

Thesis Title	Effect of <i>Spirogyra neglecta</i> Extract on Renal Organic Anion Transporter 1 and 3 Function in Type 2 Diabetic Rats	
Author	Miss Atcharaporn Ontawong	
Degree	Master of Science (Physiology)	
Thesis Advisory Committee		
	Dr. Chutima Srimaroeng	Advisor
	Dr. Anusorn Lungkaphin	Co-advisor
	Dr. Narissara Lailerd	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Anchalee Pongchaidecha	Co-advisor

ABSTRACT

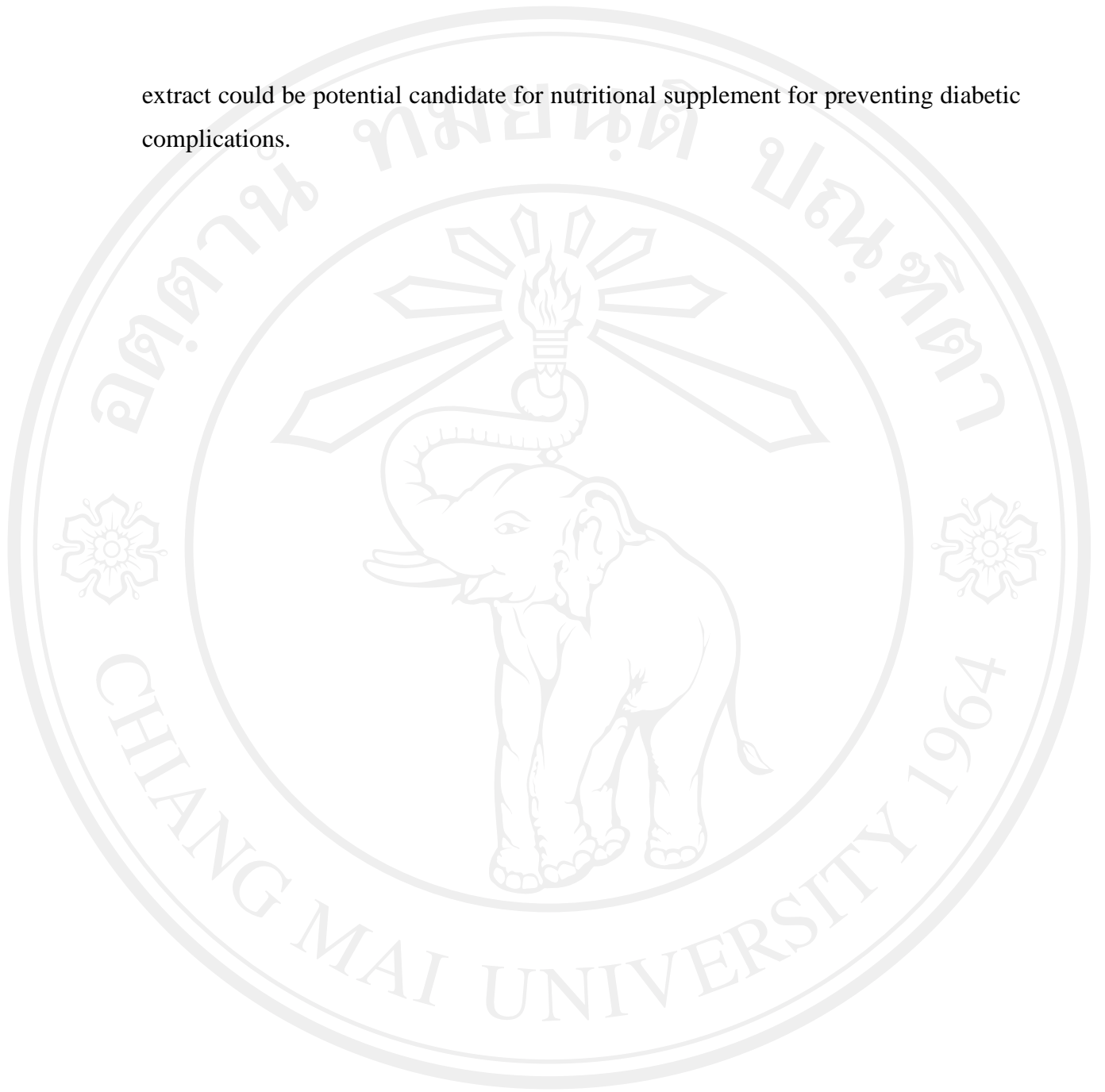
Spirogyra neglecta (SN) has been widely grown in Nan River, Northern Thailand. *In vivo* studies indicated that this species has several beneficial effects, including anti-gastric ulcer, anti-inflammatory, anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic actions. Recently, antioxidant effect of SN extract was shown *in vitro* and suggested that SN may subsequently be useful for applying as therapeutic drugs and/or food supplements. The aims of this study were to determine the effect of *Spirogyra neglecta* extract on rat renal organic anion transporter 1 and 3 (rOat1 and rOat3) functions, and identify its effect on regulatory mechanisms of rOat1 and rOat3 functions in type 2 diabetic (T2DM) rats.

Thirty Male Wistar rats were equally divided into five groups, which were normal control (NC), normal with SN supplement (NC+SN1000), type 2 diabetes (DMC), diabetes supplemented with SN (DM+SN1000) and diabetes supplemented with ascorbic acid (DM+vit.C). T2DM rats were induced by high-fat diet with low single dose of streptozotocin injection. The supplementations by SN extract (1000 mg/kg BW) and vitamins C (200 mg/kg BW) were subsequently administrated by daily oral gavage for 12 weeks. At the end of experiment, the animals were sacrificed. Blood and tissue samples were collected for biochemical analyses, and renal lipid

peroxidation was determined. Organic anion transport functions by rOat1 and 3 were obtained using para-aminohippurate (PAH) and estrone sulfate (ES). The up-regulation of these two transporters by insulin stimulation was also determined. Oxidative stress gene expressions were analyzed using semi-quantitative polymerase chain reaction. Rat Oat3 and regulatory protein expressions were identified by western blotting analyses.

T2DM rats were shown hyperglycemia, hypertriglyceridemia and insulin resistance indicated by HOMA index. However, the plasma glucose, triglyceride, and HOMA index were markedly reduced in DM+SN1000 compared to that of DM. Moreover, the significant increase in lipid peroxidation indicated by malondialdehyde (MDA) level in DM rat kidneys was apparently reduced by both SN extract and vitamin C supplementations, suggesting that antioxidant activity in SN extract had reduced hyperglycemic-induced lipid peroxidation in T2DM rat kidneys similarly to that of vitamin C. The basal uptake of PAH and ES in renal slices mediated by rOat1 and rOat3 were not different among experimental groups, paralleling with no changes in rOat3 protein expression. However, up-regulation of rOat1 and 3 functions by insulin stimulation were completely blunted in DM rats, and this defect was completely restored in DM supplemented with both SN extract and vitamin C. The result implies that the impairment of intracellular signaling proteins in T2DM rat kidneys could be recovered by antioxidant activity of SN extract. Although oxidative stress gene expressions, including glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase, did not show significant differences among experimental groups, the activation of p65NF κ B and PKC α were significantly increased in DM rats. Likewise, SN extract was able to deactivate these oxidative stress protein markers. In addition, SN supplementation induced the activation and translocation of PKC ζ from cytosol to the membrane in DM rat kidneys. Thus, these findings indicated that T2DM experimental rats were linked to hyperglycemia and hypertriglyceridemia induced oxidative stress through changing intracellular signaling protein expressions and functions, leading to down-regulated rOat1 and 3 functions. SN supplementation, according to this study, had ability to attenuate these consequences. Therefore, SN

extract could be potential candidate for nutritional supplement for preventing diabetic complications.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดสาหร่ายเตา (<i>Spirogyra neglecta</i>) ต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ ชนิดที่ 1 และ 3 ในท่อไตของหนูขาวที่มีโรคเบาหวานชนิดที่ 2	
ผู้เขียน	นางสาวอัจฉราภรณ์ อ่อนตะวงค์	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. ชุตินา ศรีมะเร็ง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ดร. อนุสรณ์ ลังกาพินธุ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. นริศรา ไต้เลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. อัญชลี พงศ์ชัยเดชา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

สาหร่ายเตาเป็นสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ที่ชาวบ้านในเขตภาคเหนือโดยเฉพาะจังหวัดแพร่ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสาหร่ายเตามีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ลด แผลในกระเพาะอาหาร ต้านอักเสบ ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด นอกจากนี้ จากการศึกษาทดลอง ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดสาหร่ายเตามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายเตาต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ที่ท่อไตส่วนต้นของหนูขาวที่มีโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยหนูขาวจะถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะเบาหวานด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีด สารสเตรปโตโซโตซินที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 30 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (NC) กลุ่มปกติที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายเตา (NC+SN1000) กลุ่มเบาหวานควบคุม (DM) กลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายเตา (DM+SN1000) และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับวิตามินซี (DM+vit.C) ภายหลังการเหนี่ยวนำภาวะเบาหวาน หนูขาวจะได้รับสารสกัดสาหร่ายเตาขนาด 1000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หรือวิตามินซี ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปากเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อไตจะถูก

นำไปวิเคราะห์ทางชีวเคมีและตรวจวัดระดับสถานะปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันนอกจากนี้เนื้อเยื่อไตจะนำไปตรวจวัดการทำงานและการควบคุมการทำงานด้วยอินซูลินของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ด้วยสารติดแถบรังสีที่จำเพาะต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ โดยการวัดปริมาณสารรังสี *para-aminohippurate* หรือ *estrone sulfate* ที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อไต ตรวจวัดการแสดงออกของเอนไซม์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี Polymerase chain reaction และตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ และโปรตีนตัวกลางอื่นๆ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อไตโดยใช้เทคนิค Western blot analysis

ผลการศึกษาพบว่าหนูขาวกลุ่มเบาหวานควบคุมมีระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาสูงร่วมกับมีภาวะคีโตนินซูลิน ในขณะที่หนูขาวกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการสารสกัดสำหรับเตามีภาวะน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาลดลง มีภาวะคีโตนินซูลินลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้หนูขาวกลุ่มเบาหวานควบคุมจะพบภาวะเครียดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อไตเพิ่มขึ้น และ สารสกัดสำหรับเตาช่วยลดภาวะดังกล่าวได้เช่นเดียวกับหนูที่ได้รับการวิตามินซี จากการตรวจวัดการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการทำงานของโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ไม่พบการตอบสนองต่อผลของอินซูลินต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบทั้งชนิดที่ 1 และ 3 ในหนูขาวกลุ่มเบาหวานควบคุม ในขณะที่หนูขาวกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการสารสกัดสำหรับเตา พบการตอบสนองผลของอินซูลินต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบทั้งชนิดที่ 1 และ 3 เหมือนหนูขาวกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม จากการวัดการแสดงออกของเอนไซม์ต้านสารอนุมูลอิสระ ไม่พบความแตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนพบว่า หนูขาวกลุ่มเบาหวาน มีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p65NFkB PKC α และ PKC ζ เพิ่มขึ้น ในขณะที่หนูขาวกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการสารสกัดสำหรับเตา สามารถลดกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p65NFkB และ PKC α ได้และยังสามารถกระตุ้นการสร้างและการทำงานของโปรตีน PKC ζ เพิ่มขึ้น ซึ่งผลดังกล่าว ส่งผลช่วยในการตอบสนองผลของอินซูลินต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบทั้งชนิดที่ 1 และ 3 ได้ในหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยอาหารไขมันสูง ร่วมกับการฉีดสารสเตโรยโตโซโตซิน จะเกิดภาวะน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาสูง เกิดภาวะคีโตนออสโมซิส เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อไตและไม่เกิดการตอบสนองผลของอินซูลินต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 โดยพบว่า มีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p65NFkB PKC α และ PKC ζ เพิ่มขึ้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดสาหร่ายเตา ทำให้ภาวะน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาลดลง ลดภาวะคีโตนออสโมซิส ลดภาวะเครียดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อไต ลดการทำงานของโปรตีน p65NFkB และ PKC α และยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างและการทำงานของโปรตีน PKC ζ เพิ่มขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวมีส่วนช่วยให้เกิดการตอบสนองผลของอินซูลินต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ในหนูที่มีโรคภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นประโยชน์ของสารสกัดสาหร่ายเตาในการป้องกันและ/หรือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะน้ำตาลสูง ที่ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและอาจส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนทางไตในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้