สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดลองครั้งนี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative property) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำสามารถลดการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันที่เกิดจากการชักนำโดยยารักษามะเร็ง cisplatin ได้ เป็นที่ทราบมาแล้วว่าผลข้างเคียงที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของยา cisplatin ในทางคลินิคคือทำให้การทำงานของไตลดลง จนอาจเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันได้ถ้าใช้ยาในขนาดที่สูงเกินไป ซึ่งการจำกัดขนาดของยาเพื่อป้องกันผลข้างเคียงนี้อาจทำให้การรักษามะเร็งไม่เกิดผล ในการวิจัยนี้การให้ยา cisplatin ทางช่องท้องหนูในขนาดต่ำสองขนาดแบบ single dose คือขนาด 4.5 และ 6 mg/kg ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของการทำงานของไตที่วัดโดยใช้ clearance technique ในวันที่สามหลังฉีดยาเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle control (รูปที่ 6-10 และ ตารางที่ 4) แต่ขนาดที่สูงอีกสองขนาดที่ใช้ทดลองคือ 7.5 และ 9 mg/kg กลับทำให้ค่าอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) ที่ประมาณจากค่า C_{in} ลดลง 61 และ 78% และทำให้ค่าการไหลเวียนพลาสมาที่ไต (effective renal plasma flow, ERPF) ที่ประมาณจากค่า C_{PAH} ลดลง 87 และ 94% ตามลำดับ (รูปที่ 7) ในขณะที่ค่าทั้งสองลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากการให้ cisplation ทั้งสองขนาดนี้ ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MABP) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งบอกว่าการเสียหายของไตไม่น่าจะเกิดจากการลดลงของ renal arterial pressure และ renal perfusion pressure ได้มีการศึกษามาก่อนแล้วว่า ในวันที่ 3 หลังจากหนูได้รับการฉีดยา cisplatin ขนาด 6 และ 9 mg/kg ค่า GFR ซึ่งวัดโดยใช้ polyfructosan clearance ได้ลดลง 43 และ 77% อย่างมีนัยสำคัญ (Nualplub & Hiranyachattada, 2000-2001) หรือค่า GFR นี้ลดลงได้ถึง 70% หลังการฉีด cisplatin ขนาด 7 mg/kg แล้ว 5 วัน (Badary *et al.*, 2005) วัดโดย creatinine clearance ส่วนการฉีด cisplatin ขนาด 5 mg/kg ก็มีรายงานว่าทำให้ GFR และ RBF ลดลง 95 และ 21% ตามลำดับ หลังให้ยาแล้ว 5 วัน (Matsushima *et al.*, 1998) หรือทำให้ single nephron GFR ลดลง 41%, whole kidney ลดลง 74% และ RBF ลดลง 36% ภายใน 3 วันหลังฉีดยา ในขณะที่ค่า intratubular hydrostatic pressure คงที่ (Winston & Safirstein, 1985) การทำงานของ glomerulus ที่ลดลงนี้อาจเกิดจากการลดลงของปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงไต

จากการที่ cisplatin ทำให้เกิด vasoconstriction ซึ่งมีงานวิจัยสนับสนุนสมมุติฐานนี้คือ ในเวลา 6 วันหลังการฉีด cisplatin ขนาด 5 mg/kg หลอดเลือดภายในไตได้มีการเสียหายเกิดขึ้น (Shirwaikar *et al.*, 2004)

การฉีด cisplatin ขนาดสูงในการทดลองนี้ (7.5 และ 9 mg/kg) ทำให้ค่า BUN เพิ่มขึ้น 3 และ 4.6 เท่าของค่ากลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่า BUN นี้สนับสนุนว่า glomerular function ของไตเกิดการเสียหาย ได้มีรายงานการเพิ่ม BUN ถึง 3-11 เท่าของค่าปกติมาก่อนแล้วในหนูที่ได้รับยา cisplatin ขนาดระหว่าง 3-10 mg/kg (al-Harbi *et al.*,1995; Rao *et al.*, 1999; Sueishi *et al.*, 2002) เนื่องจาก urea ส่วนใหญ่จะถูกกรองและขับทิ้งทางปัสสาสะ ดังนั้นหาก glomerulus เสียหายทำให้กรอง urea ได้ลดลงจึงทำให้ระดับ urea ในเลือดเพิ่มขึ้นได้ ส่วนอีกกลไกหนึ่งที่อาจทำให้ระดับ urea ในเลือดเพิ่มขึ้นได้แก่การที่ cisplatin ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการสลายตัวและสร้าง ammonia ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น urea

นอกจาก cisplatin จะทำให้ไตเสียประสิทธิภาพในการกรองแล้ว ยังทำให้ประสิทธิภาพของการดูดกลับสารอื่น ๆ และน้ำลดลงด้วย เนื่องจากในการทดลองนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ cisplatin ขนาด 7.5 และ 9 mg/kg มีค่า urine flow rate เพิ่มขึ้น 1.2 และ 1.9 เท่าและมีค่า fractional sodium excretion เพิ่มขึ้น 3.3 และ 8.4 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งการเพิ่มของค่าทั้งสองนี้เกิดขึ้นทั้ง ๆ ที่มีการลดลงของอัตราการกรองของไต บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการดูดกลับน้ำและ sodium ที่ renal tubule และยังทำให้กระบวนการทำให้ปัสสาวะเข้มข้นลดลงด้วย ส่วนกลไกน่าจะเกิดจาก 1) การลดลงของ tubular reabsorptive capacity และ 2) ระดับ renin-angiotensin-aldosterone activity ลดลง จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในสัตว์ทดลองพบว่ามีการเกิด acute tubular necrosis และการสูญเสีย proximal tubular brush-border membrane ทำให้พื้นที่ในการดูดกลับน้ำและ sodium ที่ renal tubule ลดลงภายในเวลา 2-7 วันหลังการฉีด cisplatin ขนาด 4-10 mg/kg (Dobyan *et al.*,1980; Jones *et al.*,1985; Kim *et al.*, 1995) นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้เทคนิค electron microprobe X-ray analysis พบว่ามีการลดลงของ Na^+ concentration ใน proximal tubular cells ของหนูที่ได้รับ cisplatin ซึ่งบ่งบอกถึงกระบวนการยับยั้งการขนส่ง sodium ที่ apical membrane ไม่ให้เข้าสู่ภายในเซลล์ (Field *et al.*, 1989) การศึกษาในไตที่พบว่ามีการลดลงของเอนไซม์ Na^+-K^+-ATPase และ Na^+-pump activities หลังการได้รับ cisplatin ขนาด 4 mg/kg ก็สามารถสนับสนุนว่า

ความสามารถของ renal tubule ในการดูดกลับ sodium ลดลง (Kim *et al.*, 1995) เนื่องจากกระบวนการดูดกลับ sodium ที่ renal tubule เป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยพลังงาน ดังนั้นรายงานการวิจัยที่แสดงว่า cisplatin สามารถลดการสร้าง intracellular ATP (Zhang and Lindup, 1997; Kruidering *et al.*, 1997) ก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดการขนส่ง sodium ได้ ส่วนการควบคุมการดูดกลับ sodium ที่เกิดจาก renin-angiotensin-aldosterone system นั้น มีรายงานเช่นกันว่าการฉีด cisplatin ทำให้ระดับ renin และ aldosterone ในพลาสมาผู้ป่วยลดลงได้ (Hutchison *et al.*, 1988) ซึ่งอาจส่งผลลดการขนส่ง sodium ที่ renal tubule ได้เช่นกัน

ในการทดลองนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ cisplatin ขนาด 7.5 และ 9 mg/kg มีน้ำหนักตัวลดลง 30- 40 g อย่างมีนัยสำคัญในวันที่สามหลังได้รับยา สาเหตุอาจเกิดจากความเป็นพิษของ cisplatin ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ทำให้กระเพาะอาหารบวมแก๊ส ท้องเสีย การกินน้ำและอาหารลดลง ดังเช่นที่มีรายงานมาก่อนแล้วว่าหนู ที่ได้รับ cisplatin ขนาดใกล้เคียงกับการทดลองนี้มีอาการเป็นพิษต่อทางเดินอาหารเช่นกัน (Jacoby *et al.*, 2000; Francescato *et al.*, 2001) นอกจากนี้ในการทดลองในหนูสองกลุ่มนี้พบว่าค่า hematocrit เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจสะท้อนถึงภาวะ dehydration จากกระบวนการที่ไตไม่สามารถสร้างปัสสาวะที่เข้มข้นได้ ทำให้ร่างกายของสัตว์ทดลองมีปริมาณของเหลวลดลงหลังได้รับยาด้วย

cisplatin ขนาด 7.5 และ 9 mg/kg ที่ให้ในสัตว์ทดลองแล้วเป็นเวลา 3 วันทำให้ปริมาณ renal MDA เพิ่มขึ้น 29-52% เมื่อเทียบกับค่าของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11) สาเหตุอาจเกิดจาก 1) การเพิ่มขึ้นของปริมาณ free radical, 2) การลดลงของการทำงานของ antioxidant defense system และ 3) การลดลงของ renal antioxidant enzymes activity การทดลองที่มีมาแล้วที่สนับสนุนสมมุติฐานดังกล่าวได้แก่ การทดลองที่แสดงถึง dose dependent ของ cisplatin ในการสร้าง $HO^{\cdot}$ และ $O_2^{\cdot-}$ (Masuda *et al.*, 1994) การลดลงของระดับ vitamin A และ E, GSH และ β-carotene ที่เป็นองค์ประกอบของ renal antioxidant defense system (Greggi Antunes *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001; Sueishi *et al.*, 2002; Naziroglu *et al.*, 2004) การยับยั้ง renal antioxidant enzymes เช่น CAT, GSH-Px and SOD (Mansour *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2003; Atessahin *et al.*, 2005; Badary *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตามขนาดของ cisplatin ที่ถูกเลือกใช้ในการชักนำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในหนูคือ 7.5 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดต่ำที่สุดในการทดลองนี้ทำให้ค่า GFR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของค่า C_{in} และ BUN และค่า MDA จากกระบวนการ renal lipid peroxidation

การให้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ (*H. sabdariffa* aqueous extract, HSE) แบบ short term ในหนูที่ได้รับ cisplatin ขนาดดังกล่าว (7.5 mg/kg) ทำให้ค่า C_{in} เพิ่มขึ้นได้ 82% เพิ่ม C_{PAH} ได้ 3.2 เท่า และลดระดับ BUN level ลดได้ 40% แม้ว่าจะไม่เปลี่ยนแปลงค่า urine flow rate และ FE_{Na} เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับ cisplatin แต่ไม่ได้รับสารสกัด HSE กลไกการป้องกันของ HSE ไม่ให้ไตเสียหายมากจากการได้รับ cisplatin อาจเกิดจากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ลดกระบวนการ lipid peroxidation ที่ไต โดยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของ HSE ได้แก่ quercetin และ delphinidine-3-sambucoside (anthocyanin compounds) ซึ่งมีรายงานมาแล้วว่าสารทั้งสองแสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระแบบ *in vitro* (Cao *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 2002) ส่วนสารอื่น ๆ ที่อาจเป็นไปได้อีกได้แก่ erdostein (Yildirim *et al.*, 2003), selenium (Satoh *et al.*, 1992; Francescato *et al.*, 2001) และ vitamin C และ E (Appenroth *et al.*, 1997; Naziroglu *et al.*, 2004) ที่มีรายงานว่าสามารถลดระดับ BUN และ renal MDA ที่เพิ่มขึ้นจากการให้ยา cisplatin ได้ และสาร lecithinized superoxide dismutase ที่มีรายงานว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่า RBF ที่เกิดจาก cisplatin ได้ (Matsushima *et al.*, 1998)

การที่สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำที่ให้แบบ short term ในหนูที่ได้รับ cisplatin ของการทดลองนี้ไม่ทำให้ค่า urine flow rate และ FE_{Na} ที่เพิ่มขึ้นจากผลของยากลับเข้าสู่ค่าควบคุมได้อาจเนื่องจากขนาดของสารสกัดและระยะเวลาในการให้อาจจะไม่เหมาะสมดีนักแม้ว่าวิธีการให้สารสกัดแบบ short term ของการทดลองนี้ทำให้ระดับ renal MDA ที่เพิ่มขึ้นจากผลของยา cisplatin กลับเข้าสู่ค่าควบคุมแล้ว มีรายงานถึงผลการทดลองที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ diphenyl-*p*-phenylene-diamine และ deferoxamine ว่าสามารถป้องกันการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ใน porcine proximal tubular cells แต่ไม่สามารถป้องกันภาวะการเกิด cell death และไม่สามารถ recover การทำงานของ complexes I to IV ใน mitochondria respiratory chain, ATP และ GSH level ได้ (Kruidering *et al.*, 1997) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระอื่นเช่น

sodium selenite ในขนาด 2 mg/kg ที่ให้ทางปากในหนูทดลองที่ได้รับ cisplatin (5 mg/kg) ไม่สามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ acute tubular necrosis และ serum creatinine ได้อย่างสมบูรณ์แม้ว่าผลของการให้ sodium selenite ทำให้ระดับ renal MDA ลดลงในขณะที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงการลดลงของค่า creatinine clearance, การลดลงของน้ำหนักตัวหนู, การเพิ่มปริมาณปัสสาวะและระดับ renal GSH (Francescato *et al.*, 2001) จากการทดลองทั้งหมดนี้ทำให้สรุปได้ว่าระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้นจากการให้ยา cisplatin อาจไม่ใช่เป็นสาเหตุโดยตรงหรือสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันเนื่องจากแม้ว่าได้ทำการป้องกันไม่ให้ระดับ ROS เพิ่มขึ้นแล้วยังคงพบการเสียหายของไตอยู่

ส่วนการให้สารสกัดจากระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ long term ในหนูที่ได้รับ cisplatin ของการทดลองนี้ไม่ได้ช่วยบรรเทาภาวะไตวายเฉียบพลันหรือบรรเทาความเสียหายของการทำงานของไตลงได้ ดังผลที่แสดงในรูปที่ 12-15 และ ตารางที่ 5 อย่างไรก็ตามยังสังเกตได้ว่าระดับ BUN ได้ลดลงบ้างซึ่งแสดงว่าเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของร่างกายมีการเสียหายน้อยลดลงในณะที่เนื้อเยื่อไตยังมีความเสียหายมากอยู่ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าภาวะ hyponatremia เกิดขึ้นในการให้สารสกัดจากระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ long term ในหนูที่ได้รับ cisplatin แต่จะไม่เกิดในหนูกลุ่ม cisplatin ที่ไม่ได้รับสารสกัด ซึ่งแสดงว่าสารสกัดนี้มีคุณสมบัติทำให้เกิดการขับทิ้ง Na^+ ทางปัสสาวะมากกว่าปกติ (natriuresis) จนทำให้ระดับ Na^+ ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คุณสมบัตินี้ของสารสกัดจากระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำเห็นได้เด่นชัดในภาวะที่ไตเสียหายอยู่ทำให้ไม่สามารถควบคุมระดับ Na^+ ในร่างกายเหมือนในภาวะปกติได้ ในผู้ป่วยที่มีความดันเลือดสูง (hypertension) ทั้งแบบ mild ถึง moderate เมื่อได้ดื่มสารสกัดจากระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำในระยะเวลาหนึ่งก็สามารถพบภาวะ hyponatremia ได้เช่นกัน (Herrera-Arellano *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการพบในสัตว์ทดลอง (Orisakwe *et al.*, 2003; Hussaini *et al.*, 2004)

เป็นที่น่าสนใจว่าการให้สารสกัดจากระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ long term ทำให้ระดับ renal MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูปกติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดเองจะมีคุณสมบัติเป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระ (prooxidative substance) และทำให้กระบวนการ renal lipid peroxidation เพิ่มขึ้น ซึ่งสมมุติฐานนี้มีรายงานสนับสนุนบ้างได้แก่ การทดลองโดยใช้ fluorescent probe H_2DCF-DA ใน human promyelocytic leukemia cells แล้วพบว่าสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงคือ delphinidin-3-sambubioside ใน

ขนาด 25-125 μM ทำให้ intracellular ROS มีปริมาณมากขึ้นตามขนาดและระยะเวลาที่ได้รับสาร (Hou *et al.*, 2005) ส่วนสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงอื่น ๆ เช่นพวก polyphenolic compound และ flavonoids ก็มีรายงานว่าทำให้ระดับ MDA เพิ่มขึ้นได้ใน human promyelocytic leukemia cells (Sergediene *et al.*, 1999) และสารกลุ่มดังกล่าวยังทำให้เกิดการสร้าง $HO^{\cdot}$ โดยกระบวนการ Cu^{2+}-dependent reaction (Said Ahmad *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 1997) และ vitamin C ที่พบในกระเจี๊ยบแดงก็มีคุณสมบัติเป็น prooxidative substance นี้ด้วยโดยการทดลองที่พบว่า vitamin C นี้ 1) สามารถสร้าง free radical โดยกระบวนการ Cu^{2+}-dependent reaction (Cao and Cutler, 1993), 2) กระตุ้นกระบวนการ methionine oxidation และชักนำให้เกิด apoptotic cell death ใน human myelogenous leukemic cell lines (Sakagami and Satoh, 1997), 3) ทำให้ DNA เสียหายโดยการสร้าง oxygen radicals ในสาย DNA ที่แยกจาก lymphocytes (Podmore *et al.*, 1998) และ 4) สร้าง $O_2^{\cdot}$ in hepatic microsomes (Paolini *et al.*, 1999)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าการให้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ short term หรือให้ 2 ครั้ง (24 hr และ 10 min) ครั้งละ 250 mg/kg ทางปาก ก่อนฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg ทางช่องท้อง จะช่วยลดความรุนแรงของภาวะไตวายเฉียบพลันที่เกิดจากยา cisplatin ในวันที่สามของการทดลองลงได้ โดยช่วยป้องกันการลดลงของค่า glomerular filtration rate, renal plasma flow และป้องกันการเพิ่มระดับ BUN ซึ่งกลไกการป้องกันดังกล่าวอาจเกิดจากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ แต่เนื่องจากกระบวนการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันที่เกิดจากยา cisplatin อาจมีสาเหตุจากกลไกอื่นอีก เนื่องจากแม้ว่าสารสกัดได้ช่วยลดอนุมูลอิสระแล้วส่วนหนึ่งแต่ไตยังคงความเสียหายอยู่จากการที่ค่า urine flow rate และ FE_{Na} ไม่สามารถกลับเป็นปกติได้ อีกทั้งน้ำหนักตัวหนูยังคงลดลงอยู่ ส่วนการให้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ long term หรือให้ 10 ครั้ง (วันละครั้ง 7 วัน ก่อนฉีด cisplatin และอีก 3 วันหลังฉีดยา) ครั้งละ 250 mg/kg ทางปาก ก่อนฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg ทางช่องท้อง ไม่ได้ลดระดับ renal lipid peroxidation หรือไม่ได้ช่วยป้องกันการเสียหายของไตเช่นเดียวกับที่พบในการทดลองแบบ short term ทั้งนี้อาจเป็นเพราะขนาดและระยะเวลาการให้สารสกัด ดังนั้นหากมีการพิจารณาการให้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

ด้วยน้ำในการลดปริมาณอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันภาวะไตวายเฉียบพลันจากการให้ cisplatin จึงควรคำนึงถึง ขนาดและระยะเวลาในการให้สารสกัดรวมทั้งควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเพิ่มเติม