



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลในการป้องกันของเคอร์คิวมินต่อการทำงานและการแสดง
ออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ในหนูขาว
ที่มีภาวะความเป็นพิษต่อไตจากการกระตุ้นด้วยยาเจนทาไมซิน

โดย

ดร.พัชญ์วิญญ์ อาจิณาจารย์

ตุลาคม 2559

สัญญาเลขที่ TRG5780019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลในการป้องกันของเคอร์คิวมินต่อการทำงานและการแสดงออก
ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ในหนูขาวที่มีภาวะ
ความเป็นพิษต่อไตจากการกระตุ้นด้วยยาเจนทาไมซิน

ดร.พัชญ์วิญญ์ อัจฉินาจารย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5780019

ชื่อโครงการ : ผลในการป้องกันของเคอร์คิวมินต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีน
ขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ในหนูขาวที่มีภาวะความเป็นพิษต่อไต
จากการกระตุ้นด้วยยาเจนทาไมซิน

ชื่อนักวิจัย : ดร.พัชญ์วิญญู อัจฉินาจารย์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
239 ถนนห้วยแก้ว ต.สุเทพ อ.เมือง เชียงใหม่ 50202
โทรศัพท์ 053-943346, 089-7010272

E-mail Address : arjinajarn_jin@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ :

การเกิดความเป็นพิษต่อไตเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญของการรักษาด้วยยาเจนทาไมซิน โดยพบว่าการบาดเจ็บที่ไตจากการเหนี่ยวนำด้วยยาเจนทาไมซินอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) เนื่องจากโปรตีนขนส่งชนิดนี้อยู่ที่บริเวณท่อไตส่วนต้นซึ่งเป็นบริเวณสำคัญที่จะเกิดการบาดเจ็บจากภาวะความเป็นพิษต่อไตจากการให้ยาเจนทาไมซิน เคอร์คิวมินเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สกัดจากขมิ้นชันซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อดูฤทธิ์การป้องกันของเคอร์คิวมินต่อการทำงานและการแสดงออกของ Oat3 ในหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตด้วยยาเจนทาไมซิน การศึกษานี้แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาเจนทาไมซิน กลุ่มที่ได้รับเคอร์คิวมินขนาดต่างๆ ร่วมกับการให้ยาเจนทาไมซิน กลุ่มที่ให้เฉพาะเคอร์คิวมินเท่านั้น จากนั้นตรวจวัดค่าบียูเอ็นและครีเอตินินในเลือด ครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าครีเอตินินเคลียร์เรนซ์ ซึ่งบอกถึงการทำงานของไต ตรวจวัดระดับของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) กลูตาไธโอน (GSH) เพื่อดูการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ศึกษาการทำงานของ Oat3 โดยการวัดการ uptake สารเฮสโตรนซัลเฟต ดูการแสดงออกของ Oat3 รวมถึงกลไกที่เกี่ยวข้องโดยวิธีเวสเทิร์น บล็อกทิง ผลการศึกษาพบว่าการให้ยาเจนทาไมซินเป็นสาเหตุให้ไตทำงานผิดปกติ โดยจะมีการเพิ่มขึ้นของค่าบียูเอ็นและครีเอตินินในเลือด การลดลงของค่าครีเอตินินในปัสสาวะ รวมถึงค่าครีเอตินินเคลียร์เรนซ์ มีการแสดงออกของ Oat3 ลดลงร่วมกับการลดลงของค่าการ uptake ซึ่งความผิดปกตินี้จะเกิดร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับ MDA และการลดลงของระดับ SOD และ GSH การให้เคอร์คิวมินสามารถลดผลกระทบต่างๆที่เกิดจากการให้ยาเจนทาไมซินได้ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการให้เคอร์คิวมินสามารถลดความผิดปกติและความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับไตได้ โดยผ่านกลไกการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ลดการเกิด ER stress และการตายแบบอะพอพโทซิส

คำหลัก: เจนทาไมซิน, ความเป็นพิษต่อไต, เคอร์คิวมิน, โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3, ภาวะเครียดออกซิเดชัน

Abstract

Project Code : TRG5780019

Project Title : The Protective Effect of Curcumin on the Function and Expression of Renal Organic Anion Transporter 3 (Oat3) in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rat

Investigator : Miss Phatchawan Arjinajarn, Ph.D
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
239 Huay Kaew Rd., Suthep Sub-district, Mueang, Chiang Mai,
50202
Tel. 053-943346, 089-7010272

E-mail Address : arjinajarn_jin@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract :

Nephrotoxicity is the major complication of gentamicin treatment. Gentamicin induces renal injury may be affect organic anion transporters 3 (Oat3) function and expression because it localized in the renal proximal tubular cells which is the primary target for injury in gentamicin nephrotoxicity. Curcumin, a natural product extracted from *Curcuma longa*, has shown strong antioxidant property. The aim of this study is to investigate the protective effects of curcumin on the function and expression of renal Oat3 in gentamicin-induced nephrotoxicity rats. Rats were divided into control group; gentamicin group; curcumin plus gentamicin group and curcumin alone group. Blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine, urine creatinine, and creatinine clearance were tested to diagnose renal function. The levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the renal cortex were examined as parameters of oxidative stress. Renal Oat3 function determined by measurement of estrone sulfate (ES) uptake into renal cortical slices and its expression was estimated by western blotting. The study showed gentamicin caused renal dysfunction characterized by elevation of BUN, serum creatinine and the reduction of urine creatinine and creatinine clearance. The expression of renal Oat3 decreased associated with the declined in [³H]ES uptake of gentamicin-treated rats. These abnormalities were associated with increased in MDA level and decreased SOD and GSH activity. However, animals which received curcumin reversed all the effects induced by gentamicin. These findings suggest that curcumin pretreatment attenuates kidney dysfunction and damage through the reduction of oxidative stress, ER stress, and apoptosis in gentamicin-treated rats.

Keywords: gentamicin, nephrotoxicity, curcumin, organic anion transporter 3, oxidative stress

Executive Summary

ชื่อโครงการ ผลในการป้องกันของเคอร์คิวมินต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ในหนูขาวที่มีภาวะความเป็นพิษต่อไตจากการกระตุ้นด้วยยาเจนทาไมซิน

ชื่อนักวิจัย นางสาวพัชฎวิญญ์ อาจินาจารย์
Miss Phatchawan Arjinajarn
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
239 ถนนห้วยแก้ว ต.สุเทพ อ.เมือง เชียงใหม่ 50202
โทรศัพท์ 053-943346, 089-7010272
e-mail: arjinajarn_jin@hotmail.com

นักวิจัยที่ปรึกษา นางอนุสรณ์ ลังกาพันธ์
Mrs. Anusorn Lungkaphin
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
110 ถนนอินทวโรรส ต.ศรีภูมิ อ.เมือง เชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ 053-945362-4
e-mail: onanusorn@yahoo.com

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เจนทาไมซิน (Gentamicin) เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) ซึ่งนิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้แก่ ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบไหลเวียนโลหิต โดยยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามพบว่ายาเจนทาไมซินมีฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์คือความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาด้วยยาเจนทาไมซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดความเป็นพิษต่อไตสามารถพบได้ถึงร้อยละ 30 ในผู้ป่วยที่ได้รับยาเป็นเวลา 7 วัน โดยจะส่งผลให้การทำงานของไตลดลงโดยจะมีระดับครีเอตินิน (Creatinine) บิยูเอิน (Blood urea nitrogen; BUN) ยูเรียและกรดยูริกสูงขึ้นนำไปสู่การเกิดภาวะไตวายในที่สุด ซึ่งความเป็นพิษต่อไตเกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมของยาที่ส่วนของไตซึ่งมักเกิดบริเวณท่อไตส่วนต้น ดังนั้นการเกิดความเป็นพิษต่อไตโดยการเหนี่ยวนำด้วยยาเจนทาไมซินอาจมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) ซึ่งพบมากที่บริเวณท่อไตส่วนต้นของไตได้ Oat3 โคเลนาจากมนุษย์ ลิง กระต่าย หนู rat และ หนู mice และพบได้ที่ไต สมอ ตับ และตา ในไต Oat3 จะอยู่ทางด้าน

basolateral membrane ของท่อไตส่วนต้น ทำหน้าที่ขนส่งสาร PAH, glutarate, estrone sulfate (ES), ochratoxin A, cimetidine, benzylpenicillin และ cephaloridine

กลไกที่ยาเจนทาไมซินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความเป็นพิษต่อไตจากยาเจนทาไมซินมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (Free radical) จากการที่มีความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระและกลไกการต่อต้านอนุมูลอิสระ ตามมาด้วยการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยพบว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับไขมันของผนังเซลล์และมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) ส่งผลให้เซลล์ที่ไตถูกทำลายและเกิดภาวะการตายของเซลล์ท่อไต (Tubular necrosis) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) และการตายแบบอะพอพโทซิส ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดความเป็นพิษต่อไต และทำให้เซลล์ที่ไตถูกทำลายได้

ในปัจจุบันหลายประเทศรวมถึงประเทศไทยได้ให้ความสนใจในการนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคในหลายๆโรคด้วยกัน เคอร์คูมิน เป็นสารสีเหลืองสกัดจากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ช่วยป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินยังช่วยป้องกันตับและไต ป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด และมีฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด โดยเฉพาะคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ที่ดีมาก จากการศึกษามาก่อนพบว่าเคอร์คิวมินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ hydroxyl radicals การให้เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในตับ สมองและเนื้อเยื่อไตของหนูขาว ที่สำคัญยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายไตจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการให้ยาเจนทาไมซิน ดังนั้นการให้เคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันความผิดปกติในการทำหน้าที่ของไตได้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าการได้รับเคอร์คิวมินสามารถป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่ไตจากการเหนี่ยวนำของยาเจนทาไมซินได้ นอกจากนี้คาดว่าจะมีผลลดอัตราการเกิดผลข้างเคียงของการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซินได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของการให้ curcumin ต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ไตในภาวะการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซิน
2. เพื่อศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ไตในภาวะการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซิน

ระเบียบวิธีวิจัย

1) สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 150 – 180 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม จำนวน 36 ตัว

2) การออกแบบการทดลอง

หนูจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูปกติ (Control)

กลุ่มที่ 2: หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin)

กลุ่มที่ 3: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 100 mg/kg (Gentamicin + curcumin 100)

กลุ่มที่ 4: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg (Gentamicin + curcumin 200)

กลุ่มที่ 5: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 300 mg/kg (Gentamicin + curcumin 300)

กลุ่มที่ 6: หนูที่ได้รับเฉพาะสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg (Control + curcumin 200)

3) การเก็บตัวอย่างเลือด และเนื้อเยื่อไต

ในวันที่ 15 ของการทดลอง จะทำการเก็บปัสสาวะที่ได้ จากนั้นทำการฉีดยาโดยการให้ยาสลบ pentobarbital เข้าทางช่องท้อง และทำการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บไต

4) การศึกษาการทำงานของไต (Renal function assessment)

ทำการศึกษาการทำงานของไต โดยนำเลือดที่เก็บส่งตรวจวิเคราะห์ค่า BUN, serum creatinine และ urine creatinine

5) การศึกษาการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยการวัดค่า Malondialdehyde (MDA)

ทำการตรวจหาระดับของ MDA โดยใช้ชุดตรวจ TBARS Assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

6) การศึกษาระบบการต้านออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยการวัดค่า Total glutathione (GSH) ของไต

ทำการตรวจหาระดับของ total glutathione โดยใช้ชุดตรวจ Quantichrom Glutathione assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

7) การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) ที่ไต

โดยการวัดค่าการ uptake สาร radioactive estrone sulfate ($[^3\text{H}]\text{ES}$) ซึ่งเป็น specific substrate ของ Oat3 จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง liquid scintillation counter (Perkin Elmer, MA, USA)

8) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) และกลไกที่เกี่ยวข้อง โดยวิธี Western blot analysis

โปรตีนจากแต่ละ fraction คือ whole cell lysates, cytosol, nuclear และ membrane fractions จะถูกนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีน (total protein concentration) จากนั้นจะทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีน และทำการแยกโปรตีนตัวอย่างโดยใช้ 10% เจลอะคริลาไมด์ (10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) ทำการการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene fluoride (PVDF) ทำการ blocking ด้วย 5% non-fat dry milk ซึ่งละลายในสารละลาย TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการ blocking เสร็จแล้วจะทำการแช่แผ่นเมมเบรนด้วย primary antibody เป็นเวลา 1 คืน ที่ 4 °C หลังจากนั้นทำการล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย TBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วแช่เมมเบรนด้วย horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit หรือ anti-mouse secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นโปรตีนเป้าหมายจะได้รับการมองเห็นบนฟิล์มเอกซเรย์ (Hyperfilm) โดยใช้ chemiluminescence agent (GE Healthcare, Buckinghamshire) วิเคราะห์ปริมาณแถบโปรตีนเป้าหมายที่แยกได้ (Band density) โดยใช้โปรแกรม ImageJ จากนั้นจะนำค่าที่ได้จากแถบโปรตีนเป้าหมายมาเทียบ (normalized) กับแถบโปรตีน actin

9) การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปแบบ mean $\pm$ SEM และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.1 โดยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับการทดสอบด้วย Newman-Keuls tests โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตได้ ซึ่งนำไปสู่การเกิดการบาดเจ็บ และเสียหายต่อไต โดยจะพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว นอกจากนั้นไตยังมีการทำงานที่ผิดปกติโดยจะพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของค่า BUN และครีเอตินินในเลือด และมีการลดลงของค่าครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าอัตราการกรองของไต ซึ่งการเกิดความเสียหายต่อไตนี้ยังส่งผลต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ซึ่งจะพบที่บริเวณท่อไตส่วนต้น ที่เป็นบริเวณสำคัญที่มักเกิดความเสียหายจากยาเจนทาไมซิน โดยจะพบว่าหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินจะมี

การลดลงของการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 โดยจะพบว่าจะมีค่าการ uptake สาร ES ที่ลดลงซึ่งการลดลงของการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 จะเกิดร่วมกับการมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่บริเวณ membrane ลดลงด้วย ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความผิดปกติเหล่านี้ ได้แก่ ภาวะเครียดออกซิเดชัน ER stress และการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับ MDA และการลดลงของระดับ GSH มากกว่านั้นเจนทาไมซินยังเหนี่ยวนำให้เกิด ER stress ซึ่งจะแสดงจากการเพิ่มขึ้นของ calpain2, cleaved caspase7 และการลดลงของ GRP78 และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งจะแสดงจากการเพิ่มขึ้นของ Bax, cleaved caspase 3 และ cytochrome c ในขณะที่มีการลดลงของ Bcl-2 เคอร์คิวมินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถลดการเกิดความเป็นพิษต่อไตได้ โดยพบว่าจะไปมีผลช่วยการทำงานของไตโดยจะไปมีผลลดระดับ BUN และครีเอตินินในเลือด เพิ่มค่าครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าอัตราการกรองของไต นอกจากนี้จะมีผลช่วยการทำงานของไตแล้ว ยังมีผลช่วยให้การทำงานของไตและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 อีกด้วย ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องจะเกิดจากการที่เคอร์คิวมินมีผลลดภาวะเครียดออกซิเดชันและเพิ่มการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะมีการลดลงของระดับ MDA และเพิ่มขึ้นของระดับ GSH ลดการเกิด ER stress โดยจะมีการลดลงของ calpain2, cleaved caspase7 และการเพิ่มขึ้นของ GRP78 ลดการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยจะมีการลดลงของ Bax, cleaved caspase 3 และ cytochrome c และมีการเพิ่มขึ้นของ Bcl-2

ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

วารสาร PLOS ONE impact factor (2015/2016) 3.057

สารบัญ

	หน้า
บทนำและวัตถุประสงค์	1
ทบทวนเอกสาร	3
วิธีการวิจัย	14
ผลการวิจัย	20
อภิปรายผลการวิจัย	49
สรุปผลการวิจัย	53
เอกสารอ้างอิง	54

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของเจนทาไมซิน	5
ภาพ 2 กลไกของยาเจนทาไมซินในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต	8
ภาพ 3 กลไกของยาเจนทาไมซินในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต	9
ภาพ 4 การเกิด ER stress และ apoptosis จากยาเจนทาไมซิน	9
ภาพ 5 ขมิ้นชัน	10
ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมินอยด์	11
ภาพ 7 ค่าน้ำหนักตัวของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	21
ภาพ 8 ค่าน้ำหนักไต ค่าน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	23
ภาพ 9 ค่าปริมาณปัสสาวะของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	25
ภาพ 10 ค่า BUN และ Creatinine ของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	27
ภาพ 11 ค่าครีอาตินินในปัสสาวะของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	29
ภาพ 12 ค่าอัตราการกรองของไตของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	31
ภาพ 13 ค่าการ uptake สาร [³ H]ES ของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	33
ภาพ 14 ค่า Malondialdehyde (MDA) ของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	35
ภาพ 15 ค่า Total glutathione (GSH) ของหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง	37
ภาพ 16 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง สารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3)	39
ภาพ 17 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อการเกิด ER stress	41
ภาพ 18 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ apoptotic pathway (การแสดงออกของโปรตีน Cleaved caspase 3 และ Cytochrome c)	45
ภาพ 19 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ apoptotic pathway (การแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2)	47

บทนำและวัตถุประสงค์

เจนทาไมซิน (Gentamicin) เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) ซึ่งนิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น สแตปไฟโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้แก่ ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบไหลเวียนโลหิต โดยยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามพบว่ายาเจนทาไมซินมีฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์คือความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาด้วยยาเจนทาไมซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดความเป็นพิษต่อไตสามารถพบได้ถึงร้อยละ 30 ในผู้ป่วยที่ได้รับยาเป็นเวลา 7 วัน โดยจะส่งผลให้การทำงานของไตลดลง โดยจะมีระดับครีเอตินิน (Creatinine) บิยูเอิน (Blood urea nitrogen; BUN) ยูเรียและกรดยูริกสูงขึ้นนำไปสู่การเกิดภาวะไตวายในที่สุด ซึ่งความเป็นพิษต่อไตเกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมของยาที่ส่วนของไตซึ่งมักเกิดบริเวณท่อไตส่วนต้น ดังนั้นการเกิดความเป็นพิษต่อไตโดยการเหนี่ยวนำด้วยยาเจนทาไมซินอาจมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) ซึ่งพบมากที่บริเวณท่อไตส่วนต้นของไตได้ Oat3 โคเลนาจากมนุษย์ ลิง กระต่าย หนู rat และ หนู mice และพบได้ที่ไต สมอ ตับ และตา ในไต Oat3 จะอยู่ทางด้าน basolateral membrane ของท่อไตส่วนต้น ทำหน้าที่ขนส่งสาร PAH, glutarate, estrone sulfate (ES), ochratoxin A, cimetidine, benzylpenicillin และ cephaloridine

กลไกที่เจนทาไมซินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเป็นพิษต่อไตจากยาเจนทาไมซินมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (Free radical) จากการที่มีความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระและกลไกการต่อต้านอนุมูลอิสระ ตามมาด้วยการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยพบว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับไขมันของผนังเซลล์และมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) ส่งผลให้เซลล์ที่ไตถูกทำลายและเกิดภาวะการตายของเซลล์ท่อไต (Tubular necrosis) ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) และการตายแบบอะพอพโทซิส ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดความเป็นพิษต่อไต และทำให้เซลล์ที่ไตถูกทำลายได้

ในปัจจุบันหลายประเทศรวมถึงประเทศไทยได้ให้ความสนใจในการนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคในหลายๆโรคด้วยกัน เคอร์คิวมิน เป็นสารสีเหลืองสกัดจากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ช่วยป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินยังช่วยป้องกันตับและไต ป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด และมีฤทธิ์

ในการลดระดับโคเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด โดยเฉพาะคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ที่ดีมาก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ hydroxyl radicals การให้เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในตับ สมองและเนื้อเยื่อไตของหนูขาว ที่สำคัญยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายไตจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการให้ยาเจนทาไมซิน ดังนั้นการให้เคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันความผิดปกติในการทำหน้าที่ของไตได้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าการได้รับเคอร์คิวมินสามารถป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่ไตจากการเหนี่ยวนำของยาเจนทาไมซินได้ นอกจากนั้นน่าจะมีผลลดอัตราการเกิดผลข้างเคียงของการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซินได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของการให้ curcumin ต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ไตในภาวะการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซิน
2. เพื่อศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ไตในภาวะการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการได้รับยาเจนทาไมซิน

ขอบเขตของการวิจัย

ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าการได้รับเคอร์คิวมินสามารถป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่ไตจากการเหนี่ยวนำของยาเจนทาไมซินได้ โดยกลไกที่ทำให้เกิดการป้องกันการเกิดความผิดปกติจะเกี่ยวข้องกับการที่เคอร์คิวมินช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) และการตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ศึกษาได้ตรวจวัดค่าบียูเอ็นและครีเอตินินในเลือด ครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าครีเอตินินเคลียร์แรนซ์ ซึ่งบอกถึงการทำงานของไต ตรวจวัดระดับของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) กลูตาไธโอน (GSH) เพื่อดูการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ศึกษาการทำงานของ Oat3 โดยการวัดการ uptake สารเอสโตรนซัลเฟต ดูการแสดงออกของ Oat3 โดยวิธีเวสเทิร์นบลอตติง นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องโดยศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยดูการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78 ศึกษาถึงกลไกการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยดูการแสดงออกของโปรตีน Cleaved caspase 3, Cytochrome c, Bax และ Bcl-2

บททวนเอกสาร

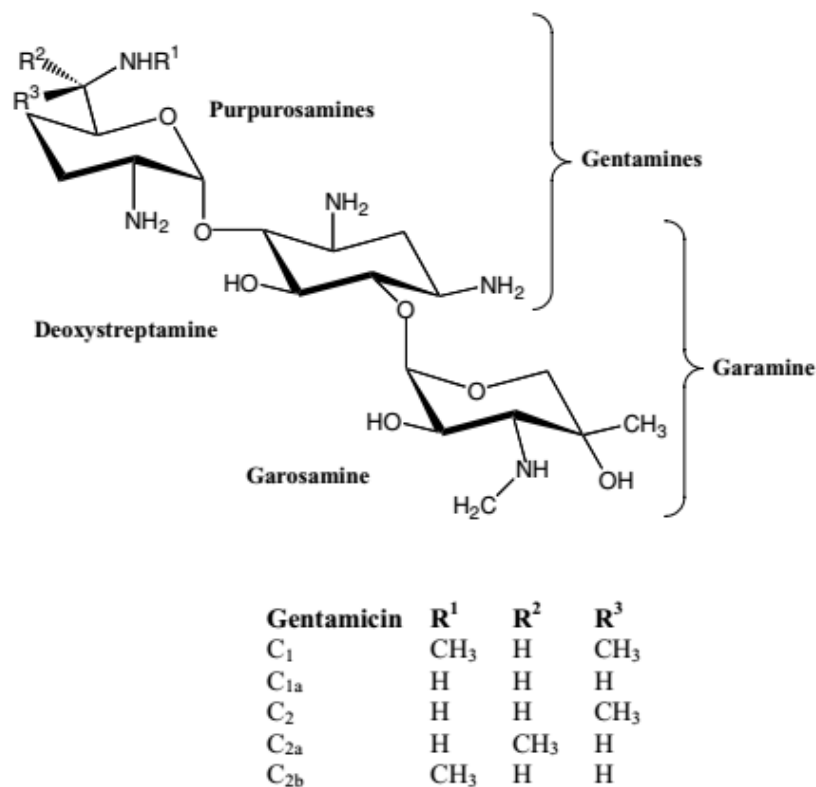
เจนทาไมซินและการเกิดความเป็นพิษต่อไต

เจนทาไมซิน (gentamicin) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียแกรมลบที่มีชื่อว่า *Micromonospora* (Kumar et al., 2008) โครงสร้างทางเคมีของเจนทาไมซิน คือ aminocyclitol มีโครงสร้างเป็นวงแหวนรูป 6 เหลี่ยมประกอบด้วย amino และ hydroxyl groups วงแหวน aminocyclitol จะเชื่อมต่อกับโมเลกุลของ amino-containing sugar หรือ non-amino-containing sugar โดยอาศัย glycosidic bond เป็นพันธะเชื่อมโยง ยาในกลุ่ม aminoglycosides ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างของ aminocyclitol เป็น 2-deoxystreptamine คุณสมบัติของยาเป็นประจุบวกสูง (strongly cationic) จึงมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีแต่ไม่ค่อยละลายในไขมัน เนื่องจากยาชนิดนี้ออกฤทธิ์ได้ดีในภาวะที่เป็นต่างมากกว่าภาวะที่เป็นกรดทำให้ยาถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้น้อยและผ่าน blood brain barrier ได้ไม่ดี นอกจากนี้ยายังซึมผ่านเข้าปอด ต่อมลูกหมาก น้ำลาย น้ำดีและน้ำในลูกตา (vitreous fluid) ได้น้อยมาก อย่างไรก็ตาม ยาสามารถเข้าสู่เซลล์ที่เยื่อบุท่อไตและในหูชั้นในได้ดี (Martínez-Salgado et al., 2007) และสามารถดูดซึมได้อย่างรวดเร็วเมื่อให้ด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เส้นเลือดดำ และกล้ามเนื้อ เจนทาไมซินจับกับโปรตีนได้น้อยประมาณร้อยละ 10 ดังนั้นเมื่อยาเข้าสู่ร่างกายแล้วจะมีการกระจายตัวไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ดีมาก นอกจากนั้นยาจะไม่ถูกเมตาบอไลต์ โดยพบว่าร้อยละ 80-90 ของยาที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกขับออกทางปัสสาวะผ่านขบวนการกรอง (glomerular filtration) โดยไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง อีกร้อยละ 10 จะสะสมที่บริเวณท่อไตส่วนต้น (renal proximal tubule) จึงทำให้ระดับยาในปัสสาวะจะสูงกว่าระดับยาในเลือด 25-100 เท่า (Chambers, 2001) นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าเจนทาไมซินยังสามารถคงอยู่ที่ท่อไตส่วนต้นเนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนาน (Luft, 2002) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าค่าครึ่งชีวิตของยาเจนทาไมซินในเลือดมีค่าประมาณไม่กี่ชั่วโมง ในขณะที่บริเวณท่อไตส่วนต้นมีค่าครึ่งชีวิตนานถึง 4-5 วัน (Gyselynck et al., 1971; Senekjian et al., 1981; Lacy et al., 1998; Turnidge, 2003) ดังนั้นค่าครึ่งชีวิตของยาจะขึ้นอยู่กับการทำงานของไตเป็นหลัก

ยาเจนทาไมซิน มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในคนที่สำคัญโดยเฉพาะเชื้อใน family Enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella spp.* และ *Proteus spp.* รวมทั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* (Ali, 1995)

กลไกการออกฤทธิ์ ยาในกลุ่ม aminoglycosides มีฤทธิ์เป็น bactericidal drugs โดยยาจะจับกับ 30S ribosomal subunit ใน messenger RNA ที่ตำแหน่ง A ซึ่งอยู่ในส่วนของ 16S reverse transfer RNA ใน 30S ribosomal subunit ส่งผลให้กระบวนการ mRNA translation และ translocation เสียไป ทำให้มีการสร้างโปรตีนลดลงและสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไปทำให้เกิดการรั่วไหลของสารที่มีประจุออกนอกเซลล์และยับยั้งการแบ่งตัวของ DNA (Balakumar et al., 2010) ถึงแม้ว่ายาชนิดนี้จะเป็นที่นิยมใช้ในทางคลินิกเนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว มีราคาถูก นอกจากนั้นยังสามารถนำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams หรือ vancomycin เพื่อเสริมฤทธิ์กันในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ Streptococci, Enterococci และ Staphylococci ได้ (Edson and Terrell, 1999) อย่างไรก็ตามยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงที่สำคัญคือความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าร้อยละ 30 ของผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาเจนทาไมซิน เกิน 7 วัน จะแสดงอาการของการเกิดพิษต่อไต (Nephrotoxicity) (Matthew, 1992) นอกจากนั้นอีกหลายๆ การศึกษายังแสดงให้เห็นว่าเจนทาไมซินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อไต (Nephrotoxicity) ได้ถึงร้อยละ 10-25 ของการรักษาแม้ว่าจะมีการตรวจสอบระดับยาในเลือดอย่างเข้มงวดและได้รับยาแค่วันละครึ่ง (Hatala et al., 1996; Lauren et al., 1990; Kacaw and Bergeron, 1990; Leehey et al., 1993) อีกทั้งยังพบว่าร้อยละ 10-15 ของการเกิดไตวายแบบเฉียบพลัน (Acute renal failure) มีสาเหตุมาจากการเกิดพิษต่อไต (Nephrotoxicity) จากยาเจนทาไมซิน (Rincon et al., 2004) ลักษณะอาการแสดงของการเกิดพิษต่อไต (Nephrotoxicity) ซึ่งมีสาเหตุมาจากยาเจนทาไมซินได้แก่ การเพิ่มขึ้นของระดับครีอาตินีน (Creatinine) กรดยูริก (Uric acid) และยูเรีย (Urea) ในเลือด โดยที่ผ่าน

มาได้มีการทดลองทำการให้ยาเจนทาไมซินขนาด 80 mg/kg พบว่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อไตโดยจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับยูเรีย (Urea) ครีอาตินีน (Creatinine) นอกจากนั้นยังพบโปรตีน กรดอะมิโน และน้ำตาลในปัสสาวะ และมีการเปลี่ยนแปลงระดับอิเล็กโทรไลต์ในร่างกาย ได้แก่ ระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นต้น (Trollfors et al., 1980; Klastersky et al., 1974; Mingeot-Leclercq et al., 1999; Parsons et al., 1997; Banday et al., 2008) อีกทั้งยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไตเมื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาด้วย (El-Ashmawy et al., 2006) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการทำงานของไตที่เสียไป ซึ่งมักจะสัมพันธ์กับการลดลงของอัตราการกรองของเลือดที่ผ่านไต (Glomerular filtration rate: GFR) ทั้งนี้เนื่องจากยาเจนทาไมซินจะเข้าไปยังเซลล์ของท่อไตส่วนต้นและจับกับฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) บนผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของการทำงานและเมตาโบลิซึมของผนังเซลล์และออร์แกเนลต่างๆ จนทำให้เซลล์ของท่อไตส่วนต้นได้รับความเสียหาย จนสุดท้ายเกิดภาวะไตวายแบบเฉียบพลันตามมาได้ (Swan, 1997)



ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของเจนทาไมซิน (Kumar et al., 2008)

เจนทาไมซิน การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และ ภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)

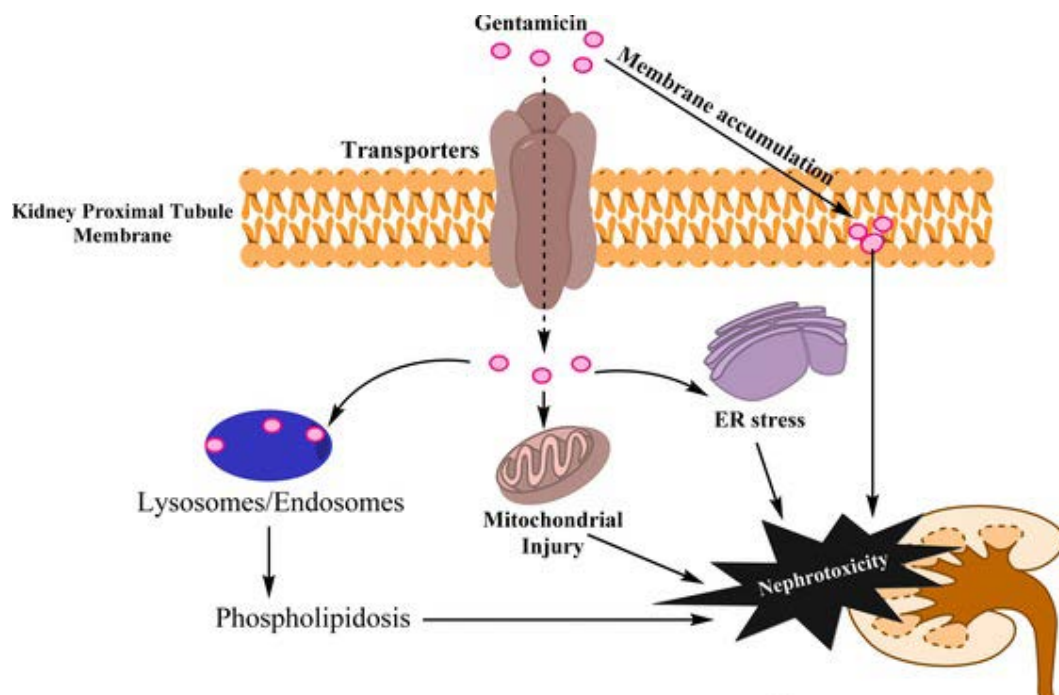
ไตมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมสมดุลน้ำและอิเล็กโทรไลต์ในร่างกาย (Smith et al., 2012) โดยไตจะกรองของเสียออกจากเลือดผ่านโกลเมอรูลัสเข้าสู่ท่อไต เมื่อผ่านไปตามท่อไตแร่ธาตุและสารบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน น้ำ และอออน จะถูกผนังของท่อไตดูดซึมกลับคืนเข้าสู่หลอดเลือดฝอยใหม่ ส่วนของเสียอื่นๆ เช่น ยูเรีย จะถูกส่งผ่านไปตามท่อไตและเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะต่อไป จากนั้นจะถูกขับออกจากร่างกายในรูปของปัสสาวะ (Guyton et al., 2011) เจนทาไมซินจะสะสมในเซลล์ของท่อไตส่วนต้น แล้วทำให้เกิดความเสียหายต่อไต โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ไมโทคอนเดรีย และไลโซโซม (Nagai et al., 2004) ถึงแม้ว่ากลไกที่เจนทาไมซินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) จนเกิดภาวะไตวายแบบเฉียบพลันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species: ROS) โดยพบว่าการสะสมของเจนทาไมซินที่บริเวณท่อไตส่วนต้นทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้น เช่น Superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl radical ($OH\cdot$) มีผลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์ท่อไตส่วนต้นได้ ซึ่งความเสียหายของเซลล์ท่อไตส่วนต้นนี้อาจส่งผลกระทบต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ ซึ่งรวมไปถึงโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3; Oat3) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการขจัดสารอินทรีย์ประจุลบหลายชนิดออกจากร่างกาย และมีรายงานว่ามีการแสดงออกมากที่สุดที่บริเวณท่อไตส่วนต้น นอกจากนั้นแล้วยังส่งผลให้เนื้อเยื่อไตเกิดความเสียหายและเกิดภาวะการตายได้ ที่ผ่านมามีการทดลองทำการให้ยาเจนทาไมซินขนาด 80 mg/kg พบว่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อไตโดยจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับยูเรีย (Urea) ครีอาตินีน (Creatinine) และ MDA (Malondialdehyde) ในเลือด นอกจากนั้นยังพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไตเมื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาด้วย (El-Ashmawy et al., 2006) นอกจากนั้นแล้ว

ยังพบการลดลงของการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเช่น Reduced glutathione (GSH) Catalase (CAT) รวมถึง Superoxide dismutase (SOD) ด้วย (Ali, 1995; Yang et al., 1995; Morales et al., 2010 and Muthuraman et al., 2011) ซึ่งการให้สารดักจับหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สามารถป้องกันการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการเหนี่ยวนำของยาเจนทาไมซินได้ (Kumar et al., 2000 and Nitha et al., 2008)

นอกจากนั้นยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชันยังมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของเอนไซม์และโมเลกุลของโปรตีนโครงสร้างส่งผลกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ตามมาได้ (Cuzzocrea et al., 2002, Kopple et al., 2002, Avdagić et al., 2007 and Poormoosaviet al., 2010) นอกจากนี้ยังพบการเกิดภาวะการตายแบบอะพอพโทซิสใน Human renal proximal tubular epithelial cells (Lee et al., 2013) และ Mesangial cells ที่ทำการให้ยาเจนทาไมซิน (Servais et al., 2006; Martinez-Salgado et al., 2004) ซึ่งกลไกการเกิดภาวะการตายแบบอะพอพโทซิสจะถูกกระตุ้นได้จากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภาวะขาดเลือด (ischemia) การเกิดการอักเสบ (inflammation) รวมถึงปัจจัยอื่นๆอีกมากมาย โดยเมื่อถูกกระตุ้นจากปัจจัยต่างๆเหล่านี้จะส่งผลกระตุ้นการหลั่งไซโตโครมซี (Cytochrome c) ออกสู่ไซโตซอล ซึ่งไซโตโครมซีจะไปมีผลกระตุ้นแคสเปส 3 (caspase-3) ซึ่งทำหน้าที่สลายโปรตีนส่งผลให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มที่กระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิส (Pro-apoptotic proteins) เช่น Bax มากขึ้นหรือการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มที่ต้านการเกิดอะพอพโทซิส (Anti-apoptotic proteins) เช่น Bcl-2 ลดลง มีผลชักนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสมากขึ้น โดย Bcl-2 เมื่อถูกกระตุ้นจะส่งผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ดังนั้นหากมีปริมาณของ Bax มากกว่า Bcl-2 แสดงว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เข้าสู่ภาวะการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Bax ร่วมกับการลดลงของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ LLC-PK1 (Lilly Laboratories, Culture-Pig Kidney type 1) ที่ให้ยาเจนทาไมซิน นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ยาเจนทาไมซินมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน

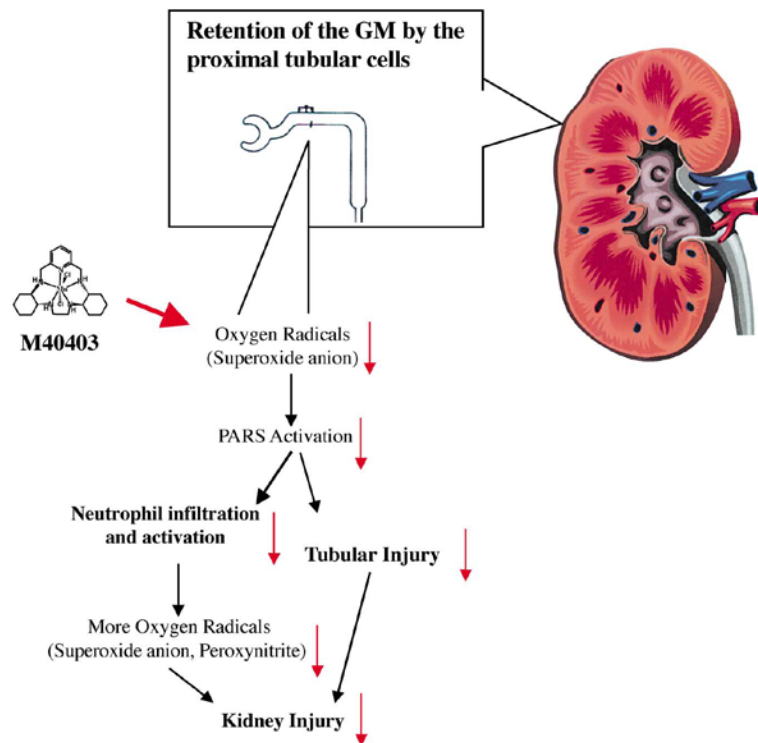
Bcl-2 ในไตของหนูขาวด้วย รวมทั้งยังพบว่ากลไกการตายแบบอะพอพโทซิสยังสัมพันธ์กับการกระตุ้นเอนไซม์แคสเปส 3 (Caspase-3) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเจนทาไมซินชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ LLC-PK1 (Lilly Laboratories, Culture-Pig Kidney type 1) โดยผ่านกลไกการกระตุ้น Caspase-3 (Servais et al., 2005). ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ ก็จะมีผลลดการตายแบบอะพอพโทซิสในภาวะไตวายเฉียบพลันจากการได้รับยาเจนทาไมซินได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะการตายแบบอะพอพโทซิส โดยภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมยังมีความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตโดยการเหนี่ยวนำของสารเคมี (Peyrou et al., 2007) เคยมีการการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากการเหนี่ยวนำด้วยยาและสารเคมี จะมีการกระตุ้นภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแล้วทำให้เกิดการตาย นอกจากนี้ยังพบว่า GRP94, GRP78 และ caspase-12 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมจะเพิ่มขึ้นในไตของหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Peyrou et al., 2007)



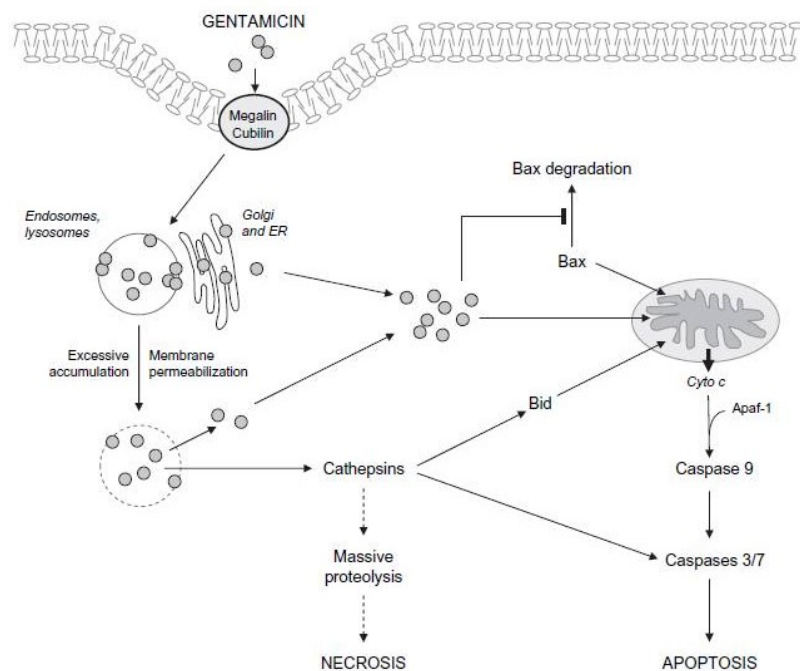
ภาพ 2 กลไกของยาเจนทาไมซินในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต

(Jamshidzadeh et al., 2015)



ภาพ 3 กลไกของยาเจนทาไมซินในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต

(Modified from Cuzzocrea et al., 2002)



ภาพ 4 การเกิด ER stress และ apoptosis จากยาเจนทาไมซิน (Martinez-Salgado et al., 2007)

เคอร์คิวมิน และ โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชประจำถิ่นและพบได้ในภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ประเทศที่เป็นแหล่งผลิตที่สำคัญ รวมทั้งเป็นผู้บริโภคและผู้ส่งออก คือ อินเดีย (Trujillo et al, 2013) โดยขมิ้นชันได้นำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ เป็นเครื่องเทศ นำมาใช้แต่งสีในอาหารหลายชนิด เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และนำมาใช้เป็นยา drugs (Ali et al., 2005)

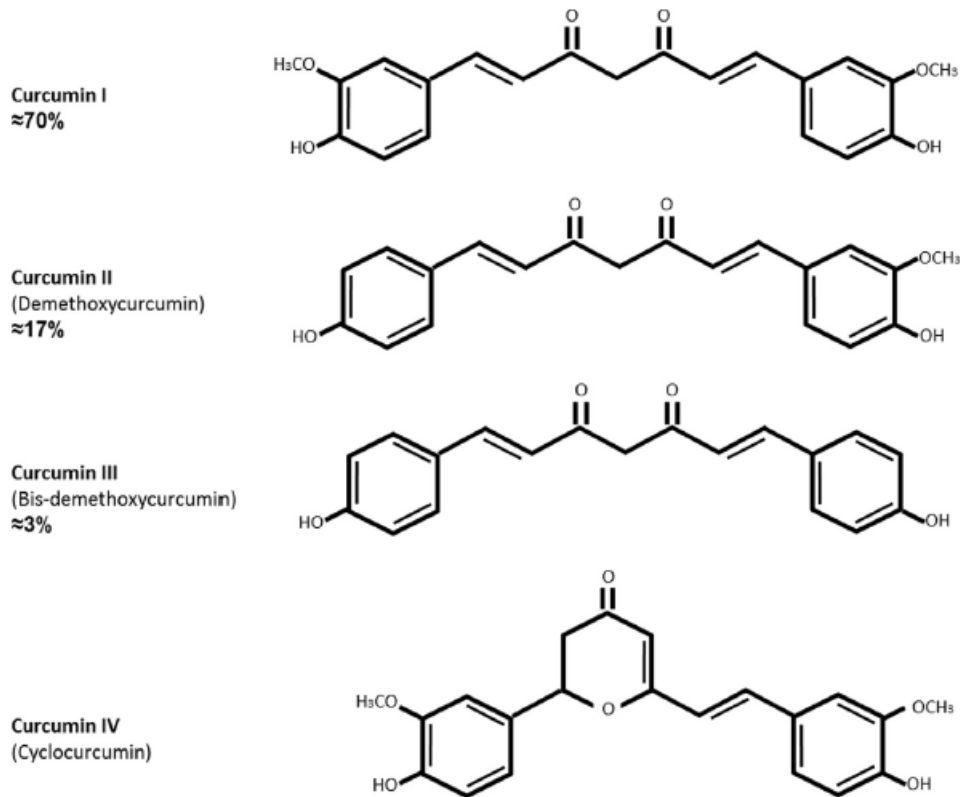


ภาพ 5 ขมิ้นชัน

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcuma_longa_roots.jpg)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) มีสารเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารสีเหลืองสกัดจากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ประกอบด้วย สารหลัก 4 ตัว คือ เคอร์คิวมิน (curcumin; curcumin I) ซึ่งมีมากที่สุด คือ ประมาณ 70% ดีเมท็อกซีเคอร์คิวมิน (Demethoxycurcumin; curcumin II) ประมาณ 17% บิสดีเมท็อกซีเคอร์คิวมิน (Bisdemethoxycurcumin; curcumin III) ประมาณ 3% และ ไซโคลเคอร์คิวมิน (cyclocurcumin; curcumin IV) อีกประมาณ 10%

โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมินจะมีหมู่ที่ทำหน้าที่ bis- α , β -unsaturated β -diketone, methoxy groups, phenolic hydroxyl groups and double-conjugated bonds ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง (Trujillo et al., 2013)



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมินอยด์ (Trujillo et al., 2013)

เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ช่วยป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินยังช่วยป้องกันตับและไต ป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด มีฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอล และน้ำตาลในเลือด (Anand et al., 2007).

สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ hydroxyl radicals (Kunchandy and Rao, 1990; Reddy and Lokesh, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อศึกษาใน renal cell line (Cohly et al., 1998) การให้เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในตับ สมอง และเนื้อเยื่อไตของหนูขาว (Reddy and Lokesh, 1992) ที่สำคัญยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ป้องกัน

การทำลายไตจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการให้ยาเจนทาไมซิน เคอร์คิวมินสามารถลดระดับมาลอน ไดอัลดีไฮด์ (MDA) ทั้งในเลือดและในไต อีกทั้งยังช่วยลดการบาดเจ็บที่ไต และช่วยให้ค่าบ่งชี้เกี่ยวกับการทำงานของไตดีขึ้นในหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Farombi and Ekor, 2006) ดังนั้นการให้เคอร์คิวมินซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันความผิดปกติในการทำหน้าที่ของไตได้ รวมถึงอาจป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 จากการเหนี่ยวนำของยาเจนทาไมซินได้

ไตและโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ

ไตมีหน้าที่ในการกำจัดสารที่เป็นพิษ สารเคมี ได้แก่ ยา รวมทั้งสารที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของร่างกาย โดยกระบวนการ Tubular secretion โดยเฉพาะบริเวณท่อไตส่วนต้น (Perri et al., 2003) ซึ่งกระบวนการนี้จะอาศัยโปรตีนขนส่งทั้งด้าน basolateral และ apical membranes ของท่อไตส่วนต้น (Cha et al., 2001; Hasegawa et al., 2002; Sekine et al., 1997) โดยโปรตีนขนส่งที่สำคัญจะมีอยู่สองกลุ่มใหญ่ๆ คือ โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุบวก (organic cation transport; Oct) และ โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ (organic anion transporter; Oat) ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งหลักที่อยู่บริเวณท่อไตส่วนต้น (Wright and Dantzer, 2004) โดยเฉพาะโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ ซึ่งทำหน้าที่หลักในการกำจัดสารจากภายในร่างกาย สารพิษ และยาต่างๆ ได้แก่ ยาด้านมะเร็ง ยาปฏิชีวนะ ยาขับปัสสาวะ ยาด้านการอักเสบ ยาลดความดัน (Sekine et al., 2000)

ในปัจจุบันโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบในไตที่พบ ได้แก่ Oat1, Oat2, Oat3, Oat4, Oat5, Oat8, Oat9 และ Oat10 จากทั้งหมดนี้พบว่า Oat1 และ Oat3 มีบทบาทหลักในการกำจัดสารออกจากร่างกายที่บริเวณท่อไตส่วนต้น (Motohashi et al., 2002; Cha et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า mRNA ของ hOAT3 มีมากที่สุดไนไตของมนุษย์ (Motohashi et al., 2002) Oat3 โคโลนาจากมนุษย์ ลิง กระต่าย หนู rat และ หนู mice (Sekine et al., 2000) และพบได้ทั้งไต สมอ ตับ และตา (Kusuhara et al., 1999) ในไต Oat3 จะอยู่ทางด้าน basolateral membrane ของท่อไตส่วนต้น ทำหน้าที่ขนส่งสาร PAH, glutarate, estrone sulfate (ES), ochratoxin A, cimetidine, benzylpenicillin

และ cephaloridine อย่างไรก็ตาม estrone sulfate ถือเป็นซับสเตรทของ Oat3 (Sweet, 2005; Torres, 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการทำงานและการแสดงออกของ Oats ถูกควบคุมโดยหลายๆ ปัจจัย เช่น protein kinase C (PKC) ซึ่งพบว่าการกระตุ้น PKC จะทำให้การแสดงออกของ Oat1 และ Oat3 ลดลงที่บริเวณ cell surface (Miller et al., 1998; Zhang et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนหลายๆตัว ได้แก่ angiotensin II, progesterone และ parathyroid มีผลต่อการแสดงออกของ Oat ผ่านการกระตุ้น PKC (Zhou et al., 2007; Nii-Kono et al., 2007; Li et al., 2009)

การเกิดพยาธิสภาพหรือโรคต่างๆ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโรคไตวายเรื้อรังมีผลทำให้การแสดงออกของ Oat1 ลดลงร่วมกับการขับสารอินทรีย์ประจุลบออกจากร่างกายลดลง (Monica Torres et al., 2005) การเกิด ischemia-reperfusion ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของทั้ง Oat1 และ Oat3 (Matsuzaki et al., 2007; Schneider et al., 2007) นอกจากนี้หลายๆการศึกษายังพบว่า อนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของโปรตีนขนส่งที่อยู่บริเวณท่อไตส่วนต้น (Fong et al., 1973; Mattson, 1998) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในภาวะเบาหวานทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของ Oat3 (Arjinajarn et al., 2013)

การเกิดความเป็นพิษต่อไตโดยการเหนี่ยวนำด้วยยาเจนทาไมซิน นำไปสู่การลดลงของการกำจัดสารออกทางไต (Akawut and Smith, 1998; Holzinger et al., 2007; Jariyawat et al., 1999; Takeda et al., 1999; Uwai et al., 2000) จากการศึกษาพบว่ารอยโรคของการได้รับยาเจนทาไมซินมักเกิดบริเวณท่อไตส่วนต้น ดังนั้นการเกิดความเป็นพิษต่อไตโดยการเหนี่ยวนำด้วยยาเจนทาไมซินอาจมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ซึ่งพบมากที่บริเวณท่อไตส่วนต้นของไตได้ โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าหนูที่ได้รับเจนทาไมซินจะมีการแสดงออกของ Oat1 และ Oat3 ลดลง (Bae et al., 2008)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและสารเคมี

1. ยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จาก Pharmaceutical Organization, INC
2. สารเคอร์คิวมิน (Curcumin) จาก Cayman Chemical Company
3. Malondialdehyde (MDA) assay kit จาก Cayman Chemical Company
4. Glutathione (GSH) assay kit จาก Cayman Chemical Company
5. แอนติบอดี caspase3 and Bax จาก Millipore company
6. แอนติบอดี calpain2, cytochrome c, Bcl-2, cleaved caspase7 และ actin จาก Cell Signaling Technology
7. แอนติบอดี GRP78 จาก Santa Cruz Biotechnology
8. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit secondary antibody จาก Amersham
9. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated rabbit anti-goat secondary antibody จาก Millipore Company
10. ECL enhanced chemilumescence agent จาก GE Healthcare
11. Hyperfilm จาก GE Healthcare
12. Mammalian tissue lysis/extraction reagent จาก Sigma-Aldrich Corp.
13. Protease inhibitor cocktail จาก Roche Applied Science
14. [³H]ES จาก Perkin Elmer

2. สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 150 – 180 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม ทำการเลี้ยงสัตว์ไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ของอาคาร สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งห้องเลี้ยงสัตว์จะเป็นห้องที่มีการควบคุม สภาพแวดล้อม ดังนี้

อุณหภูมิ	$23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
ความชื้น	30-70%
แสงสว่าง	ช่วงมืด 12 ชั่วโมงและช่วงสว่าง 12 ชั่วโมง

สัตว์จะได้รับอาหารเม็ดสำหรับหนูขาวของบริษัท CP และได้รับน้ำกินแบบเต็มที และการทำการทดลอง หรือปฏิบัติกับสัตว์ทุกอย่าง จะต้องทำตามหลักจรรยาบรรณและหลักการเลี้ยงและดูแล สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. การออกแบบการทดลอง

หลังจากทำการพักสัตว์เป็นเวลา 7 วัน หนูจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูปกติ (Control) หนูกลุ่มนี้จะทำการฉีดด้วย normal saline เข้าทางช่องท้อง

กลุ่มที่ 2: หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) หนูกลุ่มนี้จะได้รับการฉีดยา gentamicin ขนาด 100 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

กลุ่มที่ 3: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 100 mg/kg (Gentamicin + curcumin 100) หนูกลุ่มนี้จะได้รับการป้อนสาร curcumin ขนาด 100 mg/kg ด้วยวิธี gavage feeding เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดยา gentamicin ขนาด 100 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

กลุ่มที่ 4: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg (Gentamicin + curcumin 200) หนูกลุ่มนี้จะได้รับการป้อนสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg ด้วยวิธี gavage feeding เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดยา gentamicin ขนาด 100 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

กลุ่มที่ 5: หนูที่ได้รับสาร curcumin ขนาด 300 mg/kg (Gentamicin + curcumin 300) โดยหนูกลุ่มนี้จะได้รับการป้อนสาร curcumin ขนาด 300 mg/kg ด้วยวิธี gavage feeding เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดยา gentamicin ขนาด 100 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

กลุ่มที่ 6: หนูที่ได้รับเฉพาะสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg (Control + curcumin 200) โดยหนูกลุ่มนี้จะได้รับการป้อนสาร curcumin ขนาด 200 mg/kg ด้วยวิธี gavage feeding หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารแต่ละชนิดตามแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน นอกจากนั้นหนูทุกกลุ่มจะถูกชั่งน้ำหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และชั่งน้ำหนักทุกอาทิตย์จนสิ้นสุดการทดลอง หลังจากนั้นในวันที่ 14 จะนำหนูแต่ละตัวจากแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงไว้ใน metabolic cage เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อวัดปริมาณปัสสาวะ

4. การเก็บตัวอย่างเลือด และเนื้อเยื่อไต

ในวันที่ 15 ของการทดลอง จะทำการเก็บปัสสาวะที่ได้ พร้อมบันทึกปริมาณน้ำที่หนูขาวกิน และปริมาณปัสสาวะที่ได้ เพื่อนำไปหาค่าครีเอตินินในปัสสาวะ (Urine creatinine) และอัตราการกรองของไต (Glomerular filtration rate) จากนั้นทำการ усыมิตโดยการให้ยาสลบ pentobarbital เข้าทางช่องท้อง ทำการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจ เพื่อนำไปหาค่า BUN และ ครีเอตินินในเลือด (Serum creatinine) จากนั้นทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บไต โดยไตที่ได้จะถูกนำไปใช้ศึกษาหน้าที่ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) โดยการ uptake สาร Estrone sulfate, หาค่า MDA และ Total glutathione (GSH)

5. การศึกษาการทำงานของไต (Renal function assessment)

ทำการศึกษาการทำงานของไต โดยนำเลือดที่เก็บส่งตรวจวิเคราะห์ค่า BUN, serum creatinine และ urine creatinine

6. การศึกษาการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยการวัดค่า Malondialdehyde (MDA)

ทำการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) โดยนำเอาเนื้อเยื่อไตเฉพาะส่วนนอก (renal cortex) จำนวน 0.4 มิลลิกรัม มาทำการ homogenate ในบัฟเฟอร์จำนวน 0.4 มิลลิลิตร แล้วปั่นแยกโดยใช้แรงปั่นเหวี่ยงที่ $1,600 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วน supernatant ที่ได้มาใช้ในการตรวจหาระดับของ MDA โดยใช้ชุดตรวจ TBARS Assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยระดับของ MDA จะมีหน่วยเป็นนาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน (nmol/mg protein)

7. การศึกษาระบบการต้านออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยการวัดค่า Total glutathione (GSH) ของไต

ทำการวัดระดับของ total glutathione (GSH) โดยนำเอาเนื้อเยื่อไตเฉพาะส่วนนอก (renal cortex) จำนวน 0.5 มิลลิกรัม มาทำการ homogenate ในบัฟเฟอร์จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นแยกโดยใช้แรงปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เอาเฉพาะส่วน supernatant ที่ได้มาใช้ในการตรวจหาระดับของ total glutathione โดยใช้ชุดตรวจ Quantichrom Glutathione assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยระดับของ total glutathione จะมีหน่วยเป็นมิลลิโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mmole/mg protein)

8. การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) ที่ไต

โดยการวัดค่าการ uptake สาร radioactive estrone sulfate ($[^3\text{H}]\text{ES}$) ซึ่งเป็น specific substrate ของ Oat3 โดยเมื่อทำการแยกไตออกมาแล้วจะทำการลอกเอาส่วนเยื่อหุ้มไตออก จากนั้นนำไตแช่ใน ice-cold modified Cross and Taggart saline buffer (ประกอบด้วย 95 mM NaCl, 80 mM mannitol, 5 mM KCl, 0.74 mM CaCl_2 and 9.5 mM Na_2HPO_4 ; pH 7.4) จากนั้นจะทำการ

เฉือนเอาเนื้อเยื่อไตเฉพาะส่วนนอก (renal cortex) เป็นชิ้นบางๆ ขนาดน้อยกว่า 0.5 mm ด้วย Stadie-Riggs microtome เมื่อได้ชิ้นเนื้อเยื่อไตแล้วให้นำไปแช่ใน ice-cold modified Cross and Taggart saline buffer เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาทีให้นำไปแช่ใน buffer ที่มีสาร [3 H]ES อยู่ ด้วยเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาให้ทำการล้างชิ้นเนื้อเยื่อไตด้วย 0.1 M MgCl_2 นำชิ้นเนื้อเยื่อไตแช่ให้แห้งบนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปชั่ง ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อไตลงในขวด vial scintillation glass ขนาด 20 ml เติมสารละลาย 1 M NaOH ลงไป 0.5 ml เพื่อทำการย่อยเนื้อเยื่อไต จากนั้นทิ้งไว้ 1 คืน เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย 1M HCl ลงไป 0.5 ml เพื่อทำการ neutralized เติม scintillation fluid ลงไป 10 ml จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง liquid scintillation counter (Perkin Elmer, MA, USA) โดยค่าการ uptake [3 H]ES จะมีค่าเป็น tissue to medium ratios ($\text{dpm/mg of tissue} \div \text{dpm/ml of medium}$)

9. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) และกลไกที่เกี่ยวข้อง โดยวิธี Western blot analysis

9.1 การแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อ (Tissue protein extraction)

ทำการแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (renal cortex) โดยนำเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (renal cortex) มาทำการ homogenate ใน Cell Lytic buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ที่มี protease inhibitor (Roche, Indianapolis, IN, USA) อยู่ด้วย จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนที่ใส (supernatant) ซึ่งเป็นส่วนของ whole cell lysate fraction ซึ่งจะแบ่งเก็บส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งจะนำไปปั่นต่อที่ความเร็ว 100,000x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนใส (supernatant) จะเป็นส่วนของ cytosol fraction ส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นจะนำมาเติมด้วย Cell Lytic buffer จากนั้นทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนนี้คือส่วนของ membrane fraction ส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นที่ 5,000x g ในขั้นตอนแรกจะนำมาเติมด้วย Cell Lytic buffer จากนั้นทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนนี้จะเป็นส่วนของ nuclear fraction จากนั้นโปรตีนทุก fraction ที่ได้จะนำไปเก็บไว้ที่ตู้ -80 °C จนกว่าจะนำไปใช้

9.2 การเตรียม polyacrylamide gel และขั้นตอนการทำ Western blot

โปรตีนจากแต่ละ fraction คือ whole cell lysates, cytosol, nuclear และ membrane fractions จะถูกนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีน (total protein concentration) จากนั้นจะทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีน โดยนำตัวอย่างของโปรตีนความเข้มข้น 100 μg ผสมกับ SDS Laemmli buffer จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกโปรตีนตัวอย่างโดยใช้ 10% เจลอะคริลาไมด์ (10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) จากนั้นทำการการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene fluoride (PVDF) ทำการ blocking ด้วย 5% non-fat dry milk ซึ่งละลายในสารละลาย TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการ blocking เสร็จแล้วจะทำการแช่แผ่นเมมเบรนด้วย primary antibody ต่อ Oat3, Bax, Bcl2, Cytochrome c, Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 7, caspase 12, calpain 2, chop and Grp78 เป็นเวลา 1 คืน ที่ 4 °C หลังจากนั้นทำการล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย TBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วแช่เมมเบรนด้วย horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit หรือ anti-mouse secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นโปรตีนเป้าหมายจะได้รับการมองเห็นบนฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (Hyperfilm) โดยใช้ chemiluminescence agent (GE Healthcare, Buckinghamshire) วิเคราะห์ปริมาณแถบโปรตีนเป้าหมายที่แยกได้ (Band density) โดยใช้โปรแกรม ImageJ จากนั้นจะนำค่าที่ได้จากแถบโปรตีนเป้าหมายมาเทียบ (normalized) กับแถบโปรตีน actin โดยค่าที่ได้จะแสดงในหน่วย Arbitrary unit (AU)

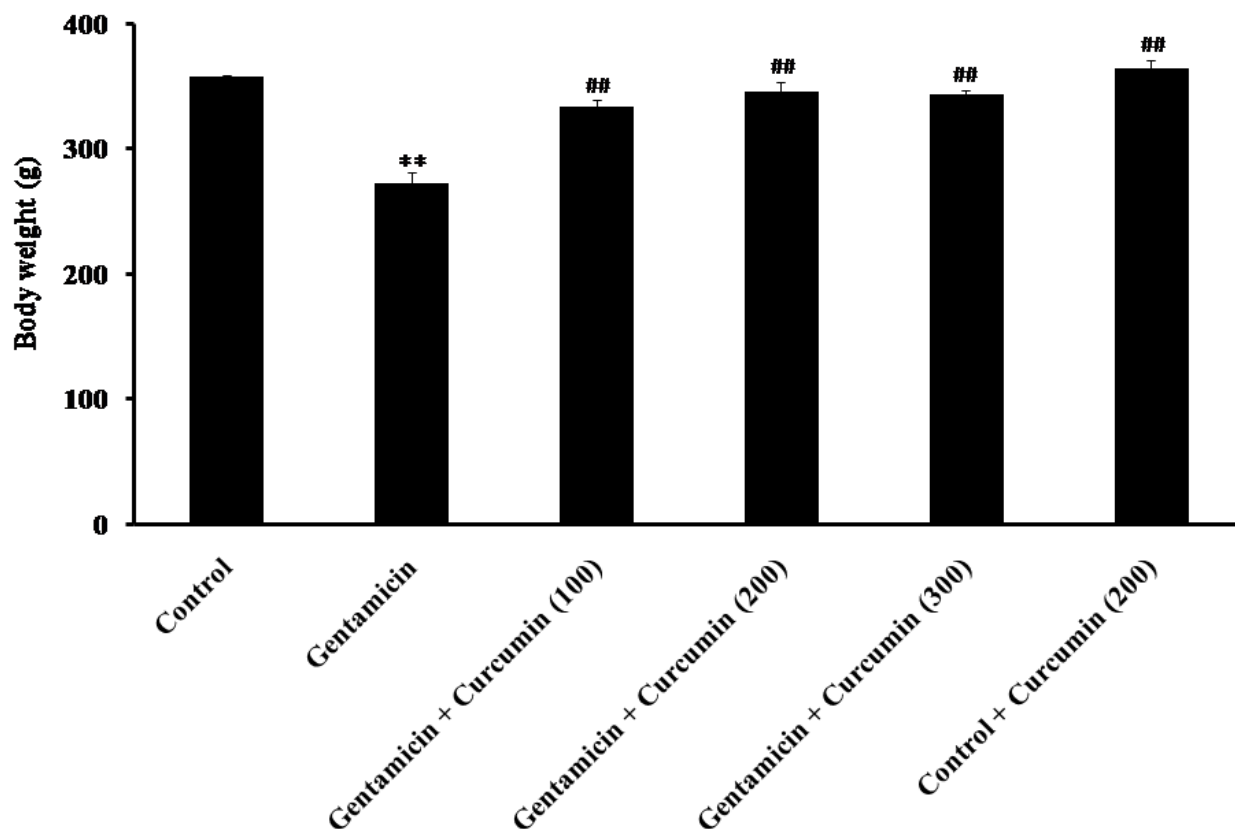
10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูป mean $\pm$ SEM และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.1 โดยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับการทดสอบด้วย Newman-Keuls tests โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

ผลการวิจัย

1. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าน้ำหนักตัว (Body weight)

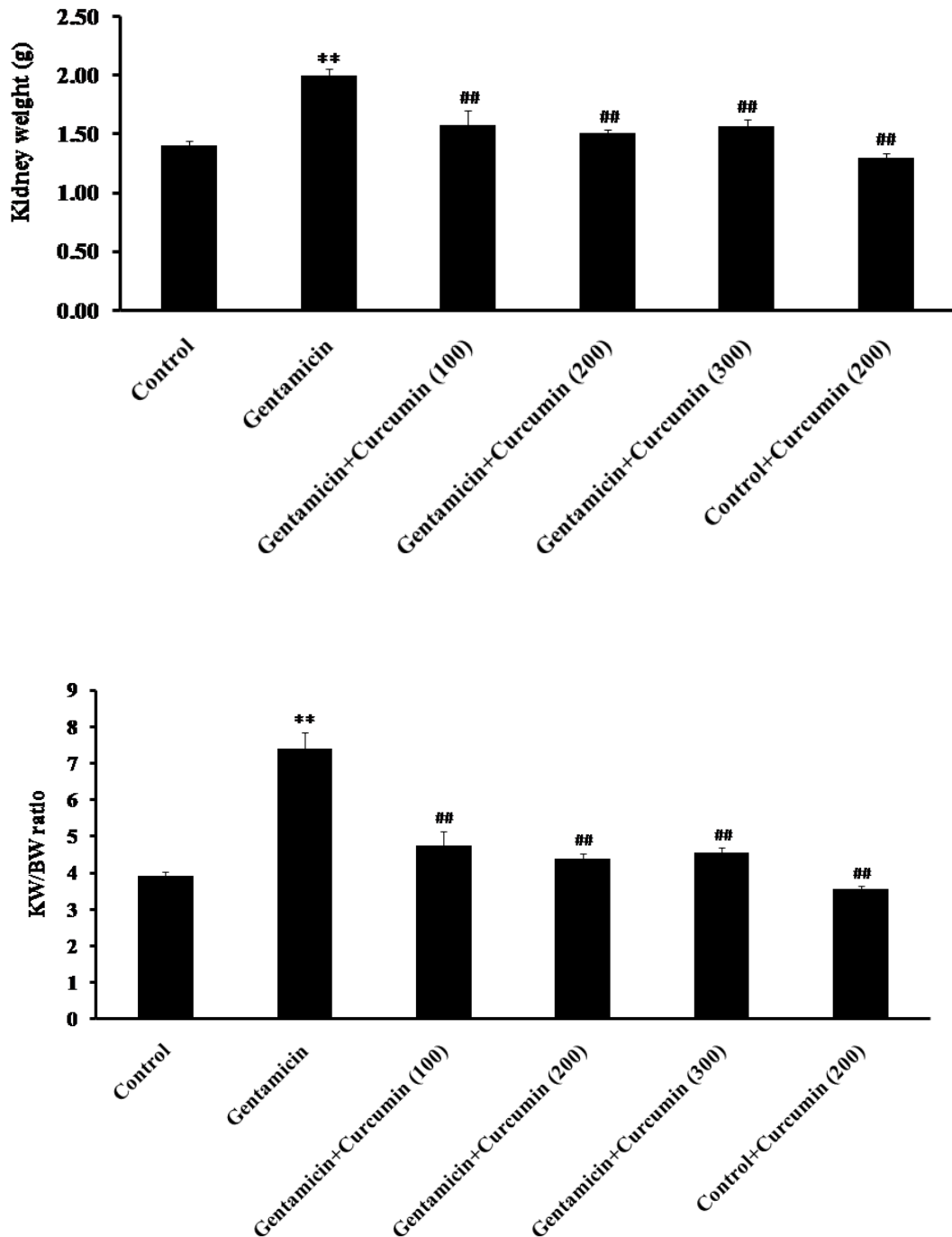
จากการวัดค่าน้ำหนักตัว (Body weight) ของหนู (ภาพ 7) พบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่าน้ำหนักตัวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาที่ก่อนการให้ยาเจนทาไมซินพบว่าหนูจะมีค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน ส่วนหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW จะมีค่าน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลต่อค่าน้ำหนักตัวโดยจะทำให้หนูมีค่าน้ำหนักตัวที่ลดลง การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันการลดลงของค่าน้ำหนักตัวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดน้ำหนักตัวโดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าน้ำหนักตัวโดยจะมีค่าน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม



ภาพ 7 แสดงค่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

2. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าน้ำหนักไต (Kidney weight) และค่าน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว (Kidney weight/Body weight ratio: KW/BW ratio)

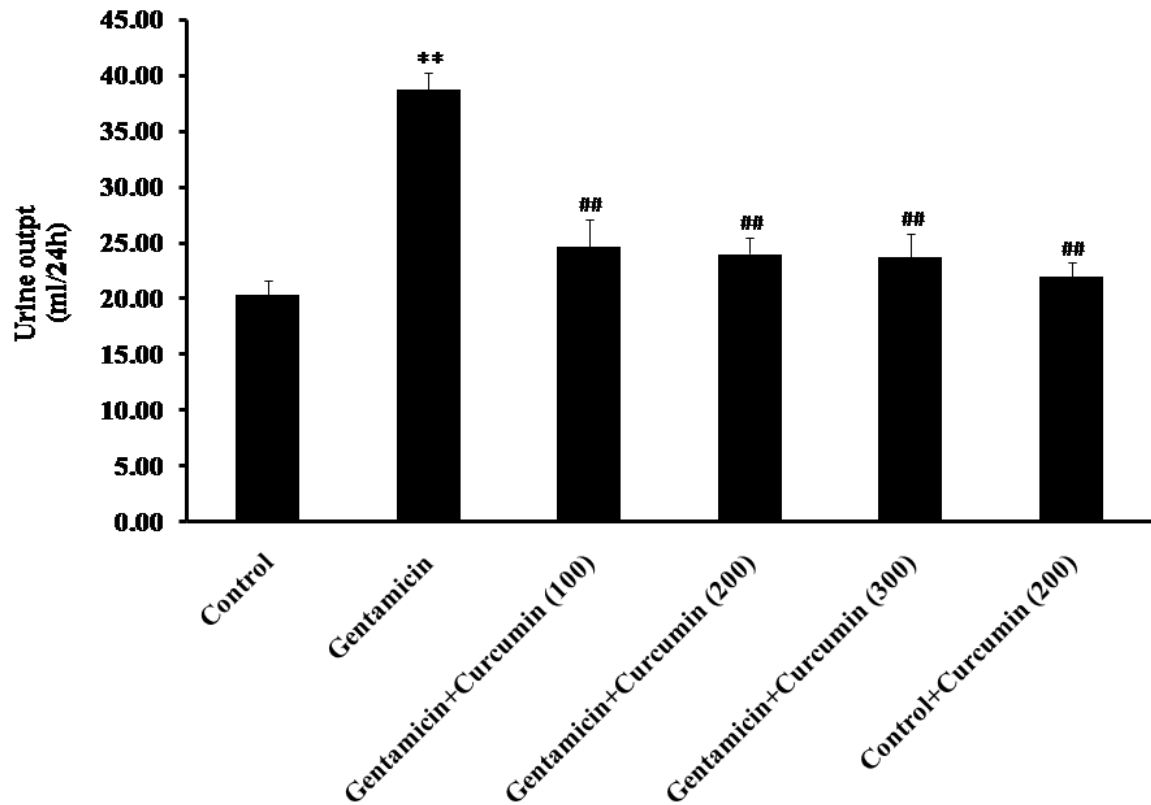
จากการวัดค่าน้ำหนักไต (Kidney weight) และค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว (Kidney weight/Body weight ratio: KW/BW ratio) ของหนู (ภาพ 8) ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงการเกิดภาวะการขยายขนาดของไต (Renal hypertrophy) พบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่าน้ำหนักไตและค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินสามารถป้องกันการเกิดความผิดปกติดังกล่าวได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าน้ำหนักไตและค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้เกิดภาวะ Hypertrophy ของไต โดยดูได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าน้ำหนักไตและค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันการเกิดภาวะ Renal hypertrophy ได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดน้ำหนักไตโดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้น ปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าน้ำหนักไตและค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวโดยจะมีค่าน้ำหนักไตและค่าอัตราส่วนน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 8 แสดงค่าน้ำหนักไต (Kidney weight) ค่าน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว (Kidney weight/Body weight ratio: KW/BW ratio) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** P < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## P < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

3. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าปริมาณปัสสาวะ

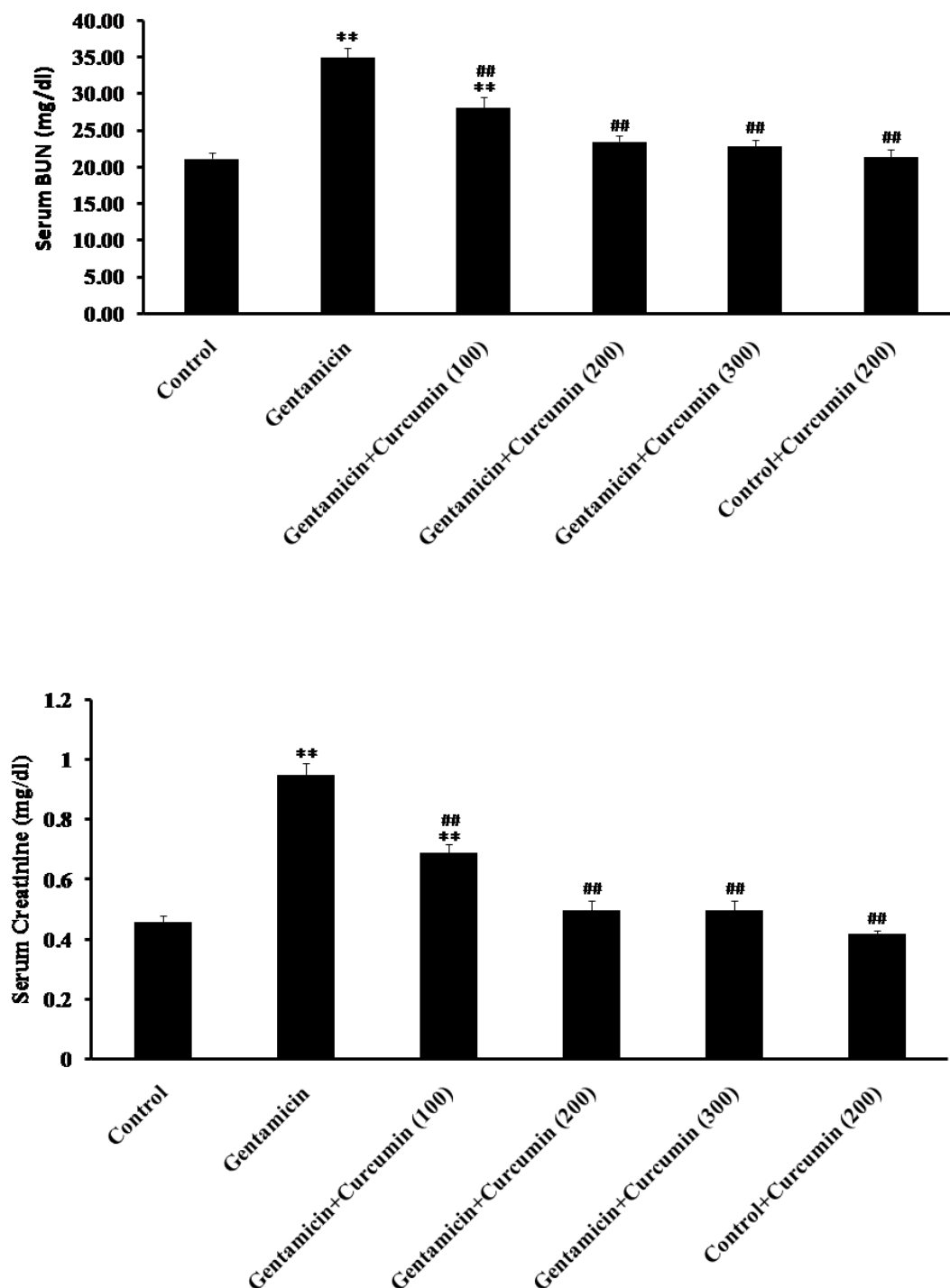
จากการวัดค่าปริมาณปัสสาวะ (ภาพ 9) พบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่าปริมาณปัสสาวะ ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการให้ยาเจนทาไมซินสามารถป้องกันความผิดปกตินี้ได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าปริมาณปัสสาวะที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้ปริมาณปัสสาวะเพิ่มขึ้น การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลเพิ่มหรือลดปริมาณปัสสาวะ โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณปัสสาวะ โดยจะมีค่าปริมาณปัสสาวะที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 9 แสดงค่าปริมาณปัสสาวะของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; $n=6$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

4. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่า BUN (Blood urea nitrogen) และ ครีเอตินิน (Creatinine)

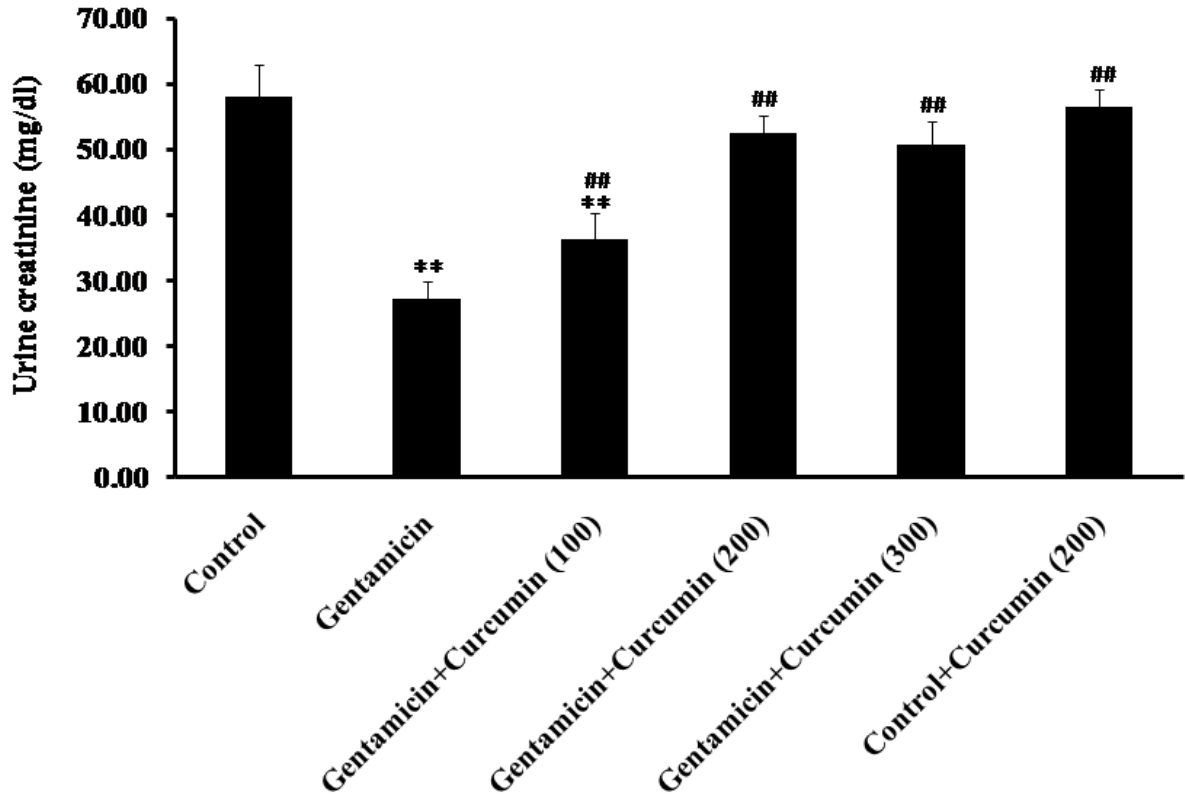
จากการวัดค่า BUN (Blood urea nitrogen) และ ครีเอตินิน (Creatinine) (ภาพ 10) ซึ่งค่านี้สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีการเพิ่มขึ้นของค่า BUN และ Creatinine อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะช่วยลดค่า BUN และ Creatinine สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่า BUN และ Creatinine ที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง โดยดูได้จากการเพิ่มขึ้นของค่า BUN และ Creatinine การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่า BUN และ Creatinine โดยสังเกตได้จากการเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า BUN และ Creatinine โดยจะมีค่า BUN และ Creatinine ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 10 แสดงค่า BUN และ Creatinine ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** P < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## P < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

5. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าครีอาตินินในปัสสาวะ (Urine creatinine)

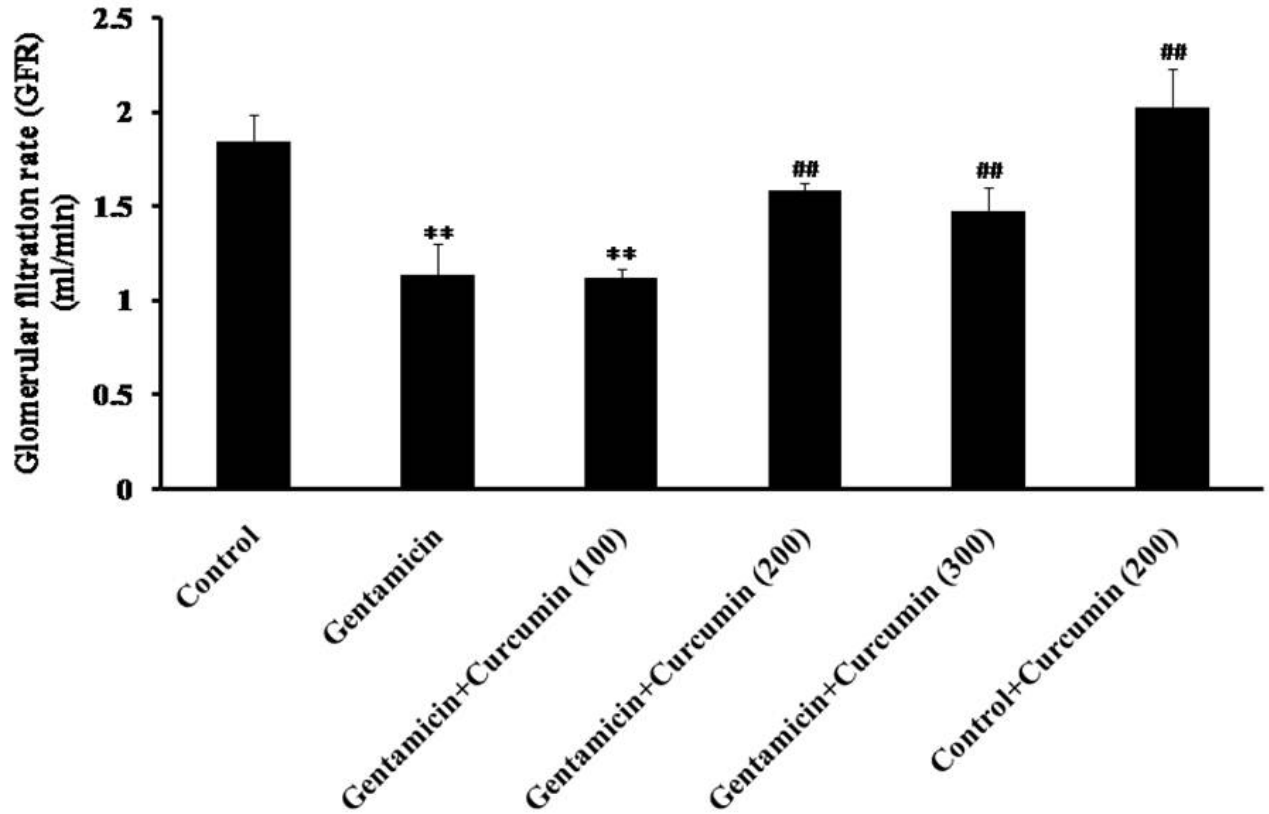
จากการวัดค่าครีอาตินินในปัสสาวะ (Urine creatinine) (ภาพ 11) ซึ่งค่านี้สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีการเพิ่มขึ้นของค่าครีอาตินินในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะช่วยลดค่าครีอาตินินในปัสสาวะได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าครีอาตินินในปัสสาวะที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง โดยดูได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าครีอาตินินในปัสสาวะ การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่าครีอาตินินในปัสสาวะ โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าครีอาตินินในปัสสาวะ โดยจะมีค่าครีอาตินินในปัสสาวะที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 11 แสดงค่าครีเอตินินในปัสสาวะ (Urine creatinine) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

6. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าอัตราการกรองของไต (Glomerular filtration rate)

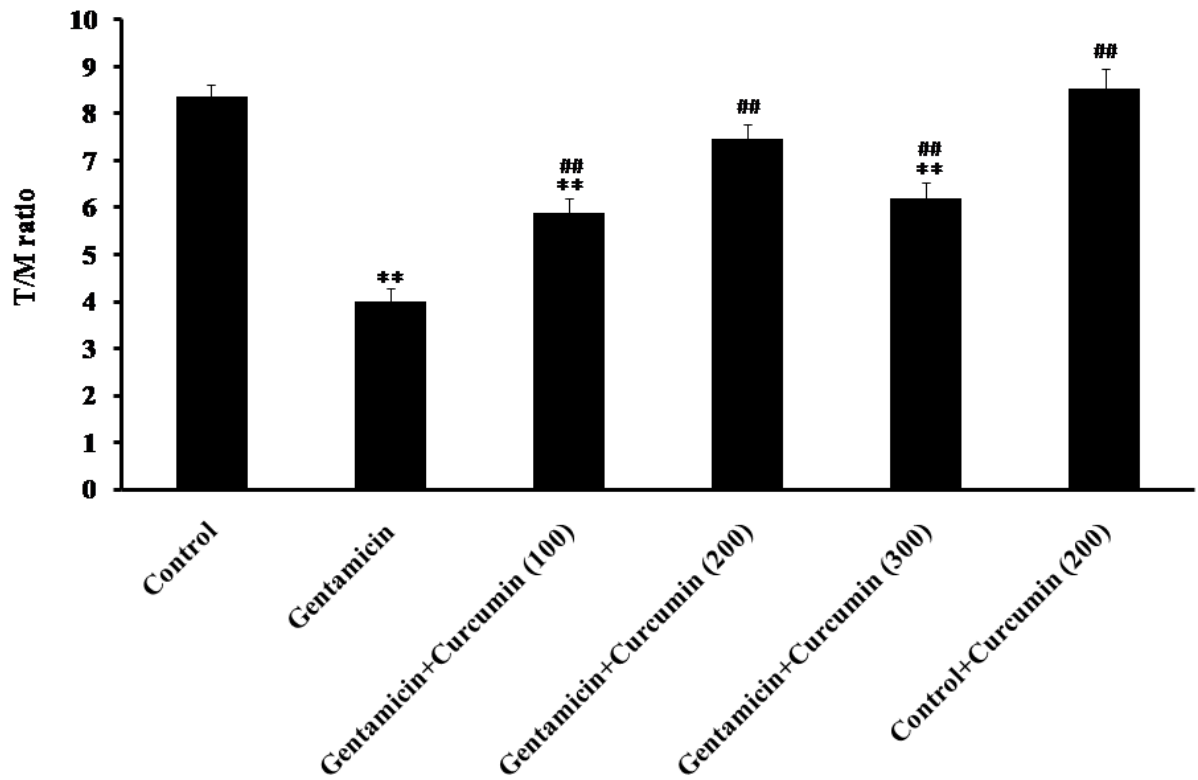
จากการวัดค่าอัตราการกรองของไต (Glomerular filtration rate) (ภาพ 12) ซึ่งค่านี้สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีการลดลงของอัตราการกรองของไตอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะช่วยแก้ไขความผิดปกติดังกล่าวได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าอัตราการกรองของไตที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง โดยดูได้จากการลดลงของค่าอัตราการกรองของไต การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่าอัตราการกรองของไต โดยสังเกตได้จากการเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการกรองของไต โดยจะมีค่าอัตราการกรองของไตที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 12 แสดงค่าอัตราการกรองของไต (Glomerular filtration rate) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; $n=6$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

7. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่าการ uptake สาร [3 H]ES

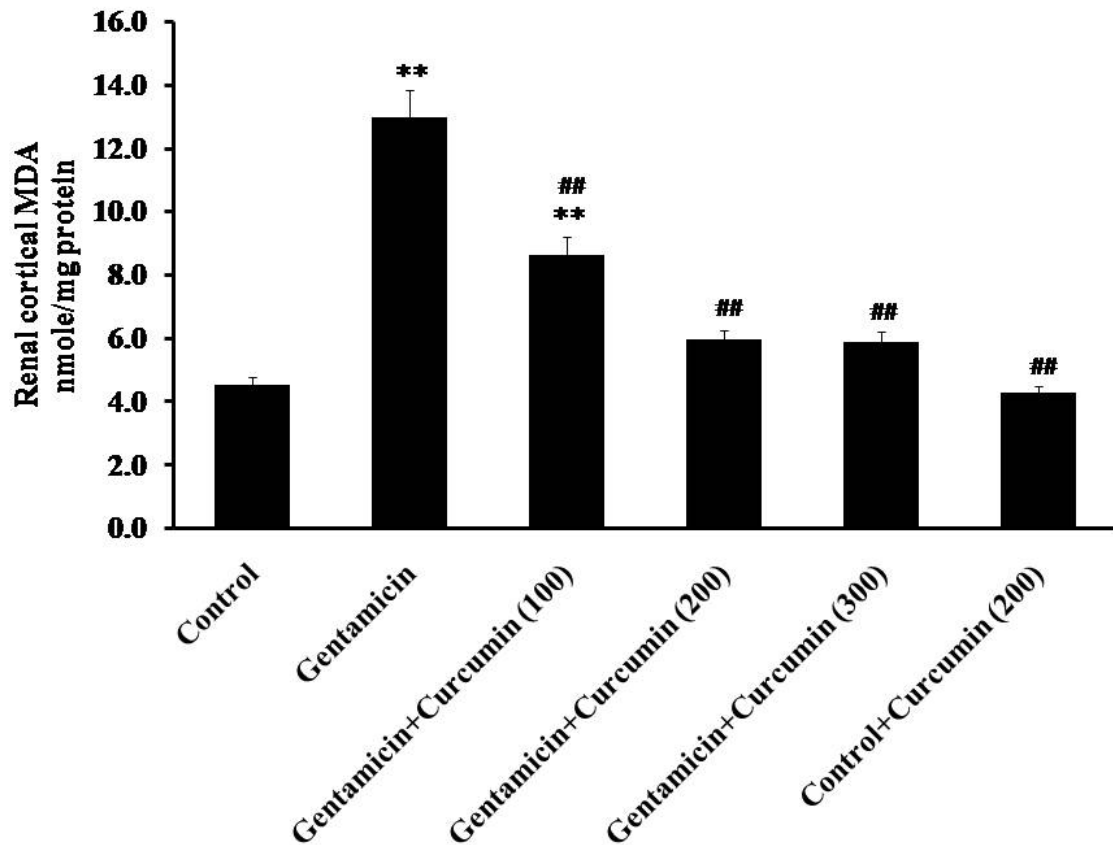
จากการวัดค่าการ uptake สาร [3 H]ES (ภาพ 13) ซึ่ง [3 H]ES เป็น substrate ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) โดยค่านี้สามารถบ่งบอกถึงการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ได้จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่าการ uptake สาร [3 H]ES ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินสามารถป้องกันการเกิดความผิดปกติดังกล่าวได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าการ uptake สาร [3 H]ES ที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้การทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ลดลง โดยดูได้จากการลดลงของค่าการ uptake สาร [3 H]ES การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่าการ uptake สาร [3 H]ES โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าการ uptake สาร [3 H]ES โดยจะมีค่าการ uptake สาร [3 H]ES ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 13 แสดงค่าการ uptake สาร [3 H]ES ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

8. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่า Malondialdehyde (MDA) ของไต

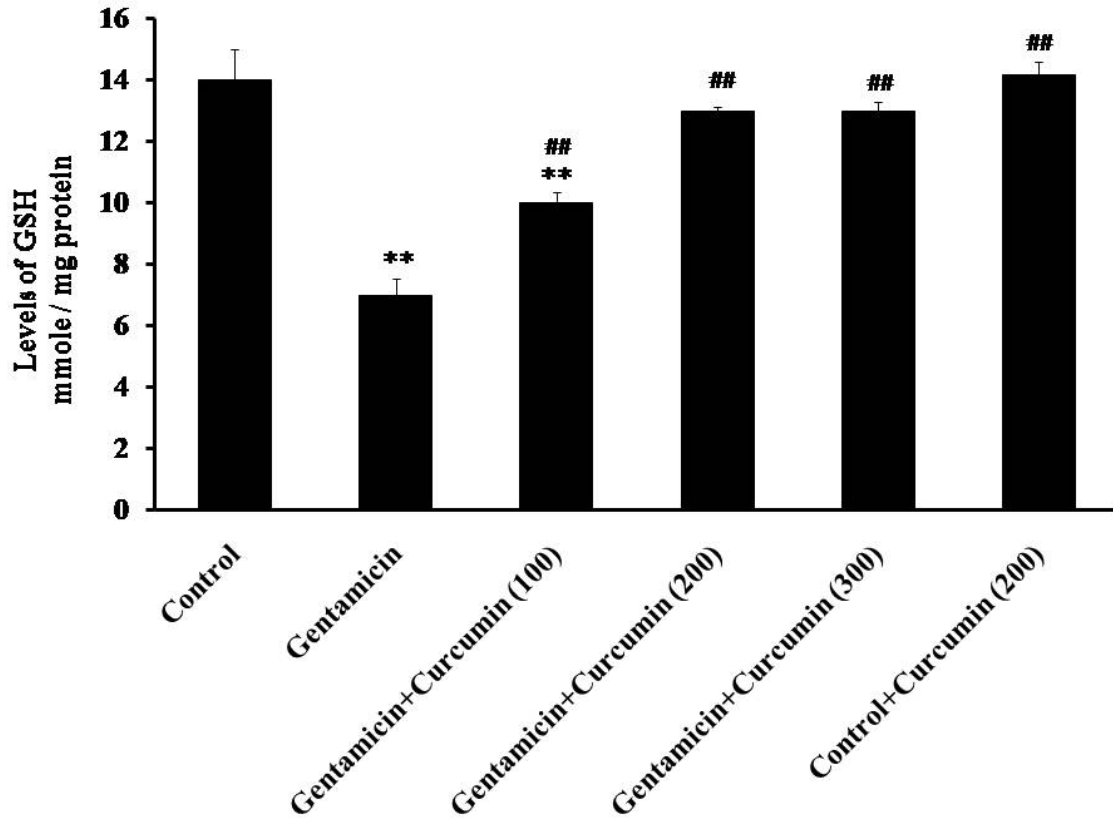
จากการวัดค่า MDA (ภาพ 14) ซึ่งค่านี้สามารถบ่งบอกถึงการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ของไตได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่า MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะมีค่า MDA ลดลง สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่า MDA ที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เพิ่มขึ้น โดยดูได้จากการเพิ่มขึ้นของค่า MDA การให้สารสกัด curcumin จะช่วยลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่า MDA โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า MDA โดยจะมีค่า MDA ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 14 แสดงค่า Malondialdehyde (MDA) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

9. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่า Total glutathione (GSH) ของไต

จากการวัดค่า Total glutathione (GSH) ของไต (ภาพ 15) ซึ่งค่านี้บ่งบอกถึงการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีการลดลงของค่า Total glutathione (GSH) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะช่วยแก้ไขความผิดปกติดังกล่าวได้ สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่า Total glutathione (GSH) ที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินทำให้เกิดการลดลงของเอนไซม์ที่ช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ส่งเสริมการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่า Total glutathione (GSH) โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า Total glutathione (GSH) โดยจะมีค่า Total glutathione (GSH) ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

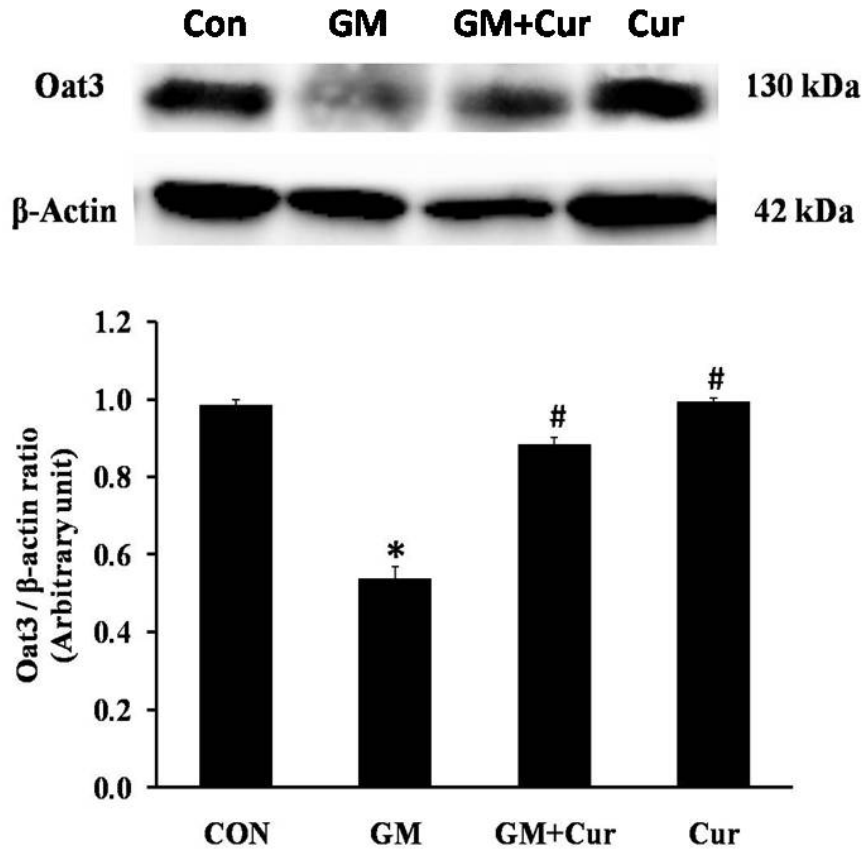


ภาพ 15 แสดงค่า Total glutathione (GSH) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+Curcumin) ขนาด 100 200 และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, ## $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

จากผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อค่า Malondialdehyde (MDA) Total glutathione (GSH) และค่า superoxide dismutase (SOD) ของไตพบว่า สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ที่ขนาด 200 mg/kg BW เป็นขนาดที่น้อยที่สุดให้ผลดีที่สุดในการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ที่ขนาด 200 mg/kg BW ในการศึกษาต่อไป

10. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3)

จากภาพที่ 16 หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีค่าการแสดงออกของ Oat3 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ก่อนการให้ยาเจนทาไมซินสามารถเพิ่มการแสดงออกของ Oat3 ได้สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) ขนาด 200 mg/kg BW พบว่ามีค่าการแสดงออกของ Oat3 ที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Organic anion transporter 3) ที่ไต่ลดลง การให้สารสกัด curcumin จะช่วยป้องกันความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยที่สารสกัดเองไม่ได้มีผลช่วยเพิ่มหรือลดค่าการแสดงออก โดยสังเกตได้จากเมื่อทำการให้เฉพาะสารสกัด curcumin เท่านั้นปรากฏว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าการแสดงออก โดยจะมีค่าการแสดงออกที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



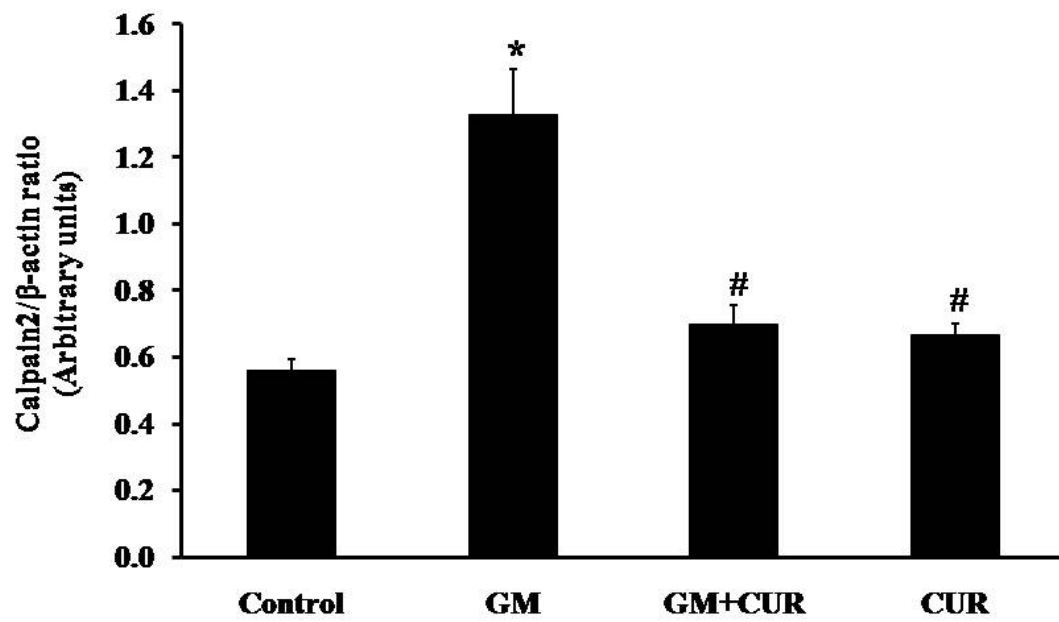
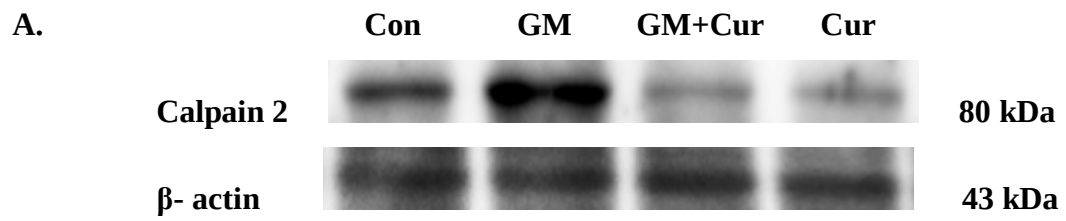
ภาพ 16 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 (Oat3) ด้านบนแสดงการแสดงออกของโปรตีน Oat3 ใน membrane fraction ของเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (Renal cortex) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (GM) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (GM+Cur) ขนาด 200 mg/kg BW และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Cur) ขนาด 200 mg/kg BW ด้านล่างเป็นกราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของโปรตีน Oat3 หลังการปรับเทียบค่าด้วยโปรตีน β -Actin ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

11. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ ER stress pathway

ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78

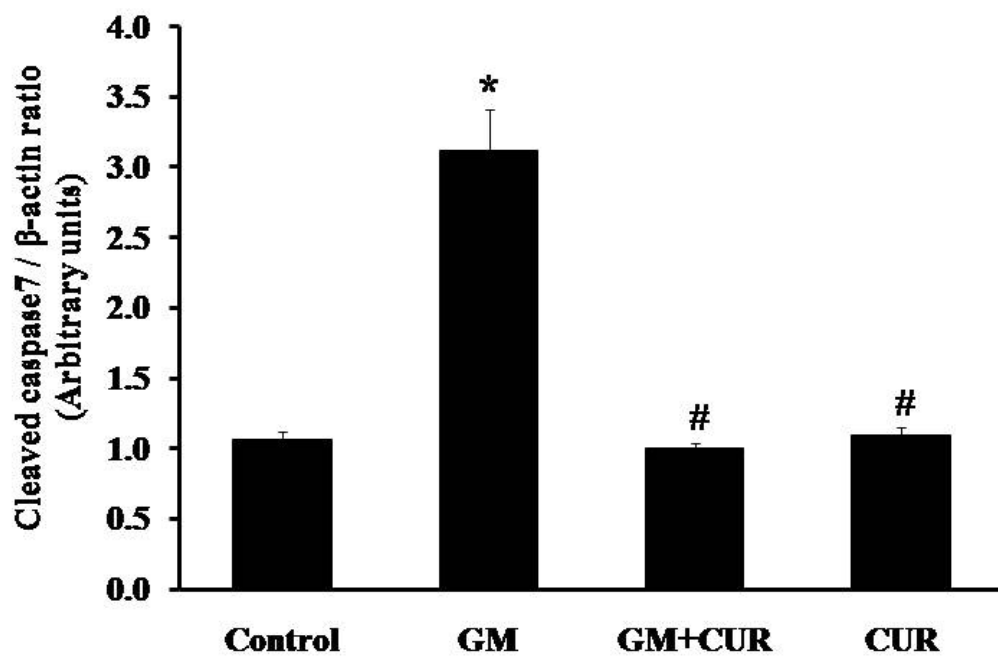
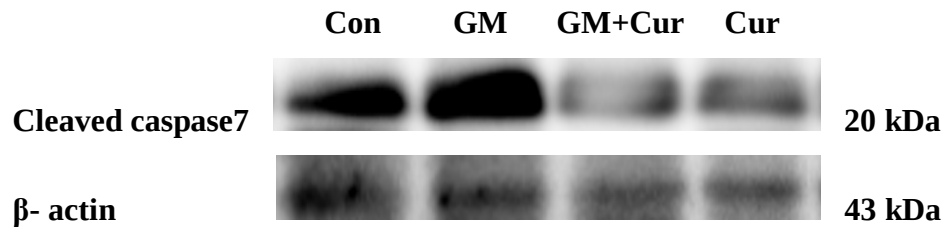
จากการวัดค่าการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78 ของไต (ภาพ 17) ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิด ER stress ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) จะมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2 และ Cleaved caspase 7 ขณะที่มีการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน Grp78 ในส่วน whole cell lysate ของไตอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างไรก็ตามพบว่า การให้สารสกัด curcumin (Gentamicin+ Curcumin) ก่อนการให้ยาเจนทาไมซินจะช่วยลดการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Grp78 สำหรับหนูในกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Control+ Curcumin) พบว่ามีค่าการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78 ในส่วน whole cell lysate ของไตที่ไม่แตกต่างจากหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้เกิด ER stress และการให้สารสกัด curcumin สามารถลดการเกิด ER stress ได้

Whole cell Lysate fractions

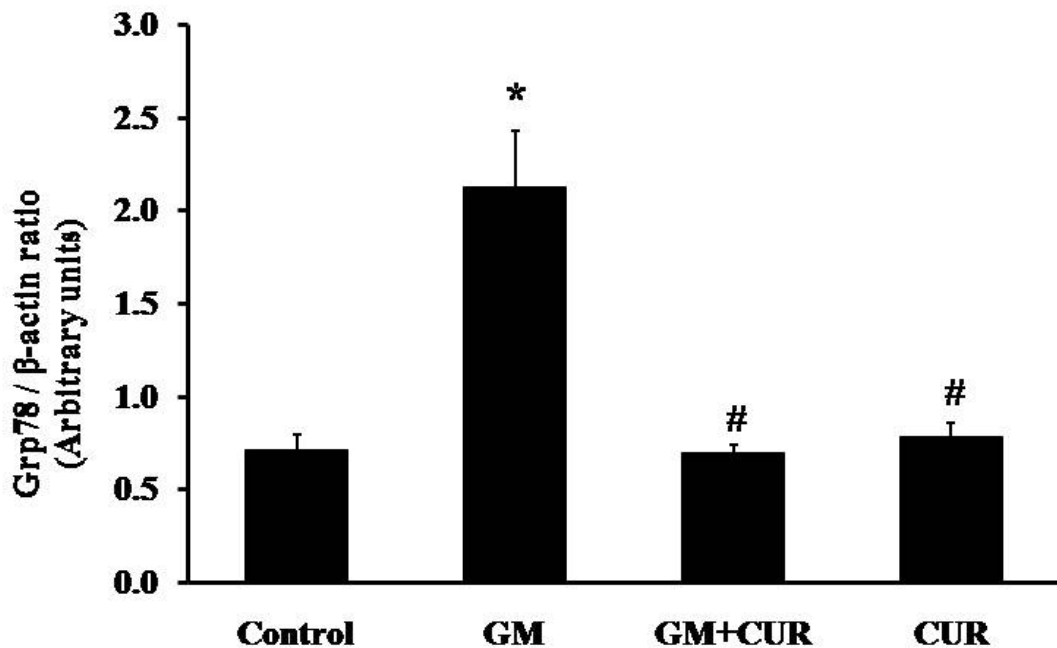
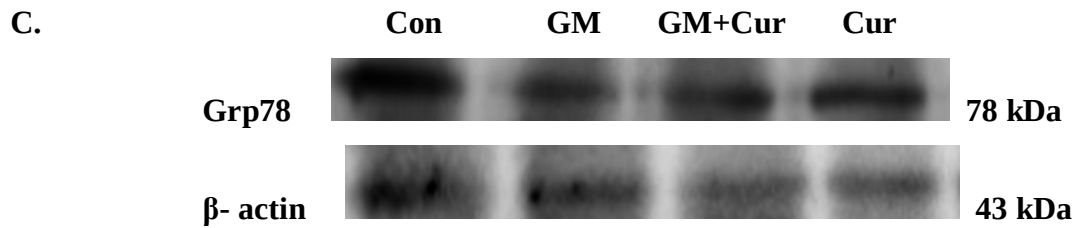


Whole cell Lysate fractions

B.



Whole cell Lysate fractions



ภาพ 17 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อการเกิด ER stress (A), (B) และ (C) ด้านบน แสดงการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78 ใน whole cell fraction ของเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (Renal cortex) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (GM) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (GM+Cur) ขนาด 200 mg/kg BW และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Cur) ขนาด 200 mg/kg BW ด้านล่างเป็นกราฟแท่ง แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีน Calpain 2, Cleaved caspase 7 และ Grp78 หลังการปรับเทียบค่าด้วยโปรตีน β -Actin ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

12. ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ apoptotic pathway

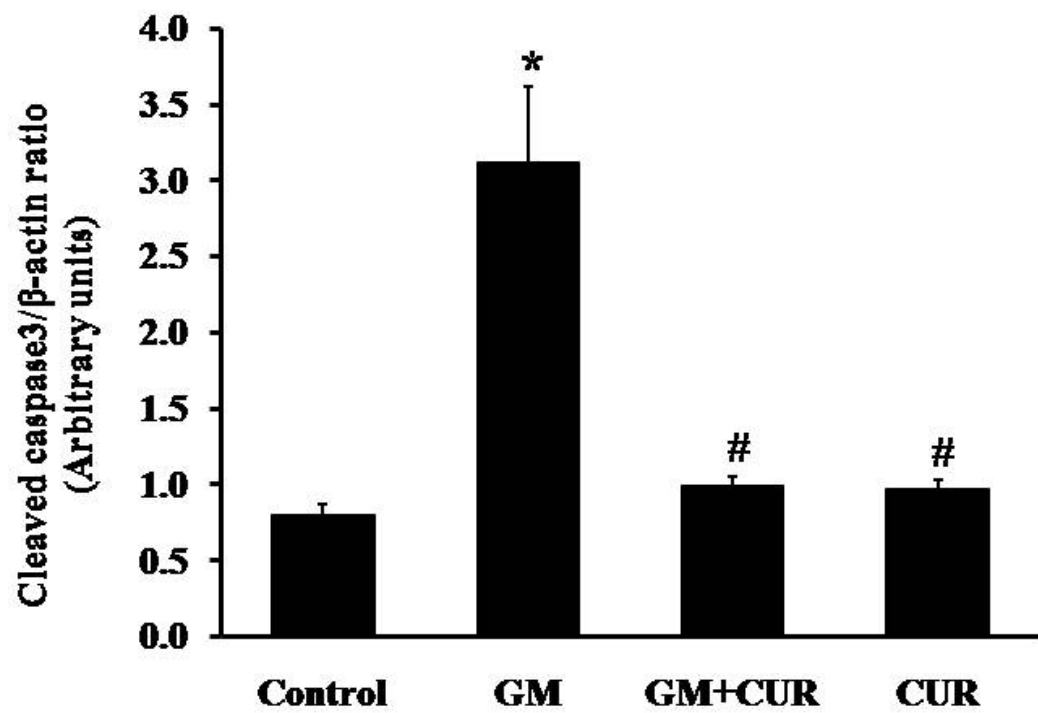
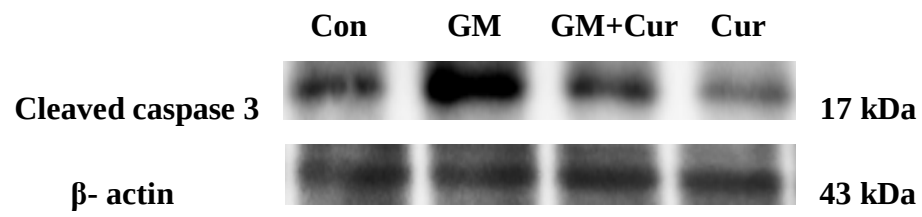
ผลของการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ Cleaved caspase 3, Cytochrome c, Bax และ Bcl-2

จากการวัดค่าการแสดงออกของโปรตีน Cleaved caspase 3, Cytochrome c, Bax และ Bcl-2 ของไต (ภาพ 18) ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิดการตายแบบ apoptosis จากการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน cleaved caspase 3 ในส่วน whole cell และ cytochrome c ในส่วน cytosol ของไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (Gentamicin) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control อย่างไรก็ตามเมื่อทำการให้สารสกัด curcumin ก่อนการให้ยาเจนทาไมซินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน cleaved caspase 3 และ cytochrome c ได้

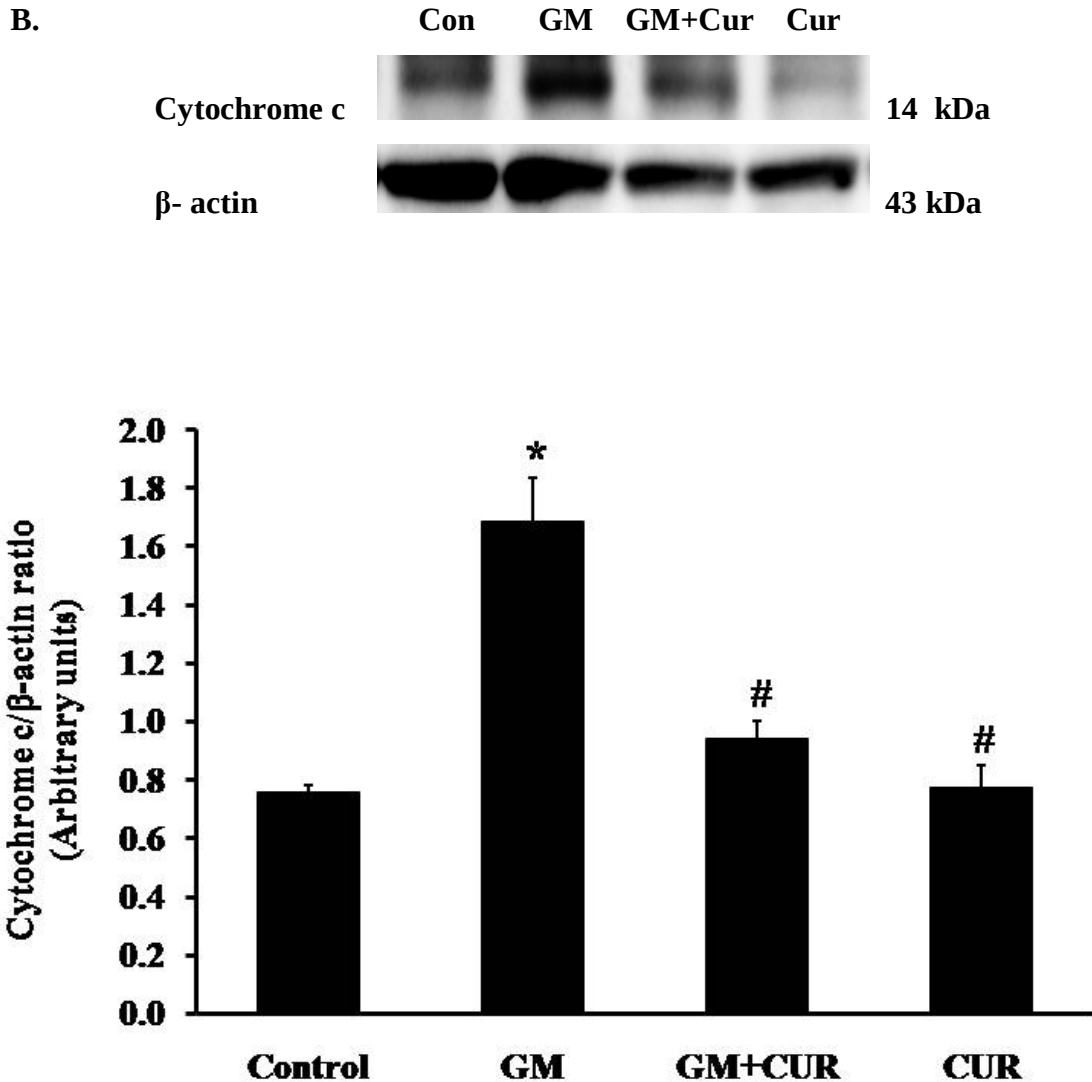
สำหรับค่าการแสดงออกของโปรตีน Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein หรือ โปรตีนที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) พบว่าจะมีค่าการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในส่วน whole cell ของไตหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และจะมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อทำการให้สารสกัด curcumin ก่อนการให้ยาเจนทาไมซิน (ภาพที่ 13) ส่วน Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้านการตายแบบอะพอพโทซิส (Antiapoptotic proteins) พบว่าจะมีค่าการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในส่วน whole cell ของไตหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินเมื่อเทียบกับกลุ่ม control อย่างไรก็ตามเมื่อทำการให้สารสกัด curcumin ก่อนการให้ยาเจนทาไมซิน ระดับการแสดงออกของ Bcl-2 จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 19)

Whole cell Lysate fractions

A.



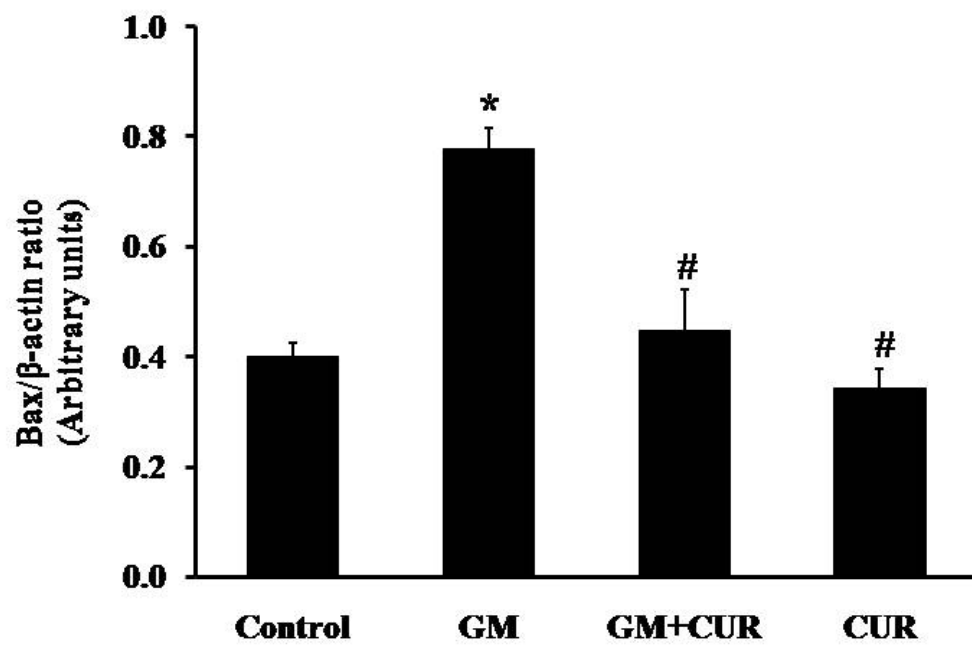
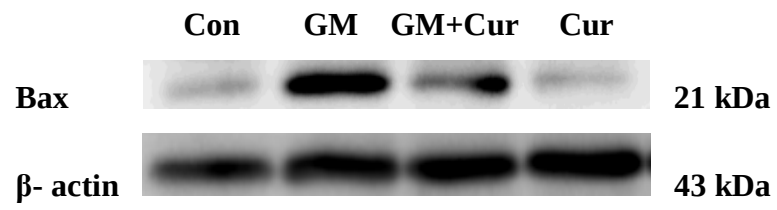
Cytosolic fractions

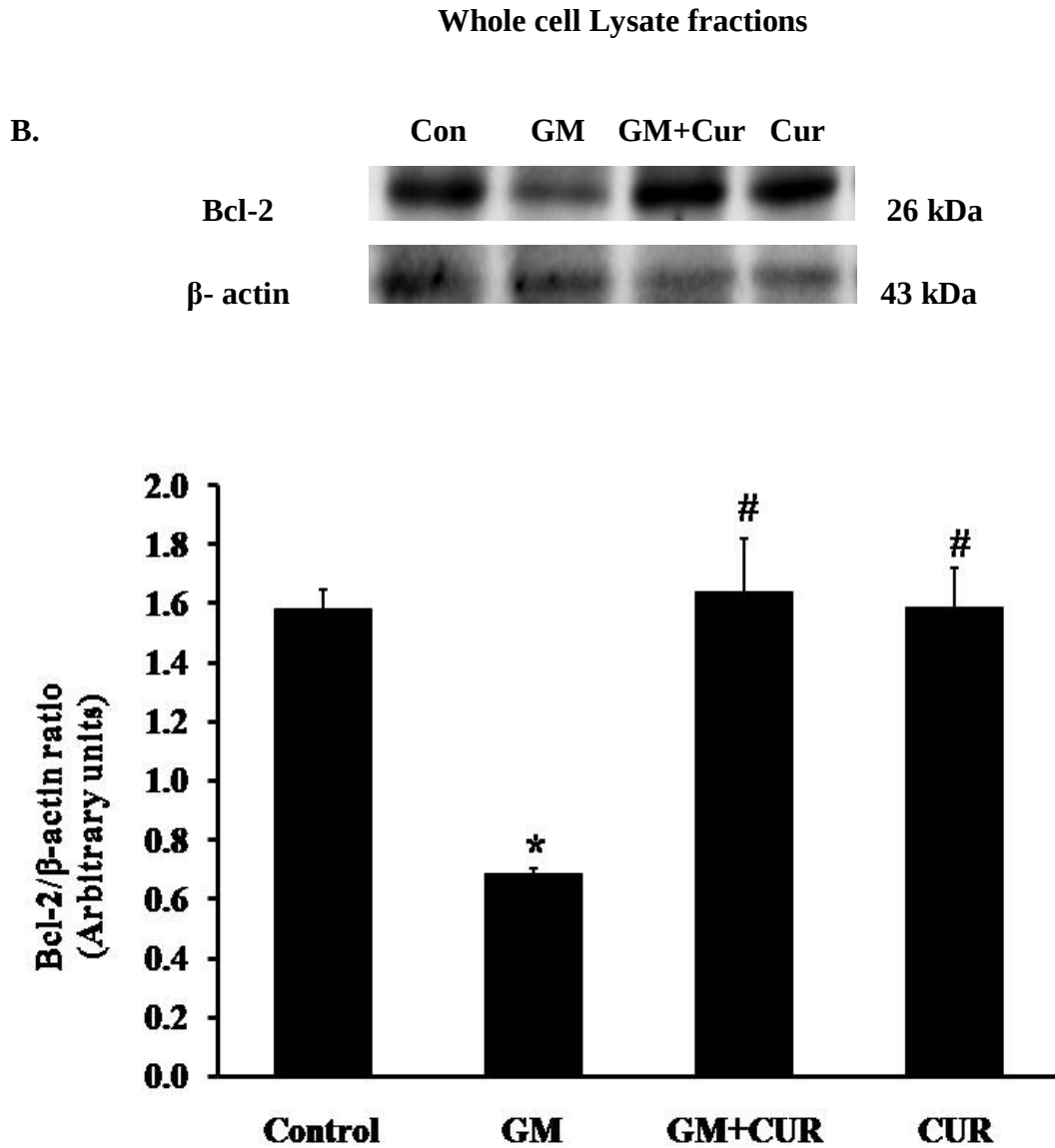


ภาพ 18 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ apoptotic pathway (A) และ(B) ด้านบนแสดงการแสดงผลของโปรตีน Cleaved caspase 3 ใน whole cell fraction และ Cytochrome c ใน cytosolic fraction ของเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (Renal cortex) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (GM) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (GM+Cur) ขนาด 200 mg/kg BW และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Cur) ขนาด 200 mg/kg BW ด้านล่างเป็นกราฟแท่งแสดงระดับการแสดงผลของโปรตีน Cleaved caspase 3 และ Cytochrome c หลังการปรับเทียบค่าด้วยโปรตีน β -Actin ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

Whole cell Lysate fractions

A.





ภาพ 19 ผลของสารสกัดเคอร์คิวมิน (Curcumin) ต่อ apoptotic pathway (A) และ(B) ด้านบนแสดงการแสดงผลของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ใน whole cell fraction ของเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (Renal cortex) ของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซิน (GM) กลุ่มที่ได้รับยาเจนทาไมซินร่วมกับการให้สารสกัด curcumin (GM+Cur) ขนาด 200 mg/kg BW และกลุ่มที่ให้เฉพาะสารสกัด curcumin (Cur) ขนาด 200 mg/kg BW ด้านล่างเป็นกราฟแท่งแสดงระดับการแสดงผลของโปรตีน Bax และ Bcl-2 หลังการปรับเทียบค่าด้วยโปรตีน β -Actin ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M; n=6, * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

อภิปรายผลการวิจัย

เจนทาไมซินเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ (Jafaryet al., 2014) อย่างไรก็ตามการใช้ยานี้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานๆ จะทำให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ ได้แก่ การเกิดพิษต่อหู (Ototoxicity) พิษต่อตับ (Hepatotoxicity) พิษต่อตา (Retinol toxicity) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดพิษต่อไต (Nephrotoxicity) (McDonald et al., 1986; Ali, 1995; Sivachandran and Hariharan, 2013; Dong et al., 2015) จากการศึกษาพบว่ายาเจนทาไมซินจะสะสมอยู่ในส่วนของเซลล์ของท่อไตส่วนต้น (Renal proximal tubular cells) แล้วทำให้เกิดความเสียหายได้ โดยจะทำให้โครงสร้างของไตเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ไมโทคอนเดรีย และไลโซโซม ผิดปกติไปด้วย (Nagai et al., 2004) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการให้ยาเจนทาไมซินมีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลง และมีน้ำหนักไตที่เพิ่มขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินมีผลทำให้เกิดภาวะ Hypertrophy ของไต อย่างไรก็ตามเมื่อทำการให้เคอร์คิวมิน พบว่าค่าน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นและน้ำหนักไตลดลง แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินช่วยลดการเกิดภาวะ hypertrophy ของไตได้ (ภาพ 7 และ 8) สำหรับน้ำหนักที่ลดลงนั้นได้มีรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินจะเกิดกระบวนการฟอสโฟลิปีโดซิสที่เนื้อเยื่อไตชั้นนอก ทำให้มีการลดลงของ renal cortical Na^+ , K^+ -ATPase activity ซึ่งจะมีผลทำให้น้ำหนักหนูลดลง (Feldman et al., 1981; Kacawet et al., 1988) และการที่ให้เคอร์คิวมินแล้วทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากเคอร์คิวมินมีผลในการช่วยเพิ่มความอยากอาหาร ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเคอร์คิวมิน (Ammon and Wahl, 2001)

ความเป็นพิษต่อไตที่เกิดจากการให้ยาเจนทาไมซิน มีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่า BUN และครีเอตินินในเลือด มีการลดลงของค่าอัตราการกรองของไต ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นดัชนีบ่งบอกว่าไตมีทำงานที่ผิดปกติไป (Romero et al., 2009; Sawardekar and Patel, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินจะมีการเพิ่มขึ้นของค่า BUN และครีเอตินินในเลือด และมีการลดลงของค่าครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าอัตราการกรองของไต การให้เคอร์คิวมินสามารถช่วยแก้ไขความผิดปกติของการทำงานของไตได้ (ภาพ 9, 10, 11 และ 12) โดยจากการศึกษา

ก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินอาจมีผลต่อความสมบูรณ์ของ glomerular basement ซึ่งมักจะเกิดความเสียหายในโรคไตที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยยา adriamycin (Venkatesan et al., 2000; Rincon et al., 2004)

เนื่องจากยาเจนทาไมซินจะสะสมอยู่ในส่วนของเซลล์ของท่อไตส่วนต้น (Renal proximal tubular cells) แล้วทำให้เกิดความเสียหายจนทำให้โครงสร้างของไตและการทำงานของไตผิดปกติไป ซึ่งอาจจะมีผลกระทบต่อการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ซึ่งอยู่ที่บริเวณท่อไตส่วนต้นด้วย ซึ่งในการศึกษานี้ได้พบว่าการให้ยาเจนทาไมซินมีผลทำให้การทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ลดลง โดยดูจากการ uptake สาร ES ที่ลดลง (ภาพ 13) ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่บริเวณ membrane ของไตชั้นนอกซึ่งก็พบว่าลดลงด้วย (ภาพ 16) อย่างไรก็ตามความผิดปกติของการทำงานและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 จะลดลงได้เมื่อทำการให้เคอร์คิวมิน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายและการตายของท่อไต และทำให้เกิดการลดลงของอัตราการกรองที่ไตของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตจากยาเจนทาไมซิน (Mahmoud et al., 2014) ความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Servais et al., 2006) การเกิดกระบวนการ lipid peroxidation เป็นตัวบ่งชี้ในการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Jurczuk et al., 2004) โดยพบว่ายาเจนทาไมซินจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งจะให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation และทำให้มีระดับของ MDA เพิ่มขึ้น (Rajasekaran et al., 2005) ในขณะที่ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ GSH และ SOD (El-Zawahry et al., 2007) ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ยาเจนทาไมซินจะกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มการสร้าง H_2O_2 ในไมโทคอนเดรียของเนื้อเยื่อไตชั้นนอก ทำให้เกิดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเพิ่มขึ้น (Walker and Shah, 1999) อีกทั้งยังมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการที่มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นและมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลงทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษานี้ก็พบว่าหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซิน

จะมีระดับของ MDA เพิ่มขึ้น พร้อมกับมีการลดลงของระดับ GSH และ SOD อย่างไรก็ดีตามเมื่อให้ เคอร์คิวมินพบว่าจะมีระดับของ MDA ลดลง และมี ระดับ GSH เพิ่มขึ้น (ภาพ 14 และ 15) จากผล การทดลองแสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินสามารถลดการเกิด lipid peroxidation ได้เนื่องจากเคอร์คิวมินมี คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หลายๆการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถกำจัด hydroxyl radical, superoxide radical, singlet oxygen, nitrogen dioxide และ NO (Sreejayan and Rao, 1997; Ruby et al., 2005 and Sharma et al., 2006) ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเกิดจากการมี phenolic OH group (Priyadarsini et al., 2003)

ในโรคไตวายเฉียบพลันและเรื้อรัง การเกิด ER stress จะทำให้เกิดการพัฒนาไปสู่การเกิดโรค ของ glomerular และ tubular ดังนั้นหลายการศึกษาจึงแสดงให้เห็นว่าเป้าหมายของการรักษา คือ การลดการเกิด ER stress (Inagi, 2009) ซึ่งจากการศึกษาในเนื้อเยื่อของไตที่ได้ยาเจนทาไมซินจะมี การเพิ่มขึ้นของ cleaved caspase 12 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิด ER stress ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ เกิดการตายตามมาได้ (Peyrou et al., 2007) นอกจากนั้นยังพบว่าเจนทาไมซินยังเหนี่ยวนำให้เกิด ER stress โดยจะพบการลดลงของ GRP78 และเพิ่มขึ้นของ calpain2 และ cleaved caspase7 เนื่องจาก ER stress เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น caspase หลายๆตัว โดยเฉพาะ caspase 12, cleaves procaspase 9 ซึ่งจะไปกระตุ้น procaspase 3 ในสภาวะที่มีการเกิด ER stress การกระตุ้น proapoptotic BAX และ BAK ที่บริเวณ ER membrane จะเป็นสาเหตุให้เกิดการปล่อย Ca^{2+} ออก จาก ER เป็นผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ในไซโตซอลส่งผลกระตุ้นต่อ calpain และ caspase 12 (Inagi, 2009) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การให้เคอร์คิวมินจะลดการแสดงออกของ calpain2 และ cleaved caspase3 และเพิ่มการแสดงออกของ GRP78 (ภาพ 17) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็น ว่า ER stress ที่เหนี่ยวนำด้วยเจนทาไมซินสามารถลดการเกิดได้โดยการให้เคอร์คิวมิน

การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่าเกี่ยวข้องกับ Bax และ Bcl-2 (Yang et al., 2001) โดย Bcl-2 จะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Huang et al., 2000) นอกจากนั้นยังพบว่า caspase 3 มีบทบาทสำคัญในการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดย caspase

3 จะไปกระตุ้น cytochrome c (Liu et al., 1996) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์ที่ได้รับยาเจนทาไมซินจะมีการเพิ่มขึ้นของ Bax (Servais et al., 2006) และ caspase 3 (Tabuchi et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินจะมีการเพิ่มขึ้นของ Bax, cleaved caspase 3 และ cytochrome c ในขณะที่มีการลดลงของ Bcl-2 แสดงให้เห็นว่าเจนทาไมซินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ของไตได้ การให้เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของไตดีขึ้น (ภาพ 18 และ 19)

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการให้เคอร์คิวมินสามารถป้องกันความผิดปกติของการทำงานและความเสียหายของไตในหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินได้ โดยกลไกในการป้องกันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้ง ER stress และยับยั้งกลไกการตายแบบอะพอพโทซิส

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายาเจนทาไมซินสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตได้ ซึ่งนำไปสู่การเกิดการบาดเจ็บ และเสียหายต่อไต โดยจะพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัว นอกจากนั้นไตยังมีการทำงานที่ผิดปกติโดยจะพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของค่า BUN และครีเอตินินในเลือด และมีการลดลงของค่าครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าอัตราการกรองของไต ซึ่งการเกิดความเสียหายต่อไตนี้ยังส่งผลต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ซึ่งจะพบที่บริเวณท่อไตส่วนต้น ที่เป็นบริเวณสำคัญที่มักเกิดความเสียหายจากยาเจนทาไมซิน โดยจะพบว่าหนูที่ได้รับยาเจนทาไมซินจะมีการลดลงของการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 โดยจะพบว่าจะมีค่าการ uptake สาร ES ที่ลดลงซึ่งการลดลงของการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 จะเกิดร่วมกับการมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ที่บริเวณ membrane ลดลงด้วย ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความผิดปกติเหล่านี้ ได้แก่ ภาวะเครียดออกซิเดชัน ER stress และการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันดูได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับ MDA และการลดลงของระดับ GSH มากกว่านั้นเจนทาไมซินยังเหนี่ยวนำให้เกิด ER stress ซึ่งจะแสดงจากการเพิ่มขึ้นของ calpain2, cleaved caspase7 และการลดลงของ GRP78 และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งจะแสดงจากการเพิ่มขึ้นของ Bax, cleaved caspase 3 และ cytochrome c ในขณะที่มีการลดลงของ Bcl-2 เคอร์คิวมินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดการเกิดความเป็นพิษต่อไตได้ โดยพบว่าจะไปมีผลช่วยการทำงานของไตโดยจะไปมีผลลดระดับ BUN และครีเอตินินในเลือด เพิ่มค่าครีเอตินินในปัสสาวะ และค่าอัตราการกรองของไต นอกจากจะมีผลช่วยการทำงานของไตแล้ว ยังมีผลช่วยให้การทำงานของไตและการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 อีกด้วย ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องจะเกิดจากการที่เคอร์คิวมินมีผลลดภาวะเครียดออกซิเดชันและเพิ่มการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะมีการลดลงของระดับ MDA และเพิ่มขึ้นของระดับ GSH ลดการเกิด ER stress โดยจะมีการลดลงของ calpain2, cleaved caspase7 และการเพิ่มขึ้นของ GRP78 ลดการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยจะมีการลดลงของ Bax, cleaved caspase 3 และ cytochrome c และมีการเพิ่มขึ้นของ Bcl-2

เอกสารอ้างอิง

- Akarawut W, Smith DE. Competitive inhibition of p-aminohippurate transport by quinapril in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1998; 26: 269–287.
- Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol.* 1995; 26: 1477–1487.
- Ali BH., Wabel N.AL., Mahmoud O., Mousa H.M., Hashad M. 2005. Curcumin has a palliative action on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Fund.Clin.Pharmacol.* 2005; 19: 473- 477.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol Pharm.* 2007; 4: 807-18.
- Arjinajarn P, Srimaroeng C, Chatsudthipong V, Lungkaphin A. Decreased renal organic anion transporter 3 expression in type 1 diabetic rats. *Am J Med Sci.* 2013
- AvdagiĆ N, CosoviĆ E, Nakas-IĆindiĆ E, MornjakoviĆ Z, ZaciragiĆ A, HadzoviĆ-Dzuvo A. *Spirulina platensis* protects against renal injury in rats with gentamicin-induced acute tubular necrosis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2008; 8: 331-336.
- Bae WK, Lee J, Park JW , Bae EH , Ma SK , Kim SH , Kim SW . Decreased Expression of Na^+/K^+ -ATPase, NHE3, NBC1, AQP1 and OAT in Gentamicin-induced Nephropathy. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2008; 12: 331-336.
- Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacological Research.* 2010; 62: 179–186.
- Banday AA, Farooq N, Priyamvada S. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sci.* 2008; 82: 450–459.
- Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol.* 2001; 59: 1277-86.

- Chambers HF. (2001). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. In Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (Eds.), *The Aminoglycosides*. New York, NY: The McGraw-Hill companies, pp.1219-1238.
- Cohly HHP, Taylor A, Angel MF, Salahudeen AK. Effect of turmeric, tumerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 49-54.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo Serraino L.I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J of Pharm*. 2002; 450: 67–76.
- Edson RS, Terrell CL. The aminoglycosides. 3. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 519–528.
- El-Ashmawy IM, El-Nahas AF, Salama OM. Grape seed extract prevents gentamicin-induced nephrotoxicity and genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 99: 230-6.
- Farombi EO, Ekor M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44: 1443-8.
- Fong KL, McCay PB, Poyer JL, Keele BB, Misra H. Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J Biol Chem*. 1973; 248: 7792-7.
- Guyton AC and Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier, Philadelphia: Saunders. 11th ed : 2011; 308–309.
- Gyselynck AM, Forrey A, Cutler R. Pharmacokinetics of gentamicin: Distribution and plasma and renal clearance. *J Infect Dis*. 1971; 124: 70-6.
- Hasegawa M, Kusuvara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H, Sugiyama Y. Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 300: 746–753.
- Hatala R, Dinh T, Cook DJ. Once-daily aminoglycoside dosing in immunocompetent adults. *Ann of Intern Med*. 1996; 124: 717-725.
- Holzinger H, Wanner C, Galle J, Gekle M. Downregulation organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F1599–F1605.

- Jariyawat S, Sekine T, Takeda M, Apiwattanakul N, Kanai Y, Sophasan S, Endou H. The interaction and transport of beta-lactam antibiotics with the cloned rat renal organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 290: 672–677.
- Kacew S, Bergeron MG. Pathogenic factors in aminoglycoside induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett*. 1990; 51: 241–259.
- Klastersky J, Hensgens C, Henri A, Daneau D. Comparative clinical study of tobramycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974; 5: 133–138.
- Kopple JD, Ding H, Letoha A, Ivanyi B, Qing DP, Dux L, Wang HY, Sonkodi S. L-carnitine ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 2122-2131.
- Kumar C, Himabindu M, Jetty A. Microbial Biosynthesis and Applications of Gentamicin: A Critical Appraisal. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008; 28: 173-212.
- Kumar KV, Naidu MUR, Shifow AA and Ratnakar KS. Probucol protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian J of Pharmacol*. 2000; 32:108–113.
- Kunchandy E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharmaceu*. 1990; 58: 237–240.
- Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem*. 1999; 274: 13675-80.
- Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 1998; 27: 23-7.
- Lauren G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1990; 40: 2383–2392.
- Lee KE, Kim EY, Kim CS, Choi JS, Bae EH, Ma SK, Kim KK, Lee JU, Kim SW. Macrophage-stimulating protein attenuates gentamicin-induced inflammation and apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434: 527-533.
- Leehey DJ, Braun BI, Tholl DA, Chung LS, Gross CA, Roback JA, Lentino JR. Can pharmacokinetic dosing decrease nephrotoxicity associated with aminoglycoside therapy. *J Am Soc*. 1993; 4: 81–90.

- Li S, Duan P, You G. Regulation of human organic anion transporter 1 by ANG II: involvement of protein kinase Calpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E378-83.
- López-Novoa JM, El-Mir MY. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int.* 2010; 77: 861–869.
- Luft FC. Gentamicin as gene therapy. Clinical implications. 2002; 80: 543-544.
- Martinez-Salgado C, Eleno N, Morales AI, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Lopez-Novoa JM. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int.* 2004; 65: 2161–2171.
- Martinez-Salgado C, Henandez-Lopez FJ, Novoa-Lopez JM. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 223: 86-98.
- Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H, Kohda Y, Tomita K, Inui K, Saito H. Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute [corrected] renal failure. *Kidney Int.* 2007; 71: 539-47.
- Mattew TH. Drug-induced renal disease. *Med J Australia.* 1992; 156: 724–728.
- Mattson MP. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 1998; 21: 53-7.
- Miller DS. Protein kinase C regulation of organic anion transport in renal proximal tubule. *Am J Physiol.* 1998; 274: F156-64.
- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1003–1012.
- Monica Torres A, Mac Laughlin M, Muller A, Brandoni A, Anzai N, Endou H. Altered renal elimination of organic anions in rats with chronic renal failure. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1740: 29-37.
- Morales AI, Demaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arévalo M, Leverve X, Muthuraman A, Singla SK, Rana A, Singh A, Sood S. Reno-protective role of flunarizine (mitochondrial permeability transition pore inactivator) against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Yakugaku Zasshi.* 2011; 131: 437–443.

- Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 866-74.
- Nagai J. and Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab.Pharmacokinet*. 2004; 19:159–170.
- Nii-Kono T, Iwasaki Y, Uchida M, Fujieda A, Hosokawa A, Motojima M, Yamato H, Kurokawa K, Fukagawa M. Indoxyl sulfate induces skeletal resistance to parathyroid hormone in cultured osteoblastic cells. *Kidney Int*. 2007; 71: 738-43.
- Nitha B. and Janardhanan KK. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 3193-3199.
- Parsons PP, Garland HO, Harpur ES. Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 570–576.
- Perri D, Ito S, Rowsell V, Shear NH. The kidney--the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *Can J Clin Pharmacol*. 2003; 10: 17-23.
- Peyrou M, Hanna EP, Cribb EA. Cisplatin, Gentamicin, and p-Aminophenol Induce Markers of Endoplasmic Reticulum Stress in the Rat Kidneys. *Toxicological sciences*. 2007; 99: 346–353.
- Poormoosavi SM, Behmanesh MA, Najafzadeh H. Effect of cimetidine on gentamicin-losartan induced -nephrotoxicity in rats. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2010; 4: 341-345.
- Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem*. 1992; 111: 117–124.
- Reddy AC, Lokesh BR. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann Nutr Met*. 1994; 38: 349–358.

- Rincon J, Romero M, Viera N, Pedreanea A, Mosquera J. Increased oxidative stress and apoptosis in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Int J Exp Pathol*. 2004; 85: 25-33.
- Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, Wanner C, Galle J, Gekle M. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F1599-605.
- Sekine T, Cha SH, Endou H : The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Eur J Physiol*. 2000; 440: 337-350.
- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem*. 1997; 272: 18526–18529.
- Senekjian HO, Knight TF, Weinman EJ. Micro puncture study of the handling of gentamicin by the rat kidney. *Kidney Int*. 1981; 19: 416-23.
- Servais H, Jossin Y, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 1213–1221.
- Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, Van der Essen G, Van Bambeke F, Tulkens P, Paule Mingeot-Leclercq M. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *ToxicolApplPharmacol*. 2005; 206: 321–333.
- Smith AM and Schnellmann GR. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2012; 96: 32–37.
- Swan SK. Aminoglycoside nephrotoxicity: review. *Semin Nephrol*. 1997; 17: 27-33.
- Sweet DH. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 204: 198-215.
- Takeda M, Tojo A, Sekine T, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Role of organic anion transporter 1 (OAT1) in cephaloridine (CER)-induced nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1999; 56: 2128–2136.

- Torres AM. Renal elimination of organic anions in cholestasis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 6616-21.
- Trollfors B, Alestig K, Krantz I, Norrby R. Quantitative nephrotoxicity of gentamicin in nontoxic doses. *J Infect Dis*. 1980; 141: 306–309.
- Trujillo J, Chirino IY, Molina-Jijón E, Andérica-Romero CA, Tapia E, Pedraza Chaverrí A. Renoprotective effect of the anti oxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology*. 2013; 1 :448–456.
- Turnidge J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin N Am*. 2003; 17: 503-28.
- Uwai Y, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI. Interaction and transport of thiazide diuretics, loop diuretics, and acetazolamide via rat renal organic anion transporter rOAT1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 295: 261–265.
- Wright SH, Dantzler WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev*. 2004; 84: 987-1049.
- Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail*. 1995; 17: 21–26.
- Zhang Q, Hong M, Duan P, Pan Z, Ma J, You G. Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C-regulated trafficking through a dynamin- and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2008; 283: 32570-9.
- Zhou F, Hong M, You G. Regulation of human organic anion transporter 4 by progesterone and protein kinase C in human placental BeWo cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293: E57-61.

Output จากโครงการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ

1. นำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการรักษาและป้องกันภาวะไตวายเฉียบพลันจากการได้รับยาที่มีพิษต่อไต ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญต่อสุขภาพของประชากรไทยและนับวันจะเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นปัญหาทั้งทางสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประเทศ
2. นำมาประยุกต์และพัฒนารักษาการใช้สารสกัดจากพืชธรรมชาติเพื่อช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อนทางไตที่เกิดจากการได้รับยาที่มีพิษต่อไตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลโดยใช้พืชธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศได้อย่างคุ้มค่าและมีประโยชน์ที่สุด
3. สามารถนำความรู้พื้นฐานที่ได้มาทำการศึกษาต่อยอดในเชิงลึกต่อไปในอนาคตในการพัฒนาศักยภาพและคุณสมบัติของเคอร์คิวมินก่อนที่จะใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมต่อไป
4. สามารถนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมทั้งระดับชาติ นานาชาติและ/หรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ อีกทั้งผลการวิจัยที่ได้ยังสามารถนำไปเผยแพร่สู่ชุมชนและสู่ระบบสาธารณสุขพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการส่งเสริมสุขภาพของประชาชน
5. ได้ฝึกฝนและสร้างบุคลากรให้มีศักยภาพในการทำงานวิจัย และสามารถสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยและนักวิชาการได้

ผลงานตีพิมพ์ที่คาดว่าจะได้จากโครงการ

ผู้วิจัยคาดว่าจะนำเสนอบทความในวารสาร PLOS ONE impact factor (2015/2016) เท่ากับ 3.057 โดยขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อตีพิมพ์บทความ