

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลงของ  
เยื่อผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร



นายวศิน มนุประเสริฐ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

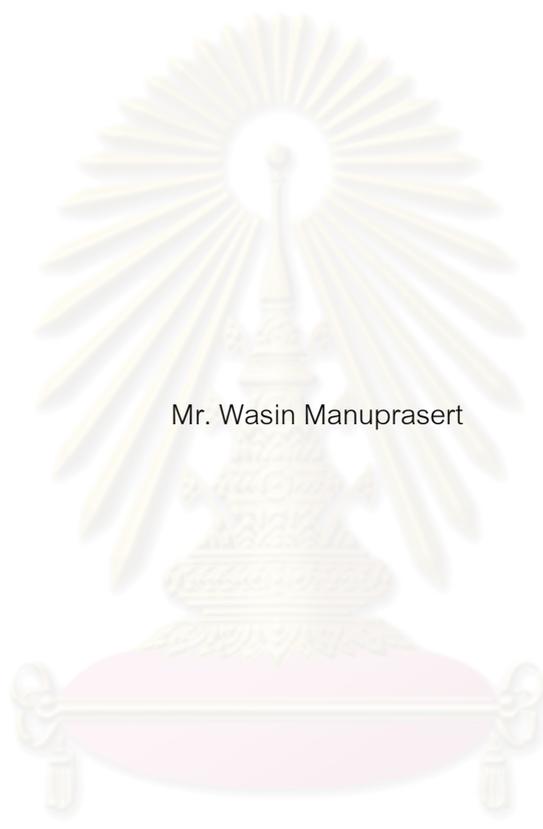
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CORRELATION OF HYPOXIA AND PERITONEAL MORPHOLOGICAL CHANGES IN  
CAPD CONDITION



Mr. Wasin Manuprasert

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลง  
ของเยื่อผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้อง  
อย่างถาวร

โดย

นายวศิน มนุประเสริฐ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์

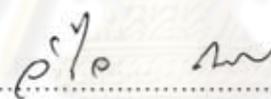
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

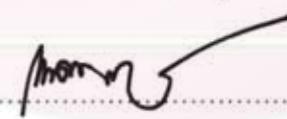
อาจารย์ นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม

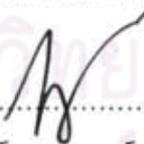
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

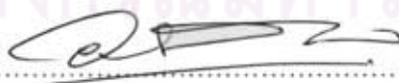
  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพร วงศ์อมรรวม)

วศิน มนุประเสริฐ : ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อ  
ผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร (CORRELATION OF  
HYPOXIA AND PERITONEAL MORPHOLOGICAL CHANGES IN CAPD  
CONDITION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.นพ.เดลินงค์ดี กาญจนบุษย์, อ. ที่  
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.นพ.กฤษณพงศ์ มโนธรรม, 117 หน้า.

**วัตถุประสงค์** เนื่องจากในผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวรมา  
เป็นระยะเวลาหน้านั้น พบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้อง ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้เป็นการ  
ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้อง โดยทำการศึกษา  
ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

**วิธีการศึกษา** การศึกษาในสัตว์ทดลองได้แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่  
ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose และกลุ่ม hypoxia-mimic โดยทำการศึกษาเป็น  
เวลา 12 สัปดาห์ แล้วทำการประเมินทางสัณฐานของเยื่อผนังช่องท้อง นับจำนวนหลอดเลือดที่  
พบ และศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia ส่วนการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น ได้ทำการเพาะเลี้ยง  
mesothelial cells แล้วแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงออกเป็น 13 กลุ่ม นำเซลล์ไปบ่มกับน้ำยาฟอกไตทาง  
ช่องท้องและองค์ประกอบของน้ำยาจากนั้นทำการศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia

**ผลการศึกษา** จากการประเมินทางสัณฐานของเยื่อผนังช่องท้องนั้นพบว่าในหนูกลุ่มที่  
ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นมีจำนวนหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น พบการหนาตัวของชั้น  
submesothelium พบการหลุดลอกของ mesothelial cells และพบการเกิดภาวะ hypoxia เมื่อ  
เทียบกับกลุ่มควบคุม และในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น  
พบการเกิดภาวะ hypoxia ซึ่งภาวะ hypoxia นี้เป็นผลอันเนื่องมาจากการสะสมขององค์ประกอบ  
ต่าง ๆ ในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง โดยองค์ประกอบหลักในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ส่งผลให้  
เกิดภาวะ hypoxia ได้แก่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงและสารในกลุ่ม GDPs

**สรุปผลการศึกษา** น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ  
hypoxia ซึ่งภาวะ hypoxia นี้เป็นผลอันเนื่องมาจากการสะสมขององค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำยา  
ฟอกไตทางช่องท้องโดยองค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด  
ภาวะ hypoxia มากที่สุดนั้นคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงและสารในกลุ่ม GDPs

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต..... วศิน มนุประเสริฐ.....  
ปีการศึกษา..... 2553..... ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5074826730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : MESOTHELIAL CELLS / HYPOXIA / PERITONEUM / PDF / HIF-1 $\alpha$

WASIN MANUPRASERT : CORRELATION OF HYPOXIA AND PERITONEAL MORPHOLOGICAL CHANGES IN CAPD CONDITION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. TELERNGSAK KANJANABUCH, M.D., THESIS CO-ADVISOR : KRISSANAPONG MANOTHAM, M.D., 117 pp.

**Objective:** Peritoneal injury and neovascularization were results from continuous exposure of peritoneum to peritoneal dialysis fluid (PDF). We aimed to investigate the correlation of hypoxia and PDF on peritoneal injury and angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.

**Methods:** Sprague-Dawley rats were subjected to twice-daily injections with normal saline (NS), 4.25 % dextrose PDF and hypoxia mimic. After 12-wk injection, morphologies of peritoneum, vascular number and hypoxia (HIF-1 $\alpha$  and hypoxyprobe) were determined. In cell culture, the mesothelial cells were incubated with PDF and PDF components. Hypoxic mesothelial cells were assessed by the HIF-1 $\alpha$  and positive hypoxyprobe staining consequently.

**Results:** Vascular number and submesothelial thickness increased significantly while mesothelial cells disappeared in rats exposed to PDF that related to hypoxia. HPMCs cultured with PDF showed the positive results to HIF-1 $\alpha$  and hypoxyprobe immunostaining. All the above abnormalities were results from additive effects of PDF component especially high glucose concentration and present of GDPs in the solution

**Conclusion:** PDF-induced peritoneal morphological changes by the additive effects of PDF component via hypoxia pathway.

Field of Study :..... Medical Science..... Student's Signature ..... *wasin manuprasert* .....  
Academic Year :..... 2010..... Advisor's Signature ..... *Assoc. Prof. Telerngsak Kanjanabuch* .....  
Co-Advisor's Signature ..... *Krisnanapong Manotham* .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะเริ่มต้นและสำเร็จไม่ได้ ถ้าปราศจากความช่วยเหลือ แนะนำ สั่งสอน จาก รศ. นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ และ อ.นพ. กฤษณพงศ์ มโนธรรม

ขอขอบพระคุณนายปรีชา เรืองเวชวรชัย นางสาวจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และนางสาววรรณิ วัฒนเสริมกิจ ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้และเทคนิคทางด้านพยาธิวิทยา อำนวยความสะดวกและ ช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ นายโสภณ สุวรรณโสภณ ผู้ให้ความรู้ด้านเทคนิค การถ่ายภาพ ที่สามารถนำมาใช้ในการทำวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ นายพงศ์ศักดิ์ พันธุ์สิน และนางอาภา วรรณนวะ ที่อำนวยความสะดวก และช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ นางสาว การดา บุตรหง่า นางสาว อมรรัตน์ มาช่วย และ เจ้าหน้าที่ บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวก ตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ นางสาวสิริกุล กาญจนบุษย์ นางสาวพรสุรี พงษ์สุชาติ นายเมธี ศรีประพันธ์ นางมารศรี พันธุ์ไพศาล นางสาวรัชชา สวัสดิ์ นางสาวนัฐนรี คำเกษ นางสาวพรทิพย์ สุวรรณ นวลทอง นางสาวมัตติกา เกียรติวระโทก นางสาววิไลพร อัมพรธน และเพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและ คอยช่วยเหลือเสมอ

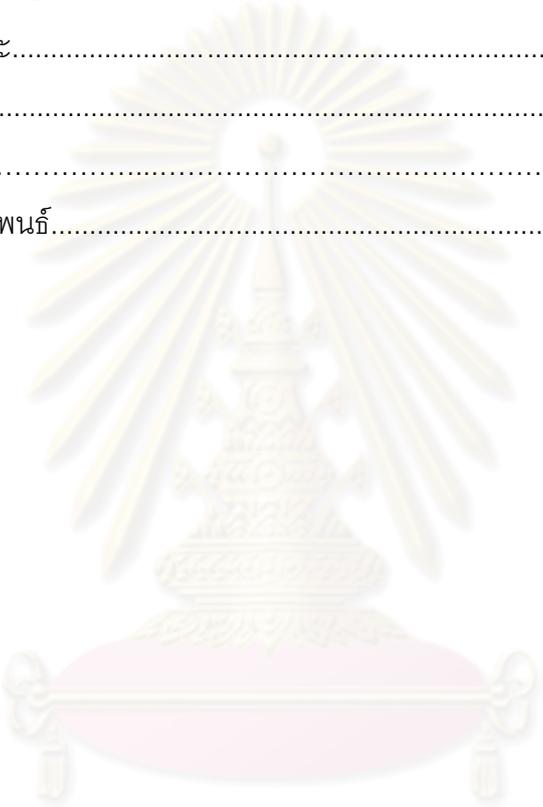
สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว “มณูประเสริฐ” ที่เลี้ยงดู ให้โอกาส สนับสนุน และ เป็น กำลังใจมาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2. สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4. คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	3
1.5. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1. Peritoneum anatomy.....	4
2.2. Ultrastructure of peritoneum.....	5
2.3. Peritoneal anatomical changes during peritoneal dialysis.....	11
2.4. Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ).....	21
2.5. Hypoxia induced fibrosis and angiogenesis.....	24
3. วิธีการวิจัย.....	26
3.1. รูปแบบการวิจัย.....	26
3.2. วิธีการวิจัย.....	26
3.3. การสังเกตและการวัด.....	30
3.4. การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	31
3.5. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
4. ผลการวิจัย.....	32
4.1. น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องก่อให้เกิดภาวะ hypoxia.....	32

บทที่	หน้า
4.2. องค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ก่อให้เกิดภาวะ hypoxia.....	43
4.3. น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่ออับผนังช่องท้องโดย ผ่านทางการเกิดภาวะ hypoxia.....	70
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	79
5.1. อภิปรายผลการวิจัย.....	79
5.2. สรุปผลการวิจัย.....	81
5.3. ข้อเสนอแนะ.....	81
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงปริมาณเซลล์ตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ.....	17



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดง anterior view of internal abdominal organ (visceral peritoneum) และ posterior view of abdominal wall (posterior parietal peritoneum).....	4
2. แสดงเยื่อช่องท้องด้านตัดขวาง ทั้ง parietal peritoneum และ visceral peritoneum.	5
3. แสดงลักษณะของ normal peritoneum.....	5
4. แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell .....	7
5. แสดง subdiaphragmatic ของท่อน้ำเหลือง.....	11
6. แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของเยื่อผนังช่องท้อง.....	12
7. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในรายที่เป็น uremia .....	12
8. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในผู้ป่วย CAPD .....	13
9. แสดงเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 40 วัน.....	14
10. แสดงให้เห็นถึงการหลุดลอกของ mesothelial cells ออกมาในช่องท้อง.....	14
11. แสดง mesothelial cells ที่ตรวจพบในน้ำยาล้างไต.....	14
12. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ.....	15
13. แสดง mesothelial cells ในเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 25 วัน.....	15
14. แสดงลักษณะเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 14 เดือน.....	15
15. แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ.....	16
16. แสดงปริมาณ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ.....	17
17. แสดงการเกิดกลไกพังผืดในรายที่ทำการล้างไตทางช่องท้อง.....	19
18. แสดงระดับ VEGF จากน้ำที่ถ่ายจากผู้ป่วย CAPD ที่มีลักษณะ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ.....	21
19. แสดงระดับ VEGF ในซีรัมของผู้ป่วย.....	21
20. โครงสร้างโมเลกุลของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1).....	23
21. แสดงการทำงานของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1).....	24
22. แสดง target genes ของ HIF-1.....	24
23. แสดงขั้นตอนในการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง.....	28
24. แสดงขั้นตอนในการศึกษาในสัตว์ทดลอง.....	30

รูปที่	หน้า
25. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ในเยื่อ ผนังช่องท้อง (X100).....	33
26. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ในเยื่อ ผนังช่องท้อง (X400).....	33
27. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลในเยื่อผนังช่องท้อง ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อสัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง.....	33
28. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ในเยื่อผนังช่อง ท้อง ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X100).....	34
29. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ในเยื่อผนังช่อง ท้อง ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X400).....	34
30. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลในเยื่อผนังช่องท้อง ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อสัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง.....	35
31. แสดงผลน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	36
32. แสดงผลน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	37
33. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง.....	37
34. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X100).....	38
35. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X400).....	38
36. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง.....	38
37. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มชั้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	39
38. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มชั้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	40

รูปที่	หน้า
39. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	40
40. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X100).....	41
41. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X400).....	42
42. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	42
43. แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	45
44. แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	46
45. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	46
46. แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X100).....	47
47. แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400).....	48
48. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	48
49. แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	49
50. แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	50
51. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	50

รูปที่	หน้า
52. แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×100).....	51
53. แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×400).....	52
54. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	52
55. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (×400).....	53
56. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (×400).....	54
57. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (×400).....	54
58. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L).....	55
59. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L).....	56
60. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L).....	57
61. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×400).....	58
62. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×400).....	58
63. แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×400).....	59

รูปที่	หน้า
64. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่างๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L).....	59
65. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่างๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L).....	60
66. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่างๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L).....	61
67. แสดงผล ของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	62
68. แสดงผล ของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	63
69. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรด.....	63
70. แสดงผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X100).....	64
71. แสดงผล ของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400).....	64
72. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรด...	65
73. แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X100).....	66
74. แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$ ใน mesothelial cells (X400).....	67
75. แสดงร้อยละของความเข้มข้นในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MGO.....	67
76. แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X100).....	68

รูปที่	หน้า
77. แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400).....	69
78. แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MGO.....	69
79. แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ mesothelial monolayer จาก anterior surface ของตับโดยวิธี liver imprint (X200).....	71
80. แสดงความหนาแน่นของ nuclei of mesothelial cells ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic.....	71
81. แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (X100).....	72
82. แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (X400).....	72
83. แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จาก abdominal parietal peritoneum ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic.....	72
84. แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (X200).....	73
85. แสดงจำนวนของหลอดเลือดที่ติด lectin ต่อพื้นที่ ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic..	74
86. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ mesothelial monolayer จาก anterior surface ของตับโดยวิธี liver imprint (X200).....	74
87. แสดงความหนาแน่นของ nuclei of mesothelial cells ในหนูที่รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic.....	75
88. แสดง ผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (x100).....	76
89. แสดง ผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (x400).....	76
90. แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จาก abdominal parietal peritoneum ในหนูที่รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic.....	76
91. แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (X200).....	77

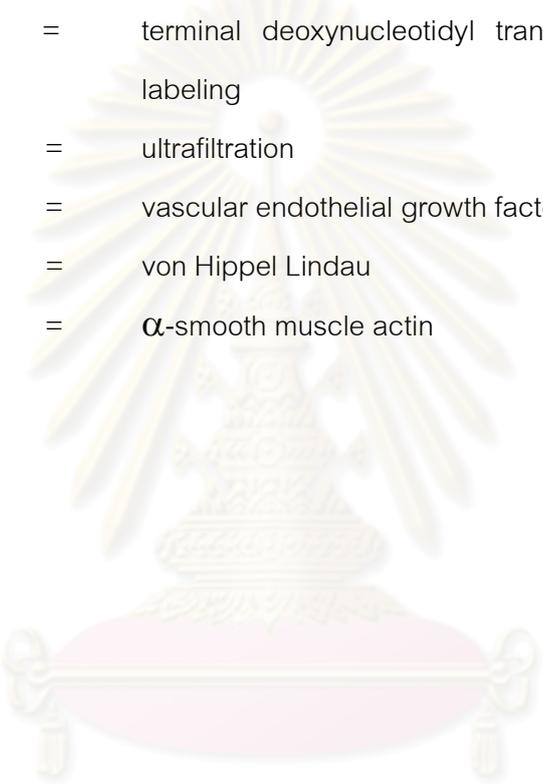
รูปที่	หน้า
92. แสดงจำนวนของหลอดเลือดที่ติด lectin ต่อพื้นที่ ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic.....	78
93. แสดงการเกาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อ.....	98
94. แสดงการ incubate ชิ้นเนื้อใน shaker waterbath.....	98
95. แสดงการปั่นชิ้นเนื้อ.....	99
96. แสดงการคืบชิ้นเนื้อออกจาก centrifuge tube.....	99
97. แสดงการเทส่วนบนทิ้ง.....	99
98. แสดงการดูดเซลล์ใส่ลงใน culture dish .....	100
99. แสดงลักษณะของ mesothelial cells ที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	101
100. แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor).....	106
101. แสดงการฝังเนื้อเยื่อ.....	106
102. แสดงการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome.....	107
103. แสดงหลักการของวิธี immunocytochemistry .....	109



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Alb	=	albumin
ARNT	=	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH	=	basic-helix-loop-helix
CAPD	=	continuous ambulatory peritoneal dialysis
CA125	=	cancer antigen 125
CTAD	=	C-terminal transactivation domain
CTGF	=	connective tissue growth factor
ECM	=	extracellular matrix
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	=	epithelial mesenchymal transition
ESRD	=	end-stage renal disease
FIH	=	asparaginyl hydroxylase
GDPs	=	glucose degradation products
HIF-1 $\alpha$	=	hypoxia inducible factor-1 $\alpha$
HPMC	=	human peritoneal mesothelial cells
HRE	=	hypoxia responsive element
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase
JNK	=	Jun N-terminal kinase
LDH	=	lactate dehydrogenase
MESO	=	mesothelial cell
MGO	=	methylglyoxal
MMPs	=	matrix metalloproteinase
NTAD	=	N-terminal transactivation domain
ODD	=	oxygen-dependent degradation
PAI-1	=	plasminogen activator inhibitor-1
PAS	=	Per-Arnt-Sim
PD	=	peritoneal dialysis
PHD-2	=	prolylhydroxylase-2
PI	=	propidium iodide

pO <sub>2</sub>	=	partial pressure of oxygen
RAGE	=	advanced glycation end products receptor
RER	=	rough endoplasmic reticulum
TAD	=	transactivation domain
TEM	=	transmission electron microscope
TGF-β	=	transforming growth factor beta
TIMPs	=	tissue inhibitor of metalloproteinase
TUNEL	=	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UF	=	ultrafiltration
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
VHL	=	von Hippel Lindau
α-SMA	=	α-smooth muscle actin



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเป็นภาวะที่ไตเสื่อมหน้าที่อย่างถาวรไม่สามารถรักษาหรือแก้ไขให้ไตกลับคืนมาทำหน้าที่ได้ดังเดิม ก่อให้เกิดการคั่งของน้ำ เกลือแร่ และของเสียภายในร่างกายของผู้ป่วย ส่งผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ผู้ป่วยเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับการรักษาทดแทนไตเพื่อชะลอการเสื่อมของไตและพองตัวของไตเองไว้ ในการรักษาทดแทนไตที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน คือ การรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร (continuous ambulatory peritoneal dialysis: CAPD) การรักษาทดแทนไตรูปแบบนี้อาศัยหลักการซึมผ่าน (diffusion) ในการขจัดเกลือแร่ส่วนเกิน และของเสียต่าง ๆ ออกจากร่างกายผ่านทางเยื่อบุผนังช่องท้อง (peritoneal membrane) โดยของเสียที่มีความเข้มข้นสูงภายในเลือดของผู้ป่วยจะแพร่ผ่าน peritoneal membrane ออกมายังน้ำยาฟอกไตที่บริสุทธิ์ (dialysis solution) ปรากฏของเสียและออสโมลิตีที่คั่งจากน้ำตาออสโมลิตี ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากร่างกายของผู้ป่วย (ultrafiltration: UF) อย่างไรก็ตามพบว่าเยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วยส่วนใหญ่เมื่อทำการล้างไตทางช่องท้องอย่าง ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานนั้นเสื่อมสมรรถภาพในการขับน้ำลง (UF failure) และเมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพยาธิวิทยาเยื่อบุผนังช่องท้องของผู้ป่วย CAPD จะพบการเปลี่ยนแปลง [1-7] ดังนี้คือ มีการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผนังช่องท้องเป็นบริเวณกว้างขวาง (extensive mesothelial denudation) มีการหนาตัวของชั้น submesothelial compact collagenous zone (submesothelial thickening) และผนังของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำในชั้น loose connective tissue พบการเพิ่มจำนวนชั้นของ vascular basement membrane (reduplication of capillary และ arteriolar basement membrane) ก่อให้เกิดการอุดตันการไหลเวียนของเลือดภายในหลอดเลือด (luminal narrowing and obliteration) นำมาซึ่งการสร้างหลอดเลือดฝอยใหม่ (neovascularization) จำนวนมากที่มีผนังไม่แข็งแรงต่อการรั่วซึมของพลาสมา

ลักษณะพยาธิสภาพของช่องท้องในผู้ป่วย CAPD ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับพยาธิสภาพที่พบในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวาน กล่าวคือในไตของผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานนั้นพบการสะสมของ extracellular matrix (ECM) ในบริเวณ glomerular basement membrane (GBM) บริเวณ mesangium และบริเวณ tubular basement membrane (TBM) ส่งผลให้ในบริเวณที่กล่าวมานั้นมีความหนาเพิ่มมากขึ้น และในระยะท้ายจะพบ

glomerulosclerosis และ interstitial fibrosis ตามลำดับ [8-10] ร่วมกับพบการหนาตัวของผนังหลอดเลือด arteriole ในลักษณะของ hyaline arteriosclerosis ภายในไตอีกด้วย

เมื่อน้ำยา dialysis นั้นถูกออกแบบมาเพื่อใช้สำหรับการล้างไต ทางช่องท้อง อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำยานี้มีคุณสมบัติหลายประการที่ไม่ปลอดภัยต่อเยื่อผนังช่องท้องได้แก่ 1) มี osmolality (358-510 mOsm/kg) 2) มีน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ย 10-40 เท่า เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมา 3) มีความเป็นกรด (pH~ 5.2-5.4) 4) มีอนุพันธ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของน้ำตาลกลูโคสสูง (reactive dicarbonyl compound : RCO) เชื่อว่าอนุพันธ์เหล่านี้เป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากสามารถจับกับกรดอะมิโนอิสระโดยไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic bonding) เกิดเป็น AGE (advance glycation end products) ที่ทนต่อการเมตาบอลิซึมของร่างกาย นำมาซึ่งการบาดเจ็บต่อเซลล์เยื่อผนังช่องท้องรวมทั้ง ก่อให้เกิดการหนาตัวของชั้น submesothelial compact collagenous zone (submesothelial thickening) และผนังของหลอดเลือดในเยื่อผนังช่องท้องของผู้ป่วย CAPD [12] ด้วยเหตุที่คณะผู้วิจัยพบการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักที่ตอบสนองต่อภาวะ hypoxia บนเยื่อผนังช่องท้องของสัตว์ทดลองที่มีการเสื่อมสมรรถภาพจากการล้างไตทางช่องท้อง คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า ภาวะ hypoxia มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้อง อย่างไรก็ตาม อีกทั้งยังเห็นว่าการวิจัยนี้จะนำซึ่งประโยชน์ในการหาวิธีป้องกันไม่ให้เยื่อผนังช่องท้องเสื่อมสมรรถภาพอันจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อผู้ป่วยที่ได้รับ การรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร

## 1.2 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

การเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวร นั้นเป็นผลเนื่องมาจากน้ำยาฟอกช่องท้องก่อให้เกิดภาวะ hypoxia

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1.3.1 เพื่อพิสูจน์ว่าการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องจากการรักษาทดแทนไตทางช่องท้องอย่างถาวรนั้นเป็นผลเนื่องมาจากน้ำยาฟอกช่องท้องทำให้เกิดภาวะ hypoxia โดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง

1.3.2 เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดในน้ำยาฟอกช่องท้องที่ส่งผลให้เกิดภาวะ hypoxia โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง

#### 1.4 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage renal disease, ESRD) หมายถึง ภาวะที่ไตสูญเสียการทำงานอย่างถาวร จนผู้ป่วยไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้หากไม่ได้รับการรักษาโดยการบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy, RRT)

การล้างไตทางช่องท้องอย่างต่อเนื่องด้วยตนเอง (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) หมายถึง การฟอกไตทางช่องท้องอย่างต่อเนื่องโดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำยาด้วยตัวผู้ป่วยเอง

เซลล์เยื่อผนังช่องท้อง (mesothelial cells) หมายถึง เซลล์ epithelium ที่บุเยื่อผนังหน้าท้อง

ภาวะ hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ (ภาวะปกติค่า  $pO_2$  ที่เซลล์โดยทั่วไปได้รับเฉลี่ยเท่ากับ 40 มิลลิเมตรปรอท) โดยให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย hypoxyprobe (pimonidazol)

#### 1.5 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

ทราบกลไกการเสื่อมของเยื่อผนังช่องท้องของผู้ป่วย

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

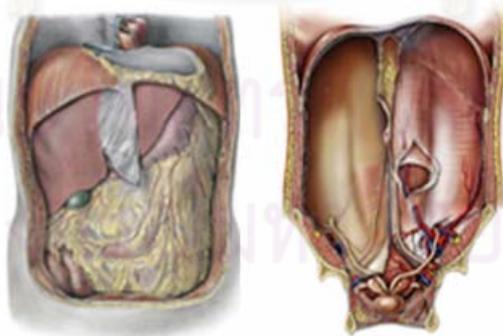
#### 2.1 Peritoneum anatomy

การล้างไตทางช่องท้อง เป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายทำโดยการใส่น้ำยาล้างไตไปในช่องท้อง เพื่อพอกเอาของเสียที่สะสมในร่างกาย และปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ [13] โดยเริ่มนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2519 และได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

องค์ประกอบพื้นฐานของช่องท้องที่สำคัญต่อการล้างไตทางช่องท้องมี 3 ประการ คือ

1. ระบบหลอดเลือด ที่หล่อเลี้ยงเยื่อผนังช่องท้อง
2. เยื่อผนังช่องท้องหรือ membrane ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเยื่อเลือกผ่าน
3. ระบบท่อน้ำเหลือง

ช่องท้องเป็นช่องว่างที่มีอาณาบริเวณล้อมรอบด้วยเยื่อผนังช่องท้อง (peritoneum) และเป็นช่องว่างที่อยู่ระหว่างอวัยวะภายในช่องท้อง โดยปกติจะเป็นช่องแคบ ๆ บรรจุของเหลวได้ 100-200 มิลลิลิตรแต่สามารถขยายตัวบรรจุของเหลวได้ 2-3 ลิตร ซึ่งคล้ายกับคุณสมบัติของช่องปอดที่เป็น potential space โดยทั่วไปเยื่อผนังช่องท้องจะมี 2 ส่วนที่สำคัญ คือ visceral peritoneum ซึ่งเป็นส่วนของ peritoneum ที่หุ้มส่วนของอวัยวะภายใน โดยคิดเป็นร้อยละ 90 ของเยื่อช่องท้องทั้งหมด และ parietal peritoneum ซึ่งเป็นส่วนของ peritoneum ที่บุบริเวณผนังโดยรอบของช่องท้อง โดยมีพื้นที่ประมาณร้อยละ 10 ของพื้นที่ทั้งหมดตามรูปที่ 1 และ 2 [14]



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

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



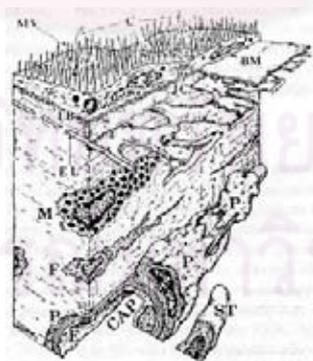
**รูปที่ 2:** แสดงเยื่อช่องท้องด้านตัดขวาง ทั้ง parietal peritoneum และ visceral peritoneum

## 2.2 Ultrastructure of peritoneum

ในการลำเลียงทางช่องท้อง เมื่อใสน้ำยาในช่องท้อง น้ำยาจะมีการกระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของช่องท้อง และมีการแลกเปลี่ยนของน้ำและสารต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของสารละลายในแต่ละส่วนคือในน้ำยาและหลอดเลือด โดยมีทั้งการแลกเปลี่ยนจากหลอดเลือดเข้าสู่ น้ำยา และมีการดูดกลับจากน้ำยาเข้าสู่หลอดเลือด โดยอาศัยเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของเยื่อช่องท้องเป็นตัวกลางสำคัญในกลไกเหล่านี้

โครงสร้างที่สำคัญของเยื่อช่องท้องประกอบด้วย 4 ระบบที่สำคัญ (รูปที่ 3) คือ

1. เซลล์เยื่อช่องท้อง (mesothelial cell)
2. เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (interstitial tissue)
3. ระบบหลอดเลือดฝอย (capillary system)
4. ระบบน้ำเหลือง (lymphatic system)



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

### 2.2.1 ชั้นเซลล์เยื่อช่องท้อง (Mesothelial layer)

ประกอบด้วย mesothelial cell [15] ในภาวะปกติที่เยื่อช่องท้องจะมีชั้น mesothelial cell 1 ชั้น [16] ซึ่งมี embryological derivation เดียวกันกับ endothelial cell ซึ่งพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นสามารถที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากเซลล์ที่มีรูปร่างแบน (flat cell) กลายเป็นรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยม (cuboidal cell) ที่มีคุณสมบัติของ mesenchymal cell ซึ่งเรียกว่าเกิด epithelial mesenchymal transition (EMT) ทำหน้าที่คล้ายกับ secretory cell และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ของ myofibroblast

ในภาวะปกติ mesothelial cell จะมีรูปร่างที่แตก ต่างกันในแต่ละตำแหน่งที่ แตกต่างกัน เช่น ที่บริเวณ parietal peritoneum จะมีลักษณะเป็นเซลล์แบนราบ (discoid flattened cell) มีความหนาประมาณ 2.5-3.0 ไมครอน มีปริมาณ cytoplasm น้อย ในขณะที่ บริเวณที่ปกคลุมรังไข่ และอวัยวะในช่องท้องจะมีลักษณะเป็น cuboidal cell [17] หรือที่บริเวณ เยื่อคลุมกระเพาะอาหารจะมีลักษณะเป็นส่วนของ transitional zone ฯลฯ โดยมีความหนาแน่น ของเซลล์ประมาณ  $10^9$  เซลล์ต่อ 1-2 ตารางเมตร ซึ่งที่ผิวเซลล์ จะมีกลุ่มของ microvilli ขนาด ประมาณ 0.08 ไมครอนและยาวประมาณ 2-3 ไมครอน กระจายในรูปแบบต่าง ๆ กันแล้ว แต่ ตำแหน่งของเซลล์

องค์ประกอบของเซลล์ ประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีลักษณะเป็นรูปรี สามารถพบ nuclei 2 อันได้บ่อย และ ลักษณะเด่นของเซลล์นี้คือ พบ vesicle อยู่มากไป ซึ่ง vesicle นี้จะมีบทบาทในการขนส่งสารจากทางด้าน peritoneal surface โดยอาศัยกลไก endocytosis mechanism นอกจากนี้พบ mitochondria ซึ่งมี rough endoplasmic reticulum (RER) อยู่มากไป ได้ทั่วไป สามารถพบ golgi apparatus ประมาณ 2-3 อัน รวมทั้ง lysosome ต่าง ๆ บางครั้ง สามารถพบ lipid inclusions ได้ 3-4 อัน โดยเฉพาะที่ส่วนยอดของเซลล์ และตรวจพบ lamellar bodies ได้บ่อยซึ่งเชื่อว่าเป็นที่เก็บของ lubricant phospholipids (ส่วนใหญ่ คือ phosphatidylcholine) โดยสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ และถูกขับออกไปยังผิวของเยื่อช่องท้อง รวมทั้งสามารถพบ lamellar bodies [18] บริเวณ microvilli และ mesothelial cell ได้บ่อยรวมทั้ง ใน macrophage

ส่วน microvilli ของ mesothelial cell มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.08-0.1 ไมครอน โดยมีความยาวประมาณ 2 ไมครอน ภายในจะมี fine filament ซึ่งส่วนใหญ่เป็น actin มีความหนาประมาณ 4 นาโนเมตร โดยมีความหนาแน่นในบริเวณต่าง ๆ ของเยื่อช่องท้องที่ แตกต่างกัน ซึ่ง microvilli นี้จะมีประจุลบ สามารถจับกับ phospholipid ชนิดต่าง ๆ เช่น phosphatidylcholine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine เป็นต้น มีบทบาททำให้ลดการเสียดสีระหว่างอวัยวะต่าง ๆ นอกจากนี้การที่เซลล์มี



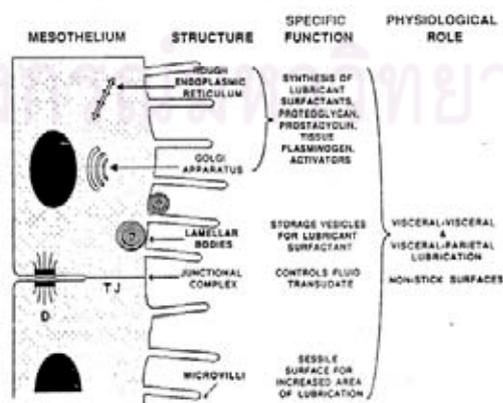
microvilli ยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนสารต่าง ๆ ระหว่างช่องท้องกับเซลล์อื่น ๆ และ หลอดเลือด และเป็นตัวกันเพื่อป้องกันการเกิด adhesion ต่อ peritoneum membrane ที่ได้รับ อันตราย ในขณะที่ส่วน cilia นั้นก็คล้ายกับที่พบในส่วนอื่น ๆ แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน

การเกาะติด กันของ mesothelial cell โดย tight junction ในรูปแบบของ desmosome โดยเฉพาะที่ส่วนนอกสุดและที่บริเวณ basal region เซลล์จะถูกยึดด้วย interdigitating process โดยประกอบด้วย glycoprotein ในกลุ่ม cadherin family ร่วมกับ actin filament และโปรตีน vinculin เซลล์บางตำแหน่งมีการเชื่อมเซลล์แบบ gap junction ซึ่งเชื่อมด้วย โปรตีน connexon พบบ่อยที่ visceral peritoneum มากกว่า parietal peritoneum จากการศึกษา เชื่อว่า การดูดซึมของสารต่าง ๆ เช่น กลูโคสกลับเข้าสู่ร่างกาย ฯลฯ น่าจะผ่านทาง intercellular route เป็นสำคัญ

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

นอกจากนี้ในบางตำแหน่งของเยื่อช่องท้องมีลักษณะเป็น จุดเล็ก ๆ ที่เรียกว่า milky spot มีรายงานการตรวจพบครั้งแรกโดย von Recklinghausen ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 ซึ่งเป็น กลุ่มของเซลล์ที่พบมากที่บริเวณ greater omentum [19] และใกล้แขนงที่ 1 และ 2 ของหลอด เลือดแดง มีขนาดตั้งแต่ 0.1-2 มิลลิเมตร ซึ่งยากที่จะมองเห็นได้ด้วย ยตาเปล่า องค์ประกอบของ milky spot ประกอบด้วย macrophage (ร้อยละ 70), เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง B และ T cell (ร้อยละ 14 และร้อยละ 13 ตามลำดับ) รวมทั้งพบ mast cell และ monocyte ได้บ้าง เชื่อว่า milky spot น่าจะเป็น accessory lymphoid organs ซึ่งเป็น first line defense mechanism ของ peritoneal cavity

ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell แสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4: แสดงโครงสร้างและหน้าที่ของ mesothelial cell [20]

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

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

ค่าแรงดันในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (interstitial pressure) ในภาวะปกติจะมีค่าเป็นลบ แต่เมื่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการบวม (interstitial edema) จะเกิดผลตรงข้ามกัน คือ ค่าแรงดันในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีค่าเป็นบวก ทำให้ความยาวและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดฝอยในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อการแลกเปลี่ยนน้ำและสารต่าง ๆ นอกจากนี้ถ้าปริมาณเลือดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง จะส่งผลกระทบต่อตรงต่อการแลกเปลี่ยนของสารต่าง ๆ ด้วย เช่น ในกรณีที่มีการอักเสบของเยื่อช่องท้อง ซึ่งมีการขยายตัวของหลอดเลือดและปริมาณเลือดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้น จึงอาจส่งผลให้เกิดการดูดซึมกลับของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กลูโคส และน้ำ กลับเข้าสู่ร่างกายเพิ่มมากขึ้น

## 2.2.3 ระบบหลอดเลือดฝอย (Capillary system)

เยื่อช่องท้อง ประกอบด้วยระบบเส้นเลือดฝอยที่สำคัญ 3 ชนิด [21] คือ

1. ชนิดต่อเนื่อง (continuous capillary) คล้ายกับที่พบใน mesenteric vessels
2. ชนิดร่างแห (fenestrated capillary) พบได้ที่บริเวณ parietal peritoneum โดยเฉพาะ mesentery คิดเป็นร้อยละ 1.7 ของจำนวนเส้นเลือดฝอยทั้งหมด โดยเป็นชนิดที่มีบทบาทในการแลกเปลี่ยนถึงร้อยละ 49 [22]
3. ชนิดไม่ต่อเนื่อง (discontinuous capillary) ซึ่งคล้ายกับที่พบใน liver sinusoid

เซลล์เยื่อหลอดเลือดฝอย (endothelium cell) มีโครงสร้างเหมือนกับเซลล์อื่น โดยมีผนังเซลล์ (plasmalemma) ที่มีลักษณะแบน Robertson unit membrane ความหนาประมาณ 80-100 Å ซึ่งประกอบด้วยชั้นของไขมันหนาด้วยชั้นของโปรตีน มี glycocalyx network บนผิวเซลล์ซึ่งประกอบด้วย sialoconjugates, proteoglycan และ acidic polymer ทำหน้าที่เป็น fibrous network และเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิด negative charge ร่วมกับมีช่องว่างเล็ก ๆ ที่มี

บทบาทในการควบคุมการขนส่งของโมเลกุลขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ผ่านผนังหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อ anionic molecule เช่น albumin เป็นต้น [23]

ส่วนภายในเซลล์ของเยื่อหลอดเลือด ประกอบด้วย pinocytic vesicle จากการศึกษานี้ [24-25] พบว่าในการขนส่งแบบ transendothelial channel เกิดจากการเชื่อมต่อของ vesicle โดย vesicle สามารถเคลื่อนจากด้านหนึ่งของเซลล์ไปยังอีกด้านหนึ่ง ทำให้เกิดการขนส่งสารต่าง ๆ [26] ซึ่งเรียกว่า fluid phase pinocytosis เกิดขึ้นโดยผ่านทาง uncoated plasmalemmal vesicles และ transendothelial channel มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น active transport ของ albumin นอกจากนี้ vesicle ที่เกิดขึ้นอาจเป็นส่วนหนึ่งของขบวนการ pinocytosis ของสารโมเลกุลขนาดใหญ่และน้ำที่อาศัยตัวรับ (receptor) หรือที่เรียกว่า highly specific receptor mediated pathway ซึ่งอยู่ที่บริเวณ coated pitted เมื่อสารจับกับ receptor จะมีการนำสารเหล่านั้นเข้าสู่เซลล์ (internalized) และส่งต่อไปยัง lysosomal compartment หลังจากนั้น receptor จะย้อนกลับมาที่ผิวเซลล์เพื่อรับสารต่อไป

การเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เยื่อของหลอดเลือดฝอย จะเชื่อมต่อกันอย่างเหนียวแน่นด้วย tight junction หรือ zonula occluden โดยเป็นการยึดกันของโปรตีนชั้นนอกทำให้เซลล์ชิดกันสนิท แต่ในส่วนของ postvenular capillary จะมีการเชื่อมต่อกันอย่างหลวม ๆ พบช่องว่างระหว่างเซลล์เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 25-30 โดยมีขนาดประมาณ  $20-60 \text{ \AA}$  ซึ่งเชื่อว่าเป็นทางผ่านของโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า  $20 \text{ \AA}$

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

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

Sinusoid (discontinuous capillary) นั้นมี endothelial cells ดาดชั้นเดียว แต่เซลล์ไม่ต่อเนื่องกัน ทำให้เกิดมีช่องว่างระหว่างเซลล์ขึ้น ซึ่งมีขนาดประมาณ  $1,000 \text{ \AA}$  ช่องทางนี้เป็นทางผ่านเข้าออกของสารทั้งขนาดใหญ่และเล็กระหว่างภายใน lumen และภายนอกหลอดเลือด

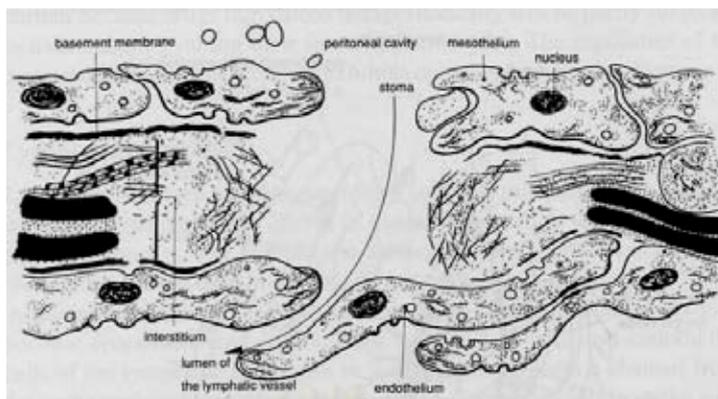
เลือด ขนาดของหลอดเลือดชนิดนี้ไม่สม่ำเสมอ ค่อนข้างกว้างและมักคดเคี้ยว ส่วน basal lamina อาจไม่มีหรือมีแต่ก็ไม่ต่อเนื่องกัน

## 2.2.4 ระบบน้ำเหลือง (Lymphatic system)

ในภาวะปกติ ร่างกายจะควบคุมปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อและช่องว่างต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับคงที่โดยการสร้างน้ำเหลืองดูดกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยปกติอัตราการสร้างน้ำเหลือง จะเท่ากับ ปริมาณสุทธิของ capillary efflux เพื่อให้ปริมาณในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและในช่องท้องมีค่าคงที่ ในการล้างไตทางช่องท้อง หรือในผู้ป่วยที่มีปริมาณสารน้ำในช่องท้องเพิ่มมากขึ้น เช่น ภาวะท้องมาน (ascites) ซึ่งน้ำและสารต่าง ๆ ที่อยู่ในช่องท้องจะมีการดูดกลับเข้าสู่ร่างกายทางระบบน้ำเหลืองและเข้าสู่หลอดเลือดในร่างกายมากขึ้น

ระบบน้ำเหลือง มีจุดเริ่มต้นจาก interstitial, non endothelial channels หรือ low resistance pathway ซึ่งเรียกว่า pre initial lymphatics ซึ่งจะนำน้ำเหลืองจากบริเวณรอบของ venous microvasculature เข้าไปยังเครือข่ายที่มีความยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร โดยเป็นท่อขนาดประมาณ 20-30 ไมครอน บุด้วย endothelial cell เมื่อมีปริมาณน้ำเหลืองเต็ม อาจมีขนาดกว้างถึง 75 ไมครอน เรียกกระบวนนี้ว่า initial lymphatic หลังจากนั้นจะนำน้ำเหลืองเข้าสู่ lymphatic capillary ซึ่งมีขนาดกว้างกว่าเส้นเลือดฝอย โดยมีขนาดประมาณ 15-40 ไมครอน บุอยู่ด้วยเซลล์ชั้นเดียวที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ endothelial cell และประกอบด้วย fine actin like filament ที่มีขนาด 40-60 Å เรียงตามแนวยาวของเซลล์ อันมีบทบาทสำคัญต่อการหดตัวของผนังของหลอดเลือดฝอยน้ำเหลือง จากหลอดเลือดฝอยน้ำเหลืองเหล่านี้ จะนำน้ำเหลืองจากส่วนต่าง ๆ ในช่องท้องเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองต่าง ๆ ที่กระจายอยู่ภายในช่องท้อง และไหลเข้าสู่ cisterna chili (ซึ่งเป็นช่องเปิดทางด้านล่างของ thoracic duct) นำน้ำเหลืองและสารต่าง ๆ ในช่องท้องกลับเข้าสู่ร่างกายทาง thoracic duct และเปิดเข้าสู่หลอดเลือดแดงที่บริเวณรอยต่อระหว่าง left subclavian vein และ left internal jugular vein [27]

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



รูปที่ 5: แสดง subdiaphragmatic ของท่อน้ำเหลือง

น้ำเหลืองจากส่วนของโครงร่างน้ำเหลืองนี้จะรวมกันเข้าสู่ procollector ซึ่งเป็นหลอดเลือดฝอยน้ำเหลืองขนาดเล็กที่มีชั้นของกล้ามเนื้อที่ไม่สมบูรณ์อยู่ต่อจากชั้น endothelial cell หลอดน้ำเหลืองเหล่านี้จะมี semilunar valve นำน้ำเหลืองเข้าสู่หลอดน้ำเหลืองที่มีขนาดใหญ่กว่า (40-200 ไมครอน) ที่มีลักษณะเป็น valvular segment โดยที่มี semilunar bicuspid valve อยู่ที่ตอนปลายของแต่ละ segment เรียกส่วนของ collector ในแต่ละ segment ระหว่างลึ้นนี้ว่า lymphangion ซึ่งถือเป็น anatomic และ functional unit ของ collecting lymphatic system [28]

### 2.3 Peritoneal anatomical changes during peritoneal dialysis

ในผู้ป่วย CAPD จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อช่องท้อง ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะของน้ำยาล้างไตในปัจจุบันที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ (bioincompatibility) เช่น มีความเป็นกรด มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง มี osmolarity สูงกว่าในพลาสมา มีความเข้มข้นของแลคเตทสูง มีอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคส (reactive carbonyl compounds) และอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับกรดอะมิโนในช่องท้องของผู้ป่วย (advanced glycation end products) ปริมาณมาก ร่วมกับการเกิดการอักเสบติดเชื้ในช่องท้อง [29-31]

เมื่อทำการผ่าตัดด้วยวิธีการส่องกล้องในผู้ป่วย CAPD พบการเปลี่ยนแปลงของผิวของเยื่อช่องท้อง (ชั้น mesothelium) โดยจะเห็นเป็นสีน้ำตาล (tanned) [16] เป็นผลจาก oxidation products ของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำยาล้างไต (รูปที่ 6)



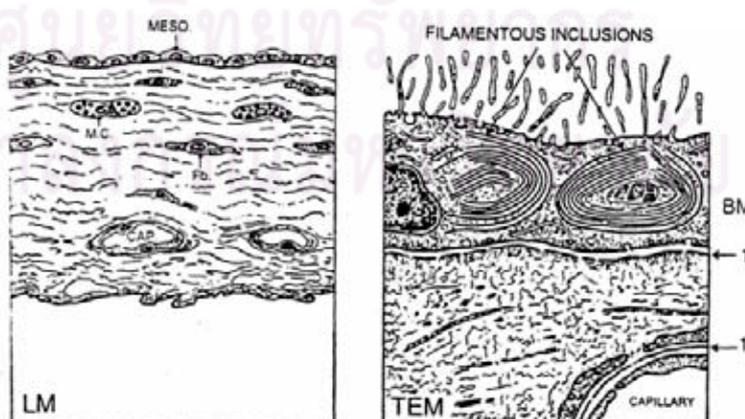
**รูปที่ 6:** แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของเยื่อช่องท้อง

พยาธิสภาพของเยื่อช่องท้องที่พบในผู้ป่วย CAPD นั้นมีดังนี้

1. mesothelial cells หลุดลอกออกจาก basement membrane
2. ส่วน submesothelial compact zone มีความหนามากขึ้นและ omental tissue เกิด interstitial fibrosis
3. หลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะเป็น subendothelial hyalinosis โดยเฉพาะ venules และ small veins รวมทั้งพบหลอดเลือดมีปริมาณมากขึ้น

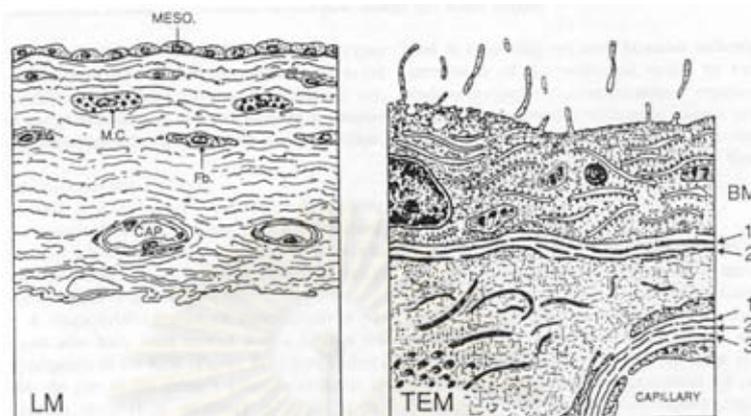
### 2.3.1 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของ mesothelial cell

ในผู้ป่วยที่เป็นไตวายเรื้อรัง ผลของของเสียในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cell โดยจากการศึกษาในการตรวจเนื้อเยื่อช่องท้อง โดยใช้ transmission electron microscope (TEM) [16] พบว่าร้อยละ 36 จะมี distinctive cytoplasmic inclusions และกลายเป็น paracrystalline deposition ใน RER เมื่อมีการสะสมมากขึ้น ทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อเซลล์ทำให้เกิดการหลุดของเซลล์ออกจาก basement membrane [32] ร่วมกับการแตกของเซลล์เยื่อช่องท้อง (รูปที่ 7 และ 8)



**รูปที่ 7:** แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในรายที่เป็น uremia

(ถ่ายภาพมือ แสดง light microscope ซึ่งไม่แตกต่างจากปกติ รูปขวามือ แสดง intracytoplasmic filamentous inclusions ใน mesothelial cell, mesothelium, MESO; mast cell, MC; fibroblast, Fb; capillary, CAP; basement membrane, BM) [51]

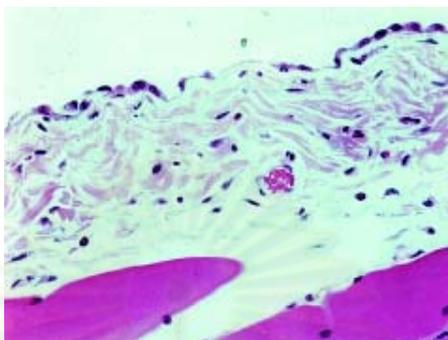


### รูปที่ 8: แสดงการเปลี่ยนแปลงของ peritoneum ในผู้ป่วย CAPD

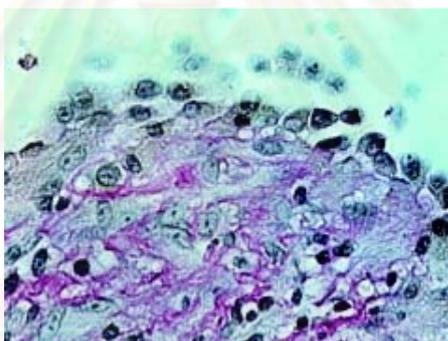
(รูปถ่ายภาพมือ แสดง light microscope ซึ่งไม่แตกต่างจากปกติ และรูปขวามือ แสดงการลดลงของ microvilli และ micropinocytotic vesicles ร่วมกับการเพิ่ม RER ทั้งในรายที่เป็นเบาหวานและไม่เป็นเบาหวาน จะพบมี reduplication ของ basement membrane (BM-1, 2, 3) mesothelium, MESO; mast cell, MC; fibroblast, Fb) [32]

เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ต้องสัมผัสกับน้ำยาล้างไตโดยตรงจึงเกิดการบาดเจ็บ และหลุดลอกออกมาในช่องท้อง ร่างกายจึงปรับตัวโดยการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทน (remesothelization) ในอัตราที่สูงประกอบกับเซลล์ชนิดนี้มีหน้าที่ผลิตสารต่าง ๆ เช่น phospholipids, collagen, elastin, proteoglycans, fibronectin, interleukins, growth factors และ prostaglandins [52-59] ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากสารดังกล่าวถูกเจือจางด้วยน้ำยาล้างไต จึงเกิดการเปลี่ยนแปลง ลักษณะของเซลล์จากลักษณะแบน (epithelial-like) เป็นลักษณะกลม หรือเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ (non-epitheloid type) ที่มีคุณสมบัติของ mesenchymal cell ซึ่งเรียกว่าเกิด epithelial mesenchymal transition (EMT) ทำหน้าที่คล้ายกับ secretory cell และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ของ myofibroblast ซึ่งจะมีเยื่อไฟเบอร์ที่คล้ายกับที่ พบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบซึ่งสามารถหดตัว (contractile fiber) และยึดติดระหว่างเซลล์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibronexi) โดยมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุม extracellular matrix และสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิดพังผืดของเยื่อช่องท้อง [33-35] ร่วมกับลักษณะของ microvilli ที่ผิวเซลล์จะมีลักษณะสั้นลง ปริมาณลดลงและจะหายไปในที่สุด [36] (รูปที่ 9-14) โดยเฉพาะหลังการล้างไตติดต่อกันนานประมาณ 8-10 เดือน เชื่อว่าเป็นผลจากการใส่น้ำยาล้างไตในช่องท้องทำให้ visceral peritoneum และ

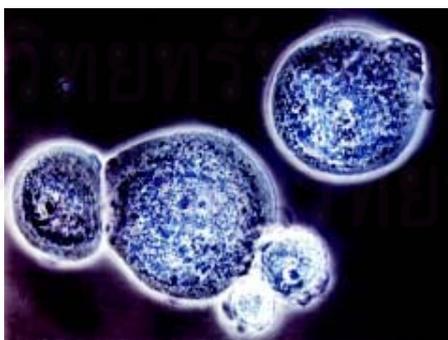
parietal peritoneum ไม่ได้สัมผัสกัน ซึ่งการสัมผัสกันของเยื่อช่องท้องทั้ง 2 ส่วนจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด microvilli ประกอบกับแลคเตทในน้ำยาล้างไตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณ microvilli ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอีกตำแหน่งคือ intercellular junction โดยจะมีการเปิดช่อง ณ บริเวณนี้ตั้งแต่ระยะแรก ๆ ที่เริ่มล้างไต



**รูปที่ 9:** แสดงเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 40 วัน พบว่ามีบางบริเวณที่ไม่มีเซลล์ปกคลุม และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เป็นแบบลูกบาศก์

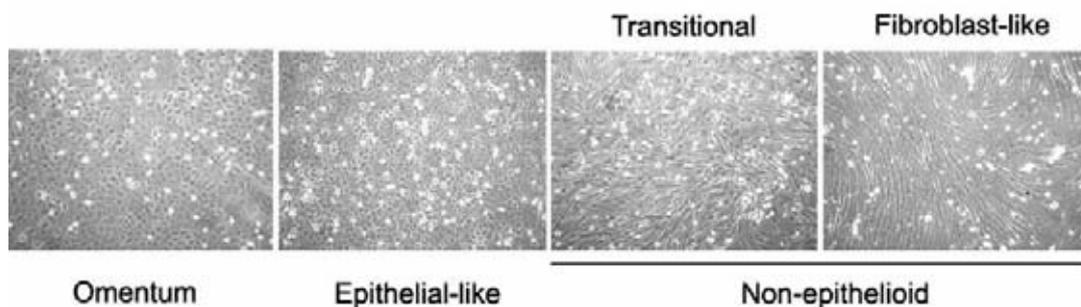


**รูปที่ 10:** แสดงให้เห็นถึงการหลุดลอกของ mesothelial cells ออกมาในช่องท้อง

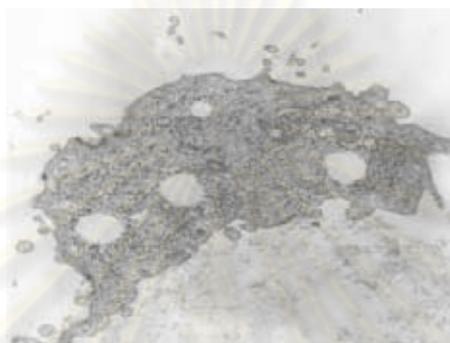


**รูปที่ 11:** แสดง mesothelial cells ที่ตรวจพบในน้ำยาล้างไต

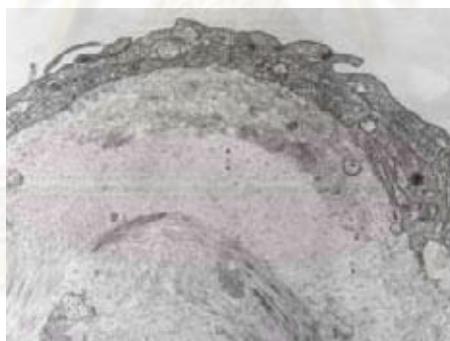




รูปที่ 12: แสดงลักษณะของ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ



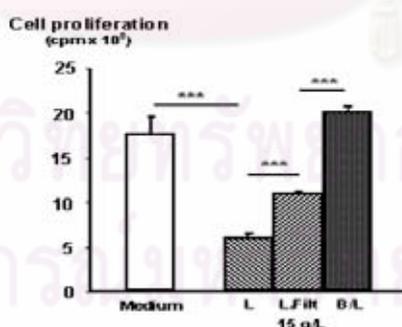
รูปที่ 13: แสดง mesothelial cells ในเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 25 วัน พบว่า microvilli สั้นลง



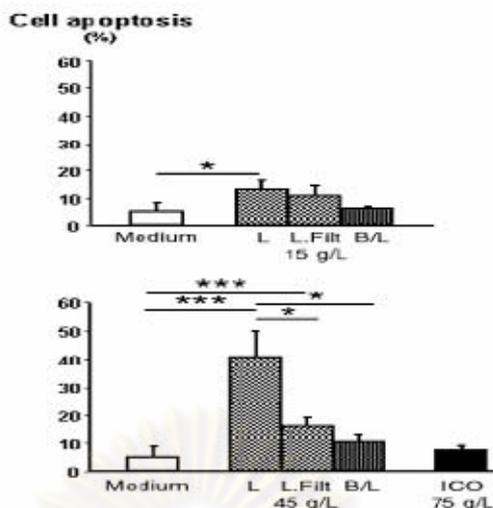
รูปที่ 14: แสดงลักษณะเยื่อช่องท้องหลังล้างไต 14 เดือน ไม่พบลักษณะของ microvilli

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติอื่น ๆ ของเซลล์ เช่น สารคัดหลั่งต่าง ๆ ของเซลล์ และการอยู่รอดของเซลล์โดยสามารถศึกษาได้โดยอาศัยสารต่าง ๆ ที่หลั่งออกมาจาก mesothelial cell (peritoneal biomarker) ต่าง ๆ เช่น phosphatidylcholine, cancer antigen 125 (CA125), hyaluronan, coagulation และ fibrinolytic factor รวมทั้ง pro และ antiinflammatory agents ต่าง ๆ ทั้ง cytokines และ chemokines รวมไปถึง matrix metalloproteinase (MMP-2) (gelatinase A), MMP-3 (stromelysin), MMP-9 และ tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) ต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ขององค์ประกอบของ basement membrane [37]

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มของเซลล์ที่ตายก่อนกำหนดที่เรียกว่า apoptotic cell ทั้ง mesothelial cell และเซลล์อื่น ๆ ในผู้ป่วยที่ล้างไตทางช่องท้องอีกด้วย โดย Boulanger และคณะ [38] ได้ศึกษาผลของน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ 4 ชนิด ประกอบด้วย heat sterilized dextrose lactate, filtered dextrose lactate, heat sterilized dextrose bicarbonate lactate และ heat sterilized icodextrin lactate ต่อการแบ่งตัวของ mesothelial cells ที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยประเมินการแบ่งตัวของเซลล์ อัตราการเกิดกระบวนการ apoptosis และ necrosis พบว่าขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร การแบ่งตัวของ mesothelial cells ในน้ำยากลุ่ม heat sterilized dextrose bicarbonate lactate ดีกว่ากลุ่ม filtered dextrose lactate และ heat sterilized dextrose lactate ตามลำดับ ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร การแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยากลุ่ม heat sterilized icodextrin lactate เท่ากับกลุ่ม heat sterilized dextrose bicarbonate lactate และทั้ง 2 กลุ่มมีการแบ่งตัวของเซลล์ดีกว่ากลุ่ม filtered dextrose lactate และ heat sterilized dextrose lactate ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 15 และ 45 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรมีการแบ่งตัวดีกว่า ร่วมกับมีปริมาณเซลล์ที่ตายผ่านกระบวนการ apoptosis และ necrosis น้อยกว่าประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 16 และ 17) จากการศึกษานี้ได้ข้อสรุปว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงและสารประกอบประเภท advanced glycation end products ในน้ำยาล้างไตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ mitochondria และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของ mesothelial cells ยับยั้งการเติบโตของเซลล์และขัดขวางกระบวนการ remesothelialization



รูปที่ 15: แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ



**รูปที่ 16:** แสดงปริมาณ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตชนิดต่าง ๆ

(L; heat sterilized dextrose lactate, L.Filt; heat sterilized dextrose bicarbonate lactate, B/L; heat sterilized dextrose bicarbonate lactate, ICO; heat sterilized icodextrin lactate, 15 g/L; ความเข้มข้นของน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร, 45 g/L; ความเข้มข้นของน้ำตาล 45 กรัมต่อลิตร)

Chen และคณะ ศึกษาปริมาณ mesothelial cells ที่เกิดกระบวนการ apoptosis ในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง เปรียบเทียบกับ ผู้ป่วย CAPD พบว่า สัดส่วนของเซลล์ที่เกิด apoptosis มีปริมาณมากขึ้นตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ ขณะที่ปริมาณเซลล์ทั้งหมดลดลง ดังตารางที่ 1 และผู้ป่วยที่ล้างไตทางช่องท้องที่ไม่ได้เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง สามารถตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ได้เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยกว่าผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญ [39]

**ตารางที่ 1:** แสดงปริมาณเซลล์ตามระยะเวลาที่เกิดการติดเชื้อ

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

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

Marina และคณะ ศึกษาเกี่ยวกับ lethal cytokines ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของ mesothelial cells โดยนำตัวอย่างจากน้ำยาล้างไตในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่อง

ท้อง และผู้ป่วย CAPD พบว่าระหว่างที่เกิดการอักเสบติดเชื้อ เซลล์ส่วนใหญ่ที่เกิดกระบวนการ apoptosis คือเซลล์เม็ดเลือดขาว และมีเพียง ร้อยละ 0.5-5 ที่เป็น mesothelial cells โดยสัดส่วนของเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นขณะที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดลดลงในระหว่างการรักษา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen และคณะ คือสามารถตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในผู้ป่วย CAPD ซึ่งตามธรรมชาติเซลล์ที่เกิด apoptosis จะถูกกำจัดโดยเซลล์ข้างเคียงภายในระยะเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง การที่สามารถตรวจพบเซลล์ดังกล่าวในน้ำยาล้างไตของผู้ป่วย บ่งบอกถึงปริมาณ mesothelial cells ที่อาจเกิด apoptosis ปริมาณสูง ส่วน cytokines ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ที่ตรวจพบในการศึกษานี้คือ FASL โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เกิดการอักเสบติดเชื้อในช่องท้อง [40]

สรุปจากการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการล้างไตทางช่องท้องด้วยน้ำยาล้างไตที่ใช้กันในปัจจุบัน ส่งผลให้ mesothelial cells เกิด apoptosis ซึ่งจะถูกกำจัดโดยเซลล์ macrophages หากตรวจพบ mesothelial cells ที่เกิด apoptosis ในน้ำยาล้างไตบ่งชี้ถึงปริมาณเซลล์จำนวนมากที่เกิดกระบวนการนี้ ทำให้เยื่อช่องท้องปราศจาก mesothelial cells ปกคลุม และเชื่อว่าเป็นกลไกที่สำคัญกลไกหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อช่องท้อง โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ mesothelial cell ที่บุบริเวณผิวของเยื่อช่องท้องที่ลดลงกับความหนาของชั้น submesothelium compact zone และจำนวนของหลอดเลือดที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ

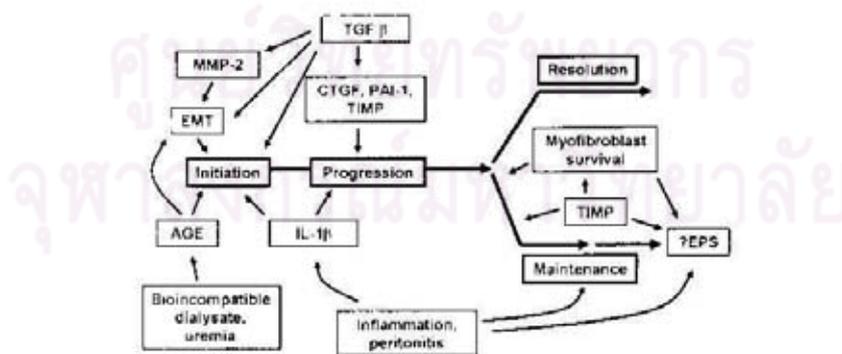
### 2.3.2 การเกิดพังผืดในชั้นใต้เยื่อหุ้ม (Submesothelial fibrosis)

จากข้อมูลที่ทราบกันทั่วไปแล้วว่า เมื่อ peritoneum สัมผัสกับ dialysis solution เป็นระยะเวลาสั้น ๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cell (mesothelial modification) ได้แก่ การเปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ โดยการเปลี่ยนรูปร่างเป็น cuboidal form และมีการสูญเสียของ mesothelial cell และเกิดการหนาตัวของ basement membrane ขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงที่ submesothelial region และเกิด simple sclerosis ตามมา โดยความหนาของ submesothelium compact zone นั้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ทำ CAPD

กลไกการเกิดพังผืดเยื่อช่องท้องสัมพันธ์กับ cytokine ที่สำคัญที่มีบทบาทต่อกระบวนการอักเสบและผลตามมาต่อการเกิดพังผืด คือ transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) ซึ่ง mesothelial cell สามารถเพิ่มการแสดงออกของ TGF- $\beta$  mRNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- $\alpha$  และ IL-1 จากการศึกษาที่มีการเพิ่มขึ้นของ TGF- $\beta$  มีผลต่อการควบคุมการทำงานของเซลล์ ทั้ง proliferation, differentiation, adhesion และ apoptosis และยังมีผลต่อความผิดปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เกิดความผิดปกติและเกิดพังผืดตามมา ตามรูปที่ 17 [41]

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ichiro และคณะ พบว่าในหนูแรทที่ได้รับ glucose degradation products (GDPs) ชนิดหนึ่งคือ methylglyoxal (MGO) ที่ผสมในน้ำยาล้างไตนั้นพบการเพิ่มการแสดงออกของ TGF- $\beta$ , collagen, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ advanced glycation end products receptor (RAGE) อีกทั้ง MGO ยังส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของ E-cadherin ส่วน TGF- $\beta$  นั้นส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของ E-cadherin และ cytokeratin ซึ่งเป็น epithelial marker [42] โดยการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนที่กล่าวมานั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด EMT ผ่านทางการควบคุมจาก transcription factor snail สอดคล้องกับการศึกษาของ Eun-Joo Oh และคณะ ที่พบว่าในหนูแรทที่ได้รับน้ำยาล้างไตที่มี GDPs ในปริมาณที่ต่ำนั้นพบการเกิด peritoneal fibrosis ลดลงและโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peritoneal fibrosis เช่น  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) นั้นมีการแสดงออกน้อยกว่าในหนูแรทที่ได้รับน้ำยาล้างไตที่มี GDPs ในปริมาณที่สูง [43] และจากการศึกษาของ Chieko Higuchi และคณะพบว่า ปริมาณของกลูโคสที่สูงนั้นมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ใน fibroblast อีกด้วย [44]

กลไกการเกิด peritoneal fibrosis นั้นได้มีผู้ทำการศึกษาไว้มากมายโดย Qiang Yao และคณะพบว่ากลไกการเกิด peritoneal fibrosis นั้นเกิดผ่านทาง TGF/Smad pathway [45] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Qinghua Liu และคณะที่พบว่า TGF/Smad pathway ที่ส่งผลต่อการเกิด peritoneal fibrosis นั้นผ่าน C-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling [46] อีกทั้ง Strippoli และคณะพบว่า การเกิด EMT นั้นผ่านทาง ERK/NF- $\kappa$ B/Snail-1 pathway ซึ่งการเกิด EMT นั้นมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุม extracellular matrix และสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิดพังผืดของเยื่อช่องท้อง [47]



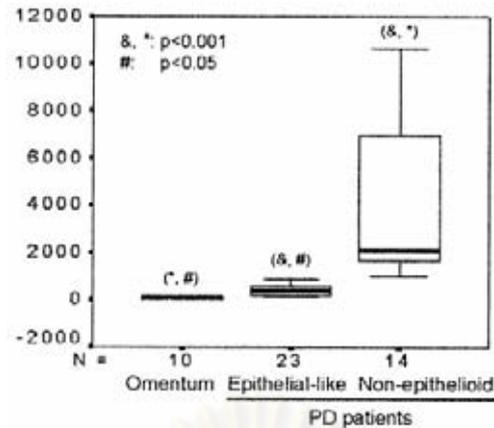
รูปที่ 17: แสดงการเกิดกลไกพังผืดในรายที่ทำกรล้างไตทางช่องท้อง [41]

### 2.3.3 การเกิดหลอดเลือดใหม่ (Neoangiogenesis)

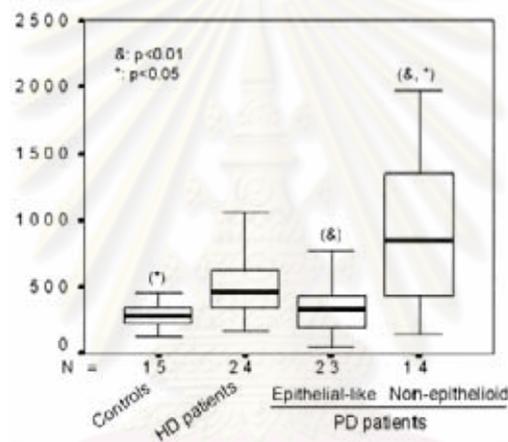
นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อผนังช่องท้อง (mesothelial cells) และการเกิดพังผืดในชั้นใต้เยื่อหุ้มในผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องมาเป็น ระยะเวลา ต่อเนื่องยาวนานแล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือด โดยจะพบมีการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือด (neoangiogenesis, granulation tissue) ซึ่งพบเพิ่มจำนวนตามระยะเวลาของการทำ PD แต่จะพบมากขึ้นในรายที่เกิดการอักเสบของเยื่อช่องท้อง และในรายที่มีการอักเสบเรื้อรัง จนเกิด เป็นพังผืดของเยื่อช่องท้อง น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ VEGF [48] ซึ่งคล้ายกับใน ผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ dilated vessels และพบการหนาตัว ของชั้น tunica media ซึ่งในบางรายอาจมีการอุดตันของเส้นเลือดได้

การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด จะพบมีการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือด ซึ่งพบ เพิ่มจำนวนตามระยะเวลาของการทำ PD แต่จะพบมากขึ้นในรายที่เป็น peritoneal sclerosis น่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ VEGF [47] ซึ่งคล้ายกับที่พบในผู้ป่วยที่เป็น เบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ dilated vessels และพบการหนาตัวของชั้น tunica media ส่งผลให้หลอดเลือดมีลักษณะตีบแคบลง ในบางรายอาจมีการอุดตันของเส้นเลือดได้ นอกจากนี้พบ cellular infiltration รวมทั้งอาจพบ activated endothelial cell ในรายที่เป็น SEP ได้ [48]

ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเยื่อช่องท้องในตำแหน่ง ไตเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในการแลกเปลี่ยนสารและน้ำ เช่นการเปลี่ยนแปลง ของเซลล์ endothelial lining peritoneal capillaries [49] หรือการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells ที่เป็นเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อช่องท้องเป็นลักษณะ fibrosis และ neoangiogenesis เนื่องจาก VEGF ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น potent proangiogenic factor พบว่ามีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วย CAPD และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของ เยื่อช่องท้องดังกล่าว โดยเชื่อว่าเป็นหนึ่งใน กลไกหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การศึกษาของ Aroeira และคณะ พบว่า mesothelial cells มีความสามารถสร้าง VEGF ได้ ปริมาณมากถ้ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะจากเซลล์ epitheliod mesothelium เป็น non- epitheliod mesothelium (รูปที่ 12) โดยการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถ ตรวจจับพบในผู้ป่วย CAPD ร่วมกับพบว่าน้ำยาล้างไตที่ถ่ายเทจากเซลล์ non-epitheliod mesothelium มีค่า VEGF มากกว่า ระดับ VEGF ในพลาสมา (รูปที่ 18 และ 19) [50]



รูปที่ 18: แสดงระดับ VEGF จากน้ำที่ถ่ายจากผู้ป่วย CAPD ที่มีลักษณะ mesothelial cells ชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 19: แสดงระดับ VEGF ในซีรัมของผู้ป่วย

#### 2.4 Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )

ภาวะ hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ โดยภาวะ hypoxia นั้นสามารถจำแนกได้เป็น 4 ประเภท ตามสาเหตุของการเกิดภาวะ hypoxia ดังนี้

1. Hypoxic hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ เนื่องจากร่างกายได้รับออกซิเจนน้อย

2. Anemic hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ เนื่องจากความบกพร่องในการขนส่งออกซิเจนไปสู่เซลล์

3. Circulatory hypoxia หรือ Stragnant hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ เนื่องจากมีการคั่งของกระแสโลหิต

4. Histotoxic hypoxia หมายถึง ภาวะที่เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนต่ำกว่าปกติ เนื่องจากภาวะเป็นพิษของเซลล์ [51-52]

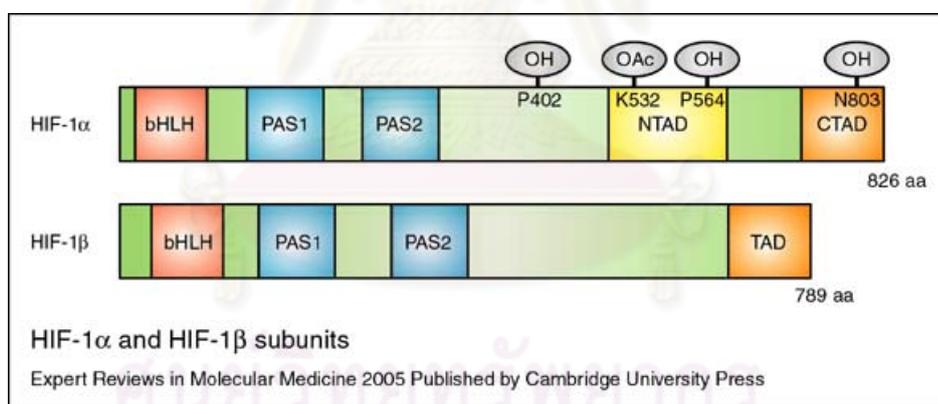
เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะ hypoxia นั้นเซลล์จะมีการแสดงออกของ Hypoxia-inducible factors-1 (HIF-1) ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ oxygen ที่เซลล์ได้รับและสามารถนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์โดยเฉพาะการลดลงของปริมาณของ oxygen (ภาวะ hypoxia)

โครงสร้างของ HIF-1 นั้นเป็น heterodimer transcription factor ประกอบด้วย HIF-1 $\alpha$  และ HIF-1 $\beta$  [ทั้ง 2 subunit ต่างกันตรงที่ตำแหน่งของ aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)] ซึ่งทั้ง 2 subunit นั้นทางด้าน N-terminal ประกอบด้วย DNA recognition domain คือ basic-helix-loop-helix (bHLH) domain ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ hypoxia responsive element (HRE) บนสาย DNA ถัดมาเป็นส่วนที่เรียกว่า Per-Arnt-Sim (PAS) domains ซึ่งเป็นส่วนที่จับ (dimerize) กับ PAS domains ของ HIF-1 $\beta$  ส่วนทางด้าน C-terminal ของ HIF-1 $\alpha$  ประกอบด้วย N-terminal transactivation domain (NTAD) และ C-terminal transactivation domain (CTAD) โดยหลังจากเกิดกระบวนการ translation ของ HIF-1 $\alpha$  แล้วจะเกิด hydroxylation ที่ตำแหน่ง proline ที่ 402 และ 564 (P402 and P564) และเกิด acetylation ที่ตำแหน่ง lysine ที่ 532 (K532) ในบริเวณที่เรียกว่า oxygen-dependent degradation (ODD) domain (residues 401-603) (รูปที่ 20) [53] โดย oxygen dependent prolylhydroxylase ซึ่งการเกิดกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะทำให้เกิดการทำลาย HIF-1 $\alpha$  โดยผ่านทาง von Hippel Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase complex และ proteasome (the von Hippel-Lindau-mediated ubiquitin-proteasome pathways) โดยอาศัยเอนไซม์ prolylhydroxylase-2 (PHD-2, EGLN) เมื่อขาดออกซิเจน เอนไซม์นี้จะไม่ทำงาน ส่งผลให้การทำลาย HIF-1 $\alpha$  หดุดลง อีกทั้งยังพบการเกิด hydroxylation ที่ตำแหน่ง asparagine ที่ 803 (N803) ภายใน C-terminal transactivation domain (CTAD) โดยอาศัยเอนไซม์ asparaginyl hydroxylase (FIH) ซึ่งเป็น oxygen dependent enzyme อีกชนิดหนึ่ง โดยการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้นั้นมีผลยับยั้งการทำงานของ HIF-1 $\alpha$  (ยับยั้งการจับของ HIF-1 $\alpha$  กับ coactivator; p300, CBP) ทำให้ HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  heterodimer ไม่สามารถจับกับส่วนของ hypoxia responsive element (HRE) บน promoter ของ target genes ได้ ซึ่ง HRE เป็น consensus sequence มีลำดับเบสคือ 5-NCGTG-3 [54] มีผลทำให้ genes ที่ควบคุมการตอบสนองต่อการอยู่รอดในภาวะที่มีปริมาณ oxygen ต่ำ เช่น glycolysis enzymes, vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoiesis, inducible nitric oxide synthase (iNOS) เป็นต้น นั้นมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 21-22) [55-56] ส่วน HIF-1 $\beta$  นั้นส่วนทางด้าน C-terminal ประกอบด้วย transactivation domain (TAD) แต่ในส่วนนี้ไม่มี ODD domain จึงทำให้ HIF-1 $\beta$  นั้นมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutively expression) นอกจากนี้ HIF-1 แล้วยังพบ HIF-2 $\alpha$  ซึ่งโครงสร้างคล้ายกับ HIF-1 $\alpha$

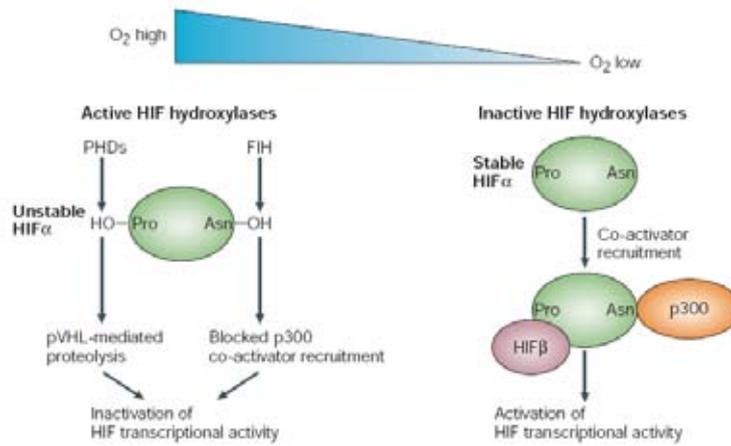


มากและมีการแสดงออกที่ endothelial จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า EPAS (endothelial PAS) อีกทั้งยังพบการแสดงออกของ HIF-2 $\alpha$  ใน bone marrow เชื่อว่าเกี่ยวกับการ maturation ของเซลล์เม็ดเลือด และ HIF-2 $\alpha$  ยังพบการแสดงออกในไตพบที่บริเวณ interstitium ปัจจุบันเชื่อว่า HIF-2 $\alpha$  เป็นโมเลกุลหลักในการควบคุมการสร้าง erythropoietin HIF-3 $\alpha$  นั้นไม่มี trans-activation domain จึงทำงานเป็น competitor กับระบบ HIF-1 $\alpha$  และ HIF-2 $\alpha$  พบการแสดงออกของ HIF-3 $\alpha$  ที่ cornea เชื่อว่า HIF-3 $\alpha$  ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดที่บริเวณนั้น [54, 56-63]

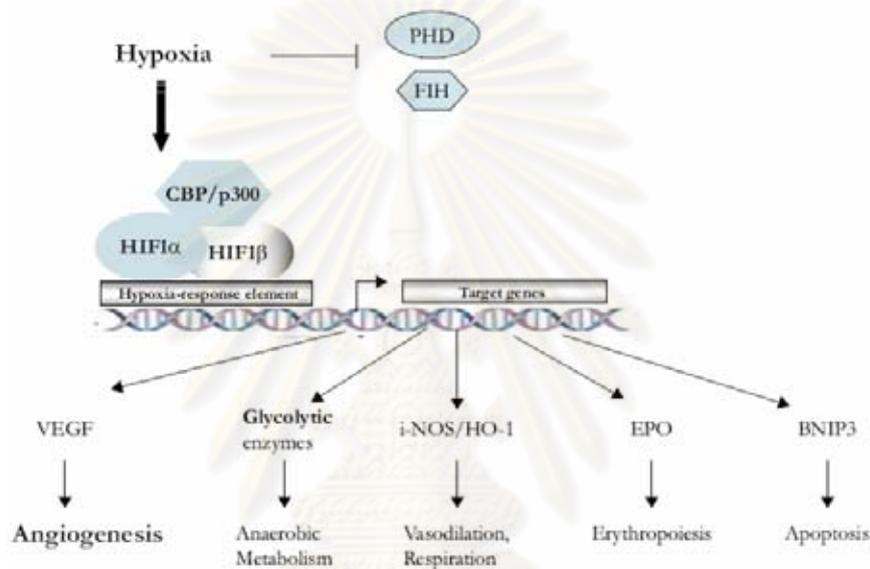
นอกจากนี้ภาวะ hypoxia ยังมีความเกี่ยวข้องกับ mitochondria อีกด้วย กล่าวคือ ใ้กระบวนการ electron transfer ใน aerobic respiration ซึ่งเซลล์จะใช้ oxygen เป็น final electron acceptor ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะปกติ (normoxic conditions) HIF-1 $\alpha$  จะถูกทำลายโดยการเกิด prolyl hydroxylation โดยเอนไซม์ PHD-2 นี้ต้องการตัว  $\alpha$ -ketoglutarate ช่วยในการทำงาน (co-factor) ซึ่ง  $\alpha$ -ketoglutarate เป็นสารกลางตัวหนึ่งในวัฏจักรเครป แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีปริมาณ oxygen ต่ำ นั้นทำให้เกิดการสะสมของ succinate ภายใน mitochondria ซึ่ง succinate นี้จะไปยับยั้งการทำงานของ HIF prolyl-hydroxylase มีผลทำให้ HIF-1 $\alpha$  ภายในเซลล์มีความเสถียร ซึ่ง HIF-1 $\alpha$  นี้จะเข้าไปจับที่ hypoxia response element (HRE) ของ target genes ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าสารตัวกลางในวงจรเครปหลาย ๆ ตัว สามารถกระตุ้นระบบ HIF ได้ [54]



รูปที่ 20: แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) [53]



รูปที่ 21: แสดงการทำงานของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) [55]



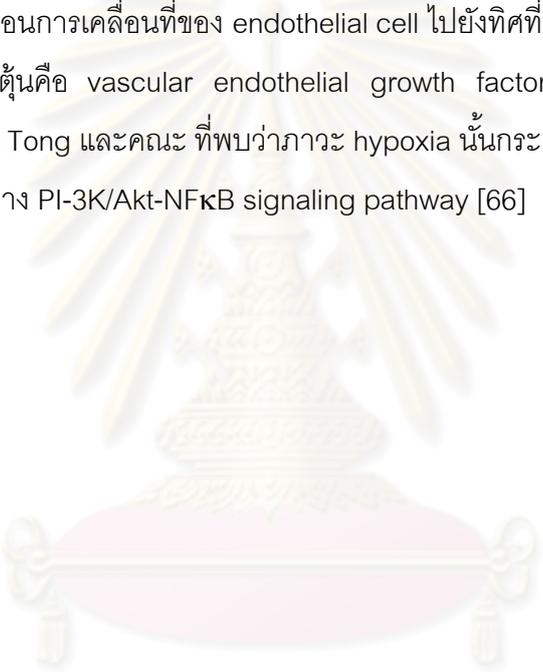
รูปที่ 22: แสดง target genes ของ HIF-1 [56]

## 2.5 Hypoxia induced fibrosis and angiogenesis

การเกิดพังผืด (fibrosis) ซึ่งเป็นกลไกของร่างกายที่ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ซึ่งพบว่า hypoxia สามารถกระตุ้น fibrosis mediator ที่สำคัญคือ transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), connective tissue growth factor (CTGF) ผลของการกระตุ้นจะทำให้มีการสะสมของ extracellular matrix (ECM) เพิ่มขึ้น การสะสม ECM นี้จะเกิดขึ้นได้มากเป็นผลลัพธ์ของการลดการสลาย ECM และมีการสร้าง ECM เพิ่มขึ้น ซึ่งการสลาย ECM นี้อาศัยเอนไซม์ที่สำคัญคือ plasmin และเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMPs) ที่สำคัญคือ MMP-2 และ MMP-9 โดย plasmin ถูกยับยั้งด้วย plasminogen inhibitor activator-1 (PAI-1) ส่วน MMPs ถูกยับยั้งด้วย tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) พบว่าในภาวะ hypoxia นั้น MMP-2 มีปริมาณลดลงในขณะที่มีการสร้าง PAI-1 มากขึ้นส่งผลให้ลดการทำลาย ECM [54] สอดคล้องกับการศึกษาของ Ghassan M. Saed และคณะ ที่พบว่า peritoneal fibroblast ที่ได้รับภาวะ

hypoxia นั้นมีการแสดงออกของ type I collagen และ TGF- $\beta$  เพิ่มมากขึ้นโดยการแสดงออกของ type I collagen และ TGF- $\beta$  นั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างถาวร [64]

นอกจากการเกิดพังผืด (fibrosis) ซึ่งเป็นกลไกของร่างกายที่ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายแล้วการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) นั้นก็ถือเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญไม่แพ้กัน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยหลายขั้นตอนคือ มีการสลาย ECM และ basement membrane ของหลอดเลือดในบริเวณที่จะมีการงอกของหลอดเลือดใหม่ออกไป การเคลื่อนที่ของ endothelial cell ไปยังทิศที่มีการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเจริญและการแบ่งตัวของ endothelial cell การสร้างโครงสร้างของหลอดเลือดและการคงสภาพรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดไปเป็นหลอดเลือดเฉพาะ [65] โดยในแต่ละขั้นตอนนั้นก็จะมีโมเลกุลต่าง ๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ในขั้นตอนการเคลื่อนที่ของ endothelial cell ไปยังทิศที่มีการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่นั้นมีตัวกระตุ้นคือ vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นต้น โดยจากการศึกษาของ Qiang Tong และคณะ ที่พบว่าภาวะ hypoxia นั้นกระตุ้นการแสดงออกของ VEGF เพิ่มมากขึ้นโดยผ่านทาง PI-3K/Akt-NF $\kappa$ B signaling pathway [66]



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study design) แบบมีกลุ่มทดลอง และกลุ่มเปรียบเทียบ (experimental controlled trial)

#### 3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์และการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เพาะเลี้ยงที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

3.2.1.1 ทำการเพาะเลี้ยง (primary culture) mesothelial cells จาก omentum ของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดลำไส้ด้วย intraluminal diseases (elective surgery)

3.2.1.2 ยืนยันชนิดของ mesothelial cells ด้วยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อ cytokeratin

3.2.1.3 ใช้เซลล์ที่เพาะไม่เกิน 3 passages ศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและองค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง โดยแบ่ง mesothelial cells ออกเป็น 13 กลุ่ม คือ

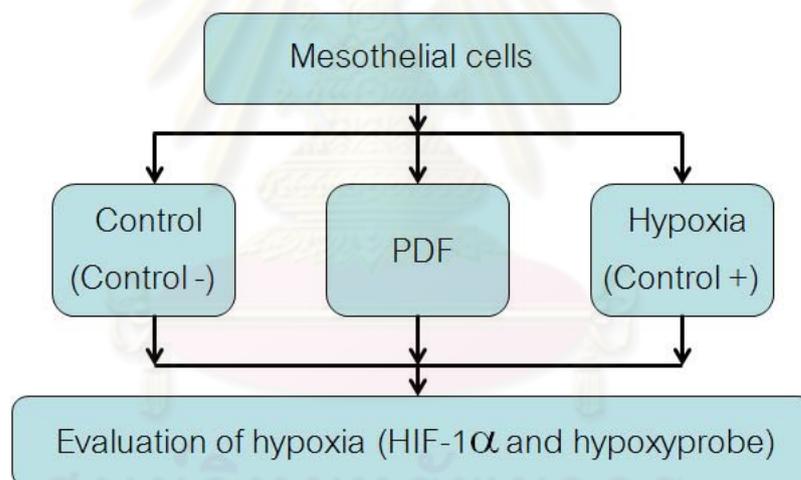
- 1) กลุ่มควบคุม (culture media pH 7.4)
- 2) กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF
- 3) กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF
- 4) กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- 5) กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media pH 7.4
- 6) กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media pH 7.4
- 7) กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media pH 7.4
- 8) กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media pH 7.4 (มีค่า osmolarity เท่ากับ 1.5% dextrose in culture media pH 7.4 คือ 344 mOsm/L)
- 9) กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media pH 7.4 (มีค่า osmolarity เท่ากับ 2.5% dextrose in culture media pH 7.4 คือ 395 mOsm/L)
- 10) กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media pH 7.4 (มีค่า osmolarity เท่ากับ 4.25% dextrose in culture media pH 7.4 คือ 483 mOsm/L)

- 7.4
- 11) กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M methylglyoxal (MGO) in culture media pH
- 12) กลุ่มที่ได้รับ culture media ที่มีสภาวะเป็นกรด (pH 5.4)
- 13) กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia (โดยเลี้ยงเซลล์ใน tri-gas incubator ที่มี ส่วนผสมของก๊าซออกซิเจน 1% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และที่เหลือเป็นก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 9 วัน)

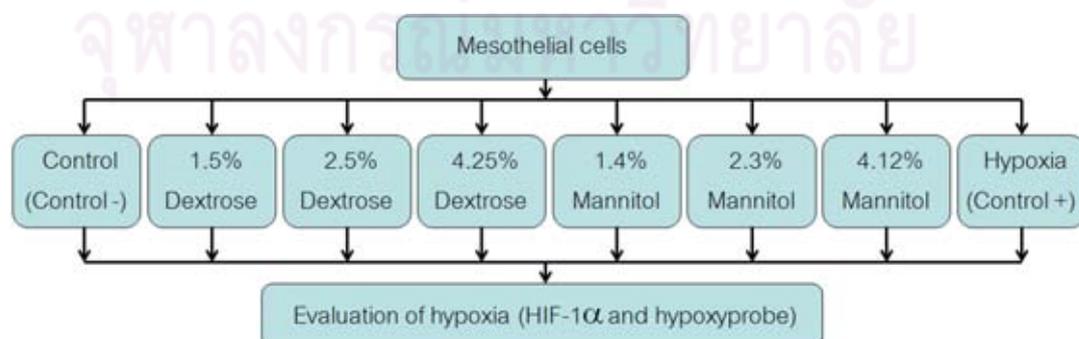
3.2.1.4 ศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia โดยพิจารณาจากการติดสีย้อมของ แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (pimonidazol) และเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ hypoxia (HIF-1 $\alpha$ ) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia กับกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและกลุ่มที่ได้รับองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำยา ฟอกไตทางช่องท้อง

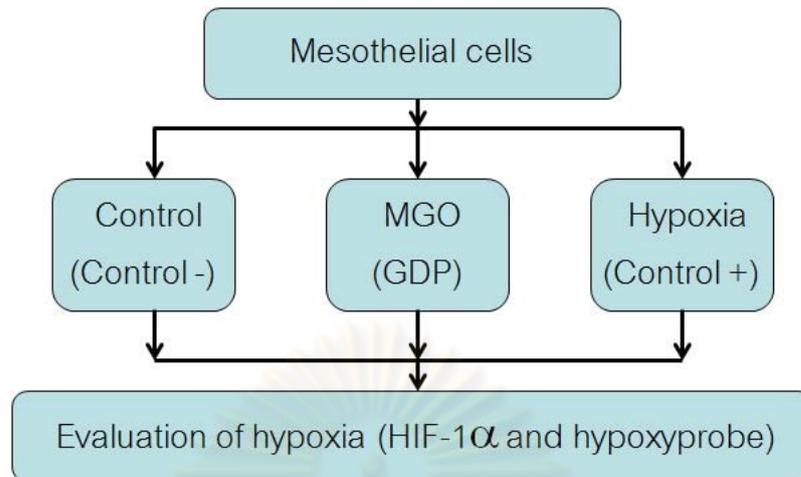
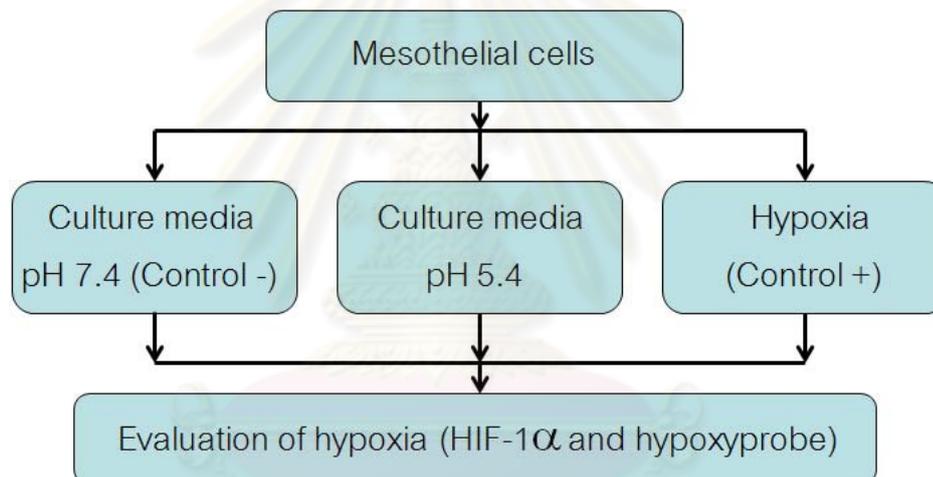
โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แสดงในรูปที่ 23

1. PDF induces hypoxia ?



2. Glucose & osmolarity induce hypoxia ?



3. GDPs induces hypoxia ?4. pH induces hypoxia ?

รูปที่ 23. แสดงขั้นตอนในการศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells ที่สัมผัสกับ น้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

## 3.2.2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ ที่มีน้ำหนักตัวแรกเข้าระหว่าง 250-300 กรัม (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ) จำนวน 15 ตัว สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการดูแลอย่างดีในศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสามารถรับประทานอาหารและน้ำได้ตามแต่ต้องการ หลังจากนั้นจะได้รับการศึกษาตามลำดับ ดังนี้ คือ

3.2.2.1 แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มควบคุม (normal saline sterile; NSS)
- 2) กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- 3) กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS pH 7.4 (กลุ่ม hypoxia-mimic)

โดยหนูในแต่ละกลุ่มจะทำการฉีดเข้าทางช่องท้องวันละ 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง ด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เป็นเวลารวมทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ ยกเว้นกลุ่ม hypoxia-mimic ที่ได้รับสารดังกล่าวเป็นเวลา 4 สัปดาห์

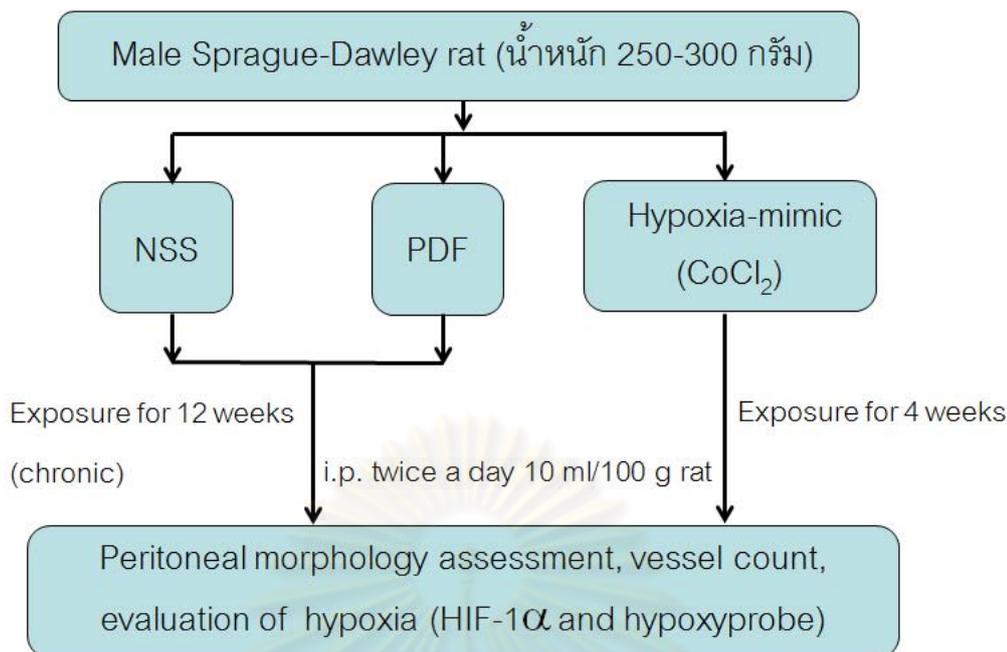
3.2.2.2 ก่อนการ sacrificed ทำให้หนูสลบด้วย sodium pentobarbital ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วจึงทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อส่วน abdominal wall, diaphragm, liver และ small bowel นำชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้งหมดมาคงสภาพใน 10% buffered neutral formalin solution

3.2.2.3 หนูบางส่วนในแต่ละกลุ่มนั้นจะทำการฉีด hypoxyprobe (pimonidazole) 60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องก่อนการ sacrificed 30 นาที เพื่อศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia และศึกษา functional vessel ด้วยวิธี perfusion โดยใช้ biotinylated lectin 0.25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และทำการ perfused ก่อนการ sacrificed 4 นาที

หลังจากหนูที่ได้รับ hypoxyprobe และ biotinylated lectin ถูก sacrificed แล้ว ชิ้นส่วนที่ใช้ทำการศึกษาคือจะถูก fix ใน methyl carnoy fixative แล้ว embed ใน paraffin โดยชิ้นส่วนที่ embed ใน paraffin ทั้งหมดนั้นจะนำมาตัด section ด้วยเครื่อง microtome แล้วทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วย hypoxyprobe kit เพื่อศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia ทำการย้อมเพื่อศึกษา functional vessel โดยวิธี immunohistochemistry และย้อม masson's trichrome เพื่อศึกษา fibrosis

โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แสดงในรูปที่ 24

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24. แสดงขั้นตอนในการศึกษาในสัตว์ทดลอง

### 3.3 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

#### 3.3.1 Hypoxic mesothelial cells

ทำการหยอด hypoxyprobe (pimonidazol) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ 30 นาที หลังจากนั้นคงสภาพเซลล์ด้วยสารละลาย acetone:methanol (อัตราส่วน 1:1) ที่เย็นจัด แล้วทำการย้อม ด้วย hypoxyprobe kit ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับ hypoxyprobe โดยเซลล์ที่เกิดภาวะ hypoxia นั้นจะเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลกระจายอยู่ภายในเซลล์นั้น ซึ่งทำการประเมินจำนวนของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมด้วยแอนติบอดี hypoxyprobe (pimonidazol) และทำการศึกษาการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  protein ในเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  ซึ่งในเซลล์ที่มีการแสดงออก ของ HIF-1 $\alpha$  จะเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลกระจายอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ แล้วทำการประเมินจำนวนของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$

#### 3.3.2 การประเมินทางสัญญาณของเนื้อเยื่อ

##### 3.3.3.1 Mesothelial monolayer

หลังจาก sacrifice หนู นำส่วนด้านหน้า ของตับมาวางบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% agarose gel (liver imprint) เป็นเวลา 15-20 วินาที โดยทำการ imprint จำนวน 4 สไลด์ต่อหนูแต่ละตัว จากนั้นทำการคงสภาพด้วย 70% ethanol และย้อมด้วยสี Giemsa's azure



eosin methylene blue for microscope (ready to use) แล้วทำการประเมินจำนวนของ mesothelial cells ต่อพื้นที่

### 3.3.2.2 Submesothelial thickness

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

### 3.3.2.3 Mesenteric vascular density

ทำการย้อมชิ้นเนื้อที่ตัดจาก paraffin block ด้วย streptavidin ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับ perfused LE-lectin โดยหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่จะเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลที่หลอดเลือดนั้น ซึ่งทำการนับจำนวนหลอดเลือดต่อพื้นที่ โดยใช้ image J 1.37a program แล้วทำการประเมินจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่

### 3.3.2.4 Hypoxic study

ทำการย้อมชิ้นเนื้อที่ตัดจาก paraffin block ด้วย hypoxyprobe kit ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับ hypoxyprobe ที่ฉีดเข้าไปในช่องท้องโดยเซลล์ที่เกิดภาวะ hypoxia นั้นจะเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลกระจายอยู่ภายในเซลล์นั้น ซึ่งทำการประเมินชนิดของเซลล์และจำนวนของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย hypoxyprobe (pimonidazol) และทำการศึกษาการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  protein ในชิ้นเนื้อที่ตัดจาก paraffin block ด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  ซึ่งในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  จะเห็นเป็นตะกอนละเอียดสีน้ำตาลกระจายอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์

## 3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวมข้อมูลการทดลองและบันทึกผลการทดลอง โดยการจดบันทึก โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นผู้ควบคุมและให้คำปรึกษา

## 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองบันทึกเป็นค่า mean  $\pm$  SEM ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ one-way ANOVA โดยการทดสอบสมมติฐาน กำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p \leq 0.01$

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องก่อให้เกิดภาวะ hypoxia

การศึกษาในหัวข้อนี้ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องกับการเกิดภาวะ hypoxia โดยทำการจำลองภาวะ Hypoxia ทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งจำลองโดยการบ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) และในสัตว์ทดลองซึ่งจำลองโดยการฉีด CoCl<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 100 μM ในน้ำเกลือออร์มัล (hypoxia-mimic) [67] แล้วทำการเปรียบเทียบกลุ่ม hypoxia กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง (PDF) จากนั้นทำการศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia จากการแสดงออกของโปรตีน HIF-1α ภายในนิวเคลียสของเซลล์ จากการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1α (ซึ่งเมื่อเซลล์เกิดภาวะ hypoxia โปรตีนชนิดนี้จะมีความเสถียรและสามารถตรวจวัดได้) และการติดสีเมื่อทำการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (pimonidazol) โดยสารชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม 2-nitroimidazol และจะจับกับหมู่ thiol ของโปรตีนในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีค่า pO<sub>2</sub> ต่ำกว่า 10 mmHg ที่อุณหภูมิ 37°C

จากการศึกษาพบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นมีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1α ในเยื่อผนังช่องท้องใกล้เคียงกับในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic และมีความแตกต่างเมื่อเทียบกับในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.05$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.61 \pm 10.83$  % ส่วนกลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.82 \pm 9.40$ % และกลุ่ม hypoxia-mimic มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $42.45 \pm 12.92$  %) (รูปที่ 25-27) ซึ่งสอดคล้องกับการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ที่พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนี้ให้ผลบวกต่อการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ในเยื่อผนังช่องท้องใกล้เคียงกับในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic และมีความแตกต่างเมื่อเทียบกับในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.89 \pm 9.56$  % ส่วนกลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $67.06 \pm 30.62$ % และกลุ่ม hypoxia-mimic มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $49.72 \pm 19.57$  %) (รูปที่ 28-30)



**รูปที่ 25:** แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ในเยื่อบุผนังช่องท้อง ( $\times 100$ )

**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> in NSS

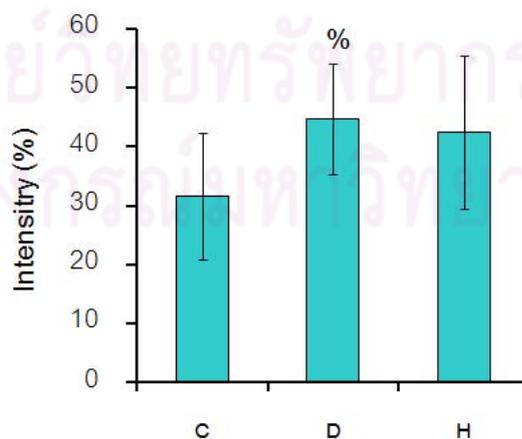


**รูปที่ 26:** แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ในเยื่อบุผนังช่องท้อง ( $\times 400$ )

**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> in NSS



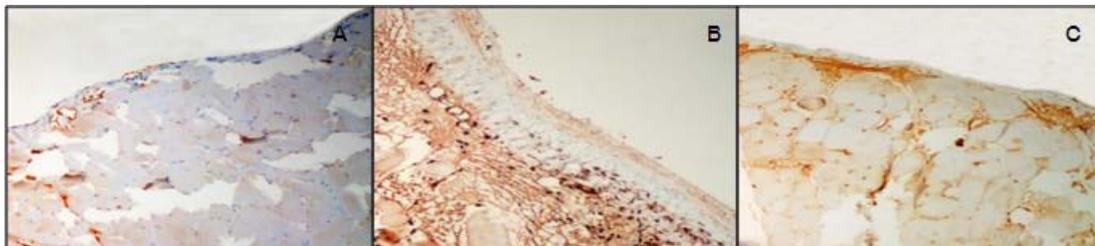
**รูปที่ 27:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลในเยื่อบุผนังช่องท้อง ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อสัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

C กลุ่มควบคุม

D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

หมายเหตุ %พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

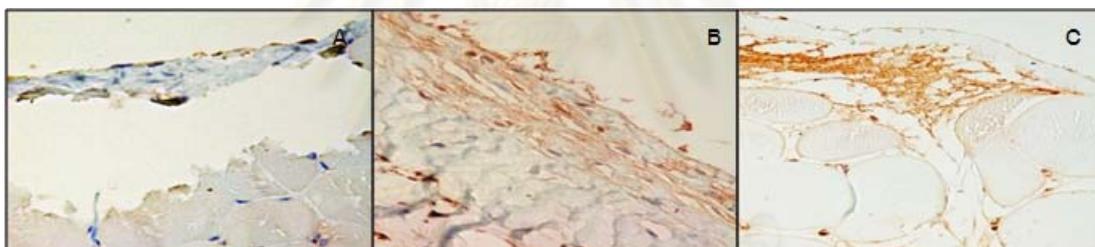


รูปที่ 28: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ในเยื่อผนังช่องท้อง ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ( $\times 100$ )

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

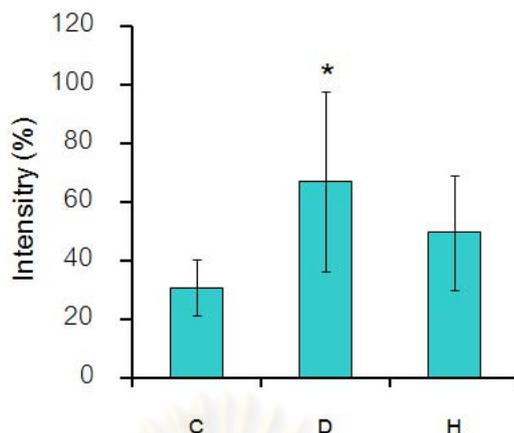


รูปที่ 29: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อ การเกิดภาวะ hypoxia ในเยื่อผนังช่องท้อง ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ( $\times 400$ )

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS



**รูปที่ 30:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลในเยื่อผนังช่องท้อง ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อสัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

C กลุ่มควบคุม

D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

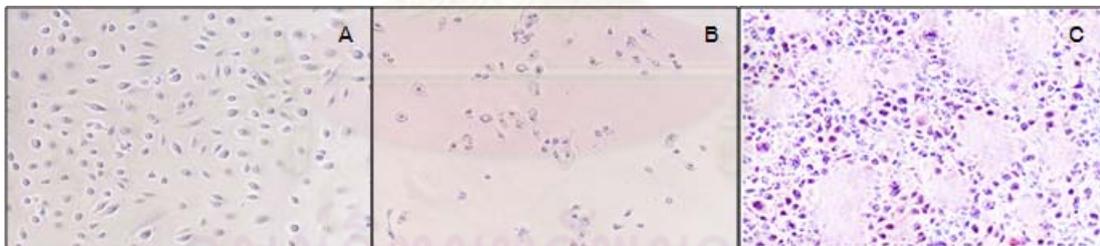
H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ส่วนผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นพบว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  ภายในนิวเคลียสของเซลล์แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.05$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.44 \pm 7.86$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.58 \pm 11.11$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $84.88 \pm 17.59$  %) (รูปที่ 31-33) ซึ่งสอดคล้องกับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ที่พบว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นให้ผลบวกต่อการย้อม ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe นั้นมีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.96 \pm 7.03$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.71 \pm 7.55$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $70.52 \pm 5.16$  %) (รูปที่ 34-36) โดยการติดสีย้อมของทั้ง HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe นั้นมีการย้อมติดสีไม่แตกต่างเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำยา ฟอกไตทางช่องท้องเพิ่มขึ้น โดยพบว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose มีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  ภายในนิวเคลียสของเซลล์แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.05$  (กลุ่มควบคุมมี

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.44 \pm 7.86$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.58 \pm 11.11$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 2.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $41.04 \pm 7.96$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $49.33 \pm 11.82$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $84.88 \pm 17.59$  % (รูปที่ 37-39) ซึ่งสอดคล้องกับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe ที่พบว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นให้ผลบวกต่อการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe นั้นมีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.96 \pm 7.03$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.71 \pm 7.55$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 2.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $48.07 \pm 6.84$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $52.22 \pm 8.98$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $70.52 \pm 5.16$  %) (รูปที่ 40-42)

กล่าวโดยสรุปได้ว่าน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นก่อให้เกิดภาวะ hypoxia ทั้งใน mesothelial cells และภายในช่องท้องของสัตว์ทดลอง

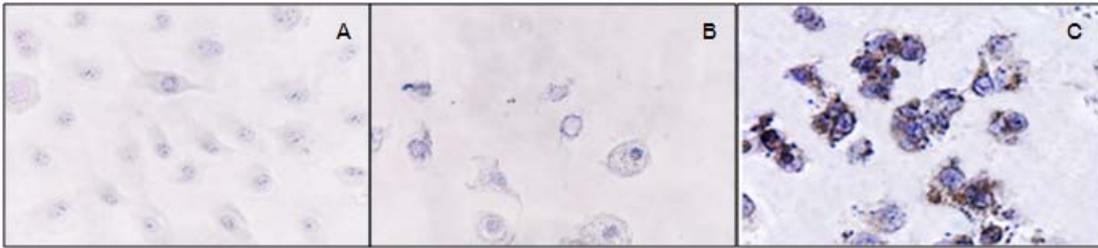


รูปที่ 31: แสดงผลน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

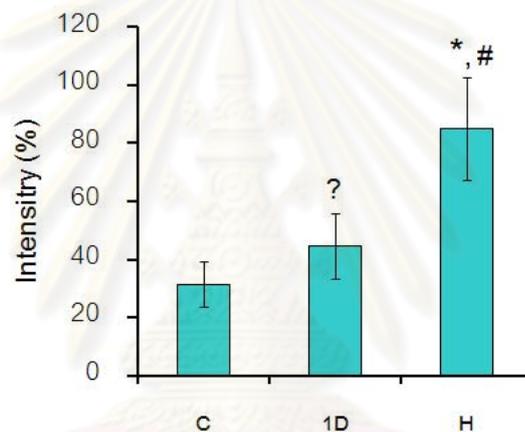


รูปที่ 32: แสดงผลน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 33: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง

C กลุ่มควบคุม

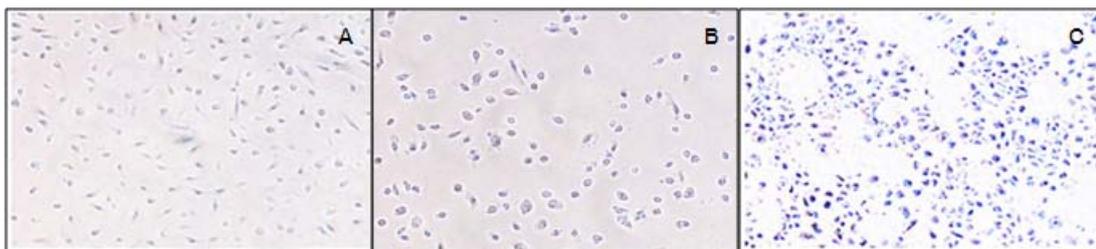
1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

?พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

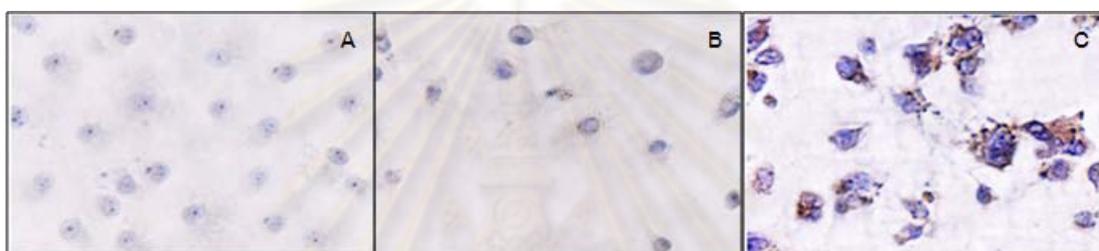


รูปที่ 34: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X100)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

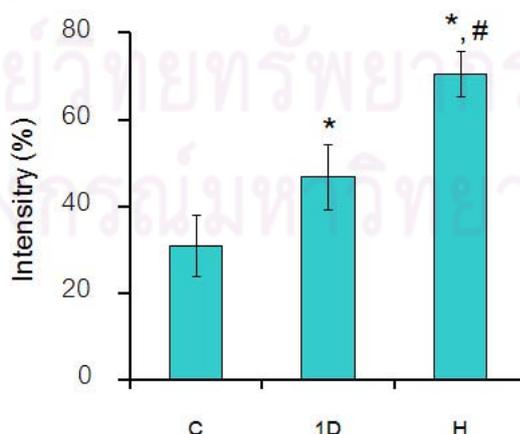


รูปที่ 35: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 36: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง



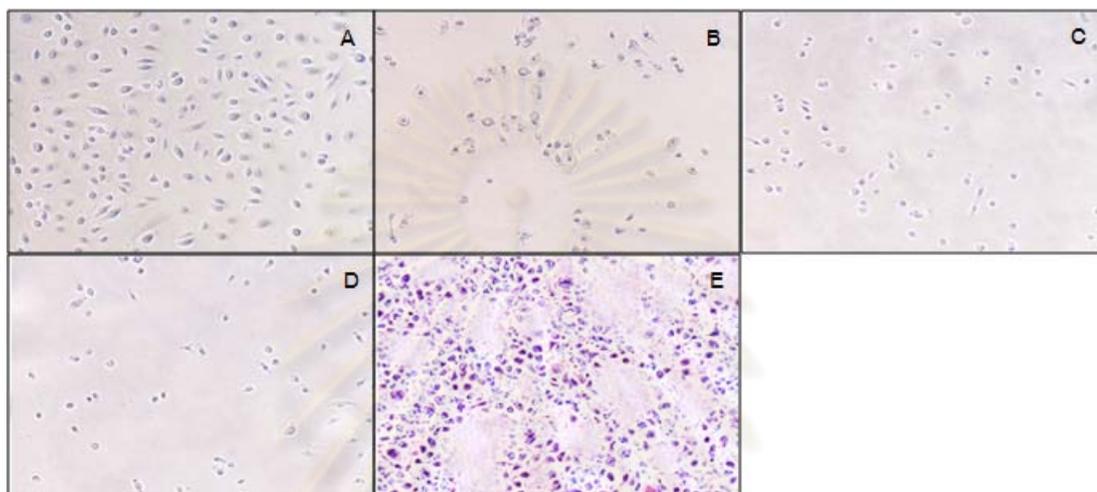
C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF



รูปที่ 37: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X100)

รูป A กลุ่มควบคุม

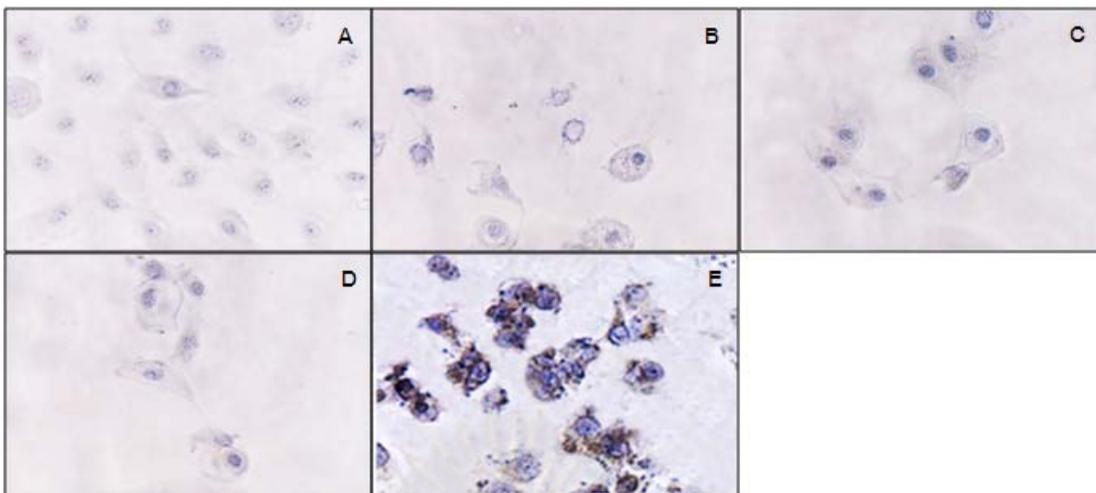
รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 38:** แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

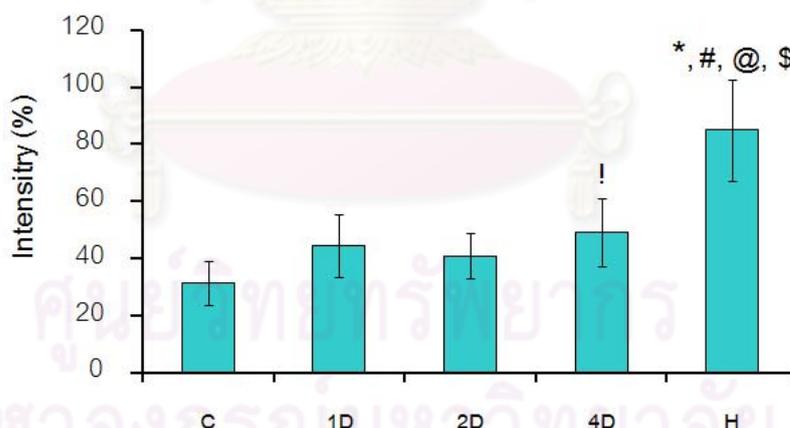
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



**รูปที่ 39:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

**C** กลุ่มควบคุม

**1D** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**2D** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

**4D** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

## H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5%

dextrose PDF

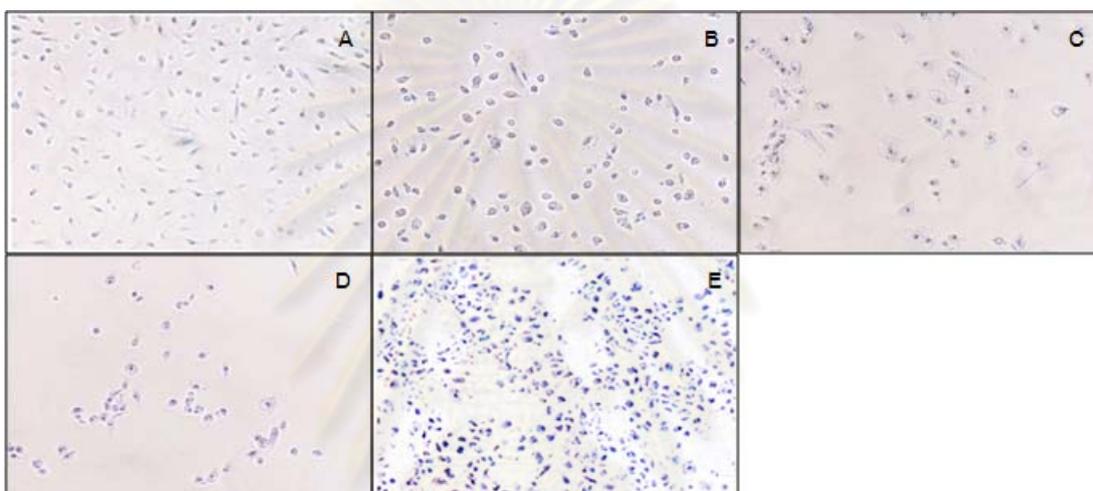
@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5%

dextrose PDF

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25%

dextrose PDF

!พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 40:** แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X100)

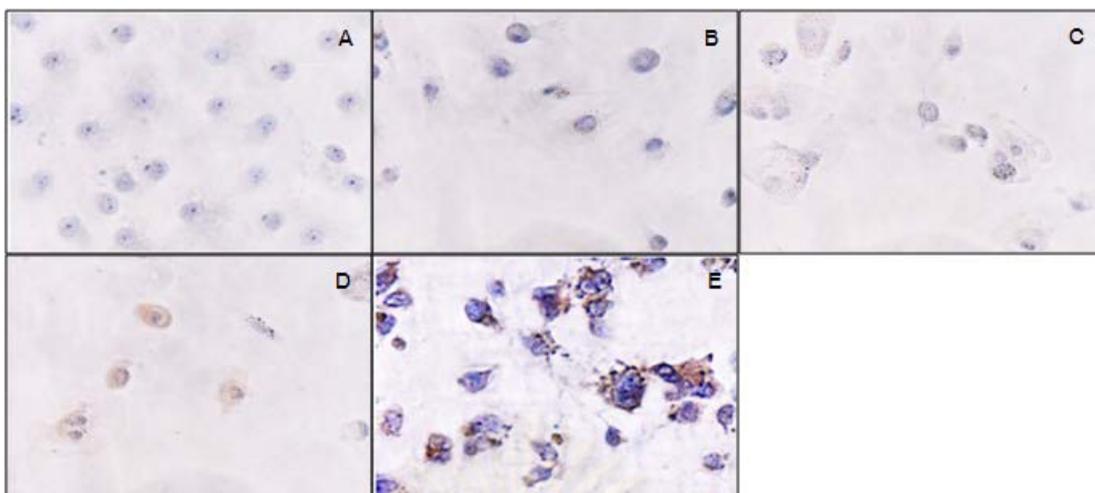
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 41: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อการเกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells ด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe (X400)

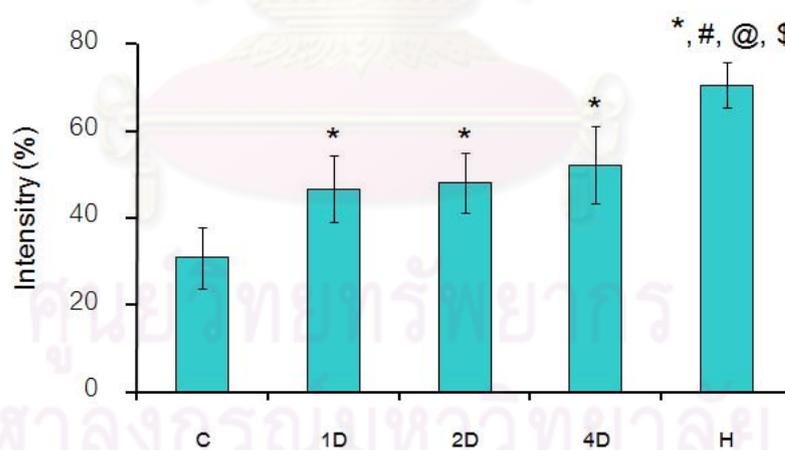
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 42: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

2D กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

4D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

## H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

- หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
- #พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF
- @พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF
- §พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

## 4.2 องค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ก่อให้เกิดภาวะ hypoxia

การศึกษาในหัวข้อนี้ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องกับการเกิดภาวะ hypoxia ซึ่งสืบเนื่องจากการศึกษาข้างต้น ที่พบว่า น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น ก่อให้เกิดภาวะ hypoxia โดยในการศึกษานี้ได้ เลียนแบบสภาพที่เกิดขึ้นจากการล้างไตทางช่องท้อง ได้แก่

- 1) Hyperglycemic condition: จำลองโดยการเติม dextrose ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์
- 2) Hyperosmolarity condition: จำลองโดยการเติม mannitol ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในสารละลายนี้จะมีค่า osmolarity เท่ากันกับ hyperglycemic condition
- 3) Acidic pH condition: จำลองโดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีสภาวะเป็นกรด (ค่า pH = 5.4 ซึ่งเท่ากับกับ pH ในน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง)
- 4) High GDP condition: จำลองโดยการเติมสารในกลุ่ม GDP ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ methylglyoxal (MGO) ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นนี้ เป็นความเข้มข้นที่สามารถตรวจพบในน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose
- 5) Hypoxic condition: จำลองโดยการ บ่มเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ hypoxia (1%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 94%  $\text{N}_2$ )

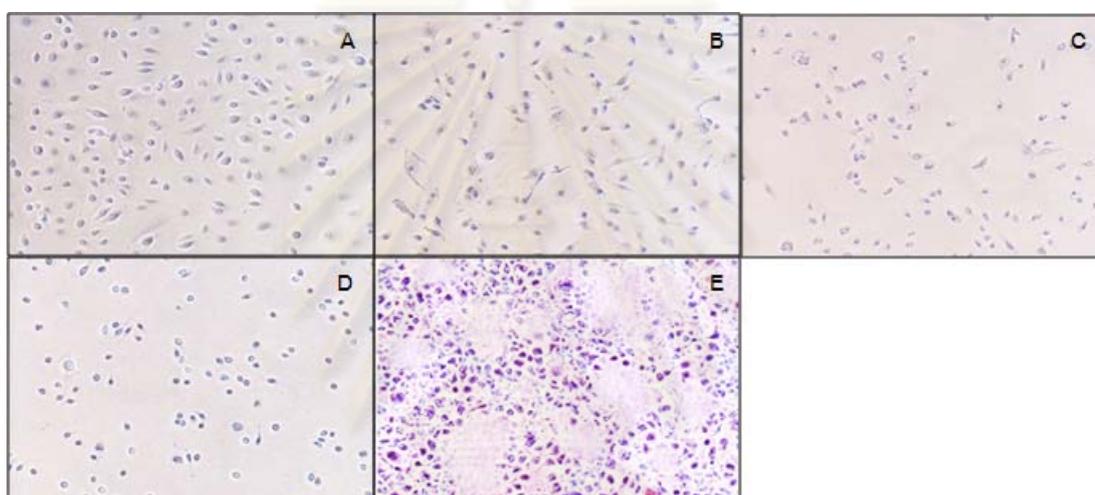
โดยแต่ละกลุ่มการทดลองจะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง (PDF)

### 4.2.1 ผลของ dextrose และ osmolarity ต่อการเกิดภาวะ hypoxia

ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงในกลุ่ม hyperglycemic condition (1.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และ 4.25% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และกลุ่ม hyperosmolarity condition (1.4% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.3% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และ 4.12% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์) นั้นพบว่า องค์ประกอบที่ส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  มากที่สุดโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม hyperglycemic condition และกลุ่ม hyperosmolarity condition กับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia คือ กลุ่มที่มี dextrose (hyperglycemic condition) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่  $p \leq 0.01$  อีกทั้งยังพบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับสารละลายที่มีค่า osmolarity สูงมาก (483 mOsm/L) มีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  มากกว่าเซลล์ที่สัมผัสกับสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (344 mOsm/L และ 395 mOsm/L) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.44 \pm 7.86$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.58 \pm 11.11$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 2.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $41.04 \pm 7.96$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $49.33 \pm 11.82$  % กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $47.86 \pm 12.04$  % กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $43.23 \pm 5.55$  % กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $69.18 \pm 12.69$  % กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $35.80 \pm 4.75$  % กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $40.83 \pm 9.15$  % และกลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $47.68 \pm 5.09$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $84.88 \pm 17.59$  %) (รูปที่ 43-45, 49-51 และ 55-60) ซึ่งผลของการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  นั้นสอดคล้องกับการติดสีย้อมของการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe กล่าวคือ กลุ่มที่มี dextrose (hyperglycemic condition) จะมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.96 \pm 7.03$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.71 \pm 7.55$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 2.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $48.07 \pm 6.84$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 4.25% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $52.22 \pm 8.98$  % กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $43.20 \pm 6.84$  % กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose ในอาหาร

เลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.69 \pm 13.83$  % กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $51.98 \pm 10.30$  % กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $37.68 \pm 5.18$  % กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $38.50 \pm 6.51$  % กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $43.69 \pm 6.30$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $70.52 \pm 5.16$  % (รูปที่ 46-48, 52-54 และ 61-66) ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ชี้ให้เห็นว่า dextrose นั้นก่อให้เกิดภาวะ hypoxia ใน mesothelial cells



รูปที่ 43: แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

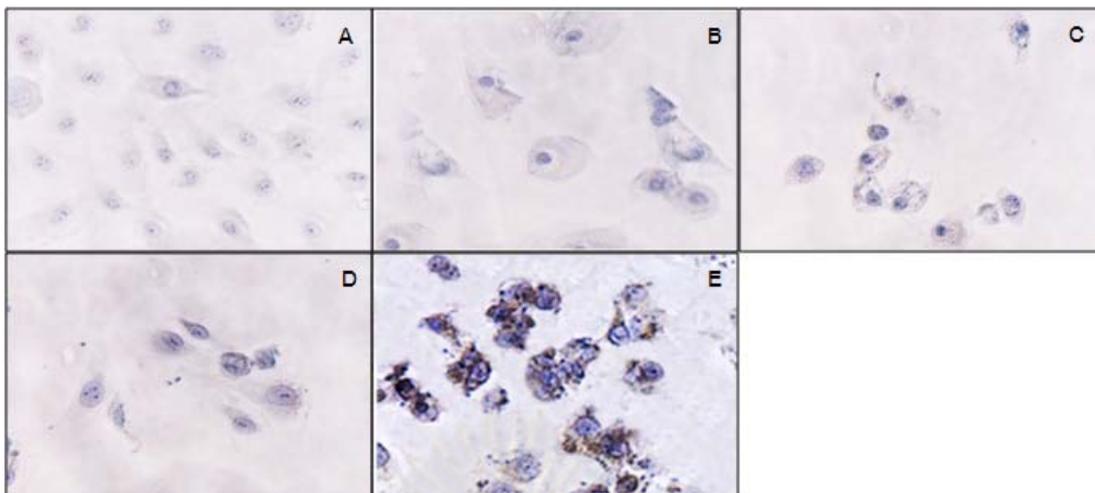
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 44: แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

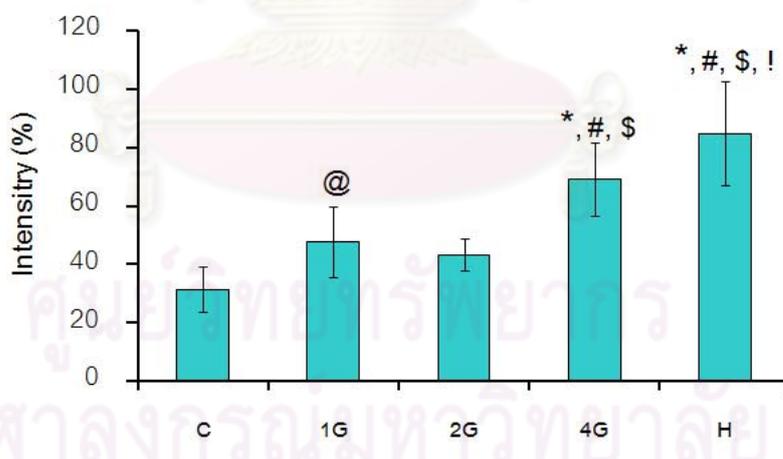
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 45: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C กลุ่มควบคุม

1G กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

2G กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

4G กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media



## H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

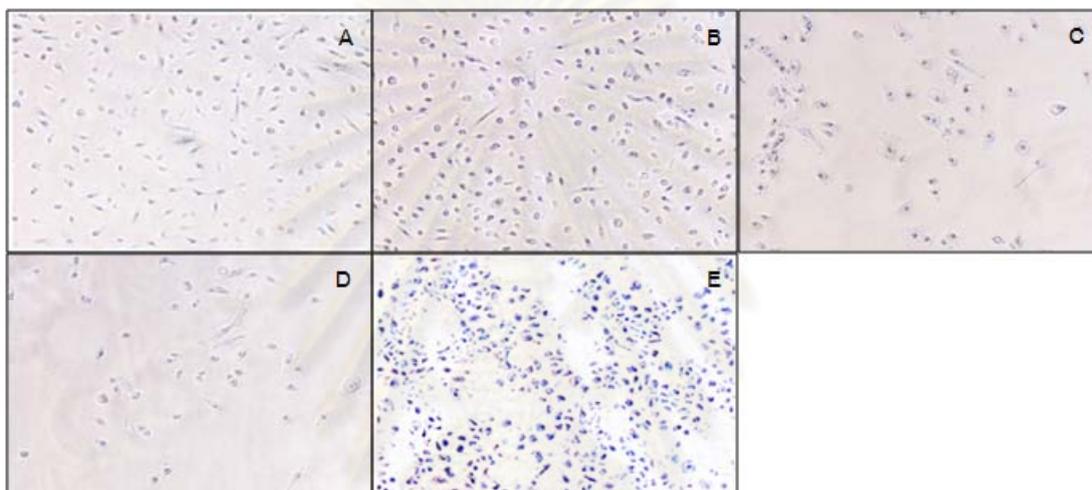
**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

'พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media



**รูปที่ 46:** แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

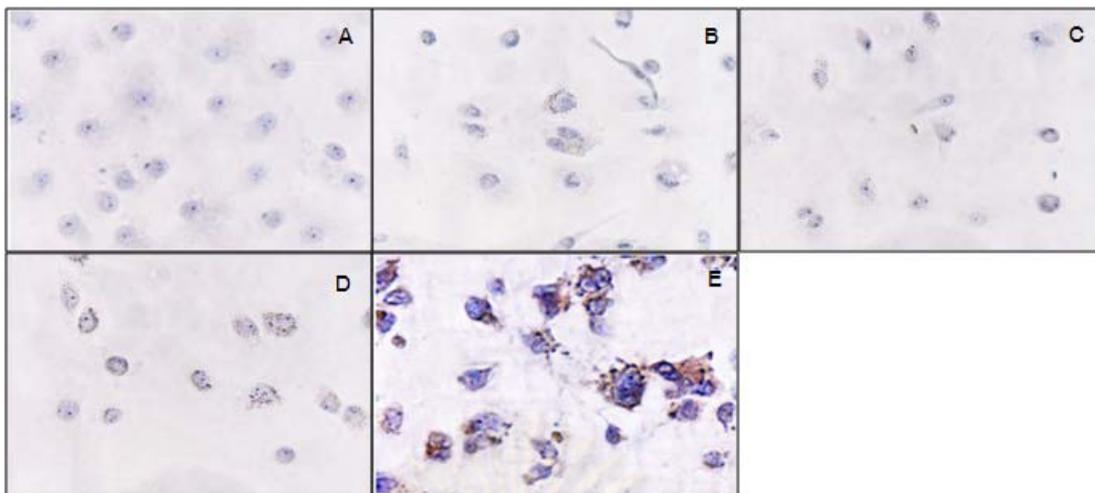
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 47: แสดงผลของ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

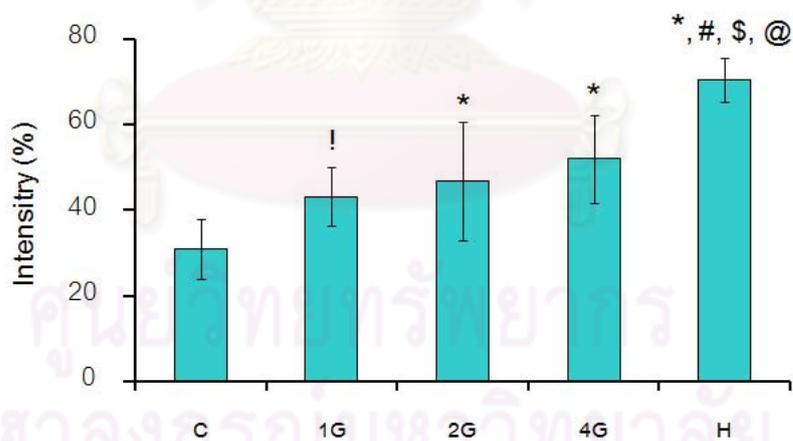
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B แสดง กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 48: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ข้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ dextrose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C กลุ่มควบคุม

1G กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

2G กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

4G กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

## H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

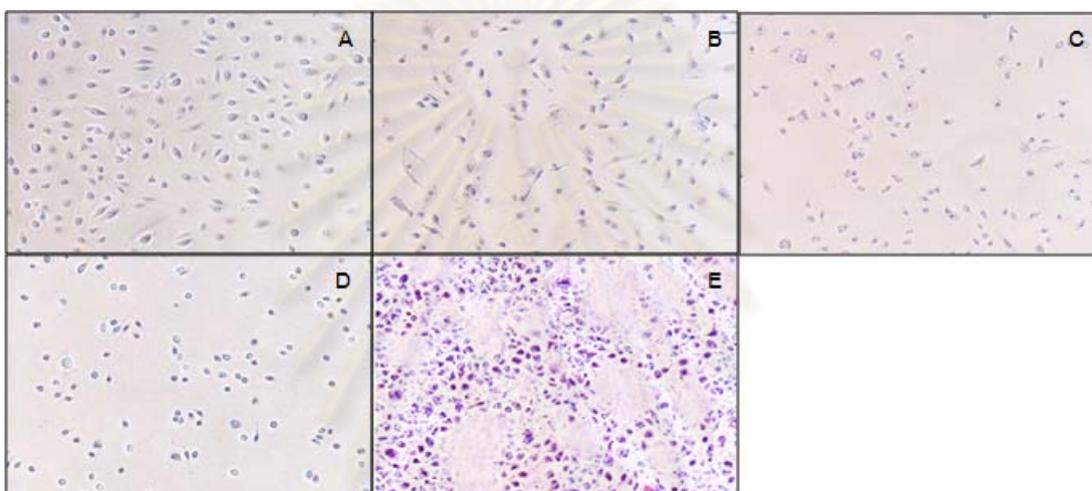
**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

!พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



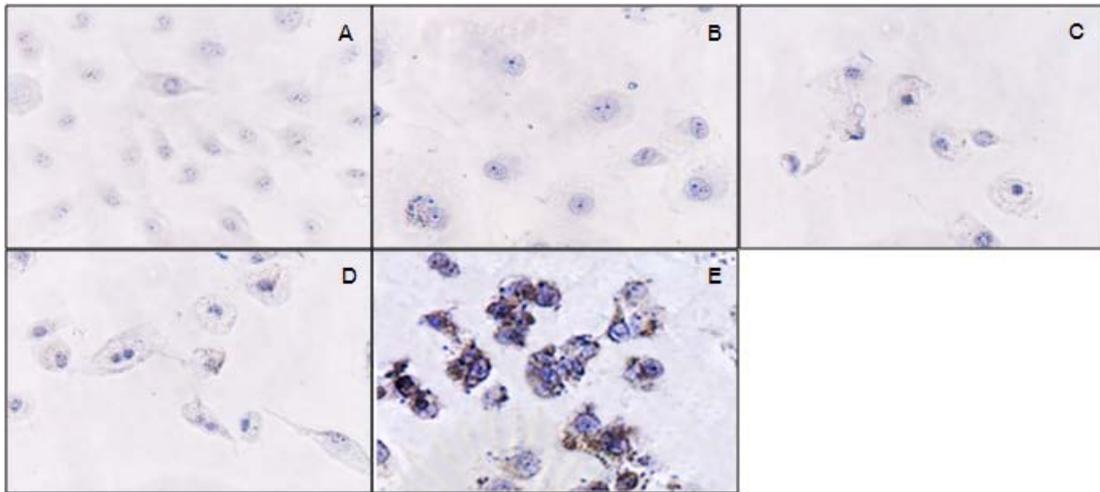
**รูปที่ 49:** แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media



รูปที่ 50: แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

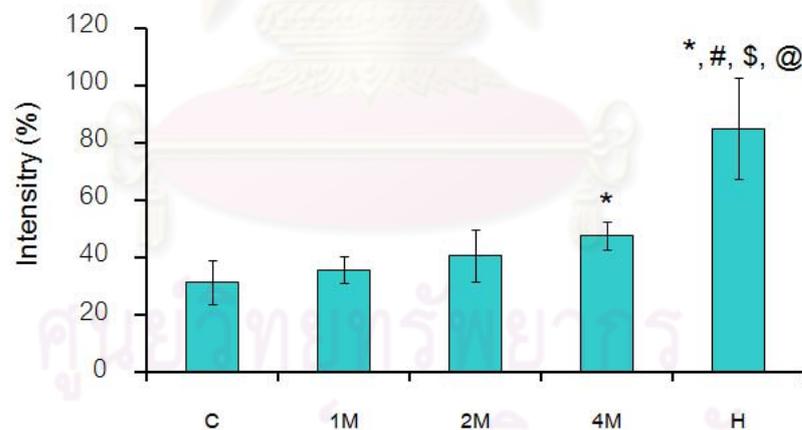
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 51: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C กลุ่มควบคุม

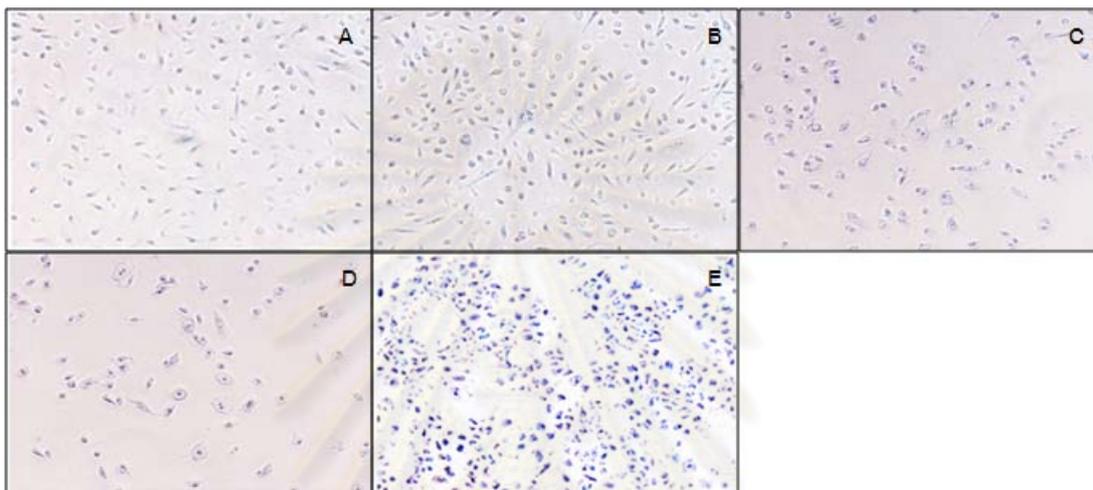
1M กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

2M กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

4M กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

- หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
- #พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media
- รพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media
- @พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media



**รูปที่ 52:** แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

**รูป A** กลุ่มควบคุม

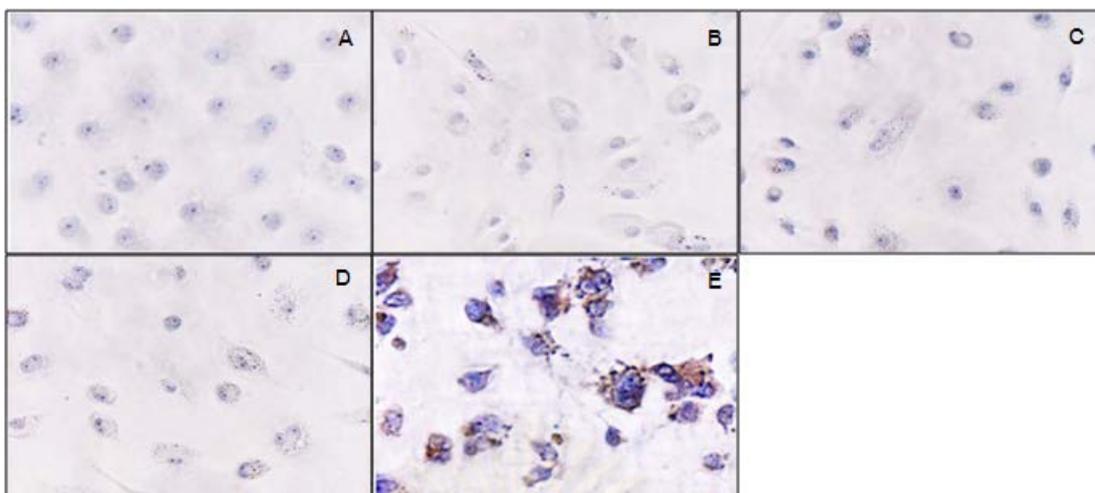
**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53: แสดงผลของ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

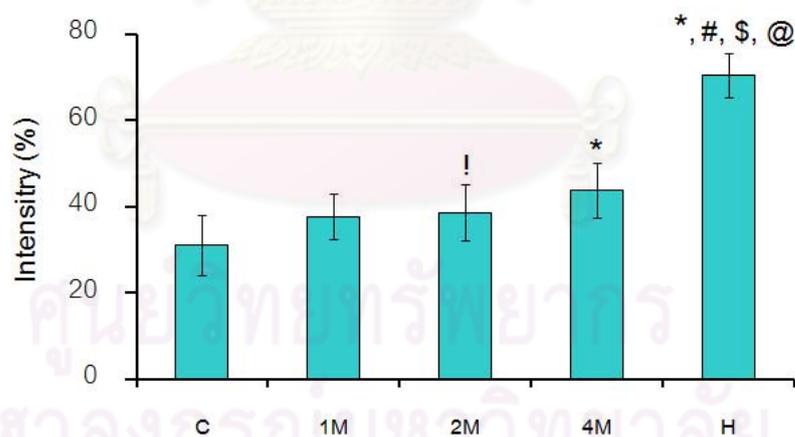
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 54: แสดงร้อยละของความเข้มในภา รติคสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ mannitol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C กลุ่มควบคุม

1M กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

2M กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

4M กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

## H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

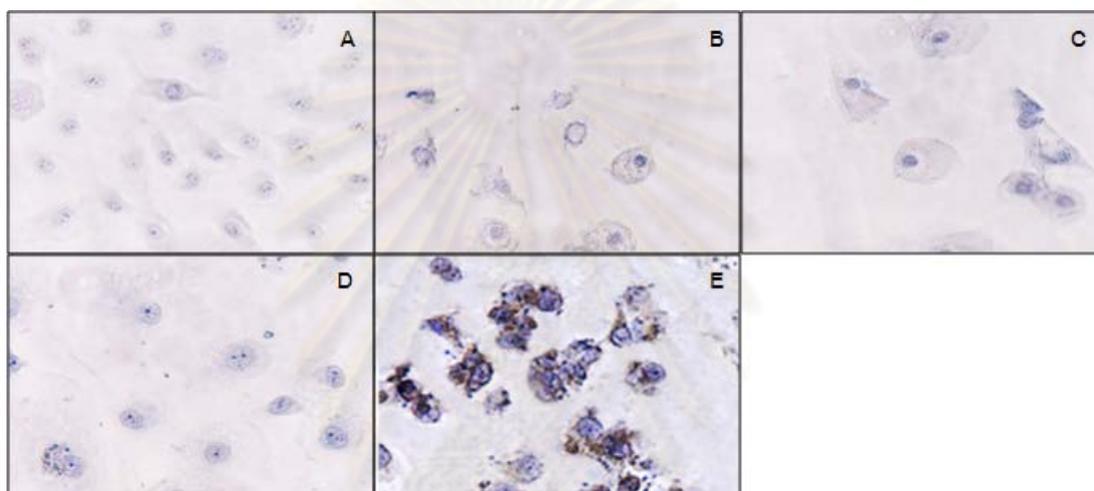
**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

‡พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \text{ value} \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

‡พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 55:** แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

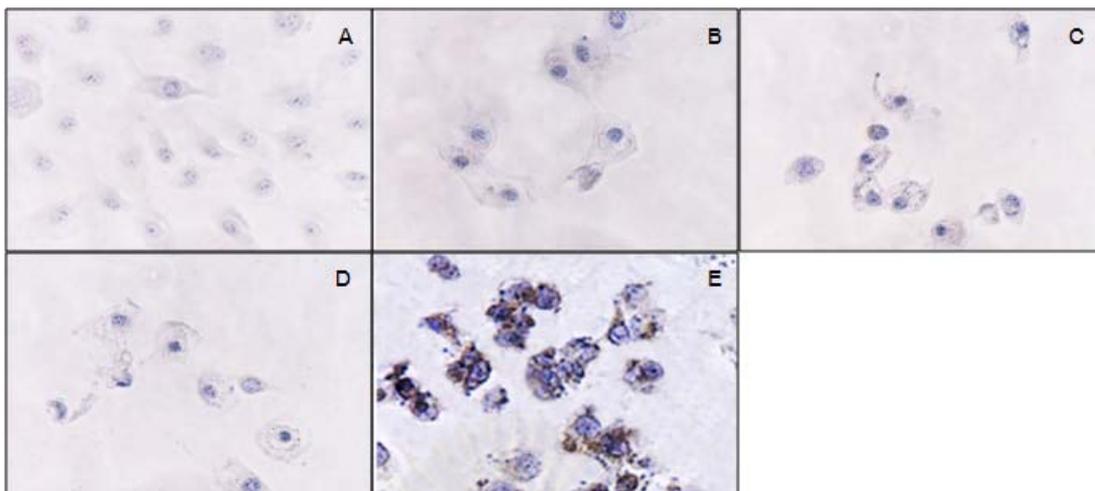
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



**รูปที่ 56:** แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

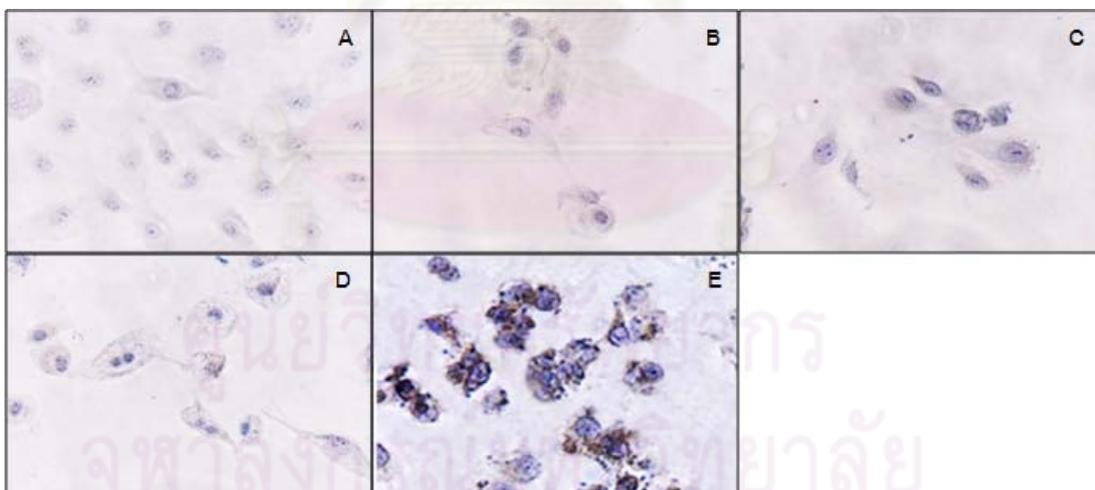
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



**รูปที่ 57:** แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

**รูป A** กลุ่มควบคุม

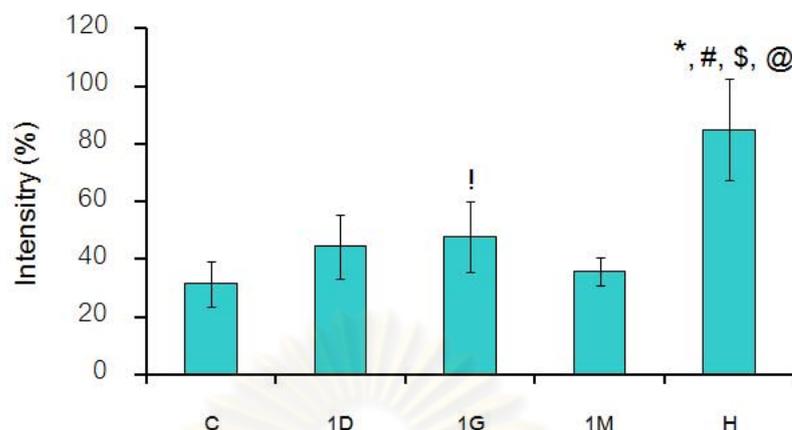
**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media



รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 58: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

1G กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

1M กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

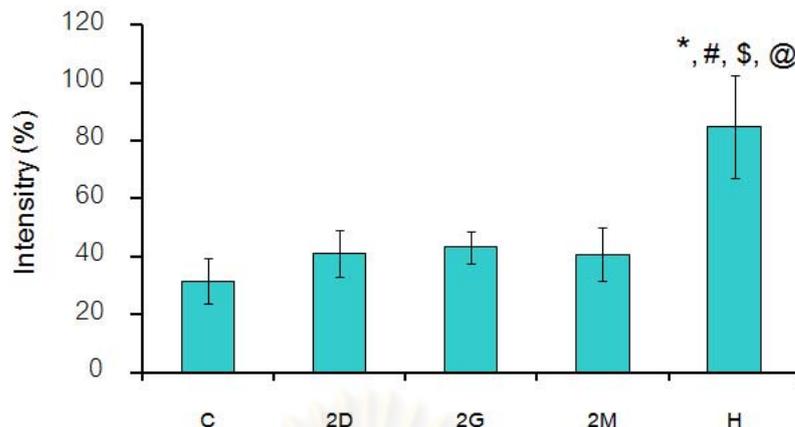
หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

\$พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

!พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 59:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

2D กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

2G กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

2M กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

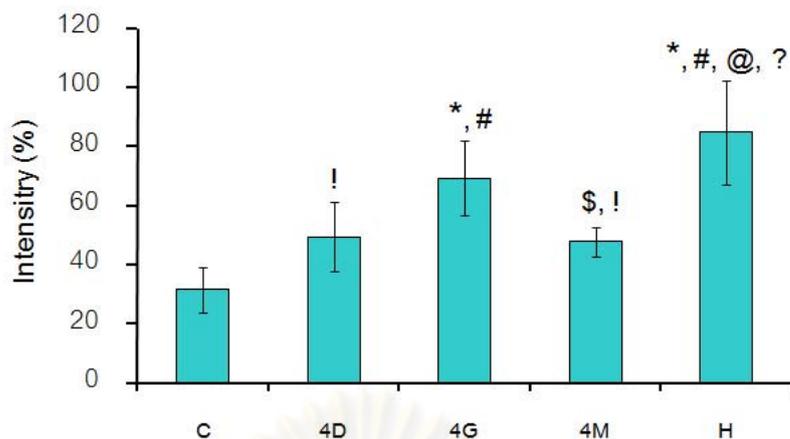
**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

\$พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 60:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ล้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

4D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

4G กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

4M กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

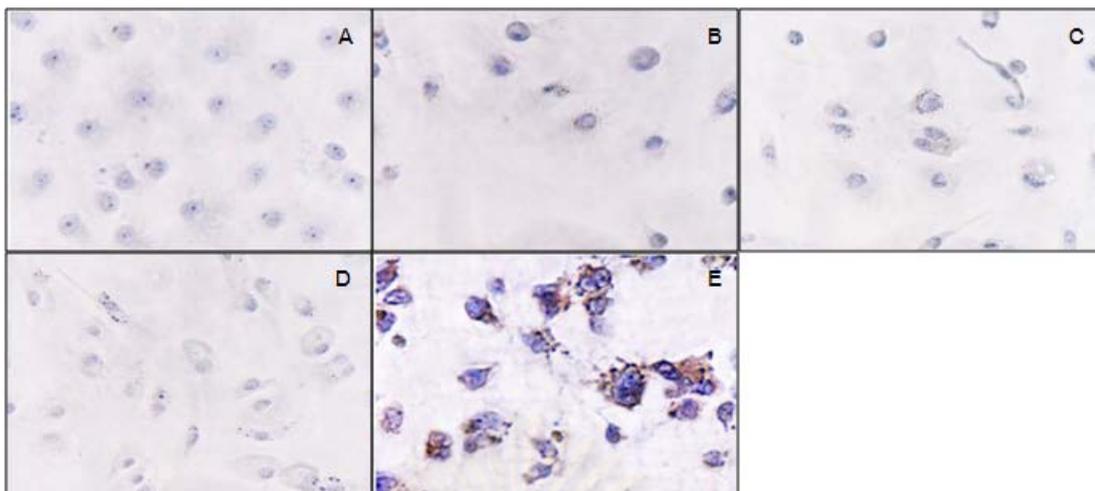
#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

!พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

\$พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

?พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media



**รูปที่ 61:** แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่างๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

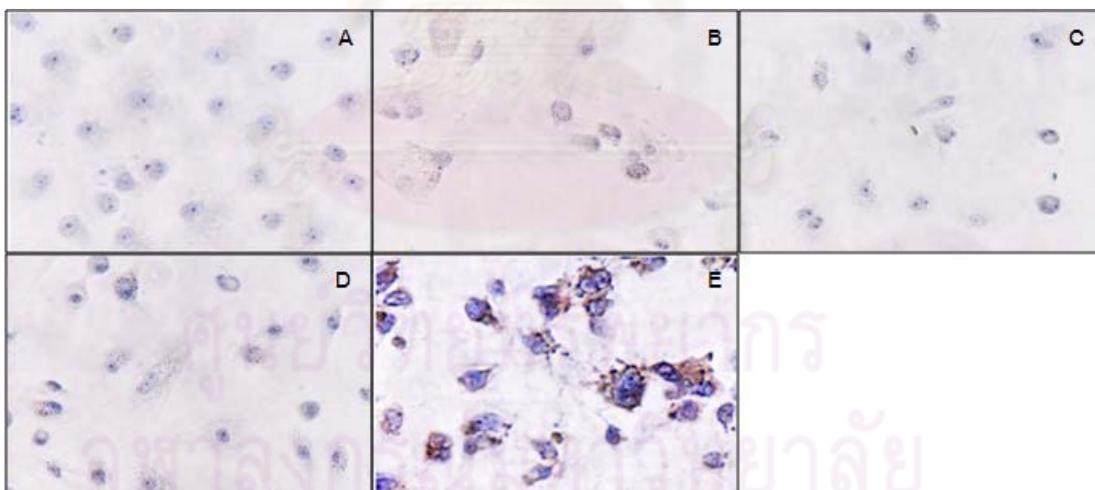
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

**รูป E** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



**รูปที่ 62:** แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่างๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

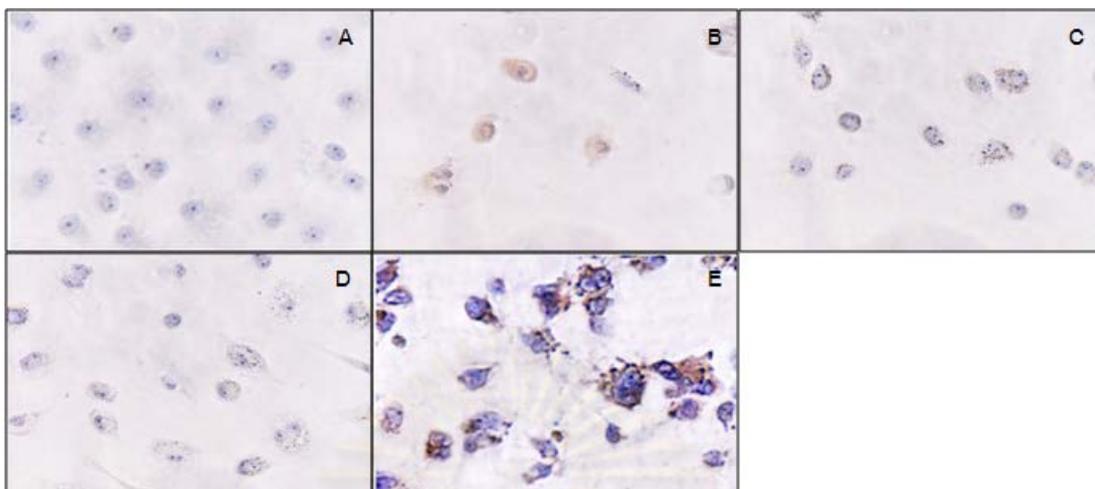
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 63: แสดงผลของ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L) ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

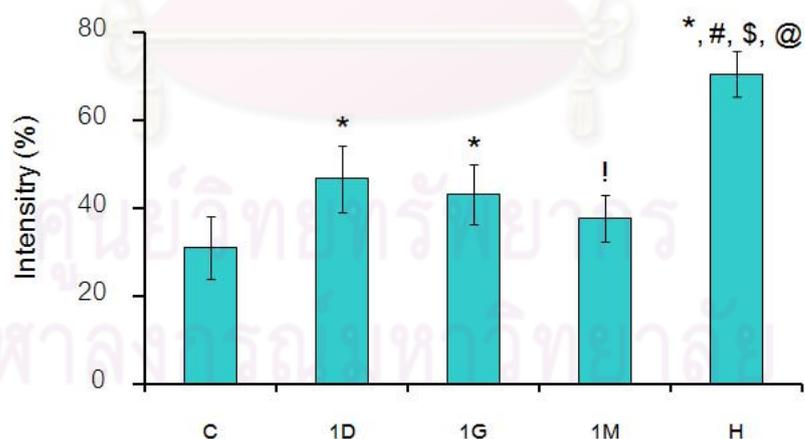
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

รูป E กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 64: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (344 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

1G กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

1M กลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

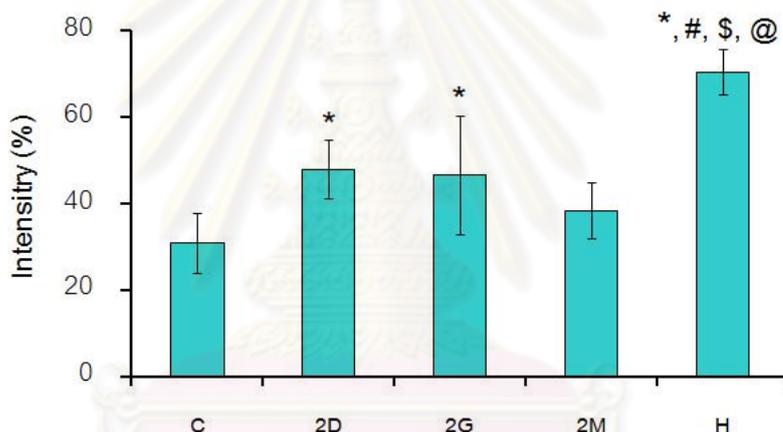
**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

\$พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.4% mannitol in culture media

'พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF



**รูปที่ 65:** แสดง ร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (395 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

2D กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

2G กลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

2M กลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media

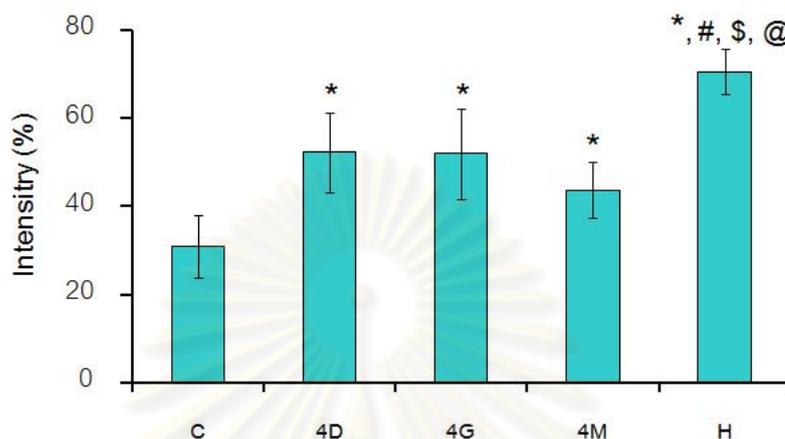
H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose PDF

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.5% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 2.3% mannitol in culture media



**รูปที่ 66:** แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาล ในเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับ osmotic agent ชนิดต่าง ๆ ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน (483 mOsm/L)

C กลุ่มควบคุม

4D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

4G กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

4M กลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

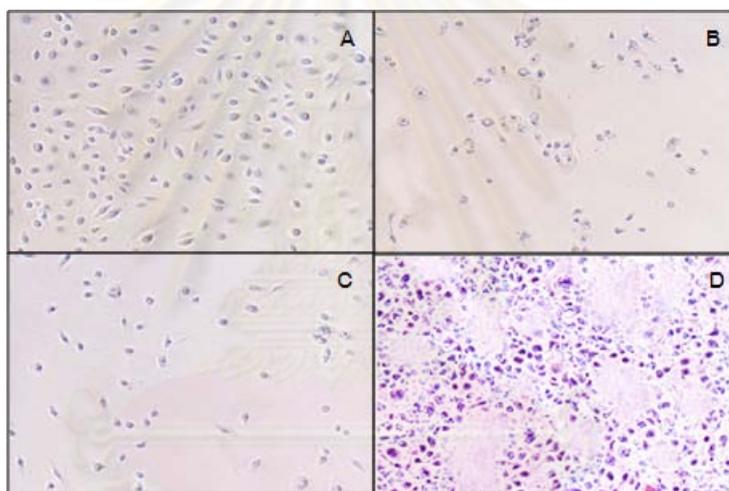
\$พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 4.12% mannitol in culture media

#### 4.2.2 ผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการเกิดภาวะ hypoxia

ผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการเกิดภาวะ hypoxia นั้นพบว่ามีการแสดงออกของ โปรตีน HIF-1 $\alpha$  ใกล้เคียงกับในกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และมีความแตกต่างจาก กลุ่มควบคุม (กลุ่มควบคุมมี เปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.44 \pm 7.86$  %

กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.58 \pm 11.11$  % กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรดมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $40.34 \pm 7.52$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $84.88 \pm 17.59$  %) (รูปที่ 67-69) แต่ผลจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe นั้นแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การติดสีจากการย้อมในกลุ่มที่มีสภาวะเป็นกรดนั้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.05$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.96 \pm 7.03$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.71 \pm 7.55$  % กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรดมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $32.62 \pm 16.50$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $70.52 \pm 5.16$  %) (รูปที่ 70-72)



**รูปที่ 67:** แสดงผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

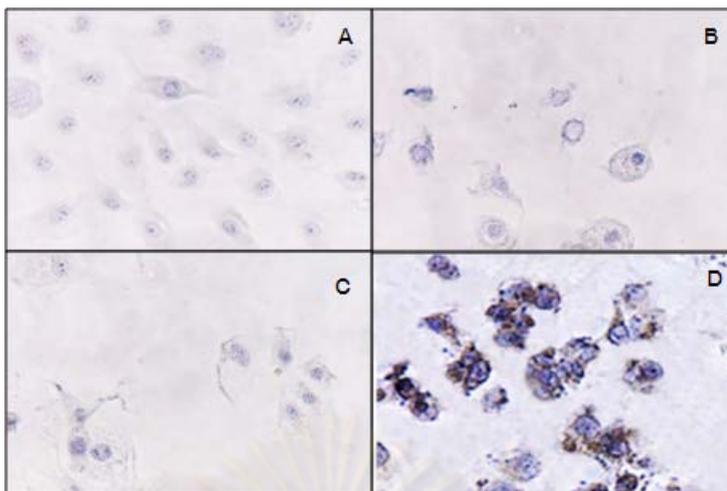
**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia





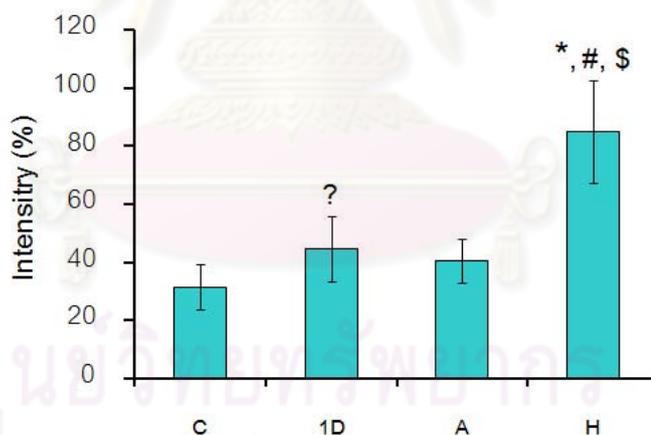
รูปที่ 68: แสดงผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 69: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรด

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

A กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

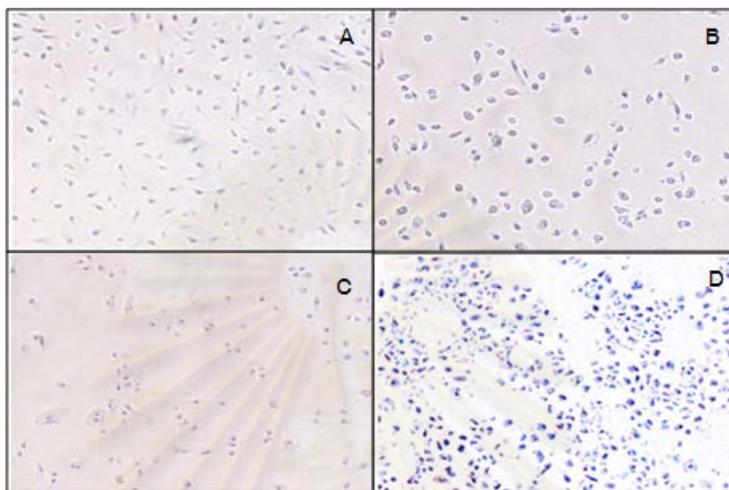
H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

?พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



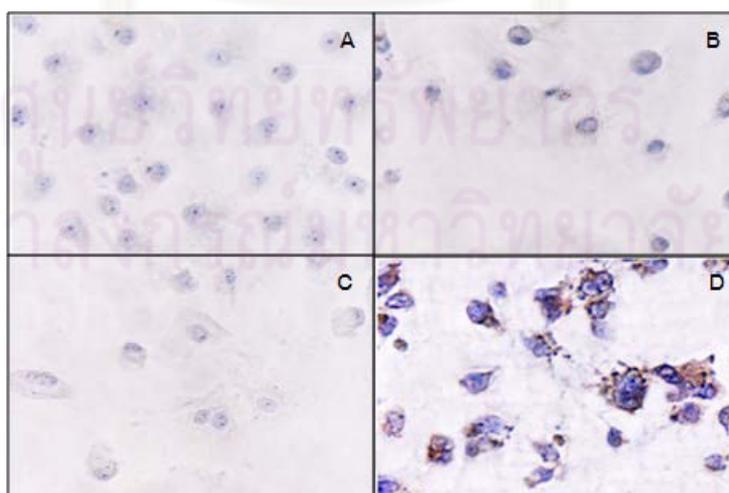
**รูปที่ 70:** แสดงผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X100)

**รูป A** กลุ่มควบคุม

**รูป B** กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

**รูป C** กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

**รูป D** กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



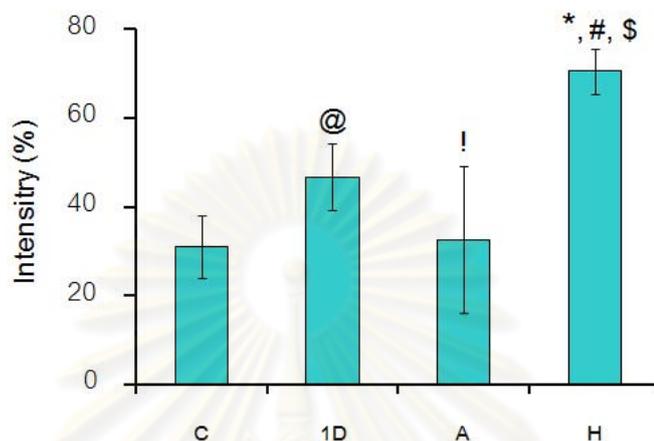
**รูปที่ 71:** แสดงผลของสภาวะที่เป็นกรดต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (X400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 72: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะเป็นกรด

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

A กลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

!พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ culture media pH 5.4

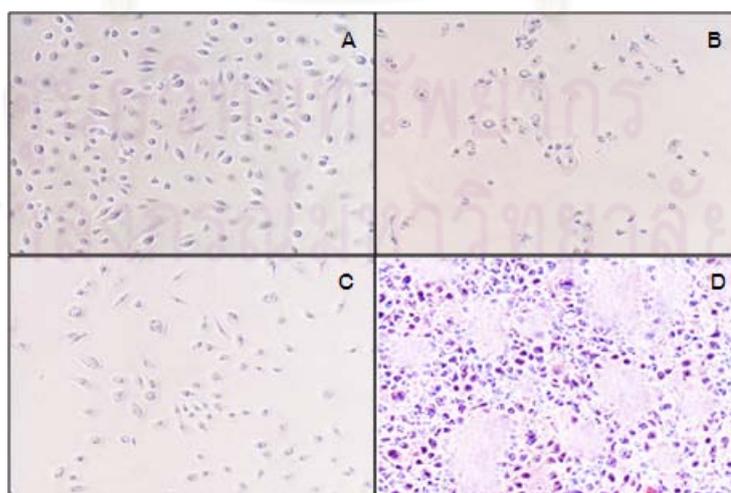
@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

'พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

PDF

#### 4.2.3 ผลของสภาวะที่มีสารในกลุ่ม glucose degradation product (GDP) ต่อการเกิดภาวะ hypoxia

สารในกลุ่ม glucose degradation product (GDP) เช่น methylglyoxal (MGO) ที่พบในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ hypoxia เช่นกัน กล่าวคือ เซลล์เพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ MGO นั้นมีการแสดงออกของโปรตีน HIF-1 $\alpha$  ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $31.44 \pm 7.86$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $44.58 \pm 11.11$  % กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu\text{M}$  MGO ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $43.71 \pm 4.26$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $84.88 \pm 17.59$  %) (รูปที่ 73-75) แต่ผลจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ hypoxyprobe นั้นแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การติดสีจากการย้อมในกลุ่มที่ได้รับ MGO มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  และอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \leq 0.05$  อีกทั้งยังมีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia อย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $30.96 \pm 7.03$  % กลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง 1.5% dextrose มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $46.71 \pm 7.55$  % กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu\text{M}$  MGO ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $55.17 \pm 5.61$  % และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของการติดสีน้ำตาลเท่ากับ  $70.52 \pm 5.16$  %) (รูปที่ 76-78)



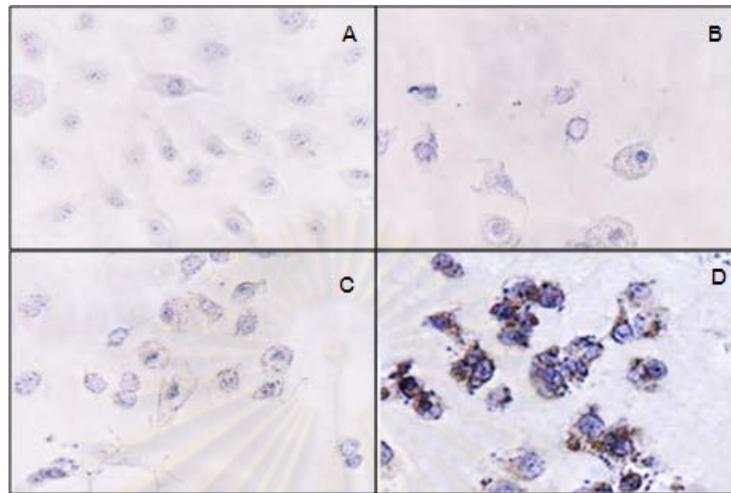
รูปที่ 73: แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



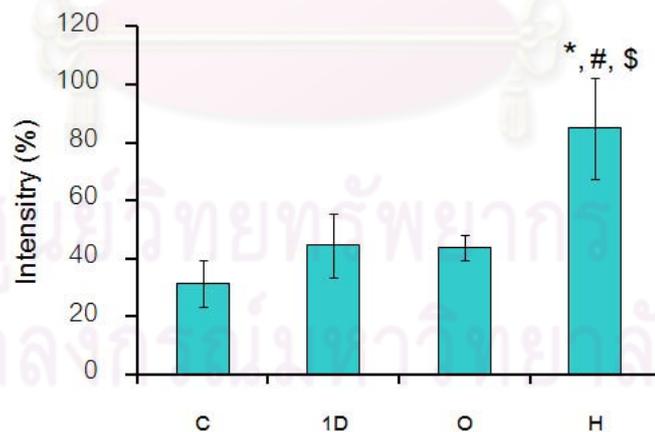
รูปที่ 74: แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน mesothelial cells (X400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 75: แสดงร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MGO

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

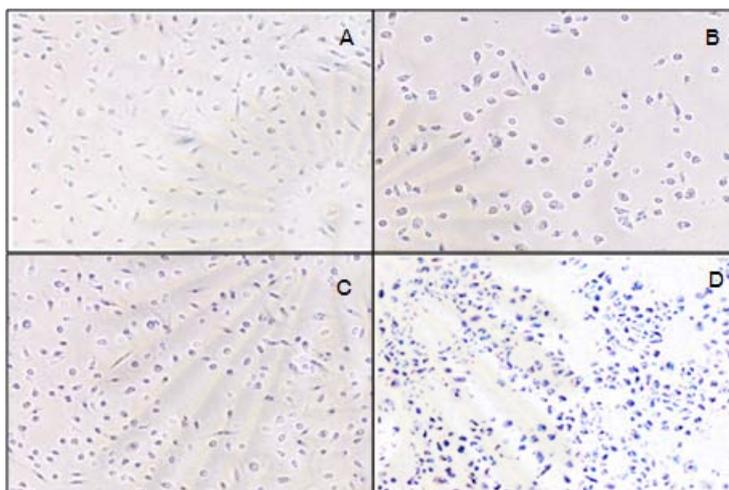
O กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media



รูปที่ 76: แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells ( $\times 100$ )

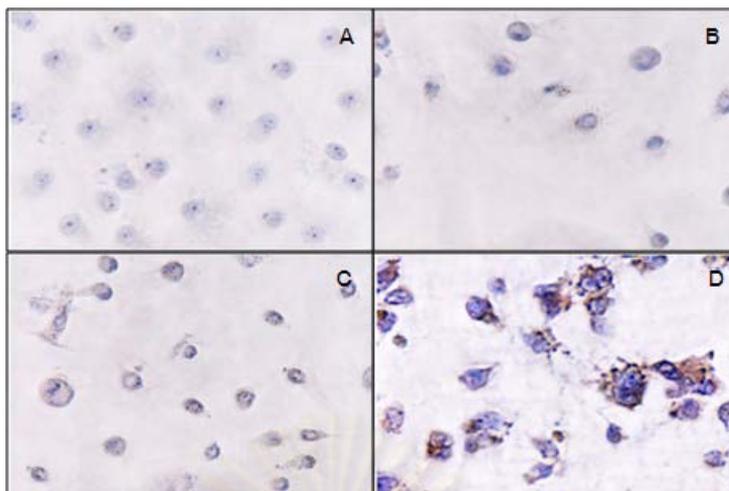
รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



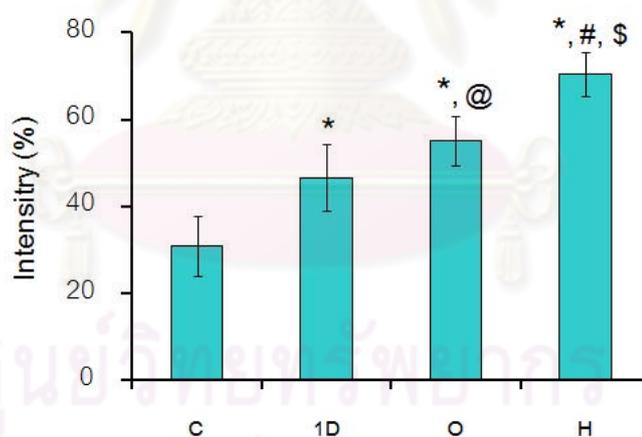
รูปที่ 77: แสดงผลของ MGO ต่อการแสดงออกของ hypoxyprobe ใน mesothelial cells (×400)

รูป A กลุ่มควบคุม

รูป B กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

รูป C กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

รูป D กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia



รูปที่ 78: แสดง ร้อยละของความเข้มในการติดสีน้ำตาลใน mesothelial cells ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อ hypoxyprobe เมื่อเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MGO

C กลุ่มควบคุม

1D กลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

O กลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

H กลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

§พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 20  $\mu$ M MGO in culture media

@พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p$  value  $\leq 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 1.5% dextrose PDF

กล่าวโดยสรุปได้ว่า น้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง หรือน้ำที่ก่อให้เกิดภาวะ hypoxia และองค์ประกอบของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่มีความสัมพันธ์กับ เกิดภาวะ hypoxia นั้นเป็นผลสะสมจากองค์ประกอบต่างๆของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องโดยองค์ประกอบที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ hypoxia มากที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคสและอนุพันธ์ที่เกิดจากระบวนการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคส (GDP)

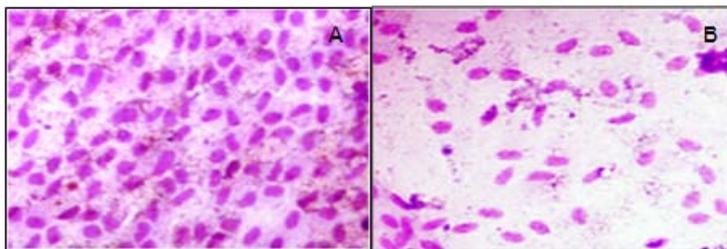
#### 4.3 น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องโดยผ่านทาง การเกิดภาวะ hypoxia

##### 4.3.1 ภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้อง

4.3.1.1 การศึกษาการจัดเรียงตัวของ mesothelial cells ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

ทำการศึกษา mesothelial monolayer ด้วยการลอก mesothelial monolayer จาก anterior surface ของตับ โดยวิธี liver imprint ในสัตว์ทดลอง และทำการย้อม mesothelial monolayer ที่ได้ด้วยสี giemsa พบว่านิวเคลียสติดสีม่วง และ mesothelial cells แต่ละเซลล์ยึดติดกับเซลล์รอบข้างอย่างต่อเนื่อง จนก่อให้เกิดแผ่นของเซลล์ชั้นบาง ๆ จำนวน 1 ชั้น หุ้มล้อมรอบผิวตับ โดยแผ่นเซลล์ที่ได้จาก ในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic นั้นพบการหลุดลอกของ mesothelial cells มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  นอกจากนี้ยังพบ apoptotic nuclei ในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic อีกด้วย (กลุ่มควบคุมมีความหนาแน่นของ nuclei เท่ากับ  $2261.48 \pm 381.11$  nuclei/mm<sup>2</sup> ส่วนกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีความหนาแน่นของ nuclei เท่ากับ  $1325.80 \pm 116.38$  nuclei/mm<sup>2</sup>) (รูปที่ 79-80)

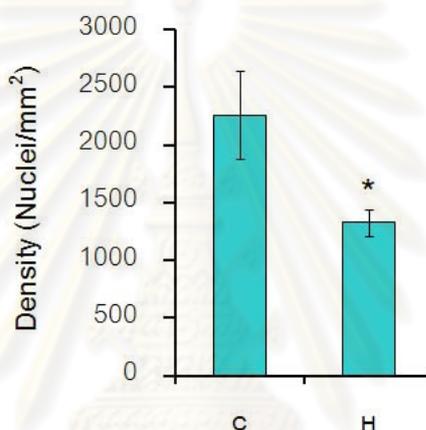




รูปที่ 79: แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ mesothelial monolayer จาก anterior surface ของตับโดยวิธี liver imprint (X200)

A กลุ่มควบคุม

B กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS



รูปที่ 80: แสดงความหนาแน่นของ nuclei of mesothelial cells ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

C กลุ่มควบคุม

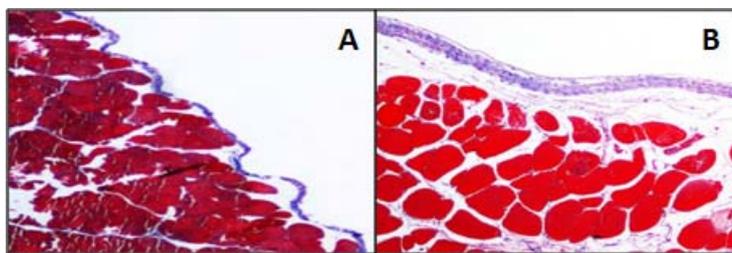
H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 4.3.1.2 การศึกษาการหนาตัวของชั้น submesothelium ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

การศึกษาการหนาตัวของชั้น submesothelium ในส่วน parietal peritoneum ของ abdominal wall สามารถประเมินได้จากการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี masson's trichrome ซึ่งบริเวณที่ติดสีน้ำเงินบ่งชี้ว่าเป็นบริเวณที่พบ collagen bundle หรือบริเวณที่มีการเกิดพังผืด (fibrosis) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic นั้นมีการหนาตัวของชั้น submesothelium มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มควบคุมมีความหนาของชั้น

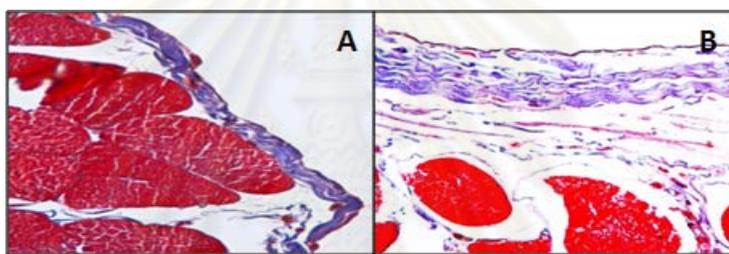
submesothelium เท่ากับ  $16.16 \pm 2.59 \mu\text{m}$  ส่วนกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia มีความหนาของชั้น submesothelium เท่ากับ  $32.20 \pm 14.14 \mu\text{m}$ ) (รูปที่ 81-83)



**รูปที่ 81:** แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome ( $\times 100$ )

A กลุ่มควบคุม

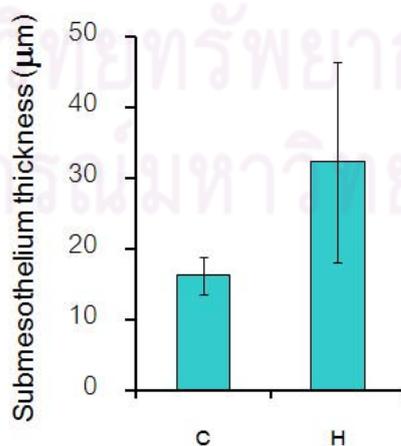
B กลุ่มที่ได้รับ  $100 \mu\text{M CoCl}_2$  in NSS



**รูปที่ 82:** แสดงผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome ( $\times 400$ )

A กลุ่มควบคุม

B กลุ่มที่ได้รับ  $100 \mu\text{M CoCl}_2$  in NSS



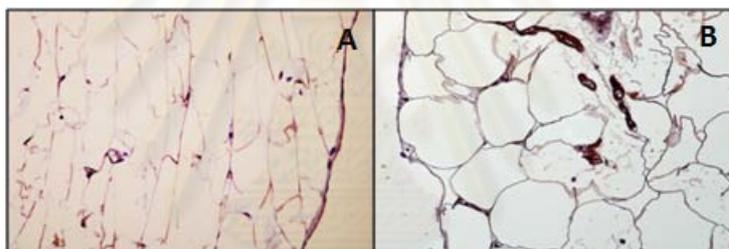
**รูปที่ 83:** แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จาก abdominal parietal peritoneum ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

C กลุ่มควบคุม

H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

#### 4.3.1.3 การศึกษาการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

การนับจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่ในชั้นเนื้อส่วน visceral peritoneum ในส่วนของ bowel นั้นสามารถทำได้โดยการฉีด biotinylated lectin เข้าไปในหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลองก่อนทำการ sacrifice ซึ่ง lectin เหล่านี้จะจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวของ endothelial cells อย่างแน่นหนา เมื่อผ่านการย้อมขึ้นเนื้อด้วย streptavidin ที่ติดสลา (streptavidin สามารถจับได้เฉพาะกับ biotin) ก็จะทำให้สามารถนับจำนวนหลอดเลือดได้อย่างง่ายดาย ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic นั้นพบว่ามีจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เท่ากับ  $1.0 \pm 1.0$  ส่วนกลุ่ม hypoxia-mimic มีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เท่ากับ  $9.33 \pm 2.08$ ) (รูปที่ 84-85)

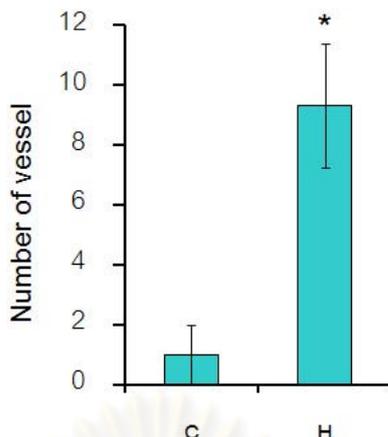


รูปที่ 84: แสดง ผลของภาวะ hypoxia-mimic ต่อจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ( $\times 200$ )

A กลุ่มควบคุม

B กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 85: แสดงจำนวนของหลอดเลือดที่ติด lectin ต่อพื้นที่ ในหนูที่ได้รับภาวะ hypoxia-mimic

C กลุ่มควบคุม

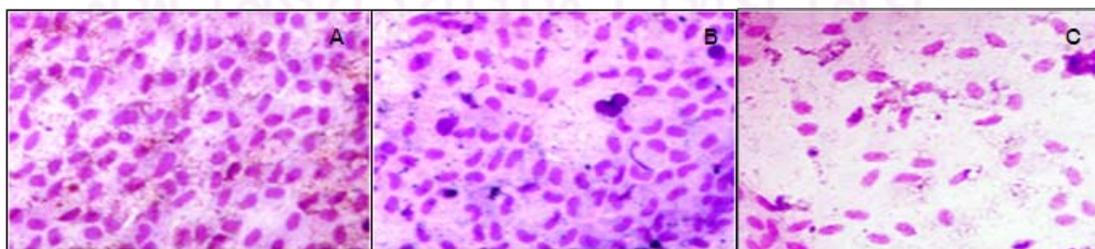
H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 4.3.2 น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia กับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้อง

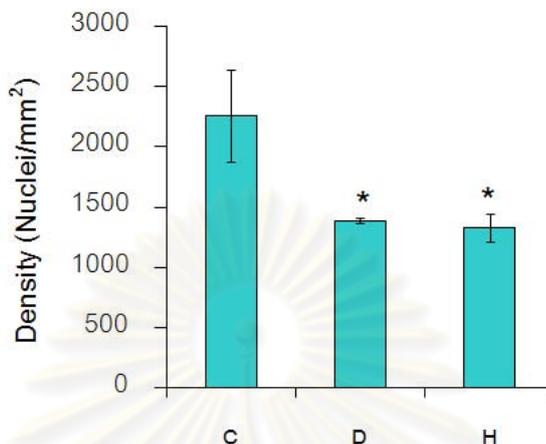
4.3.2.1 การศึกษาการจัดเรียงตัวของ mesothelial cells ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic

จากการศึกษานี้พบว่าแผ่นเซลล์ที่ได้จากในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกช่องท้องนั้นพบการหลุดลอกของ mesothelial cells ใกล้เคียงกับในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic และพบการหลุดลอกของ mesothelial cells มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  นอกจากนี้ยังพบ apoptotic nuclei อีกด้วย (กลุ่มควบคุมมีความหนาแน่นของ nuclei เท่ากับ  $2261.48 \pm 381.11$  nuclei/ $\text{mm}^2$  ส่วนกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกช่องท้องมีความหนาแน่นของ nuclei เท่ากับ  $1389.80 \pm 25.86$  nuclei/ $\text{mm}^2$  และกลุ่ม hypoxia-mimic มีความหนาแน่นของ nuclei เท่ากับ  $1325.80 \pm 116.38$  nuclei/ $\text{mm}^2$ ) (รูปที่ 86-87)



รูปที่ 86: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ mesothelial monolayer จาก anterior surface ของตับโดยวิธี liver imprint ( $\times 200$ )

- A กลุ่มควบคุม
- B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS



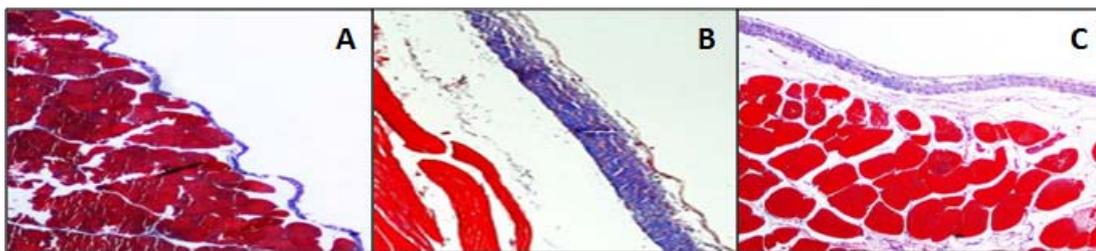
**รูปที่ 87:** แสดงความหนาแน่นของ nuclei of mesothelial cells ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic

- C กลุ่มควบคุม
- D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

**หมายเหตุ** \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

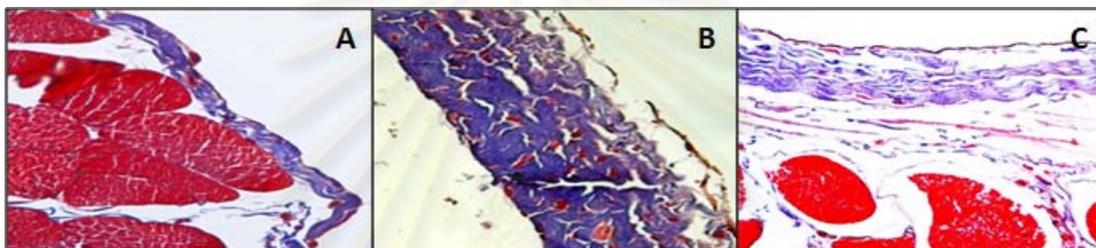
#### 4.3.2.2 การศึกษาการหนาตัวของชั้น submesothelium ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic

ผลการศึกษาการหนาตัวของชั้น submesothelium พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีความหนาของ ชั้น submesothelium ใกล้เคียงกับในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic และพบว่าความหนาของชั้น submesothelium ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มควบคุมมีความหนาของชั้น submesothelium เท่ากับ  $16.16 \pm 2.59 \mu\text{m}$  ส่วนกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง มีความหนาของชั้น submesothelium เท่ากับ  $43.60 \pm 32.55 \mu\text{m}$  และกลุ่ม hypoxia-mimic มีความหนาของชั้น submesothelium เท่ากับ  $32.20 \pm 14.14 \mu\text{m}$ ) (รูปที่ 88-90)



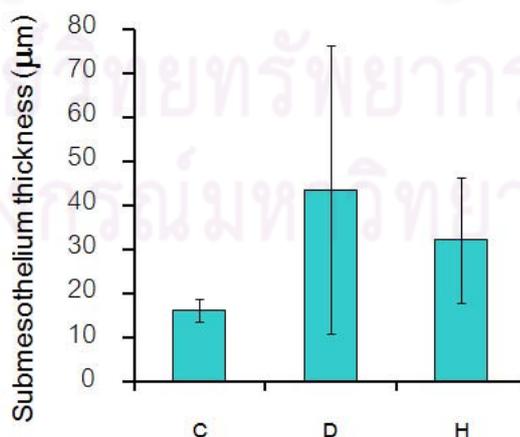
รูปที่ 88: แสดง ผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (X100)

- A กลุ่มควบคุม
- B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS



รูปที่ 89: แสดง ผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อ submesothelium thickness จากการย้อมด้วยสี masson's trichrome (x400)

- A กลุ่มควบคุม
- B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

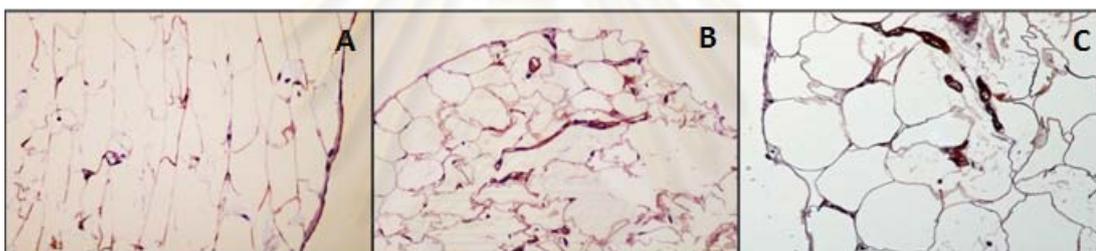


รูปที่ 90: แสดงความหนาของชั้น submesothelium ที่ได้จาก abdominal parietal peritoneum ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic

- C กลุ่มควบคุม
- D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

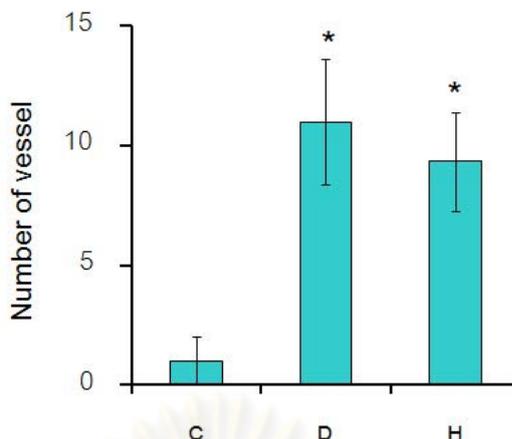
#### 4.3.2.3 การศึกษาการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และภาวะ hypoxia-mimic

ผลการศึกษา จำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่ในชั้นเนื้อส่วน visceral peritoneum ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ใกล้เคียง กับในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic และพบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p \leq 0.01$  (กลุ่มควบคุมมีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เท่ากับ  $1.0 \pm 1.0$  ส่วนกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องมีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เท่ากับ  $11.0 \pm 2.65$  และกลุ่ม hypoxia-mimic มีจำนวนของหลอดเลือดต่อพื้นที่เท่ากับ  $9.33 \pm 2.08$ ) (รูปที่ 91-92)



รูปที่ 91: แสดงผลของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องและภาวะ hypoxia-mimic ต่อจำนวนของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ( $\times 200$ )

- A กลุ่มควบคุม
- B กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF
- C กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS



รูปที่ 92: แสดงจำนวนของหลอดเลือดที่ติด lectin ต่อพื้นที่ ในหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง และภาวะ hypoxia-mimic

C กลุ่มควบคุม

D กลุ่มที่ได้รับ 4.25% dextrose PDF

H กลุ่มที่ได้รับ 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  in NSS

หมายเหตุ \*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งที่  $p$  value  $\leq 0.01$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าภาวะ hypoxia นั้นมีผลต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้อง อีกทั้งเนื่องจากน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องและมีความสัมพันธ์กับภาวะ hypoxia ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อผนังช่องท้องโดยผ่านทางภาวะ hypoxia

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ

### 5.1 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาการเกิดภาวะ hypoxia ในการศึกษานี้ได้ใช้ทั้ง hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) และ hypoxyprobe (pimonidazol) เป็นตัวบ่งชี้โดยจากการศึกษาของ Debra F. Higgins และคณะ พบว่าในหนูที่ ชักนำให้เกิดภาวะ unilateral ureteral obstruction (UUO) kidney นั้นพบภาวะ hypoxia โดยใช้ทั้ง HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe (pimonidazol) เป็นตัวบ่งชี้ [68] ทั้งนี้เนื่องจากในภาวะปกติ (normoxia) นั้น HIF-1 $\alpha$  จะถูกทำลายโดย proteosome แต่ในภาวะ hypoxia นั้น HIF-1 $\alpha$  จะเสถียรและจะไปควบคุมการแสดงออกของโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดในภาวะ hypoxia นอกจากนี้ hypoxyprobe (pimonidazol) นั้นจัดเป็นสารในกลุ่ม 2-nitroimidazol และจะจับกับหมู่ thiol ของโปรตีนในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีค่า pO<sub>2</sub> ต่ำกว่า 10 mmHg ที่อุณหภูมิ 37°C (< 14 $\mu$ M of O<sub>2</sub>)

จากการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องกับการเกิดภาวะ hypoxia ทั้งใน mesothelial cells และในสัตว์ทดลอง พบว่า mesothelial cells ที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง นั้นให้ผลบวกต่อการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe (pimonidazol) ได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับภาวะ hypoxia โดยการยับยั้งดีจะเห็นได้ชัดเจนตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง (concentration dependent) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นให้ผลบวกต่อการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe (pimonidazol) ได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่ม hypoxia-mimic โดยหนูในกลุ่ม hypoxia-mimic นี้เป็นหนูที่ได้รับ CoCl<sub>2</sub> [67] ทั้งนี้เนื่องจาก CoCl<sub>2</sub> นอกจากจะส่งผลให้ HIF-1 $\alpha$  มีความเสถียร [69] แล้ว CoCl<sub>2</sub> ยังมีผลยับยั้งกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนของเซลล์ (aerobic respiration) [70] จึงให้ผลบวกต่อการยับยั้งด้วยแอนติบอดีต่อทั้ง HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe (pimonidazol) อีกด้วย

เมื่อทำการศึกษาผลขององค์ประกอบ ต่าง ๆ ในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะ hypoxia นั้นพบว่าน้ำตาลกลูโคส และ methylglyoxal (MGO) เป็นองค์ประกอบหลัก ในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องที่ส่งผลให้ เกิดภาวะ hypoxia ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tsubasa Isoe และคณะ ที่พบว่า mesangial cells ในไตของหนูที่ถูกชักนำให้เกิดโรคเบาหวานนั้นมีการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ซึ่ง HIF-1 $\alpha$  นี้ถูกควบคุมโดย carbohydrate response element binding

protein (ChREBP) [71] นอกจากนี้ในสภาวะที่เซลล์สัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงนั้น ส่งผลให้เซลล์มี cytosolic NADH/NAD<sup>+</sup> ratio เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการรบกวนกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการหายใจระดับเซลล์ ทำให้เซลล์ต้องการออกซิเจนมากกว่าภาวะปกติ ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า hyperglycemic (metabolic) pseudohypoxia [72-73] ส่งผลให้มีการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  และให้ผลบวกต่อ hypoxyprobe ทั้งนี้จากการศึกษาของ Paola Pichiule และคณะพบว่า ในภาวะ hypoxia นั้นทำให้ HIF-1 $\alpha$  มีความเสถียรและส่งผลให้มีการแสดงออกของ receptor for advanced glycation end products (RAGE) ทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง [74] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jong Sun Chang และคณะพบว่าในภาวะ hypoxia นั้นกระตุ้นให้ทั้ง murine endothelial cells และ human endothelial cells สร้างและหลั่ง advanced glycation end products (AGEs) อย่างรวดเร็ว ซึ่ง AGEs นี้จะไปจับกับ receptor for advanced glycation end products (RAGE) บนเซลล์เมมเบรน และจะส่งสัญญาณผ่านทาง protein kinase C- $\beta$ II (PKC- $\beta$ II), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) และ early growth response-1 (Egr-1) ตามลำดับ [75] ส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของโมเลกุลที่ตอบสนองต่อภาวะ hypoxia เช่น VEGF, heme oxygenase-1 (HO-1) เป็นต้น [76] โดย AGEs นี้จะไปสะสมที่ mesothelial cells, interstitium และผนังหลอดเลือดภายในเยื่อผนังช่องท้องอีกทั้งปริมาณของการสะสมของ AGEs นี้ยังมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่สัมผัสและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง [15] ตลอดจนเกี่ยวข้องกับเกิดการเกิดพังผืดของเยื่อผนังช่องท้องและหลอดเลือดอีกด้วย [77] นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นในน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องคือภาวะที่มีค่า osmolarity ที่สูงและสภาวะที่เป็นกรดนั้นก็มีผลต่อการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ไม่แตกต่างกับการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ในกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Beiyun Zhou และคณะ พบว่าในสภาวะที่ mouse lung epithelial cells ที่ได้รับภาวะ hyperosmolarity (ในการศึกษาของ Beiyun Zhou และคณะ ใช้ sorbitol เป็น osmotic agent) นั้นมีการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  มากกว่ากลุ่มควบคุม [78] และจากการศึกษาของ Carsten Willam และคณะที่พบว่าเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดนั้นพบการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ภายในเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย [79]

ข้อมูลที่น่าสนใจอย่างยิ่ง จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ พบการยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  และ hypoxyprobe เห็นได้ชัดเจนในบริเวณ adipose tissue โดยจากการศึกษาของ Nils Halberg และคณะพบว่า การแสดงออกของ HIF-1 $\alpha$  ใน adipose tissue นั้นส่งผลให้เกิด adipose tissue fibrosis โดย HIF-1 $\alpha$  นั้นกระตุ้นผ่านทาง lysyl oxidase (LOX) ทำให้เกิดการสร้าง fibrillar collagen fiber ขึ้น [80] และสอดคล้องกับการศึกษาของ O. Kunduzova และคณะที่พบว่า adipocyte ที่ได้รับภาวะ hypoxia นั้นจะมีการแสดงออกของ apelin เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง endothelial

cells ที่ได้รับ apelin นั้นพบการเจริญของ endothelial cells รวมทั้งพบการรวมตัวของ endothelial cells เป็นหลอดเลือดโดยผ่านทาง apelin/APJ signaling pathway อีกด้วยส่งผลให้พบการเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ในบริเวณ adipose tissue [81]

การศึกษายาธิสภาพของเยื่อผนังช่องท้องในหนูกลุ่ม hypoxia-mimic พบว่า mesothelial monolayer ที่ได้จากการทำ liver imprint มีลักษณะที่ผิดปกติและมีการหลุดลอกของเซลล์ รวมทั้งพบการหนาตัวของชั้น submesothelium และเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) เพิ่มมากขึ้น โดยผลของ  $\text{CoCl}_2$  ที่ชักนำให้เกิด tissue fibrosis และ neovascularization นั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Ralph Buttyan และคณะที่พบว่าชั้น submucosa ของกระเพาะปัสสาวะในหนูที่ได้รับ  $\text{CoCl}_2$  มีความหนาเพิ่มมากขึ้นอีกทั้งยังพบหลอดเลือดขนาดเล็กเป็นจำนวนมากที่ชั้น mucosa และชั้น submucosa เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [82] นอกจากนี้ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้น mesothelial cells ที่ได้จากการทำ liver imprint มีลักษณะที่ผิดปกติและมีการหลุดลอกของเซลล์ รวมทั้งพบการหนาตัวของชั้น submesothelium และเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mohammad Zareie และคณะ ที่พบว่าหนูที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้อง (heat-sterilized PD fluid) นั้น มีการเปลี่ยนแปลงของ mesothelial cells พบการหนาตัวของชั้น submesothelium และพบการ หลอดเลือดใหม่ ในเยื่อผนังช่องท้องมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ [83]

จากการศึกษานี้กล่าวโดยสรุปได้ว่าน้ำยาฟอกช่องท้องนั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ hypoxia ของเยื่อผนังช่องท้อง โดยภาวะ hypoxia ที่พบนั้นมีความสัมพันธ์กับความไม่เหมาะสมของน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องกับเยื่อผนังช่องท้อง และองค์ประกอบของน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีความสัมพันธ์กับภาวะ hypoxia นั้นคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงและสารในกลุ่ม GDPs

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

น้ำยาฟอกไตทางช่องท้องนั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ hypoxia ของเยื่อผนังช่องท้อง โดยองค์ประกอบของน้ำยาฟอกช่องท้องที่มีความสัมพันธ์กับภาวะ hypoxia นั้นคือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงและสารในกลุ่ม GDPs

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการชะลอการเสื่อมของเยื่อผนังช่องท้องในผู้ป่วยที่ได้รับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องได้ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดภาวะ hypoxia ของเยื่อผนังช่องท้องที่สัมพันธ์กับน้ำยาฟอกไตทางช่องท้องต่อไป

## รายการอ้างอิง

- [1] Davies, S.J., Phillips, L., and Griffiths, A.M. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. **Nephrol Dial Transplant** 11 (1996): 498-506.
- [2] Devuyst, O., Topley, N., and Williams, J.D. Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions. **Nephrol Dial Transplant** 17 Suppl 3 (2002): 12-15.
- [3] Dobbie, J.W. Morphology of the peritoneum in CAPD. **Blood Purif** 7 (1989): 74-85.
- [4] Pollock, C.A., Ibels, L.S., and Eckstein, R.P. Peritoneal morphology on maintenance dialysis. **Am J Nephrol** 9 (1989): 198-204.
- [5] Rubin, J., Rogers, W.A., and Taylor, H.M. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Ann Intern Med** 92 (1980): 7-13.
- [6] Di Paolo, N., Sacchi, G., and De Mia, M. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Nephron** 44 (1986): 204-211.
- [7] Williams, J.D., Craig, K.J., Topley, N., Von Ruhland, C., and Fallon, M. Morphological changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. **J Am Soc Nephrol** 13 (2002): 470-490.
- [8] วุฒิเดช โอบาสเจริญสุข โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic Nephropathy) ใน สมชาย เข็มมอ่อง, เกียรติ ตั้งสง่า, เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ . บรรณาธิการ โรคไต กลไก พยาธิสรีรวิทยา การรักษา กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด 2550: 1013-1071.
- [9] Craig, C.T., and Barry, M.B. Renal Pathology With Clinical and Functional Correlation vol. II 2<sup>nd</sup> Edition. J.B. Lippincotte Company 1994: 1387-1412.
- [10] Sue, E.H., Kathryn, L.M., Valentina, L.B., and Neal, S.R. Understanding Pathophysiology 4<sup>th</sup> Edition. Saunders Mosby Elsevier 2008: 460-471.
- [11] Rosenbergur, C., Khamaisi, M., Abassi, Z., Shilo, V., Weksler-Zangen, S., Goldfarb, M., et al. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. **Kidney Int** 73 (2008): 34-42.

- [12] ทรงเกียรติ หลิวสุวรรณ , เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ Biocompatibility and prevention ใน สมชาย เขียมอ่อน, เกี๋ยง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันท์, เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, ดุสิต ล้ำเลิศกุล, ประเสริฐ ธนกิจจารุ. บรรณานุกรม Textbook of peritoneal dialysis. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด 2551: 405-431.
- [13] ศุภชัย ลีติอาชากุล. การล้างไตทางช่องท้อง. กรุงเทพฯ: บุ๊คเน็ต 2544.
- [14] Knapowski, J., Feder, E., Simon, M., and Zabel, M. Evaluation of the participation of parietal peritoneum in dialysis: Physiological, morphological, and pharmacological data. *Proc Eur Dial Trans Assoc* 16 (1979):155-164.
- [15] Dobbies, J.W., Lloyd, J.K., and Gall, C.A. Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. *Adv Perit Dial* 12 (1996): 3-12.
- [16] Obradovic, M.M., Stojimirovic, B.B., and Trpinac, D.P. Ultrastructure changes of peritoneal lining cells in uremia. *Adv in Perit Dial* 16 (2000): 26-29.
- [17] Di Paolo, N., and Sacchi, G. Atlas of peritoneal physiology. *Perit Dial Int* 20 (2000): 9-100.
- [18] Dobbie, J.W., and Anderson, J.D. Ultrastructure, distribution, and density of lamellar bodies in human peritoneum. *Perit Dial Int* 16 (1996): 482-487.
- [19] Khanna, R., Nolph, K.D., and Oreopoulos, D.G. The essentials of peritoneal dialysis. **Kluwer Academic Publishers, Boston** 1993: 10.
- [20] Dobbies, J.W. Ultrastructure and pathology of the peritoneum in peritoneal dialysis. In: Gokal R, Nolph KD (eds), The textbook of peritoneal dialysis. **Kluwer Academic Publishers, The Netherlands** 1994: 17-44.
- [21] Miller, F.N. The peritoneum microcirculation. In: **Nolph (ed), Peritoneal Dialysis. Martinus Nijhoff, Boston** 1985: 51-93.
- [22] Esperanca, M.J., and Collins, D.L. Peritoneal dialysis efficiency in relation to body weight. *J Pediatr Surg* 1 (1966): 162-167.
- [23] ศุภชัย ลีติอาชากุล การล้างไตทางช่องท้อง : กายวิภาคของช่องท้อง ใน สมชาย เขียมอ่อน, เกี๋ยง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันท์, เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, ดุสิต ล้ำเลิศกุล และ ประเสริฐ ธนกิจจารุ, บรรณานุกรม. Textbook of peritoneal dialysis. กรุงเทพฯ: **เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น** 2551.

- [24] Simionescu, M., Simionescu, N., and Palde, G.E. Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculature II pathways followed by microperoxidase across the endothelium. **Microvasc Res** 15 (1978): 17.
- [25] Gotloib, L., Digenis, G.E., and Rabinovich, S. Ultrastructure of normal rabbit mesentery. **Nephron** 34 (1983): 248.
- [26] Palade, G.E. Fine structure of blood capillary. **J Appl Physiol** 24 (1953): 1424.
- [27] Khanna, R., Nolph, K.D., and Oreopoulos, D.G. The essentials of peritoneal dialysis. **Kluwer Academic Publishers, Boston** 1993: 10.
- [28] Zakaria, E.R., Spain, D.A., Harris, P.D., and Garrison, R.N. In vivo quantitative description of visceral microvascular reactivity in peritoneal dialysis (PD) (Abstract). **Perit Dial Int** 21 (2001): 1.
- [29] Goldberg, A.P. The metabolic and psychological effects of exercise training in hemodialysis patients. **Am J Clin Nutr** 33 (1980): 1620.
- [30] Kautzsky-Willer, A., Pacini, G., and Barnas, U. Intravenous calcitriol normalizes insulin sensitivity in uremic patients. **Kidney Int** 47 (1995): 200-206.
- [31] Tomiyama, H., Motobe, K., and Zaydun, G. Insulin sensitivity and endothelial function in hypertension. **Am J Hypertens** 18 (2005): 178-182.
- [32] Obradovic, M.M., Stojimirovic, B.B., and Trpinac, D.P. Ultrastructure changes of peritoneal lining cells in uremia. **Adv in Perit Dial** 16 (2000): 26-29.
- [33] Yanez-Mo, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., Ramirez-Huesca, M., Dominguez-Jimenez, C., Jimenez-Heffernan, J.A., et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. **N Engl J Med** 348 (2003): 403-413.
- [34] Selgas, R., Bajo, A., Jimenez-Heffernan, J.A., Sanchez-Tomero, J.A., Del-Peso, G., Aguilera, A., et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. **Nephrol Dial Transplant** 21 (2006): 2-7.
- [35] Aroeira, L.S., Aguilera, A., Selgas, R., Ramirez-Huesca, M., Perez-Lozano, M.L., Cirugeda, A., et al. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis:

- role of vascular endothelial growth factor. **Am J Kidney Dis** 46 (2005): 938-948.
- [36] Von, R.F. Zur Fettresorption. **Arch Pathol Anat Physiol** 26 (1863): 172-178.
- [37] Ho-Dac-Pannekeet, M.M. Peritoneal fluid markers of mesothelial cells. **Adv Renal Replace Ther** 5 (1998): 205-211.
- [38] Horiuchi, T., Miyamoto, K., Miyamoto, S., Fujita, M., and Sano, N. Image analysis of remesothelialization following chemical wounding of cultured human peritoneal mesothelial cells: the role of hyaluronan synthesis. **Kidney Int** 64 (2003): 2280-2290.
- [39] Chen, J.Y., Chi, C.W., Chen, H.L., Wan, C.P., Yang, W.C., and Yang, A.H. TNF-alpha renders human peritoneal mesothelial cells sensitive to anti-Fas antibody-induced apoptosis. **Nephrol Dial Transplant** 18 (2003): 1741-1747.
- [40] Catalan, M.P., Subira, D., Reyero, A., Selgas, R., Ortiz-Gonzalez, A., Egido, J., et al. Regulation of apoptosis by lethal cytokines in human mesothelial cells. **Kidney Int** 64 (2003): 321-330.
- [41] Margetts, P.J., and Bonniaud, P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. **Perit Dial Int** 23 (2003): 530-541.
- [42] Ichiro, H., Yoshitaka, I., Shinya, K., Eiji, K., and Toshiro, F. Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rat. **Nephrol Dial Transplant** 24 (2009): 437-447.
- [43] Oh, E.J., Ryu, H.M., Choi, S.Y., Yook, J.M., Kim, C.D., Park, S.H., et al. Impact of low glucose degradation product bicarbonate/lactate-buffered dialysis solution on the epithelial-mesenchymal transition of peritoneum. **Am J Nephrol** 31 (2010): 58-67.
- [44] Chieko, H., Yoko, T., Hideki, N., Takashi, N., and Tsutomu, S. Effect of glucose and plasminogen activator inhibitor-1 on collagen metabolism in the peritoneum. **Ther Apher Dial** 9 (2005): 173-181.
- [45] Qiang, Y., Krzysztof, P., Ernesto, R.A., Arkadiusz, S., and Andrzej, B. The role of the TGF/Smad signaling pathway in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis solution. **Nephron Exp Nephrol** 109 (2008): e71-78. (in press)

- [46] Qinghua, L., Haiping, M., Jing, N., Wei, C., Qiongqiong, Y., Xiuqing, D., et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells. **Perit Dial Int** 28 (2008): 88-95.
- [47] Mateilsen, M.A.M., van der Wal, A.C., and Hendriks, P.M.E.M. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. **Perit Dial int** 19 (1999): 517-525.
- [48] Bertoli, S.V., Barone, M.T., and Vago, L. Changes in Peritoneal membrane after continuous ambulatory peritoneal dialysis-A Histological study. **Adv Perit Dial** 15 (1999): 28-31.
- [49] Hendriks, P.M., Ho-dac-Pannekeet, M.M., and van Gulik, T.M. Peritoneal sclerosis in chronic peritoneal dialysis patients: analysis of clinical presentation, risk factors and peritoneal transport kinetics. **Perit Dial Int** 17 (1997): 136-143.
- [50] Lo, W.K., Brendolan, A., Prowant, B.F., Moore, H.L., Khanna, R., Twardowski, Z.J., et al. Changes in the peritoneal equilibration test in selected chronic peritoneal dialysis patients. **J Am Soc Nephrol** 4 (1994): 1466-1474.
- [51] Sherwood, L. Human Physiology From Cells to System 6<sup>th</sup> Edition. **Thomson Brooks/Cole, The Thomson corporation** 2007: 485-486.
- [52] Guyton, A.C., and Hall, J.E. Textbook of Medical Physiology 11<sup>th</sup> Edition. **Elsevier Inc** 2006: 530-531.
- [53] Carroll, V.A., and Ashcroft, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. **Expert Reviews in Molecular Medicine** 7 (2005): 1-16
- [54] กฤษณพงศ์ มโนธรรม ภาวะการขาดออกซิเจนในเนื้อไตกับการดำเนินโรคไตวายเรื้อรัง Hypoxia and renal progression ใน รัชชชัย ชัยวัฒน์รัตน์, นริสา พุตระกูล, กฤษณพงศ์ มโนธรรม, ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์, เกียรติ ตั้งสง่า. บรรณาธิการ การฟื้นฟูสมรรถภาพของไต กลไกและกลยุทธ์การรักษาป้องกัน **โรงพยาบาลแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ** 2548: 68-80.
- [55] Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 5 (2004): 343-354.
- [56] Brahimi-Horn, C., and Pouyssegur, J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. **Bull Cancer** 93 (2006): 73-80.



- [57] Manotham, K., Tanaka, T., and Matsumoto, M. Transdifferentiation of cultured tubular cell induced by hypoxia. **Kidney Int** 65 (2004): 871-880.
- [58] Bruick, R.K., and McKnight, S.L. A conserve family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science** 294 (2001): 1337-1340.
- [59] Huang, L.E., GU, J., and Schau, M. Regulation of hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  is mediated by an  $O_2$  dependent degradation domain via the ubiquitin-proteosome pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**. 95 (1998): 7987-7992.
- [60] Ivan, M., Kondo, K., and Yang, H. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implication for  $O_2$  sensing. **Science** 292 (2001): 464-468.
- [61] Jaakkola, P., Mole, D.R., and Tian, Y.M. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by  $O_2$  regulated prolyl hydroxylation. **Science** 292 (2001): 468-472.
- [62] Kallio, P.J., Wilson, W.J., and O'brien, S. Regulation of the hypoxia-inducible transcriptional factor1 alpha by ubiquitin-proteosome pathway. **J Biol Chem** 274 (1999): 6519-6525.
- [63] Lando, D., Peet, D.J., and Whelan, D.A. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. **Science** 295 (2002): 858-861.
- [64] Shed, M.G., and Diamond, P.M. Hypoxia-induced irreversible up-regulation of type I collagen and transforming growth factor- $\beta$ 1 in human peritoneal fibroblasts. **Fertility and Sterility** 78 (2002): 144-147.
- [65] Kumar, V., Cotran, S.R., and Robbins, L.S. Robbins basic pathology 7<sup>th</sup> edition. **Saunders Mosby Elsevier** 2003: 70-72.
- [66] Tong, Q., Zheng, L., Lin, L., Li, B., Wang, D., Huang, C., et al. VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Respiratory Research** 7 (2006): 1-14.
- [67] Gross, C., Buchwalter, G., Dubois-Pot, H., Cler, E., Zheng, H., and Wasylyk, B. The ternary complex factor net is downregulated by hypoxia and regulates hypoxia-responsive genes. **Mol Cell Biol** 27 (2007): 4133-4141.

- [68] Ghafar, M.A., Shabsigh, A., Chichester, P., Anastasiadis, A.G., Borow, A., Levin, R.M., et al. Effect of chronic partial outlet obstruction on blood flow and oxygenation of the rat bladder. **J Urol** 167 (2002): 1508-1512.
- [69] Hirsila, M., Koivunen, P., Xu, L., Seeley, T., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. **The FASEB Journal** 19 (2005): 1308-1310.
- [70] Hervouet, E., Pecina, P., Demont, J., Vojtiskova, A., Simonnet, H, Houstek, J., et al. Inhibition of cytochrome c oxidase subunit 4 precursor processing by the hypoxia mimic cobalt chloride. **Biochem Biophys Res Commun** 344 (2006): 1086-1093.
- [71] Isoe, T., Makino, Y., Mizumoto, K., Sakagami, H., Fujita, Y., Honjo, J., et al. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. **Kidney Int** 78 (2010): 48-59.
- [72] Nyengaard, J.R., Ido, Y., Kilo, C., and Williamson, J.R. Interaction between hyperglycemia and hypoxia implications for diabetic retinopathy. **Diabetes** 53 (2004): 2931-2938.
- [73] Catrina, S.B., Okamoto, K., Pereira, T., Brismar, K., and Poellinger, L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein stability and function. **Diabetes** 53 (2004): 3226-3232.
- [74] Pichiule, P., Chavez, J.C., Schmidt, A.M., and Vannucci, S.J. Hypoxia inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. **J Biol Chem** 282 (2007): 36330-36340.
- [75] Chang, J.S., Wendt, T., Qu, W., Kong, L., Zou, Y.S., Schmidt, A.M., et al. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. **Circ Res** 102 (2008): 905-913.
- [76] Fu, M., Zhu, X., Zhang, J., Liang, J., Lin, Y., Zhao, L., et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. **Gene** 315 (2003): 33-41.

- [77] Honda, K., Nitta, K., Horita, S., Yumura, W., Nihei, H., Nagai, R., et al. Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultrafiltration. **Nephrol Dial Transplant** 14 (1999): 1541-1549.
- [78] Zhou, B., Ann, D.K., Li, X., Kim, K.J., Lin, H., Minoo, P., et al. Hypertonic induction of aquaporin-5: novel role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . **Am J Physiol Cell Physiol** 292 (2007): 1280-1290.
- [79] William, C., Warnecke, C., Schefold, J.C., Kugler, J., Koehne, P., Frei, U., et al. Inconsistent effects of acidosis on HIF- $\alpha$  protein and its target genes. **Eur J Physiol** 451 (2006): 534-543.
- [80] Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. **Mol Cell Biol** 29 (2009): 4467-4483.
- [81] Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, L., Muller, C., et al. Apelin/APj signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. **The FASEB Journal** 22 (2008): 4146-4153.
- [82] Buttyan, R., Chichester, P., Stisser, B., Matsumoto, S., Ghafer, M.A., and Levin, R.M. Acute intravesical infusion of a cobalt solution stimulates a hypoxia response, growth and angiogenesis in the rat bladder. **J Urol** 169 (2003): 2402-2406.
- [83] Zareie, M., Hekking, L.H.P., Welten, A.G.A., Driesprong, B.A.J., Schadee-Eestermans, I.L., Faict, D., et al. Contribution of lactate buffer glucose and glucose degradation products to peritoneal injury *in vivo*. **Nephrol Dial Transplant** 18 (2003): 2629-2637.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

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

29. เครื่องเขย่า (orbital shaker, Bibby Sthart: model S01)
30. อ่างล้างความถี่สูง (ultrasonic bath, Power sonic: model 420)
31. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader, Thermo LabSystems: model Multiskan EX 355)
32. เครื่องล้างบนไมโครเพลท (microplate washer, Thermo LabSystems: model Wellwash 4Mk2)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Plus slide (Superfrost plus microscope slides, Thermo scientific) เป็นสไลด์ที่เคลือบด้วยประจุบวก ขึ้นเนื้อจากกระบวนการ frozen tissue sections และ ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจด้วยวิธีเซลล์วิทยา จะยึดติดกับสไลด์โดย electrostatically attract หรือ ในกรณีของชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลีน จะจับกับสไลด์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond)

2. Cover glass 22x22 mm, thick 0.13-0.17 mm (HAD)
3. Cover slip sealant (DAKO)
4. กระดาษกรองเบอร์ 2 (filter paper, Whatman)
5. ทิปขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (tip, Axygen)
6. หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (tube, Axygen)
7. หลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร (centrifuge tube, Axygen)
8. ปิเปตขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร (pipette, Corning)
9. หลอดฉีดยาขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร (syringe, Nipro)
10. เข็มฉีดยาขนาด 18, 21 และ 27 นิ้ว (needle, Nipro)
11. Syringe filter (Sartorius)
12. ปีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (beaker, Pyrex)
13. กระบอกตวงขนาด 100, 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (cylinder, Pyrex)
14. ขวดแก้วขนาด 100, 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร (bottle, Pyrex)
15. เครื่องกรองสารภายใต้สุญญากาศ (glass vacuum filtration unit, Gibco)
16. เครื่องช่วยดูดสารละลายด้วยปิเปต (pipeting aid, Gilson)
17. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร (tissue culture flask T25 and T75, NUNCLON™)
18. ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6, 12 และ 96 หลุม (6, 12 and 96-well plate, Corning)
19. จานเพาะเชื้อ (petri dish, Corning)
20. ปิเปตชนิดหลายช่อง (multichannel pipette, BIOHIT PROLINE)
21. ภาชนะย้อมสี (staining jar)
22. คอปป์ลินจาร์ (coplin jar)
23. ภาชนะใส่สไลด์ (rack)
24. ตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette)
25. ปิเปตอัตโนมัติขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (auto pipette, Gilson)
26. กล้องรักษาความชื้น (moist chamber)

27. ฝ่าก๊อต (Zhende)

28. DAKO pen (DAKO)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการวิจัย

1. Acetone (Merck)
2. Albumun from bovine serum Cohn Analog™, ≥ 98% (agarose gel electrophoresis), powder, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number A1470)
3. Biotin block system (ready to use) (DAKO)
4. Biotinylated-lycopersicon esculentum (tomato) lectin (Vector, cat. no. B-1175)
5. Chloroform (Merck)
6. Cobalt (II) chloride hexahydrate, reagent grade (SIGMA-ALDRICH, product number 202185)
7. Collagen I, rat tail, for cell culture (Gibco, cat. no. A10483-01)
8. Cytology formulation consul-mounting, xylene base (Thermo Shandon)
9. DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous) (Sigma, product no. D5637)
10. Dextrose, meets USP testing specifications, anhydrous (SIGMA-ALDRICH, product number D9434)
11. Diluent (ready to use) (DAKO)
12. D-mannitol, plant cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number M1902)
13. Envision™ (ready to use) (DAKO, Carpinteria, CA)
14. Eosin solution (ready to use) (C.V. laboratories co., ltd)
15. Ethanol 99.9% (Merck)
16. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, approx. 99% titration (EDTA) (SIGMA-ALDRICH, product number ED2SS)
17. Formaldehyde solution, min. 37% (Merck, cat. no. 1.03003.2500)
18. Giemsa's azure eosin methylene blue for microscope (ready to use) (Merck, cat. no. 1.09204)
19. Glacial acetic acid (Merck)
20. GLUTAMAX™ I (100X) (L-glutamine) (Invitrogen corporation, cat. no. 35050-061)
21. Glycerol (SIGMA-ALDRICH, product number G5516)
22. HIF-1 $\alpha$  antibody (H1alpha67) (Novus Biological, cat. no. NB100-123)
23. Holo-transferrin human, powder, cell culture tested (transferring) (SIGMA-ALDRICH, product number T0665)

24. Hydrochloric acid, ACS reagent, 37% (HCl) (SIGMA-ALDRICH, product number 320331)
25. Hydrocortisone, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number H0888)
26. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (SIGMA-ALDRICH, product number 31642)
27. Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 kit (Natural Pharmacia International, Inc)
28. Imidazole, ACS reagent, ≥ 99% (titration) (SIGMA-ALDRICH, product number I2399)
29. Insulin, lyophilized powder, ≥ 25 USP units/mg, γ-irradiated, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number I1882)
30. Magnesium chloride hexahydrate, SigmaUltra, ≥ 99% (SIGMA-ALDRICH, product number M2670)
31. Mayer's haematoxylin (ready to use) (C.V. laboratories co., ltd)
32. Methylglyoxal solution, ~40% in H<sub>2</sub>O (SIGMA-ALDRICH, product number M0252)
33. M199 with hanks' salts and L-glutamine without sodium bicarbonate, powder, cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number M0393)
34. Normal horse serum (NHS) (ready to use) (Pan Biotech GmSH)
35. PARAPLAST\* tissue embedding medium (McCormick<sup>TM</sup> scientific)
36. Pentobabital 5.47% (CEVA SANTE ANIMALE)
37. Potassium chloride, SigmaUltra, ≥ 99.0% (KCl) (SIGMA-ALDRICH, product number P9333)
38. Potassium phosphate monobasic, powder, ≥ 99.0%, cell culture tested, insect cell culture tested (SIGMA-ALDRICH, product number P5655)
39. Secondary antibody (ready to use) (visualization reagent :- envision system, DAKO)
40. Sodium bicarbonate, plant cell culture tested (NaHCO<sub>3</sub>) (SIGMA-ALDRICH, product number S4772)
41. Sodium chloride, 95% (NaCl) (Merck, cat. no. 1.06404.1000)
42. Sodium hydroxide, bead, 20-40 mesh (NaOH) (SIGMA-ALDRICH, product number S0399)

43. Sodium phosphate dibasic, SigmaUltra,  $\geq 99\%$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH, product number S9638)

44. Sodium phosphate monobasic monohydrate, ACS reagent, 98.0-102.0% ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (SIGMA-ALDRICH, product number S9638)

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

46. Sterile water (ready to use)

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

48. Xylene (Merck)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

### 1.1 เทคนิคการเลี้ยง mesothelial cells

#### 1) ขั้นตอนการเลี้ยง

- A. คีบชิ้นเนื้อที่ได้มาใส่ลงในถ้วย
- B. เลาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อจากคนไข้



รูปที่ 93: แสดงการเลาะพังผืดและเส้นเลือดออกจากชิ้นเนื้อ

- C. ตัดแบ่งเนื้อเป็นชิ้นละ 6 ตารางเซนติเมตร
- D. ล้างชิ้นเนื้อด้วย phosphate-buffered saline (PBS) จนกว่าน้ำจะใส
- E. คีบชิ้นเนื้อประมาณ 2-3 ชิ้นใส่ลงใน centrifuge tube
- F. เท digestion solution ลงไปประมาณ 25 มิลลิลิตร
- G. เอาไป incubate ใน shaker water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 94: แสดงการ incubate ชิ้นเนื้อใน shaker water bath

- H. พอครบ 20 นาที ก็เอาไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที



รูปที่ 95: แสดงการปั่นขึ้นเนื้อ

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



รูปที่ 96: แสดงการคีบชิ้นเนื้อออกจาก centrifuge tube

- J. ล้างเซลล์ที่อยู่ก้น centrifuge tube ด้วย PBS ประมาณ 50 มิลลิลิตร
- K. เอาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
- L. เทส่วนบนทิ้ง



รูปที่ 97: แสดงการเทส่วนบนทิ้ง

M. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ประมาณ 4 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์อีกครั้ง  
หนึ่ง

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

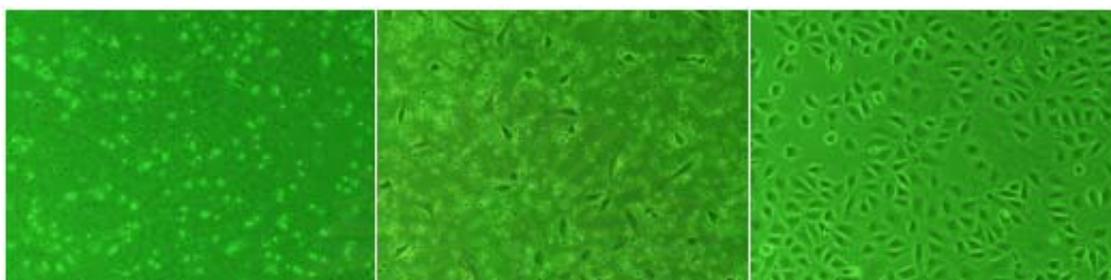
- O. เทส่วนบนทิ้ง
- P. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ประมาณ 6 มิลลิลิตร ลงไปใน centrifuge tube
- Q. ผสมเซลล์ให้เข้ากันดี แล้วดูดใส่ลงไปใน culture dish 2 ชั้น (อันละ 3 มิลลิลิตร)



รูปที่ 98: แสดงการดูดเซลล์ใส่ลงไปใน culture dish

- R. เลี้ยงเซลล์ใน 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator
- S. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกครึ่งหนึ่ง หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- T. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน
- U. พอดประมาณ 90% ให้ทำการ passage cell ในอัตรา 1:3 โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้
- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก culture dish ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 90%
  - ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปใน culture dish เล็กน้อย
  - ดูด PBS ออกให้หมด
  - ใส่ trypsin-EDTA solution 1 ลงไปใน culture dish ประมาณ 2 มิลลิลิตร
  - แกว่ง culture dish ประมาณ 1 นาที
  - ดูด trypsin-EDTA solution 1 ออกจาก culture dish (ให้เหลือติดก้น เล็กน้อย)
  - เอาไป incubate ใน 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator เป็นเวลาประมาณ 8-10 นาที
  - ถ้ายังหลุดออกมาไม่หมด ให้เคาะด้านข้างและด้านล่างของ culture dish เบา ๆ
  - ถ้าเซลล์หลุดออกหมดแล้ว ก็ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิดที่ 1 ลงไปใน culture dish ประมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยของ trypsin-EDTA solution 1
  - ดูดทั้งหมดมาใส่ใน centrifuge tube

- k) เอาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
- l) พอลครบ 5 นาที ก็ให้เอา centrifuge tube มาเทน้ำส่วนบนทิ้งไป
- m) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ลงไปใน centrifuge tube ประมาณ 9 มิลลิลิตร
- n) ผสมเซลล์ให้เข้ากันดี แล้วดูดใส่ลงใน culture dish 3 อัน (อันละ 3 มิลลิลิตร)



วันที่ 1

วันที่ 7

ความหนาแน่น 90%

รูปที่ 99: แสดงลักษณะของ mesothelial cells ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

## 2) การเตรียมน้ำยา

### A. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1

Fetal bovine serum (FBS)	10	% (v/v)
Penicillin	50	u/ml
Streptomycin	50	µg/ml
Insulin	0.1	µg/ml
Transferrin	5	µg/ml
Hydrocortisone	0.4	µg/ml
L-glutamine ใน M199	5	mM

### B. PBS

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

### C. Trypsin-EDTA solution 1

Trypsin	0.125	% (w/v)
---------	-------	---------

EDTA 0.53 mM  
 ใน PBS

## 1.2 การใส่สารในเซลล์ของแต่ละกลุ่ม

### 1) ขั้นตอนการทดลอง

- A. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ออกให้หมด
- B. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมเล็กน้อย
- C. ดูด PBS ออกให้หมด
- D. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 (media 2) ลงไปเพื่อกำจัด FBS ออกให้หมด
- E. Incubate เซลล์ใน 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง
- F. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ออกให้หมด
- G. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุมเล็กน้อย
- H. ดูด PBS ออกให้หมด
- I. ใส่สารดังต่อไปนี้
  - a) หลุมควบคุม (control) ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4
  - b) หลุม 1.5% dextrose PDF ใส่ 4% albumin in 1.5% D commercial PDF ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4
  - c) หลุม 2.5% dextrose PDF ใส่ 4% albumin in 2.5% D commercial PDF ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4
  - d) หลุม 4.25% dextrose PDF ใส่ 4% albumin in 4.25% D commercial PDF ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4
  - e) หลุม 1.5% dextrose in culture media ใส่ 1.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 344 mOsm/L)
  - f) หลุม 2.5% dextrose in culture media ใส่ 2.5% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 395 mOsm/L)
  - g) หลุม 4.25% dextrose in culture media ใส่ 4.25% dextrose ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 483 mOsm/L)
  - h) หลุม 1.4% mannitol in culture media ใส่ 1.4% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 344 mOsm/L)



i) หลุม 2.3% mannitol in culture media ใส่ 2.3% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 395 mOsm/L)

j) หลุม 4.12% mannitol in culture media ใส่ 4.12% mannitol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 (มี osmolarity 483 mOsm/L)

k) หลุม methylglyoxal (MGO) in culture media ใส่ 20  $\mu$ M MGO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4

l) หลุมที่ได้รับภาวะเป็นกรด ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 5.4

m) หลุมที่ได้รับภาวะ hypoxia ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 ที่ปรับ pH ให้เป็น 7.4 เข้าไปบ่มใน tri-gas incubator ที่มีส่วนผสมของก๊าซ O<sub>2</sub> 1%, CO<sub>2</sub> 5% และ N<sub>2</sub> 94% เป็นเวลา 15 วัน

J. Incubate เซลล์ที่ใส่สาร a) ถึง l) ใน 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

## 2) การเตรียมน้ำยา

### A. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2

Albumin	4	% (w/v)
ใน M199		
Adjusted pH to 7.4		

### B. 4% albumin in 1.5% dextrose commercial PDF

Albumin	4	% (w/v)
ใน 1.5% dextrose commercial PDF		
Adjusted pH to 7.4		

### C. 4% albumin in 2.5% dextrose commercial PDF

Albumin	4	% (w/v)
ใน 2.5% dextrose commercial PDF		
Adjusted pH to 7.4		

### D. 4% albumin in 4.25% dextrose commercial PDF

Albumin	4	% (w/v)
ใน 4.25% dextrose commercial PDF		
Adjusted pH to 7.4		

- E. 4% albumin in (1.5% dextrose in media 2)
- |                    |     |         |
|--------------------|-----|---------|
| Albumin            | 4   | % (w/v) |
| Dextrose           | 1.5 | % (w/v) |
| โนน M199           |     |         |
| Adjusted pH to 7.4 |     |         |
- F. 4% albumin in (2.5% dextrose in media 2)
- |                    |     |         |
|--------------------|-----|---------|
| Albumin            | 4   | % (w/v) |
| Dextrose           | 2.5 | % (w/v) |
| โนน M199           |     |         |
| Adjusted pH to 7.4 |     |         |
- G. 4% albumin in (4.25% dextrose in media 2)
- |                    |      |         |
|--------------------|------|---------|
| Albumin            | 4    | % (w/v) |
| Dextrose           | 4.25 | % (w/v) |
| โนน M199           |      |         |
| Adjusted pH to 7.4 |      |         |
- H. 4% albumin in (1.4% mannitol in media 2)
- |                    |     |         |
|--------------------|-----|---------|
| Albumin            | 4   | % (w/v) |
| Mannitol           | 1.4 | % (w/v) |
| โนน M199           |     |         |
| Adjusted pH to 7.4 |     |         |
- I. 4% albumin in (2.3% mannitol in media 2)
- |                    |     |         |
|--------------------|-----|---------|
| Albumin            | 4   | % (w/v) |
| Mannitol           | 2.3 | % (w/v) |
| โนน M199           |     |         |
| Adjusted pH to 7.4 |     |         |
- J. 4% albumin in (4.12% mannitol in media 2)
- |                    |      |         |
|--------------------|------|---------|
| Albumin            | 4    | % (w/v) |
| Mannitol           | 4.12 | % (w/v) |
| โนน M199           |      |         |
| Adjusted pH to 7.4 |      |         |

K. 4% albumin in (20  $\mu$ M MGO in media 2)

Albumin 4 % (w/v)

MGO 20  $\mu$ M

ใน M199

Adjusted pH to 7.4

L. Culture media, pH 5.4

Albumin 4 % (w/v)

ใน M199

Adjusted pH to 5.4

## 2. การศึกษาการเรียงตัวของ mesothelial cells บนชิ้นเนื้อ โดยวิธี liver imprint

### 1) ขั้นตอนการทำ

A. เอาตับของหนูที่ตัดได้มาวางแนบลงบนสไลด์

B. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

C. หยดสี giemsa ลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

D. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

E. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

### 2) ผลการย้อม

นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของทุกเซลล์ ติดสีม่วง-น้ำเงิน

### 3) การเตรียมน้ำยา

A. Giemsa (ready to use)

## 3. การศึกษาความหนาของ submesothelium

### 1) หลักการ การเตรียมตัวอย่าง ชิ้นเนื้อ เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาและอิมมูโนพยาธิวิทยา

โดยมีขั้นตอนทั้งหมดดังนี้

#### A. การคงสภาพ (fixation)

เป็นการรักษาสภาพ ของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งรักษาสภาพของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาให้อยู่ในสภาพเดิม หรือหลีกเลี่ยงการทำลายต่อ antigen determinant หรือ epitope (ตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติเจน นั้น ๆ บางชนิดอาจทนกับ fixative ชนิดหนึ่ง แต่อาจจะไม่ทนต่อชนิดอื่น ๆ หรือแอนติเจนหลาย ๆ ตัวอาจถูกทำลายโดย fixative ทุกชนิด เมื่อต้องการศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีจะต้องย้อมจาก cryosections อีกทั้งเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ fix

แอนติเจนอาจจะหายไป หรือแพร่กระจายไปยัง เนื้อเยื่อข้างเคียง หรือเนื้อเยื่อที่ fix นานเกินไป อาจเกิด cross-linking ทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง (masking) หรืออาจถูกทำลายเป็นบางส่วน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ fixative และระยะเวลาการ fix สถานะที่เหมาะสมก็คือชิ้นเนื้อที่บางและเวลา fix ที่สั้น ดังนั้น การ fix นานเกินไปทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง และรบกวนผลการย้อมได้ ปัจจุบันยังไม่มี fixative ชนิดใดที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนทุกชนิด

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

- B. การล้าง (washing)
- C. การขจัดน้ำ (dehydration)
- D. การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing)
- E. การแทรกซึม (infiltration)

ซึ่งกระบวนการดังที่กล่าวมาแล้ว ดังข้อ A ถึง E นั้น ได้ใช้เครื่อง tissue processor ดัง

รูปที่ 100



รูปที่ 100: แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor)

- F. การฝังเนื้อเยื่อ (embedding)



รูปที่ 101: แสดงการฝังเนื้อเยื่อ

### G. Sectioning of tissue

ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome หนา 3 ไมโครเมตร ลอยในอ่างน้ำ อุณหภูมิประมาณ  $43^{\circ}\text{C}$  ใช้สไลด์เคลือบด้วย 3-aminopropyl triethoxysilane หรือ สไลด์ที่เคลือบ ประจุบวก (plus slide) เพื่อป้องกันชั้นเนื้อหลุด รอให้ section แห้งสนิท นำเข้าตู้อบ อุณหภูมิ  $56^{\circ}\text{C}$  ทิ้งไว้ข้ามคืน



รูปที่ 102: แสดงการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome

### H. Deparaffinization and rehydration

คือการล้าง paraffin ที่เคลือบ section ด้วย xylene ผ่านไปยัง alcohol จาก เปอร์เซนต์สูงไปต่ำแล้วแช่ในน้ำกลั่น ไม่ควรปล่อยให้สไลด์แห้ง

หากมีความจำเป็น สามารถเก็บ tissue slides ที่ rehydrated แล้ว ที่  $2-8^{\circ}\text{C}$  ใน buffer ได้นานถึง 18 ชั่วโมง โดยก่อนใช้ให้นำมาวางที่อุณหภูมิห้อง  $20-25^{\circ}\text{C}$  ก่อนการย้อมต่อไป โดยไม่รบกวนผลการย้อม

### I. Blocking endogenous enzyme

เอ็นไซม์ที่มีอยู่ใน section จะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะ คือไม่ได้เกิดจากการ จับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ต้องยับยั้งก่อนทุกครั้ง มิฉะนั้น จะทำให้เกิดผลบวก ผิดพลาด หรือ background staining เอ็นไซม์ส่วนใหญ่พบในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และ เซลล์ตับ ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดยใช้ substrate ของมันคือ 3% hydrogen peroxide ในน้ำ 10 นาที

### J. การคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval technique)

เป็นการคืนสภาพแอนติเจนหรือเพิ่มความเป็นแอนติเจนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ เนื้อเยื่อซึ่ง fix ด้วย formalin ซึ่งเป็น cross-linking fixative จะทำให้เกิดการจับตัวกัน (bridging) ระหว่าง amino acid ภายในโมเลกุลเดียวกันและจับตัวกับโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง ขบวนการนี้เป็น สาเหตุที่สำคัญที่เชื่อว่าเป็นตัวการในการ block ไม่ให้ antibody เข้าไปจับตัวกับ antigen determinant (epitope) ได้ ขบวนการนี้เรียกว่า masking of antigen ในการทำอิมมูโนฮิสโตเคมี

(immunohistochemistry; IHC) จึงจำเป็นที่จะต้องแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ โดยการนำ epitope retrieval ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการ de-masking protein ที่ antigenic determinant ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อนั้น ๆ มาย้อมโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งทำให้การย้อมติดสีดีขึ้น

วิธีการคืนสภาพแอนติเจน สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

a) โดยใช้เอนไซม์ (enzymatic unmasking technique) โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ proteinase K และ pepsin การใช้เอนไซม์จะช่วยคืนสภาพของแอนติเจนหลาย ชนิด ทำให้การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีติดสีดีขึ้น แต่ก็ไม่สามารถใช้ได้ดีกับ แอนติเจนทุกชนิดได้ เพราะแอนติเจนบางชนิดไม่สามารถคืนสภาพได้ด้วยการใช้เอนไซม์ย่อย โดยเฉพาะชิ้นเนื้อที่ fix ฟอร์มาลินเป็นเวลานาน

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

c) ใช้ทั้งเอนไซม์และความร้อนร่วมกัน สำหรับแอนติบอดีบางชนิด ซึ่งเดิมจำเป็นต้องใช้กับชิ้นเนื้อสดเท่านั้น แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคนี้ สามารถนำแอนติบอดีนั้นมาใช้กับพาราฟินบล็อกได้ด้วย

การเลือกใช้วิธีคืนสภาพแอนติเจน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการศึกษา และ ขึ้นกับเครื่องมือที่มีใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ ไม่ว่าจะเลือกใช้วิธีใด สิ่งที่สำคัญคือจะต้องปรับเวลาที่ใช้ในการคืนสภาพ ชนิด และ dilution ของแอนติบอดีที่ใช้ให้เหมาะสม

K. การหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ (blocking of nonspecific reaction)

การจับกันอย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยา hydrophobic bonding ระหว่าง immunoglobulin กับ tissue proteins ทำให้ primary antibody และบางส่วนของ secondary antibody จับกับเนื้อเยื่อโดยตรงได้ดีพอ ๆ กับแอนติเจนเป้าหมาย แก้ไขโดยใช้ blocking protein โดยใช้ซีรัมของสัตว์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียม secondary antibody หรือ 2-5% bovine serum albumin (BSA) ปัจจุบัน นิยมใช้ serum free protein block มากกว่าการเติม immunoglobulins เข้าไป

L. Primary antibody

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

## M. Secondary antibody (linking antibody)

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

## N. Substrate and chromogen

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

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

## O. Counterstain

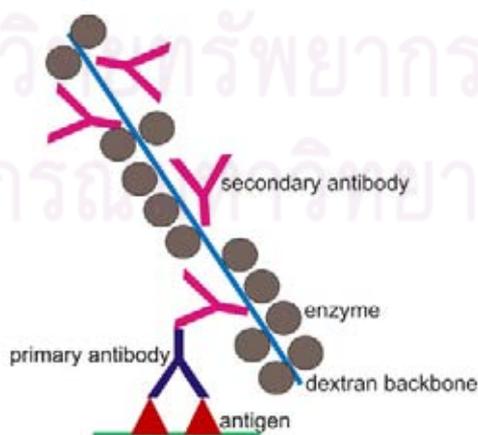
เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสีจากปฏิกิริยา IHC เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี counterstain ทำให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อชัดเจนและเปรียบเทียบกับส่วนที่ติดสีจากปฏิกิริยา IHC เพื่อให้เกิดความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์

สี counterstain ที่ใช้ คือ Mayer's hematoxylin

## P. Mounting media

การเลือกใช้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ chromogen โดยในที่นี้ใช้ cytology formulation consul-mounting, xylene base

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



รูปที่ 103: แสดงหลักการของวิธี immunocytochemistry

## 2) ขั้นตอนการทำ

- A. ตัดส่วนของ peritoneum มาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย 10% buffered neutral formalin solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน
- B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ
- C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงในเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ
- D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ
- E. ตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome ใส่ลงในสไลด์
- F. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟิน (deparaffinize) ด้วยน้ำกลั่น โดยการ
- จุ่มสไลด์ในโท xylene จำนวน 3 โถ เป็นเวลาทั้งหมด 10 นาที
  - จุ่มสไลด์ในโท 95% ethanol เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 3 โถ
  - ผ่านสไลด์ในน้ำไหล (running water) เป็นเวลา 2-3 นาที
- G. แช่สไลด์ในโท Bouin's fixative เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 56°C
- H. ตั้งสไลด์ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- I. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- J. แช่สไลด์ใน โถ Mayer's haematoxylin เป็นเวลา 10 นาที แล้วผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 10 นาที
- K. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- L. แช่สไลด์ในโท Biebrich Scarlet-acid fuchsin solution เป็นเวลา 15 นาที
- M. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- N. แช่สไลด์ในโท Phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- O. Counterstained สไลด์ด้วย aniline blue solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- P. แช่สไลด์ในโท acetic water solution 1 จุ่ม
- Q. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
- R. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) โดยการ
- จุ่มสไลด์ในโท 95% alcohol โถที่ 1 จำนวน 10 จุ่ม
  - จุ่มสไลด์ในโท 95% alcohol โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม
  - จุ่มสไลด์ในโท absolute alcohol โถที่ 1 จำนวน 10 จุ่ม
  - จุ่มสไลด์ในโท absolute alcohol โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม



e) จุ่มสไลด์ในโท xylene โถที่ 1 จำนวน 30 จุ่ม

f) จุ่มสไลด์ในโท xylene โถที่ 2 จำนวน 10 จุ่ม

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

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

### 3) ผลการย้อม

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

### 4) การเตรียมน้ำยา

#### A. Bouin's solution

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

#### B. Biebrich Scarlet-acid fuchsin solution

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

#### C. Phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution

Phosphomolybdic acid	5	g
Phosphotungstic acid	5	g
น้ำกลั่น	200	ml

#### D. Light green solution

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

ต้มน้ำกลั่นให้เดือด แล้วใส่ light green ลงไป ละลายให้หมด  
ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

กรอง

เติม glacial acetic acid

#### E. Aniline blue solution

Aniline blue	2.5	g
--------------	-----	---

Glacial acetic acid	2	ml
น้ำกลั่น	100	ml
F. Acetic water solution		
Glacial acetic acid	1	ml
น้ำกลั่น	100	ml
G. 10% Buffered neutral formalin solution		
Formaldehyde solution	100	ml
Sodium phosphate monobasic monohydrate	4.0	g
Sodium phosphate dibasic	6.5	g
น้ำกลั่น	900	ml

#### 4. การศึกษา mesenteric vascular density

##### 4.1 การย้อมชิ้นเนื้อด้วย LE-lectin

##### 1) ขั้นตอนการย้อม

- A. ตัดส่วนของ bowel ของหนูที่ทำการ perfuse ด้วย LE-lectin แล้ว มาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย methyl Carnoy's solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ
- C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงใน เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (โดยไม่ผ่าน formalin)
- D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ
- E. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น
- F. ทำการฟุ้งแอนติเจนโดยวิธี microwave method
- G. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- H. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- I. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water ลงบนสไลด์
- J. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- K. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- L. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- M. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- N. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ

- O. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- P. สบดสไลด์
- Q. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- S. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในถัง PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- T. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- U. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- V. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- W. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- X. เข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์
- Y. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base
- Z. ปิดกระจกบนสไลด์

## 2) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

## 3) การเตรียมน้ำยา

A. Methyl Carnoy's solution

Acetic acid 100%	10	ml
------------------	----	----

Chloroform	30	ml
------------	----	----

Absolute alcohol	60	ml
------------------	----	----

B. LE-lectin

Biotinylated-lycopersicon esculentum (tomato) lectin	1	ขวด
--	---	-----

น้ำกลั่น	0.5	ml
----------	-----	----

## 5. เทคนิคการย้อมสไลด์ทาง histochemistry และ immunohistochemistry

### 5.1 การย้อมชิ้นเนื้อด้วย hematoxylin และ eosin

#### 1) ขั้นตอนการย้อม

A. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น

B. จุ่มสไลด์ในถัง Mayer's haematoxylin เป็นเวลา 3 วินาที

C. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 3 นาที

D. จุ่มสไลด์ในถัง lithium carbonate จำนวน 10 จุ่ม

E. Running water เป็นเวลา 3 นาที

- F. จุ่มสไลด์ใน 95% ethanol จำนวน 6 จุ่ม
- G. จุ่มสไลด์ใน eosin solution เป็นเวลา 3 วินาที
- H. เข้ากระบวนการตั้งน้ำออกจากเซลล์
- I. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base
- J. ปิดกระจกลงบนสไลด์

## 2) ผลการย้อม

- นิวเคลียส                      ติดสีน้ำเงิน
- Cytoplasm                      ติดสีแดง

## 3) การเตรียมน้ำยา

- A. Eosin solution (ready to use)

## 5.2 การย้อมชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีต่อ HIF-1 $\alpha$

### 1) ขั้นตอนการย้อม

- A. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น
- B. ทำการฟั่นฟูแอนติเจนโดยวิธี microwave method
- C. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- D. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- E. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water ลงบนสไลด์
- F. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- G. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- H. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- I. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- J. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ
- K. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- L. สะบัดสไลด์
- M. หยด anti HIF-1 $\alpha$  (dilution 1:800) ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- N. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- O. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ใน PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- P. สะบัดสไลด์
- Q. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด

- R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- S. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในถัง PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- T. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- U. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- V. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- W. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- X. เข้ากระบวนการตั้งน้ำออกจากเซลล์
- Y. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base
- Z. ปิดกระจกลงบนสไลด์

## 2) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

## 5.3 การย้อมชิ้นเนื้อด้วย Hypoxyprobe™-1

### 1) ขั้นตอนการย้อม

- A. ตัดชิ้นส่วนของหนูที่ทำการฉีดด้วย pimonidazole HCl (Hypoxyprobe™-1) แล้วมาคงสภาพชิ้นเนื้อด้วย methyl Carnoy's solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- B. นำชิ้นเนื้อที่คงสภาพไว้ มาใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ
- C. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ลงใน เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ (โดยไม่ผ่าน formalin)
- D. นำตลับใส่เนื้อเยื่อที่ได้ไปทำการฝังเนื้อเยื่อ
- E. หลังจากตัดชิ้นเนื้อลงสไลด์แล้ว ให้ทำการแทนที่พาราฟินด้วยน้ำกลั่น
- F. ทำการฟุ้งแอนติเจนโดยวิธี microwave method
- G. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- H. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- I. ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการหยด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water ลงบนสไลด์
- J. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- K. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- L. หยด PBS-T ลงบนสไลด์
- M. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

- N. ทำการหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ โดยการหยด 3% normal horse serum ลงบนสไลด์ ให้ท่วมบริเวณที่มีเนื้อ
- O. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- P. สะบัดสไลด์
- Q. หยด mouse IgG1 monoclonal antibody (MAb1) (dilution 1:100) ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- R. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- S. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในถัง PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- T. สะบัดสไลด์
- U. หยด secondary antibody ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- V. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- W. ล้างสไลด์โดยการแช่สไลด์ในถัง PBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- X. หยด DAB ลงบนสไลด์ ให้ท่วมตำแหน่งที่มีเนื้อทั้งหมด
- Y. Incubate สไลด์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- Z. ผ่านสไลด์ในน้ำไหล เป็นเวลา 5 นาที
- AA. Counterstained สไลด์ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- BB. เข้ากระบวนการดึ่งน้ำออกจากเซลล์
- CC. Mounting สไลด์ ด้วย cytology formulation consul-mounting, xylene base
- DD. ปิดกระจกบนสไลด์

## 2) ผลการย้อม

ผลบวก ติดสีน้ำตาล

ผลลบ ติดสีน้ำเงิน

## 3) การเตรียมน้ำยา

A. pimonidazole HCl (Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1) 100 mg/ml		
solid pimonidazole HCl (Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1)	1	ขวด (100 mg)
น้ำกลั่น	1	ml

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวศิน มนุประเสริฐ เกิดเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม พ.ศ.2527 ณ จังหวัดนครสวรรค์ จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากคณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปีการศึกษา 2549 ซึ่งปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย