1.12 \pm 0.02$  เป็น  $1.13 \pm 0.02$ ,  $1.13 \pm 0.02$ ,  $1.14 \pm 0.02$ ,  $1.21 \pm 0.02$  และ  $1.40 \pm 0.06$  AFU ตามลำดับ ความเข้มข้นของ COM และ ณ เวลา 60 นาที เพิ่มขึ้นจาก  $1.31 \pm 0.04$  เป็น  $1.13 \pm 0.03$ ,  $1.33 \pm 0.02$ ,  $1.34 \pm 0.03$ ,  $1.50 \pm 0.03$  และ  $1.81 \pm 0.07$  AFU ตามลำดับ ความเข้มข้นของ COM ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ณ เวลา 30 นาที ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control ( $p < 0.001$ , Bonferoni's test) และ ณ

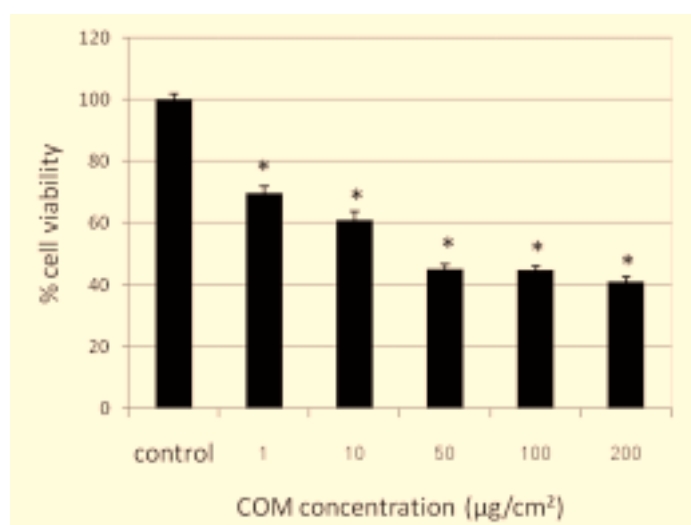
เวลา 60 นาที ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม ต่อตารางเซนติเมตร มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Bonferoni's test) จากผลแสดงให้เห็นว่าการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและเวลาที่ HK-2 cells ได้รับฟลัก COM

## การอภิปรายผล

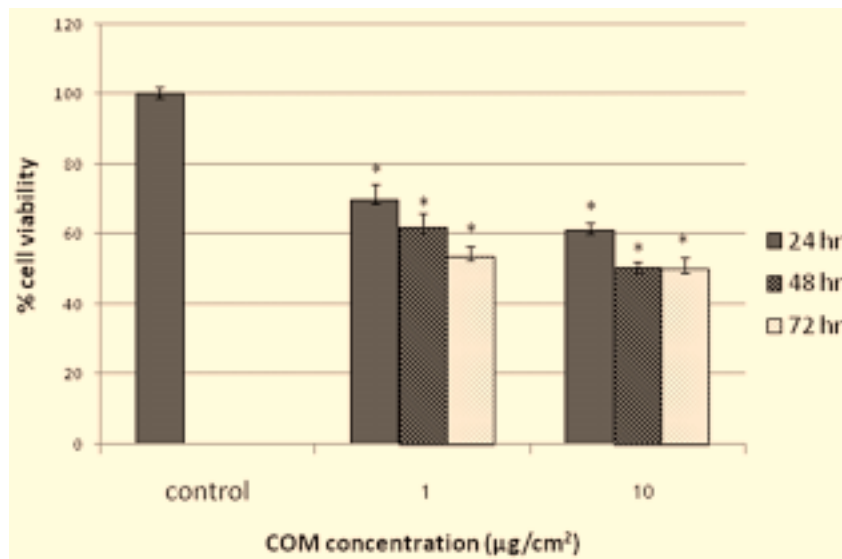
การศึกษานี้พบการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียมออกซาเลตสูง ขึ้นโดยเฉพาะที่บริเวณนิ่วเคลียสของเซลล์เยื่อปิวท่อไตในส่วน proximal tubules, distal tubules และ collecting duct tubules ขณะที่ในเนื้อเยื่อไตควบคุมไม่มีการแสดงออกของ 8-OHdG แสดงว่าเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคไตชนิดไต นอกจากนี้ยังพบเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณเนื้อไต แสดงว่ามีการอักเสบเกิดขึ้นที่บริเวณนั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Seki และคณะในผู้ป่วยโรคไตเนื่องจากการบริโภครูราที่พบการแสดงออกของ 8-OHdG ในนิ่วเคลียสของเซลล์ไตที่มีการอักเสบ[13] และมีการศึกษาปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตพบว่าปริมาณสูงกว่าคนปกติและสัมพันธ์กับระดับการทำลายเซลล์ปิวท่อไต[14] ดังนั้น คณะวิจัยตั้งสมมุติฐานว่าก้อนนิ่วและ/หรือฟลักนี้กระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นใน

เซลล์ปิวท่อไต แล้วส่งผลต่อให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ปิวท่อไต คณะวิจัยจึงทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro* model) ต่อไปว่าฟลักนี้ COM สามารถกระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นในเซลล์ปิวท่อไตได้หรือไม่

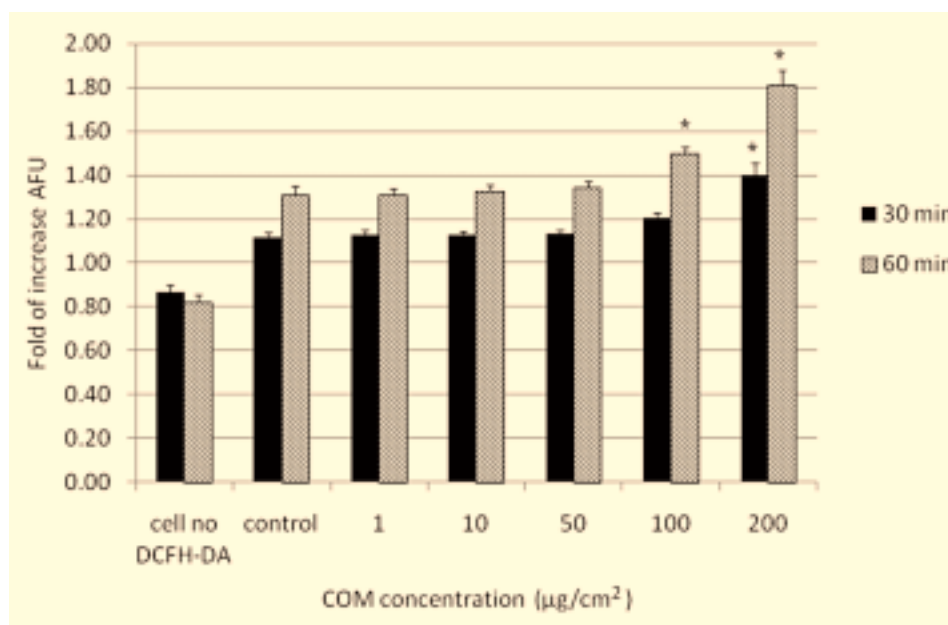
จากผลการทดสอบจำนวน HK-2 cells ที่มีชีวิตหลังจากได้รับฟลัก COM ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละของเซลล์มีชีวิต (% cell viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ COM เมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 2) แสดงว่าฟลัก COM เป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ สอดคล้องกับการวิจัยในเซลล์ LLC-PK1 และ MDCK เมื่อให้โซเดียมออกซาเลตพบว่า % cell viability ลดลงตามความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น[15] และจากผลการทดสอบแบบ time-dependent พบว่าจำนวน HK-2 cells ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มี % cell viability ลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khaskhali และคณะ ที่ให้ HK-2 cells ได้รับ COM ที่ 133 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ตายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น[16] ดังนั้น ผลการ



**รูปที่ 2** Cell viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (dose-dependent experiment) โดยวิธี MTT assay เมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้รับ COM พบว่า % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ \* $p < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 3** Cell viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (time-dependent experiment) โดยวิธี MTT assay เมื่อเทียบกับ control (100%) พบว่า % cell viability ของ COM-treated HK-2 cells ลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ \* $p < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 4** ผลของ COM ต่อการผลิต ROS ใน HK-2 cells ค่า fluorescence intensity (บ่งชี้ถึงปริมาณการสร้าง ROS ภายในเซลล์) เพิ่มขึ้นตามปริมาณ COM และตามเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าการผลิต ROS ใน COM-treated HK-2 cells เป็นทั้งแบบ dose- และ time-dependent manners โดย ณ เวลา 30 นาที ความเข้มข้นของ COM ที่ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เพิ่มปริมาณการผลิต ROS สูงขึ้นจาก control อย่างมีนัยสำคัญ (\* $p < 0.001$ , Bonferoni's test) ขณะที่ ณ เวลา 60 นาที ความเข้มข้นของ COM ที่ 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เพิ่มปริมาณการผลิต ROS สูงขึ้นจาก control อย่างมีนัยสำคัญ (\* $p < 0.05$ , Bonferoni 's test), Cell no DCFH-DA แสดงภาวะควบคุมเมื่อไม่ใส่ fluorescent substrate

ศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งปริมาณความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับผลึก COM มีผลต่อการตายของ HK-2 cells โดยความเป็นพิษและการตายของเซลล์จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของผลึกและเวลาที่ได้รับผลึก

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต ROS ใน HK-2 cells เมื่อได้รับผลึก COM พบว่าที่ความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้นมีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (เวลา 30 นาที) และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (เวลา 30 และ 60 นาที) มีปริมาณการผลิต ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 4) แม้ว่าที่ความเข้มข้น 1, 10, และ 50 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร จะยังไม่พบนัยสำคัญของการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้น แต่ผู้วิจัยเชื่อว่าถ้าเพิ่มเวลามากขึ้น จะสามารถเห็นนัยสำคัญทางสถิติได้ จากการศึกษาของ Yao และ Zhong ใน human hepatoma HepG2 cells โดยการให้สาร Perfluorooctanoic acid (PFOA) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งระดับ พบว่า HepG2 cells มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PFOA (0-400  $\mu\text{M}$ )[17] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ คณะวิจัยจึงสรุปว่า

ผลึก COM สามารถกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้นสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นได้ ซึ่งผลของ COM ต่อ intracellular ROS production นี้เป็นทั้งแบบ dose- และ time-dependent

## สรุปผลการศึกษา

เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตชนิดแคลเซียมออกซาเลตมีการแสดงออกของ 8-OHdG ในสูงขึ้น แสดงว่าเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคไต และผลึก COM เป็นพิษต่อเซลล์บุผิวท่อไต โดยกระตุ้นการสร้าง ROS และทำให้เซลล์ตายมากขึ้น และความเป็นพิษแปรผันตามความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับผลึก ข้อมูลวิจัยนี้แนะนำว่าผลึก COM ที่เกิดขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคไตสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ ดังนั้นแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคไตนอกจากการนำน้ำออกแล้ว ควรให้สารต้านอนุมูลอิสระหรือวิธีการใดๆ เพื่อลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในไตของผู้ป่วย ซึ่งอาจจะสามารถลดโอกาสการเกิดนิ่วซ้ำในอนาคตได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. **Journal of Clinical Investigation** 2005; 115(10): 2598-608.
2. Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. **Urological Research** 1995; 23(2): 71-9.
3. Kohjimoto Y, Ebisuno S, Tamura M, Ohkawa T. Adhesion and endocytosis of calcium oxalate crystals on renal tubular cells. **Scanning Microscopy** 1996; 10(2): 459-70.
4. Schubert G. Stone analysis. **Urological Research** 2006; 34(2): 146-50.
5. McMartin KE, Wallace KB. Calcium oxalate monohydrate, a metabolite of ethylene glycol, is toxic for rat renal mitochondrial function. **Toxicological Sciences** 2005; 84(1): 195-200.
6. Hackett RL, Shevock PN, Khan SR. Madin-Darby canine kidney cells are injured by exposure to oxalate and to calcium oxalate crystals. **Urological Research** 1994; 22(4): 197-204.
7. Lahme S, Feil G, Strohmaier WL, Bichler KH, Stenzl A. Renal tubular alteration by crystalluria in stone disease - An experimental study by means of MDCK cells. **Urologia Internationalis** 2004; 72(3): 244-51.
8. Schepers MSJ, Van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. **Kidney International** 2005; 68(4): 1543-53.
9. Rashed T, Menon M, Thamilselvan S. Molecular mechanism of oxalate-induced free radical production and glutathione redox imbalance in renal epithelial cells: Effect of antioxidants. **American Journal of Nephrology** 2004; 24(5): 557-68.
10. Habibzadegah-Tari P, Byer KG, Khan SR. Reactive oxygen species mediated calcium oxalate crystal-induced expression of MCP-1 in HK-2 cells. **Urological Research** 2006; 34(1): 26-36.

11. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews** 2009; 27(2): 120-39.
12. Pilger A, Rdiger HW. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. **International Archives of Occupational and Environmental Health** 2006; 80(1): 1-15.
13. Seki S, Kitada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. Pathological significance of oxidative cellular damage in human alcoholic liver disease. **Histopathology** 2003; 42(4): 365-71.
14. Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. **Urological Research** 2007; 35(4): 185-91.
15. Knoll T, Steidler A, Trojan L, Sagi S, Schaaf A, Yard B, et al. The influence of oxalate on renal epithelial and interstitial cells. **Urological Research** 2004; 32(4): 304-9.
16. Verkoelen CF, Schepers MSJ, Van Ballegooijen ES, Bangma CH. Effects of luminal oxalate or calcium oxalate on renal tubular cells in culture. **Urological Research** 2005; 33(5): 321-8.
17. Yao X, Zhong L. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 2005; 587(1-2): 38-44.