

ผลของยาอิรีย์โธรพอยอิติน เบต้า ต่อการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณ
ท่อน้ำไขสันหลังของไต ในหนูที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง

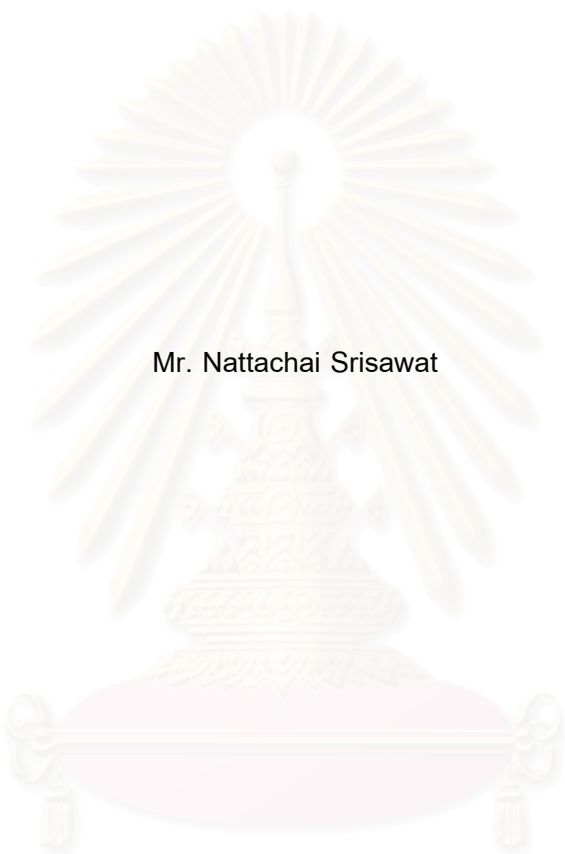


นาย ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN BETA ON TUBULOINTERSTITIAL INJURY
IN UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION RATS



Mr. Nattachai Srisawat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

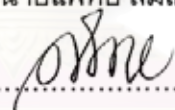
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของยาอีริโทรพอยอิติน เบต้า ต่อการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณ
ท่อนำไข่ในสัตว์ทดลองชนิดหนู ในหนูที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง
โดย นาย ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์
สาขาวิชา อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


 คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

 อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประวิตร อัครวานนท์)

 กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม)

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์ : ผลของยาอีริยโรพอยอิติน เบต้า ต่อการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณ ทูบูลินเตอร์
 สติเซียมของไต ในหนูที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง (EFFECT OF ERYTHROPOIETIN BETA ON
 TUBULOINTERSTITIAL INJURY IN UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION RATS)
 อ. ที่ปรึกษา : ศ. นพ. สมชาย เขียมอ่อง; 85 หน้า.

ความเป็นมา นอกจากยาอีริยโรพอยอิตินมีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไขกระดูกให้มีการ
 สร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ยังมีผลดีต่อการทำงานของเซลล์ในอวัยวะต่างๆมากมาย (pleiotropic effect)
 เช่น เซลล์ในระบบประสาทและสมอง เซลล์ในระบบหัวใจและหลอดเลือด แต่ยังคงขาดการศึกษาผลของยาอี
 ริยโรพอยอิตินต่อภาวะโรคไตวายเรื้อรัง

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของยาอีริยโรพอยอิตินเบต้า ต่อการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณทูบูลิน
 เตอร์สติเซียมของไต ในหนูที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง ที่ระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน

วิธีการศึกษา ทำการแบ่งหนูทดลองสายพันธุ์สปริงดอลล์ เพศผู้ น้ำหนัก 250-320 กรัม เป็น 2
 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมทำการผูกท่อไต 1 ข้าง แต่ไม่ได้รับการฉีดยา อีริยโรพอยอิติน
 เบต้า กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองได้รับการผูกท่อไต 1 ข้าง และฉีดยาอีริยโรพอยอิตินเบต้า ในขนาด 5000
 ยูนิต/กก. ทำการฉีดยา 1 วันก่อนผูกท่อไต และทุก 3 วันหลังผูกท่อไต บันทึกปริมาณพยาธิสภาพที่บริเวณ
 ทูบูลินเตอร์สติเซียม ปริมาณคอลลาเจน เซลล์มัยโอไฟโบรบลาส เซลล์แมคโครฟาจ และเซลล์ อะพอพโตซิส
 ของไต ที่ระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน หลังการผูกท่อไตโดยที่ไม่ทราบว่าเป็นสไลด์ของหนูทดลองกลุ่มใด
 ทำการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่บริเวณเนื้อไตชิ้นนอกทั้งหมด 20 ส่วน

ผลการศึกษา ยาอีริยโรพอยอิตินเบต้า สามารถลดการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณทูบูลินเตอร์
 สติเซียม ลดปริมาณคอลลาเจน เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์มัยโอไฟโบรบลาสและเซลล์อะพอพโตซิส ได้อย่าง
 มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาอีริยโรพอยอิติน ระดับฮีมาโตคริตสูงกว่ากลุ่ม
 ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สรุป ยาอีริยโรพอยอิตินเบต้า สามารถลดพยาธิสภาพที่บริเวณทูบูลินเตอร์สติเซียมของไต ในหนู
 ที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์.....
 สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์.....
 ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4874726030 : MAJOR MEDICINE (NEPHROLOGY)

KEYWORD : ERYTHROPOIETIN / UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION / TUBULOINTERSTITIAL INJURY

NATTACHAI SRISAWAT : EFFECT OF ERYTHROPOIETIN BETA ON TUBULOINTERSTITIAL INJURY IN UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION RATS. THESIS ADVISOR : PROF. SOMCHAI EIAM-ONG, M.D. 85 pp.

Background: Recombinant Human EPO (rHuEPO) which is used for treatment of anemia associated with chronic kidney disease (CKD) and cancer, also has pleiotropic properties such as anti-inflammation and anti-apoptosis in many non-renal animal models including heart, brain and spinal cord. However, the renal protective effect of rHuEPO on CKD model such as in unilateral ureteral obstruction (UUO) model, an accelerated animal model of obstructive nephropathy leading to tubulointerstitial fibrosis (TIF), has never been explored.

Method: To examine the effect of rHuEPO treatment on renal TIF, male Sprague-Dawley rats, weighed 250-320 gm, underwent 1) UUO without rHuEPO treatment (control, n=12) and 2) UUO with rHuEPO treatment (n=12). rHuEPO was injected subcutaneously at the dose 5,000 u/kg to each rat at 1 day before surgery and then every 3 days until sacrifice. Four rats of each group were sacrificed on day 3, 7, and 14. The effect of rHuEPO on UUO-induced TIF were evaluated with tubulointerstitial injury (TI) score, collagen score, the number of myofibroblast and macrophage infiltration, and apoptotic cell death in a blinded manner on 20 randomly selected non-overlapping fields throughout the renal cortex.

Results: Ligation of the ureter generated obstructed kidney showing severe tubular dilatation, tubular atrophy, and widened interstitial space with a greater number of interstitial cells and infiltrating macrophage. These changes were observed in the whole cortex. Administration of rHuEPO significantly decreased TI injury score, collagen and the number of infiltrating macrophage, which were increased significantly in UUO-treated rat kidneys, on day 3, 7, and 14. Apoptotic cell death in UUO-induced TI injury rat kidneys was also significantly reduced with rHuEPO treatment. Of note, rHuEPO-treated rats had higher hematocrit levels than the control group.

Conclusion: rHuEPO has ameliorate effects on reduction renal TIF in experimental UUO rat model.

Department Medicine

Student's signature 

Field of study Medicine

Advisor's signature 

Academic year 2006

Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของบุคคลเหล่านี้

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เขียมอ่อน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งการหาทุนทั้งหมดสำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ กฤษณพงศ์ มโนธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยเหลือทางเทคนิคต่างๆในการวิจัย ในสัตว์ทดลอง รวมถึงช่วยเหลือในการย้อมทางพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาจำนวนแมคโครฟาจและเซลล์อะพอพโตซิส ในเนื้อไต

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ เกรียง ตั้งสง่า ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ พันตำรวจโทนายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง ข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ยิงยศ อวิหิงสานนท์ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และ ข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ดอกเตอร์ สมจิตร เขียมอ่อน ภาควิชาสรีรวิทยา ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง ข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆในงานวิจัยในสัตว์ทดลอง รวมถึงการอนุญาตให้เลี้ยงสัตว์ทดลองและทำงานวิจัยที่ ภาควิชาสรีรวิทยา

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูล ต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ พิสุทธิ กตเวทิน ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูล ต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ นี้อต เตชะวัฒนวรรณ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และ ข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ทรงเกียรติ หลิวสุวรรณ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และ ข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคไตทุกท่านผู้ให้ความช่วยเหลือรวบรวม และวิเคราะห์ ข้อมูลในงานวิจัย

ขอขอบคุณ นายพงศ์ศักดิ์ พันธุ์สิน และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไตทุกท่าน ซึ่งมีจิตใจ เอื้อเฟื้อและได้ให้กำลังใจสนับสนุนการวิจัยโดยมิได้คำนึงถึงสิ่งตอบแทนจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ มารดา ผู้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ พญ. นุสารี กิจวิทย์ พี่สาวผู้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญแผนภูมิรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.6 รูปแบบการวิจัย.....	4
1.7 ปัญหาทางจริยธรรม.....	5
1.8 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 Tubulointerstitial injury พยาธิสภาพสำคัญที่นำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง.....	6
2.2 การขาดออกซิเจนในเนื้อไต.....	8
2.3 ภาวะพิษจากโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะ.....	15
2.4 การรักษาป้องกันการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium	18
2.5 รูปแบบการทดลองผูกท่อไต 1 ข้างในหนูทดลอง.....	33
3. วิธีการวิจัย.....	46
3.1 ประชากร.....	46
3.2 การสังเกตและการวัด.....	47
3.3 สิ่งแทรกแซง.....	50

	หน้า
3.4 การรวบรวมข้อมูล.....	51
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	51
4. ผลการวิจัย.....	52
4.1 ข้อมูลทั่วไป.....	52
4.2 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูพยาธิสภาพบริเวณ tubulointerstitium	52
4.3 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ myofibroblast.....	55
4.4 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูวัดปริมาณ collagen.....	57
4.5 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ macrophage.....	58
4.6 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ apoptotic cells.....	60
4.7 ระดับฮีมาโตคริตของหนูทดลอง.....	61
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	63
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	63
5.2 อภิปรายผล.....	63
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. แสดงภาวะ peritubular capillary flow ที่ลดลง เป็นสาเหตุของการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืด.....	11
ตารางที่ 2. สรุปการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการลดการเกิดภยันตรายต่อไตในสัตว์ทดลอง.....	29
ตารางที่ 3. สรุปผลการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังในมนุษย์.....	32
ตารางที่ 4. สารที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในไตที่มีการอุดตันท่อไต (ureteral obstruction).....	39



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างของหลอดเลือดจุกภาคไต.....	9
รูปที่ 2. แสดงความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันระหว่างปริมาณ peritubular capillary flow (PTCF) กับพื้นที่บริเวณ tubulointerstitium.....	10
รูปที่ 3. แสดงภาวะ hypoxia ในภาวะ diabetic nephropathy.....	15
รูปที่ 4. แสดงกลไกที่ proteinuria ก่อให้เกิดอันตรายต่อบริเวณ tubulointerstitium	17
รูปที่ 5. แสดงกลไกควบคุมการทำงานของ Hypoxic Inducible Factor โดยออกซิเจน...	21
รูปที่ 6. แสดงบทบาทของการเกิด apoptosis ต่อเนื้อเยื่อต่างๆ.....	22
รูปที่ 7. แสดงกลไกในการเกิดการตาย apoptosis และการลดการเกิด apoptosis โดยการให้ยา erythropoietin (exogenous erythropoietin).....	24
รูปที่ 8. แสดงโครงสร้างของ a) type 1 cytokine family receptor , b) EPOR homodimer, c) proposed structure of the tissue protection EPOR.....	25
รูปที่ 9. แสดงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการกระตุ้น tissue protection EPOR	26
รูปที่ 10. แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าในหนูที่ได้รับยา darbepoietin เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับยา darbepoietin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	28
รูปที่ 11. แสดงอัตราการลดลงของ glomerular filtration rate ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin (high Hb) และในผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา erythropoietin (low Hb) ...	32
รูปที่ 12. แสดงกลไกหลักที่นำไปสู่การเกิด tubulointerstitial fibrosis เมื่อมีการอุดกั้นท่อไต.....	38
รูปที่ 13. แสดงปฏิสัมพันธ์ของเซลล์ชนิดต่างๆภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต	40
รูปที่ 14. แสดงกลไกการเกิดการอักเสบภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต.....	41
รูปที่ 15. แสดงสาร cytokine ต่างๆที่มีผลต่อการเกิด tubulointerstitial fibrosis.....	43
รูปที่ 16. แสดงกลไกการเกิด tubular apoptosis ภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต.....	44
รูปที่ 17. แสดงภาพเรียงลำดับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในไตภายหลังจากการผูกท่อไต	45
รูปที่ 18. แสดงยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลด tubulointerstitial injury score ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	53
รูปที่ 19. แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย hematoxylin & eosin	54

	หน้า
รูปที่ 20. ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลด tubulointerstitial injury score ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	55
รูปที่ 21. แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย α -SMA ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต.....	57
รูปที่ 22. ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. ไม่สามารถลด α -SMA positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	56
รูปที่ 23. แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย collagen ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต.....	57
รูปที่ 24. ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ collagen ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	58
รูปที่ 25. แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อม immunohistochemistry เพื่อประเมิน ED-1 positive cell ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต.....	59
รูปที่ 26. ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ ED-1 positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	59
รูปที่ 27. แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อม immunohistochemistry ด้วยวิธี TUNEL เพื่อประเมิน apoptotic cell nuclei.....	60
รูปที่ 28. ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ TUNEL positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง.....	61
รูปที่ 29. แสดงระดับฮีมาโตคริตระหว่างหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. กับในกลุ่มควบคุม.....	62
รูปที่ 30. สรุบบทบาทของยา erythropoietin ในการลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis	68
รูปที่ 31. แสดงผลในการป้องกันระบบประสาทของยา CEPO.....	70
รูปที่ 32. แสดงผลในการลดการตายของสมองจากการขาดเลือดโดยใช้ยา asialoerythropoietin ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ภาวะไตวายเรื้อรังเป็นปัญหาที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เมื่อเริ่มมีการเสื่อมหน้าที่ของไตเกิดขึ้น มักตามมาด้วยอัตราการสูญเสียหน้าที่ของไตที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ยังผลให้ท้ายสุดเกิดการสูญเสียหน้าที่ของไตโดยสมบูรณ์หรือที่เรียกว่าภาวะไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย (end stage renal disease) ในระยะนี้ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

ในภาวะการณปัจจุบันพบว่าจำนวนผู้ป่วยไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้ายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นการสะท้อนว่าการรักษาในปัจจุบัน ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการชะลอการเสื่อมหรือฟื้นฟูสมรรถภาพของไตให้ดีขึ้น การศึกษาในช่วงหลังแสดงให้เห็นว่าการเกิดพังผืดของบริเวณทิวบูลินเตอร์สติเชียลของไต (tubulointerstitial fibrosis) มีความสัมพันธ์ชัดเจนกับการสูญเสียหน้าที่ของไต และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าการเกิดพังผืดของบริเวณทิวบูลินเตอร์สติเชียลของไตนี้เป็นดัชนีชี้บ่งถึงความรุนแรงของโรคไตได้ดีที่สุด จึงได้มีผู้พยายามลดกระบวนการเกิดพังผืดของเนื้อเยื่อไตส่วนนี้มาตลอดด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้ยากลุ่ม angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI), HMGcoA reductase inhibitor , heparin หรือ citrate เป็นต้น

Erythropoietin เป็นสารไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่ง นอกเหนือจากความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไขกระดูกให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ได้มีการศึกษาในเรื่องความสามารถในการลดภัยอันตรายต่ออวัยวะต่างๆ เช่น ระบบประสาทและสมอง ระบบหัวใจและหลอดเลือด และการทำงานของไต ในส่วนของการลดภัยอันตรายต่อไตนั้น ได้มีการศึกษาในรูปแบบการศึกษาโรคไตวายฉับพลัน (ischemic/reperfusion injury) ในสัตว์ทดลองค่อนข้างมาก ซึ่งพบว่าการใช้ยา erythropoietin สามารถลดภัยอันตรายต่อไตได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยกลไกในการลดการเกิด apoptosis และลดการอักเสบเป็นหลัก แต่พบว่ายังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยและยังไม่เป็นที่ชัดเจนถึงบทบาทของยา erythropoietin ในการชะลอการเกิดพังผืดของบริเวณทิวบูลินเตอร์สติเชียลของไต จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยมีความมุ่งหวังว่าในอนาคตจะมีการนำยา erythropoietin มาใช้ในการชะลอการเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังได้ในมนุษย์ต่อไป

ในปัจจุบันมีรูปแบบการทดลองเพื่อศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในโรคไตวายเรื้อรังอยู่หลายรูปแบบ ยกตัวอย่างเช่น การตัดไต 5/6 ส่วน (5/6 nephrectomy) การใช้ยา cyclosporin A และการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะโดยการผูกท่อไต ซึ่งกำลังเป็นการทดลองที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ สามารถนำมาใช้เป็นแบบทดลองการศึกษาได้ทั้งโรคไตวายฉับพลัน และโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้เกิดการขยายของท่อไต (hydronephrosis) และเป็นตัวเร่งให้

เกิด tubulointerstitial fibrosis อย่างรวดเร็ว โดยใช้ระยะเวลาเพียง 1 สัปดาห์จะสามารถเห็น cellular infiltration, tubular proliferation, tubular apoptosis, epithelial-mesenchymal transition (EMT) การสะสมของ (myo)fibroblast การสะสมเพิ่มขึ้นของ extracellular matrix (ECM) และการฝ่อของท่อไต (tubular atrophy) อย่างชัดเจน ในขณะที่ในแบบจำลองอื่นๆของการเกิด tubulointerstitial fibrosis เช่น การตัดไต 5/6 ส่วน (5/6 nephrectomy) ต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6-8 สัปดาห์จึงจะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน นอกจากนี้รูปแบบการทดลองการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะโดยการผูกท่อไตยังเป็นวิธีการทดลองที่ไม่ยุ่งยากจึงทำให้แบบทดลองนี้สามารถทำซ้ำ (reproducibility) และให้พยาธิสภาพที่ใกล้เคียงกันในแต่ละครั้งที่ทดสอบ ผู้วิจัยจึงได้เลือกรูปแบบการทดลองการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะโดยการผูกท่อไต มาศึกษาในงานวิจัยนี้

1.2 คำถามของการวิจัย

erythropoietin beta มีผลชะลอการเกิด tubulointerstitial injury ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้างหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการชะลอการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณท่อนูโลอินเตอร์สติเซียของไต ที่อาจนำมาประยุกต์ใช้ในอนาคตในผู้ป่วยโรคไตวาย

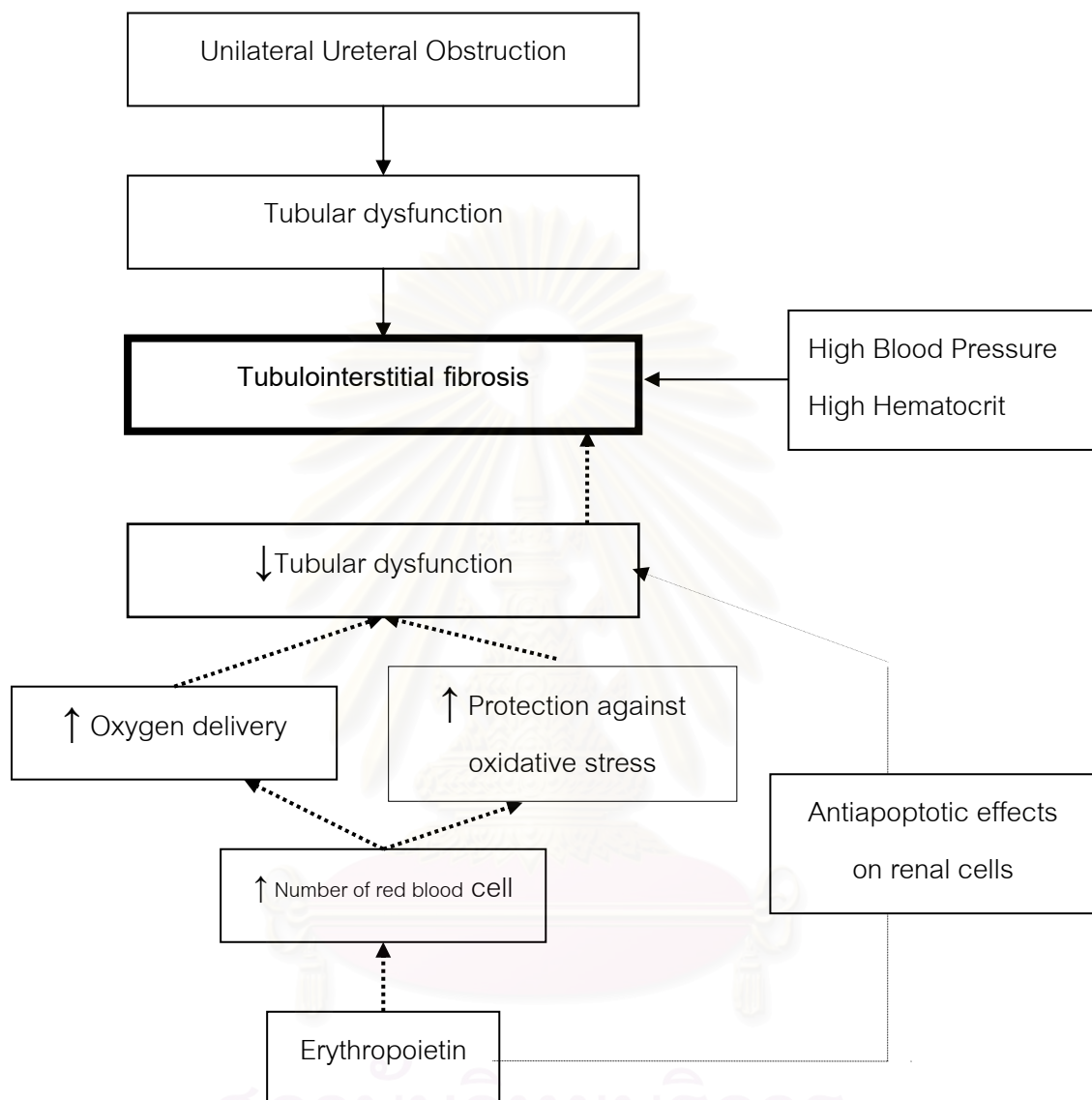
1.4 สมมติฐานของการวิจัย

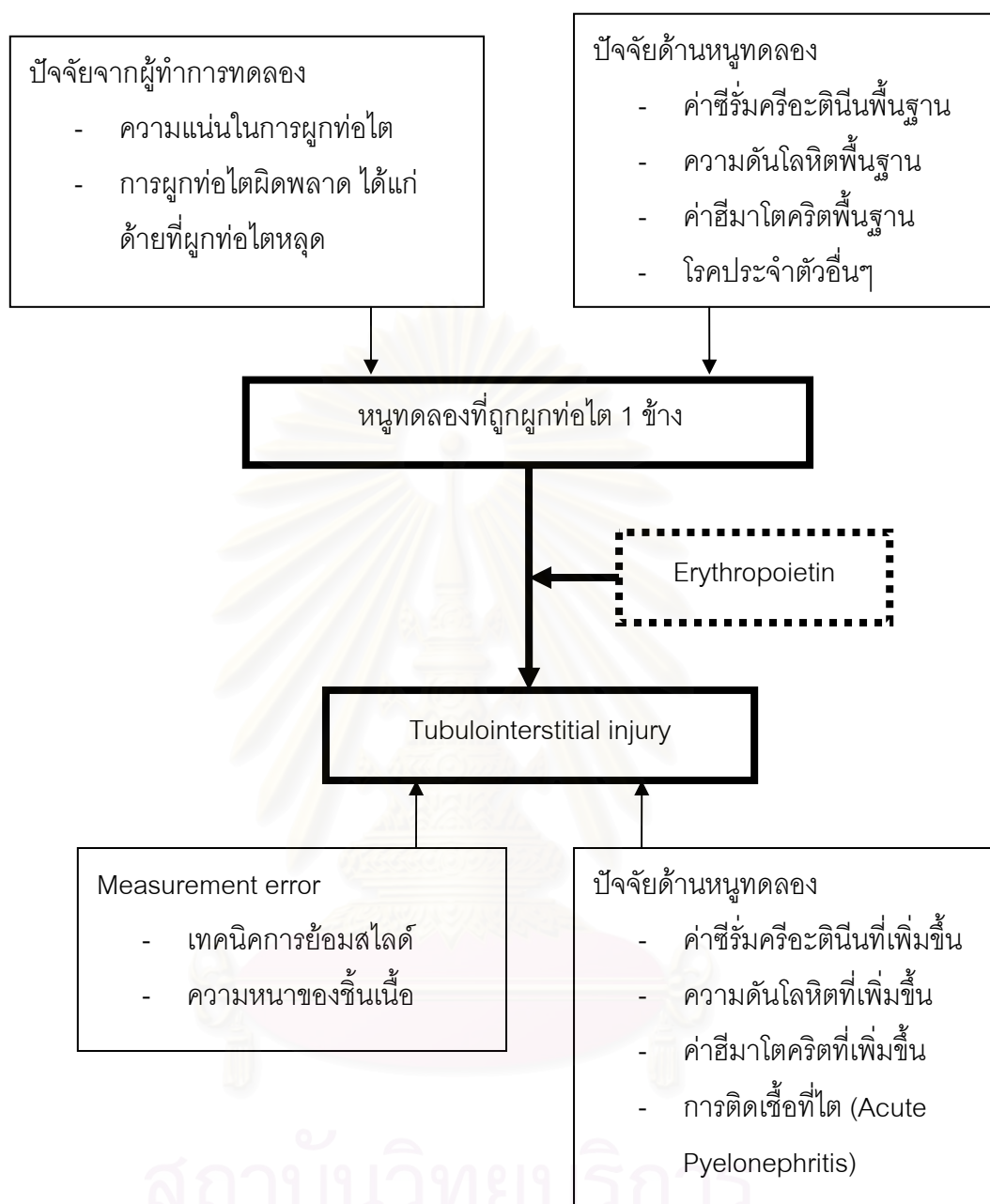
สมมติฐานว่าง: erythropoietin beta ไม่สามารถลดการเกิด tubulointerstitial injury ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง

สมมติฐานแย้ง: erythropoietin beta สามารถลดการเกิด tubulointerstitial injury ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ข้าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย





1.6 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้รูปแบบการวิจัยแบบ experimental study โดยทำการเก็บข้อมูลพื้นฐาน น้ำหนักตัวของหนูทดลองและค่าฮีมาโตคริต หลังจากนั้นแบ่งหนูทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม หนูทดลองทั้ง 2 กลุ่มจะถูกผูกท่อไตข้างขวา โดยหนูในกลุ่มทดลองจะได้รับการฉีด ยา erythropoietin 1 วันก่อนที่จะทำการผูกท่อไต และในวันที่ 3, 7 และ 10 ภายหลังจากการผูกท่อไต ทำการวัดผลของยา erythropoietin ในการลดการเกิด tubulointerstitial injury โดยนำไตข้างขวาของหนูทดลองในทั้ง 2 กลุ่มมาตรวจดูพยาธิสภาพในวันที่ 3, 7 และ 14

1.7 ปัญหาทางจริยธรรม

ได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2542: Home office guideline on the scientific use of animal (Scientific Procedure) Act 1996. ทั้งนี้ การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในงานวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.8 ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โรคไตวายเรื้อรังเป็นปัญหาทางการแพทย์ที่มีความสำคัญ และยังมีวิธีรักษาที่ได้ผลดี การศึกษานี้ก่อให้เกิดความเข้าใจพื้นฐานในการดำเนินโรคและสามารถนำสิ่งที่ได้มาประยุกต์ใช้ รักษาผู้ป่วยได้ในอนาคต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไตวายเรื้อรัง [chronic kidney disease (CKD)] เป็นโรคที่มีความสำคัญลำดับต้นๆในวิชาอายุรศาสตร์โรคไต ประมาณว่ามีผู้ป่วยกว่าล้านรายได้รับการรักษาด้วยการบำบัดทดแทนไต [1,2] และมีผู้ป่วยจำนวนมากกว่านั้นอีกหลายเท่าเสียชีวิตโดยไม่ได้รับการรักษา เป็นที่ยอมรับกันว่าวิธีการรักษาไตวายเรื้อรังก่อนการบำบัดทดแทนไตที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นเกือบไม่ได้ผล มีความเป็นไปได้ที่สำคัญอยู่สองประการในกรณีนี้คือ ประการแรกในปัจจุบันเรารักษาผู้ป่วยช้าเกินไปอันเนื่องจากวิธีการในการตรวจหาโรคไตวายเรื้อรังระยะเริ่มต้นยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ หรือ ประการที่สองความรู้ความเข้าใจในกลไกการเกิดโรคนี้ยังผิดหรือมีไม่พอเพียงที่จะแปลมาเป็นการรักษา ในบทความนี้จะได้กล่าวถึงกลไกการดำเนินโรคของโรคไตวายเรื้อรังที่ค่อนข้างได้รับความสนใจแพร่หลายในปัจจุบันไว้เพื่อเป็นความรู้พื้นฐาน ฟังระลึกว่านอกจากการเข้าใจทฤษฎีพื้นฐานแล้วการตระหนักถึงข้อบกพร่องและข้อขัดแย้งของทฤษฎีที่มีอยู่ มีความสำคัญมากในการที่จะพัฒนาความรู้ในด้านนี้ต่อไปในอนาคต

2.1 Tubulointerstitial injury พยาธิสภาพสำคัญที่นำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง

จากความรู้ที่มีในปัจจุบันเราพบว่าเมื่อไตได้รับความเสียหายไม่ว่าจะเกิดจากสาเหตุตั้งต้นใดๆก็ตาม จนถึงจุดหนึ่งจะมีการดำเนินโรคอย่างต่อเนื่องเข้าสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง และไม่สามารถย้อนกลับได้ ผู้เชี่ยวชาญบางท่านใช้คำว่า secondary progression เพื่อเน้นให้เห็นว่าสิ่งที่เกิดขึ้นเป็นขบวนการต่อจากสาเหตุตั้งต้น (primary renal disease) การศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบทั้งภาวะ glomerulosclerosis, tubulointerstitial inflammation, tubulointerstitial fibrosis และ vascular sclerosis

ได้มีการศึกษากลไกที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพนี้อย่างกว้างขวาง โดยในปี พ.ศ. 2524 Brenner และ Hostetter [3] ได้ตรวจพบภาวะ glomerular hyperfiltration /hypertension ในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดไตเสื่อมโดยตัดไตออกไป 5/6 ตั้งแต่ระยะแรกของโรคก่อนที่จะเกิดการเสื่อมของไต โดยภาวะ glomerular hyperfiltration/hypertension นั้นเกิดขึ้นจากการขยายตัวของทั้ง afferent และ efferent arteriole แต่ afferent arteriole ขยายตัวด้วยสัดส่วนสูงกว่า(ผลที่ได้จึงดูเหมือนว่า efferent arteriole มีการหดตัว) ก่อให้เกิดแรงดันในโกลเมอรูลัสเพิ่มขึ้น ทั้งคู่ได้เสนอทฤษฎีว่า ภาวะ hyperfiltration เป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิด glomerulosclerosis ซึ่งในขณะนั้นเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุ

ของการเกิด secondary progression ต่อมาจึงพบว่าการกระตุ้น renin angiotensin ผ่าน angiotensin II receptor type 1 เป็นสาเหตุของการเกิด glomerular hyperfiltration ทฤษฎี hyperfiltration ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางและมีผลสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการศึกษากลไกการเกิด renal progression มากขึ้น

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการศึกษาส่วนใหญ่จะพบภาวะ glomerular hyperfiltration ในระยะแรกของการดำเนินโรคไตก็ตาม แต่นักวิจัยบางกลุ่มกลับพบว่า glomerular hyperfiltration โดยลำพังอาจไม่เพียงพอในการก่อให้เกิดโรคไตเสื่อม Fogo และคณะได้ทำการกระตุ้นให้เกิด glomerular hyperfiltration โดยการตัดท่อไตข้างหนึ่งของหนูทดลอง ปล่อยให้ น้ำปัสสาวะไหลเข้าสู่ช่องท้อง (peritoneal cavity) [4] ซึ่งจะดูดน้ำปัสสาวะกลับเข้าสู่ระบบไหลเวียนและกลับมาถูกกรองที่โกลเมอรูลัสอีกครั้ง กลับพบว่า glomerular hyperfiltration ในแบบจำลองนี้ไม่สามารถก่อให้เกิด glomerulosclerosis ได้ ทีมวิจัยกลุ่มเดียวกันยังทำการศึกษาโดยวัดความดันของโกลเมอรูลัสหลายครั้งกลับพบว่าไม่ทุกโกลเมอรูลัสที่เกิดภาวะ hyperfiltration และ ภาวะ hyperfiltration ที่เกิดขึ้นก็ไม่ได้คงอยู่ตลอดเวลา ในทางกลับกันมีโกลเมอรูลัสจำนวนหนึ่งเกิดภาวะ glomerular hypofiltration ด้วยซ้ำ นอกจากนี้จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาโดยละเอียดในช่วงสิบปีที่ผ่านมาพบว่า การเสื่อมการทำงานของไตนั้นมีความสัมพันธ์กับการทำลายเนื้อไตในบริเวณ tubulointerstitium มากกว่าการเกิด glomerulosclerosis [5,6] การค้นพบนี้ได้นำไปสู่ทฤษฎีที่ว่า กลไกหลักในการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังควรจะเป็นที่บริเวณ tubulointerstitium มากกว่าบริเวณโกลเมอรูลัส

พยาธิวิทยาของเนื้อไตบริเวณ tubulointerstitium ก่อให้เกิดการลดลงของอัตราการกรองพลาสมาโกลเมอรูลัส (glomerular filtration rate, GFR) โดยผ่านหลายๆกลไกด้วยกัน ได้แก่ การเกิดการฝ่อของเซลล์ท่อไต (tubular atrophy) อันนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของของเหลวที่เข้าสู่บริเวณ macula densa กระตุ้นให้มีการลดลงของอัตราการกรองพลาสมาโกลเมอรูลัสโดยกลไก tubuloglomerular feedback นอกจากนี้พบว่าการเกิดพยาธิสภาพที่บริเวณ tubulointerstitium ยังก่อให้เกิดมีโกลเมอรูลัสส่วนหนึ่งซึ่งไม่มีทางติดต่อกับท่อไต (tubule) และได้เรียกโกลเมอรูลัสเหล่านี้ว่า atubular glomeruli เชื่อกันว่าถ้าการทำลายของท่อไตที่เกิดขึ้นนั้นรุนแรงพอจะทำให้ท่อไตเกิดการฝ่อ (atrophy) และสูญเสียโครงสร้างจนขาดจากโกลเมอรูลัส เกิดการสูญเสียหน้าที่ทั้งหมดของหน่วยไต (nephron) นั้นๆ ตามมาด้วยการเกิด fibrosis ของโกลเมอรูลัส (glomerulosclerosis) และของท่อไตในที่สุด มีการรายงานถึงภาวะ atubular glomeruli นี้เสมอๆ ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ในท้ายที่สุด tubulointerstitial fibrosis ที่เกิดขึ้นจะนำไปสู่การลดลงของเลือดที่จะเข้าไปหล่อเลี้ยงบริเวณดังกล่าว ก่อให้เกิดภาวะ ischemic injury ตามมา

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันเรายังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงในการเกิดภัยอันตรายที่บริเวณ tubulointerstitium แต่ข้อมูลที่มีในปัจจุบันทำให้เชื่อได้ว่า การขาดออกซิเจนในเนื้อไต (renal hypoxia) ภาวะพิษจากโปรตีนที่รั่วออกมาจากโกลเมอรูลัส และการตายของเซลล์ (cell death) น่าจะเป็นกลไกสำคัญในอันดับต้นๆ

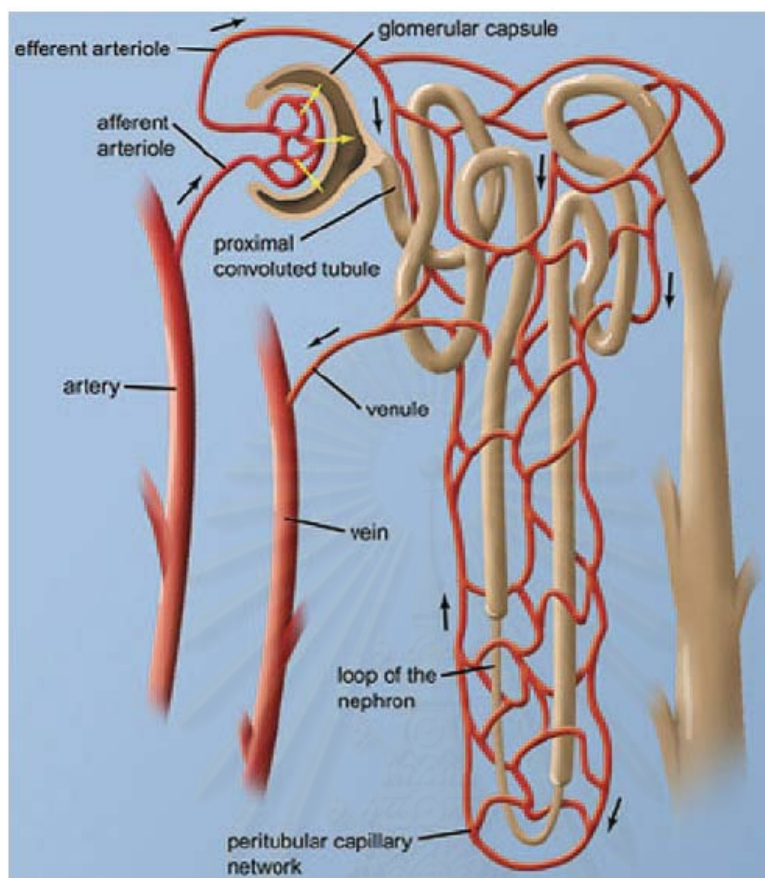
2.2 การขาดออกซิเจนในเนื้อไต (renal hypoxia)

จากวิสัยทัศน์เดิมที่มุ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่เนื้อไตในส่วนที่เป็น non-vascular component และพยาธิสภาพส่วนโกลเมอรูลัสของไตอย่างมากมาแต่ก็เป็นการประเมินโกลเมอรูลัสของไตในลักษณะที่เป็นตัวเนื้อไต ไม่ได้ประเมินโกลเมอรูลัสของไตในลักษณะของตัวหลอดเลือดที่มีการทำงานที่สำคัญเกี่ยวกับการควบคุมปริมาณเลือดที่เข้ามาหล่อเลี้ยงไต ทำให้ละเลยความสำคัญของเซลล์บุผิวในหลอดเลือดที่ถูกกระทบเมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นที่ส่วนของโกลเมอรูลัส ซึ่งส่งผลถึงโลหิตพลศาสตร์ของไต (renal hemodynamics) เมื่อพบความผิดปกติต่างๆซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต่างๆก็ใช้ยารักษาที่ออกฤทธิ์ต้านภูมิคุ้มกันต่างๆ ซึ่งมีโซลไกหลักที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อไตบริเวณ tubulointerstitium การรักษาที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มุ่งจะไม่ประสบความสำเร็จในการหยุดยั้งการดำเนินโรคไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย ก่อนอื่นเราคงจะมาทำความเข้าใจในโครงสร้างของหลอดเลือดจุลภาคไตเป็นอันดับแรก

2.2.1 โครงสร้างของหลอดเลือดจุลภาคไต

ประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ 2 ส่วนได้แก่ ส่วน glomerular capillary และส่วน peritubular capillary plexus พบว่า glomerular capillary เป็นส่วนหลอดเลือดของไตที่ทำหน้าที่กรองสารจากพลาสมา เริ่มต้นจากการแตกแขนงของ interlobular arteries กลายเป็น afferent arteriole ซึ่งจะเข้าสู่ glomerular capillary แล้วรวมตัวกันอีกครั้งกลายเป็น efferent arteriole และผ่านออกไปทาง peritubular capillary flow ซึ่งทำหน้าที่เลี้ยงไตในส่วน tubulointerstitium (รูปที่ 1)

ถึงแม้ว่าไตจะเป็นอวัยวะที่รับเลือดประมาณร้อยละ 20 ของปริมาณเลือดที่หัวใจสูบฉีดออกมาในแต่ละครั้ง (cardiac output) แต่จากโครงสร้างซึ่งมีการเรียงตัวขนานกันอย่างใกล้ชิดของระบบหลอดเลือดแดงและระบบหลอดเลือดดำทำให้มีการแลกเปลี่ยนออกซิเจน (shunt effect) อย่างมากก่อนที่ออกซิเจนนี้จะเข้าไปหล่อเลี้ยงเนื้อไตส่วนใน (renal medulla) ทำให้เมื่อตรวจวัดระดับออกซิเจนในส่วนนี้จึงมีค่าเพียง 10 มิลลิเมตรปรอท [7] ไตจึงเป็นอวัยวะที่เสี่ยงต่อการขาดออกซิเจนเป็นอย่างมาก



รูปที่1 แสดงโครงสร้างของหลอดเลือดจลภาคไต

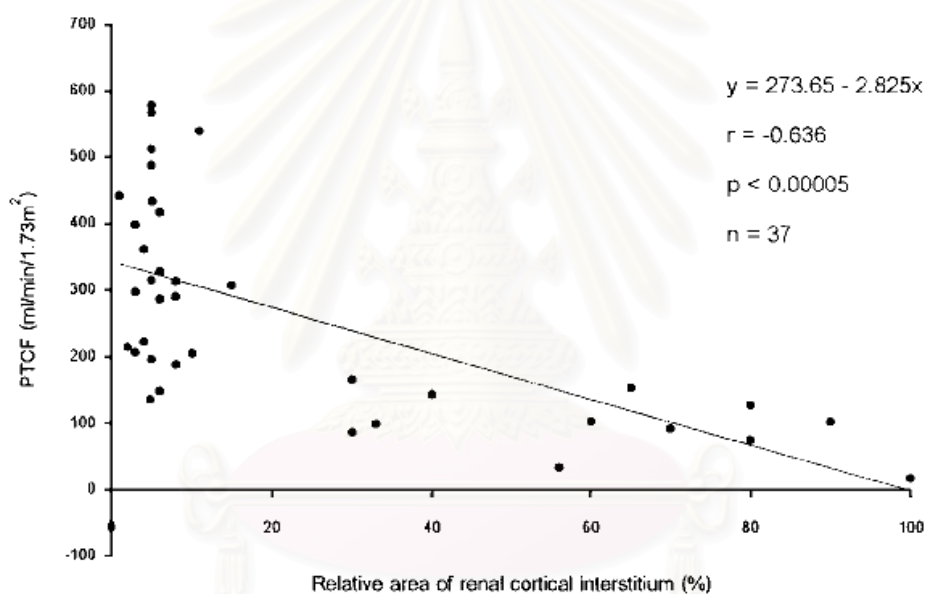
Peritubular capillary network ได้รับเลือดผ่านทาง *efferent arterioles* เพื่อไปหล่อเลี้ยงออกซิเจนและสารอาหารแก่บริเวณ *tubulointerstitium*

Fine และคณะได้ทำการเสนอว่า ภาวะ chronic tubulointerstitial hypoxia น่าจะเป็นกลไกหลักในการในการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย [8] ทำให้เกิดการศึกษาทบทวนของการขาดออกซิเจนต่อไตขึ้นอย่างกว้างขวางและได้รับการยืนยันต่อมาโดยการศึกษาของ Eckardt [9] และ Johnson [10] ในปัจจุบันมีหลายกลไกที่ได้รับการยอมรับ ได้แก่

2.2.2 การลดลงของหลอดเลือดฝอยรอบท่อไต (loss of peritubular capillaries)

การศึกษาเนื้อไตที่เกิด fibrosis พบว่าจำนวนของหลอดเลือดฝอยรอบท่อไตมีการลดลงอย่างมาก มีหลักฐานหลายประการที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างโรคหลอดเลือดจลภาคไตกับการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืด (fibrosis) บริเวณ tubulointerstitium, Bohle และคณะ เป็นหนึ่งในกลุ่มคนแรกๆที่ได้ตั้งข้อสังเกตถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยพบว่าระดับซีรัมครีอะตินินที่สูงซึ่ง

แสดงการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium สัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับปริมาณหลอดเลือดจุกภาคไต [11] เสาวนีย์ เย็นฤดี และคณะ [12] ก็ได้ทำการศึกษาในลักษณะคล้ายกันในผู้ป่วยโรคไตเนฟโรติกพบว่าปริมาณ peritubular capillary flow มีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kang [13] ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาเบื้องต้นนี้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง peritubular capillary flow กับการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium แต่ไม่ได้พิสูจน์ว่าอะไรเป็นเหตุและเป็นผลต่อกัน (cause and effect relationship)



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันระหว่างปริมาณ peritubular capillary flow (PTCF) กับพื้นที่บริเวณ tubulointerstitium [12]

อย่างไรก็ตามการศึกษาของ นริสา พุตระกูล และคณะ ในผู้ป่วยโรคไตเนฟโรติก 51 ราย พบว่า การลดลงของ peritubular capillary flow น่าจะเป็นสาเหตุนำร่องของการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium (ตารางที่ 1) โดยในผู้ป่วยกลุ่ม mesangial proliferative nephrosis ที่ไม่มีการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium มีการลดลงของ peritubular capillary flow ก่อนแล้ว แต่เนื่องจากระดับที่ลดลงของ peritubular capillary flow ไม่รุนแรง จึงทำให้ไม่มีการตายของเนื้อไตขึ้น ต่อมาเมื่อพบว่าระดับ peritubular

capillary flow ที่ลดลงรุนแรงขึ้น (ประมาณร้อยละ 40-50 ของค่าปกติ) จะเห็นว่ามี การตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดเกิดขึ้น (กลุ่ม mesangial proliferative nephrosis ที่มีการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดร่วม) การศึกษาในกลุ่มที่รุนแรงมากขึ้น เช่นพวก focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) จะพบว่า peritubular capillary flow ที่ลดลงนั้นสัมพันธ์กับอัตราการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดที่รุนแรงขึ้น การศึกษาดังกล่าวชี้บ่งว่า ภาวะ peritubular capillary flow ที่ลดลงและนำร่องนั้น เป็นสาเหตุสำคัญของการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืด หลักฐานสำคัญดังกล่าวเป็นข้อมูลชิ้นแรกที่ พิสูจน์ความสำคัญของ peritubular capillary flow ที่ลดลงเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ไต [14] เชื่อว่า capillary regression ที่เกิดขึ้นจะทำให้ภาวะ hypoxia รุนแรงขึ้นก่อให้เกิดการทำลายไตเพิ่มขึ้น ในระยะหลังจึงได้มีผู้ให้ความสนใจกับการลดลงและกระบวนการคงสภาพของ peritubular capillary เพิ่มขึ้น [15] โดยหวังว่าถ้าสามารถรักษาหลอดเลือดฝอยเหล่านี้ไว้ได้จะช่วยหยุดยั้งการเกิด secondary progression ได้

ตารางที่ 1 แสดงภาวะ peritubular capillary flow ที่ลดลง เป็นสาเหตุของการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืด [14]

	RPF cc/min/1.73 m ²	PTCF cc/min/1.73 m ²	TI fibrosis	GFR cc/min/1.73 m ²
- Control	600	480	0	120
- Minimal change disease	711±92	584±85	0	127±1.6
- Mesangial proliferative nephrosis (steroid resistant)	491±52	392±50	0	99±14
- Mesangial proliferative nephrosis with TI fibrosis	311±67	235±49	5±2	78±36
- Nephrosis with FSGS	179±80	142±59	58±14	36±18

ปัจจุบันเราทราบว่า การคงสภาพหลอดเลือดฝอยนั้นเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยการทำงานของ vascular growth factor หลายชนิด vascular growth factor ส่วนใหญ่มีฤทธิ์กระตุ้นให้หลอดเลือดแบ่งตัว สนับสนุนการคงสภาพของหลอดเลือด vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็น vascular growth factor ที่สำคัญและอาจมีบทบาทในการเกิดโรคไต โดยทำงานในลักษณะ paracrine และถูกสร้างขึ้นจากเซลล์รอบๆหลอดเลือด มี VEGF receptor อยู่บนเซลล์ endothelium เมื่อเซลล์ขาดออกซิเจนจึงจะสร้างและขับ VEGF ไปกระตุ้นให้มีการงอกแขนงของ

หลอดเลือดฝอยมากขึ้นเพื่อเพิ่มออกซิเจนเลี้ยงที่บริเวณนั้น วิธีนี้ทำให้หลอดเลือดฝอยใน vascular bed กระจายตัวได้เหมาะสมกับความต้องการออกซิเจนของเนื้อเยื่อที่มันเลี้ยง ในสภาวะปกติของเนื้อเยื่อทั่วไปพบการแสดงออกของ VEGF น้อยมาก ในไตปกติจะพบการแสดงออกของ VEGF ที่ เซลล์ podocyte และ medullary tubule บริเวณ inner stripe บริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการแสดงออกของ VEGF ในไตจะพบ glomerular tuft และ vasa recta ซึ่งเป็นโครงสร้างของหลอดเลือดที่พิเศษกว่าโครงสร้างของหลอดเลือดฝอยทั่วไป จึงมีผู้ตั้งสมมุติฐานว่า VEGF อาจมีบทบาทสำคัญในการคงสภาพของ glomerular tuft และ vasa recta พบว่า hypoxia inducible factor น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของ VEGF ใน medulla [16] ขณะที่ส่วนประกอบของ glomerular basement membrane (laminin) อาจมีบทบาทในการกระตุ้น VEGF ที่เซลล์ podocyte ในระยะแรกของการดำเนินโรคไตจะพบการกระตุ้น VEGF พร้อมกับมีการแบ่งตัวของ endothelium และการเกิด Inflammation การศึกษาเอกไตจำนวนมากชี้ให้เห็นบทบาทของ VEGF กับการรั่วของสารน้ำและการอักเสบแต่มีข้อมูลในแง่นี้น้อยมากในไต พบว่าในระยะท้ายๆของการเกิด secondary progression จะมีการลดลงของ tubular VEGF เชื่อว่าการลดลงนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการลดลงของหลอดเลือดฝอยรอบๆท่อไต Kang และ Johnson พบว่าการเพิ่ม thrombospondin อาจเป็นสาเหตุของการลด VEGF ขณะที่ Yaun และ Wolf เชื่อว่าเป็นผลมาจากการลดการกระตุ้นของ hypoxia [17] การศึกษาเนื้อไตของผู้ป่วยกลับมีผู้รายงานว่า VEGF เพิ่มขึ้นขณะที่ peritubular capillary ลดลง [18] นอกจากระบบ VEGF แล้วระบบ angiotensin (Ang) /Tie-2 receptor ซึ่งเป็น vascular growth factor ที่ทำงานร่วมกับ VEGF ที่มีการแสดงออกในไต angiotensin isoform 1 (Ang-1) ออกฤทธิ์สนับสนุนการคงสภาพของหลอดเลือด ส่วน angiotensin isoform 2 (Ang-2) ยับยั้งการทำงานของ Ang-1 แบบ antagonist จึงมีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิด vascular regression โดยเฉพาะเมื่อมีการกระตุ้น Ang-2 พร้อมๆกับการขาด VEGF ในไตปกติเราจะพบการแสดงออกของ Ang-1 ที่ เซลล์ mesangial ขณะที่ Ang-2 มีการแสดงออกบริเวณ vasa recta และ podocyte มีข้อมูลชี้ให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของ Ang-1, Ang-2 ระหว่างดำเนินโรคไต เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงที่พบน่าจะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของ peritubular capillary เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่า สาร endostatin ซึ่งเกิดจากการสลาย collagen มีปริมาณเพิ่มขึ้นในไตที่เกิดพยาธิสภาพ endostatin สามารถกระตุ้นให้เกิด capillary regression แสดงให้เห็นว่าการผลิต extracellular matrix (ECM) ที่เพิ่มขึ้นในกระบวนการเกิด fibrosis น่าจะมีความสัมพันธ์กับ capillary regression ด้วยเช่นกัน จะเห็นได้ว่าการเกิด capillary regression ในไตนั้นเป็น active process มีขั้นตอนที่สำคัญหลายขั้นตอนดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะปรับเปลี่ยนขั้นตอนเหล่านี้

เช่น การทดลองให้ exogenous VEGF พบว่าสามารถลดการสูญเสีย peritubular capillary และลดการทำลายไตลงได้

2.2.3 การปรับตัวที่ผิดปกติของระบบโลหิตพลศาสตร์ (hemodynamic maladjustment) ในเนื้อไตบริเวณ tubulointerstitium: ความไม่สมดุลของสารออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasodilator substances) และสารออกฤทธิ์หดหลอดเลือด (vasoconstrictor substances)

พบว่าความไม่สมดุลของสารออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasodilator substances) และสารออกฤทธิ์หดหลอดเลือด (vasoconstrictor substances) สามารถเป็นสาเหตุให้ไตเกิดการขาดออกซิเจน โดยที่ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อไต นริสา พุตระกูล และคณะ ได้ทำการศึกษาโลหิตพลศาสตร์ในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง (severe chronic glomerulonephritis) 11 ราย พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของความต้านทานของหลอดเลือด efferent arteriole, การเพิ่มขึ้นของ intraglomerular hydrostatic pressure, การลดลงของ renal plasma flow และการลดลงของ peritubular capillary flow ในที่สุด โดยสามารถแก้ไขการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ได้โดยการใช้ยาขยายหลอดเลือด ได้แก่ ยาในกลุ่ม ACEI, angiotensin receptor blocker (ARB) และ calcium channel blocker [19] ผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันยังได้ทำการศึกษาต่อไปในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่มีการรั่วของไข่ขาวออกมาในปัสสาวะ (normoalbuminuria) และพบความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของ peritubular capillary flow กับการทำงานที่ลดลงของท่อไต (tubular dysfunction) [20]

เชื่อว่าการกระตุ้นระบบ renin angiotensin เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดการขาดออกซิเจนในเนื้อไต โดยผ่าน 2 กลไกหลัก โดยกลไกแรกเป็นกลไกผ่านทางโลหิตพลศาสตร์ (hemodynamic mechanisms) ได้แก่การลดปริมาณเลือดที่เข้าสู่ peritubular capillaries จากการหดหลอดเลือด efferent arterioles หลักฐานสนับสนุนมาจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 กฤษณพงศ์ มโนธรรม และ Nangaku [21] ทำการทดลองเลียนแบบการทดลอง glomerular hyperfiltration ของ Brenner ในหนูทดลองที่ถูกตัดไตไป 5/6 (5/6 nephrectomy model) โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสามารถตรวจพบได้เมื่อเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีภาวะ hypoxia รวมทั้งตรวจพบการแสดงออกของ HIF1- α ซึ่งเป็น transcription factor ที่คงสภาพในภาวะ hypoxia เป็นการพิสูจน์ให้เห็นว่ามีภาวะ tubulointerstitial hypoxia เกิดขึ้นจริง การที่พบภาวะ hypoxia ก่อนการเกิด tubulointerstitial inflammation และ fibrosis สนับสนุนว่า hypoxia น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิด tubulointerstitial damage มากกว่าเป็นผลของ tubulointerstitial damage เมื่อ

ทดลองให้ยา ARB พบว่าสามารถยับยั้งการเกิด hypoxia ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่าภาวะ tubulointerstitial hypoxia ในระยะแรกเป็นผลมาจากการกระตุ้นระบบ renin angiotensin เช่นกัน

กลไกที่สองเป็นกลไกที่ไม่ได้ผ่านทางโลหิตพลศาสตร์ (nonhemodynamic mechanisms) แต่ผ่านทางกลไกของ oxidative stress ซึ่งจะได้กล่าวต่อในหัวข้อถัดไป จะเห็นได้ว่าระบบ renin angiotensin ก่อให้เกิดการขาดออกซิเจนในเนื้อไตบริเวณ tubulointerstitium ได้โดยผ่านและไม่ผ่านกลไกทางโลหิตพลศาสตร์

2.2.4 การเกิด oxidative stress

ภาวะ oxidative stress เป็นภาวะหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับโรคไตวายเรื้อรัง โดยผ่านทางสาร angiotensin II ที่เพิ่มขึ้นไปกระตุ้น NADPH oxidase นอกจากนี้ภาวะโลหิตจางก็มีส่วนร่วมในการเกิด ภาวะ oxidative stress เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นทำให้มีการสร้างสาร superoxide เพิ่มมากขึ้น และทำให้ลดปริมาณ nitric oxide ตามมา ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นตามมาคือ เกิดการใช้พลังงานภายในไมโทคอนเดรีย ที่เพิ่มขึ้น และการขาดออกซิเจนในเนื้อไต [22] การศึกษาทดลองต่อมาพบว่าการลดภาวะ oxidative stress ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณออกซิเจนภายในเนื้อไต [23]

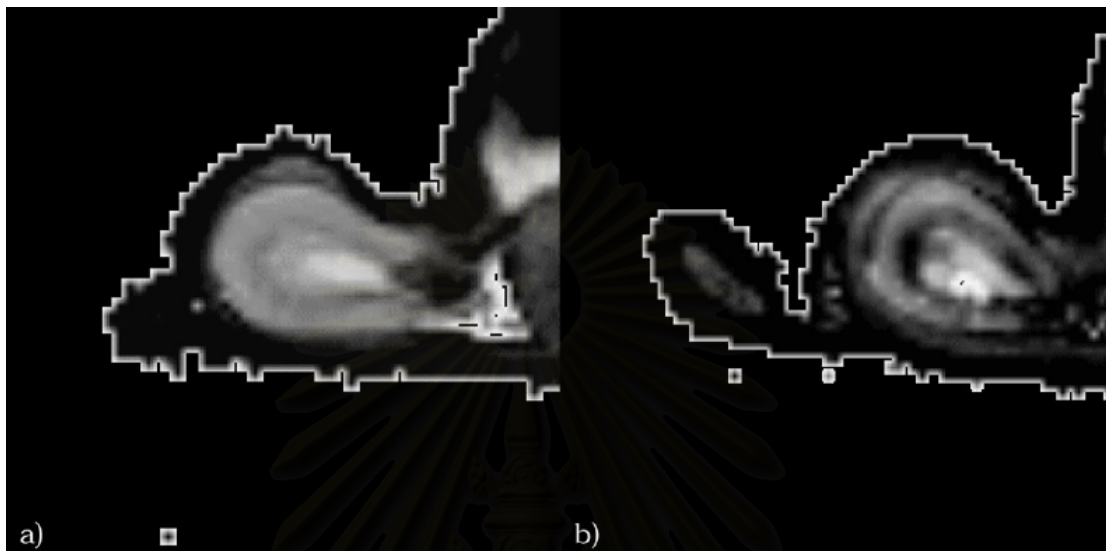
2.2.5 บทบาทของภาวะโลหิตจางในการขาดออกซิเจนของไต (role of anemia in hypoxia of the kidney)

จากสมการ oxygen delivery = CO * (% O₂ sat * 1.39 * Hb) เมื่อ CO คือ cardiac output, Hb คือ hemoglobin ดังนั้นภาวะโลหิตจางจึงนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญ ในการขาดออกซิเจนของไต ซึ่งได้รับการยืนยันจาก 2 การศึกษาใหญ่ การศึกษาแรกโดย Iseki และคณะ [24] ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย จำนวน 71,802 ราย พบว่าภาวะโลหิตจางเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย การศึกษาที่ 2 RENAAL study [25] ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มี macroalbuminuria ก็ได้ผลที่สอดคล้องกัน และพบว่าทุกๆค่าฮีโมโกลบินที่ลดลง 1 กรัมต่อเดซิลิตร จะมีโอกาสเกิดโรคไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้ายเพิ่มขึ้นร้อยละ 11

2.2.6 Relative hypoxia as a result of increase metabolic demand

ในหนูทดลองที่เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร streptozotocin พบว่ามีการขาดออกซิเจน ตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง โดยการใช้ the blood oxygen

level dependent (BOLD) MRI วัดระดับออกซิเจนในเนื้อไต [26] โดยเชื่อว่าการเกิดภาวะ hyperfiltration เป็นกลไกที่สำคัญที่อธิบายการขาดออกซิเจนตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก



รูปที่ 3 แสดงภาวะ hypoxia ในภาวะ diabetic nephropathy [26]

BOLD (Blood Oxygen Level Dependent)–MRI แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ oxyhemoglobin ในบริเวณ outer stripe ของ outer medulla ในไตของหนูทดลอง ที่เกิด hyperfiltration หลังจากกระตุ้นให้เกิดเบาหวาน (b) เทียบกับกลุ่มควบคุม (a)

2.2.7 Glomerular damage and hypoxia of the tubulointerstitium

การลดลงของ glomerular capillary bed อันเนื่องมาจาก glomerulosclerosis ทำให้เกิดการลดลงของเลือดที่เข้าไปเลี้ยงบริเวณ peritubular capillary และเกิดการขาดออกซิเจนตามมา การทดลองที่ช่วยสนับสนุนสมมุติฐานนี้มาจากการฉีด anti-Thy1 antibody ในหนูทดลองที่ถูกตัดไตออก 1 ข้าง พบว่าทำให้เกิด accelerated glomerulosclerosis ตามมา จากการใช้วิธีการ intravital microscopy และ physiologic perfusion lectin ตรวจสอบ พบว่ามีการลดลงของเลือดที่เข้าไปในบริเวณ peritubular capillary จริง [27]

2.3 ภาวะพิษจากโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะ (proteinuria)

ปริมาณของโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไต โดยเฉพาะโรคไตไกลเมอูลูลาร์ แต่ยังเป็นที่ยกเถียงว่าโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะเป็นเพียงตัวบ่งชี้ (marker) ความรุนแรงของโรคไตไกลเมอูลูลาร์ (glomerular damage) หรือเป็นสาเหตุ

ของการทำลายเนื้อไต การศึกษาในรูปแบบไปข้างหน้าโดย Iseki และคณะในประชากร 107,192 รายพบว่าภาวะโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะ สามารถเป็นตัวพยากรณ์การเกิดโรคไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้ายในอนาคตได้เป็นอย่างดี (odd ratio 14.9) [28] สอดคล้องกับการศึกษาของ MDRD [29], REIN [30] และ RENAAL [31]

ข้อมูลในสัตว์ทดลองในรูปแบบ adriamycin nephrosis หรือ BSA overload ซึ่งมี proteinuria ในปริมาณมาก พบว่ามีปริมาณ apoptotic cell เกิดขึ้นจำนวนมากในบริเวณ tubulointerstitium และนำไปสู่การฝ่อของ tubular cell และเกิด atubular glomeruli ในที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาในสัตว์ทดลองเลียนแบบการเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง (5/6 nephrectomy) เชื่อว่ากลไกภายในเซลล์ที่ก่อให้เกิดอันตรายนั้น ผ่านทางการกระตุ้น transcription factor (AP-1, NF-KB), proinflammatory และ profibrotic genes นอกจากนี้ proteinuria ยังก่อให้เกิด transdifferentiation ของ tubular cell กลายเป็น myofibroblasts และนำไปสู่การเกิด tubulointerstitial fibrosis ในระยะต่อมา เราเรียกกระบวนการนี้ว่า “epithelial to mesenchymal transformation [32, 33]

2.3.1 กลไกที่ proteinuria ก่อให้เกิดอันตรายต่อบริเวณ tubulointerstitium (mechanisms of tubulointerstitial damage by proteinuria)

ในปัจจุบันเชื่อว่าผ่าน 3 กลไกหลักด้วยกันได้แก่

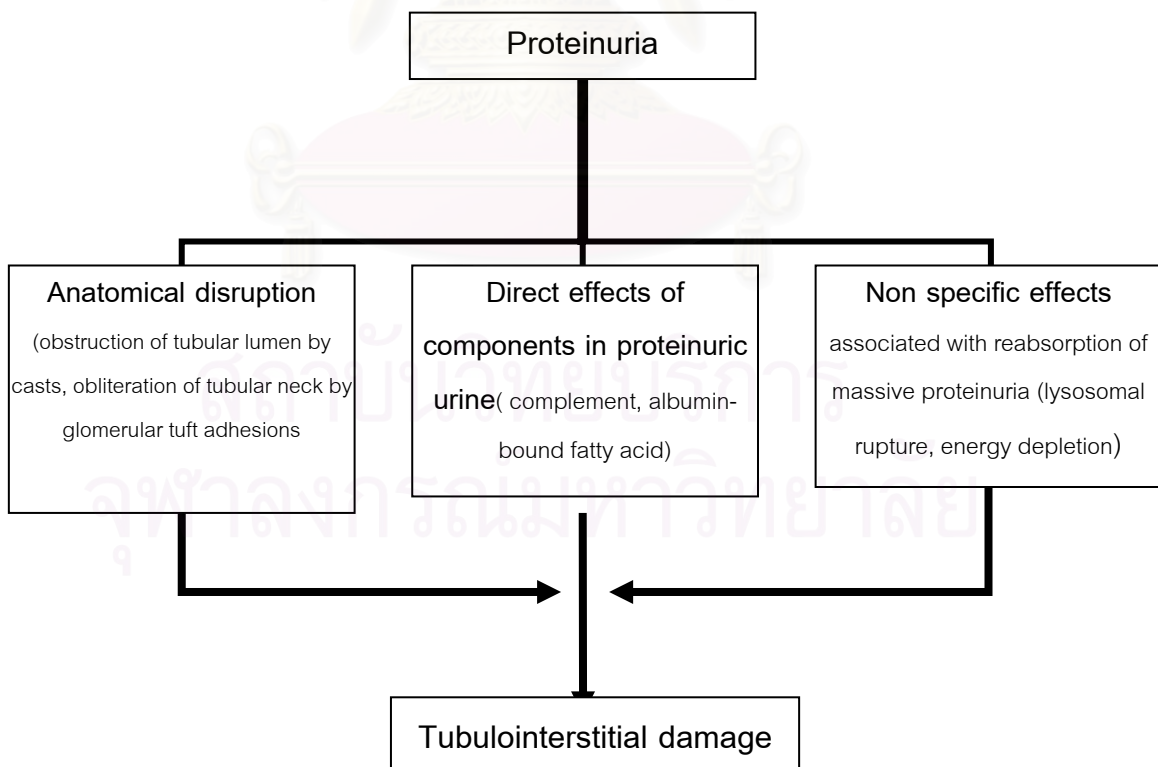
2.3.1.1) การทำลายโครงสร้างของเนื้อไตบริเวณ tubulointerstitium (anatomical disruption) โดยเกิดการอุดตันของ tubular lumen โดย cast และการเกิดพังผืดที่บริเวณ glomerular tuft

2.3.1.2) การทำลายเนื้อไตโดยปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (non-specific effects) โดยเกิดการแตกของ lysosome จากการที่มีการดูดซึมโปรตีนที่รั่วออกมาทางโกลเมอรูลัสของ tubular cell จนเกินขีดความสามารถ และภาวะไม่เพียงพอของพลังงานที่ต้องใช้ไปในการดูดซึมโปรตีนของ tubular cell

2.3.1.3) การทำลาย tubular cell โดย proteinuria ออกมาโดยตรง (direct effects) โดยผ่านทาง growth factors, transferrin, albumin-bound fatty acid [34, 35] และ complement ในปัจจุบันทฤษฎีนี้เป็นทฤษฎีที่มีหลักฐานและได้รับการยอมรับมากที่สุด

2.3.2 การกระตุ้นระบบ complement

บนผิวของเซลล์ท่อไตจะมีการแสดงออกของสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการกระตุ้นระบบ complement จึงเชื่อกันว่าไตมีแนวโน้มที่จะถูกทำลายจากการกระตุ้นระบบ complement ได้ง่ายกว่าอวัยวะอื่น ส่วน brush border ของเซลล์ท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) สามารถกระตุ้นระบบ complement ผ่านทาง alternate pathway ที่บริเวณนี้จึงมีการแสดงออกของโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของ complement เช่น DAF and CD 59 ในมนุษย์ หรือ Crry ในสัตว์ตระกูลหนู [36] พบว่า proteinuria สามารถกระตุ้นระบบ complement ได้ เช่นมีรายงานว่าพบ C5b-9 complex (แสดงถึงการกระตุ้น common pathway) บนท่อไตของหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิด proteinuria ด้วยการให้ puromycin การศึกษาของ Remuzzi และคณะ [37] พบ C3 deposit บนผิวของ tubular cell ในแบบจำลอง remnant kidney ตำแหน่งที่พบนั้นใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการดูดซึม (reabsorption) protienuria และเป็นบริเวณที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้ามาชุมนุมกัน ซึ่งให้เห็นว่ากระบวนการทำลายเนื้อไตจากภาวะ proteinuria ส่วนหนึ่งอาจออกฤทธิ์ผ่าน complement ด้วย เคยมีผู้รายงานว่าในหนูทดลองที่ขาด complement บางชนิดจะเกิด secondary progression ได้ยากขึ้นเช่นกัน [38]



รูปที่4 แสดงกลไกที่ proteinuria ก่อให้เกิดอันตรายต่อบริเวณ tubulointerstitium

2.3.3 ชนิดของโปรตีนในการก่อให้เกิดอันตราย

นอกจากภาวะพิษของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณแล้ว ชนิดของโปรตีนก็มีความสำคัญด้วย ดูเหมือนว่า albumin เป็นพิษไม่มากนักขณะที่ transferrin, thyroglobulin, prealbumin, fatty acid bound albumin และ โปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วย advanced glycation end product (AGE) มีความเป็นพิษสูงกว่า

2.4 การรักษาป้องกันการตายของเนื้อไตชนิดเพิ่มพังผืดบริเวณ tubulointerstitium (tubulointerstitial fibrosis)

จากความรู้ความเข้าใจกลไกการเกิดพังผืดของไตบริเวณ tubulointerstitium ที่มีมากขึ้น นำไปสู่แนวทางการรักษาใหม่ๆ เพื่อมุ่งหวังชะลอและฟื้นฟูโรคไตวายเรื้อรัง ในปัจจุบันมุ่งเน้นไปที่ การลดปริมาณ proteinuria การลดการขาดออกซิเจน และการลดการเกิด apoptosis ดังจะได้กล่าว ในรายละเอียดต่อไป

2.4.1 การรักษาเพื่อลดปริมาณ proteinuria (treatment targeting proteinuric tubulointerstitial damage)

ยา ACEI และยา ARB เป็นยามาตรฐานในการนำมาใช้ลด proteinuria โดยอาศัยกลไกหลักคือการลดความดันภายในโกลเมอรูลัส (intraglomerular pressure) นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ยายังช่วยลดการกรองผ่านของสารต่างๆ ได้อีกด้วย (retain glomerular permeability) ข้อมูลจากการศึกษาขนาดใหญ่ และจากการทำ metaanalysis ช่วยยืนยันบทบาทในการลด proteinuria ของยา ACEI ได้จริง [39, 40]

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ายา ACEI และ ARB จะสามารถลด proteinuria ได้ดี แต่ก็สามารถลดได้ระดับหนึ่งเท่านั้น ทำให้มีความพยายามหาวิธีใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการลด proteinuria ให้มากขึ้นไปกว่าเดิม หนึ่งในนั้นคือการใช้ยาที่ออกฤทธิ์ในการลดการทำงานของ complement [36] ซึ่งคงต้องรอการศึกษาต่อไปในอนาคต

2.4.2 การรักษาเพื่อลดการขาดออกซิเจน (treatment targeting hypoxic tubulointerstitial damage)

จากที่กล่าวไปในตอนต้นแล้วว่าการขาดออกซิเจนเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดพังผืดที่บริเวณ tubulointerstitium ดังนั้นการรักษาที่มุ่งไปที่การเพิ่มปริมาณออกซิเจนจึงน่าที่จะช่วยในการลดพังผืดได้เป็นอย่างดี การรักษาที่มีความเป็นไปได้ในปัจจุบันมีดังต่อไปนี้

2.4.2.1 การรักษาภาวะโลหิตจางโดยการให้ยา erythropoietin (EPO)

สามารถตรวจพบภาวะโลหิตจางได้ตั้งแต่ในระยะแรกๆที่ไตเริ่มทำงานลดลง โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาขนาดใหญ่ของ The Third National Health and Nutrition Examination Survey [41] และ The National Kidney Foundation Kidney Early Evaluation Program [42] เมื่อเกิดภาวะโลหิตจางขึ้นย่อมทำให้เกิดภาวะการรบกวนขาดออกซิเจนตามมา พบว่าทุกๆค่าฮีโมโกลบินที่ลดลง 1 กรัมต่อเดซิลิตร จะมีความเสี่ยงต่อการดำเนินโรคเข้าสู่ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease) เพิ่มขึ้นร้อยละ 11 จะได้กล่าวอย่างละเอียดถึงบทบาทของการให้ยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของไตในหัวข้อต่อไป

2.4.2.2 การให้ยา ACEI, ARB เพื่อคงสภาพหลอดเลือดฝอยรอบท่อไต ACEI, ARB (preservation capillary blood flow)

Norman และคณะ [43] เป็นกลุ่มแรกที่แสดงว่าการป้องกันการกระตุ้นระบบ renin angiotensin system (RAS blockade) ในหนูทดลองสามารถเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ไปเลี้ยงบริเวณ renal cortex ได้ ต่อมา กฤษณพงศ์ มโนธรรม และ Nangaku [21] ทำการทดลองในหนูทดลองที่ถูกตัดไตไป 5/6 (5/6 nephrectomy model) และสามารถพิสูจน์ให้เห็นว่ามีภาวะ tubulointerstitial hypoxia เกิดขึ้นจริง และเมื่อทดลองให้ยา angiotensin receptor blockade (ARB) พบว่าสามารถยับยั้งการขาดออกซิเจนได้ ดังได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.2.3 เชื่อว่ากลไกที่สำคัญในการช่วยลดการขาดออกซิเจนคือการขยาย efferent glomerular arteriole ซึ่งทำให้มีปริมาณเลือดไปเลี้ยงที่บริเวณ tubulointerstitium เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเชื่อว่ายายังมีผลในการเป็น antioxidant อีกด้วย [44]

2.4.2.3 การให้ยาเพื่อป้องกันระบบหลอดเลือดจุลภาค (protection of the vascular endothelium)

VEGF และ dextran sulfate เป็นสารที่ได้รับความสนใจศึกษาในบทบาทป้องกันระบบหลอดเลือดจุลภาค ในรูปแบบการศึกษาการเกิด thrombotic microangiopathy ซึ่งใช้ antiglomerular endothelial antibody ฉีดเข้าไปในหลอดเลือด renal artery พบว่า dextran sulfate สามารถป้องกันการเกิดอันตรายต่อหลอดเลือด endothelium ได้ โดยอาศัยกลไกทางด้านป้องกันการแข็งตัวของเลือด และลดการอักเสบของหลอดเลือด Kang และคณะ [45] ได้ศึกษาการใช้ VEGF ในหนูทดลองที่ถูกตัดไตไป 5/6 พบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ VEGF มีการทำงานของไตที่ดีขึ้น และมีอัตราการตายที่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาพบว่า

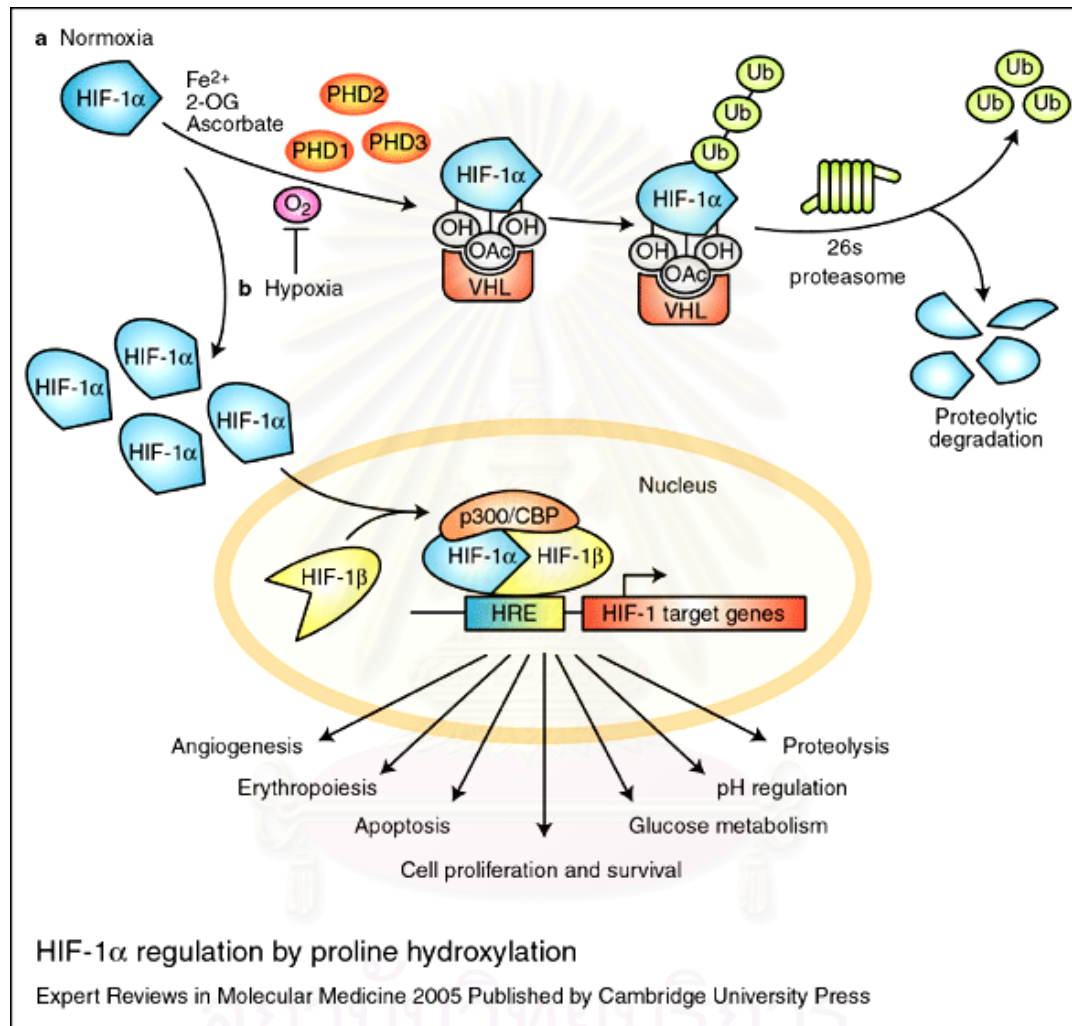
การเพิ่มขึ้นของ หลอดเลือดฝอยรอบท่อไต (peritubular capillary) อย่างชัดเจน Kang จึงสรุปว่า VEGF สามารถป้องกันการทำลายของหลอดเลือดฝอยรอบท่อไตและช่วยสร้างหลอดเลือดขึ้นใหม่ในบางส่วน

2.4.2.4 การใช้ยาที่เพิ่มการทำงานของ Hypoxic Inducible Factor (HIF-based therapy)

HIF ประกอบด้วย alpha subunit (HIF- α) และ beta subunit (HIF- β) ในขั้นตอนการทำงานทั้งสอง subunit จะจับตัวกันก่อน HIF- β เป็นโปรตีนที่มีปริมาณค่อนข้างคงที่ซึ่งไม่ได้มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองต่อ hypoxia โดยตรง ขณะที่ HIF- α เป็นโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงตามปริมาณออกซิเจนดังนั้นการควบคุมการตอบสนองต่อ hypoxia จึงขึ้นกับปริมาณ HIF- α โครงสร้างของ HIF- α ทางด้าน N terminal ประกอบด้วยโครงสร้างแบบ basic helix - loop-helix (bHLH) ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ HRE บนสาย DNA ถัดมาจะเป็นส่วนที่เรียกว่า PAS (Per-Arnt-Sim) domain เป็นส่วนที่จับ (dimerize) กับ PAS domain ของ HIF- α บริเวณปลาย carboxy ของ HIF- α จะควบคุมโดยออกซิเจนจึงเรียกว่า (oxygen dependent domain) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างยีน [trans-activator domain (TAD)]

ในภาวะที่มีออกซิเจนพอเพียง HIF- α จะถูกเอนไซม์ prolylhydroxylase (PHD-2, EGLN) เติมหมู่ OH⁻ ที่ proline ตำแหน่งอะมิโนที่ 402 และ 564 (รูปที่ 5) HIF- α ที่ถูกhydroxylase นี้จะถูกจับด้วย Von Hippel-Lindau และถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว PHD-2 เป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัย oxygen ในการทำงาน เมื่อขาดออกซิเจนเอนไซม์นี้จะไม่ทำงาน อีกนัยหนึ่งอาจกล่าวได้ว่า PHD-2 ทำหน้าที่เป็นตัววัดออกซิเจน(oxygen sensor) ในสภาวะhypoxiaเมื่อPHD-2 ทำงานไม่ได้การทำลาย HIF- α จะหยุดลง HIF- α ที่เหลือจึงสามารถ dimerized กับ HIF- β และทำงานได้ ปัจจุบันเราพบ HIF- α 3 isoform ได้แก่ HIF-1 α , HIF-2 α , และ HIF-3 α HIF-1 α เป็น isoform ที่รู้จักกันดีที่สุด เซลล์ในร่างกายเกือบทุกชนิดสร้างและเพิ่มปริมาณHIF-1 α ในภาวะ hypoxia เชื่อว่า HIF-1 α เป็นโมเลกุลหลักที่ควบคุมการตอบสนองเกือบทั้งหมดต่อภาวะ hypoxia หนูทดลองชนิด HIF-1 α knock out จะเสียชีวิตตั้งแต่เป็น embryo ในช่วงที่เริ่มสร้างระบบไหลเวียน แสดงถึงความสำคัญของระบบ HIF ต่อการ development HIF-2 α มีโครงสร้างคล้ายกับ HIF-1 α มาก มีการแสดงออกที่ endothelial จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า EPAS (endothelial PAS) ยังพบการแสดงออกของ HIF-2 α ในbone marrowเชื่อว่าเกี่ยวกับการmaturation ของเซลล์เม็ดเลือด พบ HIF-2 α ในไตที่บริเวณ interstitium ปัจจุบันเชื่อกันว่า HIF-2 α เป็นโมเลกุลหลักในการควบคุม

การสร้าง erythropoietin ส่วน HIF-3 α ไม่มี trans-activation domain จึงทำงานเป็น competitor กับระบบ HIF-1 α และ HIF-2 α พบการแสดงออกของ HIF-3 α ที่ cornea เชื่อว่า HIF-3 α ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดที่บริเวณนั้น [46, 47, 48]



รูปที่ 5 แสดงกลไกควบคุมการทำงานของ Hypoxic Inducible Factor โดยออกซิเจน

ในภาวะที่มีออกซิเจน (normoxia) HIF-1 α จะถูกเติมหมู่ OH ด้วยเอนไซม์ PHD-2 โมเลกุล HIF ที่ถูก hydroxylase จะถูกจับด้วยโมเลกุล pVHL ก่อนจะถูกทำลายโดยกระบวนการ proteolysis

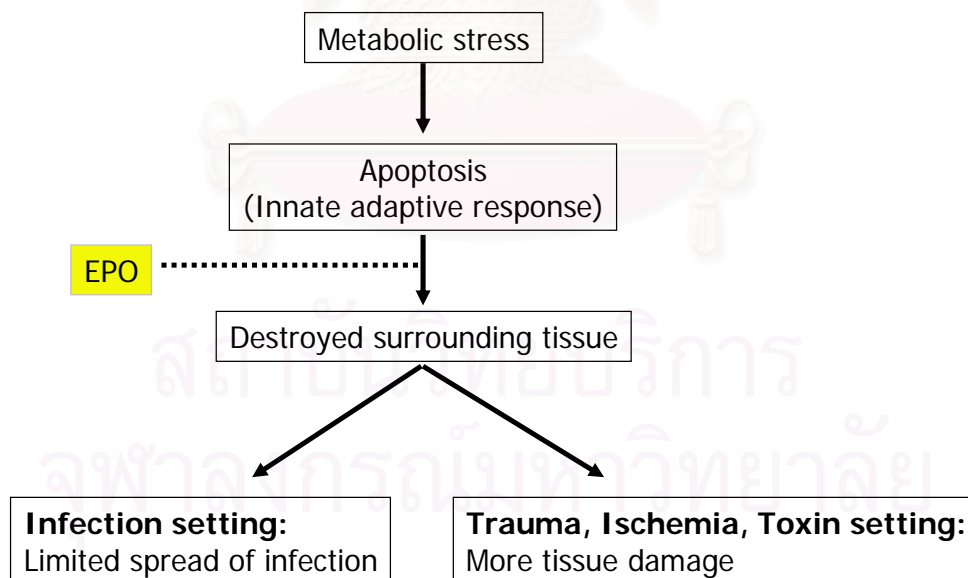
ในภาวะ hypoxia PHD FIH ไม่ทำงาน โมเลกุลของ HIF-1 α จึงไม่ถูกทำลายและสามารถจับกับ activation factor อื่น กระตุ้นการ transcription ได้

Manotham และ Nangaku [16] ได้ตรวจพบการแสดงออกของ HIF-1 α ในระดับต่ำๆ บริเวณ renal medulla ของหนูทดลอง เมื่อกระตุ้นให้หนูทดลองขาดน้ำ พบว่ามีการกระตุ้นระบบ HIF มากขึ้นเชื่อว่าเป็นผลมาจากเกิด tissue hypoxia เพิ่มขึ้น เมื่อทดลองหยุดการกระตุ้น HIF ใน

renal medulla ด้วยกระบวนการถ่ายยีน (in vivo gene transfer) พบว่าทำให้เกิด medulla damage พร้อมกับการลดลงของ VEGF เนื่องจากพบความเสียหายในบริเวณกว้างมาก จึงสนับสนุนว่าเนื้อไตส่วน medulla อาศัยการกระตุ้นระบบ HIF เป็นระยะสั้นๆเกือบตลอดเวลา เมื่อทำการทดลองกระตุ้นระบบ HIF ใน medulla ให้ทำงานเพิ่มขึ้นสามารถช่วยลดความรุนแรงของภาวะไตวายเฉียบพลันจากการขาดเลือดได้ ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าไตเองก็กำลังใช้ระบบ HIF ในการปกป้องตัวเองจากภาวะ hypoxia อยู่ ถ้าสามารถเสริมการกระตุ้นระบบ HIF ในไตแม้เพียงเล็กน้อย อาจจะช่วยให้ไตทนทานต่อภาวะ hypoxia เร็วจริงได้มากขึ้น

2.4.3 การรักษาเพื่อลดการเกิด apoptosis (treatment targeting reduce apoptosis)

ในปัจจุบันมีการศึกษากลไกการเกิด apoptosis อย่างกว้างขวาง เชื่อว่า apoptosis เป็นกลไกพื้นฐานที่เกิดขึ้นภายหลังภัยอันตรายใดๆก็ตาม แล้วไปมีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ในสภาวะการติดเชื้อการเกิด apoptosis เป็นกระบวนการที่ช่วยในการกำจัดขอบเขตการติดเชื้อซึ่งเป็นสิ่งที่ดี แต่ในส่วนของขาดเลือด (ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการเกิดของ ischemic acute tubular necrosis) การได้รับสารพิษบางอย่าง การเกิด apoptosis จะทำให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายเพิ่มขึ้น (รูปที่ 6) ทำให้มีความสนใจศึกษาเพื่อลดการเกิด apoptosis ขึ้น



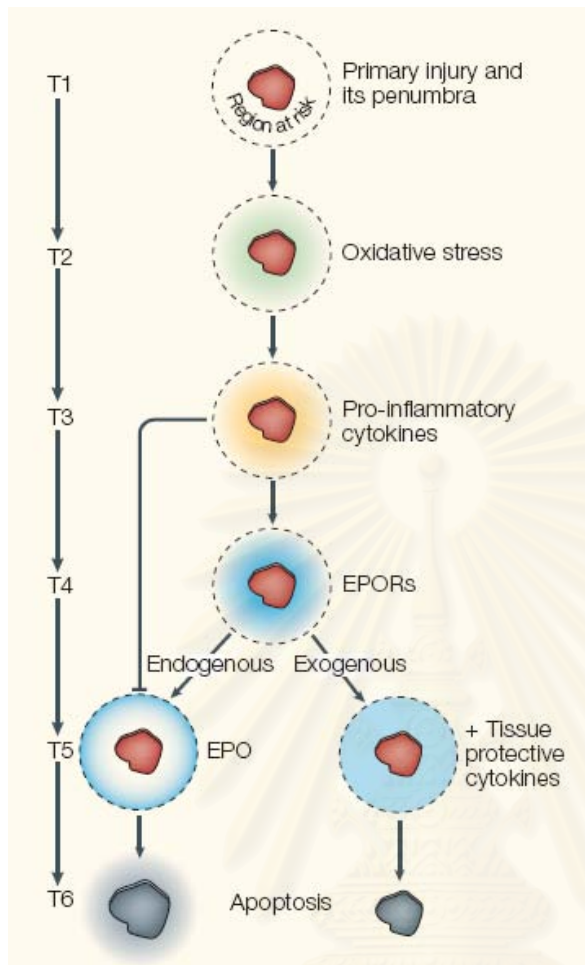
รูปที่ 6 แสดงบทบาทของการเกิด apoptosis ต่อเนื้อเยื่อต่างๆ [51]

Erythropoietin เป็นสารตัวหนึ่งที่ได้มีการศึกษาในเรื่องความสามารถชะลอความเสื่อมของไตอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพบว่านอกจาก erythropoietin มีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไขกระดูกให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์ในอวัยวะต่างๆมากมาย

(pleiotropic effect) เช่น เซลล์ในระบบประสาทและสมอง เซลล์ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และ เซลล์มะเร็ง ในภาวะที่ร่างกายขาดออกซิเจนจะมีการกระตุ้นให้ไตทำการสร้าง erythropoietin เพิ่มขึ้น erythropoietin เป็นสารไกลโคโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 34,000 ดาลตัน ยีนที่ควบคุมการสร้าง erythropoietin อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 พบว่า type 1 interstitial cell ในไตเป็นเซลล์ที่สร้าง erythropoietin ในรูปของ prohormone ซึ่งประกอบด้วย 193 amino acid หลังจากนั้นจะมีการแยก amino acid ออก 28 ตัว ก่อนที่จะมีการหลั่งออกสู่กระแสเลือด erythropoietin ที่หลั่งออกมาในกระแสเลือดจะเป็น sialoglycoprotein ประกอบด้วย 165 amino acid peptide มีส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีปริมาณ sialic acid อยู่มากเชื่อมกับสาย peptide ของ erythropoietin อีก 4 ตำแหน่ง เป็น N-linked sugar 3 ตำแหน่ง และ O-linked 1 ตำแหน่ง ทำให้การจับกันระหว่าง erythropoietin กับ erythropoietin receptor มีความมั่นคง [49] นอกจากนี้หน้าที่หลักคือการกระตุ้นไขกระดูกสร้างเม็ดเลือดแดงเพื่อนำออกซิเจนไปเลี้ยงตามเนื้อเยื่อต่างๆเพิ่มขึ้น ในปัจจุบันพบว่า erythropoietin นำจะมีบทบาทในการลดการอักเสบโดยผ่านทางระบบ glutathione, superoxide dismutase, vitamin E และ coenzyme Q และมีผลลดการเกิด apoptosis [50]

2.4.3.1 แนวคิดในการนำยา erythropoietin มาใช้ในการลดการเกิดภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อ

เมื่อมีภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อ (primary injury) จะก่อให้เกิดการหลั่ง pro-inflammatory cytokine ซึ่งไปมีผลให้เกิดการตาย apoptosis ในบริเวณนั้นและบริเวณที่อยู่โดยรอบ (penumbra area) พบว่าร่างกายจะมีกลไกในการลดการตาย apoptosis ของเนื้อเยื่อในบริเวณที่อยู่โดยรอบซึ่งเป็นบริเวณที่มีโอกาสฟื้นตัว (penumbra area) โดยการหลั่งสาร protective cytokine เพื่อมาช่วยลดการตาย apoptosis แต่โดยส่วนใหญ่ปริมาณของ protective cytokine มักจะมีไม่เพียงพอ จึงได้มีแนวคิดในการใช้ยา erythropoietin (exogenous erythropoietin) ในขนาดสูงเพื่อนำมาลดการตาย apoptosis (รูปที่ 7)

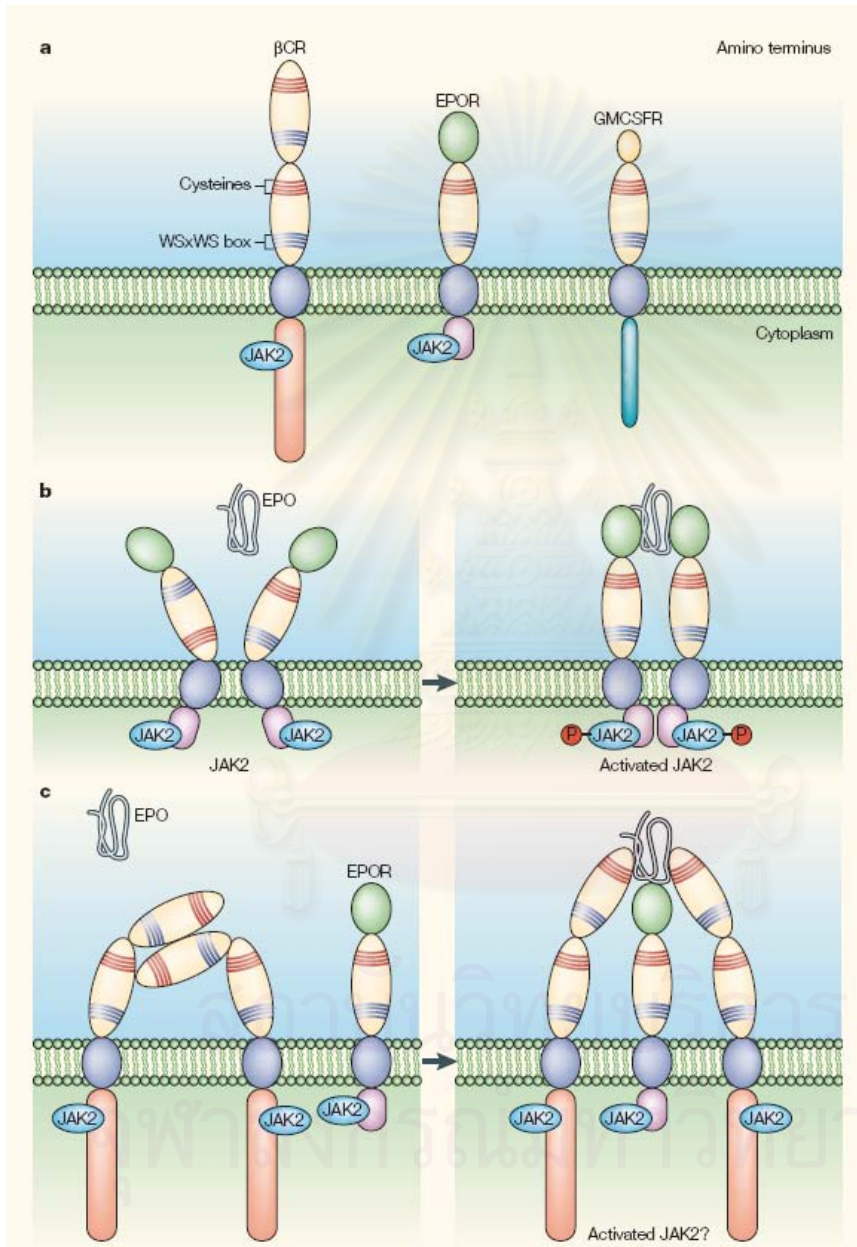


รูปที่ 7 แสดงกลไกในการเกิดการตาย apoptosis และการลดการเกิด apoptosis โดยการให้ยา erythropoietin (exogenous erythropoietin) [51]

2.4.3.2 Erythropoietin receptor

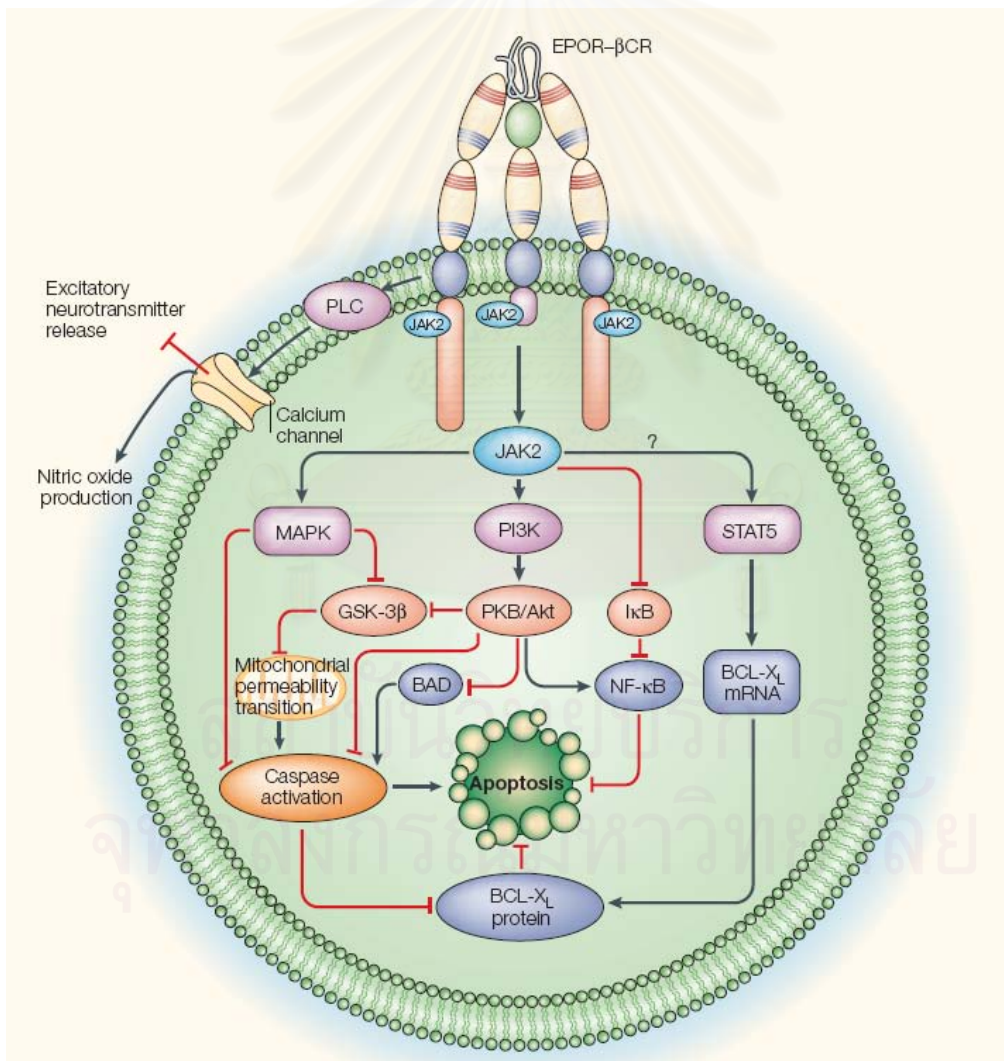
Erythropoietin receptor อยู่ในกลุ่ม type 1 cytokine family receptor ซึ่งประกอบไปด้วย erythropoietin receptor (EPOR), β common receptor (β CR) และ granulocyte macrophage colony stimulating factor (GMCSFR), erythropoietin receptor ประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยเรียกว่า homodimer และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีสาร pro-inflammatory cytokine ต่างๆ เช่น tumor necrosis factor α และ interleukin- 1β มากกระตุ้น (ต่างจาก erythropoietin ซึ่งถูกกระตุ้นโดยภาวะขาดออกซิเจน) เราสามารถพบ erythropoietin receptor ได้ในทุกส่วนของไต ไม่ว่าจะเป็นในส่วน cortex, medulla, proximal tubular cell และ distal tubular cell เชื่อว่า erythropoietin receptor ที่มีบทบาทในการป้องกันอันตรายต่อเนื้อเยื่อ (tissue protection) มีโครงสร้างที่แตกต่างจาก erythropoietin receptor ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง

โดย Brines และคณะได้เสนอโครงสร้างของ tissue protection erythropoietin receptor (tissue-protection EPOR) ว่ามี 3 หน่วยย่อย อันประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยของ β common receptor และ 1 หน่วยย่อยของ erythropoietin receptor ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ a) type 1 cytokine family receptor , b) EPOR homodimer, c) proposed structure of the tissue protection EPOR [51]

ภายหลังจากที่ erythropoietin จับกับ erythropoietin receptor จะมีการกระตุ้น janus tyrosine kinase 2 (JAK2) ซึ่งจะไปมีผลกระตุ้น mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) และ nuclear factor- κ B (NF- κ B) ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้น B-cell leukaemia/lymphoma (BCL) family ซึ่งเป็นสารต้านการตาย apoptosis (antiapoptosis) นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งเอนไซม์ glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) ซึ่งไปมีผลลดการกระตุ้นเอนไซม์ caspase หนึ่งในเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการเกิดการตาย apoptosis ข้อมูลจากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า erythropoietin ยังกระตุ้น STAT5 หนึ่งในโปรตีนสำคัญในการลดการเกิดการตาย apoptosis แต่ยังคงขาดข้อมูลในการศึกษาสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการกระตุ้น tissue protection EPOR [51]

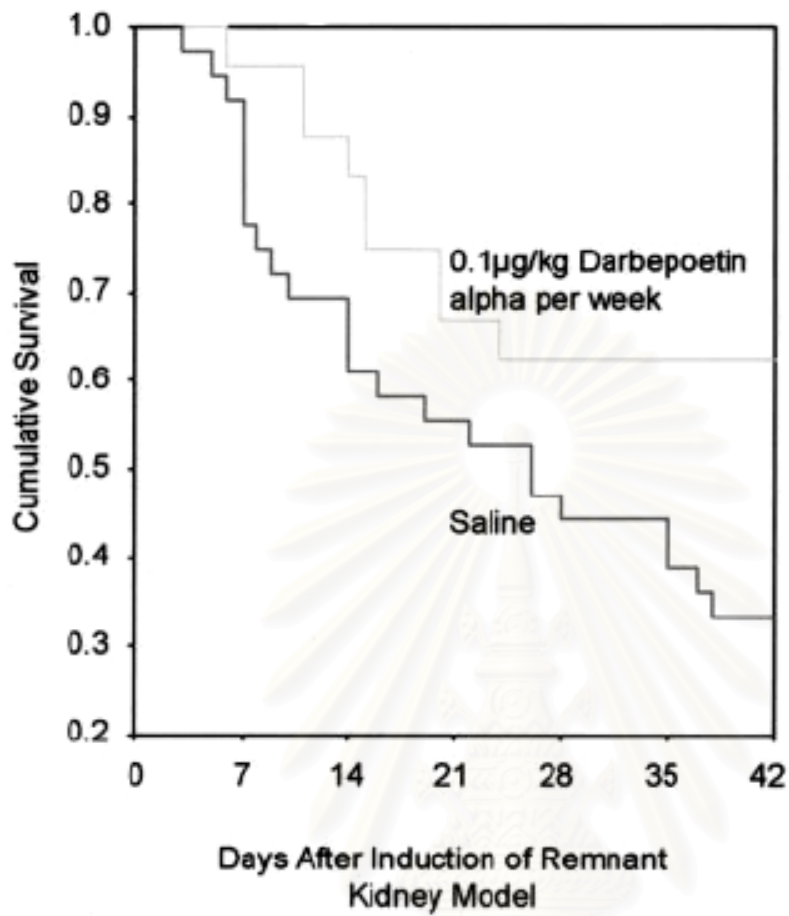
2.4.3.3 ข้อมูลของยา erythropoietin ในการลดการเกิดภัยอันตรายต่อไต

2.4.3.3.1 ข้อมูลจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง

ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลการศึกษาในหนูทดลอง ในรูปแบบการศึกษาไตวายฉับพลัน (ischemia/reperfusion injury) Patel และคณะได้ใช้ยา erythropoietin ฉีดให้หนูทดลองที่ถูกทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลัน (ischemia/reperfusion injury) พบว่ายา erythropoietin สามารถลดการสร้างสาร myeloperoxidase, lipid peroxidation ทำให้หนูทดลองมีการทำงานของไตที่ดีขึ้น [52] การศึกษาโดย Hong และคณะในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายฉับพลัน (ischemia/reperfusion injury) เช่นเดียวกับการศึกษาแรกพบว่า erythropoietin สามารถลดการเกิด down regulation ของ aquaporin channel และ Na⁺ transporter ได้ [53]

ในส่วนการลดการตาย apoptosis การศึกษาของ Vesey และคณะพบว่ายา erythropoietin สามารถลดการเกิด apoptosis ที่บริเวณ outer medullary thick ascending limb และเพิ่ม tubular epithelial regeneration ได้ ในหนูทดลองที่ไตวายฉับพลัน (ischemia/reperfusion injury) [54] นอกจากนี้ การศึกษาต่อมาของ Yang และ Sharples พบว่ายา erythropoietin มีผลลดการเกิด apoptosis โดยการเพิ่มสาร bcl-2 และลดสาร caspase-3 ซึ่งอยู่ในการกระบวนการเกิด apoptosis ในรูปแบบการทดลองเดียวกัน [55, 56]

ที่กล่าวมาแล้วนั้นเป็นการศึกษาบทบาทของยา erythropoietin ในหนูทดลองที่มีไตวายฉับพลัน (ischemia/reperfusion injury) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งพบว่ายา erythropoietin สามารถลดการเกิดอันตรายต่อไตได้ แต่ยังมีบทบาทของยา erythropoietin ในด้านการชะลอความเสื่อมของไตในภาวะไตวายเรื้อรังน้อย Bahlmann และคณะ ทำการศึกษาในหนูทดลองที่ถูกตัดไต 5/6 ส่วนซึ่งเป็นรูปแบบการศึกษาระยะไตวายเรื้อรังรูปแบบหนึ่ง โดยฉีดยา darbepoietin ซึ่งเป็น erythropoietin ที่มีการเติมโมเลกุล N-linked ทำให้คาร์โบไฮเดรตสามารถจับการ erythropoietin เพิ่มขึ้น 2 ตำแหน่ง และทำให้ยา erythropoietin ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น พบว่าหนูที่ได้รับยา darbepoietin มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าหนูที่ไม่ได้รับยา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10) นอกจากนี้หนูที่ได้รับยา darbepoietin มีค่าซีรัมครีอะตินีน ค่า urine protein excretion และความดันโลหิตที่ต่ำกว่าหนูที่ไม่ได้รับยา การศึกษานี้พบว่ากลไกหนึ่งที่ยา darbepoietin สามารถชะลอความเสื่อมของไตได้มาจากการกระตุ้น endothelial-Akt ซึ่งช่วยลดการเกิด apoptosis [57] จะเห็นได้ว่าข้อมูลงานวิจัยของ Bahlmann และคณะเป็นการศึกษา *in vivo* เพียงการศึกษาเดียวของยา erythropoietin ที่แสดงถึงความสามารถในเรื่องการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังได้ ได้สรุปการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการลดการเกิดภัยอันตรายต่อไตในสัตว์ทดลอง ในตารางที่ 2



รูปที่10 แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าในหนูที่ได้รับยา darbepoietin เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับยา darbepoietin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [57]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สรุปการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการลดการเกิดภัยอันตรายต่อไตในสัตว์ทดลอง

ชนิดสัตว์ทดลอง	Cause of renal injury	rhEPO/Darbepoietin- α	กลไกในการป้องกัน (mechanism)
Rat	Remnant	0.1 ug/kg sc /wk	Akt activation, ↓ apoptosis
Rat	I/R injury	500-3000 u/kg at 0, 24, 48 hr	↑ packed cell volume
Mouse	I/R injury	1000 u/kg sc at day -3	↓ oxidative stress, ↓ lipid peroxidation
Rat	I/R injury	200 u/kg iv at 0, 6 hr and od	↓ aquaporin water channel, Na transport
Rat	I/R injury	5000 u/kg IP at -30min	↓ apoptosis, ↑ tubular regeneration
Rat	I/R injury	300 u/kg iv -30min, -5min and + 30min	↓ apoptosis, caspase activation
Rat	I/R injury	3000 u/kg iv at day -1	↓ apoptosis
Rat	Hemorrhagic shock	300 u/kg iv before CPR	↓ caspase activation
Rat	Endotoxin shock	300 u/kg iv at LPS injection	No protection
Rat	Cisplatin	100 u/kg IP od	↑ regeneration of proximal tubular cell

I/R = ischemia/reperfusion

SC = subcutaneous

IP = intraperitoneal

2.4.3.3.2 ข้อมูลการศึกษาในมนุษย์

ในปัจจุบันข้อมูลการศึกษาบทบาทของยา erythropoietin ในภาวะไตวายฉับพลันมีเพียง 1 การศึกษาซึ่งเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective study) ในผู้ป่วย จำนวน 187 คน ที่รับไว้ในหอผู้ป่วยวิกฤตหนักและมีภาวะไตวายฉับพลันและจำเป็นต้องได้รับการฟอกไต ผู้ป่วยที่ได้รับยา erythropoietin (71 ราย) ไม่ได้มีการฟื้นตัวของไตที่เร็วขึ้น และไม่ได้ช่วยลดปริมาณการให้เลือด เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา erythropoietin (116 ราย) [58]

สำหรับการศึกษารolesบทบาทของยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังในมนุษย์นั้นได้มาจาก 5 การศึกษาด้วยกัน โดยเป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study) 4 การศึกษา และการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective study) 1 การศึกษา

การศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study) ของ Roth และคณะ [59] ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง 83 ราย แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin และกลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin โดยทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยฮีมาโตคริต (ประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์) ค่าเฉลี่ยครีอะตินีน (ประมาณ 5.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และค่าเฉลี่ย GFR (10 มิลลิลิตรต่อนาที) ใกล้เคียงกัน ไม่พบความแตกต่างในค่า GFR เมื่อสิ้นสุดการศึกษาที่ 48 สัปดาห์ แต่เมื่อวิเคราะห์ลงไป ในรายละเอียดมากขึ้นพบว่า หลังจากสัปดาห์ที่ 16 เมื่อค่าฮีมาโตคริตบรรลุเป้าหมาย กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีค่าอัตราการลดลงของ GFR ที่น้อยกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin 3 เท่า (-0.13 ± 0.35 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อเดือน เปรียบเทียบกับ -0.39 ± 0.65 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อเดือน ในกลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin, $P = 0.05$).

การศึกษาที่ 2 โดย Kuriyama และคณะ [60] ศึกษาในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง 73 ราย มีค่าเฉลี่ยฮีมาโตคริต 27.4 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย creatinine clearance 18.2 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากเริ่มการศึกษา 8 สัปดาห์ แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin และกลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin พบว่าที่ 36 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีค่าการเพิ่มครีอะตินีนเป็น 2 เท่า (doubling of serum creatinine) ร้อยละ 52 ขณะที่ในกลุ่มควบคุมมีค่าการเพิ่มครีอะตินีนเป็น 2 เท่า (doubling of serum creatinine) ร้อยละ 90 ($P < 0.005$) นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีร้อยละของผู้ป่วยที่ทำการฟอกไตเมื่อสิ้นสุดการศึกษาน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการศึกษาที่ 3 ซึ่งเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective study) โดย Jungers และคณะ [61] พบว่ายา erythropoietin น่าจะมีบทบาทในการชะลอความเสื่อมของไตได้ จากการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin (20 ราย) และกลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin (43 ราย) ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่มีระดับการทำงานของไตใกล้เคียงกัน กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีอัตราการลดลงของ creatinine clearance ที่ช้ากว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา

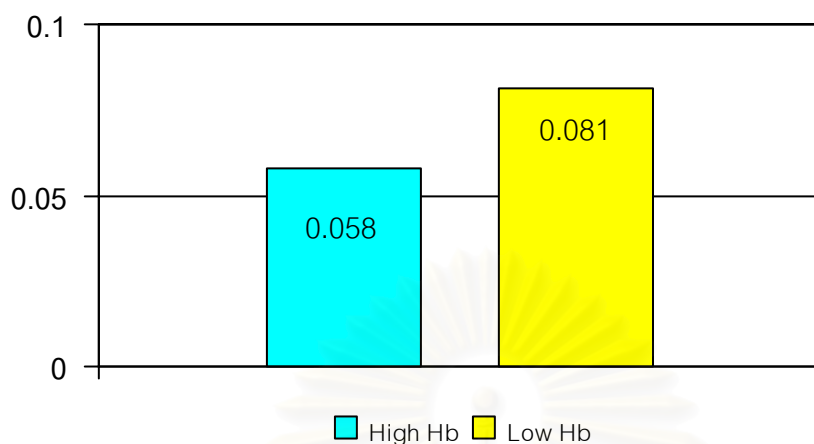
erythropoietin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-0.26 ± 0.15 มิลลิลิตรต่ออนาที่ต่อ 1.73 ตารางเมตรต่อเดือน เปรียบเทียบกับ -0.36 ± 0.16 มิลลิลิตรต่ออนาที่ต่อ 1.73 ตารางเมตรต่อเดือน, $P < 0.05$)

การศึกษาที่ 4 โดย Gouva และคณะ [62] ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่ไม่ได้เกิดจากเบาหวาน มีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะน้อยกว่า 2 กรัมต่อวัน และมีค่าฮีโมโกลบินในช่วง 9-11.6 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จำนวน 88 ราย แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ตั้งแต่เริ่มมีอาการโลหิตจางในระยะแรก และกลุ่มที่เริ่มให้ยา erythropoietin เมื่อค่าฮีโมโกลบินน้อยกว่า 9 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมื่อดูที่ผลลัพธ์รวมของค่าการเพิ่มครีอะตินีนเป็น 2 เท่า (doubling of serum creatinine) การเกิดไตวายเรื้อรังในระยะสุดท้าย และการเสียชีวิต ที่ 22 เดือน พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นมีค่าผลลัพธ์รวมต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาภาวะโลหิตจางที่ช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาล่าสุด [63] ซึ่งเป็นการศึกษาที่มีจำนวนผู้เข้าร่วมการศึกษามากที่สุด จำนวนทั้งหมด 389 ราย โดยในตอนแรกตั้งใจจะทำการศึกษา 40 เดือน แต่จำเป็นต้องหยุดการศึกษาก่อนกำหนด (ระยะเวลาในการศึกษาเฉลี่ย 7.4 ถึง 8.3 เดือน) เนื่องจากเกิดปัญหา pure red cell aplasia ในผู้ป่วยที่ได้รับยา erythropoietin พบว่าไม่มีความแตกต่างในอัตราการลดลงของ glomerular filtration rate ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin และในผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา erythropoietin (รูปที่ 11) จะเห็นได้ว่าข้อมูลการศึกษาบทบาทของยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังในมนุษย์ยังมีความขัดแย้งกันอยู่ คงจะต้องรอการศึกษาในรูปแบบไปข้างหน้าที่เป็น randomized control ขนาดใหญ่ต่อไปในอนาคตเพื่อที่จะสามารถสรุปบทบาทของยา erythropoietin ได้อย่างชัดเจน

ได้สรุปการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังในมนุษย์ ในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Rate of GFR decline (cc/min/yr)



รูปที่ 11 แสดงอัตราการลดลงของ glomerular filtration rate ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin (high Hb) และในผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา erythropoietin (low Hb) [63]

ตารางที่ 3 สรุปผลการศึกษาผลของยา erythropoietin ในการชะลอความเสื่อมของโรคไตวายเรื้อรังในมนุษย์

เอกสารอ้างอิง	รูปแบบการศึกษา (Type of Study)	จำนวน (คน)	ระยะเวลาใน การศึกษา (เดือน)	ผลลัพธ์
Roth et al	Prospective	83	48	ยา EPO ไม่ช่วย ชะลอความเสื่อม
Kuriyama et al	Prospective	108	9	ยา EPO ช่วย ชะลอความเสื่อม
Jungers et al	Retrospective	63	24	ยา EPO ช่วย ชะลอความเสื่อม
Gouva et al	RCT	88	22.5	ยา EPO ช่วย ชะลอความเสื่อม
Rosser et al	RCT	389	40	ยา EPO ไม่ช่วย ชะลอความเสื่อม

RCT = randomized control trial

2.5 รูปแบบการทดลองผูกท่อไต 1 ข้างในหนูทดลอง (unilateral ureteral obstruction)

การผูกท่อไต 1 ข้างในหนูทดลองซึ่งเป็นแบบการศึกษาที่ทำให้เกิด tubulointerstitial fibrosis ได้เป็นอย่างดี และใช้ระยะเวลาไม่นาน โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังการผูกท่อไต โดยเมื่อเกิดการอุดตันท่อไต (obstructive uropathy) จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในไตมากมาย ได้แก่การเปลี่ยนแปลงของระบบโลหิตพลศาสตร์ภายในไต (renal hemodynamics) การเปลี่ยนแปลงใน renal tubular function ไม่ว่าจะเป็นในด้านการดูดกลับของโซเดียม การทำให้ปัสสาวะเข้มข้นหรือเจือจาง การเปลี่ยนแปลงใน renal acidification และผลต่ออิเล็กโทรไลต์

ในส่วนของบทบาทของเซลล์และสารต่าง ๆ เมื่อเกิดการอุดตันท่อไต (obstructive uropathy) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ดังนี้

2.5.1 Angiotensin II (Ang II)

ในปัจจุบันเชื่อว่าระบบ renin-angiotensin เป็นกลไกหลักในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่บริเวณ tubulointerstitium เมื่อเกิดภาวะ obstructive uropathy ขึ้น โดยผ่านทางสาร angiotensin II (Ang II) โดยปกติ Ang II จะถูกสร้างที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น หัวใจและหลอดเลือด ตัวไตเองสามารถผลิต Ang II ได้ในระดับที่สูงกว่าในเลือด ถึง 1,000 เท่า Ang II จับกับ AT₁ และ AT₂ receptor signal ที่ผ่าน AT₁ receptor ทำให้เกิด vasoconstriction กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ กระตุ้น fibroblasts และ myocytes signal ที่ผ่าน AT₂ receptor ทำให้เกิด vasodilatation และมีฤทธิ์ antiproliferation รวมทั้งกระตุ้น apoptosis ด้วย

ภาวะ obstructive uropathy จะทำให้ระดับ Ang II เพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็จะมีผลควบคุมระดับ transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), nuclear factor-KB (NF-KB), monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1) และ intercellular adhesion molecule-1 มีหลักฐานที่บ่งว่า Ang II น่าจะมีบทบาทในการเกิด apoptosis และ proliferation ใน obstructive uropathy เช่น การให้ ACEI ชื่อ enalapril จะลดการเกิด apoptosis และการสูญเสียเนื้อไตในหนูได้ [64] รวมทั้งมีหลักฐานอื่น ๆ อีก เช่น ARB ก็สามารถช่วยลด apoptosis ได้

2.5.2 Cell apoptosis และ proliferation ใน obstructive uropathy

การอุดกั้นทางเดินปัสสาวะจะกระตุ้นระบบ renin-angiotensin ในไต ทำให้มีการสร้าง Ang II เพิ่มขึ้น ร่างกายจึงมีความไม่สมดุลของ vasodilators และ vasoconstrictors โดยจะมีสารชนิดหลังเป็นปริมาณมากกว่า ก่อให้เกิดอันตรายต่อไตโดยผ่านขบวนการ vasoconstriction-induced ischemia พบว่า vasoconstrictors เหล่านี้จะกระตุ้น All receptors บน tubular cells นอกจากนี้ mechanical stress ซึ่งเกิดจากการเพิ่มความกดดันในท่อไต (intratubular pressure) รวมทั้งการสร้าง cytotoxic reactive oxygen species ใน tubular cells จะทำลายเซลล์และหลั่งสารที่มีผลเสียต่อไตเพิ่มขึ้นเช่น transforming growth factor- β (TGF- β) และ mediators อื่นเช่น osteopontin และ macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) เป็นต้น MCP-1 จะดึงดูด inflammatory cells โดยเฉพาะ macrophages มาที่ไต และจะเกาะติดกับ tubular และ endothelial cells โดยอาศัย adhesion molecules ต่างๆ เช่น ICAM-1 หรือ VCAM-1 เซลล์เหล่านี้ จะหลั่งสาร cytokines ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไตตามมา การเปลี่ยนแปลงอีกประการหนึ่งคือ พบการสูญเสียเนื้อไตไป ทั้งจากขบวนการ apoptosis และ necrosis แต่ส่วนใหญ่จะพบ apoptosis ใน obstructive uropathy มากกว่า จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ที่รัดท่อไต (unilateral ureteric obstruction) พบว่ามีการเกิด apoptosis ตั้งแต่วันที่ 2 และสูงสุดวันที่ 25 การเกิด apoptosis สามารถอธิบายการสูญเสียปริมาณเนื้อไตอันเกิดจากการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะได้ [65] อย่างไรก็ตาม หลังการเกิด obstructive uropathy จะมีการแบ่งตัวของ tubular cells เพิ่มขึ้น (cell proliferation) ขึ้นตอนในการเกิด proliferation และ apoptosis บางขั้นตอนคล้ายคลึงกัน [66] โดยทั่วไป cell proliferation จะเกิดนำมาก่อน apoptosis พบว่า selectin ซึ่งเป็น adhesion molecules ชนิดหนึ่ง มีบทบาทในการดึงดูด leukocytes ให้เข้ามาสะสมในบริเวณ tubulointerstitium โดยเฉพาะ L-selectin ซึ่งพบบน leukocytes ส่วนใหญ่จะดึงดูด macrophage ให้เข้ามาอยู่ในไตข้างที่มี obstruction และก่อให้เกิด tubular apoptosis, tubular atrophy และ interstitial fibrosis ได้ [67]

2.5.3 Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

TGF- β เป็น potent fibrogenic factor พบหลักฐานว่าในที่มีการอุดกั้นท่อไต จะมีระดับ TGF- β เพิ่มสูงขึ้น ส่วนหนึ่งของ TGF- β จะถูกกระตุ้นโดย angiotensin II ด้วย นอกจากนี้ TGF- β ยังควบคุมการเกิด fibrosis จาก basic fibroblast growth factor (bFGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) TGF- β ทำให้เกิดยับยั้ง cell growth และเสริมสร้างการสร้าง matrix โดยการกระตุ้นการสร้าง matrix receptors เช่น integrins และ osteopontin ในอีกด้านหนึ่ง TGF-

β ยับยั้งการสลายตัวของ matrix โดยกระตุ้นการทำงานของ tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) และลด activity ของ metalloproteinase พบ metalloproteinases เหล่านี้พบในเนื้อไต มีบทบาทในการเกิด tissue remodeling โดยสลาย matrix ส่วนเกินออกไป metalloproteinase ถูกควบคุมโดย TIMP เมื่อ TIMP เพิ่มขึ้นและ metalloproteinase ลดลงทำให้ matrix เพิ่มขึ้นและเกิด interstitial fibrosis ตามมา แต่เนื่องจากยังไม่มีสารสังเคราะห์ specific TGF- β antagonists จึงยังไม่สามารถศึกษาบทบาทของ TGF- β ที่แน่ชัดได้ อย่างไรก็ตาม TGF- β จะเพิ่มสูงขึ้นในการอุดกั้นฉับพลันมากกว่าการอุดกั้นเรื้อรัง⁶⁷ เพราะ TGF- β ช่วยเพิ่ม collagen ซึ่งใช้ในการเสริมสร้างเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไป ในการอุดกั้นเรื้อรัง จะพบระดับ TGF- β สูงไม่มาก ซึ่งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี การให้ ACEI ในช่วงที่เกิด ureteral obstruction จะลดระดับ TGF- β และ collagen ลงถึงร้อยละ 50 รวมทั้งลดการเกิด interstitial fibrosis ด้วย เชื่อว่ากลไกเกิดจากการที่ ACEI ลดการสร้าง TGF- β ที่ผ่านทาง Ang II [68]

มีการศึกษาพบว่า hepatocyte growth factor (HGF) หรือในอีกชื่อหนึ่งคือ smad 7 ซึ่งเป็น potent mitogen สำหรับ mature hepatocyte ช่วยให้เซลล์ของเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ แบ่งตัวเพิ่มขึ้น ช่วยซ่อมแซมอวัยวะที่สึกหรอ มีฤทธิ์ cytoprotective และ renotropic พบว่า HGF มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน model ของสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิด unilateral ureteral obstruction และระดับของ TGF β และ HGF จะแปรผกผันกัน กล่าวคือ HGF จะลดระดับ TGF- β expression และลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis และช่วยลดการดำเนินโรคสู่ไตวายเรื้อรังได้ [69] ในอนาคตอาจนำเทคโนโลยี gene therapy โดยใช้ transfer gene ของ HGF เข้าไปในร่างกายเพื่อรักษา tubulointerstitial fibrosis ใน obstructive uropathy ได้

2.5.4 Clusterin

เป็น glycoprotein ซึ่งปกติจะมีอยู่ในปริมาณไม่มากในไต แต่จะถูก upregulate มากขึ้นถ้ามีภาวะ apoptosis ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดในการกระตุ้น expression ของสารนี้ แต่สันนิษฐานว่าเป็นกลไกป้องกันตัวเอง เพราะ clusterin ช่วยลด apoptosis ที่เกิดจาก tumor necrosis factor- α (TNF- α) [70]

2.5.5 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

มีบทบาทต่อการดึงดูด inflammatory cells เช่นกัน พบว่าสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิด ureteral obstruction จะมีระดับ TNF- α สูงขึ้นชัดเจน TNF- α จะจับกับ receptors ของมันและก่อให้เกิด

apoptosis และ necrosis ตามมา [71] TNF- α ทำให้มี macrophage มาสะสมใน interstitium มากขึ้นซึ่ง macrophage จะก่อให้เกิดผลตามมามีการสร้าง cytokines หลายชนิดซึ่งมีผลเพิ่มการสร้าง Collagenase, Transin และ Stromelysin mRNA ซึ่งเป็นกลุ่มของ Matrix metallo proteinases (MMPs) MMPs มีบทบาทใน tissue remodeling ของเนื้อไตและถูกควบคุมโดย Inhibitory proteins ชื่อ Timps ความไม่สมดุลของ Proteases เหล่านี้นำมาเกิดการเกิด tubulointerstitial fibrosis ใน obstructive uropathy ได้ macrophage สามารถผลิต TGF- β ได้ด้วย

มี TNF 2 ชนิด คือ TNF- α และ TNF- β ถูกสร้างจาก macrophages และ renal tubular cells เมื่อมี obstruction จะพบระดับ TNF α เพิ่มสูงขึ้นใน cortical tubules TNF- α มีบทบาทในการรวบรวม inflammatory cells, เพิ่ม (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) RANTES, m RNA ในเซลล์ mesangium ของสัตว์ทดลอง ทำให้เพิ่ม interstitial volume และกระตุ้น nuclear factor-KB (NF-KB) ในไตซึ่งมีการอุดกั้นท่อไต

2.5.6 Nuclear Factor-KB (NF-KB)

NF-KB จะอยู่ใน cytoplasm โดยจับกับ RNA ในบริเวณที่เป็น promoters ของยีนต่างๆ โดยเฉพาะเกี่ยวกับการควบคุม inflammation และ immune response พบว่าระดับ NF - KB จะสูงขึ้นหลังการอุดกั้นท่อไต และลดลงหลังได้รับ ACEI 1 บ่งชี้ว่า Ang II กระตุ้นการสร้าง NF-KB ทำให้มีการสร้าง TNF- α เพิ่มขึ้น

การให้ ACE-inhibitor จะลดระดับ TNF- α และลดระดับ NF-KB ด้วย [72] NF-KB จึงเปรียบเสมือนสะพานเชื่อมในการควบคุมการเกิด gene expression ของ cytokine ต่างๆ

2.5.7 Reactive Oxygen Species

เมื่อเกิด obstructive uropathy จะเกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วงที่เกิด vasoconstriction พร้อมกับมีการลดลงของขบวนการ antioxidant ในร่างกาย ยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของ ROS ในการทำให้เกิด apoptosis, interstitial fibrosis การให้ probucol ซึ่งเป็น antioxidant จะช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในไตจาก chronic ureteric obstruction ได้

Reactive Oxygen Species (ROS) อาจมีบทบาทสำคัญใน tubulointerstitial inflammation ที่สัมพันธ์กับ obstructive uropathy เพราะภาวะการอุดกั้นท่อไต นำไปสู่ tissue hypoxia มีการผลิต ROS เพิ่มขึ้น และมี macrophage เข้าไปสะสมใน interstitium เพิ่มขึ้น มีการ

ผลิต TGF- β , osteopontin, heat-shock protein และ ICAM-1 เพิ่มขึ้น และนำไปสู่ tubulointerstitial fibrosis ในที่สุด

2.5.8 Epidermal Growth Factor (EGF)

Cytokines เหล่านี้ จะช่วยส่งเสริมให้เซลล์เข้าสู่วงจรการเกิด proliferation ได้เร็วขึ้น แต่การเกิด apoptosis ลดลง นอกจากนี้ยังมี growth factor อื่นๆที่เกี่ยวข้องด้วยเช่น insulin-like-growth factor-1 พบว่ามีระดับ cytokines บางชนิดเพิ่มขึ้นซึ่งอาจมีบทบาทต่อการทำลายไตในภาวะอุดกั้นทางเดินปัสสาวะด้วย เช่น PDGF เป็นต้น

2.5.9 Macrophages

ภายหลังจากที่ทดลองทำให้เกิดการอุดกั้นของทางเดินปัสสาวะในสัตว์ทดลอง จะพบว่า macrophage เข้ามาสะสมในบริเวณ interstitium ค่อนข้างมาก โดยพบว่ามีสารกระตุ้นที่ชื่อ monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1) มีระดับเพิ่มขึ้นด้วยรวมทั้งโปรตีนอื่นที่มีฤทธิ์ดึงดูด macrophage เช่น osteopontin ยังไม่ทราบว่าจะปัจจัยอะไรที่เป็นสาเหตุให้ไตที่ถูกอุดกั้นหลังสารเหล่านี้มาดึงดูด macrophages ให้มาสะสมที่บริเวณ interstitium เมื่อ macrophage มาสะสมที่บริเวณ interstitium จะหลั่งสาร TGF- β ซึ่งทำให้มีการสะสมของ fibroblast มาภายหลัง และ TGF- β จะยับยั้งขบวนการย่อยสลาย extracellular matrix ด้วย [73] ผลโดยรวมทำให้มีการสะสมของ fibrous tissue เพิ่มขึ้นในที่สุด

2.5.10 Kininogen gene family

หลังเกิดการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ renal hemodynamic ตัวอย่างเช่นใน model ของ unilateral ureteral obstruction(UUO) ซึ่งเป็นรูปแบบการทดลองที่ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบว่าในช่วงแรกของการอุดกั้นจะมีปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงไต (renal blood flow) เพิ่มขึ้น อธิบายจากการเพิ่มขึ้นของ prostaglandins จากไตที่ข้างที่ถูกอุดกั้น ต่อมาเมื่อการอุดกั้นเกิดนานกว่า 24 ชั่วโมง จะมีการเพิ่มขึ้นของ renal vascular resistance และ glomerular ultrafiltration coefficient ลดลง ทำให้ RBF และ GFR ลดลง สาเหตุของการลดลงของ GFR และ RBF เกิดจากการหลั่งสาร vasoconstrictor เช่น Ang II, thromboxane, leukotrienes, vasopressin และ endothelins โดย Ang II มีบทบาทค่อนข้างมากดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้ขบวนการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะเองยังมีผลต่อไตด้วยโดยรอบขบวนการสร้างและการออกฤทธิ์ต่อ vasodilators เมื่อทดลองให้ ACEI ซึ่งยับยั้งการสลายตัวของ bradykinin จะพบว่า

preglomerular vasoconstriction ลดลง แสดงว่า intrarenal-kinin activity อาจมีบทบาทในการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะด้วย แต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก ส่วนผลของ UUO ต่อ kallikrein-kinin system พบว่าเมื่อมีการอุดกั้นทางเดินปัสสาวะในสัตว์ทดลอง จะมีการสร้าง kallikrein ลดลง เชื่อว่าความดันที่สูงขึ้นในไตจะไปมีผลต่อเซลล์ที่สร้าง Kallikrein ทำให้การสร้างสารนี้ลดลง และทำให้ kininogen ซึ่งต้องอาศัย kallikrein ในการเปลี่ยนแปลงเป็น bradykinin มีการเปลี่ยนแปลงเป็น bradykinin ลดลงด้วย การลดลงของ kinin ทำให้เกิด vasodilatation ตามมา kinin กระตุ้น thromboxane และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ prorenin เป็น renin รวมทั้งกระตุ้นการสร้าง renin โดยตรงจาก juxtaglomerular apparatus ด้วย

2.5.11 Platelet – derived growth factor (PDGF)

PDGF เป็น growth factor ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคไตหลายชนิด เพราะมีฤทธิ์เป็น mitogen และ chemoattractant สำหรับ fibroblast และ mesenchymal cells รวมทั้ง smooth muscle cells มี PDGF หลายชนิด ได้แก่ PDGF A, B, C, D ซึ่งพบว่า PDGF B และ D มีบทบาทในการทำให้เกิด tubulointerstitial injury จาก obstructive uropathy ในสัตว์ทดลอง [74]

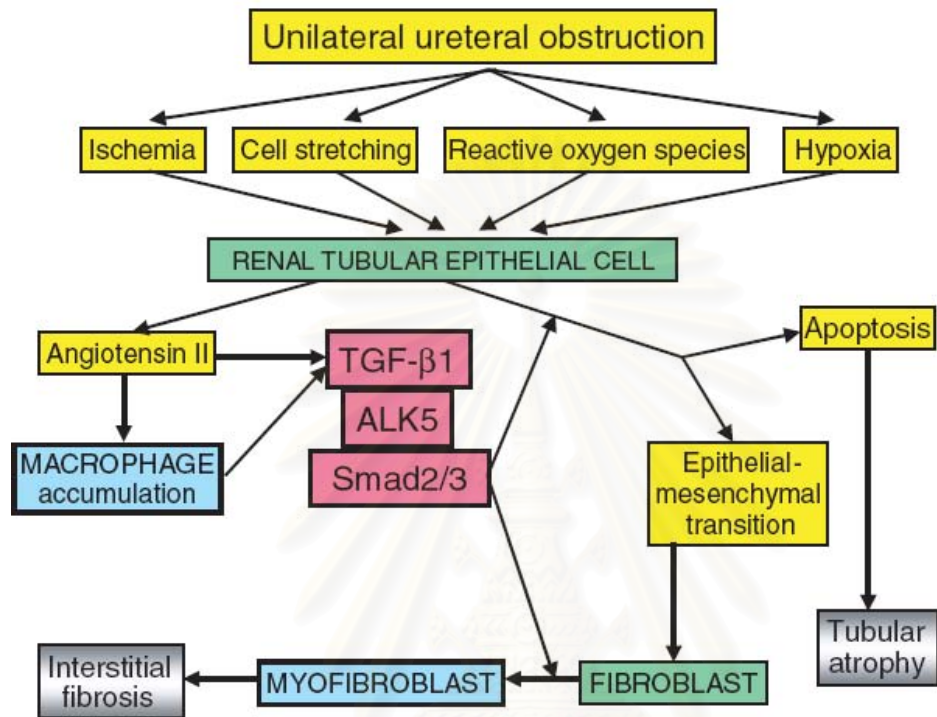
2.5.12 Nitric Oxide (NO)

เป็น messenger molecules ที่มีบทบาทเกี่ยวกับ renal physiology รวมทั้ง obstructive uropathy ด้วย พบว่า NO ช่วยลดการเกิด renal fibrosis ใน experimental uropathy การศึกษาต่อมาพบว่าการสร้าง NO ลดลง ในหนูที่ทำให้เกิด unilateral ureteral obstruction ดังนั้น การพยายามลดการเกิด fibrosis อาจทำได้โดยการดัดแปลง เอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เพื่อปรับสมดุลระดับ NO ในร่างกาย [75]

2.5.13 บทบาทของ vasoactive compounds ใน obstructive nephropathy

เมื่อเกิด obstruction นานเกิน 24 ชั่วโมง จะมี vasoconstriction , glomerular filtration rate และ effective renal plasma flow (ERPF) ลดลง และ mean arterial pressure เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงของ blood flow เกิดเนื่องจาก prostaglandins, Ang II และ NO เพราะมีหลักฐานว่าพบ vasoconstrictor บางชนิดเพิ่มขึ้นในภาวะ obstructive uropathy เช่น Ang II, thromboxane A II และ antidiuretic hormone (ADH) การให้ inhibitors ต่อสารเหล่านี้จะช่วยเพิ่ม ERPF และ GFR รวมทั้งการให้ vasodilators เช่น prostaglandins E₂ และ I₂ และ platelet activating factor (PAF) จะช่วยเพิ่ม GFR และ ERPF เช่นกัน

ได้สรุปกลไกที่สำคัญและตัวอย่างสารต่างๆที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากการอุดตันทางเดินปัสสาวะไว้ใน รูปที่ 12 และตารางที่ 4



รูปที่12 แสดงกลไกหลักที่นำไปสู่การเกิด tubulointerstitial fibrosis เมื่อมีการอุดตันท่อไต [76]

ตารางที่4 สารที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในไตที่มีการอุดตันท่อไต (ureteral obstruction)

Transforming Growth Factor β [TGF - β]

Nuclear Factor - κ B [NF - κ B]

Tumor Necrosis Factor - α [TNF - α]

Vasoactive compounds

Angiotensinogen

Angiotensin II

Endothelin

Thromboxane A2

Prostaglandins

Protooncogenes

Growth factors

Proteins involved in apoptosis

Clusterin

Osteopontin

Chemoattractants

Monocyte Chemoattractant Peptide -1 (MCP - 1)

Osteopontin

Adhesion proteins

ICAM-1

VCAM-1

Matrix / basement membrane proteins

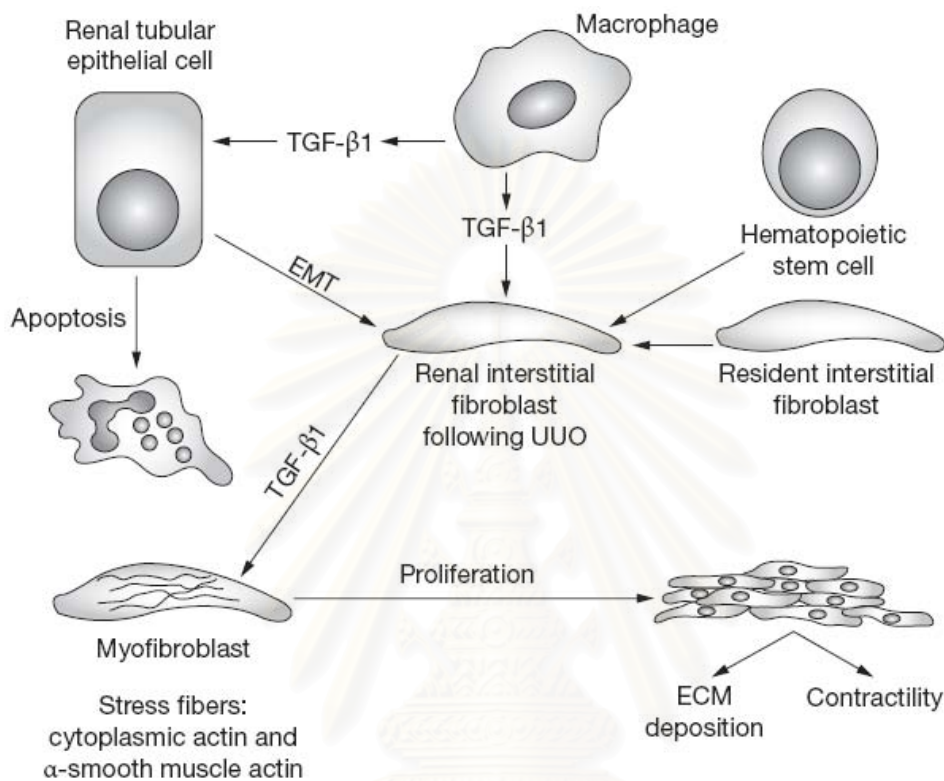
Collagen types I, III and IV

สามารถสรุปกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในไตเมื่อมีการอุดตันท่อไตได้เป็น 3 กระบวนการ ดังนี้

- กระบวนการอักเสบ (inflammation)

โดยทั่วไปหนูที่ถูกผูกท่อไตจะมีการเพิ่มขึ้นของ ED-1 positive cell ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage หนึ่งใน inflammatory cell ที่สำคัญ macrophage ที่เข้ามาในเนื้อไตนี้จะหลั่งสาร

cytokine หลายชนิดยกตัวอย่างเช่น TGF- β 1 ซึ่งจะไปมีผลกระตุ้น renal tubular epithelial cell ให้เกิดการตาย apoptosis นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้น interstitial fibroblast ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ myofibroblast



รูปที่ 13 แสดงปฏิสัมพันธ์ของเซลล์ชนิดต่างๆภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต [77]

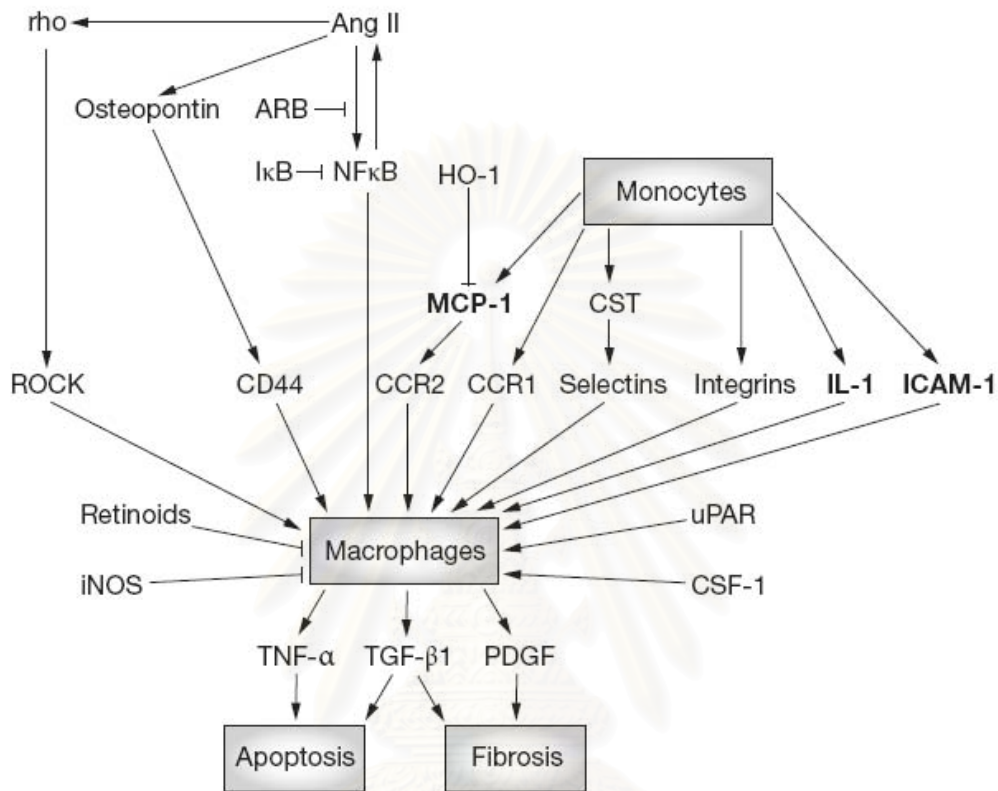
เซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการหดตัว (contractility) คล้ายเซลล์กล้ามเนื้อ และสามารถเพิ่มการสะสมของ extracellular matrix (ECM) นำไปสู่การเกิด interstitial fibrosis ในที่สุด (รูปที่ 13)

เป็นที่ชัดเจนถึงบทบาทของเซลล์ macrophage ในการเป็นเซลล์หลักของกระบวนการอักเสบภายในไตหลังจากผูกท่อไต (รูปที่ 14) โดยมี Ang II, osteopontin, monocyte chemoattractant-1 (MCP-1), selectin และ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) เป็นกลไกที่นำเซลล์ macrophage เข้าสู่เนื้อไตนั้น

- การเกิดพังผืดในเนื้อไต (renal interstitial fibrosis)

การเกิด tubulointerstitial fibrosis นับเป็นการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญเมื่อทำการผูกท่อไต โดยเชื่อว่าเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์ myofibroblast ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก activated interstitial fibroblast โดยที่ activated interstitial fibroblast นั้นเปลี่ยนแปลงมาจาก resident interstitial fibroblast มากที่สุดคือร้อยละ 49 มาจาก bone marrow-derived cell (hematopoietic

stem cell) ร้อยละ 15 และมาจากการ transformation ของ tubular epithelial cell อีกร้อยละ 36 (รูปที่ 13) เซลล์ myofibroblast เป็นเซลล์สำคัญที่ทำหน้าที่ในการสร้าง extracellular matrix ได้แก่ collagen type I, III และ IV



รูปที่ 14 แสดงกลไกการเกิดการอักเสบภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต [77]

ลูกศรหัวแหลมแสดงถึงการกระตุ้น และลูกศรหัวป้านแสดงถึงการยับยั้ง

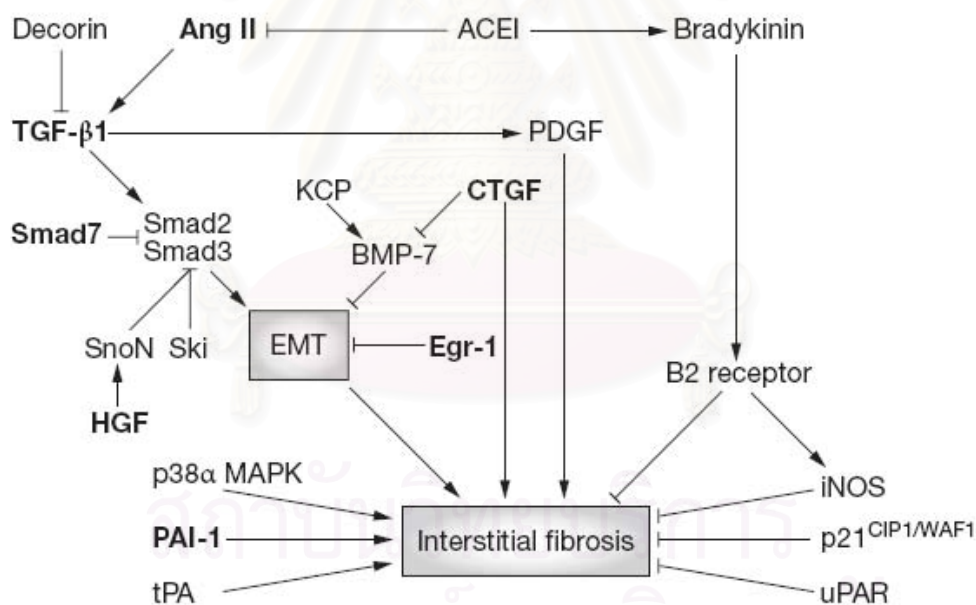
Ang II, angiotensin II; ARB, angiotensin receptor blocker; CCR1, chemokine receptor 1; CCR2, chemokine receptor 2; CSF-1, colony stimulating factor-1; CST, cerebroside sulfotransferase; HO-1, heme oxygenase-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IκB, NFκB endogenous inhibitor; IL-1, interleukin-1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NFκB, nuclear factor kappa B; PDGF, platelet-derived growth factor; ROCK, Rho-associated coiled-coil forming protein kinase; TGF-β1, transforming growth factor-β1; TNF-α, tumor-necrosis factor-α; uPAR, urokinase receptor.

เป็นที่ทราบกันดีว่า TGF-β1 เป็นสาร cytokine สำคัญในการกระตุ้นให้เกิด fibrosis โดยที่มี Ang II เป็นตัวกระตุ้นการสร้างที่สำคัญ พบว่าเมื่อทำการลด angiotensinogen gene ให้เหลือศูนย์สามารถลดปริมาณ tubulointerstitial fibrosis ลดได้ถึงร้อยละ 50 ได้ทำการสรุปสาร cytokine ต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิด tubulointerstitial fibrosis ไว้ในรูปที่ 15

- การเกิด tubular apoptosis (tubular apoptosis)

Gobe และ Axelsen เป็นกลุ่มแรกที่แสดงถึงบทบาทของการเกิด tubular apoptosis ในรูปแบบการทดลองผูกท่อไต⁷⁸ นำไปสู่การศึกษาต่อมาที่ยืนยันความสำคัญของกระบวนการเกิด tubular apoptosis

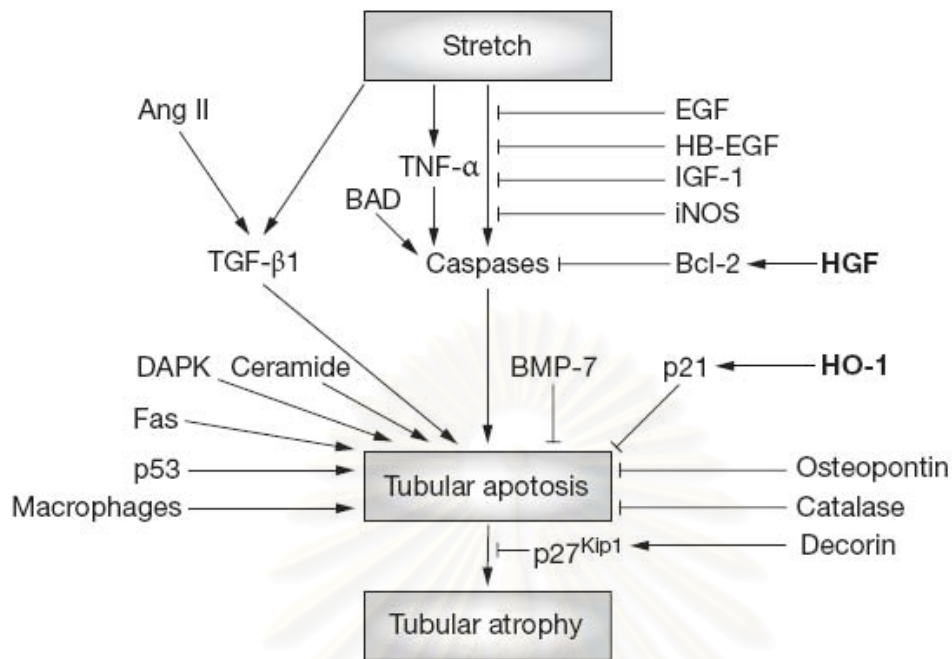
เมื่อทำการผูกท่อไตจะทำให้มีแรงดันเพิ่มขึ้นภายในท่อไต และเกิดการยืดออกของ tubular epithelial cell (mechanical stretch) หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นเอนไซม์ caspase หนึ่งใน p53-dependent pathway นำไปสู่การเกิด tubular apoptosis และ tubular atrophy ในที่สุด นอกจากนั้นการเกิดการยืดออกของ tubular epithelial cell ยังไปมีผลกระตุ้น p53-independent pathway อีกทางหนึ่งด้วย สาร cytokine ยกตัวอย่างเช่น TGF- β 1, tumor necrosis factor- α ซึ่งสร้างมาจาก tubular epithelial cell และเซลล์ macrophage ยังไปมีผลเพิ่มกระบวนการ apoptosis อีกทางหนึ่ง ในขณะที่เดียวกันสาร cytokine ได้แก่ epidermal growth factor (EGF), heparin-binding EGF-like growth factor, insulin-like growth factor-1, hepatocyte growth factor และ bone morphogenetic factor-7 กลับไปมีผลในทางตรงข้าม รูปที่ 16



รูปที่ 15 แสดงสาร cytokine ต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิด tubulointerstitial fibrosis [77]

ลูกศรหัวแหลมแสดงถึงการกระตุ้น และลูกศรหัวบานแสดงถึงการยับยั้ง

ACEI, angiotensin-converting-enzyme inhibitor; Ang II, angiotensin II; B2, bradykinin 2; BMP-7, bone morphogenetic protein-7; CTGF, connective tissue growth factor; Egr-1, early growth response gene-1; EMT, epithelial-mesenchymal transformation; HGF, hepatocyte growth factor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; KCP, kielin/chordin-like protein; p21CIP1/WAF1, cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF1; p38 α MAPK, p38 α mitogen-activated protein kinase; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PDGF, platelet-derived growth factor; SnoN, Ski-related novel protein N; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; tPA, tissue-type plasminogen activator; uPAR, urokinase receptor

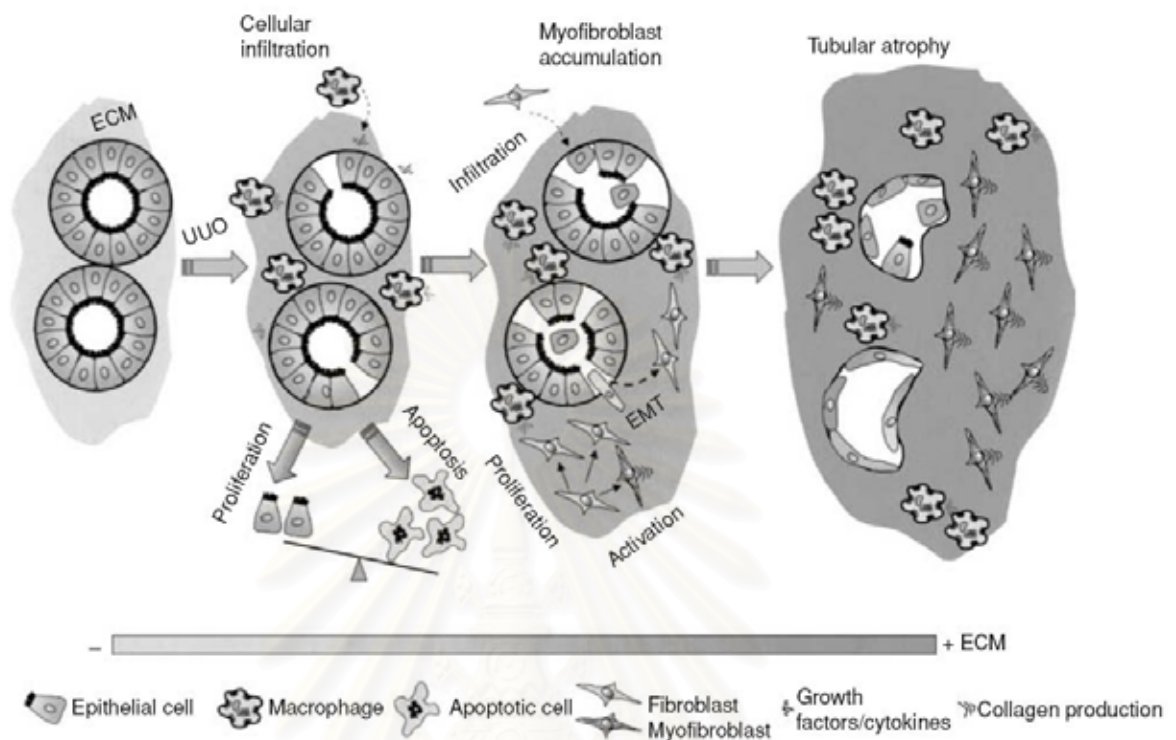


รูปที่ 16 แสดงกลไกการเกิด tubular apoptosis ภายในเนื้อไตเมื่อผูกท่อไต [77]

ลูกศรหัวแหลมแสดงถึงการกระตุ้น และลูกศรหัวป้านแสดงถึงการยับยั้ง

Ang II, angiotensin II; BMP-7, bone morphogenetic protein-7; DAPK, death-associated protein kinase; EGF, epidermal growth factor; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; HO-1, heme oxygenase-1; IGF-1, insulin-like growth factor-1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TNF- α , tumor-necrosis factor- α .

ได้สรุปการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในไตไว้ในรูปที่ 17



รูปที่ 17 แสดงภาพเรียงลำดับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในไตภายหลังจากการผูกท่อไต โดยในช่วงแรกจะมีการเพิ่มและลดของ tubular epithelial cell ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันต่อมากระบวนการตาย apoptosis จะมีมากกว่ากระบวนการ proliferation ทำให้นำไปสู่ภาวะการฝ่อของท่อไต (tubular atrophy) ในที่สุด นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มของเซลล์ myofibroblast และการสะสมของ extracellular matrix ยกตัวอย่างเช่น collagen I, III, และ IV โดยการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดนี้จะใช้ระยะเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์ [79]

2.6 บทสรุป

จากความรู้ที่มีในปัจจุบัน ทำให้ทราบว่า tubulointerstitial fibrosis เป็นพยาธิสภาพร่วมสำคัญในโรคไตวายเรื้อรัง โดยมีกลไกหลัก 2 กลไกด้วยกันที่เข้ามามีผลในการก่อให้เกิดโรคไตวายเรื้อรัง ได้แก่ การเกิดภาวะ proteinuria และการเกิด renal hypoxia ความพยายามที่จะทำความเข้าใจกลไกในการเกิด tubulointerstitial fibrosis ได้นำไปสู่การคิดค้นสร้างแบบจำลองในสัตว์ a) กองเพื่อใช้ในการศึกษาพยาธิสภาพดังกล่าว b) ระบุท่อไต 1 ข้างในหนูทดลอง ก็นับเป็นหนึ่งในรูปแบบการศึกษาที่ใช้ระยะเวลาที่ไม่นาน สามารถทำซ้ำ (reproducibility) และให้พยาธิสภาพที่ชัดเจน ในด้านวิธีการหรือยาที่จะนำมาช่วยชะลอการเสื่อมของไตนั้นก็ได้มีการศึกษาอย่าง

กว้างขวางเช่นเดียวกัน รวมไปถึงยา erythropoietin ซึ่งปัจจุบันเป็นยาที่ใช้ในการรักษาภาวะโลหิตจาง ก็มีข้อมูลสนับสนุนผลทางด้านที่เป็น tissue protective effect ออกมาเพิ่มขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 ประชากร

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

- หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 250-320 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา กิ่ง อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม หนูทดลองดังกล่าวข้างต้นถูกนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 24 -26 องศาเซลเซียส ควบคุมแสงสว่างในช่วงเวลา 6.00 น. จนถึง 18.00 น. และช่วงมืดเวลา 18.00 น. จนถึง 6.00 น. มีระบบระบายอากาศ หนูทดลองทั้งหมดถูกนำเข้ากรงเลี้ยงหนูที่มีฝากระจกทำด้วยวัสดุสแตนเลส ขนาดกว้าง 34.5 เซนติเมตร ยาว 74 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร และมีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด ได้รับอาหารหนูสูตรมาตรฐาน 2 เวลาคือในเวลาเช้าและเวลาเย็น และได้รับน้ำที่สะอาดปราศจากเชื้อโรคโดยไม่จำกัดปริมาณ หนูทุกตัวจะได้รับการเขียนหมายเลขโดยใช้ปากกาชนิดหมึกถาวรที่บริเวณหาง

3.1.2 ขั้นตอนการวิจัย

การเตรียมหนูทดลอง

ทำการผูกท่อไตทำตามขั้นตอนดังนี้

1.วางยาสลบหนูทดลองด้วยการดมยา ether

2.หลังหนูทดลองสลบจึงผ่าตัดหนูด้วยวิธีผ่าเข้าทางด้านหน้าท้อง (mid-line incision) เพื่อหาท่อไตข้างขวา

3.จากนั้นทำการผูกท่อไตข้างขวาด้วยด้าย 2 เส้น 2 ตำแหน่ง

4.ทำการเย็บปิดผนังหน้าท้อง

การทดลอง แบ่งหนูทดลองเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว

กลุ่มที่ 1 ได้รับการผูกท่อไตข้างขวาเพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 2 ได้รับยา erythropoietin beta ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. โดยฉีดยาเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ในวันก่อนจะทำการผูกท่อไตข้างขวา 1 วัน วันที่ 3 วันที่ 7 และวันที่ 10 ภายหลังจากทำการผูกท่อไตข้างขวา

หลังจากทดลองได้ 3, 7 และ 14 วัน หนูทดลอง 4 ตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกทำการผ่าตัดเพื่อนำไตส่งตรวจทางพยาธิวิทยา และทำลายหนูทดลองโดยการเจาะเส้นเลือดแดงใหญ่ (aorta) ภายหลังตัดไต

หมายเหตุ ซากสัตว์ที่เกิดจากการทดลองจะถูกนำไปแช่แข็ง และขอให้สำนักรักษาความสะอาดกรุงเทพมหานคร นำไปกำจัดในรูปของขยะติดเชื้อต่อไป

3.2 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

3.2.1 การเก็บข้อมูลเบื้องต้น

ทำการเก็บข้อมูลเบื้องต้นโดยการชั่งน้ำหนักและเจาะเลือดเพื่อหาค่าฮีมาโตคริตของหนูทดลองทุกตัว

3.2.2 การตรวจทางพยาธิวิทยา

ไตหนูทดลองจะถูกส่งให้พยาธิแพทย์โดยวิธีการแช่ในน้ำยา methyl carnoy solution และการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจดูความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายในไตด้วยวิธีดังนี้

1. ย้อม hematoxylin & eosin (H&E), periodic acid schiff (PAS) และ trichrom masson เพื่อดูพยาธิสภาพทั่วไปของเนื้อเยื่อส่วน interstitium
2. ย้อมพิเศษ (immunohistochemistry) เพื่อดู

Collagen ซึ่งแสดงถึงปริมาณ extracellular matrix ในบริเวณ tubulointerstitium

วิธีการย้อม

การเตรียมแผ่นสไลด์

- เตรียม methyl carnoy-fixed, paraffin-embedded section หน้า 2 ไมครอน บนสไลด์ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane
- นำสไลด์ไปอบที่ 60°C ทิ้งไว้ข้ามคืน
- ทำการ deparaffinized, rehydration ด้วยน้ำกลั่น

Epitope retrieval (Antigen retrieval) ใช้วิธี pressure cooker method โดยการ

- เติม epitope retrieval solution ลงในหม้อ stainless steel pressure cooker ปิดฝา

- ใส่สไลด์ ในชั้นวางโลหะ แล้วใส่ลงในหม้อ ปิดฝาให้เรียบร้อย
- เมื่ออุณหภูมิและความดันถึงขีดที่กำหนด ยกหม้อลงจากเตา จับเวลา 3 นาที

- ทำให้หม้อเย็นทันทีด้วยน้ำประปา จนอุณหภูมิและความดันลดลง เปิดฝา ยกหม้อลงแช่ในน้ำประปา 15 นาที

- ล้างด้วยน้ำประปา และ phosphate buffer saline (PBS)

การสกัดกั้น *endogenous peroxidase activity (block endogenous peroxidase activity)*

- ครอบ section ด้วย dako pen
- เติมน้ำยา 3% H₂O₂/distilled water ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature)
- ล้างน้ำประปา
- ล้างด้วยน้ำยา PBS

การสกัดกั้น *non-specific background (block non-specific background)*

- ใส่น้ำยา 3% normal horse serum 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

การใส่น้ำยา *primary antibody*

- เติมน้ำยา 3% normal horse serum ส่วนเกินทิ้ง
- เติม primary antibody ในที่นี้คือ monoclonal mouse anti-human collagen type 4 (Dako, Glostrup, Denmark) ที่ได้เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 50
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน
- ล้างด้วยน้ำยา PBS อีกครั้ง
- หยดน้ำยา visualization reagent (Envision system)
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- ล้างด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้งครั้งละ 3 นาที

การสร้างสี (*colour development*)

- หยดสารละลาย 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous (DAB)
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที
- ย้อมด้วยสารละลาย hematoxylin เพื่อ counterstaining
- ทำการปิดสไลด์ (mounting)

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) ซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์ myofibroblast
วิธีการย้อม ทำเช่นเดียวกับการย้อม collagen ยกเว้นในขั้นตอนการเติม primary antibody ใช้ monoclonal mouse anti-human α -SMA (Dako, glostrup, Denmark) ที่ได้เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 800 แทน

ED-1 เพื่อดูปริมาณเซลล์ macrophage

วิธีการย้อม ทำเช่นเดียวกับการย้อม collagen ยกเว้นในขั้นตอนการเติม primary antibody ใช้ monoclonal mouse anti-rat ED-1 (Chemicon, Temecula, CA) ที่ได้เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 500 แทน

3. ย้อมพิเศษเพื่อดูการเกิด apoptosis ของเนื้อเยื่อส่วน interstitium ด้วยวิธี TUNEL

วิธีการย้อม

การเตรียมแผ่นสไลด์

- เตรียม formalin-fixed, paraffin-embedded section หน้า 2 ไมครอน บนสไลด์ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane

- นำสไลด์ไปอบที่ 60 °c ทิ้งไว้ข้ามคืน

- ทำการ deparaffinized, rehydration ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมชิ้นเนื้อ (pretreat tissue)

- ใส่น้ำยา Proteinase K (ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มล.) ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 15 นาที

- ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งครั้งละ 2 นาที

การสกัดกั้น endogenous peroxidase activity (block endogenous peroxidase activity)

- วรอบ section ด้วย dako pen

- เติมน้ำยา 3% H₂O₂/distilled water ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature)

- ล้างน้ำประปา

- ล้างด้วยน้ำยา PBS

เติม Equilibration buffer

- ใส่น้ำยา equilibration buffer ความเข้มข้น 75 ไมโครลิตร/ 5 มล.ลงใน สไลด์

- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 วินาที

เติมแอนไทม์ TdT

- ใส่น้ำยาแอนไทม์ working strength TdT ความเข้มข้น 55 ไมโครลิตร/ 5 มล.ลงในสไลด์

- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °c 1 ชม.

ใส่น้ำยา stop/wash buffer

- วางสไลด์ลงในภาชนะที่บรรจุน้ำยา stop/wash buffer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 วินาที

ผสมน้ำยา anti-digoxigenin conjugate

- ล้างด้วยน้ำยา PBS 3 ครั้งครั้งละ 1 นาที

- หยด anti-digoxigenin conjugate ความเข้มข้น 65 ไมโครลิตร/ 5 มล. ลงบนสไลด์
- ล้างด้วยน้ำยา PBS 4 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

การสร้างสี (colour development)

- หยดสารละลาย 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous (DAB)
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที
- ย้อมด้วยสารละลาย hematoxylin เพื่อ counterstaining
- ทำการปิดสไลด์ (mounting)

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

- บันทึกค่าฮีมาโตคริต ในวันที่ -1, 3, 7, 10 และ 14 ของการทดลอง โดยการเจาะเลือดจากบริเวณหางของหนูทดลอง
- บันทึกปริมาณการเกิด tubulointerstitial injury จาก cell infiltration, tubular dilation/atrophy และ interstitial fibrosis จากสไลด์ที่ย้อม hematoxylin & eosin staining, periodic acid schiff staining (PAS) และ trichrome Masson staining โดยมีพยาธิแพทย์ทำการประเมิน 2 คน โดยจะไม่ทราบว่าสไลด์ที่ประเมินนั้นเป็นของหนูกลุ่มใด สุ่มตรวจทั้งหมดจำนวน 20 ส่วนของบริเวณ cortex (กำลังขยาย 200 เท่า) ต่อหนูทดลองหนึ่งตัว และให้คะแนนความรุนแรงของการเกิด tubulointerstitial injuries (tubulointerstitial injury score) จากผลรวมคะแนนของ cellular infiltration, tubular atrophy/dilatation และ interstitial fibrosis โดยให้น้ำหนักของแต่ละตัวแปรเท่ากัน วิธีการให้คะแนนใช้วิธี semiquantitative scoring system ดังนี้ 0 = ปกติ, 1= พบพยาธิสภาพน้อยกว่าร้อยละ 10 ของบริเวณ cortex, 2 = พบพยาธิสภาพร้อยละ 10-25 ของบริเวณ cortex, 3 = พบพยาธิสภาพร้อยละ 26-50 ของบริเวณ cortex, 4 = พบพยาธิสภาพ ร้อยละ 51-75 ของบริเวณ cortex และ 5 = พบพยาธิสภาพมากกว่าร้อยละ 75 ของบริเวณ cortex.
- บันทึกปริมาณการเกิด collagen และ alpha-smooth muscle actin (α -SMA) ในเนื้อเยื่อส่วน interstitium โดยการสุ่มตรวจทั้งหมดจำนวน 20 ส่วนของบริเวณ cortex (กำลังขยาย 200 เท่า) ต่อหนูทดลองหนึ่งตัว และให้คะแนนโดยวิธี semiquantitative scoring system ดังนี้ 0 = ปกติ, 1= พบพยาธิสภาพน้อยกว่าร้อยละ 10 ของบริเวณ cortex, 2 = พบพยาธิสภาพร้อยละ 10-25 ของ

บริเวณ cortex, 3 = พบพยาธิสภาพร้อยละ 26-50 ของบริเวณ cortex, 4 = พบพยาธิสภาพ ร้อยละ 51-75 ของบริเวณ cortex และ 5 = พบพยาธิสภาพมากกว่าร้อยละ 75 ของบริเวณ cortex.

- บันทึกปริมาณ ED-1 positive cell โดยการนับจำนวน ED-1 positive cell ทั้งหมด จากการ สุ่มตรวจทั้งหมด 20 ส่วนของบริเวณ cortex (กำลังขยาย 200 เท่า)

- บันทึกปริมาณ apoptosis โดยการนับจำนวน apoptotic positive cell ทั้งหมด จากการ สุ่มตรวจทั้งหมด 20 ส่วนของบริเวณ cortex (กำลังขยาย 400 เท่า)

3.3 สิ่งแทรกแซง (Intervention)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเกิด tubulointerstitial injury ภายหลังการให้ยา erythropoietin โดยที่ขนาดยาคงที่ตลอดการศึกษา

3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

3.4.1. ข้อมูลพื้นฐานของหนูทดลอง
เพศ, น้ำหนัก, ค่าฮีมาโตคริต

3.4.2. ข้อมูลที่ศึกษา

บันทึกปริมาณการเกิด tubulointerstitial injury จาก cell infiltration, tubular dilation/atrophy และ interstitial fibrosis จากสไลด์ที่ย้อม hematoxylin & eosin staining, periodic acid schiff staining (PAS) และ trichrome masson staining ทำการย้อมพิเศษเพื่อดูการเกิด collagen, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), ED-1 และ apoptosis ในเนื้อเยื่อส่วน interstitium

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative data) วัดผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงมาตรฐาน

ข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative data) แสดงด้วยภาพถ่าย การนำเสนอข้อมูล ตาราง, กราฟ เปรียบเทียบคะแนน และภาพถ่าย สถิติที่ใช้ t test กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ SPSS for window version 11.5

บทที่ 4

ผลการวิจัย

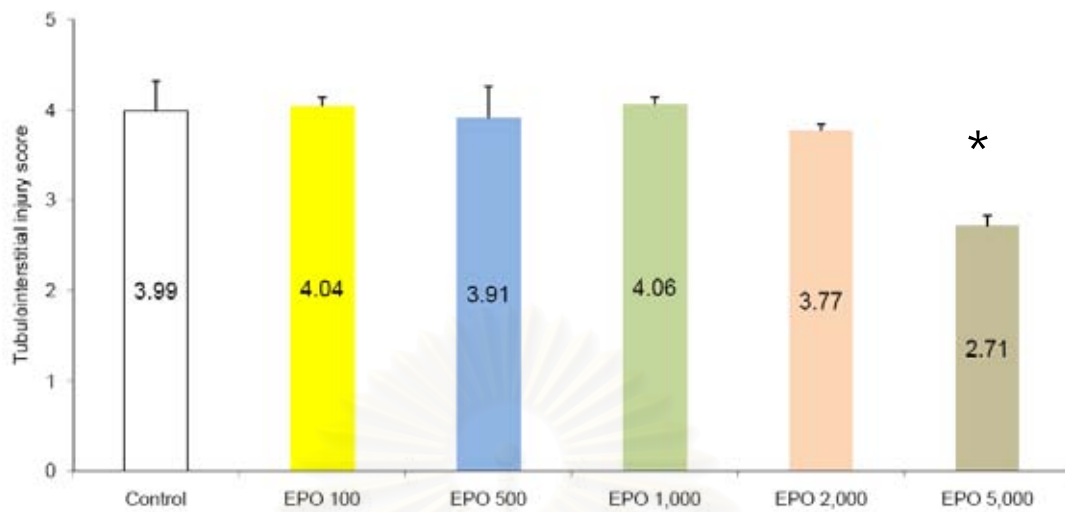
4.1 ข้อมูลทั่วไป

ได้เริ่มทำการศึกษานี้ตั้งแต่เดือน มกราคมถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2549 จำนวนหนูที่นำมาศึกษาทั้งหมด 24 ตัว ใช้หนูสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 250-320 กรัม ไม่พบการเสียชีวิต และการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของหนูทดลองทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin

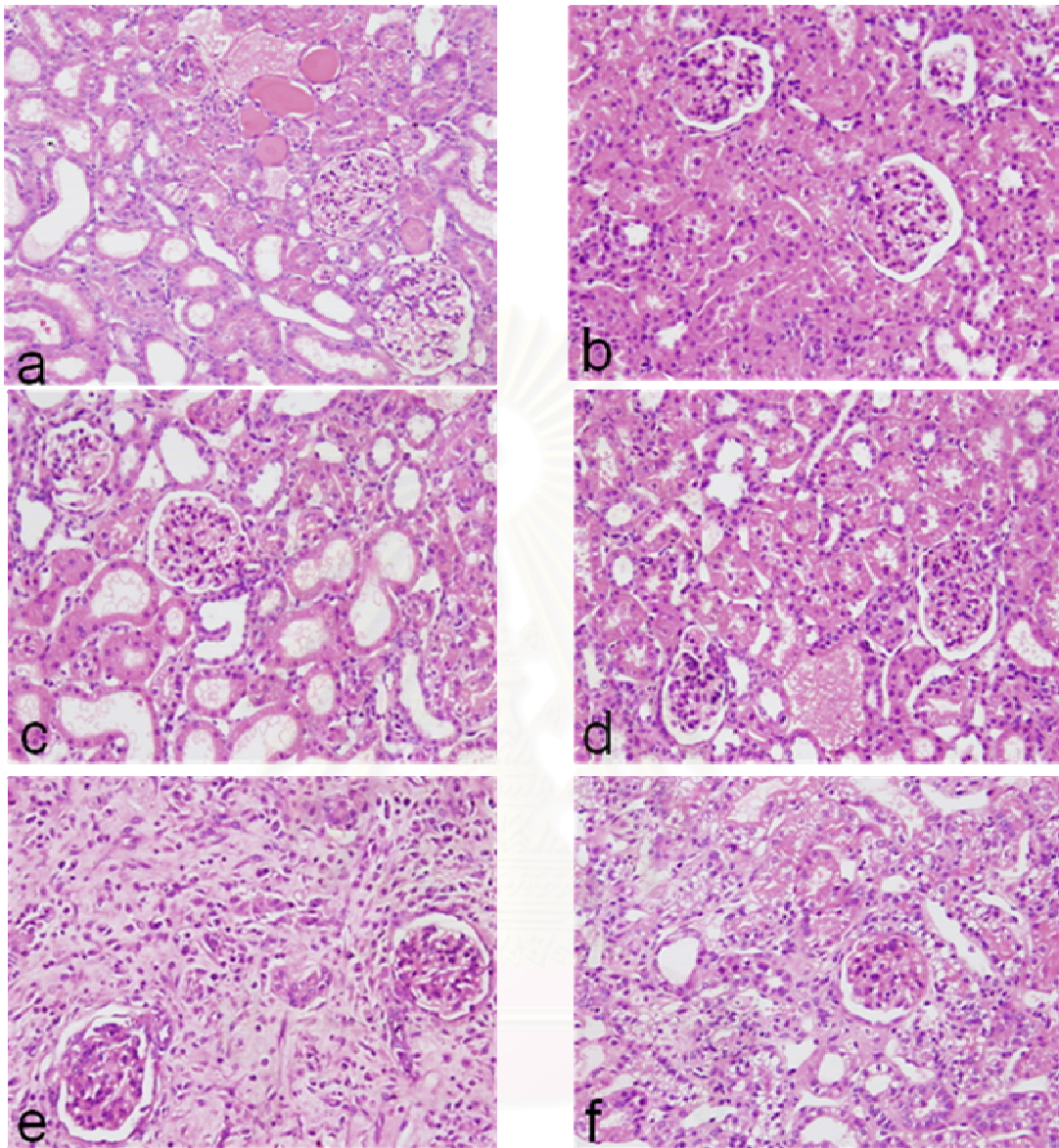
4.2 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูพยาธิสภาพบริเวณ tubulointerstitium จากการย้อม hematoxylin & eosin, periodic acid schiff staining (PAS) และ trichrome masson staining

เมื่อเริ่มทำการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาปริมาณยา erythropoietin ที่เหมาะสมในการลด tubulointerstitial injury พบว่ายา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดการเกิด tubulointerstitial injury ได้ดีกว่ายาในขนาด 100, 500, 1,000 และ 2,000 ยูนิต/กก. หลังจากนั้นผู้วิจัยได้เริ่มทำการศึกษาผลของยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. ในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังจากการผูกท่อไต พบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. มีปริมาณ tubulointerstitial injury score น้อยกว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกช่วงเวลา (รูปที่ 18)

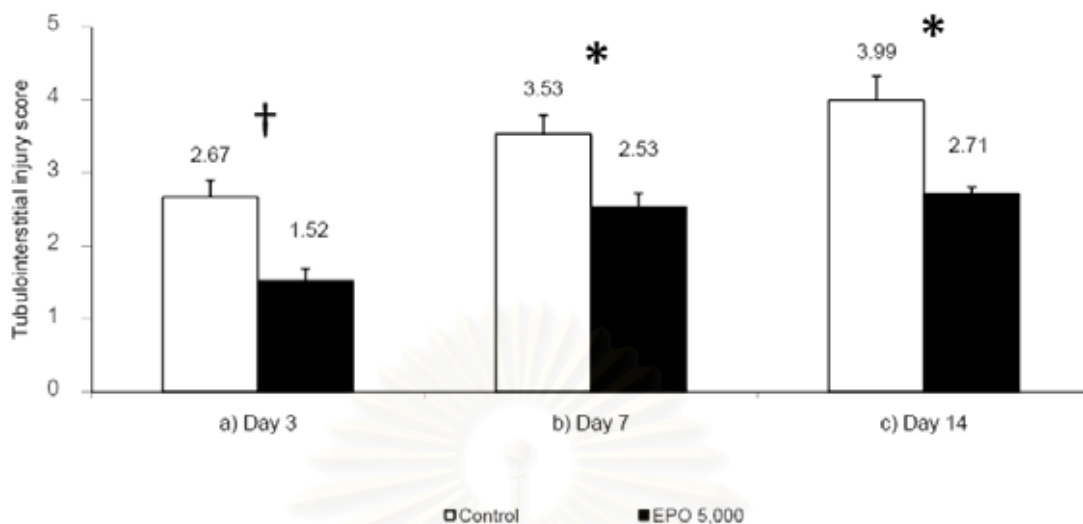
ในวันที่ 3, 7, 14 ภายหลังจากการผูกท่อไตพบว่า ไตของหนูในกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. มีขนาดเล็กกว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุม เมื่อทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มี tubulointerstitial injury ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อให้คะแนน tubulointerstitial injury score พบว่าคะแนนค่าเฉลี่ยของหนูในกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีค่าน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, < 0.01 , < 0.01 ในวันที่ 3, 7 และ 14 ตามลำดับ) (รูปที่ 19, 20)



รูปที่ 18 แสดงยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลด tubulointerstitial injury score ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 100, 500, 1000 และ 2,000 ยูนิต/กก. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 14 ภายหลังการผูกท่อไต *: $p < 0.05$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแห่ง แสดงค่าเฉลี่ยของ tubulointerstitial injury score \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)



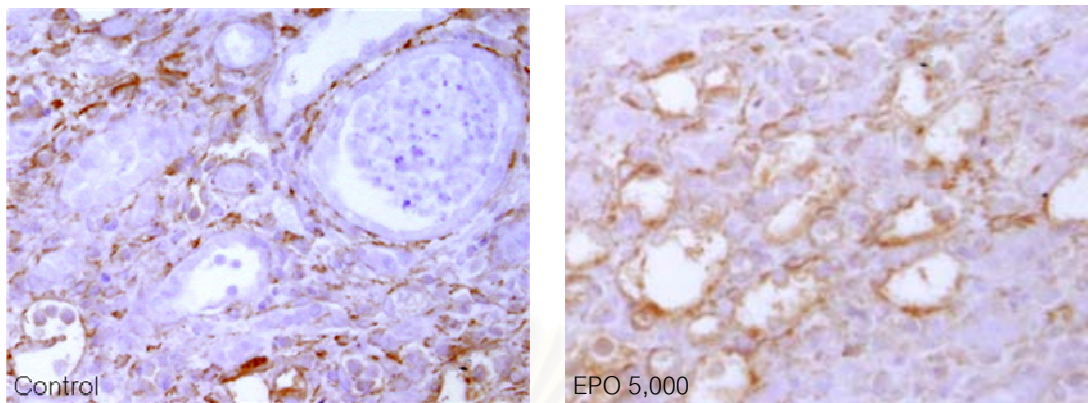
รูปที่ 19 แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย hematoxylin & eosin ในวันที่ 3 (a,b) วันที่ 7 (c, d) และวันที่ 14 (e, f) หลังผูกท่อไต โดยจะสังเกตเห็นว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. (b, c, f) จะมี cellular infiltration, tubular dilatation, tubular atrophy และ interstitial fibrosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (a, c, e) (กำลังขยาย x 200)



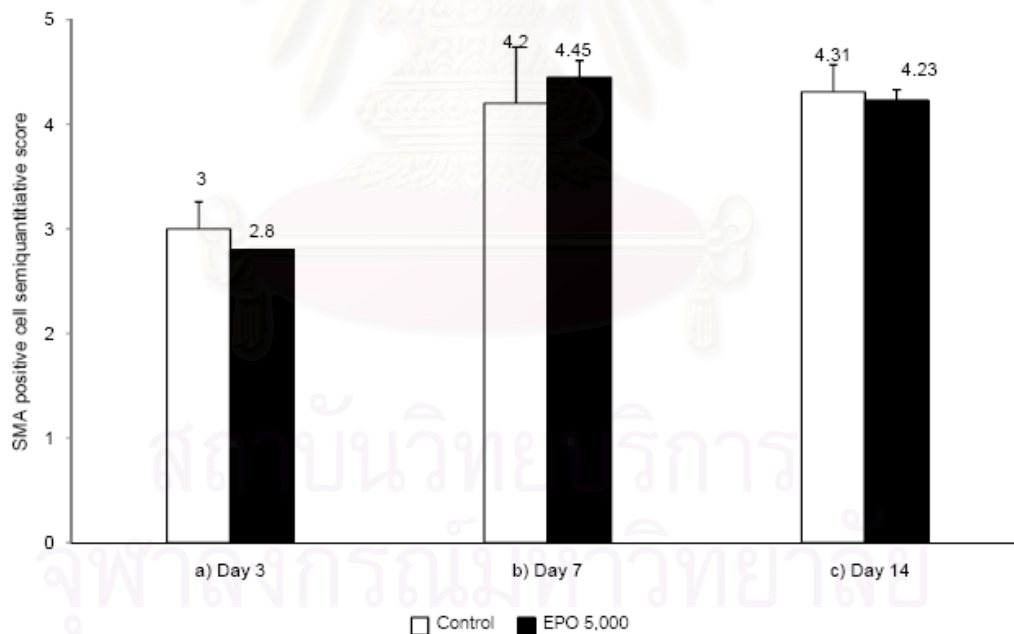
รูปที่ 20 ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลด tubulointerstitial injury score ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังจากการผูกท่อไต *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ tubulointerstitial injury score \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)

4.3 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ myofibroblast จากการย้อมพิเศษ alpha smooth muscle actin (α -SMA)

จากการย้อม immunohistochemistry เพื่อตรวจหาปริมาณ α -SMA positive cell ในเนื้อไตหนู พบว่าสามารถตรวจพบ α -SMA positive cell ได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการผูกท่อไตหนู โดยที่ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. และหนูกลุ่มควบคุมจะตรวจพบ α -SMA positive cell กินพื้นที่กว้างขวาง และไม่พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. จะมีค่าเฉลี่ยปริมาณ SMA positive cell score ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3, 7 และ 14 ตามลำดับ (รูปที่ 21, 22)



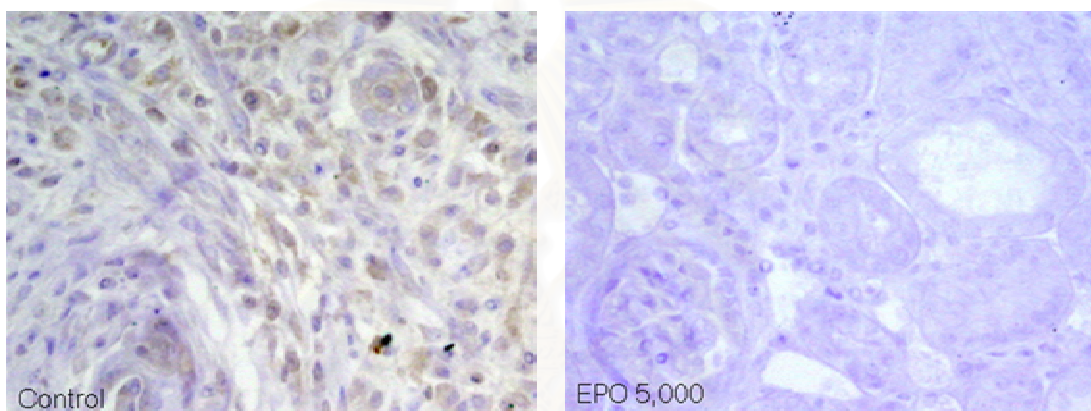
รูปที่ 21 แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย α -SMA ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต โดยจะสังเกตเห็นว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. จะมี α -SMA positive cell บริเวณ tubulointerstitium ในปริมาณใกล้เคียงกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม (กำลังขยาย x 200)



รูปที่ 22 ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. ไม่สามารถลด α -SMA positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังการผูกท่อไต, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ α -SMA positive cell score \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)

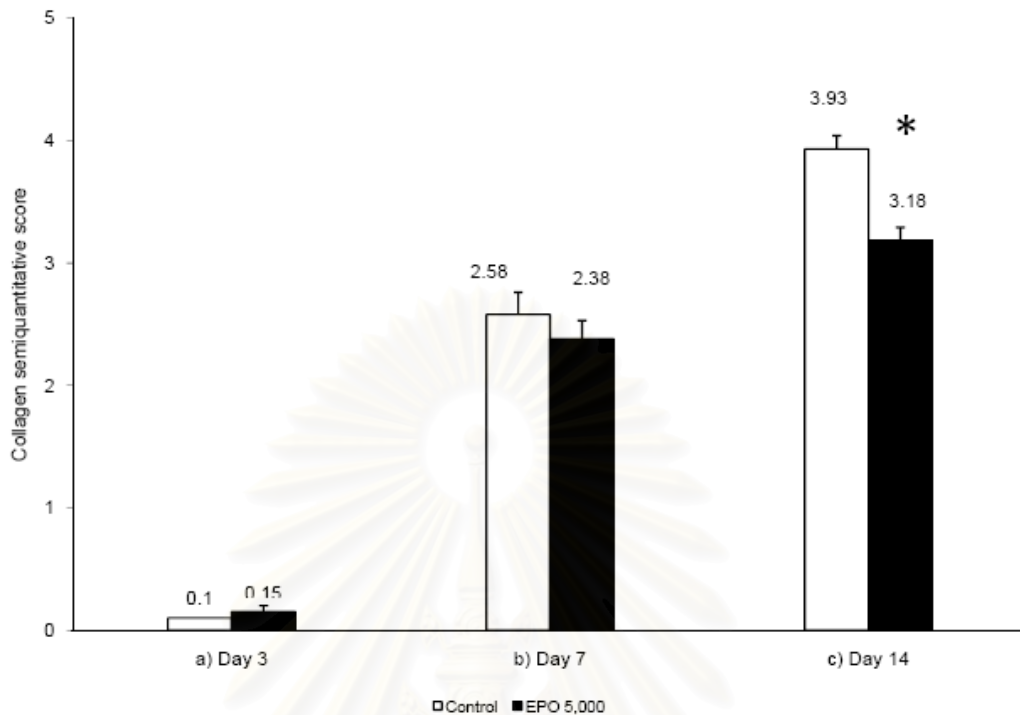
4.4 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจากการย้อมพิเศษเพื่อวัดปริมาณ collagen

ในช่วงวันที่ 3 หลังผูกท่อไตปริมาณ collagen ในบริเวณ tubulointerstitium มีปริมาณน้อย ตรวจไม่พบความแตกต่างระหว่างหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. กับกลุ่มควบคุม (NS = not significant) แต่ในวันที่ 7 และ 14 หลังผูกท่อไตปริมาณ collagen ในบริเวณ tubulointerstitium ของหนูทดลองกลุ่มควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin จะพบว่าปริมาณ collagen ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$ ในวันที่ 14) (รูปที่ 23, 24)



รูปที่ 23 แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อมด้วย collagen ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต โดยจะสังเกตเห็นว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาดสูง จะมี collagen บริเวณ tubulointerstitium น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กำลังขยาย x 200)

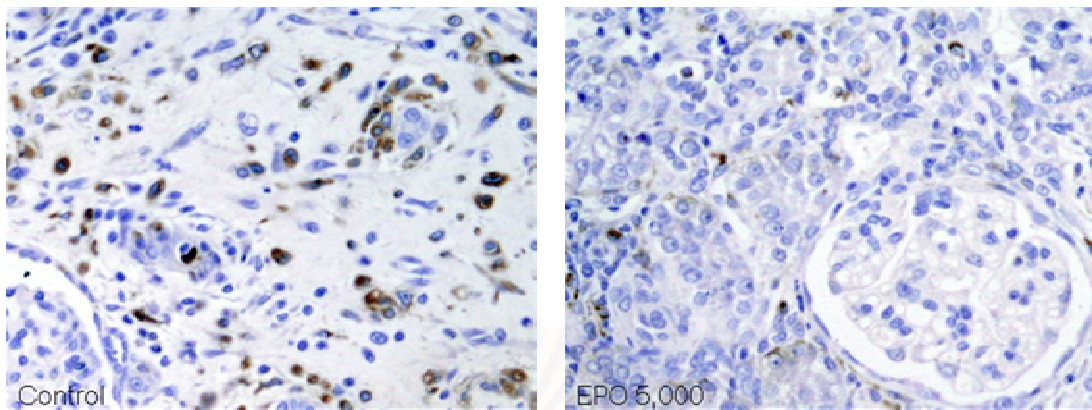
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



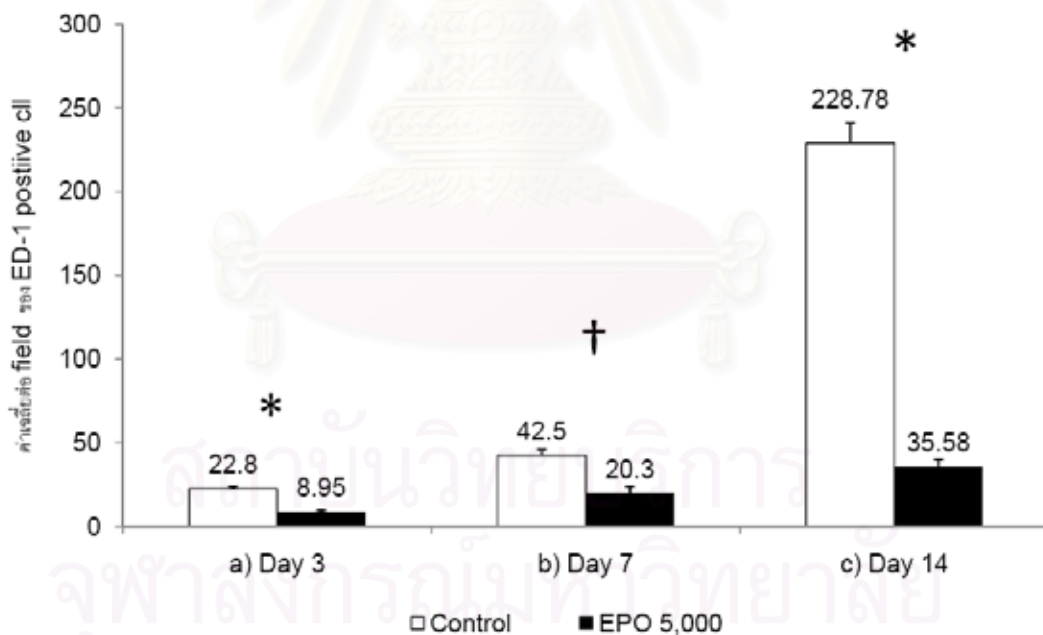
รูปที่ 24 ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ collagen ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 14 ภายหลังการผูกท่อไต *: $p < 0.005$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ collagen score \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)

4.5 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ macrophage จากการย้อมพิเศษ anti ED-1 positive cell

จากการย้อม immunohistochemistry เพื่อตรวจหาปริมาณ ED-1 positive cell ในเนื้อไตหนู พบว่าสามารถตรวจพบ ED-1 positive cell ได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการผูกท่อไตหนู และเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป โดยที่ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. จะพบ ED-1 positive cell น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.001$, < 0.01 , และ < 0.001 ในวันที่ 3, 7 และ 14 ตามลำดับ) (รูปที่ 25, 26)



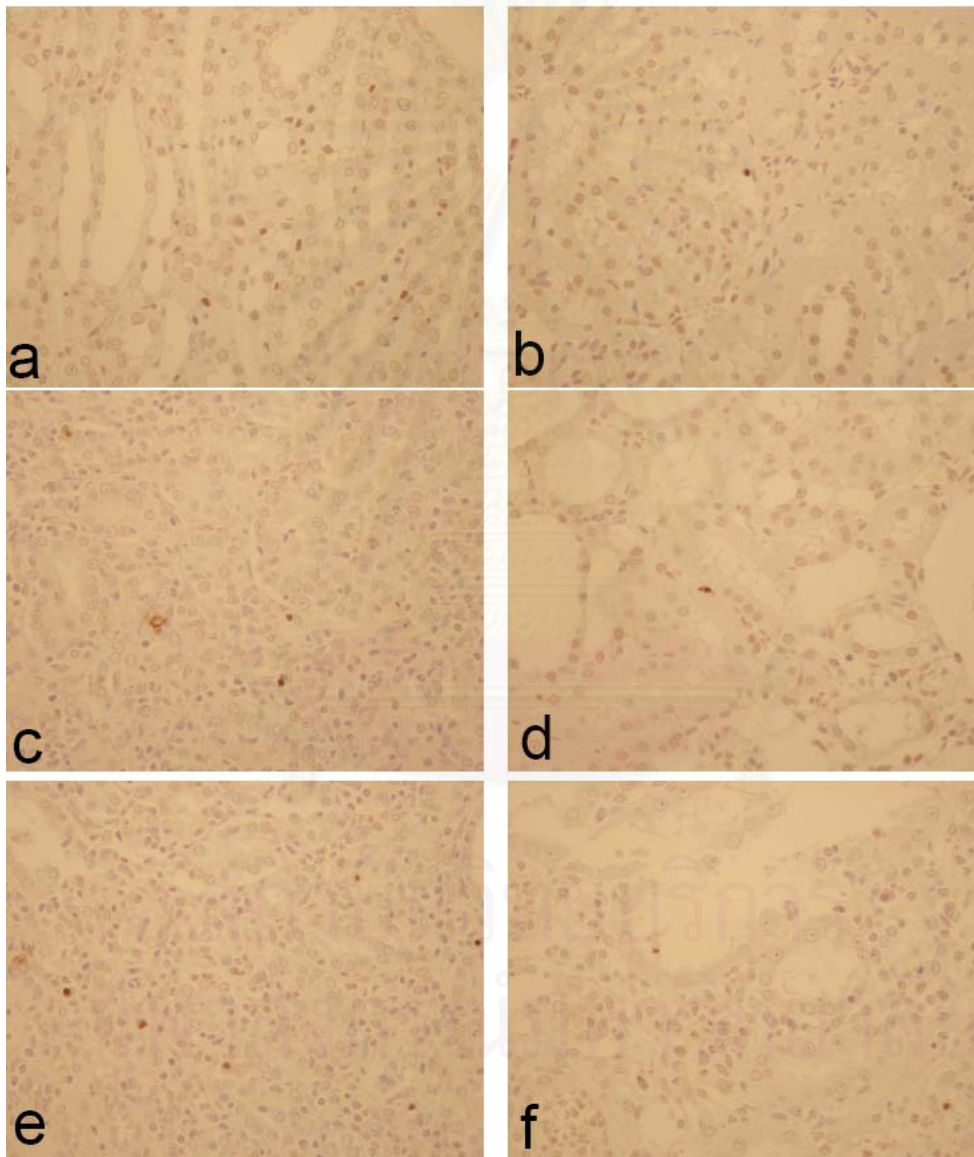
รูปที่ 25 แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อม immunohistochemistry เพื่อประเมิน ED-1 positive cell ในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต โดยจะสังเกตเห็นว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต จะมี ED-1 positive cell บริเวณ tubulointerstitium น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กำลังขยาย x 200)



รูปที่ 26 ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ ED-1 positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังการผูกท่อไต *: $p < 0.001$, †: $p < 0.01$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยต่อ field ของ ED-1 positive cell \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)

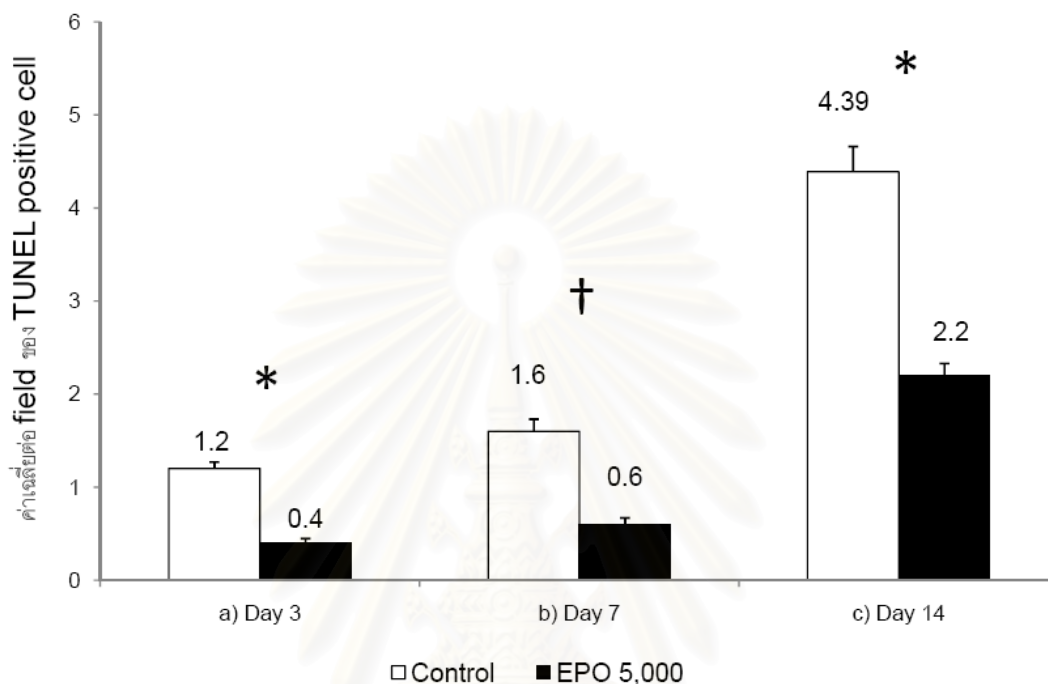
4.6 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อดูปริมาณ apoptotic cells

จากการตรวจสอบปริมาณ apoptotic cell nuclei โดยวิธี TUNEL พบว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. จะพบ apoptotic cell nuclei น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในตลอดระยะเวลาศึกษา ($p < 0.001$, < 0.005 และ < 0.001 ในวันที่ 3, 7 และ 14 ตามลำดับ) โดยความแตกต่างจะมากสุดในวันที่ 14 ของการศึกษา (รูปที่ 27, 28)



รูปที่ 27 แสดงเนื้อไตของหนูทดลองย้อม immunohistochemistry ด้วยวิธี TUNEL เพื่อประเมิน apoptotic cell nuclei ในวันที่ 3 (a,b), 7 (c, d) และ 14 (e, f) หลังผูกท่อไต โดยจะสังเกตเห็นว่าใน

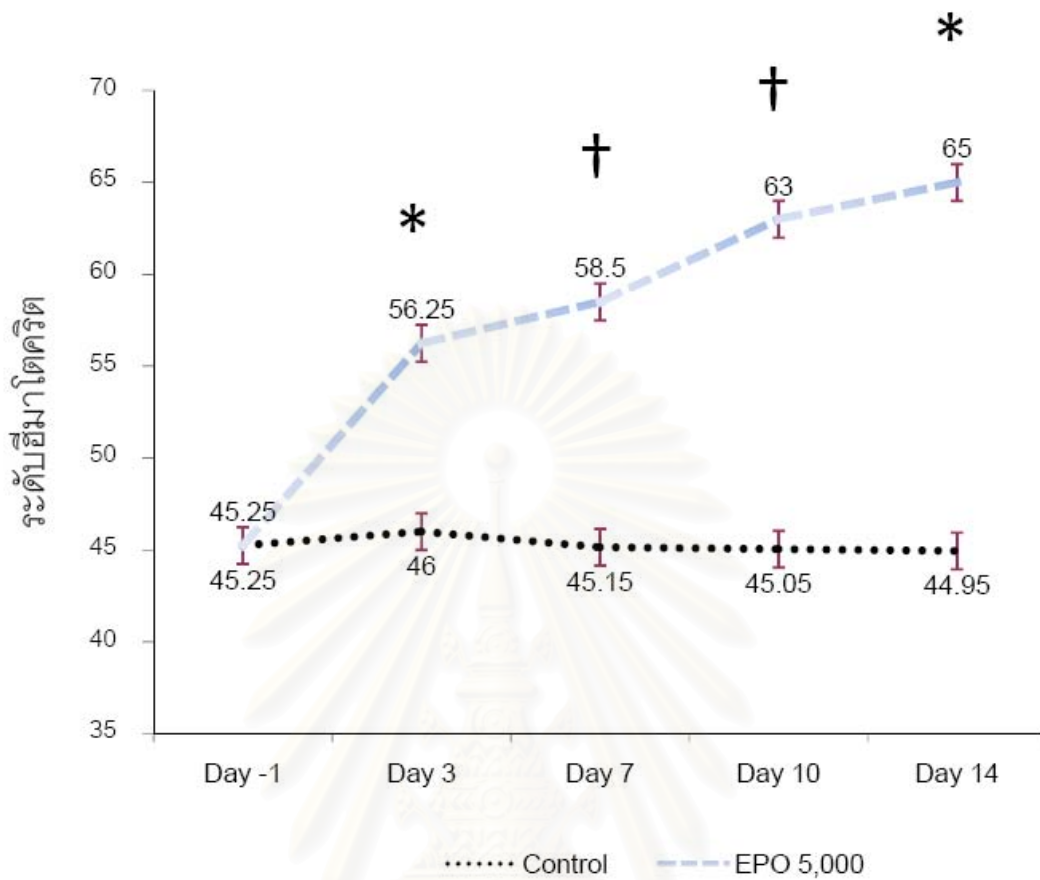
หนูทดลองที่ได้รับยา erythropoietin ในขนาดสูง (b, d, f) จะมี apoptotic cell nuclei บริเวณ tubulointerstitium น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (a, c, e) (กำลังขยาย x 400)



รูปที่ 28 ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ TUNEL positive cell ในหนูทดลองที่ถูกผูกท่อไต 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังจากการผูกท่อไต *: $p < 0.001$, †: $p < 0.005$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยต่อ field ของ apoptotic cell nuclei \pm S.E.M (mean \pm S.E.M)

4.7 ระดับฮีมาโตคริตของหนูทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบระดับฮีมาโตคริตระหว่างหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาดสูง (5,000 ยูนิต/กก.) กับในกลุ่มควบคุม พบว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม มีระดับฮีมาโตคริตไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin มีระดับฮีมาโตคริตเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 หลังผูกท่อไตและเพิ่มขึ้นไปเรื่อยๆ (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 แสดงระดับฮีมาโตคริตระหว่างหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. และหนูทดลองกลุ่มควบคุม *: $p < 0.005$, †: $p < 0.001$, EPO 5,000: erythropoietin 5,000 ยูนิต/กก. กราฟเส้นแสดงค่าเฉลี่ยฮีมาโตคริต \pm S.E.M (mean Hct \pm S.E.M)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่า ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก.

1. มีประสิทธิภาพอย่างชัดเจนในการช่วยลด tubulointerstitial injury ได้เป็นอย่างดี เมื่อย้อมเนื้อไตด้วยสาร hematoxylin & eosin (H&E), periodic acid schiff (PAS) และ trichrome masson โดยประเมินจากค่า tubulointerstitial injury score ที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา erythropoietin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 19, 20)

2. มีผลลด α -smooth muscle actin (α -SMA) positive cell ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์ myofibroblast ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 21, 22)

3. มีประสิทธิภาพในการลด collagen ซึ่งเป็นสารสำคัญของ extracellular matrix องค์ประกอบสำคัญของ tubulointerstitial fibrosis ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 23, 24)

4. มีผลลดปริมาณ ED-1 positive cell ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 25, 26)

5. มีผลลดปริมาณ TUNEL positive celli cell ซึ่งเป็นตัวแทนของการเกิด apoptosis ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 27, 28)

6. ทำให้ระดับฮีมาโตคริตในหนูทดลองมีระดับสูงกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 29)

5.2 อภิปรายผล

เมื่อทำการผูกท่อไตจะมีการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตพลศาสตร์ของไต (renal hemodynamic) ในทันที โดยในช่วงแรกจะเกิดการหดตัวของ renal artery (renal vasoconstriction) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการอักเสบ อันประกอบด้วย การเข้ามาที่ไตของเซลล์ macrophage (macrophage infiltration) การขยายของท่อไต (tubular dilatation) นอกจากนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ apoptosis ซึ่งนำไปสู่การฝ่อของท่อไต (tubular atrophy) ในขณะเดียวกันเซลล์ myofibroblast จะสร้างสาร cytokines และ growth factor ซึ่งไปมีผลให้เกิดการสะสมของสาร extracellular matrix เพิ่มขึ้น จนเกิด tubulointerstitial fibrosis ในที่สุด ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการผูกท่อไตและตรวจสอบพยาธิสภาพที่ไตในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังจาก

ท่อไตพบว่าการเกิด tubulointerstitial injury เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา (รูปที่ 19, 20) โดยในวันที่ 3 หลังผูกท่อไตได้เริ่มมี tubular dilatation และ cellular infiltration เกิดขึ้นอย่างชัดเจน และเพียงในวันที่ 14 หลังผูกท่อไตพยาธิสภาพของ tubular dilatation/atrophy, cellular infiltration และ interstitial fibrosis มีความชัดเจนและเกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง (รูปที่ 19, 20) สิ่งนี้สอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้านี้ที่พบว่ารูปแบบการทดลองนี้เป็นรูปแบบการทดลองที่ช่วยเร่งการเกิด tubulointerstitial fibrosis ได้เป็นอย่างดี [79]

ยา erythropoietin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยมะเร็งและผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง นับว่าเป็นยาที่น่าสนใจในตัวหนึ่งที่มีการนำมาศึกษาเพื่อป้องกันและชะลอการดำเนินโรคในหลายๆอวัยวะ เช่น หัวใจ สมอง และไขสันหลัง เป็นต้น ในด้านของโรคไต การศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นในรูปแบบไตวายฉับพลัน เท่าที่ทราบในปัจจุบันการศึกษานี้ นับเป็นการศึกษาแรกที่นำยา erythropoietin มาใช้เพื่อลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis ในหนูที่ถูกผูกท่อไต โดยได้ทำการตรวจสอบทางพยาธิสภาพของไตอย่างละเอียดและทำการย้อมพิเศษเพิ่มเติมเพื่อศึกษาผลของยา erythropoietin ในการลดกระบวนการอักเสบ (anti-inflammation) ลดกระบวนการเกิด interstitial fibrosis และลดการเกิด tubular apoptosis ซึ่งเป็นสามกระบวนการสำคัญที่นำไปสู่การเกิด tubulointerstitial fibrosis ในที่สุด

เมื่อทำการเปรียบเทียบพยาธิสภาพของเนื้อไตในวันที่ 3, 7 และ 14 ภายหลังจากผูกท่อไตพบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. จะมี cellular infiltration, tubular dilatation/tubular atrophy และ interstitial fibrosis ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (รูปที่ 19, 20) เหตุผลที่ผู้วิจัยเลือกใช้ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดสอบใช้ยา erythropoietin ขนาดตั้งแต่ 100, 500, 1,000, 2,000 และ 5,000 ยูนิต/กก. และพบว่า มีเพียงยา erythropoietin ในขนาด 5,000 ยูนิต/กก. ที่สามารถลด tubulointersittial injury score เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(รูปที่ 18) ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า การที่จะเกิด renal tissue protective effect จากยา erythropoietin นั้นจำเป็นจะต้องใช้ขนาดยา erythropoietin ที่สูง อนึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้มีการนำยา erythropoietin ในขนาดสูงมาใช้และสามารถลดความรุนแรงของพยาธิสภาพไตวายได้แต่เป็นไตวายฉับพลันมิใช่ภาวะไตวายเรื้อรังดังในการศึกษาปัจจุบัน

การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Torralbo และคณะ [80] ทำการศึกษาในหนูที่ถูกตัดไต 2 ใน 3 ส่วนและได้รับยา erythropoietin ในขนาด 40 ยูนิต/กก. ต่อเนื่องเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มทดลองมีพยาธิสภาพที่ไตเร็วกว่าในกลุ่มควบคุม การศึกษารูปแบบเดียวกันโดย Lebel และคณะ [81] พบว่าหนูที่ได้ยา erythropoietin ในขนาด 100 ยูนิต/กก. ต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีพยาธิ

สภาพที่ไต เลวกว่าในกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน มีข้อสังเกตสูงเกตุว่าปริมาณยา erythropoietin ที่ใช้ใน 2 การศึกษาหลังซึ่งได้ผลในทางลบ มีปริมาณน้อยกว่าการศึกษาปัจจุบันประมาณ 50 ถึง 125 เท่า อย่างไรก็ตามการศึกษาโดย Bahlman และคณะ [57] ในการทดลองตัดไต 5/6 ส่วน (5/6 nephrectomy) พบว่า การใช้ low dose darbepoietin ซึ่งเป็นยา long acting erythropoietin สามารถลด tubulointerstitial injury score ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Lee และคณะ [82] ในรูปแบบการทดลองของ chronic cyclosporine nephropathy พบว่ายา erythropoietin ในขนาด 100 ยูนิต/กก.สามารถลด tubulointerstitial injury score ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน

ในการศึกษาปัจจุบันเมื่อทำการศึกษาต่อไปในรายละเอียดถึงสาเหตุที่หนูทดลองที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis ผู้วิจัยได้เลือกที่จะดูผลทางด้านลดการอักเสบของไต ด้านลดการเกิด tubular apoptosis และด้านการลด interstitial fibrosis ซึ่งเป็น 3 กลไกหลักที่นำไปสู่การเกิด tubulointerstitial fibrosis (รูปที่ 12)

ผลประการแรก ผลทางด้านลดการอักเสบ (anti-inflammation) โดยทั่วไปหนูที่ถูกผูกท่อไตจะมีการเพิ่มขึ้นของ ED-1 positive cell ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage หนึ่งใน inflammatory cell ที่สำคัญ โดยมี Ang II, osteopontin, monocyte chemoattractant-1 (MCP-1), selectin และ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) เป็นกลไกที่นำเซลล์ macrophage เข้าสู่เนื้อไตนั้น [77] เซลล์ macrophage ที่เข้ามาในเนื้อไตนี้จะหลั่งสาร cytokine หลายชนิดยกตัวอย่างเช่น TGF- β 1 ซึ่งจะไปมีผลกระตุ้น renal tubular epithelial cell ให้เกิดการตายชนิด apoptosis นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้น interstitial fibroblast ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ myofibroblast ซึ่งมีคุณสมบัติในการหดตัว (contractility) คล้ายเซลล์กล้ามเนื้อ และสามารถเพิ่มการสะสมของ extracellular matrix (ECM) นำไปสู่การเกิด interstitial fibrosis ในที่สุด (รูปที่ 25, 26) จึงเป็นที่ชัดเจนถึงบทบาทของเซลล์ macrophage ในการเป็นเซลล์หลักของกระบวนการอักเสบภายในไต หลังจากผูกท่อไต

ในการศึกษานี้พบว่า หนูทดลองที่ถูกผูกท่อไตมีการเพิ่มขึ้นของ ED-1 positive cell อย่างชัดเจน โดยจะเริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังผูกท่อไต และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป สูงสุดในวันที่ 14 หลังผูกท่อไต (รูปที่ 25, 26) ขณะที่พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. มีการลดลงของ ED-1 positive cell อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทุกช่วงเวลา การศึกษาก่อนหน้านี้ มาจากการศึกษาของ Lee และคณะ [82] ในรูปแบบการทดลองของ chronic cyclosporine nephropathy พบว่ายา erythropoietin ในขนาด 100 ยูนิต/กก.สามารถลดปริมาณ ED-1 positive cell ได้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์และต่อเนื่องไปจนถึง

สัปดาห์ที่ 4 โดยอาศัยกลไกที่ไปลดปริมาณของ CRP-positive cell และ mRNA ของ osteopontin ซึ่งเป็นสาร glycoprotein ที่มีคุณสมบัติเป็น chemotactic factor โดยการทำงานร่วมกับ CD44 ligand [83, 84] เพื่อดึง inflammatory cell เข้ามาในบริเวณที่เกิดการอักเสบขึ้น

ผลประการที่ 2 ผลทางด้าน การลดพังผืดในไต (anti-fibrosis) การศึกษานี้ได้เลือกที่จะใช้ เซลล์ myofibroblast และ collagen เป็นตัวแทน (marker) ของ interstitial fibrosis เซลล์ myofibroblast เป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก activated interstitial fibroblast โดยที่ activated interstitial fibroblast นั้นเปลี่ยนแปลงมาจาก resident interstitial fibroblast มากที่สุดคือร้อยละ 49 มาจาก bone marrow-derived cell (hematopoietic stem cell) ร้อยละ 15 และมาจากการ transformation ของ tubular epithelial cell อีกร้อยละ 36 (รูปที่ 13) ทำหน้าที่ในการสร้าง extracellular matrix ได้แก่ collagen type I, III และ IV โดยภาวะปกติบริเวณ renal cortex จะตรวจพบ myofibroblast ในปริมาณที่น้อยมาก ในการศึกษาพบว่า α -SMA positive cell (รูปที่ 21,22) ซึ่งเป็นตัวแทน (marker) ของเซลล์ myofibroblast มีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการผูกท่อไตที่ผ่านไป โดยสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการผูกท่อไต สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าหลังจากผูกท่อไต เพียง 2-3 ชม.สามารถตรวจพบ blood-derived macrophage ในบริเวณ renal cortex [85] ในขณะที่ collagen ซึ่งเป็นตัวแทนของสาร extracellular matrix ที่สำคัญ เริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 7 หลังการผูกท่อไต

ยา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. ไม่สามารถลด α -SMA positive cell (รูปที่ 21, 22) ซึ่งเป็นตัวแทน (marker) ของเซลล์ myofibroblast แต่สามารถลดปริมาณ collagen ซึ่งเป็นตัวแทนของสาร extracellular matrix ที่สำคัญได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 23, 24) เท่าที่ทราบ การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ได้แสดงการลดลงของ collagen จากการให้ยา erythropoietin

สำหรับกลไกที่ยา erythropoietin ลด collagen อาจเกิดผ่านทางการลดลงของ TGF- β 1 (รูปที่ 13) ซึ่ง Lee และคณะ⁸² ได้ให้ยา erythropoietin ขนาด 100 ยูนิต/กก. 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ในหนูที่ได้รับยา cyclosporine เพื่อทำให้เกิดภาวะ chronic cyclosporine nephropathy เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบการลดลงของ mRNA TGF- β 1 ในหนูที่ได้รับยา erythropoietin อย่างชัดเจน เป็นที่ทราบกันดีว่า TGF- β 1 เป็นสาร cytokine สำคัญในการกระตุ้นให้เกิด fibrosis โดยที่มี Ang II เป็นตัวกระตุ้นการสร้างที่สำคัญ พบว่าเมื่อทำการลด angiotensinogen gene ให้เหลือศูนย์ สามารถลดปริมาณ tubulointerstitial fibrosis ลดได้ถึงร้อยละ 50 [85] ในปัจจุบันเรายังไม่

ทราบว่าย erythropoietin มีผลอย่างไร และด้วยกลไกอย่างไรต่อ TGF- β 1 คงจะต้องรอการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ประการที่ 3 ผลของยา erythropoietin ในการลดการเกิด tubular apoptosis (antiapoptosis) ในการศึกษาที่พบ TUNEL positive cell ตัวแทนของ apoptotic cell ได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการผูกท่อไต และเพิ่มขึ้นตลอดการศึกษา สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า apoptosis เป็นกลไกที่สำคัญของการเกิด tubular atrophy [77] ในการศึกษาปัจจุบันยา erythropoietin ขนาดสูงสามารถลดการเกิด apoptosis ได้อย่างชัดเจนจากการที่ตรวจพบการลดลงของ TUNEL-positive cells (รูปที่ 27, 28) กลไกที่ erythropoietin ไปช่วยลด apoptosis นั้นอาจเกิดผ่านหลายๆกลไกเช่น การกระตุ้น Bcl-2 ซึ่งเป็น antiapoptotic molecule ผ่านทาง JAK2-STAT5 signalling, erythropoietin ยังไปมีผล กระตุ้น heat shock protein 70 (HSP 70) แล้วไปมีผลยับยั้งการทำงานของ apoptosis protease activating factor 1 (apaf-1) และ apoptosis-inducing factor (AIF) ซึ่งเป็นสาร proapoptotic molecules อีกด้วย นอกจากนี้แล้ว erythropoietin ยังไปมีผลยับยั้ง proapoptotic molecule ต่างๆได้แก่ Bad, caspase-9, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) และ Fas ligand [86] ทั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากลไกใดเป็นกลไกหลักในการป้องกันการเกิด apoptosis

การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Bahlman และคณะ [57] ในการทดลองตัดไต 5/6 ส่วน (5/6 nephrectomy) พบว่า การใช้ low dose darbepoietin ซึ่งเป็นยา long acting erythropoietin สามารถลดปริมาณ apoptosis จากการย้อมโดยวิธี TUNEL ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาศัยการกระตุ้นผ่านทาง akt phosphorylation pathway ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันเซลล์จากการขาดออกซิเจน ข้อสังเกตจากการทดลองดังกล่าวคือสามารถใช้ erythropoietin ชนิด long acting ในขนาดต่ำในการลดการเกิด apoptosis ได้ ซึ่งต่างจากการศึกษาปัจจุบันของผู้วิจัยที่ใช้ยา erythropoietin ชนิดมาตรฐาน (standard) ในขนาดสูง

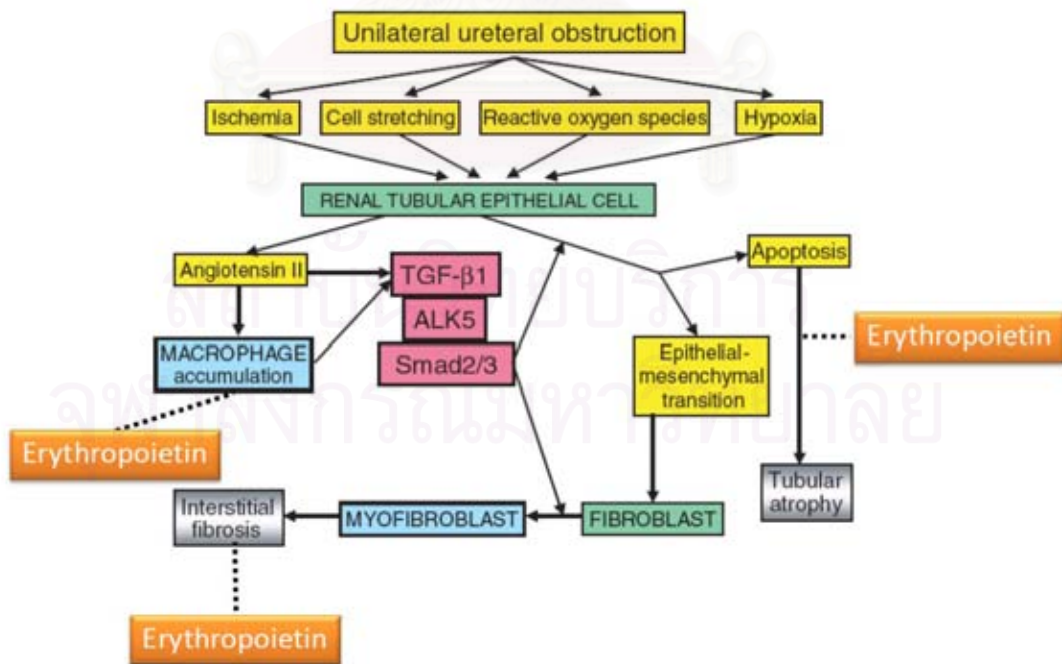
การศึกษาของ lee และคณะ [82] ในรูปแบบการทดลองของ chronic cyclosporine nephropathy พบว่าย erythropoietin ในขนาด 100 ยูนิต/กก. สามารถลดปริมาณ apoptosis จากการย้อมโดยวิธี TUNEL ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน โดยอาศัยการกระตุ้น Bcl-2 และยับยั้ง caspase-3

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ได้ใช้ยา erythropoietin ในขนาดที่สูงซึ่งย่อมไปมีผลเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดงในหนูทดลอง โดยเมื่อตรวจระดับฮีมาโตคริต พบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin ขนาดสูงจะมีระดับฮีมาโตคริตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยความแตกต่างจะเริ่มเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการผูกท่อไตหนู และยังคงเห็นความแตกต่างไปตลอดการศึกษา ระดับฮีมาโตคริตที่สูงนี้ย่อมส่งผลในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่เข้าไปเลี้ยงไต และน่าจะมิมีบทบาท

ในการช่วยป้องกันการเกิด tubulointerstitial damage ได้อีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามในทางกลับกัน เมื่อมีระดับฮีมาโตคริตที่สูงขึ้น ย่อมส่งผลให้มีความหนืดของเลือด (viscosity) ที่เพิ่มขึ้น และทำให้มีความดันโลหิตที่สูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลเสียต่อการทำงานของไตและอวัยวะอื่นตามมา [84] ดังเช่น การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Torralbo [80] และ Lebel [81] พบว่าหนูที่ได้รับการฉีด erythropoietin ต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีพยาธิสภาพที่ไต แย่กว่าในกลุ่มควบคุม โดยผู้วิจัยเชื่อว่าเป็นสาเหตุอันเนื่องมาจากความดันโลหิตที่เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของ urinary endothelin 1 (ET-1) แต่จากการศึกษาโดย Bellizzi และคณะ [87] ในรูปแบบ remnant kidney ไม่พบการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตเมื่อฉีด erythropoietin ในขนาด 100 ยูนิต/กก. 2 ครั้งต่อสัปดาห์

การศึกษานี้ไม่ได้วัดหน้าที่การทำงานของไต เช่น ค่า BUN ค่าครีอะตินีน การรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ เนื่องจากในรูปแบบการศึกษาผูกท่อไต 1 ข้างในหนูทดลองนั้น ยังมีไตอีกข้างที่ไม่ได้ถูกผูกท่อไตสามารถทำหน้าที่ทดแทนได้เป็นอย่างดี

โดยสรุปแล้วการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายา erythropoietin ขนาด 5,000 ยูนิต/กก. สามารถช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพในบริเวณ tubulointerstitial ของไต โดยผ่านการลดกระบวนการอักเสบ (anti-inflammation) ลดกระบวนการเกิดพังผืด (antifibrosis) และลดการเกิด tubular apoptosis ได้เป็นอย่างดี ได้สรุปบทบาทของยา erythropoietin ในการลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis จากการศึกษานี้ไว้ใน รูปที่ 30



รูปที่ 30 สรุปบทบาทของยา erythropoietin ในการลดการเกิด tubulointerstitial fibrosis
เส้นประแสดงถึงการยับยั้ง ลูกศรแสดงถึงการกระตุ้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

การนำไปใช้ในเชิงงานวิจัยในอนาคต (Implication for further research)

การศึกษานี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นไปสู่การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อค้นหากลไกหลักที่ erythropoietin ออกฤทธิ์ป้องกันและลดการเกิด tubulointerstitial damage ได้เนื่องจาก ยา erythropoietin มีกลไกการออกฤทธิ์มากมายนอกเหนือจากการกระตุ้นเซลล์ไขกระดูกให้สร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ที่เราเรียกกันว่า pleiotropic effect รวมไปถึงการค้นหาโครงสร้างของ erythropoietin receptor ว่ามีโครงสร้างเหมือนกับ erythropoietin receptor ของเซลล์ในไขกระดูกหรือไม่ เนื่องจากในปัจจุบันเรายังไม่ทราบว่าผลของ erythropoietin ในด้าน tissue protection นี้เกิดโดยผ่านความแตกต่างของโครงสร้าง erythropoietin receptor หรือเป็นเนื่องจากความแตกต่างของกระบวนการภายในเซลล์ นอกจากนี้การค้นหาขนาดยาที่เหมาะสมก็เป็นสิ่งที่ควรสืบค้นต่อไป เพื่อลดผลข้างเคียง ลดค่าใช้จ่ายและเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด (cost effectiveness) ต่อการรักษา

ในด้านผลข้างเคียงจากการใช้ยา erythropoietin ในขนาดสูง ไม่ว่าจะเป็นในด้านความหนืดของเลือดที่เพิ่มขึ้น หรือจะเป็นในเรื่องของความดันโลหิตที่สูงขึ้น ควรที่จะได้มีการทำวิจัยต่อไป เช่นเดียวกัน

การนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (Implication for clinical practice)

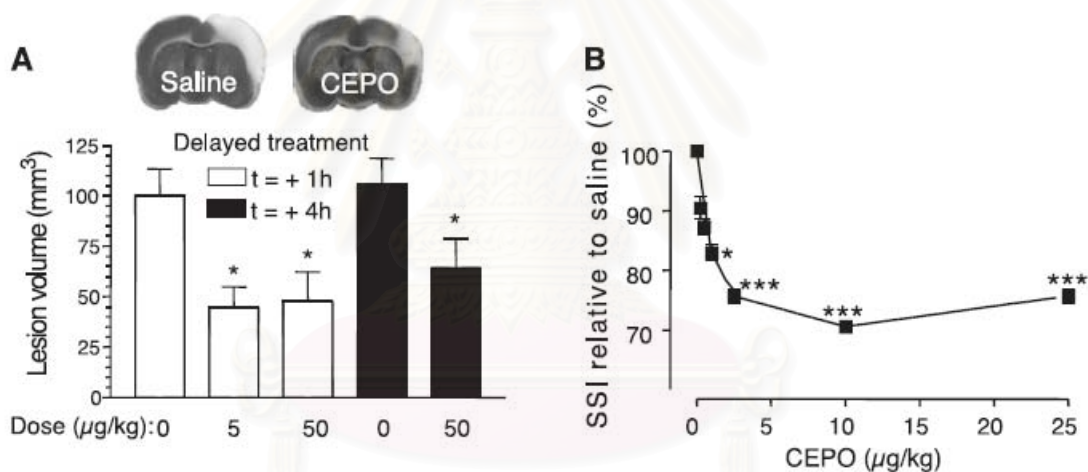
จากผลการศึกษาที่ได้กล่าวมา จะเห็นได้ว่าถ้าเรานำขนาดยา erythropoietin ที่ใช้ในการศึกษานี้ไปใช้ในคนที่มีน้ำหนักประมาณ 70 กก. จะต้องใช้ยาถึง 350,000 ยูนิต ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในทางปฏิบัติเนื่องจากอาจเกิดผลเสียบางอย่างตามมาเช่น ความหนืดของเลือดที่เพิ่มขึ้น ความดันโลหิตที่สูงขึ้น ดังนั้นการนำยา erythropoietin มาใช้ในอนาคตคงจะต้องมีการดัดแปลงโครงสร้างของยา erythropoietin เพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว

การเพิ่มระดับฮีมาโตคริตเป็นข้อจำกัดหนึ่งในการใช้ยา erythropoietin ในขนาดสูง ได้มีการคิดค้นวิธีการในการลดการเพิ่มระดับฮีมาโตคริตแต่ยังคงผลทางด้าน tissue protection ไว้ แบ่งได้เป็น 3 วิธี วิธีแรกได้แก่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ erythropoietin โดยวิธีการทางเคมี เช่นการใช้ปฏิกิริยา carbamylation เพื่อตัดกรดอะมิโน lysine ออกทำให้ carbamylated erythropoietin (CEPO) ที่เกิดขึ้นใหม่จะจับเฉพาะกับ erythropoietin receptor ที่มีผลทางด้าน tissue protection, Leist และคณะ [88] ได้นำ carbamylated erythropoietin มาศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีโรคทางระบบประสาท ได้แก่ โรคสมองขาดเลือด (focal brain ischemia), การกดทับเส้นประสาท sciatic nerve

การกดทับไขสันหลัง autoimmune encephalomyelitis และโรค diabetic neuropathy พบว่ายา CEPO สามารถเพิ่มการทำงานของเส้นประสาทได้อย่างชัดเจน และไม่มี的增加ของระดับฮีมาโตคริตแต่อย่างใดตลอดการศึกษา รูปที่ 31

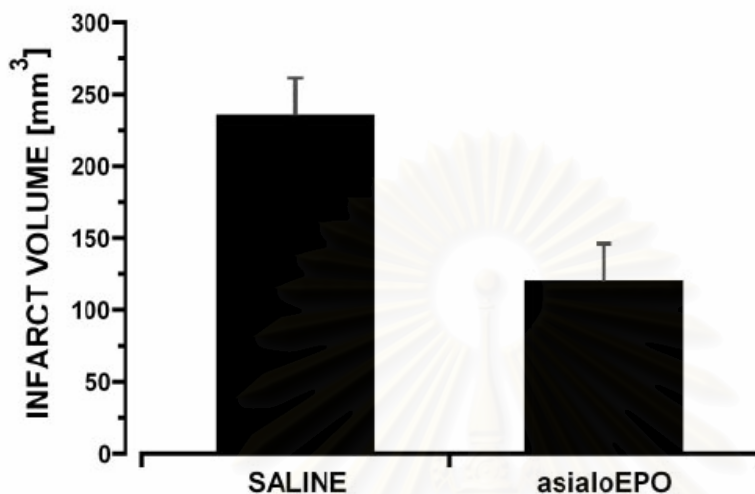
วิธีที่ 2 การตัด sialic acid ออกโดยการใช้อินไซม์ neuraminidase (ผลิตจากเชื้อ streptococcus) เกิดเป็น erythropoietin ชนิดใหม่ที่เรียกว่า asialoerythropoietin ที่มีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดที่สั้นกว่า erythropoietin อย่างมาก ทำให้ไม่เพิ่มระดับฮีมาโตคริตเช่นเดียวกัน

Erbayraktar และคณะ [89] ได้นำยา asialoerythropoietin มาศึกษาในรูปแบบเดียวกับ Leist และพบว่ายา asialoerythropoietin สามารถเพิ่มการทำงานของเส้นประสาทได้อย่างชัดเจน และไม่มี的增加ของระดับฮีมาโตคริตแต่อย่างใดตลอดการศึกษา รูปที่ 32



รูปที่ 31 แสดงผลในการป้องกันระบบประสาทของยา CEPO, A) เป็นการศึกษาในหนูทดลองที่สมองถูกทำให้ขาดเลือด จะเห็นได้ว่าหนูทดลองที่ได้รับยา CEPO มีบริเวณที่สมองขาดเลือดน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รูปภาพแสดงการย้อมเนื้อสมองด้วยสาร tetraphenyl tetrazolium chloride เพื่อประเมินบริเวณเนื้อสมองที่ขาดเลือด, B) แสดงการทำงานของเส้นประสาท sciatic ในหนูทดลองที่เส้นประสาท sciatic ถูกกดเป็นเวลา 1 นาที พบว่าในหนูที่ได้รับ CEPO มีการทำงานของเส้นประสาท sciatic ที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา SSI: The static sciatic index เป็นค่าแสดงการทำงานของเส้นประสาท sciatic [88]

วิธีที่ 3 การทำให้ erythropoietin gene เกิดการ mutation ไป ซึ่งยังไม่มีข้อมูลทางคลินิกในปัจจุบัน



รูปที่ 32 แสดงผลในการลดการตายของสมองจากการขาดเลือดโดยใช้ยา asialoerythropoietin ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [89]

จะเห็นได้ว่าข้อมูลของยา CEPO และ asialoerythropoietin เป็นการศึกษาระบบประสาทเป็นหลัก คงจะต้องรอการศึกษาทางไตเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต ที่กล่าวมาแล้วนั้นเป็นความพยายามที่จะลดผลข้างเคียงจากการเพิ่มขึ้นของระดับฮีมาโตคริต ผลข้างเคียงอื่นๆที่อาจเกิดขึ้นได้แก่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดเนื้องอก ซึ่งยา erythropoietin เป็นยาที่มีคุณสมบัติเป็น growth factor ตัวหนึ่ง แต่ยังไม่มีความชัดเจนทางด้านนี้ในปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Goodkin DA, Mapes DL, Held PJ. The dialysis outcomes and practice patterns study (DOPPS): how can we improve the care of hemodialysis patients? **Semin Dial** 2001;14(3):157-9.
- [2] Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry. **Clin Transpl** 2004;:1-16.
- [3] Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **Am J Physiol** 1981;241(1):F85-93.
- [4] Yoshida Y, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. **Kidney Int** 1989;35(2):654-60.
- [5] Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. **J Am Soc Nephrol** 1994;5(6):1273-87.
- [6] Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. **Am J Kidney Dis** 1992;20(1):1-17.
- [7] Churek HJ, Jost U, Baumgartl H, Bertram H, Heckmann U. Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. **Am J Physiol** 1990;259(6 Pt 2):F910-5.
- [8] Fine LG, Bandyopadhyay D, Norman JT. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. **Kidney Int** 2000;75:S22-6.
- [9] Eckardt KU, Rosenberger C, Jurgensen JS, Wiesener MS. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. **Blood Purif** 2003;21(3):253-7.
- [10] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. **J Am Soc Nephrol** 2002;13(3):806-16.
- [11] Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. **Kidney Blood Press Res** 1996;19(3-4):191-5.

- [12] Yenrudi S, Laohapaibul A, Kittidiwit W, Suteparuk S, Futrakul N. A correlation between renal morphology and renal circulation in pediatric nephrotic syndrome. **Ren Fail** 2001 ;23(1):85-90.
- [13] Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. **Am J Kidney Dis** 2001;37(3):601-11.
- [14] Futrakul N, Yenrudi S, Sensirivatana R, Watana D, Laohapaibul A, Watanapenphaibul K, et al. Peritubular capillary flow determines tubulointerstitial disease in idiopathic nephrotic syndrome. **Ren Fail** 2000;22(3):329-35.
- [15] Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. **J Am Soc Nephrol** 2001;12(7):1434-47.
- [16] Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, et al. A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. **Kidney Int** 2005;67(4):1428-39.
- [17] Yuan HT, Li XZ, Pitera JE, Long DA, Woolf AS. Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha. **Am J Pathol** 2003;163(6):2289-301.
- [18] Choi YJ, Chakraborty S, Nguyen V, Nguyen C, Kim BK, Shim SI, et al. Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. **Hum Pathol** 2000;31(12):1491-7.
- [19] Futrakul N, Tohsukhowong P, Patumraj S, Siriviriyakuk P, Tipprukmas N, Futrakul P. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. **Ren Fail** 2003;25(5):839-44.
- [20] Futrakul N, Vongthavarawat V, Sirisalipotch S, Chairatanarat T, Futrakul P, Suwanwalaikorn S. Tubular dysfunction and hemodynamic alteration in

- normoalbuminuric type 2 diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;32(1):59-65.
- [21] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, et al. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 2004 ;15(5):1277-88.
- [22] Adler S, Huang H. Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(7):1788-94.
- [23] Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(1):H22-8.
- [24] Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Haematocrit and the risk of developing end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(5):899-905.
- [25] Mohanram A, Zhang Z, Shahinfar S, Keane WF, Brenner BM, Toto RD. Anemia and end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *Kidney Int* 2004 ;66(3):1131-8.
- [26] Ries M, Basseau F, Tyndal B, Jones R, Deminiere C, Catargi B, et al. Renal diffusion and BOLD MRI in experimental diabetic nephropathy. Blood oxygen level-dependent. *J Magn Reson Imaging* 2003;17(1):104-13.
- [27] Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, et al. Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(6):1574-81.
- [28] Iseki K, Iseki C, Ikemiya Y, Fukiyama K. Risk of developing end-stage renal disease in a cohort of mass screening. *Kidney Int* 1996;49(3):800-5.
- [29] Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, et al. The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(13):877-84.
- [30] Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, Gaspari F, Benini R, Remuzzi G. Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term

- ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy. **Lancet** 1998;352(9136):1252-6.
- [31] Keane WF, Brenner BM, de Zeeuw D, Grunfeld JP, McGill J, Mitch WE, et al. RENAAL Study Investigators. The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. **Kidney Int** 2003 A;63(4):1499-507.
- [32] Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, et al. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney Int** 1998;54(3):864-76.
- [33] Abbate M, Zoja C, Rottoli D, Corna D, Tomasoni S, Remuzzi G. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. **Kidney Int** 2002;61(6):2066-77..
- [34] Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hase H, Kaneko T, et al. Urinary free fatty acids bound to albumin aggravate tubulointerstitial damage. **Kidney Int** 2002;62(5):1628-37.
- [35] Arici M, Chana R, Lewington A, Brown J, Brunskill NJ. Stimulation of proximal tubular cell apoptosis by albumin-bound fatty acids mediated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma. **J Am Soc Nephrol** 2003;14(1):17-27.
- [36] Nangaku M. Complement regulatory proteins: are they important in disease? **J Am Soc Nephrol** 2003;14(9):2411-3.
- [37] Zoja C, Morigi M, Remuzzi G. Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. **J Am Soc Nephrol** 2003;14 Suppl 1:S36-41.
- [38] Nangaku M, Pippin J, Couser WG. C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys. **J Am Soc Nephrol** 2002;13(4):928-36.
- [39] Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, Gaspari F, Benini R, Remuzzi G. Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in

- Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy. **Lancet** 1998 ;352(9136):1252-6.
- [40] Jafar TH, Schmid CH, Landa M, Giatras I, Toto R, Remuzzi G, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. **Ann Intern Med** 2001;135(2):73-87.
- [41] Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). **Arch Intern Med** 2002;162(12):1401-8.
- [42] National Kidney Foundation. Kidney Early Evaluation Program. **Am J Kidney Dis** 2005;45(2 Suppl 2):S1-135.
- [43] Norman JT, Stidwill R, Singer M, Fine LG. Angiotensin II blockade augments renal cortical microvascular pO₂ indicating a novel, potentially renoprotective action. **Nephron Physiol** 2003;94(2):39-46.
- [44] Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS. Renal oxygenation defects in the spontaneously hypertensive rat: role of AT₁ receptors. **Kidney Int** 2003;63(1):202-8.
- [45] Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. **J Am Soc Nephrol** 2001;12(7):1448-57.
- [46] Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998;95(14):7987-92.
- [47] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. **Science** 2001;292(5516):464-8.
- [48] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science** 2001 ;292(5516):468-72.

- [49] Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. **JAMA** 2005;293(1):90-5.
- [50] Rossert J, Fouqueray B, Boffa JJ. Anemia management and the delay of chronic renal failure progression. **J Am Soc Nephrol** 2003;14(7 Suppl 2):S173-7.
- [51] Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. **Nat Rev Neurosci** 2005;6(6):484-94.
- [52] Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. **Kidney Int** 2004 ;66(3):983-9.
- [53] Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Li C, Ring T, et al. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQP_s and sodium transporters in rat kidney. **Kidney Int** 2004 ;66(2):683-95.
- [54] Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. **Nephrol Dial Transplant** 2004;19(2):348-55.
- [55] Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **FASEB J** 2003;17(12):1754-5.
- [56] Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. **J Am Soc Nephrol** 2004 ;15(8):2115-24.
- [57] Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielewski R, Lindschau, et al. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. **Circulation** 2004;110(8):1006-12.
- [58] Park J, Gage BF, Vijayan A. Use of EPO in critically ill patients with acute renal failure requiring renal replacement therapy. **Am J Kidney Dis** 2005;46(5):791-8.

- [59] Roth D, Smith RD, Schulman G, Steinman TI, Hatch FE, Rudnick MR, et al. Effects of recombinant human erythropoietin on renal function in chronic renal failure predialysis patients. **Am J Kidney Dis** 1994 ;24(5):777-84.
- [60] Kuriyama S, Tomonari H, Yoshida H, Hashimoto T, Kawaguchi Y, Sakai O. Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure, especially in nondiabetic patients. **Nephron** 1997;77(2):176-85.
- [61] Jungers P, Choukroun G, Oualim Z, Robino C, Nguyen AT, Man NK. Beneficial influence of recombinant human erythropoietin therapy on the rate of progression of chronic renal failure in predialysis patients. **Nephrol Dial Transplant** 2001;16(2):307-12.
- [62] Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. **Kidney Int** 2004;66(2):753-60.
- [63] Rossert J, Levin A, Roger SD, Horl WH, Fouqueray B, Gassmann-Mayer C, Frei D, McClellan WM. Effect of early correction of anemia on the progression of CKD. **Am J Kidney Dis** 2006 ;47(5):738-50.
- [64] Klahr S, Morrissey JJ. The role of growth factors, cytokines, and vasoactive compounds in obstructive nephropathy. **Semin Nephrol** 1998;18(6):622-32.
- [65] Truong L, Yang G, Nguyen A. Improvement of the renal lesions in chronic obstructive by enalapril is associated with a decrease in tubular cell apoptosis. **J Am Soc nephrol** 1996; 7:3005A.
- [66] Sermetis G, Maizels M. TGF β - mRNA expression in the renal pelvis after experimental and clinical ureteropelvic junction obstruction. **J Urol** 1996;156:261-6. 17
- [67] Sensibar J, Sutkowsti D, Raffo A. Prevention of cell death induced by tumor necrosis alpha in LNCap cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). **Cancer Res** 1995;55:2431-7.
- [68] Diamond J. Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis. **Am J kidney Dis** 1995;26:133-40.

- [69] Diamond J, Ricardo S, Klahr S. Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **Semin Nephrol** 1998;18:544-602.
- [70] Chevalier R, Klahr S. Therapeutic approaches in obstructive uropathy. **Semin Nephrol** 1998;18:625-8
- [71] Ansong K, Smith A. Emergency management of obstructive uropathy. **Urol Clin North Am** 1983;10:161-173
- [72] Harrington K, Pandha H, Kelly S, Lambert H, Jackson J, Waxman J. Palliation of obstructive nephropathy due to malignancy. **Br J Urol** 1995;76:102-7
- [73] Lau M, Temperley D, Mehta S, Johnson R, Bernard R, Clarke N. Urinary tract obstruction and nephrostomy drainage in pelvic malignant disease. **Br J Urol** 1995;76:565-9
- [74] Morrison A, Benabe J. Prostaglandins in vascular tone in experimental obstructive nephropathy. **Kidney Int** 1981;19:786-90
- [75] McDougal W. Pharmacologic preservation of renal mass and function in obstructive uropathy. **J Urol** 1992;128:478-421.
- [76] Chevalier RL. Specific molecular targeting of renal injury in obstructive nephropathy. **Kidney Int** 2006;70(7):1200-1.
- [77] Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. **Nat Clin Pract Nephrol** 2006;2(3):157-68.
- [78] Fern RJ, Yesko CM, Thornhill BA, Kim HS, Smithies O, Chevalier RL. Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. **J Clin Invest** 1999;103(1):39-46.
- [79] Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. **Kidney Int** 2005;68(3):925-37.
- [80] Torralbo A, Blanco J, Fontanellas A, Herrero JA, Cruceyra A, Gonzalez-Lopez P, et al. Long-term erythropoietin in rats with reduced renal mass. **Nephron** 1996;73(2):280-5.
- [81] Lebel M, Rodrigue ME, Agharazii M, Lariviere R. Antihypertensive and Renal Protective Effects of Renin-Angiotensin System Blockade in Uremic Rats Treated With Erythropoietin. **Am J Hypertens** 2006;19(12):1286-1292.

- [82] Lee SH, Li C, Lim SW, Ahn KO, Choi BS, Kim YS, et al. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. **Am J Nephrol** 2005;25(1):64-76.
- [83] Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM, et al. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. **Kidney Int** 1994;45(2):515-24.
- [84] Li C, Yang CW, Park CW, Ahn HJ, Kim WY, Yoon KH, et al. Long-term treatment with ramipril attenuates renal osteopontin expression in diabetic rats. **Kidney Int** 2003 ;63(2):454-63.
- [85] Klahr S. Obstructive nephropathy. **Kidney Int** 1998;54(1):286-300.
- [86] Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. **Nephrol Dial Transplant** 2005;20(6):1025-8.
- [87] Bellizzi V, Sabbatini M, Fuiano G, Sansone G, Magri P, Uccello F, et al. The impact of early normalization of haematocrit by erythropoietin on renal damage in the remnant kidney model. **Nephrol Dial Transplant** 1998;13(9):2210-5
- [88] Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. **Science** 2004;305(5681):239-42.
- [89] Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003;100(11):6741-6.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	TI injury score	α -SMA score	Collagen score	ED-1 positive cell score	TUNEL positive score	Hematocrit (เปอร์เซ็นต์)
1. หนูทดลองกลุ่มควบคุม						
1.1 วันที่ 3						
- หนูทดลองตัวที่ 1	2.30	2.70	0.10	19.20	1.20	48.00
- หนูทดลองตัวที่ 2	2.53	3.10	0.10	23.00	1.35	48.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	2.53	2.50	0.10	24.00	1.25	44.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	3.33	3.70	0.10	25.00	1.00	44.00
1.2 วันที่ 7						
- หนูทดลองตัวที่ 1	3.66	4.80	2.70	45.00	1.30	42.50
- หนูทดลองตัวที่ 2	4.00	2.60	2.95	35.00	1.50	45.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	2.80	4.60	2.55	39.00	1.70	42.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	3.66	4.80	2.10	51.00	1.90	43.00
1.3 วันที่ 14						
- หนูทดลองตัวที่ 1	4.76	4.70	4.00	217.10	4.95	45.00
- หนูทดลองตัวที่ 2	4.13	4.80	4.20	245.00	4.00	43.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	3.16	3.80	3.70	253.00	3.85	37.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	3.19	3.95	3.80	200.00	4.75	38.00

	TI injury score	α -SMA score	Collagen score	ED-1 positive cell score	TUNEL positive score	Hematocrit (เปอร์เซ็นต์)
2.หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา erythropoietin						
1.1 วันที่ 3						
- หนูทดลองตัวที่ 1	2.03	3.10	0.10	8.30	0.30	57.00
- หนูทดลองตัวที่ 2	1.40	2.40	0.10	6.20	0.35	56.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	1.40	2.70	0.30	10.30	0.55	56.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	1.26	3.00	0.10	11.00	0.40	56.00
1.2 วันที่ 7						
- หนูทดลองตัวที่ 1	2.03	4.40	2.50	9.20	0.45	56.00
- หนูทดลองตัวที่ 2	2.46	4.70	2.30	21.00	0.70	59.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	2.70	4.20	2.70	26.00	0.50	59.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	2.93	4.50	2.00	25.00	0.75	60.00
1.3 วันที่ 14						
- หนูทดลองตัวที่ 1	2.53	4.80	3.00	23.30	2.10	66.00
- หนูทดลองตัวที่ 2	3.00	4.70	3.30	35.00	2.50	64.00
- หนูทดลองตัวที่ 3	2.70	3.40	3.30	39.00	1.90	65.00
- หนูทดลองตัวที่ 4	2.60	4.00	3.10	45.00	2.30	65.00

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นาย ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์
 วัน เดือน ปีเกิด 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2518
 ภูมิลำเนา กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

- ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนเซนต์คาเบรียล (พ.ศ.2525-2534)
- ชั้นมัธยมศึกษา โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา (พ.ศ.2534-2536)
- แพทย์ศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2536-2542)
- วุฒิบัณฑิตสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2545-2548)
- กำลังศึกษา อายุรศาสตร์ต่อยอดสาขาวิชาโรคไต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2548 - ปัจจุบัน)

ประวัติการปฏิบัติงาน

- แพทย์ใช้ทุนประจำโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ.นครสวรรค์ พ.ศ. 2542-2545

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย