การใช้ยาไทอะโซลิดินไดโอนเพื่อชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไต
ทางช่องท้องอย่างถาวร

นางสาวสิริกุล กาญจนบุษย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF THIAZOLIDINEDIONES ON PERITONEAL MEMBRANE SURVIVAL IN CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS

Miss Sirigul Kanchanabuch

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ยาไทอะโซลิดินไดโอนเพื่อชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร
โดย	นางสาว สิริกุล กาญจนบุษย์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิริกุล กาญจนบุษย์ : การใช้ยาไทอะโซลิดินไดโอนเพื่อชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร (THE EFFECTS OF THIAZOLIDINEDIONES ON PERITONEAL MEMBRANE SURVIVAL IN CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 116 หน้า.

วัตถุประสงค์ เนื่องจากในผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวรมาเป็นระยะเวลานานนั้น พบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้อง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงผลของยา pioglitazone ในการชะลอการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นกับเยื่อบุผนังช่องท้องในผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวรมาเป็นระยะเวลานาน โดยทำการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา การศึกษาในสัตว์ทดลองนั้นได้แบ่งหนูออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องร่วมกับยา pioglitazone โดยทำการศึกษาเป็นเวลา 16 สัปดาห์ แล้วทำการประเมินทางสัณฐานของเยื่อบุผนังช่องท้องและนับจำนวนหลอดเลือดที่พบ ส่วนการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นได้ทำการเพาะเลี้ยง mesothelial cells และ adipocytes แล้วแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงออกเป็นสามกลุ่มแล้ว incubate กับสารดังที่กล่าวข้างต้น แล้วทำการศึกษาการบาดเจ็บและการตายของเซลล์

ผลการศึกษา จากการประเมินทางสัณฐานของเยื่อบุผนังช่องท้องนั้นพบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นมีจำนวนหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น พบการหนาตัวของชั้น submesothelium พบการเกิด EMT และการหลุดลอกของ mesothelial cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าทั้ง mesothelial cells และ adipocytes ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และลักษณะดังที่กล่าวมานั้นทั้งในพบน้อยลงเมื่อได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone

สรุปผลการศึกษา ยา pioglitazone นั้นสามารถป้องกันการบาดเจ็บและการตายของทั้ง mesothelial cells และ adipocytes และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้องที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ....

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..............................

ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..............................

4974813030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : MESOTHELIAL CELLS / CA125 / PERITONEAL SURVIVAL / PPAR-γ / THIAZOLIDINEDIONES

SIRIGUL KANCHANABUCH : THE EFFECTS OF THIAZOLIDINEDIONES ON PERITONEAL MEMBRANE SURVIVAL IN CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TELERNGSAK KANJANABUCH, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., 116 pp.

Objective: Peritoneal injury and neovascularization were results from continuous exposure of peritoneum to peritoneal dialysis fluid (PDF). We aimed to investigate the protective roles of pioglitazone (PGZ), PPAR-γ agonist on peritoneal injury and angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.

Methods: Sprague-Dawley rats were subjected to twice-daily injections with 3.86G%PDF ± 0.1 μM PGZ. After 16-wk injection, morphologies of peritoneum and vascular number were determined. In cell culture, the mesothelial cell and adipocyte injury, epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) and apoptosis were assessed after overnight incubation of human peritoneal mesothelial cells (HPMC) and adipocytes with 1.36G%PDF ± PGZ.

Results: Vascular number, submesothelial thickness, and EMT in visceral and parietal peritoneum increased significantly while mesothelial cells disappeared in rats exposed to PDF. All the above abnormalities were markedly attenuated when co-injected with PGZ. HPMC and adipocytes cultured with PDF showed morphological changes including apoptosis.

Conclusion: PGZ showed the protective roles agonist PDF-induced HPMC and adipocytes injury and peritoneal morphologic changes via PPAR-γ response

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : Medical Science	Student's Signature ....
Academic Year : 2009	Advisor's Signature ....
	Co-Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะเริ่มต้นและสำเร็จไม่ได้ ถ้าปราศจากความช่วยเหลือ แนะนำ สั่งสอน จาก ผศ.นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ และ ผศ.นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

ขอขอบพระคุณนายปรีชา เรืองเวชวรชัย นางสาววรรณี วัฒนเสริมกิจ และนางสร้อยสุดา แสงปราการ ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้และเทคนิคทางด้านพยาธิวิทยา และนางสาวจุฑามาศ วงศ์ภูมิ ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ นายโสภณ สุวรรณโสภณ ผู้ให้ความรู้ด้านเทคนิคการถ่ายภาพ ที่สามารถนำมาใช้ในการทำวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณนายพงศ์ศักดิ์ พันธุ์สิน และนางอาภา วรรธนวหะ ที่อำนวยความสะดวก และช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณนางสาวการดา บุตรหง้า และนางสาวกรรณิการ์ ศรีสุข เจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ นายวศิน มนูประเสริฐ นางสาวพรสุรี พงษ์สุชาติ นางภัทรนฤน กาญจนบุษย์ นายเมธี ศรีประพันธ์ นางมารศรี พันธ์ไพศาล นางสาวรัชยา สวัสดี นางสาวนัฏนรี คำเกษ นางสาวพรทิพย์สวรรค์ นวลทอง นางสาวมัตติกา เกรียวกระโทก และนางสาววิไลพร อำพรรณ เพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือเสมอ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว “กาญจนบุษย์” ที่เลี้ยงดู ให้โอกาส สนับสนุน และ เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2. สมมติฐานของการวิจัย	4
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.4. คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย	4
1.5. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	6
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1. Peritoneum anatomy	7
2.2. Ultrastructure of peritoneum	8
2.3. Peritoneal physiology	15
2.4. Peritoneal anatomical changes during peritoneal dialysis	16
2.5. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-γ)	28
2.6. โครงสร้างและเภสัชจนศาสตร์ของยาในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs)	31
3. วิธีการวิจัย	34
3.1. รูปแบบการวิจัย	34
3.2. วิธีการวิจัย	34
3.3. การสังเกตและการวัด	36
3.4. การเก็บรวบรวมข้อมูล	39
3.5. การวิเคราะห์ข้อมูล	39

บทที่ **หน้า**

4. ผลการวิจัย.. 40
4.1. ผลการศึกษาการยืนยันชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง.. 40
4.2. ผลการศึกษา cell death และ cytotoxicity……..…………………………………. 41
4.3. ผลการศึกษาทางสัณฐานของเนื้อเยื่อ.. 46
4.4. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้อง…………………………………………………………………………... 56
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.. 61
5.1. อภิปรายผลการวิจัย... 61
5.2. สรุปผลการวิจัย.. 64
5.3. ข้อเสนอแนะ... 64
รายการอ้างอิง.. 65
ภาคผนวก…………………….……………………………………………………………….. 74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 116

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงปริมาณเซลล์ตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ…..…………………………..……..…….. 23
2. แสดงผลของยาในกลุ่ม thiazolidinediones ต่อเซลล์ต่าง ๆ ของไต............................. 31
3. แสดงอุบัติการณ์การเกิดภาวะแทรกซ้อนของยา thiazolidinediones ……….………...…. 33
4. แสดง condition ที่ใช้ในการทำ RT-PCR……………………..…………………………. 113
5. แสดง condition ที่ใช้ในการทำ real-time PCR…………….………………………….... 114
6. แสดง primer และ probe ที่ใช้ในงานวิจัย……..……………………..…………………. 115

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดง anterior view of internal abdominal organ (visceral peritoneum) และ posterior view of abdominal wall (posterior parietal peritoneum)……..………..	8
2. แสดงเยื่อบุช่องท้องด้านตัดขวาง ทั้ง parietal peritoneum และ visceral peritoneum.	8
3. แสดงลักษณะของ normal peritoneum………………………………..……..………	9
4. แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell ……….……………..………………	11
5. แสดง subdiaphragmatic ของท่อน้ำเหลือง………………………………………....	14
6. แสดงหลักการของ peritoneal dialysis ……………………...………..……………....	15
7. แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของเยื่อบุผนังช่องท้อง…………….………………………..	17
8. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในรายที่เป็น uremia ………….……….….	18
9. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในผู้ป่วย CAPD ………..……..……………...	18
10. แสดงเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 40 วัน………………..……………………….…………	19
11. แสดงให้เห็นถึงการหลุดลอกของ mesothelial cells ออกมาในช่องท้อง……………….	19
12. แสดง mesothelial cells ที่ตรวจพบในน้ำยาล้างไต……..……………………………....	20
13. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ……………….…………………….	20
14. แสดง mesothelial cells ในเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 25 วัน……....…………………..	20
15. แสดงลักษณะเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 14 เดือน..	20
16. แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ...	22
17. แสดงปริมาณ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ……..….	22
18. แสดงการเกิดกลไกพังผืดในรายที่ทำการล้างไตทางช่องท้อง…………….…………..…	23
19. แสดงกระบวนการอักเสบและ inflammatory response ต่อการติดเชื้อก่อโรค…..…….	26
20. แสดงระดับ VEGF จากน้ำที่ถ่ายจากผู้ป่วย CAPD ที่มีลักษณะ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ……………..…………………………………………………………………	27
21. แสดงระดับ VEGF ในซีรั่มของผู้ป่วย………….……………………………………..	28
22. แสดงโครงสร้างเปปไทด์ของทั้ง 3 isoforms ของ PPARs……………………………...	29
23. แสดงกลไกการควบคุมยีนของ PPAR โดยผ่านกระบวนการ transactivation และ transrepression …………..……………..…………..……………………………..	30
24. แสดงขั้นตอนในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์……………………………………………..	35
25. แสดงขั้นตอนในการศึกษาในสัตว์ทดลอง..	36

รูปที่ **หน้า**

26. ลักษณะของ mesothelial cells ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนสมบูรณ์ 40
27. ลักษณะของ 3T3-L1 pre-adipocytes ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนสมบูรณ์.......................... 40
28. ลักษณะของ mesothelial cells ที่ incubate กับสารละลายในกลุ่มทดลองต่าง ๆ....... 42
29. ลักษณะของ mature adipocytes ที่ incubate กับสารละลายในกลุ่มทดลองต่าง ๆ... 43
30. ลักษณะของ apoptotic cells ของ adipocytes ที่ incubate กับ 1.36% G commercial PDF.. 43
31. แสดงร้อยละของ mesothelial cells ที่ตายแบบ apoptosis ในแต่ละกลุ่มการทดลอง... 44
32. แสดงร้อยละของ adipocytes ที่ตาย ในแต่ละกลุ่มการทดลอง.................................. 44
33. แสดงร้อยละของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH ของ mesothelial cells ในแต่ละกลุ่มการทดลอง.. 45
34. แสดงร้อยละของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH ของ adipocytes ในแต่ละกลุ่มการทดลอง... 46
35. ลักษณะของ mesothelial monolayer ด้วยเทคนิค liver imprint............................. 47
36. แสดงความหนาแน่นของ mesothelial cells ซึ่งประเมินจากวิธี liver imprint ในหนูแต่ละกลุ่มการทดลอง... 48
37. แสดงการเกิด epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) ของ mesothelial cells ที่พบใน omentum ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลอง.......... 49
38. แสดงร้อยละของ mesothelial cells ที่เกิด EMT คือมีการลดการแสดงออกของ cytokeratin และมีการเพิ่มการแสดงออกของ α-SMA บน omentum ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม.. 50
39. แสดง submesothelial thickness ของ visceral peritoneum (bowel) และ parietal peritoneum (diaphragm และ abdominal wall) จากการย้อมด้วยสี Masson's trichrome.. 51
40. แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จากชิ้นเนื้อส่วนต่าง ๆ ของช่องท้อง visceral peritoneum, diaphragmatic parietal peritoneum และ abdominal parietal peritoneum ในแต่ละกลุ่มของสัตว์ทดลอง.. 52
41. แสดงลักษณะและจำนวนของหลอดเลือดที่พบบนเยื่อบุผนังช่องท้องในแต่ละกลุ่ม...... 55
42. แสดงจำนวนของหลอดเลือด และจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD 34 ต่อหนึ่งพื้นที่ ของชิ้นเนื้อในส่วน visceral peritoneum ในแต่ละกลุ่มของสัตว์ทดลอง.............. 55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ **หน้า**

43. แสดงปริมาณการแสดงออกของ VEGF protein ใน rat dialysate และ VEGF mRNA ใน mesothelial cells ของแต่ละกลุ่มการทดลอง... 57
44. แสดงปริมาณการแสดงออกของ VEGF บนเยื่อบุผนังช่องท้องของแต่ละกลุ่มการทดลอง... 58
45. แสดงปริมาณการแสดงออกของ TGF-β protein ใน rat dialysate และ TGF-β mRNA ใน mesothelial cells ของแต่ละกลุ่มการทดลอง.. 59
46. แสดงการเลาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อ.. 80
47. แสดงการ incubate ชิ้นเนื้อใน shaker waterbath... 81
48. แสดงการปั่นชิ้นเนื้อ... 81
49. แสดงการคีบชิ้นเนื้อออกจาก centrifuge tube... 81
50. แสดงการเทส่วนบนทิ้ง.. 82
51. แสดงการดูดเซลล์ใส่ลงไปใน culture dish.. 82
52. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ที่ระยะเวลาต่าง ๆ.. 83
53. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 60-80%.............................. 84
54. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 80-100%............................ 85
55. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่เริ่มทำการ differentiate... 85
56. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 2................................ 86
57. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 4................................ 86
58. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 6................................ 86
59. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 10.............................. 87
60. แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor).................................. 96
61. แสดงการฝังเนื้อเยื่อ... 96
62. แสดงการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome... 97
63. แสดงหลักการของวิธี immunocytochemistry... 99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Alb	=	albumin
CAPD	=	continuous ambulatory peritoneal dialysis
CA125	=	cancer antigen 125
Ct	=	cycle threshold
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	=	epithelial mesenchymal transition
ESRD	=	end-stage renal disease
HPMC	=	human peritoneal mesothelial cells
LDH	=	lactate dehydrogenase
MESO	=	mesothelial cell
PGZ	=	pioglitazone
PI	=	propidium iodide
PPARs	=	peroxisome proliferator activated receptors
PPAR-γ	=	peroxisome proliferators-activated receptor-gamma
PPRE	=	peroxisome proliferator response element
RGZ	=	rosiglitazone
rRNA	=	ribosomal RNA
TG	=	triglyceride
TGF-β	=	transforming growth factor beta
TUNEL	=	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TZDs	=	thiazolidinediones
UF	=	ultrafiltration
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
α-SMA	=	α-smooth muscle actin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเป็นภาวะที่ไตเสื่อมหน้าที่อย่างถาวรไม่สามารถรักษาหรือแก้ไขให้ไตกลับคืนมาทำหน้าที่ได้ดังเดิม ก่อให้เกิดการคั่งของน้ำ เกลือแร่ และของเสียภายในร่างกายของผู้ป่วย ส่งผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย อาการแสดงทางคลินิกของภาวะ uremia เช่น หอบเหนื่อย บวม คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ซึมลงจนถึงเสียชีวิตได้ในท้ายที่สุด ผู้ป่วยเหล่านี้จำเป็นจะต้องได้รับการรักษาทดแทนไตเพื่อระงับอาการและพยุงชีวิตตนเองไว้ การรักษาทดแทนไตรูปแบบหนึ่งคือ การรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร (continuous ambulatory peritoneal dialysis: CAPD) การรักษาทดแทนไตรูปแบบนี้อาศัยหลักการซึมผ่าน (diffusion) ในการขจัดเกลือแร่ส่วนเกิน และของเสียต่าง ๆ ออกจากร่างกายผ่านทางเยื่อบุผนังช่องท้อง (peritoneal membrane) โดยของเสียที่มีความเข้มข้นสูงภายในเลือดของผู้ป่วยจะแพร่ผ่าน peritoneal membrane ออกมายังน้ำยาฟอกไตที่บริสุทธิ์ (dialysis solution) ปราศจากของเสีย และอาศัยแรงดึงน้ำที่เกิดจากน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสาร osmotic agent หลักของน้ำยา dialysis ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากร่างกายของผู้ป่วย (ultrafiltration: UF) แม้ว่าได้มีการฟอกทดแทนไตรูปแบบนี้มาเป็นเวลาหลายสิบปี พบว่าเยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเสื่อมสมรรถภาพในการขับน้ำลง (UF failure) ตามลำดับ กล่าวคือร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่ทำ CAPD มานานกว่า 6 ปี จะเกิดการคั่งของน้ำส่วนเกิน (volume overload) และ UF failure [1] อันเนื่องมาจากเยื่อบุผนังช่องท้องเพิ่มอัตราการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในน้ำยา dialysis กลับสู่กระแสเลือด (high transporter) ส่งผลให้แรงดัน osmosis ในน้ำยา dialysis ลดต่ำลง นำมาซึ่งปริมาตร UF ที่ลดลงในท้ายที่สุด

เมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพยาธิวิทยาเยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วย CAPD จะพบการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกับลักษณะที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน (diabetiform change) [2-11] ดังนี้คือ 1) มีการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผนังช่องท้องเป็นบริเวณกว้างขวาง (extensive mesothelial denudation) 2) มีการหนาตัวขึ้นของชั้น submesothelial compact collagenous zone (submesothelial thickening) โดยการหนาตัวของเยื่อบุผนังช่องท้องดังกล่าวนี้จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยทำ CAPD และเป็นปฏิภาคผกผันกับจำนวนของเซลล์ mesothelium ที่หลงเหลืออยู่บนผิวเยื่อบุผนังช่องท้อง พบว่าความหนาของชั้น submesothelial compact zone เฉลี่ยเท่ากับ 180 ไมครอน ในผู้ป่วยที่ทำการฟอกช่องท้องมานานไม่เกิน 2 ปี แต่จะเพิ่มความหนา

เป็น 300 และ 700 ไมครอน ในผู้ป่วยที่ทำการฟอกมานาน 4-6 ปี และมากกว่า 6 ปี ตามลำดับ และจะยิ่งทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะ membrane failure 3) ผนังของทั้งหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำในชั้น loose connective tissue จะหนาตัวขึ้น (subendothelial hyalinization) ร่วมกับการเพิ่มจำนวนชั้นของ basement membrane (reduplication of capillary และ arteriolar basement membrane) ก่อให้เกิดการอุดตันการไหลเวียนของเลือดภายในหลอดเลือด (luminal narrowing and obliteration) นำมาซึ่งการสร้างหลอดเลือดฝอยใหม่จำนวนมากที่มีผนังไม่แข็งแรง ง่ายต่อการรั่วซึมของสสาร (neoangiogensis) ทดแทน การเปลี่ยนแปลงความหนาของหลอดเลือดนี้จะเป็นแปรผันโดยตรงกับความหนาของชั้น submesothelial compact zone โดยเฉพาะในรายที่มีภาวะ membrane failure

เชื่อว่าสาเหตุของ membrane failure ดังกล่าวข้างต้นเกิดจากการที่เยื่อบุผนังช่องท้องสัมผัสกับน้ำยา dialysate มาเป็นระยะเวลาต่อเนื่องยาวนาน [1, 12-15] ทั้งนี้เนื่องจากน้ำยา dialysis ที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบันมีน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูง (เฉลี่ย 13, 22 และ 38 เท่าของพลาสมากลูโคส หากทำการฟอกช่องท้องด้วยน้ำยา dialysis ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1.36%, 2.26% และ 3.86% ตามลำดับ) พบว่าเซลล์เยื่อบุผนังช่องท้องที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงจะหยุดการแบ่งตัวและตายด้วยขบวนการ apoptosis ภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากที่เซลล์สัมผัสกับน้ำยา dialysis โดยปริมาณเซลล์ที่หยุดการแบ่งตัว และเกิดขบวนการ apoptosis จะสัมพันธ์โดยตรงกับระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับน้ำยา และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการทดสอบ [15-17] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในสัตว์ทดลองของ Horiuchi T และคณะ [18-19] โดยคณะผู้วิจัยพบการหลุดลอกของ mesothelial cells เป็นจำนวนมากจากผนังของเยื่อบุผนังช่องท้องเมื่อทำการฉีดน้ำยา dialysis เข้าไปยังช่องท้องของสัตว์ทดลอง ก่อให้เกิดบริเวณที่ปราศจากเซลล์บุผิวจำนวนมากบนผนังช่องท้องเรียก denuded area นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าขีดความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนเซลล์ที่หลุดลอกออกไป (remesothelization) ของ mesothelial cell ลดต่ำลง เนื่องจากเซลล์ที่เหลืออยู่แก่ตัวลง มีสัดส่วนของ nuclear-cytoplasmic ratio เพิ่มขึ้น และบางเซลล์แสดงลักษณะผิดปกติ (dysplastic features)

การแก้ไขภาวะ UF failure ในปัจจุบันได้แก่ 1) การเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำยา dialysis ซึ่งการแก้ไขด้วยวิธีนี้จะยิ่งเร่งให้เยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วยเสื่อมสภาพเร็วขึ้นจากการสัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูง และในระยะยาวจะส่งผลให้ร่างกายของผู้ป่วยเกิดภาวะการดื้อต่ออินซูลิน (syndrome X) นำมาซึ่งภาวะไขมันในกระแสเลือดสูง ภาวะอ้วน ความดันโลหิตสูง เก๊าท์ โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น 2) เพิ่มความถี่ในการฟอก เพื่อลดระยะเวลาที่ต้องทิ้งน้ำยา dialysis ค้างในช่องท้อง แต่การกระทำเช่นนี้จะทำให้ผู้ป่วยต้องสูญเสียเวลาในการฟอกเพิ่มขึ้น และต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการฟอก 3) การใช้น้ำยา dialysis ชนิดที่มี

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

polyglucose (icodextrin) solution ทดแทนน้ำตาลกลูโคส อย่างไรก็ตามน้ำยา dialysis ชนิดใหม่นี้มีราคาแพง และยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดเมืองไทย รวมทั้งไม่สามารถบริหารน้ำยา polyglucose ได้เกินกว่าวันละ 1 ครั้ง เนื่องจากจะทำให้เกิดการคั่งของน้ำตาล maltose ในร่างกายผู้ป่วย สถิติในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่าร้อยละ 60 ของผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้น้ำยา dialysis ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 1.36% เปลี่ยนถ่ายอย่างน้อย 1 ครั้งต่อสัปดาห์ เพื่อรักษาภาวะสมดุลของน้ำในร่างกาย ซึ่งเป็นหลักฐานทางอ้อมแสดงให้เห็นว่าเยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วยมีการเสื่อมสมรรถภาพ

ในระยะหลายปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบยารักษาโรคเบาหวานชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เพิ่มความไวของตัวรับฮอร์โมนอินซูลินบนผิวเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ตับโดยการกระตุ้น peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR-γ) เรียกยารักษาโรคเบาหวานกลุ่มใหม่นี้ว่ายากลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) ยากลุ่มนี้ประกอบด้วยยาหลายชนิด แต่ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดเมืองไทยได้แก่ pioglitazone (PGZ), rosiglitazone (RGZ) และ ciglitazone (INN) เป็นต้น ทั้งหมดเมื่อบริหารเข้าสู่ร่างกายจะผ่านเข้าไปภายในเซลล์จับกับ PPAR-γ ในไซโตรพลาสซึม แล้วทั้งสองจะถูกส่งต่อเข้าสู่นิวเคลียสจับกับตัวรับของ PPAR-γ บน transcription factor ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่สำคัญของเซลล์ ด้วยเหตุนี้การกระตุ้น PPAR-γ จึงสามารถปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีนได้ทั้งในเชิงบวกคือเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนและเชิงลบคือลดการสังเคราะห์โปรตีน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ transcription factor ที่ PPAR-γ เข้าไปรวมตัวจับ ในปัจจุบันพบว่า PPAR-γ ควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีส่วนควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ควบคุมการตายและการมีชีวิตรอดของเซลล์ ควบคุมการเจริญเติบโตและผลิตผลจากเซลล์ ควบคุมขบวนการอักเสบ เป็นต้น [20-26] จึงเป็นเหตุให้มีการนำยาในกลุ่ม TZDs เข้ามาทดลองกับเซลล์หลายชนิด ทั้งที่เป็นเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ พบว่ายาสามารถป้องกันไม่ให้เซลล์ปกติบาดเจ็บ และล้มตายจากสารเคมี และยังเร่งให้เซลล์บางสายพันธุ์ ได้แก่เซลล์ไขมัน (preadipocyte) และเซลล์ glomerular visceral epithelial cells (podocyte) เจริญเป็นตัวเต็มวัย ในขณะเดียวกันยายังมีคุณสมบัติยับยั้งการแบ่งตัวผิดปกติของเซลล์มะเร็ง และช่วยส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเซลล์ตัวอ่อนนั้นเจริญเติบโตเป็นเซลล์ตัวแก่ที่มีการทำงานเป็นปกติ [21-28] ด้วยเหตุนี้ทำให้แพทย์และนักวิทยาศาสตร์หลายท่านนำยากลุ่ม TZDs มาใช้ศึกษาในสัตว์ทดลองหลายแบบจำลองรวมทั้งนำมาใช้รักษาผู้ป่วย เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าการรับประทานยา PGZ วันละ 30 มิลลิกรัม ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 เดือน สามารถชะลอการเสื่อมของไตจากภาวะ diabetic nephropathy ได้ เป็นต้น

Lin SH และคณะ [29] ศึกษา RGZ ในผู้ป่วย CAPD พบว่าการบริหารยาทางปากสามารถเพิ่มความไวของเนื้อเยื่อภายในร่างกายต่อการออกฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin sensitivity) และลด

อัตราการดื้ออินซูลินในผู้ป่วย ผู้วิจัยไม่พบภาวะแทรกซ้อนใด ๆ เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่ได้รับยาดังกล่าว อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยาในการเพิ่มการขจัดปริมาณน้ำส่วนเกินในร่างกายของผู้ป่วย และไม่ได้ศึกษาประสิทธิผลของยาในการแลกเปลี่ยนสสาร รวมไปถึงการชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้อง

ด้วยเหตุที่น้ำยา dialysis มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง และการเสื่อมสภาพของเยื่อบุผนังช่องท้องมีลักษณะคล้ายกับผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวาน อีกทั้งยาในกลุ่ม TZDs มีคุณสมบัติป้องกันการบาดเจ็บ และการตายของเซลล์จากสารเคมี และสามารถชะลอการเสื่อมของไตจากภาวะเบาหวานได้ คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการบริหารยาในกลุ่ม TZDs อย่างต่อเนื่องจะช่วยชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องในผู้ป่วย CAPD ได้ และเนื่องจากยังไม่เคยมีผู้ศึกษาผลของยากลุ่ม TZDs ต่อ peritoneal membrane survival มาก่อน อีกทั้งโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเป็นโรคที่มีความสำคัญของประเทศ คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการวิจัยนี้จะนำซึ่งประโยชน์อย่างมากสู่วงการแพทย์ไทย

1.2 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

ยาไทอะโซลิดินไดโอนสามารถชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องจากการฟอกไตทางช่องท้องได้ทั้งในสัตว์ทดลอง และในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยศึกษาประสิทธิภาพในเชิงกายภาพและพยาธิสภาพในสัตว์ทดลอง และทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1.3.1 ศึกษาประสิทธิผลของยาไทอะโซลิดินไดโอนในการป้องกันไม่ให้เยื่อบุผนังช่องท้องของสัตว์ทดลองเสื่อมสมรรถภาพ โดยการประเมิน cytokines ในน้ำยา spent dialysate และ membrane morphologies

1.3.2 เพื่อศึกษากลไกในการป้องกันไม่ให้เซลล์เยื่อบุผนังช่องท้องบาดเจ็บจากการฟอกไตทางช่องท้อง โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

1.4 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage renal disease, ESRD) หมายถึง ภาวะที่มีอัตรากรองผ่านโกลเมอรูลัสน้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อ 1.73 ตารางเมตรต่อนาที นานกว่า 3 เดือน โดยอาจมีหรือไม่มีพยาธิสภาพที่ไตร่วมด้วย

การล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis) หมายถึง วิธีการที่ใช้น้ำยาล้างไตใส่เข้าไปในช่องท้องโดยให้ผนังเยื่อบุช่องท้องรับหน้าที่เป็นตัวกรองฟอกเลือด แยกระหว่างส่วนของเลือดกับน้ำยาล้างไต เนื่องจากผนังบุช่องท้องมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ บุอยู่ภายในช่องท้อง โดยที่ช่องท้องนั้นมีลักษณะคล้ายถุงบรรจุอวัยวะต่าง ๆ ทั้งกระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ ฯลฯ พูดง่ายๆ ก็คือ ส่วนน้ำยาล้างไตที่ใส่เข้าไปนั้นก็จะอยู่ในถุง (ช่องท้อง) ส่วนของเลือดก็คือเส้นเลือดต่าง ๆ ที่อยู่ตามผิวของเยื่อบุช่องท้องและลำไส้ โดยมีผนังบุช่องท้องเป็นตัวกั้นและทำหน้าที่กรอง เพราะเมื่อใส่น้ำยาล้างไตเข้าไปในช่องท้องแล้วทิ้งไว้สักระยะ ของเสียในเลือดที่มีความเข้มข้นสูงกว่าน้ำยาล้างไต ก็จะมีการแพร่กระจาย (diffusion) ผ่านเยื่อบุช่องท้องเข้ามาอยู่กับน้ำยาล้างไต ทำให้ของเสียในเลือดลดลง เมื่อถ่ายน้ำยาล้างไตออกทิ้ง ของเสียในเลือดก็จะถูกกำจัดออกไป ทำเช่นนี้ต่อเนื่องกันไปเรื่อย ๆ ของเสียในเลือดก็จะลดปริมาณลง

การล้างไตทางช่องท้องแบบถาวร (chronic peritoneal dialysis, CPD) เป็นการรักษาทดแทนไตแบบหนึ่ง หลักการจะอาศัยผนังเยื่อบุช่องท้อง (peritoneum) ทำหน้าที่คล้ายเมมเบรนของตัวกรองฟอกเลือด แยกระหว่างส่วนของเลือด (blood compartment) กับส่วนของน้ำยาล้างไต (dialysate compartment) เมื่อแช่น้ำยาทิ้งไว้ในช่องท้องระยะเวลาหนึ่ง ของเสียในเลือดที่มีความเข้มข้นสูงกว่าน้ำยาล้างไตจะมีการแพร่กระจาย (diffusion) ผ่านเยื่อบุช่องท้องมายังน้ำยาล้างไต ทำให้ของเสียในเลือดลดลง หลังจากนั้นถ่ายน้ำยาล้างไตออกมาทิ้งแล้วใส่น้ำยาล้างไตใหม่เข้าไปแทนที่ ทำเช่นนี้ต่อเนื่องกันไปเรื่อย ๆ รูปแบบของการรักษา ประกอบด้วย การล้างไตทางช่องท้องแบบต่อเนื่อง (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) การล้างไตทางช่องท้องต่อเนื่องแบบใช้เครื่อง (continuous cyclic-assisted peritoneal dialysis, CCPD) การล้างไตทางช่องท้องแบบที่มีน้ำยาในช่องท้องเฉพาะช่วงกลางวัน (day time ambulatory peritoneal dialysis, DAPD) และการล้างไตทางช่องท้องแบบที่มีน้ำยาในช่องท้องเฉพาะช่วงกลางคืน (nightly intermittent peritoneal dialysis, NIPD)

น้ำยาล้างไตทางช่องท้องที่ผ่านการใช้งาน (spent dialysate) หมายถึง น้ำยาล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis solution) ที่ไหลออกมาจากช่องท้อง (peritoneal cavity) ผ่านทาง catheter เมื่อทำการรักษาทดแทนไตด้วยการล้างช่องท้อง

ขบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและสาร (dialysis) หมายถึง ขบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและสารผ่าน semipermeable membrane โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารนั้น ๆ ซึ่งจะซึมผ่านจากที่ที่มีความเข้มข้นมาก ไปยังที่ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า ซึ่งเป็นขบวนการทางเคมี

การล้างไตทางช่องท้องอย่างต่อเนื่องด้วยตนเอง (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) หมายถึง การนำความรู้เรื่อง dialysis มาใช้ โดยอาศัย peritoneum ซึ่งมี

คุณสมบัติเป็น semipermeable membrane ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนสารต่าง ๆ ระหว่างเลือดกับ peritoneal dialysis fluid

เซลล์มีโซทีเลี่ยม (mesothelium cells) หมายถึง เซลล์ที่บุผนังหน้าท้องซึ่งจะย้อมติด anti-cytokeratin

apoptosis หมายถึง กระบวนการตายของเซลล์ด้วยตัวเอง (program cell death) ซึ่งจะย้อมติดสี Alexa

1.5 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

1.5.1 สามารถนำการศึกษานี้มาใช้กับผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องทุกรายที่ไม่มีข้อห้ามในการใช้ยา เพื่อชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องซึ่งช่วยในผู้ป่วยประหยัดค่าใช้จ่ายโดยไม่ต้องเพิ่มปริมาตรน้ำยาที่ใช้ในการฟอกไตทางช่องท้องหรือใช้น้ำยาฟอกที่มีคุณสมบัติพิเศษซึ่งมีราคาแพง

1.5.2 ช่วยทำให้ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องมีคุณภาพชีวิตดีขึ้น ลดอัตราการตายและอัตราการเกิดหัวใจวาย

1.5.3 การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติหรือวารสารที่อยู่ใน index medicus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Peritoneum anatomy

การล้างไตทางช่องท้อง เป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย โดยวิธีการใส่น้ำยาที่เตรียมไว้ในช่องท้อง เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนของเสียที่สะสมในร่างกาย และปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่[30] โดยเริ่มนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายตั้งแต่ปี พ.ศ. 2519 และได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

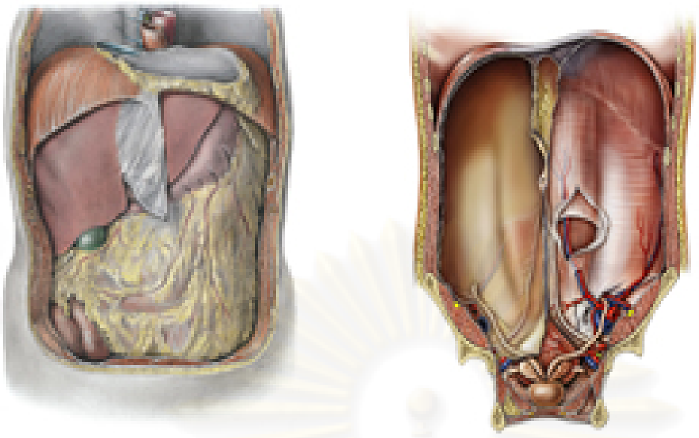
ในการทำการล้างไตทางช่องท้อง ประกอบด้วยองค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญ 3 อย่าง คือ

1. ระบบหลอดเลือด ซึ่งในการล้างไตทางช่องท้อง หมายถึง อัตราการไหลของเลือดที่ไปยังบริเวณเยื่อบุช่องท้อง
2. เยื่อบุหรือ membrane ซึ่งเป็นตัวคัดเลือกสำหรับการกรอง
3. ระบบน้ำยา ซึ่งในที่นี้ หมายถึงน้ำยาที่ใส่เข้าในช่องท้อง

ในการศึกษาพื้นฐานของการล้างไตทางช่องท้อง มีความจำเป็นต้องเข้าใจถึงกายวิภาคของเยื่อบุช่องท้อง (peritoneal membrane) และช่องท้อง (peritoneal carvity) ซึ่งมีความสำคัญยิ่งในกระบวนการแลกเปลี่ยนของเสีย สารต่าง ๆ และน้ำออกจากร่างกาย

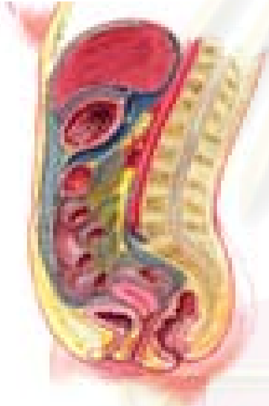
โดยช่องท้องเป็นช่องว่าง มีปริมาตรของเหลวบรรจุอยู่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร บุด้วยเยื่อบุช่องท้อง ซึ่งมีลักษณะเป็นเยื่อบุบาง ๆ ที่มีหลอดเลือดอยู่มากมาย จึงทำหน้าที่คล้ายกับเป็นตัวกรอง (dialyzer) ในการล้างไต โดยเยื่อบุช่องท้องจะมี 2 ส่วนที่สำคัญ คือ visceral peritoneum ซึ่งเป็นส่วนของ peritoneum ที่หุ้มส่วนของอวัยวะภายใน โดยคิดเป็นร้อยละ 90 ของเยื่อบุช่องท้องทั้งหมด และ parietal peritoneum ซึ่งเป็นส่วนของ peritoneum ที่บุบริเวณผนังโดยรอบของช่องท้อง โดยมีพื้นที่ประมาณร้อยละ 10 ของพื้นที่ทั้งหมดตามรูปที่ 1 และ 2 [31]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1. แสดง anterior view of internal abdominal organ (visceral peritoneum) และ posterior view of abdominal wall (posterior parietal peritoneum)

(ด้านซ้ายมือ แสดง anterior view of internal abdominal organ (visceral peritoneum) และ ด้านขวามือ แสดง posterior view of abdominal wall (posterior parietal peritoneum))



รูปที่ 2. แสดงเยื่อบุช่องท้องด้านตัดขวาง ทั้ง parietal peritoneum และ visceral peritoneum

2.2 Ultrastructure of peritoneum

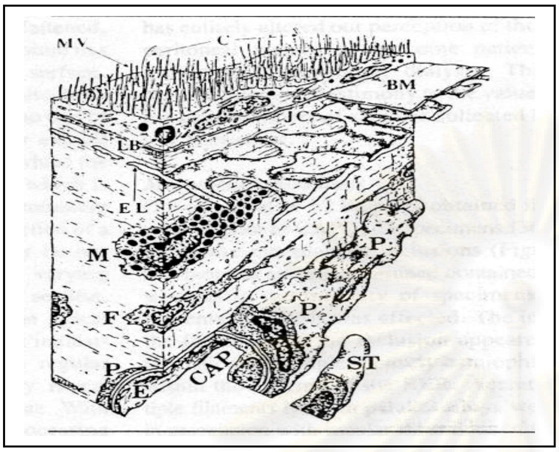
ในการล้างไตทางช่องท้อง เมื่อใส่น้ำยาในช่องท้อง น้ำยาจะมีการกระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของช่องท้อง และมีการแลกเปลี่ยนของน้ำและสารต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของสารละลายในแต่ละส่วนคือในน้ำยาและหลอดเลือด โดยมีทั้งการแลกเปลี่ยนจากหลอดเลือดเข้าสู่น้ำยา และมีการดูดกลับจากน้ำยาเข้าสู่หลอดเลือด โดยอาศัยเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของเยื่อบุช่องท้องเป็นตัวกลางสำคัญในกลไกเหล่านี้

โครงสร้างที่สำคัญของเยื่อบุช่องท้องประกอบด้วย 4 ระบบที่สำคัญ (รูปที่ 3) คือ

1. เซลล์เยื่อบุช่องท้อง (mesothelial cell)
2. เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (interstitial tissue)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ระบบหลอดเลือดฝอย (capillary system)
4. ระบบน้ำเหลือง (lymphatic system)



รูปที่ 3. แสดงลักษณะของ normal peritoneum แสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบต่าง ๆ microvilli, M; cilium, C; junctional complex, JC; lamellar body, LB; elastic laminar, EL; mast cell, M; fibroblast, F; pericyte, P; endothelium, E; capillary, CAP; basement membrane, BM.

2.2.1 ชั้นเซลล์เยื่อบุช่องท้อง (Mesothelial layer)

ประกอบด้วย mesothelial cell [32] ในภาวะปกติที่เยื่อบุช่องท้องจะมีชั้น mesothelial cell 1 ชั้น [33] ซึ่งมี embryological derivation เดียวกันกับ endothelial cell ซึ่งพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นสามารถที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากเซลล์ที่มีรูปร่างแบน (flat cell) กลายเป็นรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยม (cuboidal cell) ที่มีคุณสมบัติของ mesenchymal cell ซึ่งเรียกว่าเกิด epithelial mesenchymal transition (EMT) ทำหน้าที่คล้ายกับ secretory cell และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ของ myofibroblast

ในภาวะปกติ mesothelial cell จะมีรูปร่างที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งที่แตกต่างกัน เช่น ที่บริเวณ parietal peritoneum จะมีลักษณะเป็นเซลล์แบนราบ (discoid flattened cell) มีความหนาประมาณ 2.5-3.0 ไมครอน มีปริมาณ cytoplasm น้อย ในขณะที่บริเวณที่ปกคลุมรังไข่และอวัยวะในช่องท้องจะมีลักษณะเป็น cuboidal cell [34] หรือที่บริเวณเยื่อบุคลุมกระเพาะอาหารจะมีลักษณะเป็นส่วนของ transitional zone ฯลฯ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อ 1-2 ตารางเมตร ซึ่งที่ผิวเซลล์ จะมีกลุ่มของ microvilli ขนาดประมาณ 0.08 ไมครอน และยาวประมาณ 2-3 ไมครอน กระจายในรูปแบบต่าง ๆ กันแล้วแต่ตำแหน่งของเซลล์

องค์ประกอบของเซลล์ ประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีลักษณะเป็นรูปรี สามารถพบ nuclei 2 อันได้บ่อย และ ลักษณะเด่นของเซลล์นี้คือ พบ vesicle อยู่โดยทั่วไป ซึ่ง vesicle นี้จะมีบทบาทใน

การขนส่งสารจากทางด้าน peritoneal surface โดยอาศัยกลไก endocytosis mechanism นอกจากนี้พบ mitochondria ซึ่งมี rough endoplasmic reticulum (RER) อยู่รอบ ๆ ได้ทั่วไป สามารถพบ golgi apparatus ประมาณ 2-3 อัน รวมทั้ง lysosome ต่าง ๆ บางครั้งสามารถพบ lipid inclusions ได้ 3-4 อัน โดยเฉพาะที่ส่วนยอดของเซลล์ และตรวจพบ lamellar bodies ได้บ่อยซึ่งเชื่อว่าเป็นที่เก็บของ lubricant phospholipids (ส่วนใหญ่ คือ phosphatidylcholine) โดยสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ และถูกขับออกไปยังผิวของเยื่อบุช่องท้อง รวมทั้งสามารถพบ lamellar bodies [35] บริเวณ microvilli และ mesothelial cell ได้บ่อยรวมทั้งใน macrophage

ส่วน microvilli ของ mesothelial cell มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.08-0.1 ไมครอน โดยมีความยาวประมาณ 2 ไมครอน ภายในจะมี fine filament ซึ่งส่วนใหญ่เป็น actin มีความหนาประมาณ 4 นาโนเมตร โดยมีความหนาแน่นในบริเวณต่าง ๆ ของเยื่อบุช่องท้องที่แตกต่างกัน ซึ่ง microvilli นี้จะมีประจุลบ สามารถจับกับ phospholipid ชนิดต่าง ๆ เช่น phosphatidylcholine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine เป็นต้น มีบทบาททำให้ลดการเสียดสีระหว่างอวัยวะต่าง ๆ นอกจากนี้การที่เซลล์มี microvilli ยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนสารต่าง ๆ ระหว่างช่องท้องกับเซลล์อื่น ๆ และหลอดเลือด และเป็นตัวกั้นเพื่อป้องกันการเกิด adhesion ต่อ peritoneum membrane ที่ได้รับอันตราย ในขณะที่ส่วน cilia นั้นก็คล้ายกับที่พบในส่วนอื่น ๆ แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน

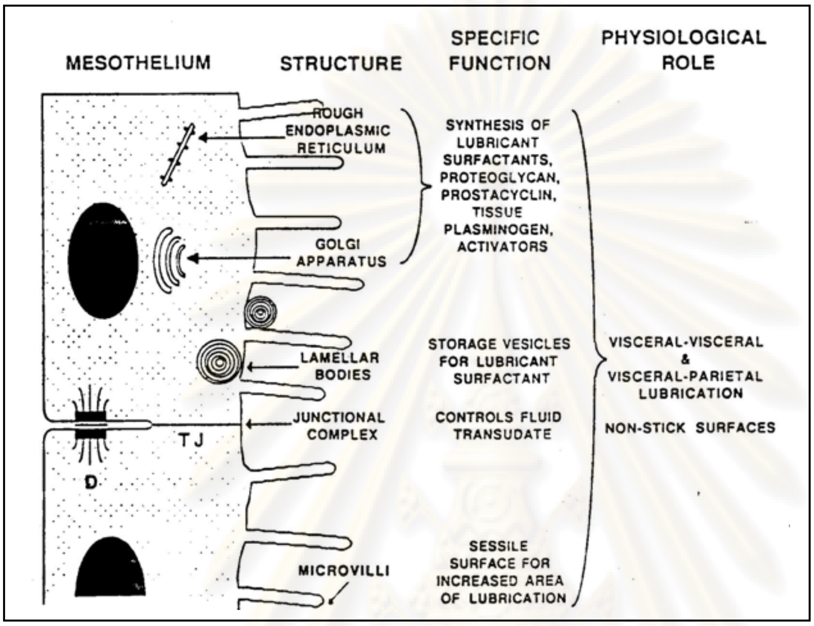
การเกาะติดกันของ mesothelial cell โดย tight junction ในรูปแบบของ desmosome โดยเฉพาะที่ส่วนนอกสุดและที่บริเวณ basal region เซลล์จะถูกล็อคด้วย interdigitating process โดยประกอบด้วย glycoprotein ในกลุ่ม cadherin family ร่วมกับ actin filament และโปรตีน vinculin เซลล์บางตำแหน่งมีการเชื่อมเซลล์แบบ gap junction ซึ่งเชื่อมด้วยโปรตีน connexon พบบ่อยที่ visceral peritoneum มากกว่า parietal peritoneum จากการศึกษาเชื่อว่าการดูดซึมของสารต่าง ๆ เช่น กลูโคสกลับเข้าสู่ร่างกาย ฯลฯ น่าจะผ่านทาง intercellular route เป็นสำคัญ

ถัดจากชั้น mesothelial cell เป็นชั้นบาง ๆ ที่เรียกว่า mesothelial basement membrane มีความหนาประมาณ 40 นาโนเมตร ซึ่งประกอบด้วย type IV collagen ใน ground substance ที่มี laminin, fibronectin และ proteoglycan

นอกจากนี้ในบางตำแหน่งของเยื่อบุช่องท้องมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ ที่เรียกว่า milky spot มีรายงานการตรวจพบครั้งแรกโดย von Recklinghausen ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่พบมากที่บริเวณ greater omentum [36] และใกล้แขนงที่ 1 และ 2 ของหลอดเลือดแดง มีขนาดตั้งแต่ 0.1-2 มิลลิเมตร ซึ่งยากที่จะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า องค์ประกอบของ milky spot ประกอบด้วย macrophage (ร้อยละ 70), เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง B และ T cell (ร้อยละ

14 และร้อยละ 13 ตามลำดับ) รวมทั้งพบ mast cell และ monocyte ได้บ้าง เชื่อว่า milky spot น่าจะเป็น accessory lymphoid organs ซึ่งเป็น first line defense mechanism ของ peritoneal cavity

ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell แสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4. แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell [37]

2.2.2 **เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน** (Interstitial tissue) **หรือชั้นที่อยู่ใต้** mesothelial (Submesothelial layer)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ประกอบไปด้วย fibroblasts, mast cell, macrophage และ collagen network ซึ่งมี collagen bundle โดยเฉพาะอย่างยิ่ง type I และ type III เชื่อมระหว่างเส้นเลือด และ mesothelial layer ร่วมกับองค์ประกอบที่สำคัญใน gel-like matrix คือ hyaluronic acid และ proteoglycan ซึ่งมีความสามารถในการจับกับน้ำ และเนื่องจาก hyaluronic acid มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ จึงทำหน้าที่กั้นการผ่านเข้าออกของน้ำและโมเลกุลของสารต่าง ๆ โดยเฉพาะ plasma protein ซึ่งมีประจุลบเช่นกัน กรณีที่มีการอักเสบของเยื่อบุช่องท้อง สารเหล่านี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยมักร่วมกับการบวมของชั้น interstitial ด้วย

ค่าแรงดันในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (interstitial pressure) ในภาวะปกติจะมีค่าเป็นลบ แต่เมื่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการบวม (interstitial edema) จะเกิดผลตรงข้ามกัน คือ ค่าแรงดันในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีค่าเป็นบวก ทำให้ความยาวและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดฝอยในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อการแลกเปลี่ยนน้ำและสารต่าง ๆ นอกจากนี้ถ้าปริมาณเลือด

ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแลกเปลี่ยนของสารต่าง ๆ ด้วย เช่น ในกรณีที่มีการอักเสบของเยื่อบุช่องท้อง ซึ่งมีการขยายตัวของหลอดเลือดและปริมาณเลือดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้น จึงอาจส่งผลให้เกิดการดูดซึมกลับของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กลูโคส และน้ำ กลับเข้าสู่ร่างกายเพิ่มมากขึ้น

2.2.3 **ระบบหลอดเลือดฝอย** (Capillary system)

เยื่อบุช่องท้อง ประกอบด้วยระบบเส้นเลือดฝอยที่สำคัญ 3 ชนิด [38] คือ

1. ชนิดต่อเนื่อง (continuous capillary) คล้ายกับที่พบใน mesenteric vessels

2. ชนิดร่างแห (fenestrated capillary) พบได้ที่บริเวณ parietal peritoneum โดยเฉพาะ mesentery คิดเป็นร้อยละ 1.7 ของจำนวนเส้นเลือดฝอยทั้งหมด โดยเป็นชนิดที่มีบทบาทในการแลกเปลี่ยนถึงร้อยละ 49 [39]

3. ชนิดไม่ต่อเนื่อง (discontinuous capillary) ซึ่งคล้ายกับที่พบใน liver sinusoid

เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดฝอย (endothelium cell) มีโครงสร้างเหมือนกับเซลล์อื่น โดยมีผนังเซลล์ (plasmalemma) ที่มีลักษณะแบน Robertson unit membrane ความหนาประมาณ 80-100 A^o ซึ่งประกอบด้วยชั้นของไขมันขนาบด้วยชั้นของโปรตีน มี glycocalyx network บนผิวเซลล์ซึ่งประกอบด้วย sialoconjugates, proteoglycan และ acidic polymer ทำหน้าที่เป็น fibrous network และเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิด negative charge ร่วมกับมีช่องว่างเล็ก ๆ ที่มีบทบาทในการควบคุมการขนส่งของโมเลกุลขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ผ่านผนังหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อ anionic molecule เช่น albumin เป็นต้น [40]

ส่วนภายในเซลล์ของเยื่อบุหลอดเลือด ประกอบด้วย pinocytic vesicle จากการศึกษาในสัตว์ [41-42] พบว่าในการขนส่งแบบ transendothelial channel เกิดจากการเชื่อมต่อของ vesicle โดย vesicle สามารถเคลื่อนจากด้านหนึ่งของเซลล์ไปยังอีกด้านหนึ่ง ทำให้เกิดการขนส่งสารต่าง ๆ [43] ซึ่งเรียกว่า fluid phase pinocytosis เกิดขึ้นโดยผ่านทาง uncoated plasmalemmal vesicles และ transendothelial channel มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น active transport ของ albumin นอกจากนี้ vesicle ที่เกิดขึ้นอาจเป็นส่วนหนึ่งของขบวนการ pinocytosis ของสารโมเลกุลขนาดใหญ่และน้ำที่อาศัยตัวรับ (receptor) หรือที่เรียกว่า highly specific receptor mediated pathway ซึ่งอยู่ที่บริเวณ coated pitted เมื่อสารจับกับ receptor จะมีการนำสารเหล่านั้นเข้าสู่เซลล์ (internalized) และส่งต่อไปยัง lysosomal compartment หลังจากนั้น receptor จะย้อนกลับมาที่ผิวเซลล์เพื่อรับสารต่อไป

การเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เยื่อบุของหลอดเลือดฝอย จะเชื่อมต่อกันอย่างเหนียวแน่นด้วย tight junction หรือ zonula occluden โดยเป็นการยึดกันของโปรตีนชั้นนอกทำให้เซลล์ชิดกันสนิท

แต่ในส่วนของ postvenular capillary จะมีการเชื่อมต่อกันอย่างหลวม ๆ พบช่องว่างระหว่างเซลล์เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 25-30 โดยมีขนาดประมาณ 20-60 A° ซึ่งเชื่อว่าเป็นทางผ่านของโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 20 A°

basement membrane เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดยมีความหนาแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อ basement membrane ประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ชั้น มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ จึงมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกั้นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยเฉพาะที่มีประจุลบ เช่น โปรตีน เป็นต้น ผ่านเข้าออก ซึ่งพบว่าเมื่อร่างกายเกิดภาวะที่ basement membrane สูญเสียประจุลบเช่น ภาวะ septic peritonitis, ได้รับ protamine sulfate, enzymatic degradation of glycosaminoglycan เป็นต้น จะทำให้มีการสูญเสียโปรตีนเพิ่มมากขึ้น

ส่วน endothelial cell ของ fenestrated capillary ซึ่งมี fenestrae ขนาด 20-120 นาโนเมตร เปิดและปิดโดย diaphragm สามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อมีการอักเสบ นอกจากนี้พบว่าทางด้าน blood surface จะมีประจุลบเด่น ทำให้ fenestarted capillary มีการผ่านของโมเลกุลที่มีประจุลบน้อยกว่า continuous capillary

Sinusoid (discontinuous capillary) นั้นมี endothelial cells ดาดชั้นเดียว แต่ละเซลล์ไม่ต่อเนื่องกัน ทำให้เกิดมีช่องว่างระหว่างเซลล์ขึ้น ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,000 A° ช่องทางนี้เป็นทางผ่านเข้าออกของสารทั้งขนาดใหญ่และเล็กระหว่างภายใน lumen และภายนอกหลอดเลือด ขนาดของหลอดเลือดชนิดนี้ไม่สม่ำเสมอ ค่อนข้างกว้างและมักคดเคี้ยว ส่วน basal lamina อาจไม่มีหรือมีแต่ก็ไม่ต่อเนื่องกัน

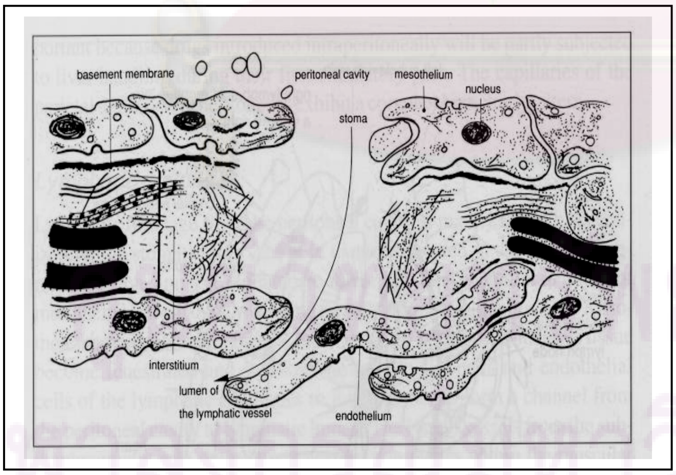
2.2.4 **ระบบน้ำเหลือง** (Lymphatic system)

ในภาวะปกติ ร่างกายจะควบคุมปริมาตรน้ำในเนื้อเยื่อและช่องว่างต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับคงที่โดยการสร้างน้ำเหลืองดูดกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยปกติอัตราการสร้างน้ำเหลือง จะเท่ากันกับปริมาณสุทธิของ capillary efflux เพื่อให้ปริมาตรในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและในช่องท้องมีค่าคงที่ ในการล้างไตทางช่องท้อง หรือในผู้ป่วยที่มีปริมาตรสารน้ำในช่องท้องเพิ่มมากขึ้น เช่น ภาวะท้องมาน (ascites) ซึ่งน้ำและสารต่าง ๆ ที่อยู่ในช่องท้องจะมีการดูดกลับเข้าสู่ร่างกายทางระบบน้ำเหลืองและเข้าสู่หลอดเลือดร่างกายมากขึ้น

ระบบน้ำเหลือง มีจุดเริ่มต้นจาก interstitial, non endothelial channels หรือ low resistance pathway ซึ่งเรียกว่า pre initial lymphatics ซึ่งจะนำน้ำเหลืองจากบริเวณรอบของ venous microvasculature เข้าไปยังเครือข่ายที่มีความยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร โดยเป็นท่อขนาดประมาณ 20-30 ไมครอน บุด้วย endothelial cell เมื่อมีปริมาณน้ำเหลืองเต็ม อาจมีขนาด

กว้างถึง 75 ไมครอน เรียกระบบนี้ว่า initial lymphatic หลังจากนั้นจะนำน้ำเหลืองเข้าสู่ lymphatic capillary ซึ่งมีขนาดกว้างกว่าเส้นเลือดฝอย โดยมีขนาดประมาณ 15-40 ไมครอน บุอยู่ด้วยเซลล์ชั้นเดียวที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ endothelial cell และประกอบด้วย fine actin like filament ที่มีขนาด 40-60 A^{o} เรียงตามแนวยาวของเซลล์ อันมีบทบาทสำคัญต่อการหดตัวของผนังของหลอดเลือดฝอยน้ำเหลือง จากหลอดเลือดฝอยน้ำเหลืองเหล่านี้ จะนำน้ำเหลืองจากส่วนต่าง ๆ ในช่องท้องเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองต่าง ๆ ที่กระจายอยู่ภายในช่องท้อง และไหลเข้าสู่ cisterna chili (ซึ่งเป็นช่องเปิดทางด้านล่างของ thoracic duct) นำน้ำเหลืองและสารต่าง ๆ ในช่องท้องกลับเข้าสู่ร่างกายทาง thoracic duct และเปิดเข้าสู่หลอดเลือดแดงที่บริเวณรอยต่อระหว่าง left subclavian vein และ left internal jugular vein [44]

นอกจากนี้ยังมีโครงร่างน้ำเหลืองที่สำคัญอีกระบบหนึ่งซึ่งเกี่ยวข้องกับการล้างไตทางช่องท้อง คือ โครงร่างที่บริเวณกระบังลม (diaphragmatic lymphatic capillary network) (รูปที่ 5) โดยเป็น plexus อยู่ใต้ชั้น mesothelial layer ซึ่งนำน้ำเหลืองจากช่องท้องเข้าสู่ pleural side ซึ่งโครงร่างน้ำเหลืองนี้ในคนจะกระจายอยู่ที่ชั้นกล้ามเนื้อของกระบังลมโดยเริ่มต้นที่บริเวณ lymphatic lacunae ซึ่งบุอยู่ด้วย endothelial cell บาง ๆ เพียงชั้นเดียว อยู่แบบคาบเกี่ยวกัน (overlap) โดยที่ไม่มี tight junction พบว่า ที่บริเวณนี้ไม่พบประจุลบเนื่องจากมี ferritin ที่เป็นประจุบวกเกาะติดกับบริเวณ glycocalyx นอกจากนี้พบว่ามี stoma ซึ่งเป็นช่องเปิดระหว่าง mesothelial cell ทำให้มีการติดต่อกันของ abdominal cavity และ subdiaphragmatic lymphatics โดยที่ stoma จะเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็น lacunae



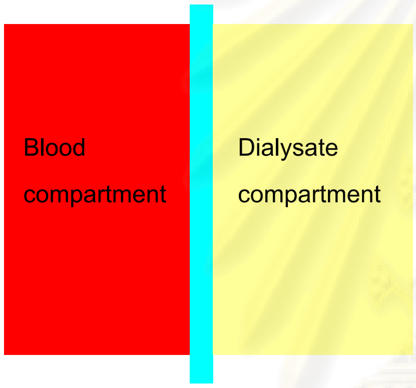
รูปที่ 5. แสดง subdiaphragmatic ของท่อน้ำเหลือง

น้ำเหลืองจากส่วนของโครงร่างน้ำเหลืองนี้จะรวมกันเข้าสู่ procollector ซึ่งเป็นหลอดเลือดฝอยน้ำเหลืองขนาดเล็กที่มีชั้นของกล้ามเนื้อที่ไม่สมบูรณ์อยู่ต่อจากชั้น endothelial cell

หลอดน้ำเหลืองเหล่านี้จะมี semilunar valve นำน้ำเหลืองเข้าสู่หลอดน้ำเหลืองที่มีขนาดใหญ่กว่า (40-200 ไมครอน) ที่มีลักษณะเป็น valvular segment โดยที่มี semilunar bicuspid value อยู่ที่ตอนปลายของแต่ละ segment เรียกส่วนของ collector ในแต่ละ segment ระหว่างลิ้นนี้ว่า lymphangion ซึ่งถือเป็น anatomic และ functional unit ของ collecting lymphatic system [45]

2.3 Peritoneal physiology

การล้างไตทางช่องท้อง อาศัยกระบวนการที่เรียกว่า dialysis ซึ่งเป็นการแลกเปลี่ยนน้ำและสารต่าง ๆ ระหว่างสารละลาย 2 ชนิด ในที่นี้คือ เลือดและน้ำยาที่ใส่ในช่องท้อง โดยผ่านเยื่อบุ (membrane) ที่ทำหน้าที่กั้นและกรองสารต่าง ๆ [46] (รูปที่ 6)



รูปที่ 6. แสดงหลักการของ peritoneal dialysis ซึ่งประกอบด้วย 2 compartment คือ ส่วนของเลือด ซึ่งมีของเสียและเกลือแร่ละลายอยู่ และ ส่วนของน้ำยาล้างไตที่อยู่ในช่องท้อง ซึ่งมีเกลือแร่ละลายอยู่ โดยมีเยื่อบุกั้นระหว่าง 2 ส่วนนี้

วัตถุประสงค์หลักในการล้างไตทางช่องท้อง 2 ประการในการทดแทนการทำงานของไตคือ

1. กำจัดของเสียหรือสารที่เกินความต้องการของร่างกาย โดยอาศัยขบวนการแพร่ (diffusion) และขบวนการนำพา (convection) สารต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากร่างกาย

ในขบวนการแพร่ของสาร อาศัยคุณสมบัติของช่องท้องและความแตกต่างของความเข้มข้นของสารระหว่างในกระแสเลือดกับน้ำยาในช่องท้อง ดังนั้นในกรณีที่ต้องการจำกัดสารออกจากร่างกาย สารเหล่านั้นจะต้องมีความเข้มข้นในน้ำยาต่ำกว่าในกระแสเลือด เช่น โพแทสเซียม เป็นต้น หรือไม่พบในน้ำยา เช่น ยูเรีย และครีเอตินีน จึงจะสามารถที่จะกำจัดสารเหล่านี้ออกจากร่างกายได้ ในขณะเดียวกันเมื่อต้องการรักษาให้สารอยู่ในร่างกาย ในน้ำยาก็จะต้องประกอบด้วยสารที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับในเลือด เช่น โซเดียม คลอไรด์ และแคลเซียม เป็นต้น อย่างไรก็

ตาม ไม่สามารถใส่สารที่มีประโยชน์ทั้งหมดในน้ำยาเนื่องจากปัญหาอื่น ๆ เช่น การเตรียมน้ำยา ผลแทรกซ้อนต่าง ๆ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการผลิต เป็นต้น

ขบวนการนำพา คือ การนำสารออกจากร่างกายโดยอาศัยความสามารถในการละลายของสารนั้นในน้ำ เมื่อมีการดึงน้ำจากหลอดเลือดเข้าสู่ช่องท้อง และออกจากร่างกาย ก็จะนำพาสารออกมาด้วย โดยการนำพานี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเยื่อบุช่องท้องในการกั้นสารเหล่านั้น ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า ประสิทธิภาพการกรอง (sieving coefficient, s) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนของสารที่ผ่านเยื่อบุจาก compartment หนึ่งไปอีก compartment หนึ่ง หรืออาจหมายถึงจากเลือดไปสู่ช่องท้อง และในทางตรงข้าม ประสิทธิภาพการสะท้อนกลับ (reflection coefficient, σ) ซึ่งหมายถึงสัดส่วนของสารที่สะท้อนกลับขณะผ่านเยื่อบุ หรือหมายถึงสัดส่วนของสารที่ไม่กรองผ่านเยื่อบุ ซึ่งในกรณีที่เป็นเยื่อบุอย่างง่าย (simple membrane) ค่า reflection coefficient จะมีค่าเท่ากับ 1-s

ในขบวนการดึงน้ำออกจากร่างกายผู้ป่วย ต้องอาศัยสารที่มีคุณสมบัติในการดูดน้ำที่เรียกว่า osmotic agent หรือ osmolyte ในเลือดมีสาร osmolytes ที่สำคัญคือ โซเดียม ยูเรีย และกลูโคส ในขณะที่ในน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง ก็จะมีการใส่ osmolyte เพื่อเพิ่ม osmolarity ให้กับน้ำยา ที่สำคัญคือ กลูโคส และโซเดียม เพื่อให้เกิดความแตกต่างออสโมสิส (osmotic gradient) ระหว่างเลือดและน้ำยาในช่องท้อง สารที่ใส่ในช่องท้องจะมีคุณสมบัติและความสามารถในการดึงน้ำแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการสะท้อนการดูดซึมกลับ (osmotic reflection coefficient, σ) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในกรณีที่มีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าไม่มีการสะท้อนกลับของสารนั้นทำให้ไม่มีความสามารถในการดูดน้ำกลับโดยอาศัยแรงดันออสโมสิส ในทางตรงข้ามถ้ามีค่าเท่ากับ 1 สารนั้นจะมีคุณสมบัติในการดึงน้ำได้เป็นอย่างดี

2. ปรับสมดุลน้ำในร่างกาย ในผู้ป่วยไตวายจะมีแนวโน้มในการมีภาวะน้ำเกินได้บ่อย ดังนั้นในการทำการล้างไตทางช่องท้องจึงต้องการดึงน้ำส่วนที่เกินออกจากร่างกาย (ultrafiltration) โดยอาศัยคุณสมบัติของเยื่อบุช่องท้อง (peritoneal ultrafiltration coefficient) และคุณสมบัติของสารที่มีความสามารถในการดูดน้ำ (osmolytes) ซึ่ง osmolytes หรือ osmotic agents ที่จะดึงน้ำออกจากร่างกายได้ดีจะต้องอยู่ในช่องท้องได้นานและดูดซึมกลับน้อย (หรือมีค่า osmotic reflection coefficient สูง) โดยสารเหล่านี้ถูกนำมาใส่ในน้ำยาเพื่อเพิ่มความสามารถในการดึงน้ำออกจากผู้ป่วย [47]

2.4 Peritoneal anatomical changes during peritoneal dialysis

ในผู้ป่วย CAPD จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อบุช่องท้อง ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะของน้ำยาล้างไตในปัจจุบันที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ (bioincompatibility) เช่น มีความเป็นกรด ความเข้มข้นของน้ำตาลสูง มี osmolarity สูงกว่าในพลาสมา มีความเข้มข้นของแลคเตทสูง มี

อนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคส (reactive carbonyl compounds) และอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับกรดอะมิโนในช่องท้องของผู้ป่วย (advanced glycation end products) ปริมาณมาก ร่วมกับการเกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง [48-50]

เมื่อทำการผ่าตัดด้วยวิธีการส่องกล้องในผู้ป่วย CAPD พบการเปลี่ยนแปลงของผิวของเยื่อบุช่องท้อง (ชั้น mesothelium) โดยจะเห็นเป็นสีน้ำตาล (tanned) [33] เป็นผลจาก oxidation products ของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำยาล้างไต (รูปที่ 7)

รูปที่ 7. แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของเยื่อบุผนังช่องท้อง

พยาธิสภาพของเยื่อบุช่องท้องที่พบในผู้ป่วย CAPD นั้นมีดังนี้

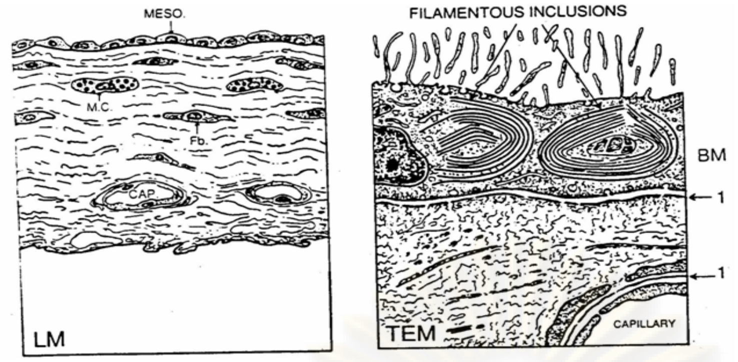
1. mesothelial cells หลุดลอกออกจาก basement membrane

2. ส่วน submesothelial compact zone มีความหนามากขึ้นและ omental tissue เกิด interstitial fibrosis

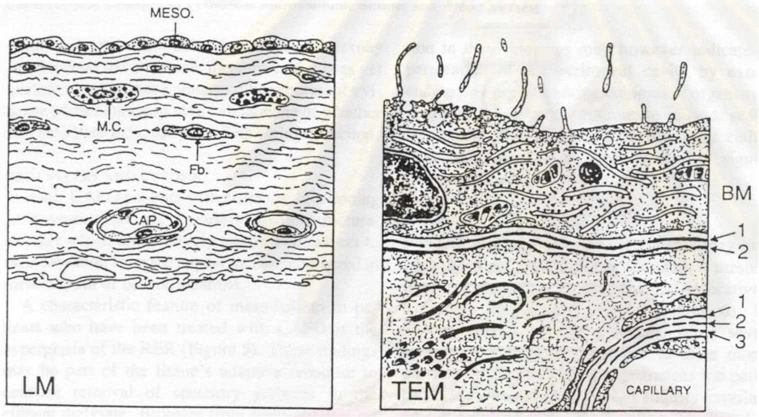
3. หลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะเป็น subendothelial hyalinosis โดยเฉพาะ venules และ small veins รวมทั้งพบหลอดเลือดมีปริมาณมากขึ้น

2.4.1 **การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของ** mesothelial cell

ในผู้ป่วยที่เป็นไตวายเรื้อรัง ผลของของเสียในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cell โดยจากการศึกษาในการตรวจเนื้อเยื่อบุช่องท้อง โดยใช้ transmission electron microscope (TEM) [33] พบว่าร้อยละ 36 จะมี distinctive cytoplasmic inclusions และกลายเป็น paracrystalline deposition ใน RER เมื่อมีการสะสมมากขึ้น ทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อบุเซลล์ทำให้เกิดการหลุดของเซลล์ออกจาก basement membrane [51] ร่วมกับการแตกของเซลล์เยื่อบุช่องท้อง (รูปที่ 8 และ 9)



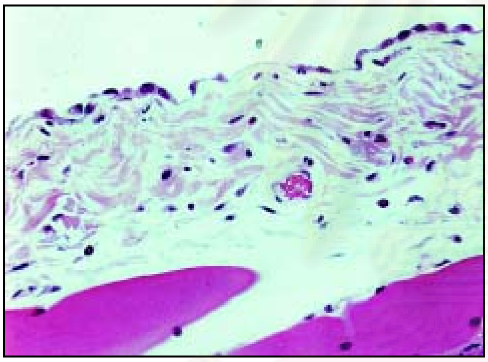
รูปที่ 8. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในรายที่เป็น uremia
(ซ้ายมือ แสดง light microscope ซึ่งไม่แตกต่างจากปกติ รูปขวามือ แสดง intracytoplasmic filamentous inclusions ใน mesothelial cell, mesothelium, MESO; mast cell, MC; fibroblast, Fb; capillary, CAP; basement membrane, BM) [51]



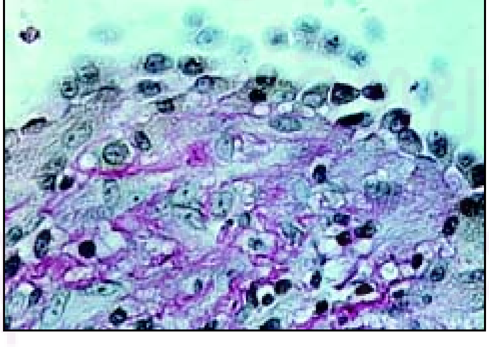
รูปที่ 9. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในผู้ป่วย CAPD
(รูปซ้ายมือ แสดง light microscope ซึ่งไม่แตกต่างจากปกติ และรูปขวามือ แสดงการลดลงของ microvilli และ micropinocytotic vesicles ร่วมกับการเพิ่ม RER ทั้งในรายที่เป็นเบาหวานและไม่เป็นเบาหวาน จะพบมี reduplication ของ basement membrane (BM-1, 2, 3) mesothelium, MESO; mast cell, MC; fibroblast, Fb) [51]

เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ต้องสัมผัสกับน้ำยาล้างไตโดยตรงจึงเกิดการบาดเจ็บ และหลุดลอกออกมาในช่องท้อง ร่างกายจึงปรับตัวโดยการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทน (remesothelization) ในอัตราที่สูงประกอบกับเซลล์ชนิดนี้มีหน้าที่ผลิตสารต่าง ๆ เช่น phospholipids, collagen, elastin, proteoglycans, fibronectin, interleukins, growth factors และ prostaglandins [52-59] ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากสารดังกล่าวถูกเจือจางด้วยน้ำยาล้างไต จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์จากลักษณะแบน (epithelial-like) เป็นลักษณะกลม หรือเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์

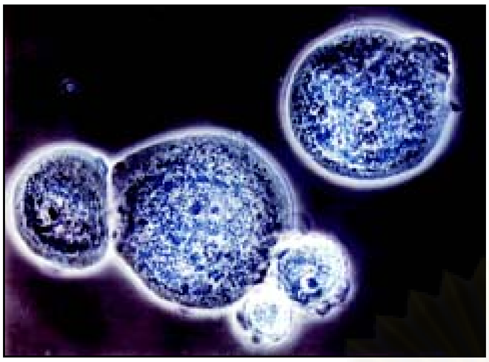
(non-epitheloid type) ที่มีคุณสมบัติของ mesenchymal cell ซึ่งเรียกว่าเกิด epithelial mesenchymal transition (EMT) ทำหน้าที่คล้ายกับ secretory cell และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ของ myofibroblast ซึ่งจะมีเยื่อไฟเบอร์ที่คล้ายกับที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบซึ่งสามารถหดตัว (contractile fiber) และยึดติดระหว่างเซลล์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibronexi) โดยมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุม extracellular matrix และสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิดพังผืดของเยื่อบุช่องท้อง [60-62] ร่วมกับลักษณะของ microvilli ที่ผิวเซลล์จะมีลักษณะสั้นลง ปริมาณลดลงและจะหายไปในที่สุด [63] (รูปที่ 10-15) โดยเฉพาะหลังการล้างไตติดต่อกันนานประมาณ 8-10 เดือน เชื่อว่าเป็นผลจากการใส่น้ำยาล้างไตในช่องท้องทำให้ visceral peritoneum และ parietal peritoneum ไม่ได้สัมผัสกัน ซึ่งการสัมผัสกันของเยื่อบุช่องท้องทั้ง 2 ส่วนจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด microvilli ประกอบกับแลคเตทในน้ำยาล้างไตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณ microvilli ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอีกตำแหน่งคือ intercellular junction โดยจะมีการเปิดช่อง ณ บริเวณนี้ตั้งแต่ระยะแรก ๆ ที่เริ่มล้างไต



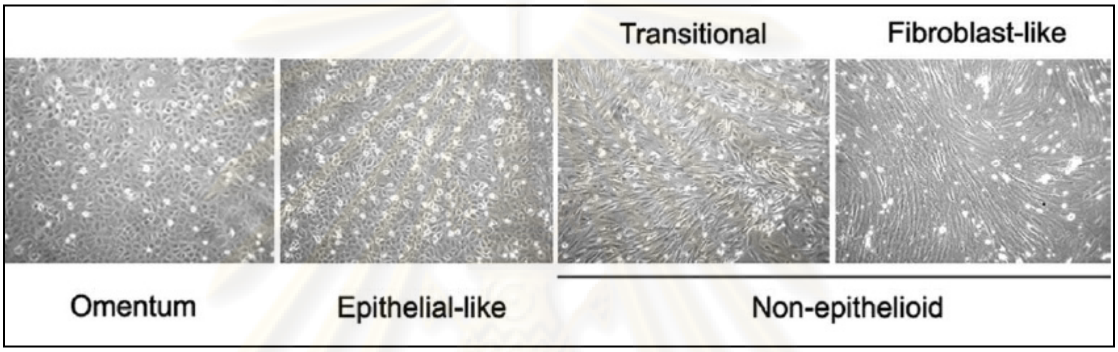
รูปที่ 10. แสดงเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 40 วัน พบว่ามีบางบริเวณที่ไม่มีเซลล์ปกคลุม และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เป็นแบบลูกบาศก์



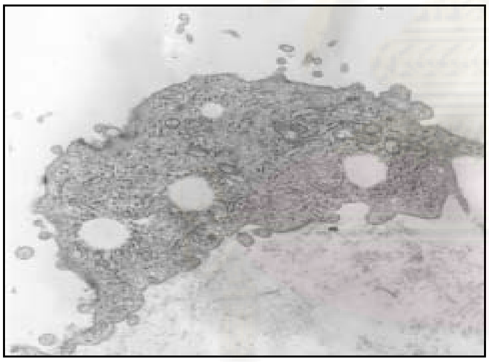
รูปที่ 11. แสดงให้เห็นถึงการหลุดลอกของ mesothelial cells ออกมาในช่องท้อง



รูปที่ 12. แสดง mesothelial cells ที่ตรวจพบในน้ำยาล้างไต



รูปที่ 13. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ

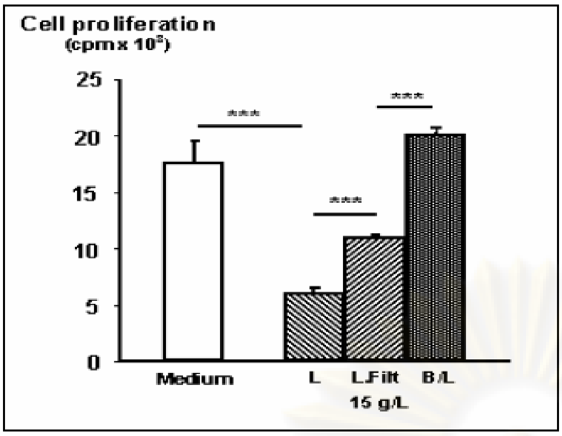


รูปที่ 14. แสดง mesothelial cells ในเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 25 วัน พบว่า microvilli สั้นลง

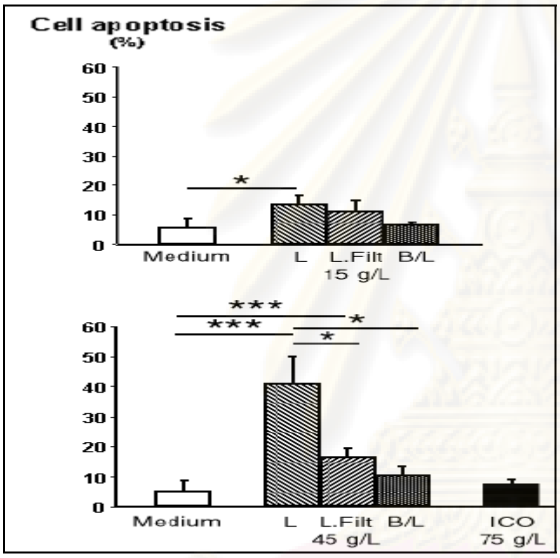
รูปที่ 15. แสดงลักษณะเยื่อบุช่องท้องหลังล้างไต 14 เดือน ไม่พบลักษณะของ microvilli

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติอื่น ๆ ของเซลล์ เช่น สารคัดหลั่งต่าง ๆ ของเซลล์ และการอยู่รอดของเซลล์โดยสามารถศึกษาได้โดยอาศัยสารต่าง ๆ ที่หลั่งออกมาจาก mesothelial cell (peritoneal biomarker) ต่าง ๆ เช่น phosphatidylcholine, cancer antigen 125 (CA125), hyaluronan, coagulation และ fibrinolytic factor รวมทั้ง pro และ antiinflammatory agents ต่าง ๆ ทั้ง cytokines และ chemokines รวมไปถึง matrix metalloproteinase (MMP-2) (gelatinase A), MMP-3 (stromelysin), MMP-9 และ tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) ต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ขององค์ประกอบของ basement membrane [64], การตรวจ MTT assay, การตรวจ trypan blue staining รวมถึง การตอบสนองของเซลล์ต่อปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น การกระตุ้นการหลั่งสาร interleukin-6, MCP-1 เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มของเซลล์ที่ตายก่อนกำหนดที่เรียกว่า apoptotic cell ทั้ง mesothelial cell และเซลล์อื่น ๆ ในผู้ป่วยที่ล้างไตทางช่องท้องอีกด้วย โดย Boulanger และคณะ [18] ได้ศึกษาผลของน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ 4 ชนิด ประกอบด้วย heat sterilized dextrose lactate, filtered dextrose lactate, heat sterilized dextrose bicarbonate lactate และ heat sterilized icodextrin lactate ต่อการแบ่งตัวของ mesothelial cells ที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยประเมินการแบ่งตัวของเซลล์ อัตราการเกิดกระบวนการ apoptosis และ necrosis พบว่าขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร การแบ่งตัวของ mesothelial cells ในน้ำยากลุ่ม heat sterilized dextrose bicarbonate lactate ดีกว่ากลุ่ม filtered dextrose lactate และ heat sterilized dextrose lactate ตามลำดับ ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร การแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยากลุ่ม heat sterilized icodextrin lactate เท่ากับกลุ่ม heat sterilized dextrose bicarbonate lactate และทั้ง 2 กลุ่มมีการแบ่งตัวของเซลล์ดีกว่ากลุ่ม filtered dextrose lactate และ heat sterilized dextrose lactate ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 15 และ 45 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรมีการแบ่งตัวดีกว่า ร่วมกับมีปริมาณเซลล์ที่ตายผ่านกระบวนการ apoptosis และ necrosis น้อยกว่าประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 16 และ 17) จากการศึกษานี้ได้ข้อสรุปว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงและสารประกอบประเภท advanced glycation end products ในน้ำยาล้างไตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ mitochondria และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของ mesothelial cells ยับยั้งการเติบโตของเซลล์และขัดขวางกระบวนการ remesothelialization



รูปที่ 16. แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 17. แสดงปริมาณ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ (L; heat sterilized dextrose lactate, L.Filt; heat sterilized dextrose bicarbonate lactate, B/L; heat sterilized dextrose bicarbonate lactate, ICO; heat sterilized icodextrin lactate, 15 g/L; ความเข้มข้นของน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร, 45 g/L; ความเข้มข้นของน้ำตาล 45 กรัมต่อลิตร)

Chen และคณะ ศึกษาปริมาณ mesothelial cells ที่เกิดกระบวนการ apoptosis ในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง เปรียบเทียบกับผู้ป่วย CAPD พบว่า สัดส่วนของเซลล์ที่เกิด apoptosis มีปริมาณมากขึ้นตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ ขณะที่ปริมาณเซลล์ทั้งหมดลดลง ดังตารางที่ 1 และผู้ป่วยที่ล้างไตทางช่องท้องที่ไม่ได้เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้องสามารถตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ได้เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยกว่าผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญ [65]

ตารางที่ 1. แสดงปริมาณเซลล์ตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ

	Day 5	Day 15	Day 28	Non-infective control
Total cell count (x 10^6/L)	0.16 $\pm$ 0.048	0.04 $\pm$ 0.02	0.014 $\pm$ 0.0076	0.004 $\pm$ 0.001
Mesothelial cells (%)	9.2 $\pm$ 1.9	9.0 $\pm$ 1.5	12.3 $\pm$ 1.9	4.2 $\pm$ 2.5
Percentage of M30 positive	9.5 $\pm$ 3.2*	12.5 $\pm$ 4.6*	16.1 $\pm$ 6.3*	4.7 $\pm$ 1.8

หมายเหตุ * P < 0.0001 compared with non-infective PDE.

Marina และคณะ ศึกษาเกี่ยวกับ lethal cytokines ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของ mesothelial cells โดยนำตัวอย่างจากน้ำยาล้างไตในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง และผู้ป่วย CAPD พบว่าระหว่างที่เกิดการอักเสบติดเชื้อ เซลล์ส่วนใหญ่ที่เกิดกระบวนการ apoptosis คือเซลล์เม็ดเลือดขาว และมีเพียงร้อยละ 0.5-5 ที่เป็น mesothelial cells โดยสัดส่วนของเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นขณะที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดลดลงในระหว่างการรักษา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen และคณะ คือสามารถตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในผู้ป่วย CAPD ซึ่งตามธรรมชาติเซลล์ที่เกิด apoptosis จะถูกกำจัดโดยเซลล์ข้างเคียงภายในระยะเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง การที่สามารถตรวจพบเซลล์ดังกล่าวในน้ำยาล้างไตของผู้ป่วย บ่งบอกถึงปริมาณ mesothelial cells ที่อาจเกิด apoptosis ปริมาณสูง ส่วน cytokines ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ที่ตรวจพบในการศึกษานี้คือ FASL โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง [66]

สรุปจากการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการล้างไตทางช่องท้องด้วยน้ำยาล้างไตที่ใช้กันในปัจจุบัน ส่งผลให้ mesothelial cells เกิด apoptosis ซึ่งจะถูกกำจัดโดยเซลล์ macrophages หากตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตบ่งชี้ถึงปริมาณเซลล์จำนวนมากที่เกิดกระบวนการนี้ ทำให้เยื่อบุช่องท้องปราศจาก mesothelial cells ปกคลุม และเชื่อว่าเป็นกลไกที่สำคัญกลไกหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อบุช่องท้อง โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mesothelial cell ที่บุบริเวณผิวของเยื่อบุช่องท้องที่ลดลงกับความหนาของชั้น submesothelium compact zone และจำนวนของหลอดเลือดที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ

2.4.2 **การเกิดพังผืดในชั้นใต้เยื่อบุผิว** (Submesothelial fibrosis)

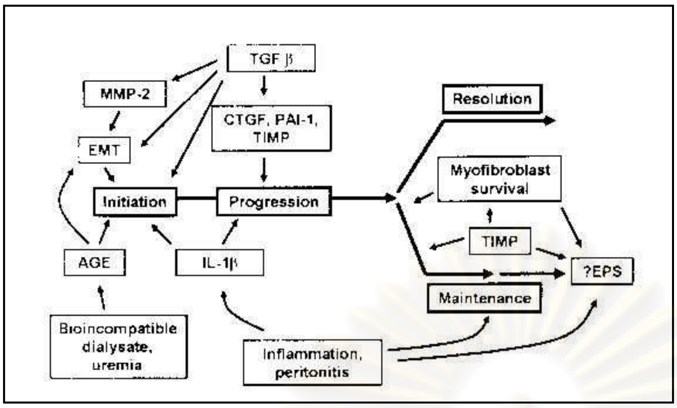
จากข้อมูลที่ทราบกันทั่วไปแล้วว่าเมื่อ peritoneum สัมผัสกับ dialysis solution เป็นระยะเวลานาน ๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cell (mesothelial modification)

ได้แก่ การเปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ โดยการเปลี่ยนรูปร่างเป็น cuboidal form และมีการสูญเสียของ mesothelial cell และเกิดการหนาตัวของ basement membrane ขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงที่ submesothelial region และเกิด simple sclerosis ตามมา โดยความหนาของ submesothelium compact zone นั้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ทำ CAPD

กลไกการเกิดพังผืดเยื่อบุช่องท้องสัมพันธ์กับ cytokine ที่สำคัญที่มีบทบาทต่อกระบวนการอักเสบและผลตามมาต่อการเกิดพังผืด คือ transforming growth factor beta (TGF-β) ซึ่ง mesothelial cell สามารถเพิ่มการแสดงออกของ TGF-β mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IL-1 จากการที่มีการเพิ่มขึ้นของ TGF-β มีผลต่อการควบคุมการทำงานของเซลล์ ทั้ง proliferation, differentiation, adhesion และ apoptosis และยังมีผลต่อความผิดปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เกิดความผิดปกติและเกิดพังผืดตามมา ตามรูปที่ 18 [67] นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ichiro และคณะ พบว่าในหนูแรทที่ได้รับ glucose degradation products (GDPs) ชนิดหนึ่งคือ methylglyoxal (MGO) ที่ผสมในน้ำยาล้างไตนั้นพบการเพิ่มการแสดงออกของ TGF-β, collagen, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ advanced glycation end products receptor (RAGE) อีกทั้ง MGO ยังส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของ E-cadherin ส่วน TGF-β นั้นส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของ E-cadherin และ cytokeratin ซึ่งเป็น epithelial marker [68] โดยการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนที่กล่าวมานั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด EMT ผ่านทางการควบคุมจาก transcription factor snail สอดคล้องกับการศึกษาของ Eun-Joo Oh และคณะ ที่พบว่าในหนูแรทที่ได้รับน้ำยาล้างไตที่มี GDPs ในปริมาณที่ต่ำนั้นพบการเกิด peritoneal fibrosis ลดลงและโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peritoneal fibrosis เช่น α-smooth muscle actin (α-SMA) นั้นมีการแสดงออกน้อยกว่าในหนูแรทที่ได้รับน้ำยาล้างไตที่มี GDPs ในปริมาณที่สูง [69] และจากการศึกษาของ Chieko Higuchi และคณะพบว่าปริมาณของกลูโคสที่สูงนั้นมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ใน fibroblast อีกด้วย [70]

กลไกการเกิด peritoneal fibrosis นั้นได้มีผู้ทำการศึกษาไว้มากมายโดย Qiang Yao และคณะพบว่ากลไกการเกิด peritoneal fibrosis นั้นเกิดผ่านทาง TGF/Smad pathway [71] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Qinghua Liu และคณะที่พบว่า TGF/Smad pathway ที่ส่งผลต่อการเกิด peritoneal fibrosis นั้นผ่าน C-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling [72] อีกทั้ง Strippoli และคณะพบว่าการเกิด EMT นั้นผ่านทาง ERK/NF-κB/Snail-1 pathway ซึ่งการเกิด EMT นั้นมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุม extracellular matrix และสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิดพังผืดของเยื่อบุช่องท้อง [77]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18. แสดงการเกิดกลไกพังผืดในรายที่ทำการล้างไตทางช่องท้อง [67]

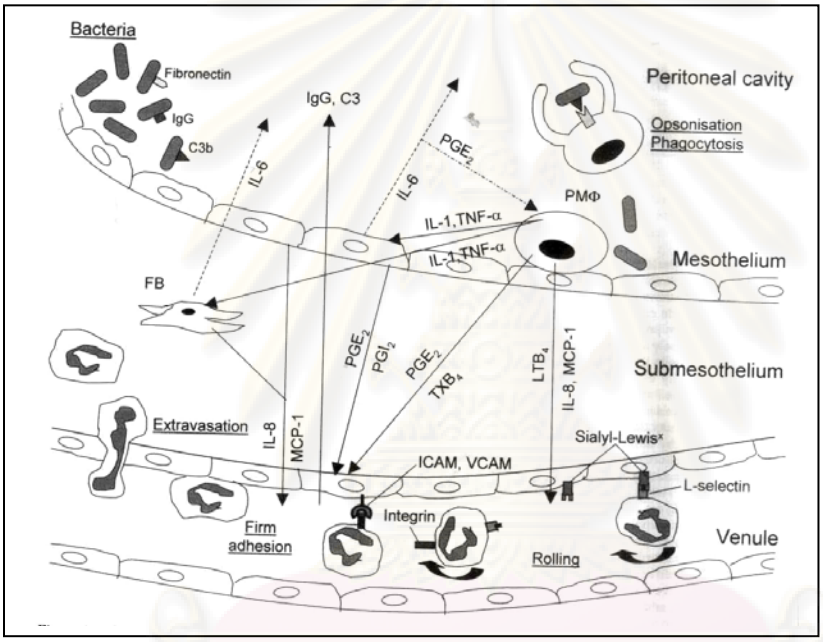
2.4.3 ปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายและการเกิดหลอดเลือดใหม่

ในสภาวะปกติซึ่งมีน้ำอยู่ในช่องท้องน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร และจะมีปริมาณเซลล์ต่าง ๆ ประมาณ 7-12 ล้านเซลล์ โดยที่เซลล์ส่วนใหญ่เป็น peritoneal macrophage (มากกว่าร้อยละ 90) และเป็น lymphocyte (ประมาณ ร้อยละ 5-10) และ polymorphonuclear cell (น้อยกว่าร้อยละ 5) [74] ในรายที่ทำการล้างไตทางช่องท้อง พบว่า ในน้ำยา peritoneal effluent จะมี mesothelial cell ร้อยละ 4.4 และ macrophage ร้อยละ 57

ปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกาย เริ่มต้นจากการกระตุ้น peritoneal macrophage จากเชื้อก่อโรคหรือสารที่หลั่งจากเชื้อเหล่านั้น เช่น lipopolysaccharide ฯลฯ ซึ่งเริ่มต้นจากเกาะติดของเชื้อหรือองค์ประกอบของเชื้อกับ serum factor ต่าง ๆ ซึ่งเรียกว่า ขบวนการ opsonization (ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญคือ IgG, C3 และ fibronectin) ที่เชื้อก่อโรค หลังจากนั้นจับกับตัวรับของ macrophage ซึ่งสามารถกระตุ้น complement cascade โดยการย่อย C3 ให้เกิด C3b ซึ่งสามารถจับกับตัวรับที่ monocytes, polymorphonuclear cell และ peritoneal macrophage อย่างไรก็ตามเชื้อบางชนิดเช่น Staphylococcus aureus สามารถที่จะกระตุ้น IgG molecule บนเยื่อบุ peritoneal macrophage โดยที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการ opsonization

หลังจากที่ peritoneal macrophage ถูกกระตุ้น ทำให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine ชนิดต่าง ๆ เช่น tumor necrotic factor alpha (TNF-α), interleukin-1 (IL-1), IL-6 และ IL-8 รวมทั้งกระตุ้นให้มีการหลั่ง chemotracttractants leukotriene B_4 (LTB_4) และ monocyte chempotactic protein-1 (MCP-1) และการกระตุ้นผ่านทาง prostaglandin E_2 (PGE_2) และ trombroxane B_2 (TXB_2) โดยพบว่าในรายที่เกิดการอักเสบเยื่อบุช่องท้อง จะมีการเพิ่มขึ้นของ PGE_2 ร้อยละ 199 และ 6-keto PGF1 alpha ร้อยละ 68 รวมทั้ง TXB_2 ร้อยละ 44 [75]

นอกจากนี้ TNF-α และ IL-1 สามารถกระตุ้น macrophage ได้โดยตรงให้มีการเพิ่มการหลั่ง PGE_2 และ TXB_2 ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดและการเพิ่ม vascular permeability ทำให้มีการรั่วของโปรตีนต่าง ๆ รวมทั้ง opsonin จากเลือดเข้าสู่ช่องท้อง ในขณะที่ IL-8, MCP-1 และ LTB_4 จะกระตุ้นการอักเสบโดยการดึง polymorphonuclear cell และ monocyte มายังตำแหน่งที่การอักเสบ ในขณะที่ IL-6 และ PGE_2 จะควบคุม macrophage และควบคุมการขยายตัวของการอักเสบ ซึ่งในการควบคุมการอักเสบยังถูกควบคุมโดย IL-1 receptor antagonist (IL-1r) และ TNF-soluble receptor ที่หลั่งออกมาจาก PMN และ monocytes (รูปที่ 19)



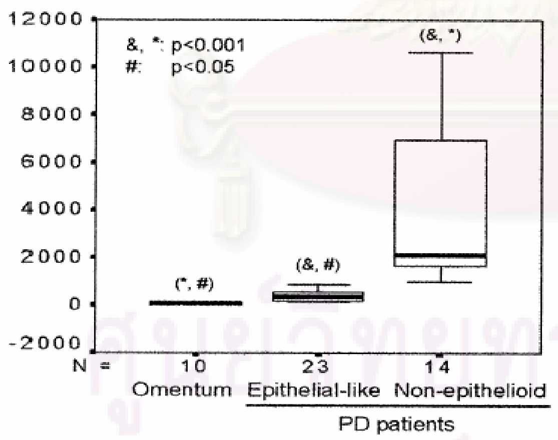
รูปที่ 19. แสดงกระบวนการอักเสบและ inflammatory response ต่อการติดเชื้อก่อโรค [75]

จาก inflammatory mediator และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือด จะพบมีการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือด (neoangiogenesis, granulation tiissue) ซึ่งพบเพิ่มจำนวนตามระยะเวลาของการทำ PD แต่จะพบมากขึ้นในรายที่เกิดการอักเสบของเยื่อบุช่องท้อง และในรายที่มีการอักเสบเรื้อรังจนเกิดเป็นพังผืดของเยื่อบุช่องท้อง น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ VEGF [76] ซึ่งคล้ายกับในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ dilated vessels และพบการหนาตัวของชั้น tunica media ซึ่งในบางรายอาจมีการอุดตันของเส้นเลือดได้

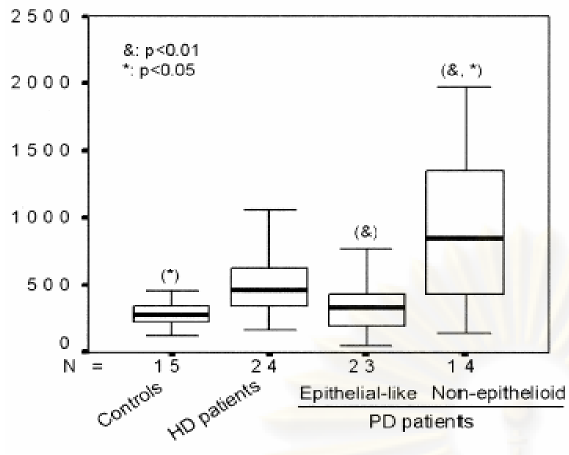
การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด จะพบมีการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือด ซึ่งพบเพิ่มจำนวนตามระยะเวลาของการทำ PD แต่จะพบมากขึ้นในรายที่เป็น peritoneal sclerosis

น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ VEGF [77] ซึ่งคล้ายกับที่พบในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ dilated vessels และพบการหนาตัวของชั้น tunica media ส่งผลให้หลอดเลือดมีลักษณะตีบแคบลง ในบางรายอาจมีการอุดตันของเส้นเลือดได้ นอกจากนี้พบ cellular infiltration รวมทั้งอาจพบ activated endothelial cell ในรายที่เป็น SEP ได้ [76]

ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อบุช่องท้องในตำแหน่งใดเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในการแลกเปลี่ยนสสารและน้ำ เช่นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ endothelial lining peritoneal capillaries [13] หรือการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells ที่เป็นเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุช่องท้องเป็นลักษณะ fibrosis และ neoangiogenesis เนื่องจาก VEGF ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น potent proangiogenic factor พบว่ามีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วย CAPD และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อบุช่องท้องดังกล่าว โดยเชื่อว่าเป็นหนึ่งในกลไกหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การศึกษาของ Aroeira และคณะ พบว่า mesothelial cells มีความสามารถสร้าง VEGF ได้ปริมาณมากถ้ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะจากเซลล์ epitheliod mesothelium เป็น non-epitheliod mesothelium (รูปที่ 13) โดยการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถตรวจพบในผู้ป่วย CAPD ร่วมกับพบว่าน้ำยาล้างไตที่ถ่ายเทจากเซลล์ non-epitheliod mesothelium มีค่า VEGF มากกว่าระดับ VEGF ในพลาสมา (รูปที่ 20 และ 21) [78]



รูปที่ 20. แสดงระดับ VEGF จากน้ำที่ถ่ายจากผู้ป่วย CAPD ที่มีลักษณะ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 21. แสดงระดับ VEGF ในซีรั่มของผู้ป่วย

2.5 Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-γ)

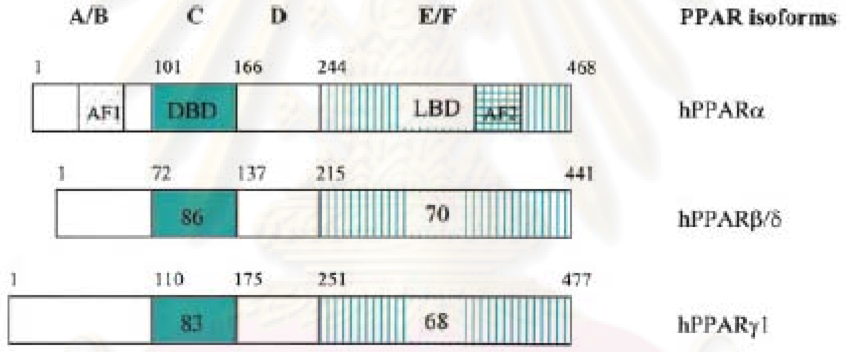
PPAR เป็นเป้าหมายสำคัญในการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม TZDs ซึ่งเป็นยาลดน้ำตาลตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติลดภาวะ insulin resistance ในผู้ป่วยเบาหวาน ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย อีกทั้งยังสามารถชะลอการเสื่อมหน้าที่ของไตจากภาวะเบาหวาน (diabetic nephropathy) และจากสาเหตุอื่น ๆ (non-diabetic nephropathy)

PPAR อยู่ในตระกูล nuclear hormone receptor กลุ่มเดียวกับ thyroid และ steroid hormones ในปัจจุบันสามารถแบ่ง PPAR เป็น 3 isoforms ได้แก่ PPAR-α, PPAR-β และ PPAR-γ ทั้ง 3 isoforms มีลักษณะพื้นฐานและการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันคือประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วน (รูปที่ 22) คือ 1) N-terminal ligand-independent transactivation domain (A/B domain) 2) DNA binding domain (DBD หรือ C domain) 3) cofactor docking domain (D domain) 4) C-terminal E/F domain ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ ligand binding domain (LBD) และ ligand-dependent transactivation domain (AF2 domain) พบความแตกต่างในการกระจายตัว ชนิดของตัวกระตุ้น และการแสดงออกของทั้ง 3 isoforms คือ

1. PPAR-α พบได้แพร่หลายในอวัยวะที่มีปฏิกิริยา β-oxidation ในไมโตคอนเดรียสูง ได้แก่ ตับ, หัวใจ, ลำไส้เล็ก, brown fat และ renal cortex สร้างจากโครโมโซมคู่ที่ 22 ทำหน้าที่ในการควบคุมการเผาผลาญไขมันและเมตาบอลิซึมของร่างกาย สามารถจับได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับกรดไขมันในร่างกาย ได้แก่ palmitic acid, oleic acid, linoleic acid และ arachnodic acid และกับยาในกลุ่ม fibrates เช่น fenofibrate, bezafibrate และ gemfibrozil มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถป้องกันและยับยั้งกระบวนการ atherosclerosis ในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยได้

2. PPAR-β พบกระจายตัวเกือบทุกอวัยวะแต่ในปริมาณน้อย ได้แก่ ผิวหนัง สมอง และเนื้อเยื่อไขมัน สร้างจากโครโมโซมคู่ที่ 6 ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของ embryo และการงอกของกระดูก

3. PPAR-γ สร้างจากโครโมโซมคู่ที่ 3 พบว่าในมนุษย์มี PPAR-γ ทั้งหมด 3 subtypes คือ PPAR-γ1, PPAR-γ2 และ PPAR-γ3 พบ PPAR-γ1 ได้บ้างในเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ม้าม กล้ามเนื้อลาย เซลล์บุผนังหลอดเลือด และ macrophage นอกจากนี้ยังพบได้ในปริมาณต่ำ ๆ ในเนื้อเยื่อที่มี PPAR-α ปริมาณมาก เช่น ตับ, หัวใจ และกล้ามเนื้อลาย พบ PPAR-γ2 ปริมาณสูงในเนื้อเยื่อไขมัน ไม่พบว่าทั้งสาม subtype ของ PPAR-γ มีความแตกต่างในหน้าที่การทำงาน เนื่องด้วยความใหญ่ของ LBD บนโครงสร้างของ PPAR-γ ทำให้พบ ligand เป็นจำนวนมากที่สามารถจับได้จำเพาะกับ PPAR-γ ทั้งที่เป็นกรดไขมัน, สารสังเคราะห์ทั้งที่เป็นยาในกลุ่ม TZDs, phenylacetic acid และ NSAIDs พบว่ามีเพียงยาในกลุ่ม TZDs เท่านั้นที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ PPAR-γ โดยมีสัมประสิทธิ์ในการจับสูงกว่ากรดไขมัน 100-1,000 เท่า

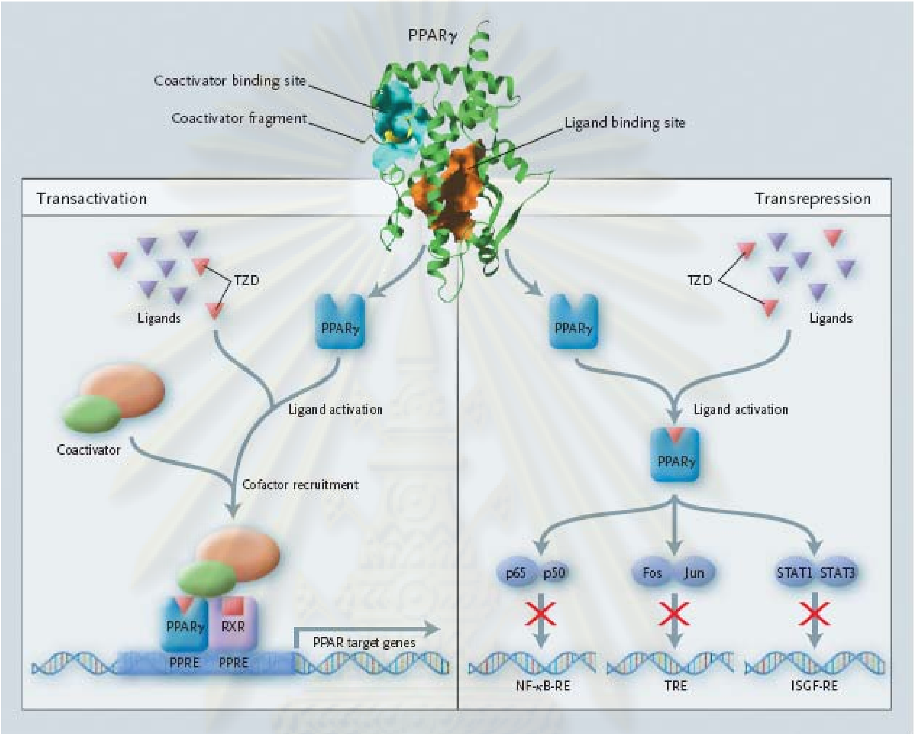


รูปที่ 22. แสดงโครงสร้างเปปไทด์ของทั้ง 3 isoforms ของ PPARs ซึ่งประกอบด้วย transactivation domains (AF1 และ AF2), DNA binding domain (DBD), cofactor docking domain (D) และ ligand binding domain (LBD) [79]

เมื่อ PPAR จับกับตัวกระตุ้น (ligand) จะกระตุ้นยีนให้เกิดการสร้างโปรตีนผ่านทาง 2 กลไก (รูปที่ 23)

1. transactivation เป็นกระบวนการสร้างโปรตีนและควบคุมเซลล์ของ PPAR โดยอาศัย DNA หลังจาก PPAR จับคู่กับ specific ligand แล้วจะเกิดการ heterodimerization กับ retinoid X receptor (RXR) ก่อนไปจับจำเพาะกับ DNA ในส่วนที่เป็น promoter region ของยีนเป้าหมายที่เรียกว่า PPAR response elements (PPRE) ก่อให้เกิดการเพิ่มหรือลดการ transcription ของยีนเป้าหมาย

2. transrepression เป็นกระบวนการยับยั้งการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวเนื่องกับขบวนการการอักเสบของร่างกายโดยรบกวน signal-transduction pathway ของ nuclear factor kappa B (NF-κB), phorbol ester responsive element (TRE) และ interferon-stimulated gene factor response element (ISGF-RE) โดยกระบวนการนี้ไม่ต้องพึ่ง DNA [79]



รูปที่ 23. แสดงกลไกการควบคุมยีนของ PPAR โดยผ่านกระบวนการ transactivation และ transrepression [79]

การแสดงออกและหน้าที่ของ PPAR ที่ไต ไตแสดงออกทั้ง 3 isoforms ของ PPAR โดยพบ PPAR-α มากที่ proximal tubules และ medullary thick ascending limbs ของ henle loop พบเป็นส่วนน้อยใน glomerular mesangial cells มีบทบาทสำคัญในการควบคุม fatty acid oxidation ภายในเซลล์ และการรักษาสมดุลพลังงานในไต ทั้งกระบวนการผลิตและการเผาผลาญพลังงาน โดยเป็นกลไกหนึ่งของไตในการปรับตัวกับภาวะขาดสารอาหาร ด้วยเหตุนี้จึงแสดงบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิด ischemic/reperfusion injury ของไตในบริเวณดังกล่าวได้ พบ PPAR-β ได้ทั่วไปในทุก ๆ segment ของ nephron ทั้งใน renal cortex และ medulla ในปริมาณที่ต่ำมาก และไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดที่ไตในปัจจุบัน ต่างจาก PPAR-γ ที่พบได้มากบริเวณท่อไตส่วน medullary collecting ducts เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการดูดกลับของน้ำและเกลือแร่ ก่อให้เกิดภาวการณ์คั่งของเกลือและสารน้ำในผู้ป่วยบางรายได้ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ PPAR-γ ใน glomeruli ได้ในปริมาณเล็กน้อยภายในเซลล์บุผนังหลอดเลือด,

mesangial cells และ podocyte เชื่อว่าการแสดงออกของ PPAR-γ ภายใน mesangial cells นี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันไม่ให้ไตของผู้ป่วยเบาหวานเสื่อมสภาพจากกระบวนการ glomerulosclerosis จากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น (proliferation) การสร้างโปรตีนนอกเซลล์ (extracellular matrix: ECM) และการกลายพันธุ์ (transdifferentiation) เป็น myofibroblast ของ mesangial cells ดังตารางที่ 2 [80]

ตารางที่ 2. แสดงผลของยาในกลุ่ม thiazolidinediones ของเซลล์ต่าง ๆ ของไต [80]

PPAR subtype	mesangial cells	proximal tubular cells	Interstitial fibroblasts	vasculature
PPAR-α	antifibrotic	Energy utilization	unknown	Antiinflammation Anti-atherogenic
PPAR-β	Energy utilization	Energy utilization	cytoprotective	Anti-atherogenic
PPAR-γ	Antiproliferative Antifibrotic antiinflammation	Antiproliferative Antifibrotic antiinflammation	Antiproliferative Antifibrotic antiinflammation	Antiinflammation Anti-atherogenic

2.6 โครงสร้างและเภสัชจนศาสตร์ของยาในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs)

ยา TZDs เป็นกลุ่มของยาที่มีโครงสร้างหลักเป็น 2,4 thiazolidinedione ring ซึ่งยา TZDs นั้นสามารถลดน้ำตาลในเลือดโดยออกฤทธิ์เพิ่มความไวของร่างกายต่ออินสุลิน (insulin sensitizer) ประกอบด้วยยา 5 ตัวคือ troglitazone (TGZ), RGZ, PGZ, ciglitazone และ englitazone พบภาวะแทรกซ้อนจาก ciglitazone และ englitazone มากในสัตว์ทดลองจึงไม่มีการนำยามาใช้รักษาผู้ป่วย TGZ เป็น TZDs ตัวแรกที่นำมาใช้รักษาผู้ป่วยในสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 ตามด้วย rosiglitazone และ pioglitazone ในปี พ.ศ. 2542 แต่ TZD ถูกถอดออกจากทะเบียนยาใน ปี พ.ศ. 2543 เนื่องจากพบภาวะแทรกซ้อนทางตับที่รุนแรง ปัจจุบันจึงเหลือยากลุ่มนี้ 2 ตัว คือ RGZ และ PGZ สามารถบริหารยา RGZ และ PGZ ได้ทางปาก เนื่องจากถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีโดยไม่ถูกรบกวนด้วยอาหาร เกือบทั้งหมดของยาจะถูกทำลายที่ตับโดยอาศัย cytochrome P450 ยา PGZ ถูกขับออกจากร่างกายทางไตร้อยละ 20-30 และทางน้ำดีในส่วนที่เหลือ ต่างจาก RGZ ที่ขับออกทางน้ำดีเป็นส่วนใหญ่ ไม่พบว่าผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่องจะมีเภสัชจนศาสตร์ของยาต่างจากคนปกติ Budde และคณะ ทำการศึกษาเภสัช

จนศาสตร์ของยาเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติ (creatinine clearance > 80 ml/min) จำนวน 6 ราย ผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่อง แบ่งเป็นผู้ที่มีไตเสื่อมปานกลาง (creatinine clearance 30-60 ml/min) จำนวน 9 ราย และผู้ที่มีไตเสื่อมรุนแรง (creatinine clearance < 30 ml/min) จำนวน 12 ราย พบว่าผู้ป่วยไตวายจะมี elimination half-life ของยา PGZ ไม่ต่างไปจากผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติ แต่ในผู้ป่วยที่ไตวายรุนแรงจะมี area under the plasma concentration time curve (AUC) ของยา PGZ และอนุพันธุ์ (metabolism) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตปกติเล็กน้อย อย่างไรก็ตามไม่พบอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องปรับลดขนาดของยาทั้งสองในผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตลดลง [81]

ภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยากลุ่ม TZDs พบได้บ่อย (ตารางที่ 3) ส่วนใหญ่เป็นผลสืบเนื่องมาจากการคั่งของเกลือและสารน้ำในร่างกายผู้ป่วย ได้แก่ น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การบวมน้ำและการลดลงของค่า hemoglobin โดยผู้ป่วยบางรายอาจมีระดับ hemoglobin ลดลง 1 gm/dl พบความรุนแรงดังกล่าวมากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยาร่วมกับการใช้อินสุลิน โดยมีอุบัติการณ์ร้อยละ 15 เทียบกับร้อยละ 4.8 ในผู้ป่วยที่ได้รับยา TZDs อย่างเดียว ในบางรายรุนแรงถึงขั้นทำให้ผู้ป่วยมีภาวะหัวใจวายได้ ด้วยเหตุนี้องค์การอาหารและยาในสหรัฐอเมริกา (US-FDA) ไม่อนุญาตให้ใช้ยา TZDs ในผู้ป่วย functional class 3 และ 4 โดย New York Heart Association และในประเทศแถบยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้ยา TZDs ร่วมกับอินสุลิน อย่างไรก็ตามสามารถแก้ไขภาวะบวมน้ำโดยการให้ร่วมกับยาขับปัสสาวะ และหายได้หลังจากหยุดยา ส่วนใหญ่ภาวะบวมน้ำจะเกิดขึ้นภายใน 1 เดือนหลังเริ่มบริหารยา เชื่อว่ากลไกการคั่งของเกลือและน้ำเกิดจากการที่ยาออกฤทธิ์เพิ่มการดูดกลับของเกลือที่ท่อไตส่วนปลาย โดยเพิ่มการทำงานของ epithelium sodium channel (ENAC), serum and glucocorticoid regulated kinase (SGK 1) และ Na^+, K^+-ATPase นอกจากนี้ยังพบว่ายาอาจออกฤทธิ์เพิ่มการคั่งของสารน้ำโดยกระตุ้นการทำงานของ aquaporin ที่ท่อไตส่วน collecting duct โดยผ่านทาง PPAR-independent pathway ส่วนรายงานที่มีผลต่อตับ (idiosyncratic hepatotoxicity) ดังที่พบในยา TGZ พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา RGZ และ PGZ พบอุบัติการณ์การเพิ่มขึ้นของพลาสมา transaminase (มากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ) เพียงร้อยละ 0.26 ในผู้ป่วยที่ได้รับยา PGZ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการใช้ยากลุ่มนี้ในผู้ป่วยโรคตับ (ระดับ transaminase ในเลือดมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ) แนะนำให้ตรวจการทำงานของตับก่อนเริ่มใช้ยา และติดตามการทำงานของตับเป็นระยะ ๆ อย่างน้อยทุก 2 เดือน [82]

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3. แสดงอุบัติการณ์การเกิดภาวะแทรกซ้อนของยา thiazolidinediones [82]

Incidence	Adverse reaction
> 10%	weight gain Respiratory: upper respiratory tract infection (13%)
1-10%	Cardiovascular: edema (5%) (combination with sulfonylurea or insulin, the incidence of edema was as high as 15%) Central nervous system: headache (9%), fatigue (4%) Endocrine: hypoglycemia (2-15% when used in combination with sulfonylurea or insulin) Hematologic: anemia (1%) Neuromuscular and skeletal: myalgia (5%) Respiratory: sinusitis (6%), pharyngitis (5%)
< 1%	Congestive heart failure Elevated creatine phosphokinase Elevated transaminase, hepatic failure (very rare)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study design) แบบมีกลุ่มทดลองและกลุ่มเปรียบเทียบ (experimental controlled trial)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์และการหาขนาดของยาที่เหมาะสม

3.2.1.1 ทำการเพาะเลี้ยง (primary culture) mesothelial cells จาก omentum ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดลำไส้ด้วย intraluminal diseases (elective surgery) และ 3T3-L1 adipocytes cell line (ATCC, ATCC® number CL-173TM) ซึ่ง cell line ดังกล่าวนี้เป็น pre-adipocyte หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80-100% ของพื้นที่ของภาชนะที่ทำการเพาะเลี้ยงแล้วก็ทำการ differentiation ด้วย adipogenic hormonal cocktail (insulin 5 μg/ml, dexamethasone 0.25 μM และ IBMX 0.5 mM) เป็นเวลาประมาณ 10 วัน (วันแรกที่ทำการ differentiation นับเป็นวันที่ 0) หลังจากทำการ differentiation จนครบเวลาที่กำหนดแล้ว pre-adipocyte ก็กลายเป็น mature adipocyte

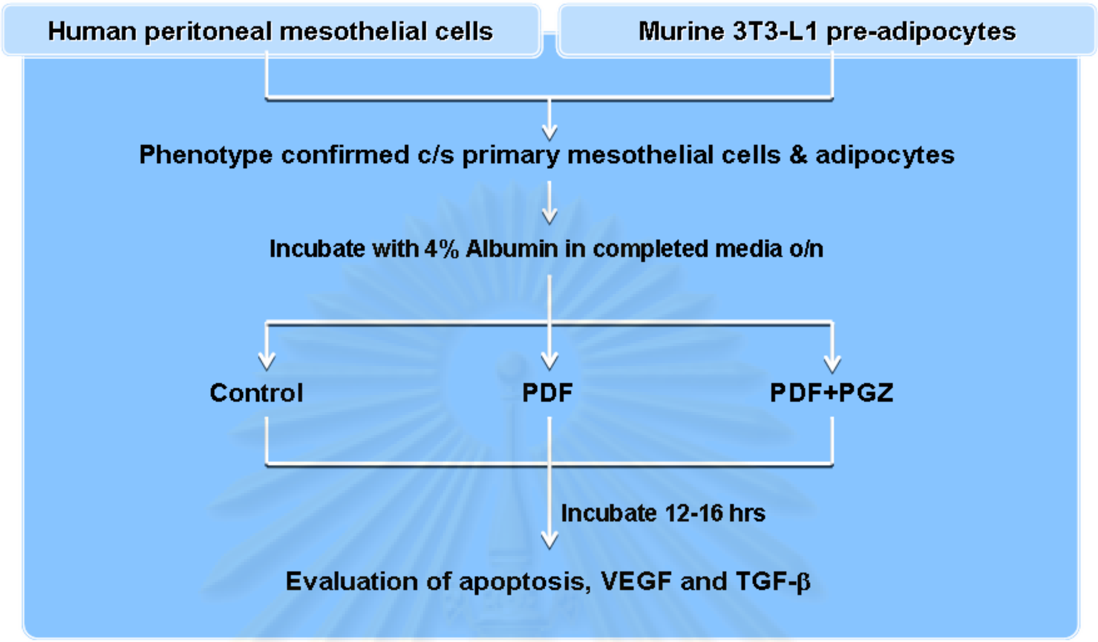
3.2.1.2 ยืนยันชนิดของ mesothelial cells ด้วยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีย์ต่อ cytokeratin และยืนยันชนิดของ mature adipocyte ด้วยการย้อม oil red O

3.2.1.3 ใช้เซลล์ที่เพาะไม่เกิน 3 passages ศึกษาผลของ purified pioglitazone powder (ในขนาดความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้คือ 0.1, 1, 5 และ 10 μM) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการป้องกันการบาดเจ็บและการตายของเซลล์และของสัตว์ทดลองโดยกระบวนการ apoptosis และ oncosis หลังจากที่เซลล์สัมผัสกับน้ำยา standard commercial dialysate เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.2.1.4 วัดปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis และ oncosis ด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์โดยใช้ propidium iodide (PI) และ TUNEL รวมทั้งตรวจหาปริมาณ DNA laddering เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับยา pioglitazone ในขนาดที่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก

3.2.1.5 เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในช่องท้อง ได้แก่ VEGF และ TGF-β ระหว่างกลุ่มที่ได้รับยา pioglitazone ในขนาดที่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก

โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24. แสดงขั้นตอนในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์

3.2.2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

หนูทดลองสายพันธ์ Sprague-Dawley เพศผู้ ที่มีน้ำหนักตัวแรกเข้าระหว่าง 250-300 กรัม (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) จำนวน 45 ตัว สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการดูแลอย่างดีในศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสามารถรับประทานอาหารและน้ำได้ตามแต่ต้องการ ได้รับการชั่งน้ำหนักและประเมินสภาวะ well being และชั่งน้ำหนักทุกสัปดาห์ หลังจากนั้นจะได้รับการศึกษาตามลำดับดังนี้ คือ

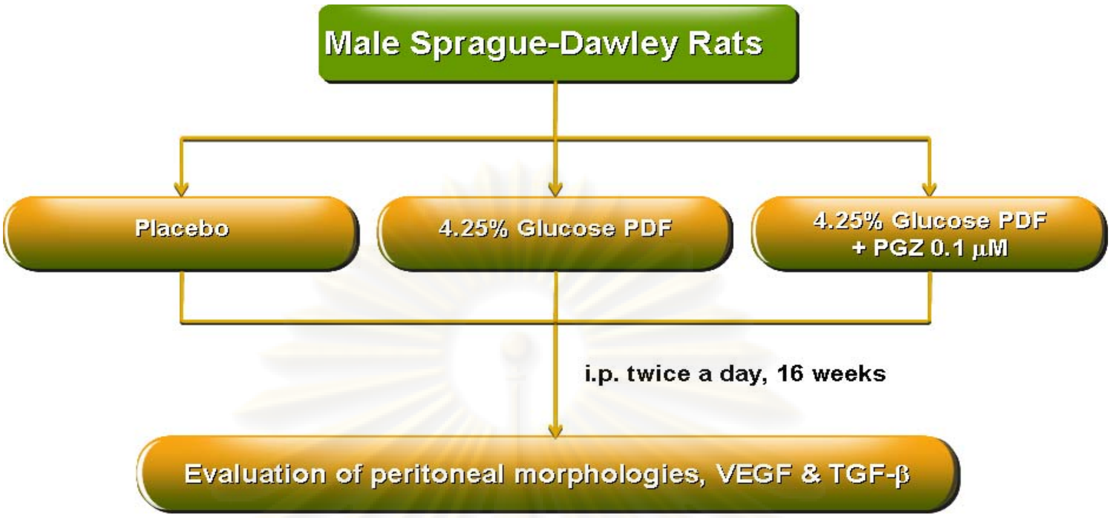
3.2.2.1 แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือนอร์มัล 2) กลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 3.86% G commercial PDF at pH 5.5 (Dianeal; Baxter, Singapore) 3) กลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องผสมกับยา pioglitazone 0.1 µM ซึ่งเป็นขนาดที่ได้ทำการทดลองกับเซลล์แล้วว่ามีปริมาณที่เหมาะสมในการป้องกันการบาดเจ็บและการตายของเซลล์และของสัตว์ทดลอง โดยทำการฉีดวันละ 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง ด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัม เป็นเวลารวมทั้งสิ้น 16 สัปดาห์

3.2.2.2 สัตว์ทดลองส่วนที่เหลือจะได้รับการประเมิน peritoneal morphology เจาะเลือด นับจำนวนหลอดเลือด และเก็บน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่เหลือค้างในช่องท้องเพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีนและ cytokines ต่าง ๆ

3.2.2.3 สัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกดูดเลือดออกจากร่างกายจนหมดร่างกายร่วมกับการฉีดยาสลบเกินขนาดเพื่อ sacrifice หลังจากสิ้นสุดการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25. แสดงขั้นตอนในการศึกษาในสัตว์ทดลอง

3.3 **การสังเกตและการวัด** (Observation and Measurement)

3.3.1 Cell death and cytotoxicity

การวัดการบาดเจ็บของ mesothelial cells และ mature adipocytes ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.36% G commercial PDF และที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา pioglitazone เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทำการ incubate ทั้ง mesothelial cells ในน้ำยากลุ่มต่าง ๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ adipocytes ในน้ำยากลุ่มต่าง ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากนั้นประเมินจากเปอร์เซ็นต์ของปริมาณ lactate dehydrogenase (LDH) ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เทียบกับปริมาณของ LDH ที่มีอยู่ภายในเซลล์ด้วย cytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega corporation, cat. no. G1780)

ส่วนการวัดการตายของเซลล์นั้น ทำการตรวจวัดโดยใช้ fluorescent microscope ซึ่งทำการย้อมทั้ง mesothelial cells และ mature adipocytes ในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกันกับการวัดการบาดเจ็บของเซลล์ โดยทำการวัดการตายของเซลล์ด้วยการย้อมด้วยวิธี terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) ซึ่งวิธี TUNEL นี้จะย้อมติด nucleosome-associated DNA fragments และย้อมเซลล์ทั้งหมดด้วย propidium iodide (PI) โดยใช้ APO-BrdUTM TUNEL assay kit (Invitrogen corporation, cat. no. A35126) จากนั้นประเมินเปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ที่ย้อมติดด้วยวิธี TUNEL เทียบกับปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติด PI ทั้งหมด

3.3.2 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อ

หลังจากทำให้หนูสลบด้วย sodium pentobarbital ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วจึงทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อส่วน upper part of the abdominal wall, diaphragm, liver และ distal part of the small bowel นำชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้งหมดมาคงสภาพใน 10% buffered neutral formalin solution และ methyl Carnoy's solution เพื่อทำการประเมินทางสัณฐานของเนื้อเยื่อโดยการย้อมทาง histochemistry และ immunohistochemistry นอกจากนี้ยังเก็บชิ้นเนื้อตัวอย่างบางส่วนไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอีกด้วย

3.3.3 การประเมินทางสัณฐานของเนื้อเยื่อ

3.3.3.1 Mesothelial monolayer

หลังจาก sacrifice หนูนำส่วนด้านหน้าของตับมาวางบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% agarose gel (liver imprint) เป็นเวลา 15-20 วินาที โดยทำการ imprint จำนวน 4 สไลด์ต่อหนูแต่ละตัว จากนั้นทำการคงสภาพด้วย 70% ethanol และย้อมด้วยสี Giemsa's azure eosin methylene blue for microscope (ready to use) แล้วทำการประเมินจำนวนของ mesothelial cells ต่อพื้นที่

3.3.3.2 Submesothelial thickness

ทำการย้อมชิ้นเนื้อที่ตัดจาก paraffin block ด้วย masson's trichrome โดยชั้น submesothelial tissue นั้นอยู่ระหว่างชั้นของ mesothelial cells กับชั้นของกล้ามเนื้อ ความหนาของชั้น submesothelial tissue วัดโดยใช้ image J 1.37a program ซึ่งทำการวัดทั้งหมด 6 ตำแหน่งต่อเนื้อเยื่อ

3.3.3.3 Mesenteric vascular density

ก่อนทำการ sacrifice หนูทำการ perfuse ด้วย LE-lectin อีกทั้งยังทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีต่อ CD 34 เพื่อการศึกษาหลอดเลือดซึ่งทำการวัดทั้งหมด 5 ตำแหน่งต่อเนื้อเยื่อโดยใช้ image J 1.37a program แล้วทำการประเมินจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่

3.3.4 Immunohistochemical analysis

การศึกษาทาง immunohistochemistry นั้นเลือกใช้ streptavidin-biotin method โดยนำ mesothelial cells ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่คงสภาพด้วย formaldehyde และชิ้นเนื้อที่คงสภาพใน 4% neutral formaldehyde และ methyl Carnoy's solution ที่ฝังใน paraffin block นำ paraffin block มาตัดด้วยเครื่อง microtome ได้ ribbon ที่มีความหนา 2 ไมครอน แล้วทำการ

deparaffin, rehydration, blocking an endogenous peroxidase ด้วย 3% hydrogen peroxide in PBS, blocking nonspecific binding ด้วย 10% normal horse serum in PBS เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการ incubate ด้วย monoclonal antibody ต่อ vascular endothelial growth factor (VEGF), alpha-smooth muscle actin (α-SMA), cytokeratin AE1/AE3, CD34 และ biotinylated IgG (สำหรับการศึกษา mesenteric vascular density) แล้ว incubate ด้วย streptavidin-peroxidase (envision) เป็นเวลา 45 นาที เติม chromogenic substrate (3,3' diaminobenzine; DAB) ซึ่งจะมองเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลในบริเวณที่มี antigen ที่ต้องการศึกษา

3.3.5 Cytokine analyses

เจาะเก็บน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 3.86%G commercial PDF จากหนู และ cell culture supernatant มาทำการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ supernatant มาตรวจวัดปริมาณของ transforming growth factor-beta (TGF-β) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยใช้ TGF-β ELISA kit (R&D systems, cat. no. DB100B) และ VEGF ELISA kit (R&D systems, cat. no. QVE00B) ซึ่งการตรวจวัดปริมาณของ TGF-β นั้นทำการตรวจวัด TGF-β ทั้งในรูปแบบของ active และ latent TGF-β

3.3.6 RNA preparation and real time quantitative RT-PCR

ทำการสกัด total RNA จากเซลล์ โดยใช้ trizol reagent แล้วนำ total RNA ที่สกัดได้มาแปลงเป็น cDNA โดยใช้ transcriptor first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche, cat. no. 04379012001) โดยใน master mix ประกอบด้วย total RNA 1 ไมโครกรัม (ใช้เป็น template), random hexamer 60 ไมโครโมลาร์ (ใช้เป็น primer), 1x transcription RT reaction buffer, dNTP 1 มิลลิโมลาร์, ribonuclease 20 ยูนิต, transcriptor reverse transcriptase 10 ยูนิต ซึ่งขั้นตอนที่กล่าวข้างต้นนั้นอ้างอิงตามคู่มือของ transcriptor first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR

ในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยใช้วิธี real-time quantitative PCR ซึ่งใช้ 5' nuclease activity ของ tag polymerase เป็นตัวแสดงผลของการวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยใช้เครื่องของ LightCycler version 2.0 ซึ่งยีนที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ TGF-β และ VEGF โดยใช้ 18s ribosomal RNA เป็น housekeeping gene ซึ่ง reaction condition มีดังนี้ RT products 1 ไมโครลิตร, PCR reaction

mixure 25 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 1x TagMan PCR master mix, gene specific forward and reverse primers 810 นาโนกรัม, real-time PCR probe 6.25 ไมโครโมลาร์) ซึ่งเงื่อนไขต่าง ๆ ในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยใช้วิธี real-time quantitative PCR นั้นได้อ้างอิงตามคู่มือของ LightCycler TaqMan 2.0 system โดยข้อมูลที่ได้นั้นทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Sequence detector version 1.7a ซึ่งค่า cycle threshold (Ct) ของแต่ละยีนที่สนใจในแต่ละกลุ่มนั้นเทียบกับค่า cycle threshold (Ct) ของ housekeeping gene (ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการเปรียบเทียบคือ relative Ct value) โดย fold change = 2 –(relative Ct) และเมื่อนำค่าที่ได้จากข้างต้นในแต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 3.86%G commercial PDF และกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องผสมกับยา piogliatazone) เทียบกับค่าที่ได้จากข้างต้นในกลุ่มควบคุมนั้นถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1 (values <1) แสดงว่าการแสดงออกของยีนที่สนใจในกลุ่มนั้นมีการแสดงออกลดลง แต่ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 1 (values >1) แสดงว่าการแสดงออกของยีนที่สนใจในกลุ่มนั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวมข้อมูลการทดลองและบันทึกผลการทดลองโดยการจดบันทึก โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นผู้ควบคุมและให้คำปรึกษา

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองบันทึกเป็นค่า mean ± SEM ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ one-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้ Mann Whitney U test โดยการทดสอบสมมติฐาน กำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

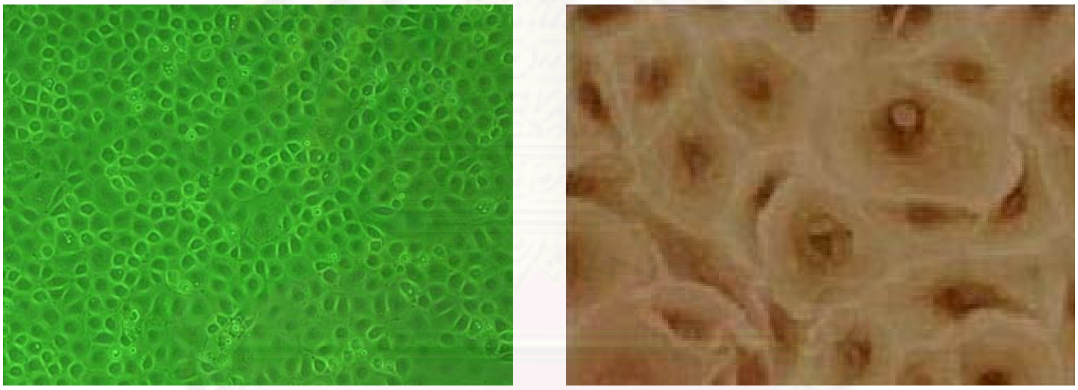
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

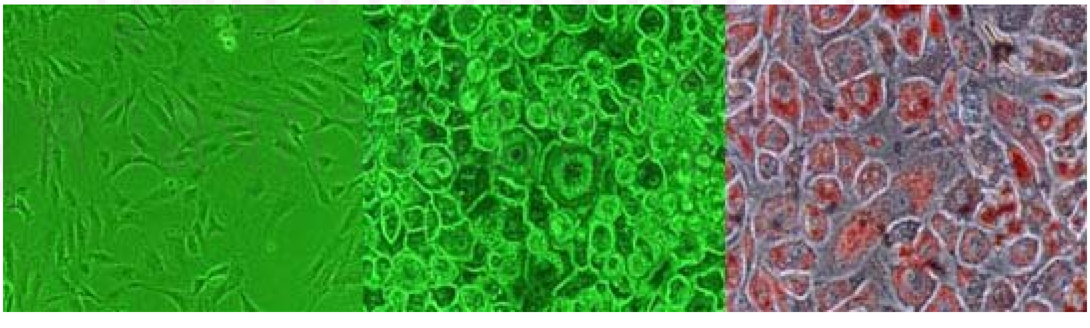
ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการยืนยันชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่นำมาทดลองในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ชนิดคือ mesothelial cells และ adipocytes โดย mesothelial cells ที่โตเต็มวัยจะมีลักษณะเป็น epithelial phenotype ยึดติดกับเซลล์รอบข้างจนมีลักษณะเรียงเป็นแผ่นของเซลล์จำนวน 1 ชั้น และพบการแสดงออกของ cytokeratin ภายในเซลล์ ซึ่งเห็นเป็นสีน้ำตาลแผ่กระจายออกเป็นรัศมีล้อมรอบนิวเคลียส (รูปที่ 26) ต่างจาก adipocyte ตัวเต็มวัยที่เซลล์จะไม่ยึดเกาะติดกับเซลล์ข้างเคียง มีรูปร่างเป็นทรงกลม ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยถุงไขมันหลากหลายขนาด (lipid droplets) จำนวนมาก สามารถยืนยันถุงไขมันเหล่านี้ได้โดยการย้อมสี oil red O ซึ่งสีดังกล่าวจับได้จำเพาะเจาะจงกับหยดไขมันภายในเซลล์ทำให้เห็นเป็นสีแดง (รูปที่ 27)



รูปที่ 26. ลักษณะของ mesothelial cells ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนสมบูรณ์
รูปทางด้านซ้าย แสดงลักษณะของ mesothelial cells ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า และ**รูปทางด้านขวา** แสดง mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีย์ต่อ cytokeratin



รูปที่ 27. ลักษณะของ 3T3-L1 pre-adipocytes ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนสมบูรณ์

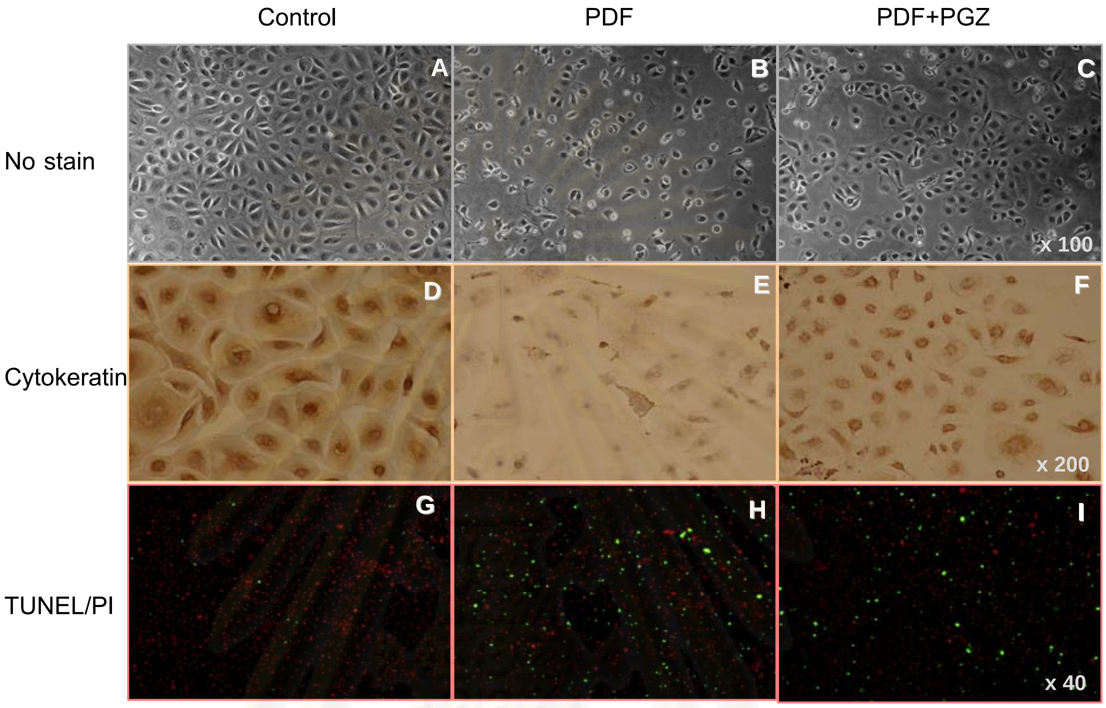
รูปทางด้านซ้าย แสดงลักษณะของ 3T3-L1 pre-adipocytes **รูปตรงกลาง** แสดง pre-adipocytes ที่ทำการ differentiation จนสมบูรณ์ (mature adipocytes) และ**รูปทางด้านขวา** แสดง mature adipocyte ที่ย้อมด้วย oil red O ทั้งหมดถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า

4.2 ผลการศึกษา cell death และ cytotoxicity

เมื่อทำการหยอด 1.36% G commercial PDF ลงไปใน mesothelial cells และ adipocytes เป็นเวลา 16 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่ามีเซลล์เป็นจำนวนมากได้รับบาดเจ็บและตาย สังเกตได้ว่าเซลล์จะมีลักษณะกลมและพบการหลุดลอกออกจากพื้นผิวภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมถึงลดการแสดงออกของ differentiation marker ของทั้ง mesothelial cells และ mature adipocyte (รูปที่ 28 และ 29) นอกจากนี้ยังอาจพบ apoptotic bleb และ apoptotic bodies ด้วย (รูปที่ 30) พบว่าการบริหารยา pioglitazone ที่ขนาดความเข้มข้น 0.1 μM ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF สามารถป้องกันการบาดเจ็บ ล้มตาย และลดการแสดงออกของ differentiation marker ได้ (รูปที่ 28 ถึง 30)

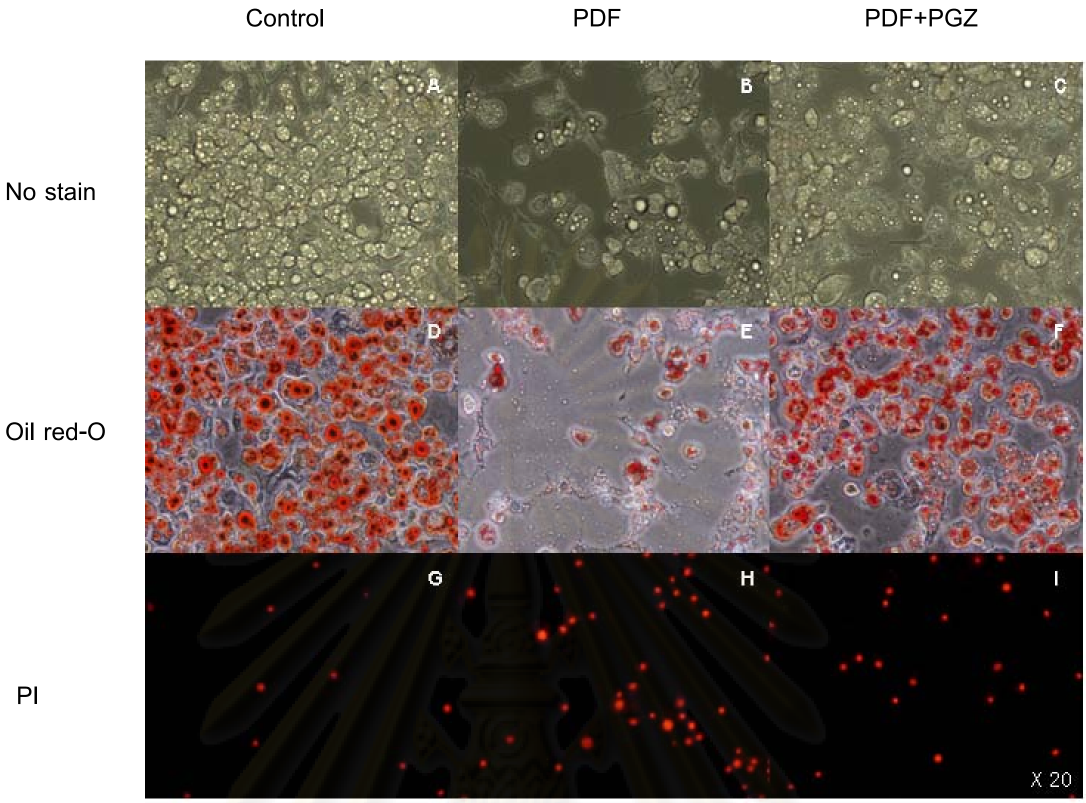
เมื่อทำการยืนยันผลการศึกษาโดยการนับจำนวนเซลล์ที่ตายด้วยวิธี apoptosis ด้วยวิธี terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) และการย้อมสี propidium iodide (PI) พบว่า mesothelial cells ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีการตายแบบ apoptosis มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ของการตายแบบ apoptosis เท่ากับ 13.33±11.25 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการตายแบบ apoptosis เท่ากับ 40.42±11.25) และกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีการตายแบบ apoptosis น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDFอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการตายแบบ apoptosis เท่ากับ 40.42±11.25 ส่วนกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการตายแบบ apoptosis เท่ากับ 35.83±12.92) (รูปที่ 28 และ 31) จุดสีเขียวที่เห็นในภาพคือ เซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis (apoptotic cells) และจุดสีแดงคือนิวเคลียสของเซลล์ทั้งหมดที่ติดสี PI ในทางเดียวกันพบว่าเซลล์ adipocytes ที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีอัตราการตายมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (adipocytes กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการตายของเซลล์เท่ากับ 95.00±5.13 ส่วน adipocytes กลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการตายของเซลล์

เท่ากับ 40.00±3.29 เมื่อเทียบกับ adipocytes กลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการตายของเซลล์เท่ากับ 5.00±0.25 (รูปที่ 29 และ 32) โดยจุดสีแดงที่เห็นคือเซลล์ที่เกิดการตาย (dead cells)

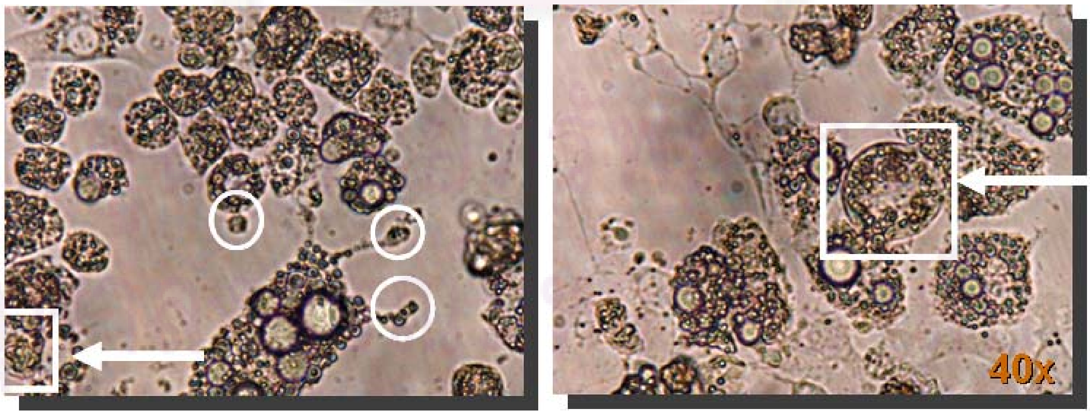


รูปที่ 28. ลักษณะของ mesothelial cells ที่ incubate กับสารละลายในกลุ่มทดลองต่าง ๆ **แถวบน (รูป** A-C) แสดงลักษณะของ mesothelial cells ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า **แถวกลาง (รูป** D-F) แสดง mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีย์ต่อ cytokeratin ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า **แถวล่าง (รูป** G-I) แสดง mesothelial cells ที่ย้อมโดยวิธี TUNEL/PI ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 40 เท่า **แถวซ้าย (รูป** A, D, G) เป็นกลุ่มควบคุม **แถวกลาง (รูป** B, E, H) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF **แถวขวา (รูป** C, F, I) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

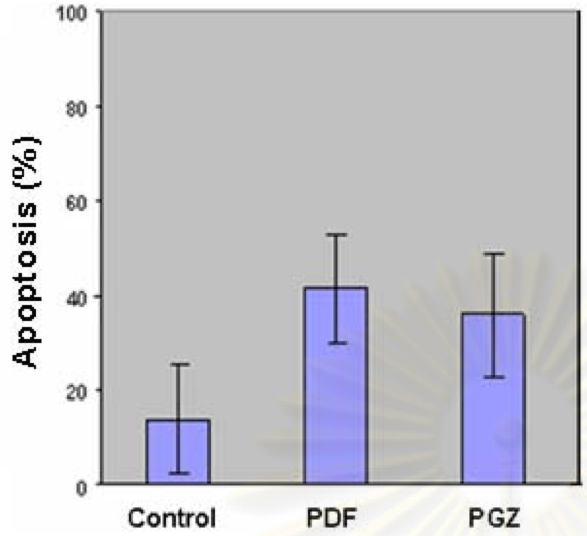


รูปที่ 29. ลักษณะของ mature adipocytes ที่ incubate กับสารละลายในกลุ่มทดลองต่าง ๆ **แถวบน (รูป** A-C) แสดงลักษณะของ mature adipocytes **แถวกลาง (รูป** D-F) แสดง mature adipocytes ที่ย้อมด้วย oil red-O **แถวล่าง (รูป** G-I) แสดง mature adipocytes ที่ย้อมด้วย PI **แถวซ้าย (รูป** A, D, G) เป็นกลุ่มควบคุม **แถวกลาง (รูป** B, E, H) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF **แถวขวา (รูป** C, F, I) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone ทั้งหมดถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า

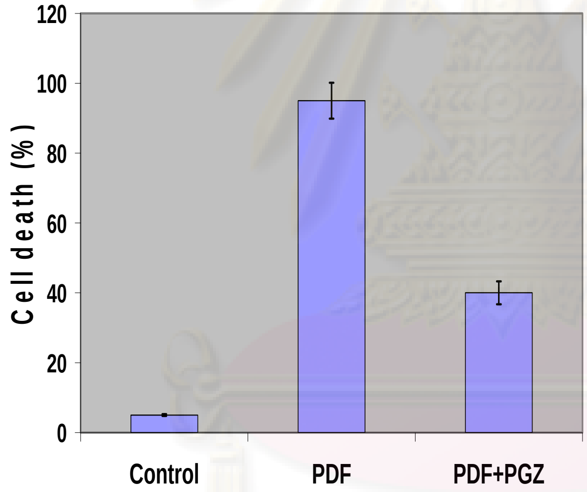


รูปที่ 30. ลักษณะของ apoptotic cells ของ adipocytes ที่ incubate กับ 1.36% G commercial PDF ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 400 เท่า

หมายเหตุ กรอบสี่เหลี่ยมแสดง apoptotic bodies และวงกลมแสดง apoptotic blebs



รูปที่ 31. แสดงร้อยละของ mesothelial cells ที่ตายแบบ apoptosis ในแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับ 4% albumin in M199 2) PDF คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF 3) PGZ คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone



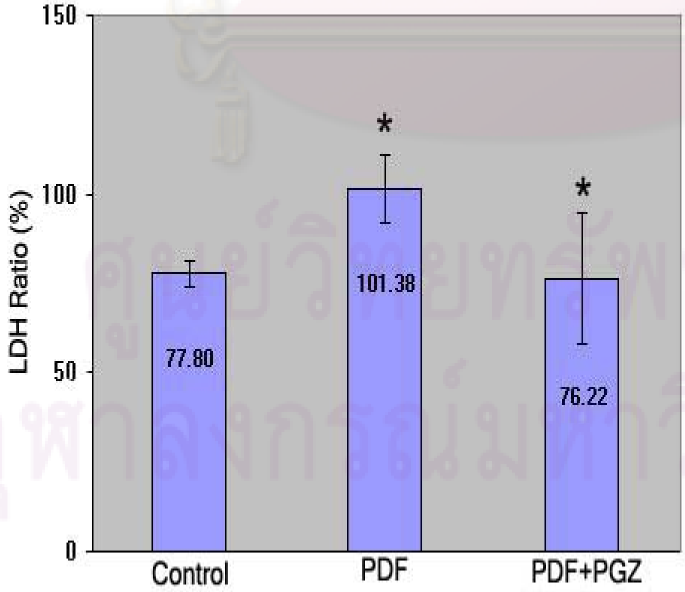
รูปที่ 32. แสดงร้อยละของ adipocytes ที่ตาย ในแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับ 4% albumin in DMEM 2) PDF คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF 3) PGZ คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

สามารถยืนยันการบาดเจ็บของเซลล์ทั้งสองชนิดได้โดยวัดปริมาณการปลดปล่อยเอนซัมย์ lactate dehydrogenase (LDH) ออกจากเซลล์เทียบกับปริมาณของ LDH ที่มีอยู่ภายในเซลล์ทั้งหมด ซึ่ง LDH นั้นเป็นเอนซัมย์ชนิดหนึ่งที่พบอยู่ในส่วนของ cytoplasm ของเซลล์ ทำหน้าที่คอยเปลี่ยน lactate ใหม่เป็น pyruvate ก่อนเข้าขบวนการเติม acetyl CoA ในท้ายของขบวนการ glycolysis ไม่พบว่าเซลล์ปกติ (ไม่มีรูรั่วบน plasma membrane) หลั่ง LDH ออกมา

ภายนอกเซลล์ แต่เมื่อมีการบาดเจ็บหรือมีการล้มตายของเซลล์ plasma membrane ของเซลล์จะเกิดการฉีกขาดทำให้เกิดการปลดปล่อย LDH ออกมาภายนอกเซลล์ได้

พบว่ากลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีร้อยละของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (mesothelial cells กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 101.38±10.00 ส่วน mesothelial cells กลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 76.22±18.33 เมื่อเทียบกับ mesothelial cells กลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 77.80±3.61 และใน adipocytes กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 44.71± 3.53 ส่วน adipocytes กลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 20.00±1.32 เมื่อเทียบกับ adipocytes กลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH เท่ากับ 12.65±2.06) (รูปที่ 33 และ 34) สอดคล้องกับการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ที่กล่าวมาข้างต้น

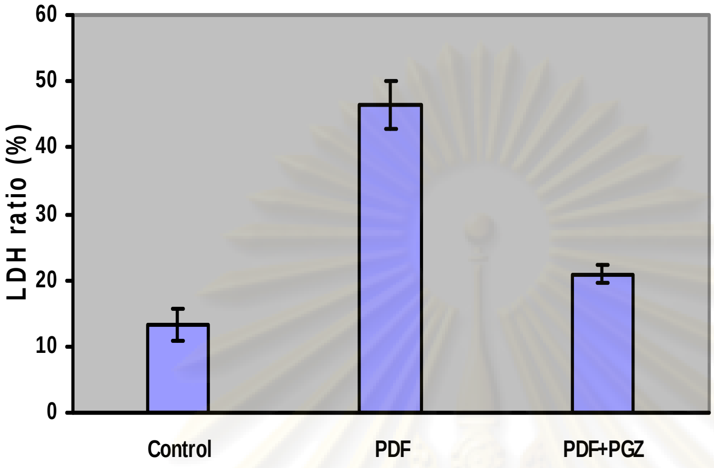
กล่าวได้ว่ายา pioglitazone ที่ขนาดความเข้มข้น 0.1 μM สามารถป้องกันการบาดเจ็บและการตายของทั้ง mesothelial cells และ adipocytes ที่สัมผัสกับ 1.36% G commercial PDF



รูปที่ 33. แสดงร้อยละของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH ของ mesothelial cells ในแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับ 4% albumin in M199 2) PDF คือ กลุ่มที่

ได้รับ 1.36% G commercial PDF 3) PGZ คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 34. แสดงร้อยละของ LDH ใน supernatant เทียบกับ total LDH ของ adipocyte ในแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับ 4% albumin in DMEM 2) PDF คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF 3) PGZ คือ กลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

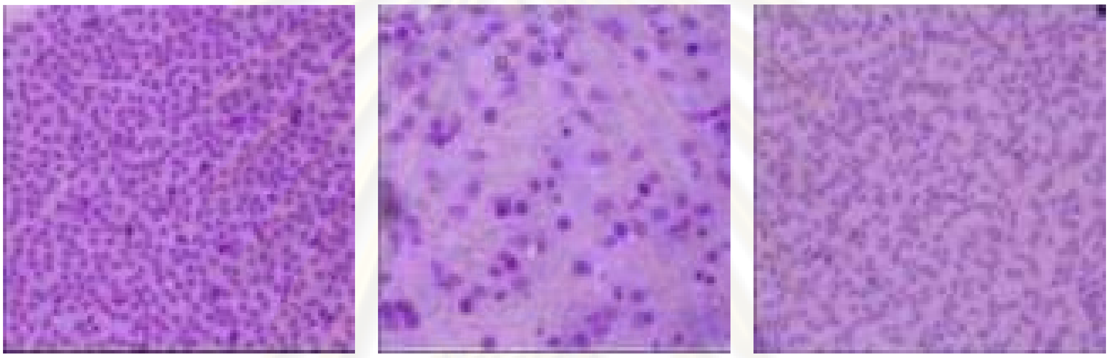
หมายเหตุ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 ผลการศึกษาทางสัณฐานของเนื้อเยื่อ

4.3.1 Mesothelial cells morphologic changes

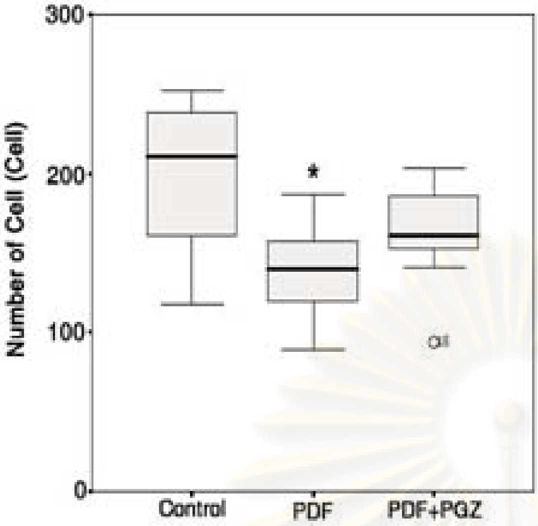
สามารถลอก mesothelial monolayer ได้โดยขบวนการ imprint ของตับสัตว์ทดลองในบริเวณ anterior surface เมื่อทำการย้อม mesothelial cells ด้วยสี Giemsa พบว่าเซลล์ติดสีม่วง ซึ่งปกติ mesothelial cells แต่ละตัวยึดติดกับเซลล์รอบข้างอย่างต่อเนื่องจนก่อให้เกิดแผ่นของเซลล์ชั้นบาง ๆ จำนวน 1 ชั้น หุ้มล้อมรอบผิวตับ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 35 ซ้ายมือ ซึ่งเป็นแผ่นเซลล์ที่ได้จากสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม ต่างจากแผ่นเซลล์ที่ได้จากสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย 3.86% G commercial PDF วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 16 สัปดาห์ ที่พบหลายหย่อมที่ปราศจาก mesothelial cells หรือมีการหลุดลอกออกของเซลล์ เรียกบริเวณดังกล่าวนี้ว่า mesothelial deserted area นอกจากนี้เซลล์ที่หลงเหลืออยู่ก็เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างน่าตาและมีนิวเคลียสผิดปกติไป (dysplastic appearance) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นไม่พบในหนูกลุ่มควบคุมบางตำแหน่งอาจพบการจับกลุ่มกันของ inflammatory cell พบว่าแผ่นเซลล์ที่ได้จากสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF มีปริมาณการหลุด

ลอกของเซลล์น้อยกว่า มี deserted area แคบและปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (หนูกลุ่มที่ได้รับ 1.36%G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการคงอยู่ของ mesothelial cells เท่ากับ 133.80±46.48 เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการคงอยู่ของ mesothelial cells เท่ากับ 207.04±66.20) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF กับหนูกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF (หนูกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF มีเปอร์เซ็นต์ของการคงอยู่ของ mesothelial cells เท่ากับ 154.93±31.69 เทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ 1.36%G commercial PDF เท่ากับ 133.80±46.48) ดังแสดงในรูปที่ 35 และ 36



รูปที่ 35. ลักษณะของ mesothelial monolayer ด้วยเทคนิค liver imprint รูปทั้ง 3 รูป แสดงลักษณะการคงอยู่ของ mesothelial cells บนพื้นผิวของตับในหนูกลุ่มต่าง ๆ ทั้งหมดถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า **รูปทางด้านซ้าย** เป็นกลุ่มควบคุม **รูปตรงกลาง** เป็นกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ซึ่งจะสังเกตเห็นบริเวณ mesothelial deserted area และ mesothelial cells repopulation (โดยสังเกตเห็นเป็นกลุ่มของเซลล์) และ**รูปทางด้านขวา** เป็นกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา pioglitazone ที่ความเข้มข้น 0.1 μM จะสังเกตเห็นบริเวณ mesothelial deserted area น้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ทั้งหมดถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

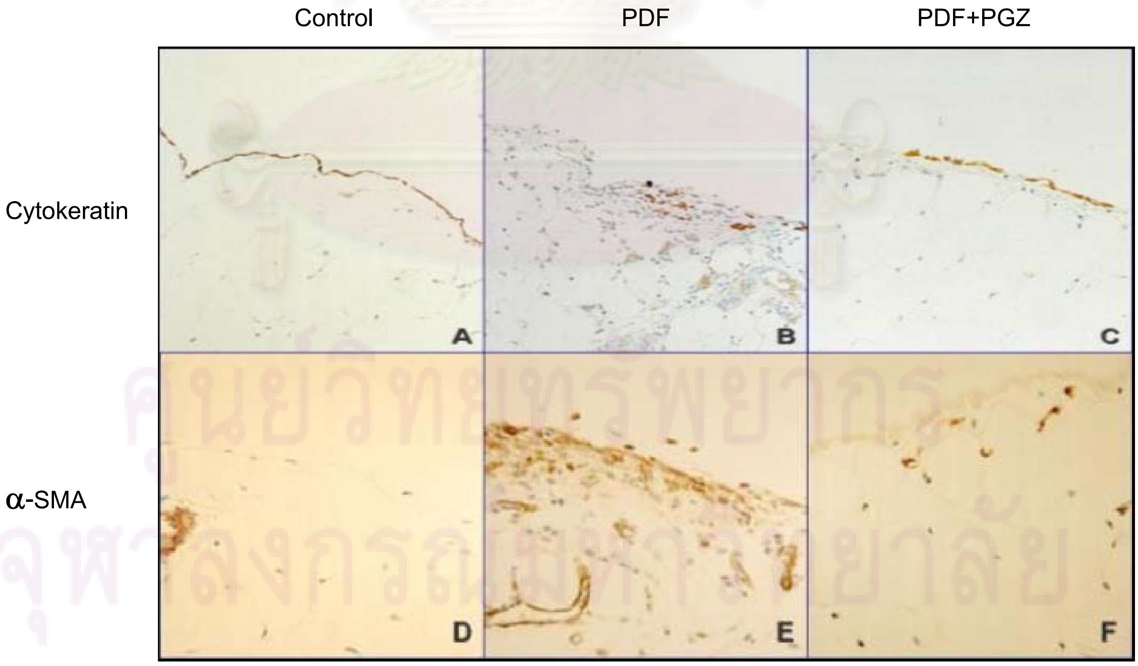


รูปที่ 36. แสดงความหนาแน่นของ mesothelial cells ซึ่งประเมินจากวิธี liver imprint ในหนูแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) **Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล 2) **PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF 3) **PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

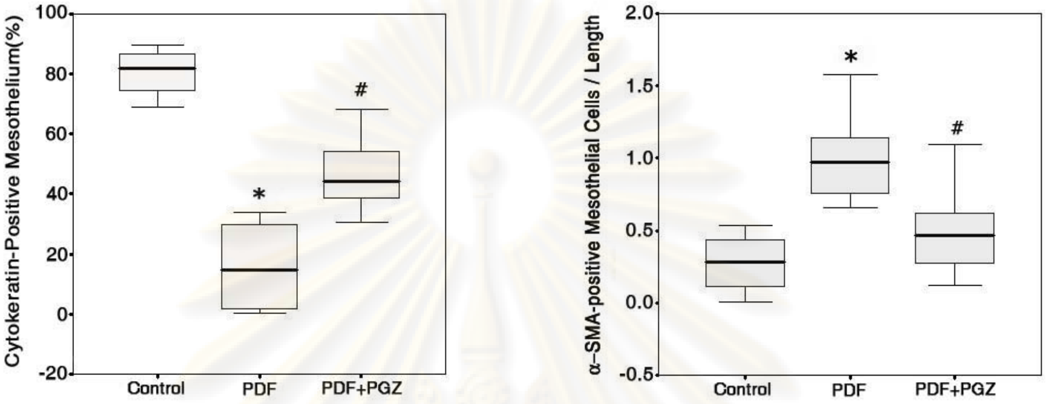
นอกจากการเปลี่ยนแปลงที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังพบอีกว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปคล้ายกับเซลล์ fibroblast คือมีเซลล์ที่เรียวยาว และมีการสร้างออกของ myofibroblast marker (alpha-smooth muscle actin: α-SMA) รวมไปถึงมีการลดการแสดงออกของ epithelial marker (cytokeratin) ซึ่งบ่งบอกทางอ้อมว่าเซลล์กำลังผ่านกระบวนการ epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) ไม่พบลักษณะดังกล่าวนี้ในหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ $p<0.01$ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มควบคุม (เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 14.44±16.67 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 87.04±10.34) และเมื่อเทียบระหว่าง เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับ เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ $p<0.01$ (เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial

cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 14.44±16.67 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด cytokeratin ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 44.07±18.52) อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ p<0.01 เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มควบคุม (เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 0.97±0.46 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.28±0.26) และเมื่อเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับ เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ p<0.01 (เปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 0.97±0.46 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของ mesothelial cells จากชิ้นเนื้อที่ย้อมติด α-SMA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 0.47±0.48) (รูปที่ 37 และ 38)



รูปที่ 37. แสดงการเกิด epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) ของ mesothelial cells ที่พบใน omentum ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลอง **แถวบน (รูป**

A-C) แสดง mesothelial cells ที่ผ่านการย้อมด้วยแอนติบอดีย์ต่อ cytokeratin **แถวล่าง (รูป** D-F) แสดง mesothelial cells ที่ผ่านการย้อมด้วยแอนติบอดีย์ต่อ α-SMA ทั้งหมด ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า **แถวซ้าย (รูป** A, D) เป็นกลุ่มควบคุม **แถวกลาง (รูป** B, E) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา pioglitazone ที่ความเข้มข้น 0.1 μM



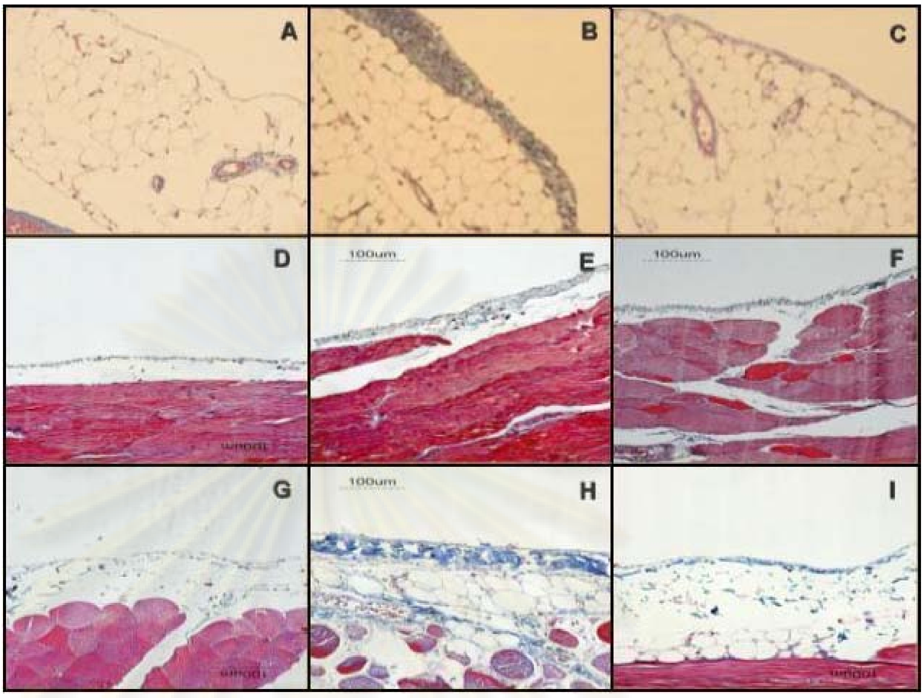
รูปที่ 38. แสดงร้อยละของ mesothelial cells ที่เกิด EMT คือมีการลดการแสดงออกของ cytokeratin (**แผนภูมิซ้ายมือ**) และมีการเพิ่มการแสดงออกของ α-SMA (**แผนภูมิขวามือ**) บน omentum ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม **1) Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล **2) PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF **3) PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ *p* value น้อยกว่า 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ *p* value น้อยกว่า 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF

4.3.2. Submesothelial thickness

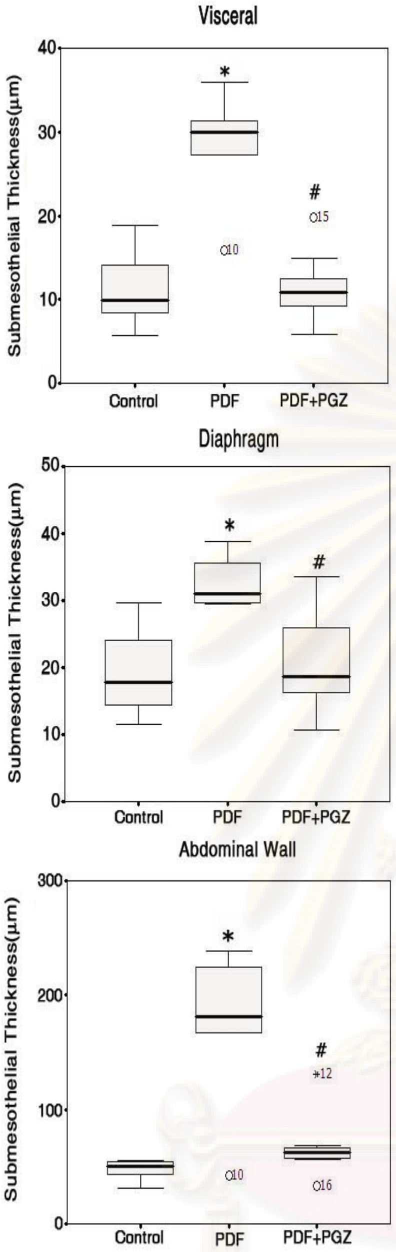
Submesothelial thickness ของ visceral peritoneum (bowel) และ parietal peritoneum (diaphragm และ abdominal wall) สามารถประเมินได้จากการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Masson's trichrome สีน้ำเงินบ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของ collagen bundle หรือมีการเกิดพังผืด (fibrosis) สีแดงบ่งชี้เซลล์กล้ามเนื้อ และสีดำบ่งชี้นิวเคลียสของเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 39. แสดง submesothelial thickness ของ visceral peritoneum (bowel) และ parietal peritoneum (diaphragm และ abdominal wall) จากการย้อมด้วยสี Masson's trichrome สีน้ำเงินบ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของ collagen bundle หรือมีการเกิดพังผืด (fibrosis) สีแดงบ่งชี้เซลล์กล้ามเนื้อ และสีดำบ่งชี้นิวเคลียสของเซลล์ **แถวบน (รูป** A-C) แสดง visceral peritoneum **แถวกลาง (รูป** D-F) แสดง diaphragmatic parietal peritoneum **แถวล่าง (รูป** G-I) แสดง abdominal parietal peritoneum **แถวซ้าย (รูป** A, D, G) เป็นกลุ่มควบคุม **แถวกลาง (รูป** B, E, H) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF **แถวขวา (รูป** C, F, I) เป็นกลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF ทั้งหมดถ่ายด้วยกำลังขยาย 200 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 40. แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จากชิ้นเนื้อส่วนต่าง ๆ ของช่องท้อง visceral peritoneum (แผนภูมิบน), diaphragmatic parietal peritoneum (แผนภูมิกลาง) และ abdominal parietal peritoneum (แผนภูมิล่าง) ในแต่ละกลุ่มของสัตว์ทดลอง **1) Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล **2) PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF **3) PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่าสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF มีการหนาตัวขึ้นของชั้น submesothelium ทั้งในส่วนของ visceral peritoneum และ parietal peritoneum เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในส่วนของ abdominal wall, diaphragm และ visceral ตามลำดับนั้น ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มควบคุม (เปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 182.65±36.22, 31.93±4.65 และ 30.41±4.45 ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 52.04±12.24, 18.42±9.39 และ 9.73±6.57 ตามลำดับ) และเมื่อเทียบระหว่าง เปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับ เปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (เปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 182.65±36.22, 31.93±4.65 และ 30.41±4.45 ตามลำดับส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น submesothelium ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 63.27±5.61, 18.42±9.39 และ 10.96±4.59 ตามลำดับ) โดยที่ความหนาของชั้น submesothelium มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและการแสดงออกของ mesothelial markers ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (รูปที่ 39 และ 40)

4.3.3 Mesenteric vascular density

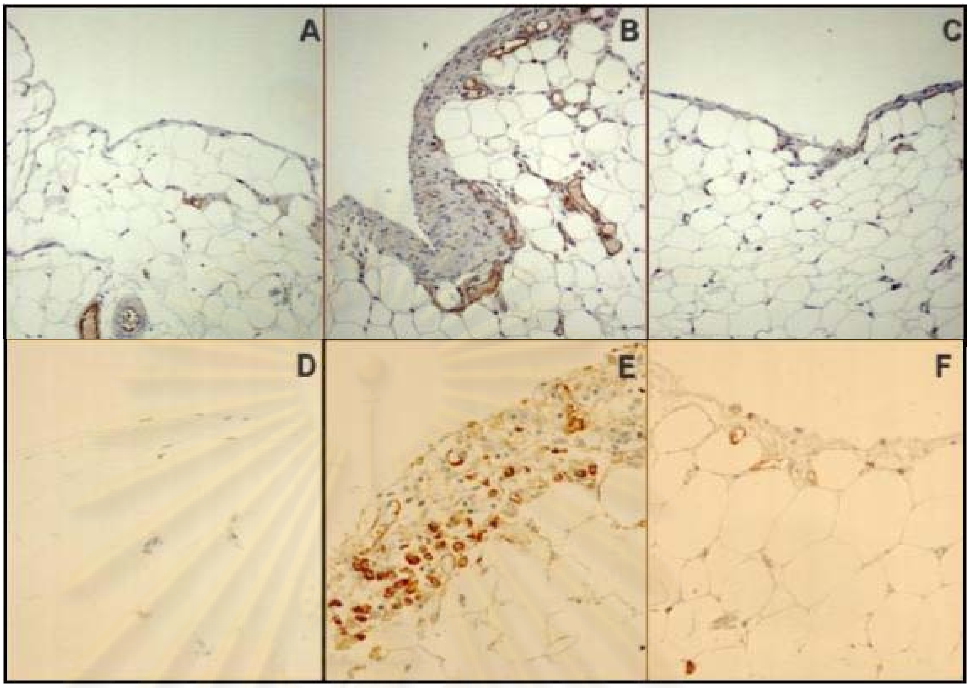
สามารถทำการนับจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่ในชิ้นเนื้อส่วน visceral peritoneum ด้วยการฉีด lectin เข้าไปในหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลองก่อนทำการ sacrifice ซึ่ง lectin เหล่านี้จะวิ่งไปจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวของ endothelial cells อย่างแน่นหนา เมื่อผ่านการย้อมชิ้นเนื้อด้วย streptavidin ที่ติดสลาก (streptavidin สามารถจับได้จำเพาะกับ lectin) ก็จะทำให้สามารถนับจำนวนหลอดเลือดได้อย่างง่ายดาย

พบว่าชิ้นเนื้อของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF มีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่าเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF และที่น่าประหลาดใจคือไม่พบความแตกต่างของปริมาณหลอดเลือดต่อพื้นที่ระหว่างสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม และใน

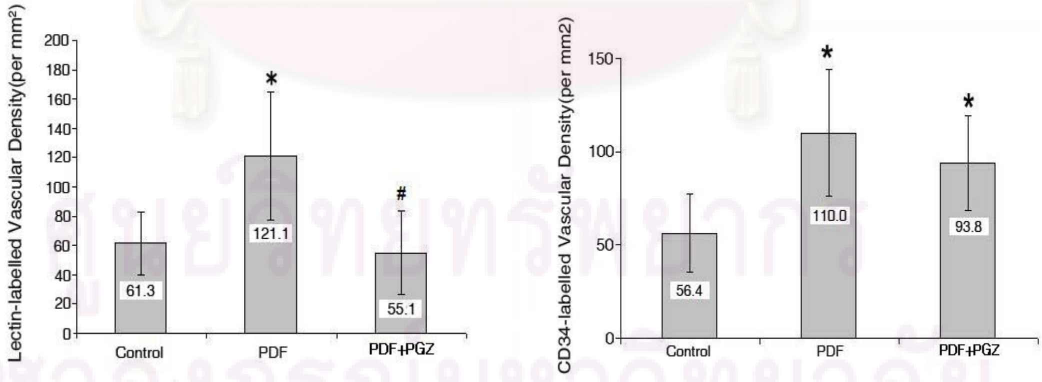
กลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มควบคุม (เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 121.10±44.49 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 61.30±21.65) และเมื่อเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 121.10±44.49 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด lectin ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 55.10±29.13)

สามารถยืนยันการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดโดยการย้อมชิ้นเนื้อดังกล่าวด้วย anti-CD 34 ที่ติดสลาก CD 34 เป็น marker ที่ตรวจพบได้ทั่วไปบนผิวของ endothelial progenitor cells ซึ่งเซลล์นี้เป็นเซลล์บุผิวหลอดเลือดฝอยตัวอ่อน พบได้ในช่วงที่มีการงอกของหลอดเลือดฝอย (angiogenesis) อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบ CD 34 ได้เล็กน้อยบน inflammatory cell พบว่าเยื่อบุผนังช่องท้องของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับการฉีดด้วย 3.86% G commercial PDF มีการแสดงออกของ CD 34 มากกว่าในสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF อย่างมีนัยสำคัญโดยที่เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มควบคุม (เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 110.00±34.64 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 56.40±21.69) และเมื่อเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับ เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (เปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 110.00±34.64 ส่วนเปอร์เซ็นต์ของหลอดเลือดที่ย้อมติด CD 34 ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 93.80±25.90) (รูปที่ 41 และ 42)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41. แสดงลักษณะและจำนวนของหลอดเลือดที่พบบนเยื่อบุผนังช่องท้องในแต่ละกลุ่ม 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล 2) PDF คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF 3) PDF+PGZ คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 µM pioglitazone **แถวบน (รูป** A-C) เป็นชิ้นเนื้อที่ผ่านการ profuse ด้วย lectin และย้อมด้วย streptavidin วงกลมหรือเส้นสีน้ำตาลแสดงหลอดเลือดฝอยที่พบใน visceral peritoneum **แถวล่าง (รูป** D-F) เป็นชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมด้วย anti-CD 34 ที่ติดสลาก ทั้งหมดถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 42. แสดงจำนวนของหลอดเลือด (**แผนภาพซ้ายมือ**) และจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD 34 (**แผนภาพขวามือ**) ต่อหนึ่งพื้นที่ ของชิ้นเนื้อในส่วน visceral peritoneum ในแต่ละกลุ่มของสัตว์ทดลอง 1) Control คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล 2) PDF คือ กลุ่มที่ได้รับ

3.86% G commercial PDF **3) PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

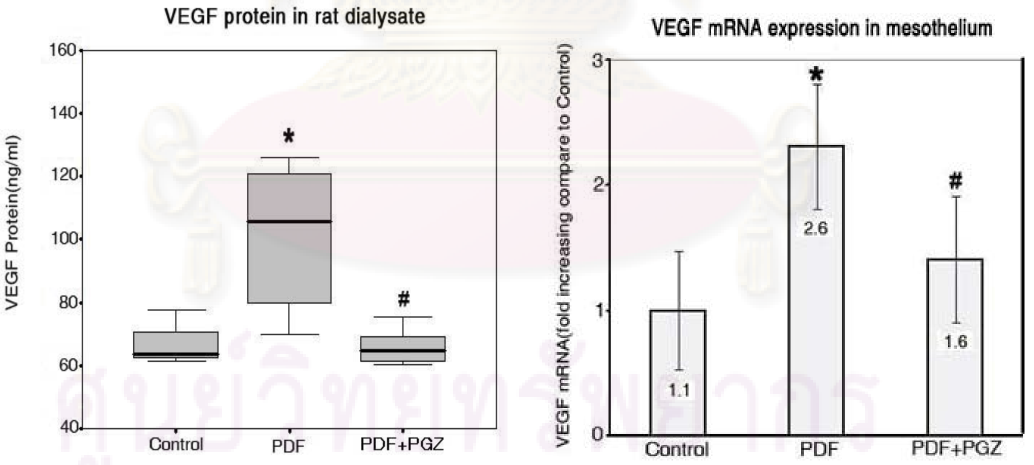
#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF

4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้อง

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้องที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้คือ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ transforming growth factor-β (TGF-β) ซึ่ง VEGF นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด angiogenesis ส่วน TGF-β นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด peritoneal fibrosis โดยการศึกษานี้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่กล่าวข้างต้นเทียบกับการแสดงออกของยีน 18s ribosomal RNA (18s rRNA) ด้วยวิธี real time quantitative RT-PCR (สำหรับการตรวจหาปริมาณ mRNA ใน mesothelial cells) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (สำหรับการตรวจหาปริมาณโปรตีนในน้ำยา dialysate)

ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF มีปริมาณการแสดงออกของ VEGF mRNA เป็น 2.6 เท่า เมื่อเทียบกับ VEGF mRNA ในกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36%G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มควบคุมเทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA (ปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 2.60±0.49 ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มควบคุมเทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 1.10±0.47) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA กับปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (ปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 2.60±0.49 ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ VEGF mRNA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 1.60±0.49) และเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีน VEGF ในน้ำยา

dialysate นั้น พบว่าสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF มีปริมาณการแสดงออกของโปรตีน VEGF มากกว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการแสดงออกของ VEGF protein และ mRNA ในสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF โดยที่ปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มควบคุม (ปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 105.52±27.79 ng/ml ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 64.29±7.91 ng/ml) แต่เมื่อเทียบระหว่างปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86%G commercial PDF กับเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (ปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 105.52±27.79 ng/ml ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ VEGF protein ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 65.03±7.73 ng/ml) (รูปที่ 43)

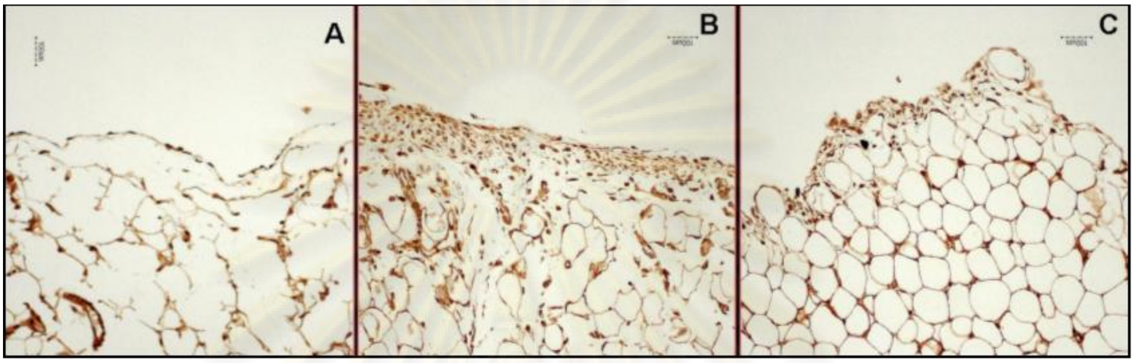


รูปที่ 43. แสดงปริมาณการแสดงออกของ VEGF protein ใน rat dialysate และ VEGF mRNA ใน mesothelial cells ของแต่ละกลุ่มการทดลอง **1) Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล **2) PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF **3) PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF

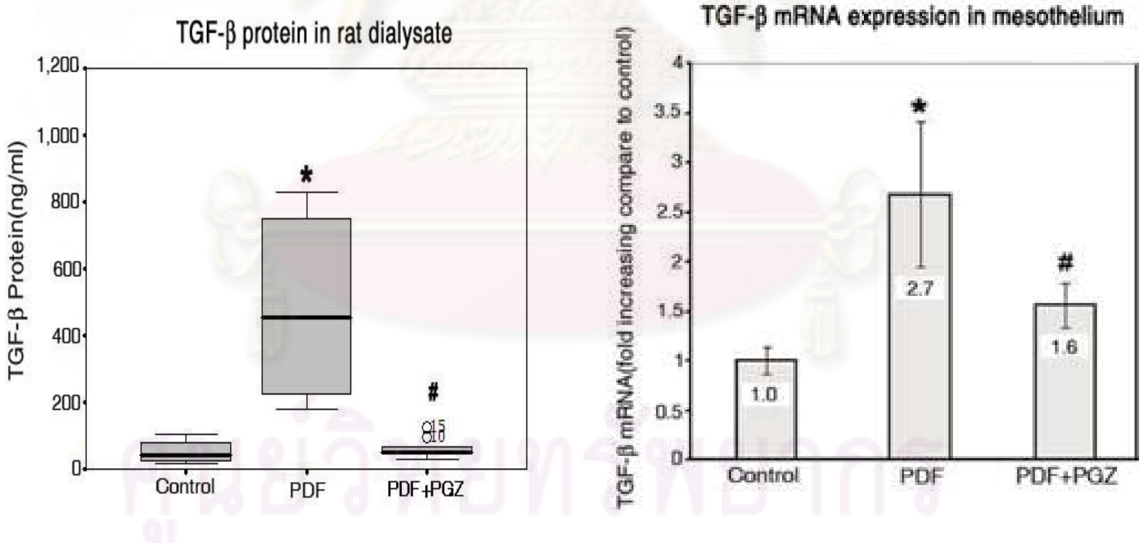
เพื่อยืนยันการแสดงออกของ VEGF จึงได้ทำการย้อม VEGF ในชิ้นเนื้อด้วยวิธี immunohistochemistry (บริเวณที่ย้อมติดสลาก VEGF จะเห็นเป็นสีน้ำตาล) ดังแสดงในรูปที่ 44



รูปที่ 44. แสดงปริมาณการแสดงออกของ VEGF บนเยื่อบุผนังช่องท้องของแต่ละกลุ่มการทดลอง A) **Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล **B) PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF **C) PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone ทุกรูปถ่ายภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า

พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF มีการแสดงออกของ TGF-β protein ในน้ำยา dialysate สูงถึง 9 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มควบคุม (ปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 440.82±318.37 ng/ml ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 44.90±44.90 ng/ml) แต่เมื่อเทียบระหว่างปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF กับปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ $p<0.01$ (ปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 440.82±318.37 ng/ml ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β protein ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 3.86% G commercial PDF เท่ากับ 57.14±18.37 ng/ml) และปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ

18s rRNA นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มควบคุมเทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA (ปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 2.70±0.70 ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มควบคุมเทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 1.00±0.11) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA กับปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA พบว่าทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ $p<0.01$ (ปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 2.70±0.70 ส่วนปริมาณของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ในกลุ่มที่ได้รับยา 0.1 μM pioglitazone ร่วมกับ 1.36% G commercial PDF เทียบกับปริมาณการแสดงออกของ 18s rRNA เท่ากับ 1.60±0.21) โดยพบความสอดคล้องของการแสดงออกของ TGF-β mRNA ใน mesothelial cell culture (รูปที่ 45)



รูปที่ 45. แสดงปริมาณการแสดงออกของ TGF-β protein ใน rat dialysate และ TGF-β mRNA ใน mesothelial cells ของแต่ละกลุ่มการทดลอง 1) **Control** คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือนอร์มัล 2) **PDF** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF 3) **PDF+PGZ** คือ กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา 0.1 μM pioglitazone

หมายเหตุ *พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ *p* value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่ *p* value น้อยกว่า 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กล่าวได้ว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้องที่กล่าวมาข้างต้นคือ VEGF และ TGF-β นั้นมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้องในสัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่ม (กลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF และกลุ่มที่ได้รับ 3.86% G commercial PDF ร่วมกับยา pioglitazone) โดยยา pioglitazone นั้นสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผนังช่องท้องที่สัมผัสกับ 3.86% G commercial PDF โดยยา pioglitazone นี้ มีผลทำให้การเกิด angiogenesis และ peritoneal fibrosis ของเยื่อบุผนังช่องท้องลดลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าทั้ง mesothelial cells และ adipocytes ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง (commercial PDF) นั้น เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ เกิดการตายแบบ apoptosis รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ (loss of differentiation marker) ของ mesothelial cell (การติดสีย้อมของแอนติบอดีย์ต่อ cytokeratin ลดลง) และ adipocytes (การติดสีย้อมของ oil red-O ลดลง) นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของทั้ง TGF-β และ VEGF ในระดับ mRNA นี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น พบว่า เกิดการหลุดลอกของ mesothelial cells เกิดการหนาตัวของชั้น submesothelium และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells จาก epithelial form ไปเป็น mesenchymal form ซึ่งเรียกว่า epithelial mesenchymal transdifferentiation (EMT) รวมทั้งพบการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่บริเวณ peritoneum ซึ่งลักษณะที่กล่าวมานี้ไม่พบในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของทั้ง TGF-β และ VEGF ในระดับ protein นี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งในเซลล์และในสัตว์ทดลองนั้น จะลดลงเมื่อได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone โดยยา pioglitazone (ซึ่งเป็น PPAR-γ agonist) นั้นสามารถที่จะป้องกันการบาดเจ็บและการตายของทั้ง mesothelial cells และ adipocytes หลังจากที่เซลล์ทั้งสองชนิดสัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง รวมทั้งสามารถลดการเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเยื่อบุช่องท้องของสัตว์ทดลองที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

โดยเชื่อว่ายา pioglitazone นั้นออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ DNA ในบริเวณที่เรียกว่า PPRE [79] ซึ่งการจับกันของ PPAR-γ กับ PPRE นั้น ส่งผลทำให้เซลล์มีการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่จะไปยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis (B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2)) [83]

ซึ่งการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้น ส่งผลให้มีการหลุดลอกของ mesothelial cells จาก peritoneal membrane ทำให้เกิดบริเวณที่เรียกว่า mesothelial deserted area นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ PPAR-γ ใน mesothelial cells โดยเชื่อว่ามีบทบาทในการเป็น local defense mechanism ซึ่ง PPAR-γ นี้ จะไปลดการแสดงออกของ inflammatory mediators ส่งผลทำให้โอกาสในการเกิด peritoneal fibrosis ลดน้อยลง [84] อีกทั้งยังมีรายงานอีกหลายฉบับที่

แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ PPAR-γ นั้นส่งผลให้มีการลดลงของระดับการแสดงออกของ TGF-β ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า TGF-β นั้นเป็น pro-apoptotic และ pro-fibrotic mediator กล่าวคือ TGF-β นั้นมีบทบาทในการทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในหลายขั้นตอน เช่น cooperate with TNF-α, activation caspase 1, activation caspase 3, activation caspase 8, activation caspase 9, down-regulation Bcl-X_L และ down-regulation Bcl-2 เป็นต้น [83, 85, 86] นอกจากนี้ TGF-β ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง phenotype ของ mesothelial cells จาก epithelium ไปเป็น myofibroblast ซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวว่า EMT ซึ่ง EMT นี้มีบทบาทสำคัญที่ทำให้มีการเพิ่มการสะสมของ extracellular matrix (ECM) โดย TGF-β นั้นไปทำให้เกิด down-regulation ในการแสดงออกของโปรตีนและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย ECM เช่น matrix metalloproteinases (MMPs) และไปทำให้เกิด up-regulation ในการแสดงออกของโปรตีนและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสม ECM เช่น plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), collagen, laminin และ fibronectin ส่งผลให้เกิด fibrosis ตามมา [87-89]

ส่วนการแสดงออกของ PPAR-γ ใน adipocytes นั้น มีข้อมูลสนับสนุนว่า PPAR-γ มีบทบาทต่อการเกิด adipogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการที่ pre-adipocytes เกิดการ differentiation ไปเป็น mature adipocytes [91-92] นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่าการแสดงออกของ PPAR-γ นั้นมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ cytokines ที่หลั่งออกมาจาก adipocytes (adipokines) โดยยาในกลุ่ม thaizolidinediones (รวมทั้งยา pioglitazone) นั้น ไปลดการแสดงออกของ leptin (ซึ่ง leptin นี้มีบทบาทใน metabolic syndromes) และมีผลทำให้ adiponectin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (ซึ่ง adiponectin นี้มีบทบาทใน metabolic syndromes เช่นเดียวกับ leptin) [93-94] เป็นต้น

ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวรนั้นคล้ายคลึงกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เช่น พบภาวะดื้อต่ออินสุลินในผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง เนื่องจากผู้ป่วยได้รับการสัมผัสกับกลูโคสในน้ำยาล้างไตเป็นเวลานาน มีผลทำให้เกิดการหลั่งของอินสุลินเพิ่มมากขึ้น ร่วมกับการที่ตัวรับอินสุลิน (insulin receptor) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ลดน้อยลง ทำให้พบภาวะดื้อต่ออินสุลินในผู้ป่วยที่ได้รับล้างไตทางช่องท้อง ซึ่งภาวะดื้อต่ออินสุลินนี้ มีผลทำให้ผู้ป่วยมีหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) และมีอัตราการตายจากโรคหัวใจเพิ่มมากขึ้น (cardiovascular mortality) เป็นต้น [95]

จากการศึกษาครั้งนี้ ในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าทั้ง mesothelial cells และ adipocytes ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone ที่ความเข้มข้น 0.1 μM นั้น มีระดับการแสดงออกของ TGF-β ลดลง อีกทั้งการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ทั้งสองชนิดเมื่อสัมผัส

กับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ mesothelial cells และ adipocytes ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยพบว่ามีการลดลงของการแสดงออกของ TGF-β ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone พบการลดลงของการเกิด EMT ของ mesothelial cells และพบการลดลงของการเกิด peritoneal fibrosis รวมทั้งพบ mesothelial deserted area ลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องเพียงอย่างเดียว

พบว่าการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neoangiogenesis) ในบริเวณ peritoneum ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ cytokine ชนิดหนึ่งคือ vascular endothelial growth factor (VEGF) (ซึ่ง VEGF นั้นมีบทบาทในการเกิด angiogenesis) โดย VEGF จะไปกระตุ้นให้เกิด endothelial cells เพิ่มมากขึ้น และเกิดการเคลื่อนที่ออกมา รวมทั้ง endothelial cells นี้จะไปรวมตัวกันเพื่อสร้างเป็นโครงสร้างของหลอดเลือดใหม่ที่แตกแขนงออกมาจากหลอดเลือดเดิม [96]

โดยพบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น มีปริมาณการแสดงออกของ VEGF เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการสร้างหลอดเลือดใหม่นั้น ก็ยังมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเยื่อบุผนังช่องท้องอีกด้วย กล่าวคือ ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น จะมีการรั่วของ high molecular weight solute (ในที่นี้คือ albumin) ออกมาในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสามารถในการขนส่งสารผ่านเยื่อบุผนังช่องท้องนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไป (ความสามารถในการขนส่งสารผ่านเยื่อบุผนังช่องท้องนั้นพิจารณาจาก จำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่ และ permeability ของเยื่อบุผนังช่องท้อง) ซึ่งหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่นี้ยังทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ดีพอ (high permeable) จึงส่งผลทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่กล่าวมาข้างต้น แต่ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone นี้ พบว่าจำนวนของหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่นั้นมีจำนวนน้อยกว่า และความสามารถในการขนส่งสารผ่านเยื่อบุผนังช่องท้องดีกว่า (มีการรั่วของ high molecular weight solute ออกมาในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องน้อยกว่า) เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องเพียงอย่างเดียว อีกทั้งเมื่อทำการวัดปริมาณของการแสดงออกของ VEGF ก็พบว่า ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องร่วมกับยา pioglitazone นั้นมีปริมาณของ VEGF น้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับแต่น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องเพียงอย่างเดียวอีกด้วย

จากที่กล่าวมาข้างต้นที่บอกว่า TGF-β นั้น มีบทบาทต่อการเกิด cell injury, cell death และ fibrosis แล้วยังพบอีกว่า TGF-β นั้น มีความสัมพันธ์กับการสร้างหลอดเลือดใหม่อีกด้วย กล่าวคือ มีรายงานจากการศึกษาหลายฉบับที่แสดงว่า TGF-β นั้น สามารถกระตุ้นให้มีการ

แสดงออกของ VEGF ได้ โดยผ่านทาง mitogen-activated protein (MAP) kinase อีกทั้งยังพบอีกว่า TGF-β นั้น สามารถกระตุ้นให้ endothelial cells เกิดการเพิ่มจำนวนและรวมตัวกันเพื่อสร้างเป็นโครงสร้างของหลอดเลือดใหม่ที่แตกแขนงออกมาจากหลอดเลือดเดิม มีการสะสมของ ECM รวมถึงยังทำให้ vascular smooth muscle cell มายังบริเวณที่มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพื่อที่ vascular smooth muscle cell นั้นจะช่วยเสริมความแข็งแรงให้กับหลอดเลือดใหม่ที่สร้างขึ้น [97-99] ซึ่งข้อมูลข้างต้นนั้น สอดคล้องกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดยทำการเพิ่ม TGF-β เข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ก็พบว่า เซลล์ที่ได้รับ TGF-β ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นมีปริมาณการแสดงออกของ VEGF มากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ตามปกติและเมื่อใส่ TGF-β ร่วมกับยา pioglitazone ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า ปริมาณการแสดงออกของ VEGF ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใส่ TGF-β เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า PPAR-γ agonist นั้น สามารถที่จะยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ โดยไปลดการแสดงออกของ VEGF อีกด้วย [100-101]

5.2 สรุปผลการวิจัย

ยา pioglitazone นั้นสามารถป้องกันการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ และสามารถลดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเยื่อบุช่องท้องที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องได้ โดยผ่านทางการควบคุมการแสดงออกของ TGF-β

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการชะลอการเสื่อมของเยื่อบุผนังช่องท้องในผู้ป่วยที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องได้ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนผลของยา pioglitazone ในการกระตุ้นผ่าน pathway อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเยื่อบุช่องท้องที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. **Nephrol Dial Transplant** 11 (1996): 498-506.

[2] Devuyst O, Topley N, Williams JD. Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions. **Nephrol Dial Transplant** 17 Suppl 3 (2002): 12-5.

[3] Dobbie JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. **Blood Purif** 7 (1989): 74-85.

[4] Pollock CA, Ibels LS, Eckstein RP. Peritoneal morphology on maintenance dialysis. **Am J Nephrol** 9 (1989): 198-204.

[5] Rubin J, Rogers WA, Taylor HM. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Ann Intern Med** 92 (1980): 7-13.

[6] Di Paolo N, Sacchi G, De Mia M. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Nephron** 44 (1986): 204-11.

[7] Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M. Morphological changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. **J Am Soc Nephrol** 13 (2002): 470-90.

[8] Williams JD, Craig KJ, Von Ruhland C, Topley N, Fallon M, William GT. Biopsy registry study group: the natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. **Kidney Int** 88 (2003): S43-9.

[9] Honda K, Nitta K, Horita S. Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultra-filtration. **Nephrol Dial Transplant** 14 (1999): 1541-9.

[10] Honda K, Nitta K, Horita H. Morphological changes in the peritoneal vasculature of on CAPD with ultrafiltration failure. **Nephron** 72 (1996): 171-6.

[11] Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. **Perit Dial Int** 19 (1999): 517-25.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[12] Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E. Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. **Am J Kidney Dis** 23 (1994): 64-73.

[13] Hendriks PM. Ho-dac-Pannekeet MM, van Gulik TM. Peritoneal sclerosis in chronic peritoneal dialysis patients: analysis of clinical presentation, risk factors and peritoneal transport kinetics. **Perit Dial Int** 17 (1997): 136-43.

[14] Davies SJ, Phillips L, Naish PF. Peritomeal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis. **J Am Soc Nephrol** 12 (2001): 1046-51.

[15] Coles GA, Williams JD, Topley N. Peritoneal inflammation and long-term changes in peritoneal structure and function. In: Gokal R, Khanna R, Krediet RT, Nolph KD. (eds.), **Textbook of Peritoneal Dialysis, 2nd Edition. Dordrecht, Netherland; Kluwer Acedemic Publishers** 2000: 556-83.

[16] Lai KN, Ho SK, Leung J, Tang SC, Chan TM, Li FK. Increased survival of mesothelial cells from the peritoneum in peritoneal dialysis fluid. **Cell Biol Int** 25 (2001): 445-50.

[17] Boulanger E, Wautier MP, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier JL. The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. **Nephrol Dial Transplant** 19 (2004): 2208-16.

[18] Horiuchi T, Miyamoto K, Miyamoto S, Fujita M, Sano N. Image analysis of remesothelialization following chemical wounding of cultured human peritoneal mesothelial cells: the role of hyaluronan synthesis. **Kidney Int** 64 (2003): 2280-90.

[19] Gotloib L, Wajsbrot V, Shostak A. Mesothelial dysplastic changes and lipid peroxidation induced by 7.5% icodextrin. **Nephron** 92 (2002): 142-55.

[20] Guan YF, Breyer MD. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. **Kidney Int** 60 (2001): 14-30.

[21] Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR. Hsueh WA: Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. **Hypertension** 37 (2001): 722-7.

[22] Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Tanaka T, Yamashita J, Chun TH, et al. Thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, regulate endothelial cell growth and secretion of vasoactive peptides. **Atherosclerosis** 158 (2001): 113-9.

[23] Oates JC, Reilly CM, Crosby MB, Gilkeson GS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: potential use for treating chronic inflammatory diseases. **Arthritis Rheum** 46 (2002): 598-605.

[24] Reilly CM, Oates JC, Sudian J, Crosby MB, Halushka PV, Gilkeson GS. Prostaglandin J(2) inhibition of mesangial cell iNOS expression. **Clin Immunol** 98 (2001): 337-45.

[25] Levonen AL, Dickinson DA, Moellering DR, Mulcahy RT, Forman HJ, Darley-Usmar VM. Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 21 (2001): 1846-51.

[26] Chinetti G, Griglio S, Antonucci M. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **J Biol Chem** 273 (1998): 25573-80.

[27] Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **J Clin Invest** 110 (2002 Oct): 923-32.

[28] Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stawowy P, Blaschke F, et al. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. **Biochem Biophys Res Commun** 293 (2002): 1431-7.

[29] Lin SH, Lin YF, Kuo YJ, HsuYJ, Hung YJ. Rosiglitazone improves glucose metabolism in nondiabetic uremic patients on CAPD. **Am J Kidney Dis** 42 (2003): 774-80.

[30] ศุภชัย ฐิติอาชากุล. การล้างไตทางช่องท้อง. **กรุงเทพฯ: บุ๊คเน็ท** 2544.

[31] Knapowski J, Feder E, Simon M, Zabel M. Evaluation of the participation of parietal peritoneum in dialysis: Physiological, morphological, and pharmacological data. **Proc Eur Dial Trans Assoc** 16 (1979):155-64.

[32] Dobbies JW, Lloyd JK, Gall CA. Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. **Adv Perit Dial** 12 (1996): 3-12.

[33] Obradovic MM, Stojimirovic BB, Trpinac DP. Ultrastructure changes of peritoneal lining cells in uremia. **Adv in Perit Dial** 16 (2000): 26-9.

[34] Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal physiology. **Perit Dial Int** 20S3 (2000): S9-100.

[35] Dobbie JW, Anderson JD. Ultrastructure, distribution, and density of lamellar bodies in human peritoneum. **Perit Dial Int** 16 (1996): 482-87.

[36] Khanna R, Nolph KD, Oreopoulos DG. The essentials of peritoneal dialysis. **Kluwer Academic Publishers, Boston** 1993: 10.

[37] Dobbies JW. Ultrastructure and pathology of the peritoneum in peritoneal dialysis. In: Gokal R, Nolph KD (eds), **The textbook of peritoneal dialysis, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands** 1994: 17-44.

[38] Miller FN. The peritoneum microcirculation. **In: Nolph (ed), Peritoneal Dialysis. Martinus Nijhoff, Boston** 1985: 51-93.

[39] Esperanca MJ, Collins DL. Peritoneal dialysis efficiency in relation to body weight. **J Pediatr Surg** 1 (1966): 162-7.

[40] สมชาย เอี่ยมอ่อง, เกรียง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันทน์, เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, ดุสิต ล้ำเลิศกุล และประเสริฐ ธนกิจจารุ, บรรณาธิการ. **Textbook of peritoneal dialysis.** กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. 2551.

[41] Simionescu M, Simionescu N, Palde GE. Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculaure II pathways followed by microperoxidase across the endothelium. **Microvasc Res** 15 (1978): 17.

[42] Gotloib L, Digenis GE, Rabinovich S. Ultrastructure of normal rabiit mesentery. **Nephron** 34 (1983): 248.

[43] Palade GE. Fine structure of blood capillary. **J Appl Physiol** 24 (1953): 1424.

[44] Khanna R, Nolph KD, Oreopoulos DG. The essentials of peritoneal dialysis. **Kluwer Academic Publishers, Boston** 1993: 10.

[45] Zakaria ER, Spain DA, Harris PD, Garrison RN. In vivo quantitative description of visceral microvascular reactivity in peritoneal dialysis (PD) (Abstract). **Perit Dial Int** 21 (2001): S1.

[46] Flessner MF, Fenstermacher JK, Dedrick RL , Blasberg RG. A distributed model of peritoneal - plasma transport: Tissue concentration gradients. **Am J Physiol** 248 (1985): F425-35.

[47] Leypoldt JK, Mistry CD. Ultrafiltration in peritoneal dialysis. In: R.gokal & K.D.Nolph. **The Textbook of Peritoneal dialysis. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers** 1994: 135-60.

[48] Goldberg AP. The metabolic and psychological effects of exercise training in hemodialysis patients. **Am J Clin Nutr** 33 (1980): 1620.

[49] Kautzsky-Willer A, Pacini G, Barnas U. Intravenous calcitriol normalizes insulin sensitivity in uremic patients. **Kidney Int** 47 (1995): 200-06.

[50] Tomiyama H, Motobe K, Zaydun G. Insulin sensitivity and endothelial function in hypertension. **AJH** 18 (2005): 178-82.

[51] Obradovic MM, Stojimirovic BB, Trpinac DP. Ultrastructure changes of peritoneal lining cells in uremia. **Adv in Perit Dial** 16 (2000): 26-9.

[52] Grahame GR, Torchia MG, Dankewich KA, Ferguson IA. Surface-active material in peritoneal effluent of CAPD patients. **Perit Dial Bull** 5 (1985): 109-14.

[53] Cantor JO, Willhite M, Bray BA, Keller S, Mandl I, Turino GM. Synthesis of crosslinked elastin by a mesothelial cell culture. **Proc Soc Exp Biol Med** 181 (1986): 387-91.

[54] Hills BA. Lubrication of visceral movement and gastric motility by peritoneal surfactant. **J Gastroenterol Hepatol** 11 (1996): 797-803.

[55] Di-Paolo N, Sacchi G. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. **Contrib Nephrol** 84 (1990): 10-26.

[56] Aalto M, Kulonen E, Penttinen R, Renvall S. Collagen synthesis in cultured mesothelial cells response to silica. **Acta Chir Scand** 147 (1981): 1-6.

[57] Yung S, Coles GA, Williams JD, Davies M. The source and possible significance of hyaluronan in the peritoneal cavity. **Kidney Int** 46 (1994): 527-33.

[58] Douvdevani A, Rapoport J, Konforty A, Argov S, Ovnat A, Chaimovitz C. Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 alpha and beta. **Kidney Int** 46 (1994): 993-1001.

[59] Di-Paolo N, Garosi G, Traversari L, Di-Paolo M. Mesothelial biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. **Perit Dial Int** 13 (1993): S109-12.

[60] Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. **N Engl J Med** 348 (2003): 403-13.

[61] Selgas R, Bajo A, Jimenez-Heffernan JA, Sanchez-Tomero JA, Del-Peso G, Aguilera A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. **Nephrol Dial Transplant** 21 (2006): 2-7.

[62] Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A, et al. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. **Am J Kidney Dis** 46 (2005): 938-48.

[63] Von RF. Zur Fettresoption. **Arch Pathol Anat Physiol** 26 (1863): 172-8.

[64] Ho-Dac Pannekeet MM. Peritoneal fluid markers of mesothelial cells. **Adv Renal Replace. Ther.** 5 (1998): 205-11.

[65] Chen JY, Chi CW, Chen HL, Wan CP, Yang WC, Yang AH. TNF-alpha renders human peritoneal mesothelial cells sensitive to anti-Fas antibody-induced apoptosis. **Nephrol Dial Transplant** 18 (2003): 1741-7.

[66] Catalan MP, Subira D, Reyero A, Selgas R, Ortiz-Gonzalez A, Egido J, et al. Regulation of apoptosis by lethal cytokines in human mesothelial cells. **Kidney Int** 64 (2003): 321-30.

[67] Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. **Perit Dial Int** 23 (2003): 530-41.

[68] Ichiro H, Yoshitaka I, Shinya K, Eiji K, Toshiro F. Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rat. **Nephrol Dial Transplant** 24 (2009): 437-47.

[69] Oh EJ, Ryu HM, Choi SY, Yook JM, Kim CD, Park SH, et al. Impact of low glucose degradation product bicarbonate/lactate-buffered dialysis solution on the epithelial-mesenchymal transition of peritoneum. **Am J Nephrol** 31 (2010): 58-67.

[70] Chieko H, Yoko T, Hideki N, Takashi N, Tsutomu S. Effect of glucose and plasminogen activator inhibitor-1 on collagen metabolism in the peritoneum. **Therapeutic Apheresis and Dialysis** 9 (2005): 173-81.

[71] Qiang Y, Krzysztof P, Ernesto RA, Arkadiusz S, Andrzej B. The role of the TGF/Smad signaling pathway in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis solution. **Nephron Exp Nephrol** 109 (2008): e71-8. (in press)

[72] Qinghua L, Haiping M, Jing N, Wei C, Qiongqiong Y, Xiuqing D, et al. Transforming growth factor β1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells. **Perit Dial Int** 28 (2008): 88-95.

[73] Raffaele S, Miguel F, Manuel LC, Migel A, Del P. Targeting the ERK/NF-κB/Snail1 pathway as a potential therapeutic strategy to prevent the failure of peritoneal dialysis. **Nature review** 6 (2009): 43-8.

[74] Mortier S, Lameire NH, Vriese AS. The effects of peritoneal dialysis solutions on peritoneal host defense. **Perit Dial Int** 24 (2004): 123-38.

[75] Douma CE, de Waart DR, Struijk DG, Krediet RT. Are phospholipase A2 and nitric oxide involved in the alterations in peritoneal transport during CAPD peritonitis?. **J lab Clin Med** 132 (1998 Oct): 329-40.

[76] Bertoli SV, Barone MT, Vago L. Changes in Peritoneal membrane after continuous ambulatory peritoneal dialysis-A Histological study. **Adv Perit Dial** 15 (1999): 28-31.

[77] Mateilsen MAM, van der Wal AC, Hendriks PMEM. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. **Perit Dial int** 19 (1999): 517-25.

[78] Lo WK, Brendolan A, Prowant BF, Moore HL, Khanna R, Twardowski ZJ, et al. Changes in the peritoneal equilibration test in selected chronic peritoneal dialysis patients. **J Am Soc Nephrol** 4 (1994): 1466-74.

[79] Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. **N Eng J Med** 351 (2004): 1106-18.

[80] Panchapakesan U, Chen XM, Pollock C.A. Drug insight: Thiazolidinediones and diabetic nephropathy relevance to renoprotection. **Nat Clin Pract Nephrol** 1 (2005): 33-43.

[81] Lin SH, Lin YF, Kuo SW, Hsu YJ, Hung YJ. Rosiglitazone improves glucose metabolism in nondiabetic uremic patients on CAPD. **Am J Kidney Dis** 42 (2003): 774-80.

[82] Pioglitazone. Drug information. In: Rose BD, editor. Uptodate Wellesley: Uptodate 2005.

[83] Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. **J Biol Chem** 21 (2007 Dec): 37006-15.

[84] Zhang YF, Yang X, Zhang YJ, Sun YL, Zou XL, Kong QY, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is expressed by rat peritoneal mesothelial cells: its potential role in peritoneal cavity local defense. **Am J Nephrol** 26 (2006): 602-11.

[85] Cao Y, Chen L, Zhang W, Liu Y, Papaconstantinou HT, Bush CR, et al. Identification of apoptotic genes mediating TGF-β/Smad3-induced cell death in intestinal epithelial cells using a genomic approach. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 292 (2007): G28-38.

[86] Chipuk JE, Bhat M, Hsing AY, Ma J, Danielpour D. Bcl-xL blocks transforming growth factor-β1-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release and not by directly antagonizing apaf-1-dependent caspase activation in prostate epithelial cells. **J Biol Chem** 276 (2001): 26614-21.

[87] Willis BC, Borok Z. TGF-β-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 293 (2007): L525-34.

[88] Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF-beta/Smad pathway in transplant arteriopathy. **J Heart Lung Transplant** 21 (2002 Sep): 999-1008.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[89] Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS. TGF-β-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. **Am J Physiol Cell Physiol** 292 (2007): C1361-9.

[90] Kim ES, Kim MS, Moon A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. **Int J Oncol** 25 (2004 Nov): 1375-82.

[91] Spiegelman BM. P PA R - : Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes** 47 (1998 Apr): 507-14.

[92] Spiegelman BM, Hu E, Kim JB, Brun R. PPAR-γ and the control of adipogenesis. **Biochimie** 79 (1997 Feb): 111-2.

[93] Bradford B. Lowell PPARg: an essential regulator minireview of adipogenesis and modulator of fat cell function. **Cell** 99 (1999 Oct): 239-42.

[94] Kintscher U, Law RE. PPAR-γ-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 288 (2005): E287-91.

[95] Prichard S. Major and minor risk factors for cardiovascular disease in peritoneal dialysis. **Perit Dial Int** 20 (2000): S154-9.

[96] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature** 438 (2005 Dec): 932-6

[97] Londesborough A, Vaahtomeri K, Tiainen M, Katajisto P, Ekman N, Vallenius T, et al. LKB1 in endothelial cells is required for angiogenesis and TGF-β-mediated vascular smooth muscle cell recruitment. **Development** 135 (2008): 2331-8.

[98] Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, Dijke PT. Transforming growth factor-β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. **Chest** 128 (2005 Dec): S585-90.

[99] Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. **Cytokine Growth Factor Rev** 8 (1997 Mar): 21-43.

[100] Herng-Sheu WH, Ou HC, Chou FP, Lin TM, Yang CH. Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. **Life Sciences** 78 (2006): 1520-8.

[101] Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor g ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. **J Biol Chem** 274 (1999 Mar): 9116-21.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow, Thermo electron corporation: model SAFE 2010)
2. เครื่องไมโครเวฟ (microwave, Electrolux)
3. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิพร้อมอุปกรณ์เขย่าสารเคมี (shaking water bath, Memmert: model M22)
4. เครื่องผสม (vortex, Labnet: model VX100)
5. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer, LabTech®: model LMS-100)
6. เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter, Fisher scientific: model AB15)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 2 ตำแหน่ง (analytical balance, Precia: model XB2200C)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง (analytical balance, Ohaus: model AR2140)
9. ไมโครโตม (microtome, Shandon Finesse)
10. เครื่องฝังเนื้อเยื่อ (tissue embedding, LEICA: model EG1150H)
11. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (tissue processor)
12. ตู้อบ (oven, Binder: model B28)
13. ตู้เย็น (refrigerator, Sanyo: model ultra low)
14. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope, Olympus: model BX41)
15. เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, Bio-Rad: model Smart Spec™ 3000)
16. โฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer, Uibra cell™: model VOX750)
17. เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (heat block, Tehne: model DB-2D)
18. ตู้เตรียม PCR (PCR cabinet)
19. ตู้ดูดควัน (fume hood, Captair: model filtair 824)
20. ตู้บ่มเพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator, ThermoForma)
21. หม้อฆ่าเชื้อ (autoclave, Selecta: model presoclave 75)
22. ตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmert)
23. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, Nikon: model Eclipse T5100)
24. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope, Olympus: model DP72)
25. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงปรับอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge, Boeco: model U-32R)
26. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump, Vacuumband: model ME2)
27. เครื่องสปินดาวเซนตริฟิวส์ (spindown centrifuge, LabTech: model GMC 260)
28. ตู้ดูดความชื้น (electronic dry carbinet, Gibco: model Dry100)

29. เครื่องเขย่า (orbital shaker, Bibby Sthart: model S01)

30. อ่างล้างความถี่สูง (ultrasonic bath, Power sonic: model 420)

31. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine, Eppendorf: model Mastercycler personal)

32. เครื่องตรวจวัดปริมาณกรดนิวคลิอิกแบบ real-time PCR (LightCycler, Roche: model 2.0)

33. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลท (microplate reader, Thermo Labsystems: model Multiskan EX 355)

34. เครื่องล้างบนไมโคเพลท (microplate washer, Thermo Labsystems: model Wellwash 4Mk2)

35. ถังบรรจุไนโตรเจน (liquid nitrogen tank, Taylor-Wharton: model VHC35)

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Plus slide (Superfrost plus microscope slides, Thermo scientific) เป็นสไลด์ที่เคลือบด้วยประจุบวก ชิ้นเนื้อจากกระบวนการ frozen tissue sections และ ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจด้วยวิธีเซลล์วิทยา จะยึดติดกับสไลด์โดย electrostatically attract หรือ ในกรณีของชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลีน จะจับกับสไลด์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond)
2. Cover glass 22x22 mm, thick 0.13-0.17 mm (HAD)
3. Cover slip sealant (DAKO)
4. กระดาษกรองเบอร์ 2 (filter paper, Whatman)
5. ทิปขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (tip, Axygen)
6. หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (tube, Axygen)
7. หลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร (centrifuge tube, Axygen)
8. ปิเปตขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร (pipette, Corning)
9. หลอดฉีดยาขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร (syringe, Nipro)
10. เข็มฉีดยาขนาด 18, 21 และ 27 นิ้ว (needle, Nipro)
11. Syringe filter (Sartorius)
12. บีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (beaker, Pyrex)
13. กระบอกตวงขนาด 100, 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (cylinder, Pyrex)
14. ขวดแก้วขนาด 100, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (bottle, Pyrex)
15. เครื่องกรองสารภายใต้สภาพสุญญากาศ (glass vacuum filtration unit, Gibco)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16. เครื่องช่วยดูดสารละลายด้วยปิเปต (pipeting aid, Gilson)

17. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร (tissue culture flask T25 and T75, NUNCLON™)

18. ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6, 12 และ 96 หลุม (6, 12 and 96-well plate, Corning)

19. จานเพาะเชื้อ (petri dish, Corning)

20. หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube)

21. ปิเปตชนิดหลายช่อง (multichannel pipette, BIOHIT PROLINE)

22. ภาชนะย้อมสี (staining jar)

23. คอปปลินจาร์ (coplin jar)

24. ภาชนะใส่สไลด์ (rack)

25. ตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette)

26. ปิเปตอัตโนมัติขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (auto pipette, Gilson)

27. กล่องรักษาความชื้น (moist chamber)

28. ผ้าก๊อส (Zhende)

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการวิจัย

1. Acetone (Merck)

2. Albumun from bovine serum Cohn Analog™, ≥ 98% (agarose gel electrophoresis), powder, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number A1470)

3. Anti CD 34, mouse anti human (Biogenex, cat. no. MU236UC)

4. Anti cytokeratin AE1/AE3 (Biogenex, cat. no. MU071UC)

5. APO-BrdU™ TUNEL assay kit (Invitrogen corporation, cat. no. A35126)

6. Biotin block system (ready to use) (DAKO)

7. Biotinylated-lycopersicon esculentum (tomato) lectin (Vector, cat. no. B-1175)

8. Chloroform (Merck)

9. Collagen I, rat tail, for cell culture (Gibco, cat. no. A10483-01)

10. CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega corporation, cat. no. G1780)

11. Cytology formulation consul-mounting, xylene base (Thermo Shandon)

12. DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous) (Sigma, product no. D5637)

13. Dexamethasone-water soluble, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number D2915)

14. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) ($O(CO_2C_2H_5)_2$) (SIGMA-ALDRICH, product number 159220)

15. Diluent (ready to use) (DAKO)

16. Dulbecco's modified eagle medium with 4,500 mg/L glucose and L-glutamin, without sodium bicarbonate, powder, cell culture tested (DMEM) (SIGMA-ALDRICH, product number D5648)

17. Dimethyl sulfoxide, ≥ 99.7%, Hybri-MAX™, sterile filtered, hybridoma tested (DMSO) (SIGMA-ALDRICH, product number D2650)

18. Envision ™ (ready to use) (DAKO, Carpinteria, CA)

19. Eosin solution (ready to use) (C.V. laboratories co., ltd)

20. Ethanol 99.9% (Merck)

21. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, approx. 99% titration (EDTA) (SIGMA-ALDRICH, product number ED2SS)

22. Formaldehyde solution, min. 37% (Merck, cat. no. 1.03003.2500)

23. Giemsa's azure eosin methylene blue for microscope (ready to use) (Merck, cat. no. 1.09204)

24. Glacial acetic acid (Merck)

25. GLUTAMAX™ I (100X) (L-glutamine) (Invitrogen corporation, cat. no. 35050-061)

26. HEPES, ≥ 99.5% (titration) (SIGMA-ALDRICH, product number H3375)

27. Holo-transferrin human, powder, cell culture tested (transferring) (SIGMA-ALDRICH, product number T0665)

28. Hydrochloric acid, ACS reagent, 37% (HCl) (SIGMA-ALDRICH, product number 320331)

29. Hydrocortisone, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number H0888)

30. Hydrogen peroxide (H_2O_2) (SIGMA-ALDRICH, product number 31642)

31. Imidazole, ACS reagent, ≥ 99% (titration) (SIGMA-ALDRICH, product number I2399)

32. Insulin, lyophilized powder, ≥ 25 USP units/mg, γ-irradiated, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number I1882)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

33. 3-isobutyl-1-methylxanthine, $\geq$ 99% (HPLC), powder (IBMX) (SIGMA-ALDRICH, product number I5879)

34. Mayer's haematoxylin (ready to use) (C.V. laboratories co., ltd)

35. Monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin, clone 1A4 (DAKO, code M0851)

36. M199 with hanks' salts and L-glutamine without odium bicarbonate, powder, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number M0393)

37. Normal horse serum (NHS) (ready to use) (Pan Biotech GmSH)

38. Oil red O (Fluka, product number 75087)

39. PARAPLAST* tissue embedding medium (McCormick^{TM} scientific)

40. Pentobabital 5.47% (CEVA SANTE ANIMALE)

41. Potassium chloride, SigmaUltra, $\geq$ 99.0% (KCl) (SIGMA-ALDRICH, product number P9333)

42. Potassium phosphate monobasic, powder, $\geq$ 99.0%, cell culture tested, insect cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number P5655)

43. Secondary antibody (ready to use) (visualization reagent :- envision system, DAKO)

44. Sodium bicarbonate, plant cell culture tested ($NaHCO_3$) (SIGMA-ALDRICH, product number S4772)

45. Sodium chloride, 95% (NaCl) (Merck, cat. no. 1.06404.1000)

46. Sodium hydroxide, bead, 20-40 mesh (NaOH) (SIGMA-ALDRICH, product number S0399)

47. Sodium phosphate dibasic, SigmaUltra, $\geq$ 99% (Na_2HPO_4) (SIGMA-ALDRICH, product number S9638)

48. Sodium phosphate monobasic monohydrate, ACS reagent, 98.0-102.0% ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (SIGMA-ALDRICH, product number S9638)

49. Streptavidin-HRP conjugates (streptavidin peroxidase (ready to use), lab vision and neomarkers lab vision products Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) (ready to use)

50. Sterile water (ready to use)

51. TGF-β1 immunoassay (R&D systems, cat. no. DB100B)

52. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche, cat. no. 04379012001)

53. Trisma base, primary standard and buffer, ≥ 99.9% (titration), crystalline (SIGMA-ALDRICH, product number T1503)

54. Triton® x-100 (SIGMA-ALDRICH, product number T9284)

55. TRIzol® Reagent (Invitrogen corporation, cat. no. 15596-018)

56. Trypsin from porcine pancreas, lyophilized powder, Type II-S, ≤ 10 BTEE units/mg protein (chymotrypsin) (SIGMA-ALDRICH, product number T7409)

57. VEGF (A-20), rabbit polyclonal IgG (SANTA CRUZ, cat. no. SC-152)

58. VEGF immunoassay (R&D systems, cat. no. QVE00B)

59. Xylene (Merck)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 เทคนิคการเลี้ยง mesothelial cells

1) ขั้นตอนการเลี้ยง

A. คีบชิ้นเนื้อที่ได้มาใส่ลงไปในถ้วย

B. เลาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อจากคนไข้

รูปที่ 46. แสดงการเลาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อ

C. ตัดแบ่งเนื้อเป็นชิ้นละ 6 ตารางเซนติเมตร

D. ล้างชิ้นเนื้อด้วย phosphate-buffered saline (PBS) จนกว่าน้ำจะใส

E. คีบชิ้นเนื้อประมาณ 2-3 ชิ้นใส่ลงไปใน centrifuge tube

F. เท digestion solution ลงไปประมาณ 25 มิลลิลิตร

G. เอาไป incubate ใน shaker water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

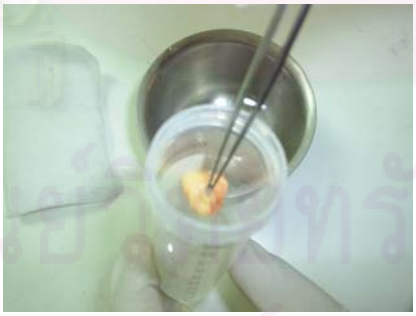
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 47. แสดงการ incubate ชิ้นเนื้อใน shaker water bath

H. พอครบ 20 นาที ก็เอาไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที

รูปที่ 48. แสดงการปั่นชิ้นเนื้อ

I. พอครบ 5 นาที ก็เอาที่คีบ (forcept) มาคีบชิ้นเนื้อที่ลอยอยู่ด้านบนออกจาก centrifuge tube เบา ๆ



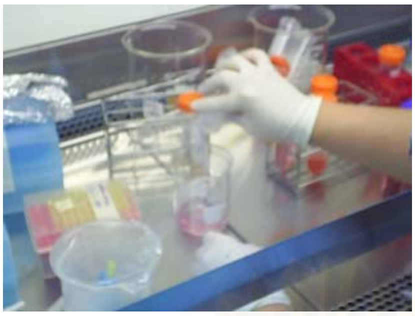
รูปที่ 49. แสดงการคีบชิ้นเนื้อออกจาก centrifuge tube

J. ล้างเซลล์ที่อยู่ที่ก้น centrifuge tube ด้วย PBS ประมาณ 50 มิลลิลิตร

K. เอาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที

L. เทส่วนบนทิ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 50. แสดงการเทส่วนบนทิ้ง

M. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 4 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์อีกครั้งหนึ่ง

N. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

O. เทส่วนบนทิ้ง

P. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 6 มิลลิลิตร ลงไปใน centrifuge tube

Q. ผสมเซลล์ให้เข้ากันดี แล้วดูดใส่ลงไปใน culture dish 2 อัน (อันละ 3 มิลลิลิตร)

รูปที่ 51. แสดงการดูดเซลล์ใส่ลงไปใน culture dish

R. เลี้ยงเซลล์ใน 5%CO_2, 37°C incubator

S. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกครึ่งหนึ่ง หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

T. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

U. พอโตประมาณ 90% ให้ทำการ passage cell ในอัตรา 1:3 โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

a) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก culture dish ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 90%

b) ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปใน culture dish เล็กน้อย

c) ดูด PBS ออกให้หมด

d) ใส่ trypsin-EDTA solution 1 ลงไปใน culture dish ประมาณ 2 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

e) แกว่ง culture dish ประมาณ 1 นาที

f) ดูด trypsin-EDTA solution 1 ออกจาก culture dish (ให้เหลือติดก้นเล็กน้อย)

g) เอาไป incubate ใน 5%CO_2, 37°C incubator เป็นเวลาประมาณ 8-10 นาที

h) ถ้ายังหลุดออกมาไม่หมด ให้เคาะด้านข้างและด้านล่างของ culture dish เบา ๆ

i) ถ้าเซลล์หลุดออกหมดแล้ว ก็ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใน culture dish ประมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยของ trypsin-EDTA solution 1

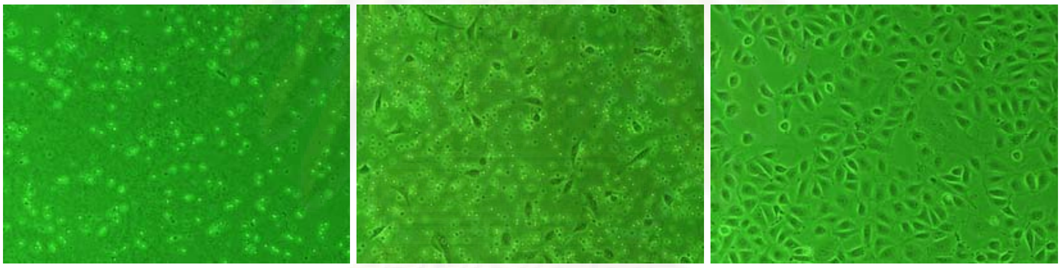
j) ดูดทั้งหมดมาใส่ใน centrifuge tube

k) เอาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

l) พอครบ 5 นาที ก็ให้เอา centrifuge tube มาเทน้ำส่วนบนทิ้งไป

m) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใน centrifuge tube ประมาณ 9 มิลลิลิตร

n) ผสมเซลล์ให้เข้ากันดี แล้วดูดใส่ลงไปใน culture dish 3 อัน (อันละ 3 มิลลิลิตร)



วันที่ 1 วันที่ 7 ความหนาแน่น 90%

รูปที่ 52. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

2) การเตรียมน้ำยา

A. อาหารเลี้ยงเซลล์

Fetal bovine serum (FBS)	10	% (v/v)
Penicillin	50	u/ml
Streptomycin	50	µg/ml
Insulin	0.1	µg/ml
Transferrin	5	µg/ml
Hydrocortisone	0.4	µg/ml
L-glutamine	5	mM

ใน M199

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B. PBS

Sodium chloride	0.137	M
Potassium chloride	2.7	mM
Potassium dihydrogen phosphate	1.4	mM
Disodium hydrogen phosphate	0.01	M

ในน้ำกลั่น

C. Trypsin-EDTA solution 1

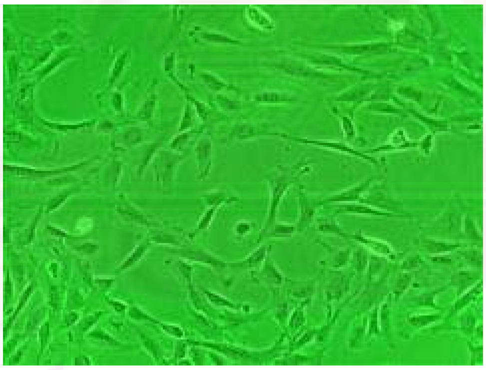
Trypsin	0.125	% (w/v)
EDTA	0.53	mM

ใน PBS

1.2 **เทคนิคการเลี้ยง** pre-adipocyte (3T3-L1) **และการ** differentiate **ไปเป็น** adipocytes

1) **ขั้นตอนการเลี้ยง**

A. เพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 (media 3) จนมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 60-80% ก็ให้ทำการ passage เซลล์ในอัตราส่วน 1:4 โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้



รูปที่ 53. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 60-80%

B. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์

C. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์เล็กน้อย

D. ดูด PBS ออกให้หมด

E. ใส่ trypsin-EDTA solution 2 ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 2 มิลลิลิตร

F. แกว่งภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10 วินาที

G. เอาภาชนะเลี้ยงเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscope)

H. ถ้าเซลล์หลุดออกหมดแล้ว ก็ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยของ trypsin-EDTA solution 2

I. ดูดทั้งหมดมาใส่ใน centrifuge tube

J. เอาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที

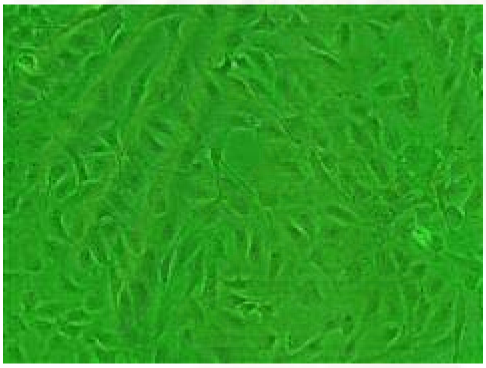
K. พอครบ 5 นาที ก็ให้เอา centrifuge tube มาเทน้ำส่วนบนทิ้งไป

L. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ลงไปใน centrifuge tube ประมาณ 16 มิลลิลิตร

M. ผสมเซลล์ให้เข้ากันดี แล้วดูดใส่ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ 4 อัน (อันละ 4 มิลลิลิตร)

2) **ขั้นตอนการ differentiate**

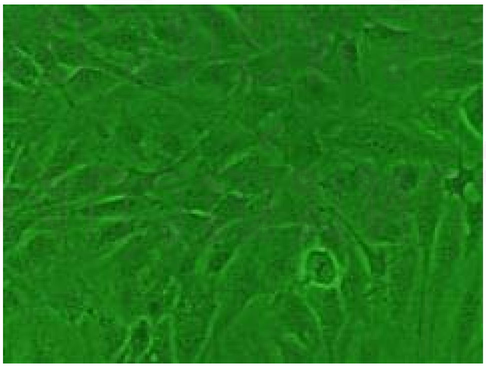
A. เลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80-100%



รูปที่ 54. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 80-100%

B. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ออกให้หมด

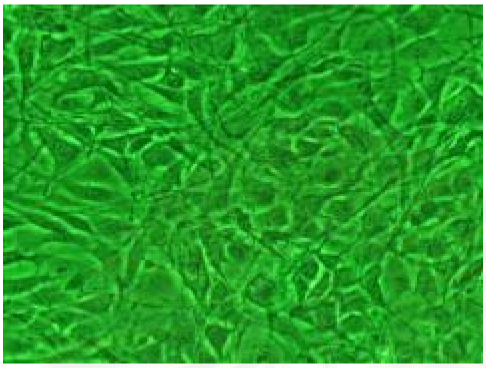
C. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 (media 1) ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (เริ่มทำการ differentiate) (นับเป็น วันที่ 0)



รูปที่ 55. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่เริ่มทำการ differentiate

D. วันที่ 2 ให้ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ออกให้หมด

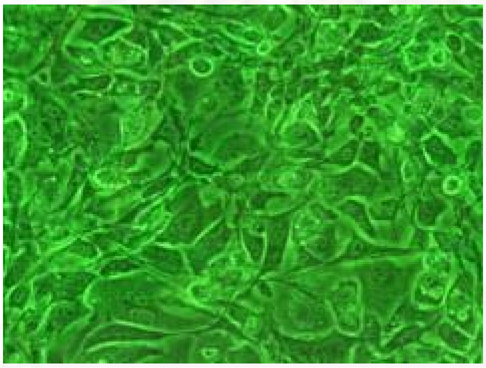
E. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 อันใหม่ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (นับเป็น วันที่ 2)



รูปที่ 56. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 2

F. วันที่ 4 ให้ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ออกให้หมด

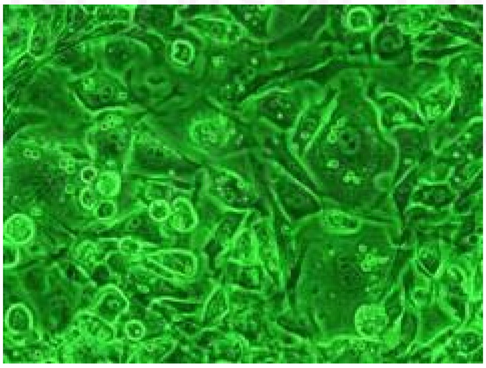
G. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 (media 2) ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (นับเป็น วันที่ 4)



รูปที่ 57. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 4

H. วันที่ 6 ให้ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ออกให้หมด

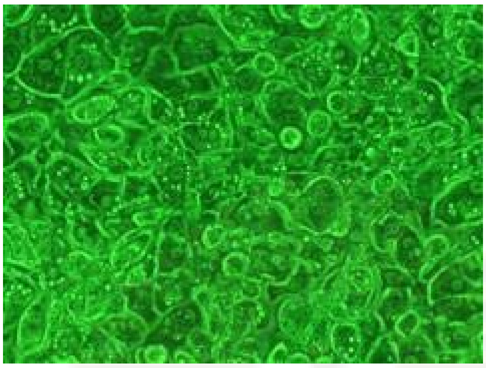
I. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (นับเป็น วันที่ 6)



รูปที่ 58. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

J. เริ่มทำการทดลองได้ในวันที่ 10



รูปที่ 59. แสดงลักษณะของ 3T3-L1 ที่ทำการ differentiate เป็นวันที่ 10

3) การเตรียมน้ำยา

A. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 (media 1)

FBS	10	% (v/v)
Insulin	5	μg/ml
Dexamethasone	0.25	μM
IBMX	0.5	mM

ใน DMEM

B. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 (media 2)

FBS	10	% (v/v)
Insulin	5	μg/ml

ใน DMEM

C. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 (media 3)

FBS	10	% (v/v)

ใน DMEM

D. Trypsin-EDTA solution 2

Trypsin	0.25	% (w/v)
EDTA	0.53	mM

ใน PBS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 **การใส่สารในเซลล์ของแต่ละกลุ่ม**

1) **ขั้นตอนการทดลอง**

A. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด

B. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมเล็กน้อย

C. ดูด PBS ออกให้หมด

D. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4 (media 4) สำหรับ mesothelial cells และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 5 (media 5) สำหรับ adipocytes ลงไปเพื่อกำจัด FBS ออกให้หมด

E. Incubate เซลล์ใน 5%CO_2, 37^{o}C incubator เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

F. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4 ออกให้หมด

G. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4 ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมเล็กน้อย

H. ดูด PBS ออกให้หมด

I. ใส่สารดังต่อไปนี้

a) หลุมควบคุม (control) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4

b) หลุม PDF ใส่ 4%albumin in 1.36% G commercial PDF

c) หลุม PDF+PGZ ใส่ 4%albumin in 1.36% G commercial PDF + pioglitazone ที่ความเข้มข้น 0.1 μM

J. Incubate เซลล์ที่ใส่สารแล้วใน 5%CO_2, 37^{o}C incubator เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2) **การเตรียมน้ำยา**

A. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4

Albumin	4	% (w/v)
ใน M199		

B. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 5

Albumin	4	% (w/v)
ใน DMEM		

C. 4%albumin in 1.36% G commercial PDF

Albumin	4	% (w/v)
ใน 1.36% G commercial PDF		

D. 4%albumin in 1.36% G commercial PDF + pioglitazone 0.1 μM

Albumin	4	% (w/v)
Pioglitazone	0.1	μM

ใน 1.36% G commercial PDF

2. การยืนยันชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง

2.1 การย้อม mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ cytokeratin

1) ขั้นตอนการย้อม

A. ดูดสารทั้งหมดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ (เลี้ยงเซลล์บน cover slip)

B. ล้างด้วย PBS 1 รอบ

C. ดูด PBS ออกให้หมด

D. คีบ cover slip มาวางผึ่งบน moist chamber

E. หยด acetone ที่เย็นลงไปบน cover slip

F. ทำการ incubate ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 10 นาที

G. สะบัด acetone ออกจาก cover slip

H. ล้าง cover slip ด้วย PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

I. หยด diluent ลงบน cover slip

J. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

K. สะบัด cover slip

L. หยด anti cytokeratin AE1/AE3 (dilution 1:100) ลงบน cover slip

M. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

N. ล้าง cover slip ด้วย PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

O. สะบัด cover slip

P. หยด secondary antibody (โดยใช้ visualization reagent :- envision system) ลงบน cover slip

Q. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

R. ล้าง cover slip ด้วย PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

S. หยด DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous) ลงบน cover slip

T. Incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

U. ล้าง cover slip ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

V. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer's haematoxylin

W. Mounting cover slip ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

X. ปิด cover slip ลงบนสไลด์

2) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

3) การเตรียมน้ำยา

A. 30X PBS, pH 6.2

NaCl	526	g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	82.8	g
น้ำกลั่น	1,625	ml
5N NaOH	120	ml

B. PBS-T

30X PBS, pH 6.2	35	ml
น้ำกลั่น	1,015	ml
Triton X-100	100	μl
Normal horse serum (NHS)	1	ml

C. Tis-HCl buffer, pH 7.4

Sock A	2.5	ml
stock B	2.07	ml
น้ำกลั่น	5.43	ml

โดย

Stock A: 2.42 g Trisma base ใน 100 ml water

Stock B: 1.7 ml HCl เข้มข้น ใน 100 ml water

D. DAB 50 mg/ml

DAB	50	mg
น้ำกลั่น	1	ml

แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 μl (or 5 mg)

เก็บที่ -20°C

E. 1M Imidazole

Immidazole	68.08	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

F. การเตรียม DAB tris-HCl buffer, pH 7.4

Tris-HCl buffer, pH7.4	10	ml
30X H_2O_2	10	µl
DAB	100	µl
1M Imidazole	100	µl

G. Diluent (ready to use)

H. Cytology formulation consul-mounting, xylene base (ready to use)

I. Secondary antibody (ready to use)

J. Mayer's haematoxylin (ready to use)

2.2 การย้อม mature adipocytes ด้วย oil red O

1) ขั้นตอนการย้อม

A. ดูดสารต่าง ๆ ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์

B. ล้างเซลล์ด้วย PBS

C. เคาะให้แห้ง

D. หยด 70% ethanol ลงไปกลั้ว ๆ

E. เททิ้ง

F. หยด oil red O ลงไปให้ท่วมเซลล์

G. Incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

H. เท oil red O ออก

I. หยด 70% ethanol ลงไปเพื่อล้างสีออก

J. กลั้ว ๆ แล้วรีบเทออก

K. ใส่น้ำลงไป 2-3 ครั้ง เพื่อล้าง 70% ethanol

L. หยด Mayer's haematoxylin ลงไปในเซลล์

M. เขย่าให้ทั่ว ๆ

N. เททิ้ง

O. ล้างสีด้วยน้ำ (ล้างจนกว่าจะไม่มีสีออกมา)

P. หยด lithium carbonate solution ลงไปในเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Q. เขย่าให้ทั่ว ๆ

R. เททิ้ง

S. ล้างด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง

T. ผึ่งให้แห้ง

2) ผลการย้อม

Fat droplet ติดสีแดงออกน้ำตาลภายในเซลล์

นิวเคลียส ติดสีฟ้าอมม่วง

3) การเตรียมน้ำยา

A. Oil red O

Oil red O	1	g
70% Ethanol	50	ml
Acetone	50	ml

กวนจนกว่าสีจะละลายได้มากที่สุด (อาจจะละลายไม่หมด)

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.2

B. Lithium carbonate solutions

Lithium carbonate	1.54	g

เติมน้ำกลั่นจนได้สารละลายอิ่มตัว

ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบนมาใช้

C. 70% Ethanol

95% Ethanol	70	ml
น้ำกลั่น	25	ml

3. การศึกษา cell death และ cytotoxicity

3.1 เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย PI

1) ขั้นตอนการทำ

A. ดูดสารทั้งหมดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์

B. ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 รอบ

C. ดูด PBS ออกให้หมด

D. ดูด PI ใส่ลงไปในเซลล์ แค่พอท่วมเซลล์

E. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

2) ผลการย้อม

เซลล์ที่ตาย ติดสีแดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ที่เป็น ไม่ติดสี

3) **การเตรียมน้ำยา**

A. PI (ready to use)

3.2 เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย APO-BrdU™ TUNEL assay kit

1) **ขั้นตอนการทำ**

A. ดูดสารทั้งหมดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์

B. ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 รอบ

C. ดูด PBS ออกให้หมด

D. ดูด 10% formalin in PBS ใส่ลงไปในเซลล์ เพื่อทำการคงสภาพเซลล์ไว้

E. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

F. ดูด formalin ออกให้หมด

G. ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 รอบ

H. ดูด PBS ออกให้หมด

I. ดูด 70% ethanol ที่เย็น ใส่ลงไปในเซลล์

J. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

K. ดูด 70% ethanol ออกให้หมด

L. ล้างเซลล์ด้วย wash buffer 1 รอบ

M. ดูด wash buffer ออกให้หมด

N. ดูด DNA-labeling solution ใส่ลงไปในเซลล์ แค่พอท่วมเซลล์

O. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

P. ล้างเซลล์ด้วย rinse buffer 1 รอบ

Q. ดูด rinse buffer ออกให้หมด

R. ดูด antibody solution ใส่ลงไปในเซลล์ แค่พอท่วมเซลล์

S. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

T. ดูด PI/RNase A staining buffer ใส่ลงไปในเซลล์ แค่พอท่วมเซลล์

U. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

2) **ผลการย้อม**

เซลล์ที่เกิด apoptosis ติดสีเขียว

เซลล์ทั้งหมด ติดสีแดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) การเตรียมน้ำยา

A. DNA-labeling solution

Reaction buffer (จากชุด kit)	10	μl
Terminal deoxynucleotidyl transferase (จากชุด kit)	0.75	μl
5-Bromo-2’-deoxyuridine 5’-triphosphate (จากชุด kit)	8	μl
น้ำกลั่น	31.25	μl

B. Antibody solution

Anti-BrdU mouse monoclonal antibody PRB-1, alexa fluor 488 conjugate (จากชุด kit)	5	μl
Rinse buffer (จากชุด kit)	95	μl

C. 10% Formalin in PBS

Formaldehyde solution	100	ml
PBS	900	ml

D. Wash buffer (จากชุด kit)

3.3 เทคนิคการตรวจวัดปริมาณ LDH โดยใช้ CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay kit

1) ขั้นตอนการทำ

A. ดูดสารทั้งหมดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์

B. ดูด lysis solution (10X) ใส่ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์

C. ทำการ incubate เซลล์ ไว้ใน 5%CO_2, 37^{o}C incubator เป็นเวลา 45 นาที

D. ดูดเซลล์ที่ lyse แล้วไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml

E. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที

F. ดูดเฉพาะส่วนใสใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

G. ดูด reconstituted substrate mix ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

H. ทำการ incubate ตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

I. ดูด stop solution ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

J. เคาะ 96-well plate เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันดี

K. นำ 96-well plate ไปใส่ในเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลท ที่ 490 nm

2) การเตรียมน้ำยา

A. Reconstituted substrate mix

Assay buffer (จากชุด kit)	12	ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Substrate mix (จากชุด kit) 1 ขวด

B. Lysis solution (10X) (จากชุด kit)

C. Stop solution (จากชุด kit)

4. การศึกษาการเรียงตัวของ mesothelial cells **บนชิ้นเนื้อ โดยวิธี** liver imprint

1) ขั้นตอนการทำ

A. เอาตับของหนูที่ตัดได้มาวางแนบลงบนสไลด์

B. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

C. หยดสี giemsa ลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

D. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

E. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2) ผลการย้อม

นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของทุกเซลล์ ติดสีม่วง-น้ำเงิน

3) การเตรียมน้ำยา

A. Giemsa (ready to use)

5. การศึกษาความหนาของ submesothelial

1) หลักการการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาและอิมมูโนพยาธิวิทยา

โดยมีขั้นตอนทั้งหมดดังนี้

A. การคงสภาพ (fixation)

เป็นการรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งรักษาสภาพของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาให้อยู่ในสภาพเดิม หรือหลีกเลี่ยงการทำลายต่อ antigen determinant หรือ epitope (ตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติเจนนั้น ๆ บางชนิดอาจทนกับ fixative ชนิดหนึ่ง แต่อาจจะไม่ทนต่อชนิดอื่น ๆ หรือแอนติเจนหลาย ๆ ตัวอาจถูกทำลายโดย fixative ทุกชนิด เมื่อต้องการศึกษาทางอิมมูโนฮีสโตเคมีจะต้องย้อมจาก cryosections อีกทั้งเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ fix แอนติเจนอาจจะหายไป หรือแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือเนื้อเยื่อที่ fix นานเกินไปอาจจะเกิด cross-linking ทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง (masking) หรืออาจถูกทำลายเป็นบางส่วน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ fixative และระยะเวลาการ fix สภาวะที่เหมาะสมก็คือชิ้นเนื้อที่บางและเวลา fix ที่สั้น ดังนั้น การ fix นานเกินไปทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง และรบกวนผลการย้อมได้ ปัจจุบันยังไม่มี fixative ชนิดใดที่เหมาะสำหรับแอนติเจนทุกชนิด

10% formalin หรือ 10% neutral buffer formalin เป็น fixative ซึ่งใช้กันแพร่หลาย ระยะเวลาในการ fix เนื้อเยื่อโดยสมบูรณ์จะประมาณ 18-24 ชั่วโมง fixative ขนาดของชิ้นเนื้อที่เหมาะสมคือ 10x10x3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

B. การล้าง (washing)

C. การขจัดน้ำ (dehydration)

D. การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing)

E. การแทรกซึม (infiltration)

ซึ่งกระบวนการดังที่กล่าวมาแล้ว ดังข้อ 1 ถึง 5 นั้น ได้ใช้เครื่อง tissue processor ดังรูปที่ 60

รูปที่ 60. แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor)

F. การฝังเนื้อเยื่อ (embedding)

รูปที่ 61. แสดงการฝังเนื้อเยื่อ

G. Sectioning of tissue

ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome หนา 3 ไมโครเมตร ลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิประมาณ 43 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์เคลือบด้วย 3-aminopropyl triethoxysilane หรือสไลด์ที่เคลือบประจุบวก (plus slide) เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุด รอให้ section แห้งสนิท นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 56°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 62. แสดงการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome

H. Deparaffinization and rehydration

คือการล้าง paraffin ที่เคลือบ section ด้วย xylene ผ่านไปยัง alcohol จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำแล้วแช่ในน้ำกลั่น ไม่ควรปล่อยให้สไลด์แห้ง

หากมีความจำเป็น สามารถเก็บ tissue slides ที่ rehydrated แล้ว ที่ 2-8 องศาเซลเซียส ใน buffer ได้นานถึง 18 ชั่วโมง โดยก่อนใช้ให้นำมาวางที่อุณหภูมิห้อง 20-25 องศาเซลเซียส ก่อนการย้อมต่อไป โดยไม่รบกวนผลการย้อม

I. Blocking endogenous enzyme

เอ็นไซม์ที่มีอยู่ใน section จะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะ คือไม่ได้เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ต้องยับยั้งก่อนทุกครั้ง มิฉะนั้น จะทำให้เกิดผลบวกผิดพลาด หรือ background staining เอ็นไซม์ส่วนใหญ่พบในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเซลล์ตับ ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดยใช้ substrate ของมันคือ 3% hydrogen peroxide ในน้ำ 10 นาที

J. การคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval technique)

เป็นการคืนสภาพแอนติเจนหรือเพิ่มความเป็นแอนติเจนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ เนื้อเยื่อซึ่ง fix ด้วย formalin ซึ่งเป็น cross-linking fixative จะทำให้เกิดการจับตัวกัน (bridging) ระหว่างamino acid ภายในโมเลกุลเดียวกันและจับตัวกับโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง ขบวนการนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญที่เชื่อว่าเป็นตัวการในการ block ไม่ให้ antibody เข้าไปจับตัวกับ antigen determinant (epitope) ได้ ขบวนการนี้เรียกว่า masking of antigen ในการทำอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry; IHC) จึงจำเป็นที่จะต้องแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ โดยการทำ epitope retrieval ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการ de-masking protein ที่ antigenic determinant ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อนั้น ๆ มาย้อมโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี ซึ่งทำให้การย้อมติดสีดีขึ้น

วิธีการคืนสภาพแอนติเจน สามารถทำได้ หลายวิธี ได้แก่

a) โดยใช้เอนไซม์ (enzymatic unmasking technique) โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ proteinase K และ pepsin การใช้เอ็นไซม์จะช่วยคืนสภาพของแอนติเจนหลายชนิด ทำให้

การย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีติดสีดีขึ้น แต่ก็ไม่สามารถใช้ได้ดีกับแอนติเจนทุกชนิดได้ เพราะแอนติเจนบางชนิดไม่สามารถคืนสภาพได้ด้วยการใช้เอ็นไซม์ย่อย โดยเฉพาะชิ้นเนื้อที่ fix ฟอร์มาลินเป็นเวลานาน

b) โดยวิธีการทางฟิสิกส์ (physical methods) โดยทั่วไปใช้ความร้อน (heat induced antigen retrieval - technique) ซึ่งมีการนำความร้อนจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ไมโครเวฟ หม้ออัดแรงดัน และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

c) ใช้ทั้งเอ็นไซม์และความร้อนร่วมกัน สำหรับแอนติบอดีบางชนิด ซึ่งเดิมจำเป็นต้องใช้กับชิ้นเนื้อสดเท่านั้น แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคนี้ สามารถนำแอนติบอดีนั้นมาใช้กับพาราฟินบล็อกได้ด้วย

การเลือกใช้วิธีคืนสภาพแอนติเจน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการศึกษา และ ขึ้นกับเครื่องมือที่มีใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ ไม่ว่าจะเลือกใช้วิธีใด สิ่งที่สำคัญคือจะต้องปรับเวลาที่ใช้ในการคืนสภาพ ชนิด และ dilution ของแอนติบอดีที่ใช้ให้เหมาะสม

K. การหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ (blocking of nonspecific reaction)

การจับกันอย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยา hydrophobic bonding ระหว่างimmunoglobulin กับ tissue proteins ทำให้ primary antibody และบางส่วนของ secondary antibody จับกับเนื้อเยื่อโดยตรง ได้ดีพอ ๆ กับแอนติเจนเป้าหมาย แก้ไขโดย ใช้ blocking protein โดยใช้ซีรั่มของสัตว์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียม secondary antibody หรือ 2-5%bovine serum albumin (BSA) ปัจจุบัน นิยมใช้ serum free protein block มากกว่าการเติม immunoglobulins เข้าไป

L. Primary antibody

มีทั้ง polyclonal และ monoclonal antibodie ความเข้มข้นของ primary antibody ที่ใช้ในงานขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนและความไวของเทคนิคการย้อมที่ใช้ ไม่สามารถกำหนดให้เป็นมาตรฐานตายตัวไปได้ว่าจะใช้ dilution เท่าใด ต้องทดสอบกับ positive control ซึ่งควรเป็น dilution สูงสุดที่ให้ผลการย้อมติดสีชัดเจน และ background น้อยที่สุด หรือไม่มีเลย

M. Secondary antibody (linking antibody)

linking antibody ต้องมีคุณสมบัติที่จะจับกับ primary antibody และ enzyme immuno complex เป็น peroxidase-conjugated antibody โดยเตรียมจากสัตว์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียม primary antibody

N. Substrate and chromogen

substrate ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพื่อให้ได้สีต่าง ๆ โดย substrate สำหรับ peroxidase คือ hydrogen peroxide (H_2O_2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย chromogen ที่ใช้คือ 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ซึ่งให้ end product เป็นสีน้ำตาล และมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ แอลกอฮอล์ และ xylene

O. Counterstain

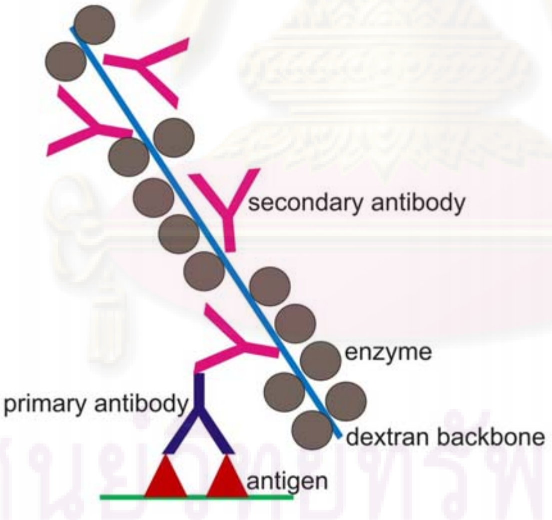
เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสีจากปฏิกิริยา IHC เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี counterstain ทำให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อชัดเจนและเปรียบเทียบกับส่วนที่ติดสีจากปฏิกิริยา IHC เพื่อให้เกิดความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์

สี counterstain ที่ใช้ คือ Mayer's hematoxylin

P. Mounting media

การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของ chromogen โดยในที่นี้ใช้ cytology formulation consul-mounting, xylene base

การแปลผลของวิธี immunocytochemistry คือ ดูสีของสารก่อให้เกิดสีที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่ามีโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในเซลล์ เป็นผลบวก (positive staining) โดยสีที่เห็นอาจจะอยู่ในไซโตพลาสซึม นิวเคลียส หรือ เยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจอยู่เป็นจุดรวม หรือ กระจายก็ได้



รูปที่ 63. แสดงหลักการของวิธี immunocytochemistry

2) **ขั้นตอนการทำ**

A. ตัดส่วนของทั้ง parietal peritoneum และ visceral peritoneum มาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 10% buffered neutral formalin solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ

C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงในเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ

D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ

E. ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome ใส่ลงบนสไลด์

F. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟิน (deparaffinize) ด้วยน้ำกลั่น โดยการ

a) จุ่มสไลด์ในโถ xylene จำนวน 3 โถ เป็นเวลาทั้งหมด 10 นาที

b) จุ่มสไลด์ในโถ 95% ethanol เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 3 โถ

c) ผ่านสไลด์ในน้ำไหล (running water) เป็นเวลา 2-3 นาที

G. แช่สไลด์ในโถ Bouin's fixative เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 56^{o}C

H. ตั้งสไลด์ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

I. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

J. แช่สไลด์ในโถ Mayer's haematoxylin เป็นเวลา 10 นาที แล้วผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา10 นาที

K. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

L. แช่สไลด์ในโถ Biebrich Scarlet-acid fuchsin solution เป็นเวลา 15 นาที

M. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

N. แช่สไลด์ในโถ Phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

O. Counterstained สไลด์ด้วย aniline blue solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

P. แช่สไลด์ในโถ acetic water solution 1 จุ่ม

Q. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

R. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) โดยการ

a) จุ่มสไลด์ในโถ 95% alcohol โถที่ 1 จำนวน 10 จุ่ม

b) จุ่มสไลด์ในโถ 95% alcohol โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม

c) จุ่มสไลด์ในโถ absolute alcohol โถที่ 1 จำนวน 10 จุ่ม

d) จุ่มสไลด์ในโถ absolute alcohol โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม

e) จุ่มสไลด์ในโถ xylene โถที่ 1 จำนวน 30 จุ่ม

f) จุ่มสไลด์ในโถ xylene โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม

S. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

T. ปิดกระจก (cover slip) ลงบนสไลด์ (mounting slides)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) ผลการย้อม

นิวเคลียส	ติดสีดำ
Muscle, cytoplasm, keratin	ติดสีแดง
Collagen, mucus	ติดสีน้ำเงิน

4) การเตรียมน้ำยา

A. Bouin's solution

Saturated aqueous picric acid solution	75	ml
Formaldehyde solution	25	ml
Glacial acetic acid	5	ml

B. Biebrich Scarlet-acid fuchsin solution

1% Aqueous Biebrich Scarlet	90	ml
1% Aqueous acid fuchsin	10	ml
Glacial acetic acid	1	ml

C. Phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution

Phosphomolybdic acid	5	g
Phosphotungstic acid	5	g
น้ำกลั่น	200	ml

D. Light green solution

Light green	2	g
น้ำกลั่น	98	ml
Glacial acetic acid	1	ml

ต้มน้ำกลั่นให้เดือด แล้วใส่ light green ลงไปละลายให้หมด

ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

กรอง

เติม glacial acetic acid

E. Aniline blue solution

Aniline blue	2.5	g
Glacial acetic acid	2	ml
น้ำกลั่น	100	ml

F. Acetic water solution

Glacial acetic acid	1	ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำกลั่น	100	ml

G. 10% Buffered neutral formalin solution

Formaldehyde solution	100	ml
Sodium phosphate monobasic monohydrate	4.0	g
Sodium phosphate dibasic	6.5	g
น้ำกลั่น	900	ml

6. การศึกษา mesenteric vascular density

6.1 การย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีต่อ CD 34

1) ขั้นตอนการย้อม

A. ตัดส่วนของ bowel มาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 10% buffered neutral formalin solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ

C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงในเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ

D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ

E. ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome ใส่ลงบนสไลด์

F. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น

G. ทำการฟื้นฟูแอนติเจนโดยวิธี microwave method โดยการ

a) นำ citrate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 300 ml ใส่ลงในภาชนะ (jar) พลาสติกที่สามารถใช้กับเครื่องไมโครเวฟ

b) เรียงสไลด์ในชั้น (rack) จากนั้นแช่ลงในภาชนะ

c) นำภาชนะใส่ในเครื่องไมโครเวฟ โดยใช้ hi-power เป็นเวลา 3 นาที แล้วปรับเป็น power 30% เป็นเวลา 10 นาที

d) นำภาชินะออกมา incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

H. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

I. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

J. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H_2O_2 in water ลงบนสไลด์

K. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

L. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

M. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

N. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

O. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ

P. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

A. สะบัดสไลด์

B. หยด anti CD 34 (dilution 1:50) ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

C. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

D. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในโถ PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

E. สะบัดสไลด์

F. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

G. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

H. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในโถ PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

I. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

J. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

K. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

L. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer's haematoxylin

M. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์

N. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

O. ปิดกระจกลงบนสไลด์

2) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

3) การเตรียมน้ำยา

A. 2 M NaOH

NaOH	8	g
น้ำกลั่น	100	ml

B. 10 mM citrate buffer, pH 6.0

Citric acid monohydrate	2.1	g
น้ำกลั่น	900	ml
2 M NaOH	13.0	ml

C. 3% H_2O_2 in water

30% H_2O_2	1	ml
น้ำกลั่น	9	ml

D. 3% Normal horse serum

100% Normal horse serum	0.27	ml
PBS	8.73	ml

6.2 การย้อมชิ้นเนื้อด้วย LE-lectin

1) ขั้นตอนการย้อม

A. ตัดส่วนของ bowel ของหนูที่ทำการ perfuse ด้วย LE-lectin แล้ว มาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย methyl Carnoy's solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ

C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงในเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (โดยไม่ผ่าน formalin)

D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ

E. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น

F. ทำการฟื้นฟูแอนติเจนโดยวิธี microwave method

G. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

H. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

I. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H_2O_2 in water ลงบนสไลด์

J. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

K. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

L. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

M. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

N. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ

O. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

P. สะบัดสไลด์

Q. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

S. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในโถ PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

U. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

V. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

W. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer’s haematoxylin

X. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์

Y. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

Z. ปิดกระจกลงบนสไลด์

3) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

4) การเตรียมน้ำยา

A. Methyl Carnoy’s solution

Acetic acid 100%	10	ml
Chloroform	30	ml
Absolute alcohol	60	ml

B. LE-lectin

Biotinylated-lycopersicon esculentum (tomato) lectin	1	ขวด
น้ำกลั่น	0.5	ml

7. เทคนิคการย้อมสไลด์ทาง histochemistry และ immunohistochemistry

7.1 การย้อมชิ้นเนื้อด้วย hematoxylin และ eosin

1) ขั้นตอนการย้อม

A. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น

B. จุ่มสไลด์ในโถ Mayer’s haematoxylin เป็นเวลา 3 วินาที

C. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 3 นาที

D. จุ่มสไลด์ในโถ lithium carbonate จำนวน 10 จุ่ม

E. Running water เป็นเวลา 3 นาที

F. จุ่มสไลด์ในโถ 95% ethanol จำนวน 6 จุ่ม

G. จุ่มสไลด์ในโถ eosin solution เป็นเวลา 3 วินาที

H. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์

I. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

J. ปิดกระจกลงบนสไลด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) **ผลการย้อม**

นิวเคลียส	ติดสีน้ำเงิน
Cytoplasm	ติดสีแดง

3) **การเตรียมน้ำยา**

A. Eosin solution (ready to use)

7.2 การย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีต่อ cytokeratin, α-SMA และ VEGF

1) **ขั้นตอนการย้อม**

A. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น

B. ทำการฟื้นฟูแอนติเจนโดยวิธี microwave method

C. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

D. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

E. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H_2O_2 in water ลงบนสไลด์

F. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

G. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

H. หยด PBS-T ลงบนสไลด์

I. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

J. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ

K. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

L. สะบัดสไลด์

M. หยด anti cytokeratin AE1/AE3 (dilution 1:100) หรือ anti α-SMA (dilution 1:1000) หรือ anti VEGF (dilution 1:100) ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

N. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

O. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในโถ PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

P. สะบัดสไลด์

Q. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

S. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในโถ PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

T. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

U. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

V. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที

W. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer’s haematoxylin

X. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์

Y. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base

Z. ปิดกระจกลงบนสไลด์

2. ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

8. การตรวจวัดปริมาณ cytokine

8.1 เทคนิคการตรวจวัดปริมาณโปรตีน VEGF **โดยวิธี** ELISA

1) ขั้นตอนการทำ

A. ดูด assay diluent RD1W ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

B. ดูด sample หรือ standard หรือ blank ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 200 μl

C. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip

D. เคาะ 96-well plate เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันดี

E. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

F. พอครบเวลา ให้เอา 96-well plate ไปใส่ในเครื่องล้างบนไมโคเพลท

G. ทำการล้างทั้งหมด 3 รอบ

H. เคาะ 96-well plate บนกระดาษชิดซู่

I. ดูด VEGF conjugate ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 200 μl

J. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip ชิ้นใหม่

K. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

L. พอครบเวลา ให้เอา 96-well plate ไปใส่ในเครื่องล้างบนไมโคเพลท

M. ทำการล้างทั้งหมด 4 รอบ

N. เคาะ 96-well plate บนกระดาษชิดซู่

O. ดูด Substrate solution ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 200 μl

P. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip ชิ้นใหม่

Q. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด

R. ดูด stop solution ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S. เคาะ 96-well plate เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันดี

T. นำ 96-well plate ไปใส่ในเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลท ที่ 450 nm

2) การเตรียมน้ำยา

A. Wash buffer 1X

Wash buffer 25X (จากชุด kit)	10	ml
น้ำกลั่น	240	ml

B. Substrate solution ต่อ 1 หลุม

Color reagents A (จากชุด kit)	100	μl
Color reagents B (จากชุด kit)	100	μl

ผสมกันเบา ๆ เก็บในที่มืด และต้องเตรียมก่อนใช้ไม่เกิน 15 นาที

C. Assay diluent RD1W (จากชุด kit)

D. Calibration diluent RD5K (จากชุด kit)

E. VEGF conjugate (จากชุด kit)

F. Stop solution (จากชุด kit)

G. VEGF stock standard (ความเข้มข้น 2,000 pg/ml)

VEGF stock standard	1	ขวด
Calibration diluent RD5K	1	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานกว่า 15 นาที

H. VEGF standard

a) VEGF standard ความเข้มข้น 500 pg/ml

Calibration diluent RD5K	330	μl
VEGF stock standard (ความเข้มข้น 2,000 pg/ml)	110	μl

b) VEGF standard ความเข้มข้น 250 pg/ml

Calibration diluent RD5K	220	μl
VEGF standard ความเข้มข้น 500 pg/ml	220	μl

c) VEGF standard ความเข้มข้น 125 pg/ml

Calibration diluent RD5K	220	μl
VEGF standard ความเข้มข้น 250 pg/ml	220	μl

d) VEGF standard ความเข้มข้น 62.5 pg/ml

Calibration diluent RD5K	220	μl
VEGF standard ความเข้มข้น 125 pg/ml	220	μl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

e) VEGF standard ความเข้มข้น 31.25 pg/ml

Calibration diluent RD5K	220	μl
VEGF standard ความเข้มข้น 62.5 pg/ml	220	μl

f) VEGF standard ความเข้มข้น 15.625 pg/ml

Calibration diluent RD5K	220	μl
VEGF standard ความเข้มข้น 31.25 pg/ml	220	μl

8.2 เทคนิคการตรวจวัดปริมาณโปรตีน TGF-β โดยวิธี ELISA

1) ขั้นตอนการทำ

A. ทำการ activate sample โดยการ

a) ดูด sample ใส่ลงไปในหลอด 75 μl

b) ดูด 1 N HCl ใส่ลงไปในหลอดที่มี sample อยู่ 16.5 μl

c) ผสมให้เข้ากันดี

d) Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

e) ดูด 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES ใส่ลงไปในหลอดเดิม 15 μl

f) ผสมให้เข้ากันดี

B. ดูด assay diluent RD1-21 ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

C. ดูด sample หรือ standard หรือ blank ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 50 μl

D. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip

E. เคาะ 96-well plate เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันดี

F. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

G. พอครบเวลา ให้เอา 96-well plate ไปใส่ในเครื่องล้างบนไมโคเพลท

H. ทำการล้างทั้งหมด 4 รอบ

I. เคาะ 96-well plate บนกระดาษชิดชู่

J. ดูด TGF-β1 conjugate ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 100 μl

K. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip ชิ้นใหม่

L. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

M. พอครบเวลา ให้เอา 96-well plate ไปใส่ในเครื่องล้างบนไมโคเพลท

N. ทำการล้างทั้งหมด 4 รอบ

O. เคาะ 96-well plate บนกระดาษชิดชู่

P. ดูด Substrate solution ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 100 μl

Q. ปิด 96-well plate ด้วย adhesive strip ชิ้นใหม่

R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

S. ดูด stop solution ใส่ลงไปใน 96-well plate หลุมละ 100 μl

T. เคาะ 96-well plate เบาๆ เพื่อให้สารผสมกันดี

U. นำ 96-well plate ไปใส่ในเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลท ที่ 450 nm

2) การเตรียมน้ำยา

A. HCl 1 N

Hydrochloric acid fuming 37%	20.7	ml
น้ำกลั่น	229.3	ml

B. 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES

NaOH	1.2	N
HEPES	0.5	M

ในน้ำกลั่น

C. Assay diluent RD1-21 (จากชุด kit)

D. TGF-β1 conjugate (จากชุด kit)

E. Stop solution (จากชุด kit)

F. Calibration diluent RD5-26 (1X)

Calibrator diluent RD5-26 concentrate (4X)	1	ml
น้ำกลั่น	3	ml

G. TGF-β1 stock standard (ความเข้มข้น 2,000 pg/ml)

TGF-β1 stock standard	1	ขวด
Calibration diluent RD5-26 (1X)	2	ml

ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานกว่า 5 นาที

H. Wash buffer 1X

Wash buffer 25X (จากชุด kit)	10	ml
น้ำกลั่น	240	ml

I. Substrate solution ต่อ 1 หลุม

Color reagents A (จากชุด kit)	50	μl
Color reagents B (จากชุด kit)	50	μl

ผสมกันเบา ๆ เก็บในที่มืด และต้องเตรียมก่อนใช้ไม่เกิน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

J. TGF-β1 standard

a) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 500 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	82.5	μl
TGF-β1 stock standard (ความเข้มข้น 2,000 pg/ml)	27.5	μl

b) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 250 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	55	μl
TGF-β1 standard ความเข้มข้น 500 pg/ml	55	μl

c) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 125 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	55	μl
TGF-β1 standard ความเข้มข้น 250 pg/ml	55	μl

d) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 62.5 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	55	μl
TGF-β1 standard ความเข้มข้น 125 pg/ml	55	μl

e) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 31.25 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	55	μl
TGF-β1 standard ความเข้มข้น 62.5 pg/ml	55	μl

f) TGF-β1 standard ความเข้มข้น 15.625 pg/ml

Calibration diluent RD5-26 (1X)	55	μl
TGF-β1 standard ความเข้มข้น 31.25 pg/ml	55	μl

9. การตรวจวัดปริมาณ mRNA โดยวิธี real time quantitative RT-PCR

9.1 เทคนิคการทำสกัด RNA ด้วย TRIzol

1) ขั้นตอนการทำ

A. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมให้หมด

B. ใส่ trizol ลงไปในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตร

C. เขย่าภาชนะเลี้ยงเซลล์บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที

D. ดูดทั้งหมดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

E. ใส่คลอโรฟอร์มลงไปในหลอด 200 ไมโครลิตร

F. ผสมให้เข้ากัน

G. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

H. ดูดสารละลายใสด้านบนไปใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I. ใส่ isopropanol ลงไปในหลอด 500 ไมโครลิตร

J. ผสมให้เข้ากัน

K. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

L. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

M. ดูดสารละลายใสด้านบนออกไปให้หมด (ให้เหลือแต่ส่วนของตะกอน (pellet))

N. ใส่ 75% ethanol ลงไปในหลอด 1 มิลลิลิตร

O. ผสมให้เข้ากัน

P. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

Q. ดูดสารละลายใสด้านบนออกไปให้หมด

R. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

S. ใส่ DEPC treated water ลงไปเพื่อละลายตะกอน 30 ไมโครลิตร

T. แบ่งมาบางส่วน เพื่อนำไปวัดค่า O.D. (เพื่อหาความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้)

2) การเตรียมน้ำยา

A. DEPC treated water 100 ml

DEPC	0.2	ml
น้ำกลั่น	100	ml

เขย่าแรง ๆ เพื่อให้ DEPC ละลาย หลังจากนั้นให้เอาไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปใส่หม้อฆ่าเชื้อ (autoclave) เพื่อ inactivate DEPC

B. 75% Ethanol 100 ml

95% Ethanol	79	ml
น้ำกลั่น	21	ml

9.2 เทคนิคการทำ RT-PCR

1) ขั้นตอนการทำ

A. ใส่ส่วนผสมของ RNA ของตัวอย่าง 1 μg น้ำ และ random hexamer primer 600 μM จำนวน 2 μl ลงไปใน PCR tube

B. ให้ความร้อนแก่ส่วนผสมจากข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที

C. ใส่ master mix ลงไปใน PCR tube

D. ผสมให้เข้ากัน

E. เอา PCR tube ไปใส่เครื่อง PCR machine โดยตั้ง condition ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4. แสดง condition ที่ใช้ในการทำ RT-PCR

อุณหภูมิ (°C)	**เวลา (นาที)**
25	10
50	60
85	5
4	∞

2) การเตรียมน้ำยา

A. Master mix ต่อ 1 ตัวอย่าง

Transcriptor reverse transcriptase 20 U/μl (จากชุด kit)	0.5	μl
Transcriptor RT reaction buffer (5X) (จากชุด kit)	4	μl
Protector RNase inhibitor 40 U/μl (จากชุด kit)	0.5	μl
Deoxynucleotide mix (จากชุด kit)	2	μl

9.3 **เทคนิคการทำ** real-time PCR

1) ขั้นตอนการทำ

A. เตรียม PCR mix ของ primer และ probe ของทุกยีน (primer และ probe ที่ใช้ในงานวิจัย แสดงดังตารางที่ 6) ที่จะทำ

B. ดูด PCR mix ใส่ลงไปใน precooled capillary โดยใส่ capillary ละ 15 μl

C. ดูด cDNA ของตัวอย่างลงไปใน capillary โดยใส่ capillary ละ 5 μl

D. ปิดฝา capillary ด้วย stopper

E. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 700 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 วินาที

F. เอา capillary ไปใส่เครื่อง real-time PCR โดยตั้ง condition ดังตารางที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5. แสดง condition ที่ใช้ในการทำ real-time PCR

Analysis mode	Cycles	Segment	Target temperature (^{o}C)	Hold time	Acquisition mode
Pre-incubation					
none	1		95	10 min	none
Amplification					
quantification	45	denaturation	95	10 s	none
		annealing	60	10 s	none
		extension	72	1 s	single
cooling					
none	1		40	30 s	none

2) **การเตรียมน้ำยา**

A. PCR mix ของแต่ละยีน ต่อ 1 ตัวอย่าง

Master mix (5X) (จากชุด kit)	4	μl
Forward primer 20 μM	0.5	μl
Backward primer 20 μM	0.5	μl
Probe 5 μM	0.4	μl
RNase free water	9.6	μl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6. แสดง primer และ probe ที่ใช้ในงานวิจัย

Gene	Types	Sequences
TGF-β	Forward	5'-CCCTGCCCCTACATTTGGAG-3'
	Backward	5'-CCGGGTTATGCTGGTTGTACA-3'
	Probe	6-FAM-CACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGCC-TAMRA
VEGF	Forward	5'-CCTACAGCACAACAAATGTGAATG-3'
	Backward	5'-CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA-3'
	Probe	6-FAM-CAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCT-TAMRA
18s ribosomal RNA	Forward	5'-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA-3'
	Backward	5'-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3'
	Probe	6-FAM-AAAGCAGGCCCGAGCCGCC-TAMRA 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริกุล กาญจนบุษย์ เกิดเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ.2521 ณ จังหวัดยะลา จบการศึกษาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (เคมี) จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2543 ซึ่งปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา แขนงวิชาอณูชีววิทยาทางการแพทย์และพันธุศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนั้นทำงานเป็นผู้ช่วยวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2547 จนถึงปัจจุบัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย