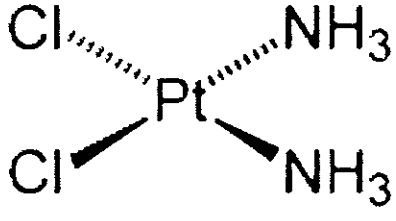
บทนำ

ความเป็นพิษของ cisplatin ต่อการทำงานของไต

cisplatin, cisplatinum หรือ *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) เป็นยารักษามะเร็งที่จัดอยู่ในกลุ่ม cytotoxic drugs ที่จัดอยู่ในกลุ่มปินสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักที่มีอะตอม platinum (Pt) อยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วยอะตอมของ chloride (Cl) และ ammonium (NH_3) อย่างละ 2 อะตอม วางตัวอยู่ในตำแหน่ง *cis* และเป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบนราบ มีสูตรเคมีคือ $H_6Cl_2N_2Pt$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 300.05 g/mol และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 cisplatin มีชื่อทางการค้าอื่นๆ คือ Platinum, DDP, CACP และ Platinol สามารถละลายได้ดีในน้ำที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ *cis*-isomer เท่านั้นที่มีฤทธิ์เป็นยารักษามะเร็ง



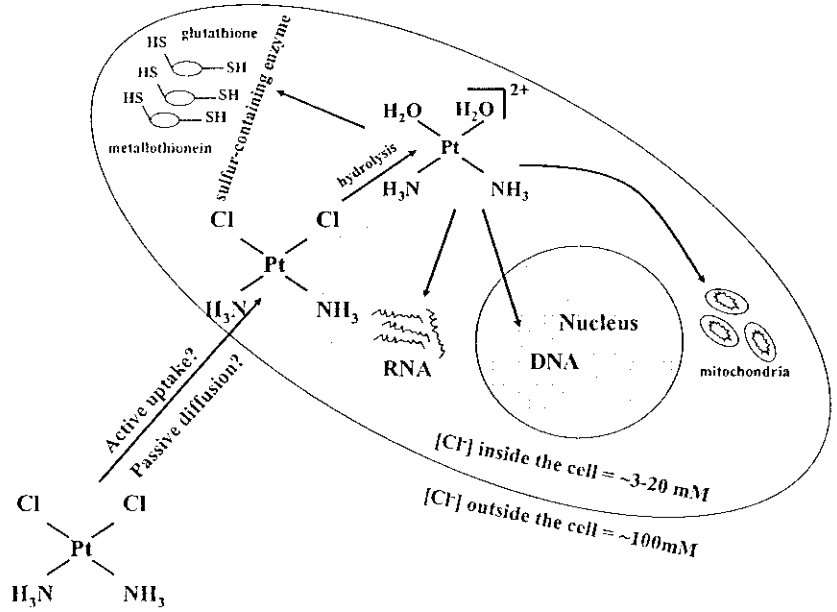
รูปที่ 1 โครงสร้างของ cisplatin หรือ *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (www.wikipedia.org)

cisplatin เป็นยาประเภท alkylating agent ใช้รักษามะเร็งชนิด solid tumor เช่น มะเร็งในรังไข่ (Sherman-Baust *et al.*, 2003) มะเร็งปอดชนิด non-small-cell lung (Rosell *et al.*, 2002) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Kong *et al.*, 2005) และมะเร็งอัณฑะ (Burger *et al.*, 1997) เป็นต้น

cisplatin จัดเป็นยารักษามะเร็งที่ออกฤทธิ์ไม่จำเพาะต่อวงชีพ (cell cycle non-specific drug) ซึ่งหมายความว่าการเกิดปฏิกิริยา alkylation ที่ DNA สามารถเกิดกับเซลล์ใด ๆ ได้ไม่ว่าเซลล์นั้นจะอยู่ในระยะใดของวงชีพของเซลล์ แต่ระยะที่จะเกิด alkylation ได้ดีที่สุดคือท้ายระยะ G1 หรือระยะ S เนื่องจากเป็นระยะที่ DNA อยู่ในรูป polynucleotide ซึ่งทำให้ cisplatin เข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า DNA ในระยะอื่น ๆ ซึ่งจะอยู่ในรูป helix

กลไกการออกฤทธิ์ของ cisplatin จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 2 หลังจาก cisplatin เข้าสู่ร่างกายอยู่ใน extracellular fluid (ECF) แล้วก็จะเข้าสู่เซลล์โดยวิธี passive diffusion หรือ active uptake เมื่อเข้าสู่เซลล์ Cl

จะหลุดออกจากสารประกอบ cisplatin และถูกแทนที่ด้วยน้ำทำให้โมเลกุลของยาเกิดประจุบวกซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ชอบประจุบวกได้ โดยเฉพาะกับ DNA (ในรูปที่ 2 แสดงอะตอม Cl ของโมเลกุล cisplatin หลุดออกและถูกแทนที่ด้วยน้ำจนทำให้ cisplatin มีประจุ 2+) การเกิดปฏิกิริยา alkylation กับ DNA ที่อยู่ภายในเซลล์เกิดโดย alkyl group ของ cisplatin ไปแทนที่ H-atom ใน nucleic acid หรือโปรตีนหรือเกิดโดย nucleophilic atom ไปแทนที่ leaving group ใน cisplatin (Chu, 1994) โดยสามารถเกิด alkylation กับ N7 และ O6 ของโมเลกุล guanine ที่อยู่ใกล้เคียงได้ทั้งสองโมเลกุล หรืออีกหนึ่งโมเลกุลอาจเกิด alkylation กับเบสอื่น ๆ ได้ ซึ่งอาจจะอยู่บน DNA สายเดียวกันหรือคนละสายกันก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับระยะห่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา เกิดเป็น intrastrand และ interstrand cross-linking ตามลำดับ (Gonzalez *et al.*, 2001) ดังรูปที่ 3 ซึ่งมีผลทำให้สายของ DNA มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปและพบว่า interstrand cross-linking มีผลขัดขวางกระบวนการสร้าง DNA สายใหม่คือทำให้ DNA ทั้งสองสายถูกตรึงเข้าด้วยกันไม่สามารถคลายและทำหน้าที่ในการเป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์ DNA สายใหม่หรือ RNA ได้ แต่ interstrand cross-linking เกิดได้ช้าและน้อยกว่า intrastrand cross-linking



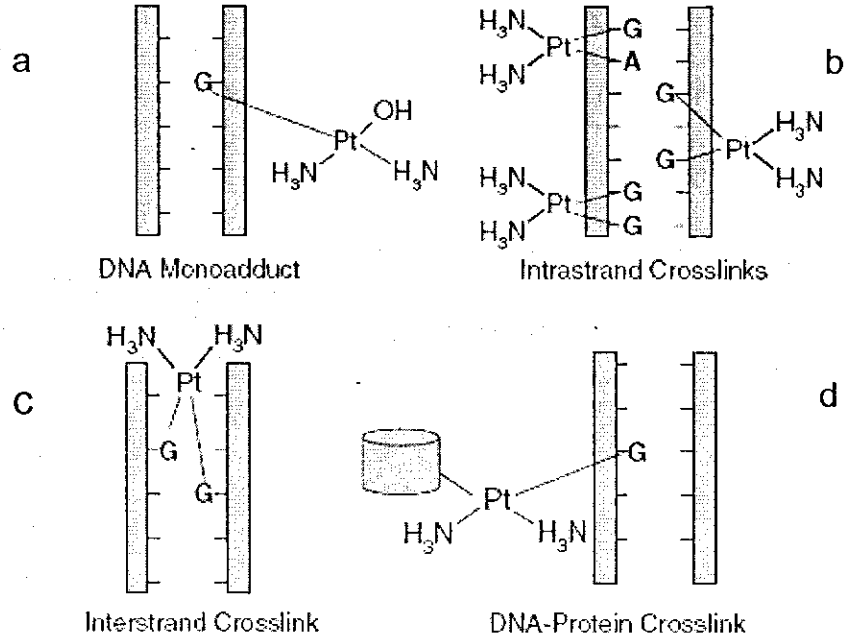
รูปที่ 2 แสดงกระบวนการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ของ cisplatin โดยที่ cisplatin จะทำปฏิกิริยากับ cellular components ที่มี nucleophilic sites เช่น DNA, RNA, proteins, membrane phospholipids และ sulfur-containing enzymes. (http://www.chemcases.com/cisplat/cisplat12.htm)

ตัวอย่างการเกิด alkylation คือเมื่อเกิด alkylation ที่ N7 ของ guanine (N7 position ของ guanine ใน DNA เป็น strong nucleophilic group) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ DNA หลายประการคือ โครงสร้างของ guanine base จะเปราะทำให้เกิดการแตกหรือเปิดออกได้ง่ายหรืออาจทำให้โมเลกุลของ guanine base หลุดออกจากสาย DNA มีผลทำให้สาย DNA ขาด ทำให้เกิด mispairing โดยจะสามารถจับคู่กับ thymine แทน cytosine กลไกนี้จะเกิดขึ้นในระหว่างที่มีการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ทำให้ได้ DNA สายใหม่ที่ผิดปกติไปจากเดิม อย่างไรก็ตามเซลล์ส่วนใหญ่มีระบบซ่อมแซม DNA (DNA repairing system) ซึ่งมีหน้าที่ซ่อมแซม DNA ที่ผิดปกติให้กลับเป็นปกติโดยมีเอนไซม์ที่สามารถตัดเอา alkyl group ออกจาก O6 ของ guanine, N3 ของ adenine และ N7 ของ guanine เป็นต้น ดังนั้นเซลล์ที่มี repairing enzymes มากเพียงพอ และสามารถซ่อมแซม DNA ที่ผิดปกติทั้งหมดได้ก่อนที่จะเข้าสู่การแบ่งเซลล์ครั้งใหม่ ก็จะไม่มีผลกระทบใด ๆ ต่อการสร้าง DNA สายใหม่และการแบ่งเซลล์ อย่างไรก็ตามความผิดปกติจาก DNA สายเดียวเช่น intrastrand cross-linking สามารถซ่อมแซมได้ง่ายกว่าความผิดปกติที่เกิดกับ DNA สองสายเช่น interstrand cross-linking การเกิด interstrand cross-linking จึงเป็นกลไกสำคัญของ cisplatin ในการเป็นยารักษามะเร็ง

cisplatin จึงเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการยับยั้ง DNA replication และ DNA transcription นอกจากนี้ยังทำให้ mitrochondria ถูกทำลาย เกิดการยับยั้ง ATPase activity มีการเปลี่ยนแปลงของ cellular transport system เกิด apoptosis necrosis เกิด inflammation และเกิด cell death ในที่สุด (Boulikas and Vougiouka, 2003; Jo *et al.*, 2005)

เนื่องจากยารักษามะเร็งเป็นยาที่ไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง จึงมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ทุกเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ดังนั้นเซลล์ปกติที่มีอัตราการแบ่งเซลล์สูง เช่นเซลล์ไขกระดูก เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารและเซลล์รากผมจึงถูกทำลายไปด้วย ความเป็นพิษของยา cisplatin ได้แก่ อาการคลื่นไส้อาเจียนอย่างรุนแรง การกดไขกระดูกซึ่งอาจทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ของเลือดลดน้อยลง ยาขนาดสูงอาจทำให้เม็ดเลือดขาวต่ำ โลหิตจาง เป็นพิษต่อระบบประสาทที่สำคัญ เช่น พิษต่อหู (ototoxicity) พิษต่อระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy) (Rabik and Dolan, 2007) เกิดความเสียหายต่อไต (renal damage) (Mishima *et al.*, 2006) ภาวะ

เป็นพิษต่อไต (nephrotoxicity) และภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure, ARF) (Liu *et al.*, 2008; Yildirim *et al.*, 2003)



รูปที่ 3 การจับกันของโมเลกุล cisplatin กับ DNA ภายในเซลล์ (a) cisplatin จับกับ guanine บนสาย DNA (b) cisplatin 1 โมเลกุลจับกับ guanine 2 ตัวที่ DNA สายเดียวกัน เรียกว่า intrastrand crosslink (c) cisplatin 1 โมเลกุลจับกับ guanine 2 ตัวที่ DNA คนละสายกัน เรียกว่า interstrand crosslink (d) cisplatin จับกับ guanine และอีกแขนจับกับ protein เรียกว่า DNA-protein crosslink (Rabik and Dolan, 2007)

สาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเป็นพิษดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความเป็นพิษต่อไตคือ cisplatin ที่อยู่ภายในเซลล์จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้นจากที่มีอยู่เดิม ROS เป็นโมเลกุลที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่จะไปออกซิไดส์ ROS พบได้ทั้งที่เป็นอนุมูลอิสระ (radicals) ซึ่งมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ และที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (nonradicals) บางครั้งจะเรียกรวมอนุพันธ์เหล่านี้ว่า สารที่มีฤทธิ์ออกซิไดซ์ หรือสารออกซิแดนท์ (oxidants) ได้แก่ $O_2^{\cdot}$ (superoxide anion), H_2O_2 (hydrogen peroxide) และ hydroxyl radicals (Kruidering *et al.*, 1997) เป็นต้น ร่างกายคนเรามีการสร้างสาร ROS เหล่านี้ออกมาตลอดเวลาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสาร (metabolism) ตามปกติของร่างกาย เช่น การเผาผลาญ

สารอาหารให้เป็นพลังงานซึ่งต้องอาศัยออกซิเจน และอาจสูงขึ้นในบางสภาวะ เช่น เมื่อมีการติดเชื้อ ในสภาวะปกติ ร่างกายจะมีกระบวนการควบคุมสารออกซิแดนซ์เหล่านี้ไม่ให้มากเกินไป โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) หลายชนิด แต่ถ้ากระบวนการควบคุมเหล่านี้ต่ำลงหรือเสียไปหรือมีภาวะที่ทำให้ ROS มีมากเกินกว่าที่ระบบกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายจะกำจัดออกได้หมด ซึ่งมีผลให้สมดุลเสียไป ก็จะเกิดการทำลายอันเป็นอันตรายต่อชีวโมเลกุล (ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน หรือ DNA) เซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ เรียกว่าเกิดภาวะเครียดจากการกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative stress) ในร่างกายขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกินมานี้จะไปกระตุ้นให้เกิด oxidation ของ lipid ภายในไตเพิ่มขึ้น (Matsushima *et al.*, 1998) โดย ROS หรืออนุมูลอิสระ จะทำหน้าที่ไปแย่งจับดึง หรือรับอิเล็กตรอนของ lipid ในเยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า lipid peroxidation ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังชีวโมเลกุลอื่นๆ เกิดอนุพันธ์ใหม่เป็นลูกโซ่ได้ ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อตามมา โดยการทำลายดังกล่าวจัดเป็น oxidative damage ซึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage จะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะของเซลล์ ชนิด และความรุนแรงของสภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ ROS ยังทำให้เกิดการลดลงของตัวกำจัด ROS ที่อยู่ในเซลล์ เกิด DNA damage เกิดการทำลาย transport protein หลายชนิด เช่น Na^+/K^+-ATPase เกิด protein cross-linking และเกิด cell death ในที่สุด (Brennan, 1996; Thevenod, 2003)

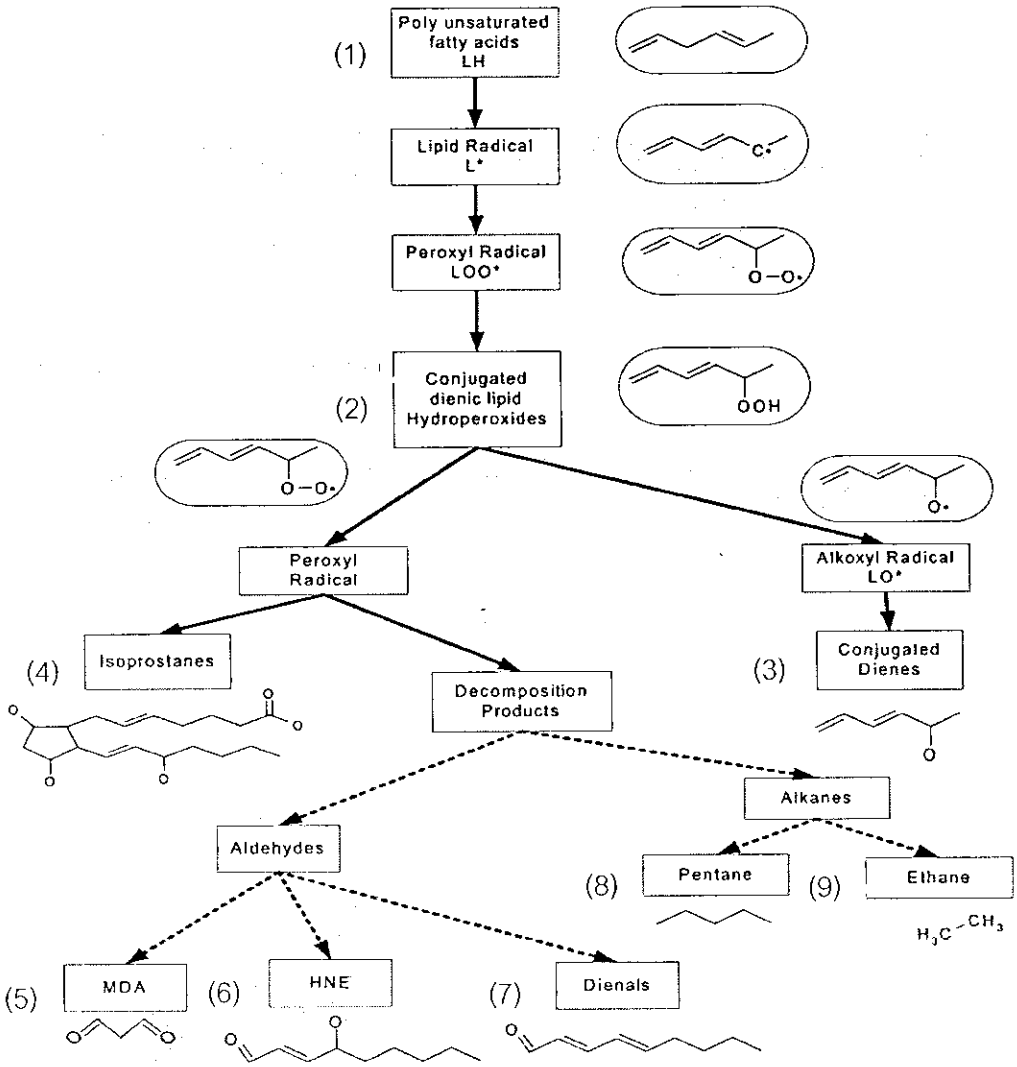
กระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นนี้สามารถสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับสาร malondialdehyde (MDA) หรือสารอื่น ๆ ที่เป็น products ของกระบวนการนี้ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในการหาค่าความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 4

การที่ cisplatin ออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเป็นพิษต่อการทำงานของไตทราบได้จากการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตที่สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับ malondialdehyde (MDA) (Antunes *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001) และค่าการทำงานของไตต่าง ๆ ที่ลดลง โดยค่าการทำงานของไตที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของไต ได้แก่ อัตราการกรอง หรือ glomerular filtration rate (GFR) และ การไหลเวียนของพลาสมาที่ไต หรือ renal plasma flow (RPF) ซึ่งจะลดลงเมื่อมีค่า lipid peroxidation ภายในไตเพิ่มขึ้นหรือเกิดภาวะไตวาย

เฉียบพลัน (Agarwal *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังสังเกตได้จากระดับ blood urea nitrogen ที่เพิ่มขึ้น (Sueishi *et al.*, 2002) และค่า sodium fractional excretion ที่เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย (Kim *et al.*, 1995)

ความรุนแรงของอาการเป็นพิษต่อไตและภาวะไตวายเฉียบพลันขึ้นกับขนาดและวิธีการให้ยาและระยะเวลาหลังให้ยา รวมทั้งสภาพผู้ป่วยหรือชนิดของสัตว์ทดลอง จากรายงานการศึกษาขนาดและการตอบสนองของยา cisplatin ต่อการทำงานของไตพบว่า ในเวลา 2-3 วันหลังการให้ cisplatin ทางหลอดเลือดดำหรือทางช่องท้องสัตว์ทดลอง ขนาดระหว่าง 5-9 mg/kg BW มีผลลด renal plasma flow (RPF) ลด glomerular filtration rate (GFR) เพิ่มการขับทิ้งของ sodium และ potassium ทางปัสสาวะ และเพิ่มค่า blood urea nitrogen (BUN) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Field *et al.*, 1989; Nualplab and Hiranyachattada, 2000)

กลไกของ cisplatin ที่ทำให้เกิดการเป็นพิษต่อไตคือเกิดการสะสมของ cisplatin ที่ renal tubular cell โดยเฉพาะที่ S3 segment ของหลอดไตฝอยส่วน proximal tubule (Blachley and Hill, 1981) รายงานในสัตว์ทดลองที่ได้รับ cisplatin ขนาดระหว่าง (5-7.5 mg/kg) เป็นเวลา 4-7 วันพบว่าที่ไตเกิด proximal tubular necrosis โดยพบ epithelial vacuolization, tubular swelling, tubular dilation และยังพบว่าความสูงของ tubular epithelium ลดลง และมี protein cast ส่วนปลี่ยนแปลงทาง histology ของ glomeruli มีรายงานว่าเกิดขึ้นเช่นกัน (Sueishi *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2003) การเปลี่ยนแปลงทาง histology ของไตอื่น ๆ หลังได้รับ cisplatin ก็มีรายงานมาแล้ว เช่น peritubular และ glomerular congestion, interstitial edema และ inflammatory cell infiltration (Shirwaikar et al., 2004) สำหรับ distal tubule และ collecting duct ก็มีรายงานความเสียหายหลังฉีด cisplatin เช่นกัน (Choie *et al.*, 1981; Megyesi *et al.*, 1998; Shiraishi *et al.*, 2000a,b)



รูปที่ 4 แสดง products และ pathways ต่าง ๆ ในกระบวนการ lipid peroxidation หมายเลขในภาพแสดง products และวิธีการค่าความเข้มข้นของสารนั้น ๆ ดังนี้ หมายเลข (1) polyunsaturated fatty acids และ (2) lipid hydroperoxides ใช้วิธี FOX assay, HPLC หรือ iodometric assay หมายเลข (3) conjugated dienes ใช้วิธี UV spectroscopy (234 nm) หมายเลข (4) isoprostances ใช้วิธี cyclization ของ arachidonic acid และวิธี GC/MS หรือ immunological assays หมายเลข (5) MDA ใช้วิธีการประยุกต์ TBARS assays, GC/MS หรือ HPLC หมายเลข (6) HNE ใช้วิธี HPLC หมายเลข (7) dienals ใช้วิธี spectroscopy หมายเลข (8,9) alkanes ใช้วิธีการวัดระดับ breath gases โดย GC/MS หมายเหตุ GC/MS = gas chromatography/mass spectrometry, HNE = 4-hydroxynonenal, MDA = malondialdehyde, TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances. (Dotan *et al.*, 2004)

กลไกการออกฤทธิ์ของ cisplatin ที่ทำให้เกิดภาวะ nephrotoxicity และ acute renal failure ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีงานวิจัยจำนวนมากที่ชี้ว่าอนุมูลอิสระที่เกิดจากการให้ยา cisplatin จะมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพนี้ (Masuda *et al.*, 1994; Kruidering *et al.*, 1997; Baliga *et al.*, 1998) หรืออาจเกิดจากการลดปริมาณสารที่อยู่ใน antioxidant system ของร่างกายเช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione s-transferase (GST), glutathione (GSH), lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferring, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin, และ cysteine I รวมทั้งสารกลุ่มอื่น เช่น β-carotene, flavonoids, วิตามินเอ, วิตามินซี และวิตามินอี (Zhang and Lindup, 1993; Weijl *et al.*, 1998; Greggi Antunes *et al.*, 2000; Francescato *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Mansour *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 2003; Naziroglu.*et al.*, 2004; Badary *et al.*, 2005; Atessahin *et al.*, 2005;)

การเกิดอนุมูลอิสระหลังการให้ cisplatin จะทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่ renal tubule ซึ่งสังเกตุได้จากปริมาณ melondialdehyde (MDA) ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีรายงานว่าอยู่ระหว่าง 20-200% ของค่าปกติที่เกิดขึ้นในเนื่อเยื่อสัตว์ทดลอง (Matsushima et al., 1998; Francescato *et al.*, 2001; Greggi Antunes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Mansour *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 2003; Badary *et al.*, 2005) และ renal cortical slices (Zhang and Lindup, 1993; Kim et al., 1997) ซึ่งความแตกต่างของระดับ MDA อาจเกิดจากขนาดยา ระยะเวลา และ species ของสัตว์ทดลอง

การออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระต่อภาวะ nephrotoxicity

สารต้านอนุมูลอิสระหลายตัวมีคุณสมบัติในการยับยั้งภาวะ oxidative stress และป้องกันภาวะ nephrotoxicity ที่ถูกชักนำโดย cisplatin หรือสารพิษอื่น ๆ ได้ โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระนั้นไม่เป็นอนุมูลอิสระอีก งานวิจัยหลายชิ้นได้ทำการศึกษาการป้องกันและรักษาผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา cisplatin โดยการให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของ antioxidants และ free radical scavengers ที่มีรายงานว่าสามารถป้องกัน renal oxidative damage ที่ถูกชักนำโดย cisplatin.

Antioxidants and dose of cisplatin administered	Protective effect	References
Aminoguanidine (peroxynitrite scavenger) 100 mg/kg + cisplatin 7.5 mg/kg	Decreased serum urea and creatinine concentrations, urine volume, urinary excretion of albumin and GST, renal MDA level and kidney weight and increased GST and GSH-Px activities in the kidney of Swiss albino rats	Mansour et al., 2002
Bixin 2.5 or 5 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Reduced cisplatin-induced abnormal metaphases and total number of chromosome aberrations, inhibited an increase in lipid peroxidation and renal GSH depletion induced by cisplatin in Wistar rats	Silva et al., 2001
Catalase 500 U/ml and pyruvate (hydrogen peroxide scavenger) 10 mM + cisplatin 2 mM	Partially prevented necrotic cell death in primary culture of rabbit proximal tubules	Baek et al., 2003
Deferoxamine 1 mM (iron chelator) + cisplatin 25 and 75 μM	Completely prevented generation of ROS as determined by the fluorescence probe Dih 123 in porcine proximal tubular cells	Kruidering et al., 1997
Dimethylthiourea (hydroxyl radical scavenger) 500 + 125 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Associated with less accumulation of MDA, less tubular damage and enhanced expression of proliferating cell nuclear antigen in the damaged tubular cells	Matsushima et al., 1998

ตารางที่ 1 ชนิดของ antioxidants และ free radical scavengers ที่มีรายงานว่าสามารถป้องกัน renal oxidative damage ที่ถูกชักนำโดย cisplatin (ต่อ)

Antioxidants and dose of cisplatin administered	Protective effect	References
Dimethylthiourea (hydroxyl radical scavenger) 500 + 125 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Inhibited cytochrome c release from mitochondria and caspase-3 activation in M117 and LLC-PK1 cells, prevented increase in serum creatinine level and fractional excretion of Na+ in New Zealand white rabbits	Baek et al., 2003
30 mM + cisplatin 50 μM and 2 mM	Inhibited apoptotic cell death in primary culture of rabbit proximal tubules	
Edavarone 1-10 mg/kg + cisplatin 5-10 mg/kg	Reversed the cisplatin-induced elevation of BUN and serum creatinine and morphological changes, including vacuolation, necrosis and protein casts in Wistar rats	Sueishi et al., 2002
Erdostein 10 mg/kg + cisplatin 7 mg/kg	Reduced depletion in the tissue CAT, GSH-Px and SOD activities, attenuated increase in plasma creatinine, BUN, tissue MDA, nitric oxide levels and provided a histologically-proven protection against cisplatin-induced ARF in Wistar albino rats	Yildirim et al., 2003
Isoeugenol 10 mg/kg + cisplatin 3 mg/kg	Prevented body weight reduction and BUN and serum creatinine elevation in rats	Rao et al., 1999
Lecithinized superoxide dismutase (superoxide anion scavenger) 3000 U/kg + cisplatin 5 mg/kg	Attenuated the increase in serum creatinine, preservation of RBF and increased urinary cyclic guanosine monophosphate (cGMP) excretion in Sprague-Dawley rats	Matsushima et al., 1998

ตารางที่ 1 ชนิดของ antioxidants และ free radical scavengers ที่มีรายงานว่าสามารถป้องกัน renal oxidative damage ที่ถูกชักนำโดย cisplatin (ต่อ)

Antioxidants and dose of cisplatin administered	Protective effect	References
Lycopene 4 mg/kg + cisplatin 7 mg/kg	Decreased plasma creatinine and urea, provided marked normalization in kidney tissue MDA and GSH concentration, increased CAT activity, reduced tubular necrosis in Sprague-Dawley rats	Atessahin et al., 2005
Naringenin 20 mg/kg + cisplatin 7 mg/kg	Reduced serum urea and creatinine concentrations, polyuria, body weight loss, urinary fractional excretion of Na+ and GST activity, increased creatinine clearance, SOD, GSH-Px and CAT activities, improved alteration in renal lipid peroxidation and GST activity in Wistar rats	Badary et al., 2005
Diphenyl-p-phenylenediamine 20 μM + cisplatin 25 and 75 μM	Completely prevented generation of ROS as determined by the fluorescence probe Dih 123 in porcine proximal tubular cells	Kruidering et al., 1997
Salviae radix extract 0.05% + cisplatin 5 mg/kg	Decreased lipid peroxidation, serum creatinine levels, fractional excretion of Na+ and renal morphological changes and increased GFR in rabbits, reduced lactate dehydrogenase release and lipid peroxidation and increased PAH uptake in renal cortical slices	Jeong et al., 2001
Selenium (sodium selenite) 2 mg/kg + cisplatin 15-25 mmol/kg	Reduced BUN and plasma creatinine levels in mice	Satoh et al., 1992

ตารางที่ 1 ชนิดของ antioxidants และ free radical scavengers ที่มีรายงานว่าสามารถป้องกัน renal oxidative damage ที่ถูกชักนำโดย cisplatin (ต่อ)

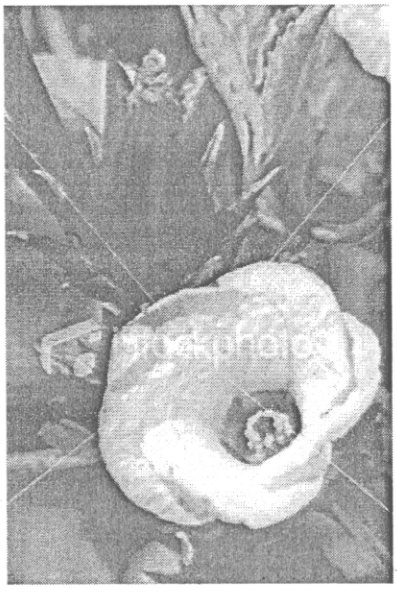
Antioxidants and dose of cisplatin administered	Protective effect	References
Selenium (sodium selenite) 2 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Decreased the effect of cisplatin on creatinine, renal MDA levels and kidney necrosis in Wistar rats	Francescato et al., 2001
Selenium 1.5 mg/kg + cisplatin 6 mg/kg	Increased renal GSH-Px activity and β-carotene, vitamin E and GSH levels, decreased MDA levels in Wistar rats	Naziroglu et al., 2004
Sodium benzoate (hydroxyl radical scavenger) 600 + 300 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Attenuated tubular damage, as documented by the histologic examination and the measurement of urinary NAG isoenzyme B activity excretion	Matsushima et al., 1998
Vitamin C 2.5 g/kg + cisplatin 6 mg/kg	Reduced BUN and urinary protein excretion in Wistar rats	Appenroth et al., 1997
Vitamin C 50, 100 and 200 mg/kg + cisplatin 5 mg/kg	Decreased serum creatinine levels and increased GSH levels and creatinine clearance	Greggi Antunes et al., 2000
Vitamin E 1 g/kg + cisplatin 6 mg/kg	Increased vitamin E concentration in kidney and decreased urinary volume, urinary protein excretion and BUN in Wistar rats	Appenroth et al., 1997
Vitamin E 1 g/kg + cisplatin 6 mg/kg	Increased renal GSH-Px activity and β-carotene, vitamin E and GSH levels, decreased MDA levels in Wistar rats	Naziroglu et al., 2004

นอกจากรายงานในตารางข้างต้นแล้ว มีการทดลองในหนูที่ได้รับ วิตามินซีและวิตามินอี ก่อนได้รับ methyl parathion ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันเช่นกัน พบว่าระดับ MDA ของเนื้อเยื่อไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อไตที่ถูกทำลายจากการได้รับ methyl parathion เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ methyl patathion เพียงอย่างเดียว (Kalender *et al.*, 2007) และรายงานล่าสุดของสารต้านอนุมูลอิสระ ligustrazine ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนซึ่งเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูแร็ทด้วยขนาดยาที่ 50 และ 100 mg/kg/day เป็นเวลา 7 วันต่อเนื่องกัน และเริ่มฉีด cisplatin ในวันที่ 2 ขนาด 8 mg/kg เข้าทางหลอดเลือดดำ จะมีผลทำให้ระดับ urinary protein, urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, serum creatinine, blood urea nitrogen, MDA และ พยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไตที่ถูกทำลายกลับสู่ภาวะปกติ (Liu *et al.*, 2008)

อย่างไรก็ตามในการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสารที่เป็น antioxidants จากร่างกายคือ glutathione กับสารพวก nucleophiles เช่น sodium thiosulfate, N-methyl–D-glucamine dithiocarbamate และ S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid (WR-2721) ในการป้องกัน nephrotoxicity จาก cisplatin พบว่า glutathione ซึ่งร่างกายสร้างขึ้นเพื่อทำลายอนุมูลอิสระจะให้ผลดีกว่าสารที่ได้จากภายนอก (Jones *et al.*, 1991)

ฤทธิ์ทางสรีรวิทยาและเภสัชวิทยาของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*)

กระเจี๊ยบแดงหรือ Roselle มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Hibiscus sabdariffa* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชล้มลุก อายุเกิน 1 ปี ลำต้นและกิ่งก้านมีสีแดงอมม่วง ขอบใบหยักลึก 3-5 แฉก คล้ายนิ้วมือ ก้านใบยาว ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่สีเหลืองหรือชมพู ดอกออกตรงซอกระหว่างกิ่งและใบ เมื่อกลีบดอกร่วงกลีบเลี้ยงจะขยายใหญ่ มีลักษณะหนาและแข็ง สีแดงอมม่วง มีรสเปรี้ยว ผลสีแดงมีกลีบเลี้ยงและใบประดับหุ้มอยู่ (วันดี, 2539)



รูปที่ 5 ดอกและกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa L.*)

สารที่พบในกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงมีหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ 1) เกลือแร่ เช่น อลูมิเนียม แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม สังกะสี โครเมียม (Falade *et al.*, 2005) 2) กรดอินทรีย์ เช่น วิตามินซี (Falade *et al.*, 2005) และ 3) สารประกอบฟีนอล (polyphenolic compound) ได้แก่ protocatechuic acid, Hibiscus anthocyanin, delphinidin 3-glucoside และ quercetin (Tseng *et al.*, 1996; Duh and Yen., 1997; Tseng *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002) ปริมาณและวิธีการตรวจหาสารเหล่านี้แสดงในตารางที่ 2

สรรพคุณของกระเจี๊ยบแดงในตำรับยาไทยคือ การใช้กลีบเลี้ยงกนำมาเป็นเครื่องดื่มซึ่งช่วยแก้กระหายน้ำ และทำให้อุณหภูมิของร่างกายลดลง (นิจศิริ, 2534) แล้วยังช่วยขับปัสสาวะ รักษานิ่ว และโรคทางเดินปัสสาวะ อักเสบ ช่วยย่อยอาหารประเภทไขมัน ช่วยระบาย ช่วยรักษาและป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน ช่วยลดอัตราการดูดซึมแอลกอฮอล์ (วันดี, 2539 และ พเยาว์, 2534) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเป็น folk medicine ที่ออกฤทธิ์ antiseptic, aphrodisiac, astringent, resolvent, cholagogue, digestive, diuretic และเป็นยารักษา abscess, heart ailment และ hypertension (Perry, 1980)

ฤทธิ์ลดความดันเลือดและขับปัสสาวะของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*)

การทดลองทางคลินิกพบว่าคนไข้ essential hypertension เมื่อดื่มน้ำกระเจี๊ยบทุกวันในระยะเวลาหนึ่ง สามารถทำให้ความดันเลือดลดลงและการขับ sodium ทิ้งทางปัสสาสะเพิ่มมากขึ้น (Haji Faraji and Haji Tarkhani, 1999; Herrera-Arellano *et al.*, 2004) ส่วนการทดลองในสัตว์นั้น พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำเมื่อให้ทางหลอดเลือดดำของหนูแร็ทที่สลบจะแสดงคุณสมบัติของในการลดความดันเลือดแบบ dose-dependent ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอว่ากลไกการออกฤทธิ์ในการลดความดันเลือดนี้น่าจะผ่าน acetylcholine-like และ histamine-like mechanism ในการทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Adegunloye *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำในการลดความเลือดแบบ dose-dependent ทั้งในหนูปกติและหนูความดันเลือดสูงทั้งแบบ spontaneous (Onyenekwe *et al.*, 1999) แบบความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วยเกลือ (salt-induced hypertension) หรือ L-NAME (Mojiminiyi *et al.*, 2007) และแบบความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำวิธี 2-kidney,1-clip renovascular hypertension (Odigie *et al.*, 2003)

เนื่องจากพยาธิสภาพของการเกิดความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำวิธี 2-kidney, 1-clip renovascular hypertension นั้นเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเพิ่มอนุมูลอิสระ $O2^-$ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitrovasodilators ลดลง (Heitzer *et al.*, 1999)

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการลดความดันเลือดโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัวของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วย methanol นั้นต้องอาศัย endothelim-derived nitric oxide/cGMP relaxant pathway หรือ การยับยั้งการทำงานของ calcium influx ผ่านทาง receptor-gated channels (Ajay *et al.*, 2007) หรืออาจผ่านกลไกการยับยั้ง angiotensin converting enzyme (Jonadet *et al.*, 1990)

ตารางที่ 2 Chemical constituents of *Hibiscus sabdariffa* Linn. calyces.

Chemical constituents	Detection method	References
Total anthocyanins (amount)		
(2.5%)	Spectrophotometer method	Chen et al., 2003
(0.96 g/kg)	Colorimetric method	Herrera-Arellano et al., 2004
(57 mg/kg)	-	Falade et al., 2005
(14.74 g/kg)	HPLC	Frank et al., 2005
Delphinidin-3-glucoside (0.3 g/kg)	HPLC	Frank et al., 2005
Delphinidin-3-sambubioside (8.16 g/kg)	HPLC	Frank et al., 2005
Cyanidin-3- glucoside (18 mg/kg)	HPLC	Frank et al., 2005
Cyanidin-3- sambubioside (6.26 g/kg)	HPLC	Frank et al., 2005
Delphinidin-3-sambubioside	HPLC	Hou et al., 2005
L-ascorbic acid	-	Oboh and Elusiyan, 2004
(625 mg/kg)	2,4-dinitro phenyl hydrazine	Falade et al., 2005
Total polyphenolic acid (1.7%)	Folin-Ciocalteau method	Chen et al., 2003
Total flavonoids (1.43%)	Spectrophotometer method	Chen et al., 2003
Protocatechuic acid	-	Liu et al., 2005
Hibiscus acid and its 6-methyl ester	HPLC	Hansawasdi et al., 2000
Aluminum, chromium, copper, iron, manganese and nickel	Electrothermal atomic absorption spectrometry	Wrobel et al., 2000
Zinc, sodium and calcium	-	Oboh and Elusiyan, 2004
Calcium (9.7 g/kg), iron (177 mg/kg), magnesium (2.2 g/kg) and zinc (28 mg/kg)	Atomic absorption spectrophotometry	Falade et al., 2005

ความเป็นพิษของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*)

มีรายงานทางคลินิคในคนปกติที่สุขภาพแข็งแรงที่ได้ดื่มน้ำกระเจี๊ยบระยะหนึ่งแล้วพบว่าการขับทิ้งของ creatinine, uric acid, citrate, tartrate, calcium, sodium, potassium และ phosphate ในปัสสาวะลดลง แต่การขับทิ้งของ oxalate เป็นปกติ (Kirdpon *et al.*, 1994)

ในสัตว์ทดลอง (spontaneously hypertensive rat) ที่ได้รับสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบด้วยน้ำเป็นเวลานานนั้น นอกจากทำให้ความดันเลือดลดลงแล้วยังพบว่าระดับ creatinine, cholesterol และ glucose ในเลือดลดลงแต่ระดับ uric acid ในเลือดเพิ่มขึ้นและมีปริมาณปัสสาวะเพิ่มขึ้นด้วย (Onyenekwe *et al.*, 1999) ส่วนการทดลองในหนูแร็ทที่ได้รับสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบด้วยน้ำเป็นเวลาหลายสัปดาห์อีกการทดลองหนึ่งพบว่าระดับ sodium, potassium, chloride และ bicarbonate ในเลือดลดลงแต่ระดับ creatinine และ urea เพิ่มขึ้น (Orisakwe et al., 2003) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงระดับของสารต่าง ๆ ในเลือดและการขับทิ้งของสารเหล่านั้นทางปัสสาวะที่เกิดจากการได้รับสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบอาจจะขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสาร

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*)

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* มาแล้ว โดยการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์ที่ใช้ทดสอบหรือใน liposome model ได้ (Tseng *et al.*, 1996; Duh and Yen, 1997; Suboh *et al.*, 2004; Hirunpanich *et al.*, 2005; Farombi and Fakoya *et al.*, 2005)

ส่วนการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงทั้งแบบ *in vivo* นั้นก็มีรายงานมาบ้างเช่นกัน โดยสามารถลด LDL oxidation (Hirunpanich *et al.*, 2006) ลด sperm abnormality และ ต้านการลดลงของเอนไซม์ GSH, SOD, CAT และ MDA ได้ (Amin and Hamza, 2006)

เนื่องจากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ หลายชนิด แต่สารที่มีการทดสอบว่ามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้แก่พวก anthocyanins และ protocatechuic acid (Wang et al., 2000; Tsai et al, 2002; Lee et al., 2002)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงนอกจากที่กล่าวแล้วอีกมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสรรพคุณทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.)

Effects	References
Anti-analgesic and antipyretic activities	Dafallah and al-Mustafa, 1996
Anti-atherosclerotic effect	Lee *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2003
Antibacterial activity	Oboh and Elusiyan, 2004; Liu *et al.*, 2005
Anti-clastogenic effect	Adetutu *et al.*, 2004
Anti-hepatoma activity	Lin *et al.*, 2002
Anti-inflammation and against ulceration	Clûzel *et al.*, 2002
Antimutagenic effect	Chewonarin *et al.*, 1999;Farombi and Fakoya, 2005
Antispasmodic effect	Ali *et al.*, 1991
Antitumor	Tseng *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005
Constipating agent, reducing the intensity of diarrhea (inhibitor of intestinal motility)	Salah *et al.*, 2002; Owulade *et al.*, 2004
Enzyme inhibitor	
- α-chymotrypsin and trypsin	Abu-Tarboush and Ahmed, 1996
- porcrine pancreatic α-amylase	Hansawasdi *et al.*, 2000; Hansawasdi *et al.*, 2001
Hepatoprotective effect	Tseng *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2003 Lin *et al.*, 2003; Amin and Hamza, 2005; Liu *et al.*, 2006
Adipogenesis blocker	Kim *et al.*, 2003
Hypolipidemic effect	el-Saadany *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2003; Hirunpanich *et al.*, 2006
Stimulate proliferation and differentiation of human keratinocytes	Brunold *et al.*, 2004

วัตถุประสงค์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อภาวะไตวายเฉียบพลันที่เกิดจากการชักนำโดย cisplatin ในหนูแร็ท โดยการวัดระดับ renal melondialdehyde (MDA) และ renal functions ได้แก่ renal plasma flow, glomerular filtration rate, sodium และ potassium excretion และ blood urea nitrogen (BUN) โดยใช้ clearance technique โดยตั้งสมมุติฐานของงานวิจัยว่าด้วยคุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำจะสามารถลดกระบวนการ lipid peroxidation โดยการลดปริมาณ reanl MDA, BUN และสามารถป้องกันการลดลงของค่า GFR, RPF ในภาวะ acute renal failure ที่เกิดขึ้นจากการให้ยา cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg ในหนูแร็ทเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับหาแนวทางในการพัฒนาพืชสมุนไพรไทยชนิดนี้ไปเป็นยาเพื่อลดความเป็นพิษต่อไตซึ่งเกิดจากการให้ยารักษามะเร็ง