

ประสิทธิภาพของน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบเทียบกับ
น้ำยาฟอกช่องท้องกลูโคสและน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ



นางสาวพรทิพย์สุวรรณค์ นวลทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

551657

EFFICACY OF TAPIOCA DERIVATIVE-BASED PERITONEAL DIALYSIS SOLUTION
COMPARED WITH GLUCOSE-BASED AND CORN DERIVATIVE-BASED SOLUTIONS

Miss Phonethipsavanh Nouanthong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctoral of Philosophy Program in Biomedical Sciences

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University



5 1 8 7 7 9 4 5 2 0

Thesis Title EFFICACY OF TAPIOCA DERIVATIVE-BASED PERITONEAL
DIALYSIS SOLUTION COMPARED WITH GLUCOSE-BASED AND
CORN DERIVATIVE-BASED SOLUTIONS

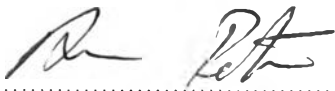
By Miss Phonethipsavanh Nouanthong

Field of Study Biomedical Science

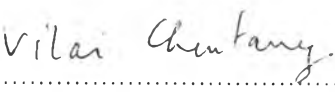
Thesis Advisor Associate Professor Talerngsak Kanjanabuch, M.D

Thesis Co-advisors Assistant Professor Angkana Tantituvanont, Ph.D.
 Kuakoon Piyachomkwan, Ph.D.

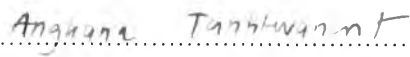
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Doctoral Degree

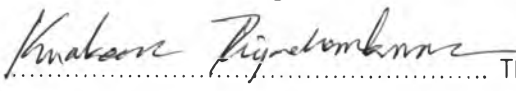

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

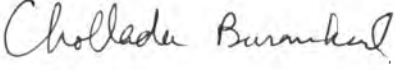
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Professor Vilai Chentanez, M.D.)



..... Thesis advisor
(Associate Professor Talerngsak Kanjanabuch, M.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Angkana Tantituvanont, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Kuakoon Piyachomkwan, Ph.D.)


..... Examiner
(Professor Chollada Buranakarl, Ph.D.)


..... Examiner
(Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.)


..... External Examiner
(Colonel Ouppatham Supasyndh, M.D.)

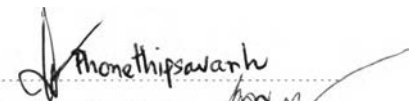
พรทิพย์สุวรรณ นวลทอง : ประสิทธิภาพของน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งมัน
 สำปะหลังเป็นส่วนประกอบเทียบกับน้ำยาฟอกช่องท้องกลูโคสและน้ำยาฟอกช่องท้องที่มี
 อนุพันธ์ของแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ(EFFICACY OF TAPIOCA DERIVATIVE-
 BASED PERITONEAL DIALYSIS SOLUTION COMPARED WITH GLUCOSE-
 BASED AND CORN DERIVATIVE-BASED SOLUTIONS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
 รศ.นพ. เกลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ญญ.ดร.อังคณา ดันติสุ
 วานนท์; ดร.เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 128 หน้า.

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของน้ำยาฟอกช่องท้องชนิดใหม่ที่มีอนุพันธ์ของแป้งมันสำปะหลังเป็น
 ส่วนประกอบเทียบกับน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งข้าวโพดและน้ำยาฟอกช่องท้องกลูโคสเป็นส่วนประกอบในเซลล์
 เพาะเลี้ยง ในสัตว์ทดลอง และในหลอดทดลอง โดยทำการศึกษาความเป็นพิษของน้ำยาฟอกช่องท้องต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด
 ต่างๆ ได้แก่ เซลล์เยื่อผนังช่องท้องมีโซเลียล ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เม็ดเลือดขาว ด้วยการศึกษาปริมาณการปลดปล่อย
 เอนไซม์เเลคเตอซอออกมาภายนอกเซลล์ และด้วยการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการเอพอโทซิสด้วยเครื่องโฟลไซโตมิ
 เดอร์หลังย้อมเซลล์ด้วยสีแอนเนคซิน V/โพรปีเดียม ไอโอดาย นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความมีชีวิตและอัตราการแบ่งเซลล์ด้วยวิธี
 เอ็มทีที ทำการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) ฉีดน้ำยาใหม่ความเข้มข้นร้อยละ
 20 เข้าทางช่องท้อง (2) ฉีดน้ำยาใหม่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เข้าทางเส้นเลือด (3) กลุ่มควบคุมโดยการฉีดน้ำเกลือความเข้มข้นร้อย
 ละ 0.9 หลังการฉีด 14 วัน ตรวจชันสูตรซากหนูทั้งหมดและตรวจทางพยาธิวิทยา ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาในหลอด
 ทดลอง ทำโดยการบรรจุน้ำยาฟอกช่องท้องชนิดต่างๆ ในถุงเซลโลเฟนที่มีขนาดของรูกรอง 10 ไมครอนตัน ในภาชนะบรรจุที่เป็นน้ำ
 และพลาสติก วัดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของโมเลกุลอนุพันธ์แป้งทั้งข้างในและข้างนอกถุงด้วยวิธี เอช
 พีแอลซี ร่วมกับใช้สมการทางคณิตศาสตร์และแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงความสามารถในของการเคลื่อนที่ของสารน้ำ
 ผ่านเมมเบรน พบว่าน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ดึงน้ำได้
 มากกว่าในอัตราที่ช้ากว่าในช่วงต้นเมื่อเทียบกับน้ำยาฟอกช่องท้องกลูโคสเป็นส่วนประกอบ แต่สามารถดึงน้ำได้สูงกว่าเล็กน้อย
 ด้วยอัตราที่เท่ากันเมื่อเทียบน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ นอกเหนือคุณสมบัติความเป็น colloid
 ของแป้งที่กำหนดปริมาณการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำ ยังพบว่าอนุพันธ์ของแป้งที่เกิดจากการย่อยสลายทางกายภาพ ซึ่งเป็น
 น้ำตาลเชิงซ้อนขนาดเล็กยังมีส่วนอย่างมากต่อปริมาณการดึงน้ำสุทธิ ซึ่งสอดคล้องกับผลการจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าเซลล์
 เยื่อผนังช่องท้องมีโซเลียลบาดเจ็บจากน้ำยาฟอกช่องได้เร็วกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เม็ดเลือดขาว หลังการทดสอบ
 ด้วยน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีอนุพันธ์ของแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบ พบว่าเซลล์ยังคงสภาพได้ดีเช่นเดิม รูปร่างไม่
 เปลี่ยนแปลง และมีอัตราส่วนของเซลล์ที่ตายน้อยกว่าการทดสอบด้วยน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ ถึงแม้ว่าได้
 ทำการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำยาเป็นร้อยละ 15 อีกทั้งไม่พบว่ามีสัตว์ทดลองในกลุ่มใดสูญเสียน้ำหนัก ตาย มีความผิดปกติทาง
 คลินิก ความผิดปกติในผลการชันสูตรซากและการตรวจทางพยาธิวิทยาแตกต่างจากกลุ่มอื่น โดยสรุปน้ำยาฟอกไตที่มีอนุพันธ์
 แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบมีประสิทธิภาพในการดึงน้ำและคงสภาพเซลล์ได้เทียบเท่ากับน้ำยาที่มีอนุพันธ์แป้งข้าวโพด แต่
 ดีกว่าน้ำยาฟอกไตที่มิกกลูโคสเป็นส่วนประกอบ น่าจะเป็นไปในการนำอนุพันธ์แป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นส่วนประกอบของ
 น้ำยาฟอกไตเพื่อช่วยในการรักษาผู้ป่วยโรคไตต่อไป

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

ปีการศึกษา 2555

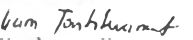
ลายมือชื่อนิสิต

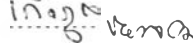


ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม





5187794520: MAJOR BIOMEDICAL SCIENCE

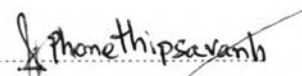
KEYWORDS: PERITONEAL DIALYSIS / GLUCOSE BASED PERITONEAL DIALYSIS / CORN
DERIVATIVE-BASED PERITONEAL DIALYSIS / EFFICACY

PHONETHIPSAVANH NOUANATHONG: EFFICACY OF TAPIOCA DERIVATIVE-BASED
PERITONEAL DIALYSIS SOLUTION COMPARED WITH GLUCOSE-BASED AND CORN-
DERIVATIVE-BASED SOLUTIONS. ADVISOR: ASSOC. PROF. TALERNGSAK
KANJANABUCH, M.D. CO-ADVISORS: ASSIST. PROF. ANGKANA TANTITUVANONT,
Ph.D., KUAKOON PIYACHOMKWAN, Ph.D., 128 pp.

To investigate the safety and effectiveness of the new product tapioca derivative-based peritoneal dialysis fluid (PDF) compared to corn derivative-based PDF and standard glucose-based PDF, *in-vitro* and *in-vivo* toxicity as well as *ex-vivo* fluid shift were studied. The *in-vivo* cytotoxicity using LDH assay, cell proliferation, and cell death were assessed in different cell cultures, including primary human mesothelial peritoneal cells (HMPCs), fibroblast cell line, and peripheral mononuclear cells. After the cells exposure to various PDFs, the apoptotic and necrotic fibroblast and PBMC were labeled with Annexin V/propidium iodide and counted by FACS Calibur Flow Cytometer. Viability and proliferation of fibroblast and PBMC were assessed by MTT assay. Bal/C mice were subjected to daily injection with 1) intra-peritoneal (IP) route of 20% tapioca-based PDF 2) intravenously (IV) route of 15%TPDF at dosage of 5 and 10 mL/kg 3) IP and IV routes of 0.9% normal saline served as controls. After 14-day injections, mice were sacrificed for gross pathology and histology examinations. The *ex-vivo* effectiveness study was experimented by filling various PDFs into 10 kDa cut-off cellophane bags placed in water & plasma containers. Mass changes of the bags were measured and calculated. The HPLC was also performed to detect the starch derivatives inside and outside the bag. The mathematic formulation and computer-simulation were proposed to imitate the fluid flux across the membrane. 7.5% tapioca-based pull larger amount of fluid but slower rate of flux compared to the glucose-based PDF; however, it dragged slightly higher amount but equivocal rate compared to the corn-based PDF. Besides colloid osmotic pressure, the diffusion of small molecule also affected the fluid shift. A mathematical model also confirmed this phenomenon. HMPC were more venerable to injure with PDF compared to fibroblast and mononuclear cells. Treatments with tapioca- and corned-based PDFs yielded better cell preservation in terms of morphology, proliferation, and cell death, although the higher dosage of tapioca-based PDF (15%) were used, compared to glucose-based PDF. No significant clinical parameters, weight reduction, and animal lost were detected. Moreover, the gross pathology and histology yielded no significant abnormalities compared to control group. In conclusion, tapioca-based and corned-based PDF have similar fluid recruitment and cellular preservation effects but are superior to conventional glucose PDF in terms of safety and efficacy. Usage of tapioca-based solution seems to be possible in the clinical practice as a polyglucose PDF.

Field of Study: Biomedical Science.....

Student's Signature

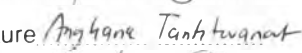


Academic Year: 2012.....

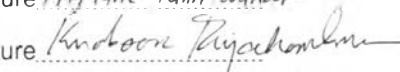
Advisor's Signature



Co-advisor's Signature



Co-advisor's Signature



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank the most significant person in this endeavor, my advisor, Assoc. Prof. Talergsak Kanjanabuch, M.D., for his guidance in both scientific and non-scientific areas, for his insight, patience and encouragement throughout my study. I acknowledge the staff, both past and present, at KUB-MED Research Unit, Chulalongkorn University, for providing a wealth of technical assistance and social support. The accomplishment of this thesis would not have been possible without their support. Also, I thank Assoc. Prof. Voranuch Thanakit, M.D., Mr. Preecha Ruangvesvorachai and Ms. Jutamas Wongphoom at the Faculty of Medicine for pathology examination assistance.

I thank my thesis co-advisors: Dr. Kuakoon Piyachomkwan for her HPLC technical advice and all comments over the years; and Assist. Prof. Dr. Angkana Tantituvanont for her significant comments on this study. Thanks to Ms. Rungtiva Wansuksri and Juthamas Sinthusock for HPLC analysis and technical assistance.

Thanks to my friends at the HIV-NAT Research Laboratory for helping me in so many ways to keep my study work and life in balance. Thanks to Sumontida Sayachak, my roommate, and to her family for taking care of me during my student life. Thanks to my special friends Mr. Jessada Nittayajarn, Gayle J Hall and David O'Connor for spiritual encouragement and support.

I am indebted to my parents, who understand and believe in me whatever I do and have tried. To them I say that I am so much lucky to be your daughter; and many thanks to my brother and sisters for always giving me love, support and encouragement.

This study was supported by the Graduate Scholarship for Students from Neighboring Countries. This was a partial finance, supported by the Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
Background and Rationale	1
Statement of the Problem.....	8
Hypothesis Mechanism	9
Research Methodology	9
Research Questions.....	10
Objectives.....	10
Hypotheses.....	10
Key words.....	10
Expected Benefit.....	10
Conceptual Frameworks.....	11
CHAPTER II REVIEW OF RELATED LITERATURE.....	15
Chronic Renal Disease.....	15
Renal Replacement Therapy (RRT).....	15
Peritoneal Membrane physiology.....	17
Peritoneum characteristics and peritoneal dialysis.....	22
Overview of peritoneal dialysis fluids (PDFs).....	24
Conventional glucose-based peritoneal dialysis fluid (GPDF).....	25
Corn derivative-based PDF (CPDF).....	27
Tapioca derivative based-peritoneal dialysis fluid (TPDF)	31

	PAGE
CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS.....	32
TPDF composition and its degradation products.....	32
Safety testing.....	33
Animal Toxicity Testing	40
Effectiveness of this TPDF-induced water transportation	41
Statistical analysis	47
CHAPTER IV: RESULTS.....	48
Reviewed tapioca derivative properties.....	48
Tapioca derivative-based peritoneal dialysis fluid (TPDF) preparation.....	51
Cytotoxicity and toxicity testing.....	55
Toxicity testing in animal.....	66
Effectiveness of TPDF and its mechanism.....	79
CHAPTER V: DISCUSSION.....	84
REFERENCES.....	90
APPENDIX.....	113
BIBLIOGRAPHY.....	128

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.1	Effect of GDPs and AGEs.....	3
1.2	Composition of glucose and glucose polymer based PDFs.....	5
1.3	Comparison of effects of GPDF and CPDF.....	6
2.1	Classification of CKD and the clinical guideline evaluation.....	16
2.2	Effect of PDFs on peritoneal membrane function.....	29
4.1A	Structural properties of glucose.....	49
4.1B	The molecular weight property of tapioca derivative compared to cornstarch derivatives.....	50
4.1C	Compositions of peritoneal dialysis fluids.....	51
4.1D	Levels of Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), 3-deoxyglucoson (3-DG) in glucose and glucose polymers based PDFs.....	54
4.2.1A	Evaluation of HPMC morphology changes.....	56
4.3.1A	Acute Intravenous Toxicity Test in Mice.....	66
4.3.1B	Mean of body weight and its %change (I.V).....	67
4.3.1C	Organ weight per body weight monitoring (I.V).....	68
4.3.2A	Acute Intraperitoneal Toxicity Test in Mice.....	69
4.3.2B	Mean of body weight and its %change (I.P).....	70
4.3.2C	Organ weight per body weight monitoring (I.P).....	71
4.3.2D	Pathology finding (Acute I.V & I.P Toxicity Test in Mice).....	73
4.3.3E	Summary of abnormality findings in pathology examination.....	74

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	Mechanism of peritoneal gluco-toxicity.....	2
1.2	Potential role of biocompatibility in clinical outcomes.....	4
1.3	The MW distribution of corn-derived PDF.....	7
1.4	The MW distribution in human and in rat.....	7
2.1	Overview of CAPD intervention.....	17
2.2	The peritoneal cavity anatomy.....	18
2.3	Pathways for solute and water transport	20
2.4	Interpretation of peritoneum equilibrium test	23
2.5	Transport status and mortality in peritoneal dialysis patients.....	23
2.6	Molecular chemical structures of glucose and glucose polymer	27
2.7	Compare net ultrafiltration between CPDF andGPDF.....	28
3.1	PDFs induce water osmosis in water and in plasma containers	42
3.2	Two mechanisms of heterogamous glucose polymer as osmotic agent to induce water osmosis.....	43
3.3	Effects of desalted CPDF small molecules on water os.mosis....	44
3.4	Effect of colloid and crystalloid molecules on water osmosis.....	45
4.1A	Chromatographic analysis on molecular weight distribution.....	49
4.1B	Effect of sterilization step on osmolarity changes.....	52
4.1C	Effect of sterilization process on pH of TPDF changes.....	53
4.2.1	HPMC cultures.....	55
4.2.1A	PDFs induced mesothelial cell morphological changes.....	56
4.2.1B	Effect of peritoneal dialysis fluids on lactate dehydrogenase (LDH) released by human peritoneal mesothelial cells.....	57
4.2.1C	Effect of PDFs on mesothelial cells death by TUNEL/PI Assay...	58
4.2.1D	Effect of PDFs on lactate dehydrogenase (LDH) released by 3T3 fibroblast cell line.....	59

FIGURE		PAGE
4.2.1E	Effect of PDFs with and without adjusted pH on 3T3 cell viability by MTT assay.....	60
4.2.1F	Effects of tapioca derivative on 3T3 cell viability by MTT assay..	61
4.2.1G	Effects of PDFs on 3T3 cells proliferation by MTT Assay.....	62
4.2.1H	Percentage of PBMC death by FITC-Annexin V/PI staining/ flow cytometry.....	63
4.2.1I	Percentage of PBMC viability by FITC-Annexin V/PI staining flow cytometry.....	64
4.2.1J	Effect of PDFs on PBMC proliferation.....	65
4.3.1A	Body weight monitoring by group/sex among acute intravenous toxicity (Limit) 14-days testing in mice.....	67
4.3.1B	Organs weight per body weight (Toxicity in Mice, I.V.).....	68
4.3.2A	Body weight monitoring by group/sex among acute intraperitoneal toxicity (Limit) 14-days in mice	70
4.3.2B	Organs weight per body weight (Toxicity in Mice, I.P.).....	72
4.3.2C	Light micrograph of heart sections with H&E and PAS staining..	75
4.3.2D	Light micrograph of liver sections with H&E and PAS staining...	76
4.3.2E	Light micrograph of kidney sections with H&E and PAS staining	77
4.3.2F	Light micrograph of spleen sections with H&E and PAS staining	78
4.4.1A	Water osmosis in water and plasma studies.....	79
4.4.1B	Water osmosis by mass changes between experiments compared to computer simulation.....	79
4.4.2A	Effects of polyglucose molecules induced water osmosis.....	80
4.4.2B	The HPLC chromatogram of diffused CPDF into outside bag...	81
4.4.2C	Experiment compared to simulated theory.....	82
4.4.2D	Computer simulation without small MW<1.08 kDa compared to experiment study in water.....	82
4.4.2E	Effect of each fraction on %water reduction.....	83

LIST OF ABBREVIATIONS

AGE	Advanced glycation end-products
ANOVA	Analysis was performed with a two-way analysis of variance
APD	Automated peritoneal dialysis
BUN	Blood urea nitrogen
CAPD	Continuous ambulatory peritoneal dialysis
CCPD	Continuous cyclic peritoneal dialysis
CPDF	Corn derivative-based peritoneal dialysis fluid
CKD	Chronic kidney disease
Da, kDa	Daltons, kilo Daltons
D/P	Dialysate to plasma concentration ratio
ESRD	End-stage renal disease
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
GDP	Glucose degradation product
GFR	Glomerular filtration rate
GPDF	Glucose-based peritoneal dialysis fluid
HD	Hemodialysis
HMW	High molecular weight
HPMC	Human peritoneal mesothelial cells
IP	Intra-peritoneal
IV	Intravenous
KT	Kidney transplantation
LMW	Low molecular weight
LDH	Lactate dehydrogenous
Mn	Number average molecular weight
Mw	Weight average molecular weight
NRRF	Non-residual renal function
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells

Mw	Weight average molecular weight
NRRF	Non-residual renal function
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer solution
PD	Peritoneal dialysis
PDF	Peritoneal dialysis fluid
PET	Peritoneal equilibration test
RRF	Residual renal function
RT	Room temperature
RRT	Renal replacement therapies
TPDF	Tapioca derivative based peritoneal dialysis fluid
UF	Ultrafiltration
UFF	Ultrafiltration failure
VEGF	Vascular endothelial growth factor