

การศึกษาดัชนีวัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต
ที่ได้รับสูตรยาที่มี Sirolimus



นางสาวณัฐพัชร นามจัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY OF CARDIOVASCULAR RISK MARKERS IN RENAL TRANSPLANT
RECIPIENTS RECEIVING SIROLIMUS-BASED REGIMEN



Miss Nuttaphat Namjud

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วย
ปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี Sirolimus

โดย

นางสาวณัฐพัชร นามจัด

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์แพทย์หญิงดร. ปาจริย์ ลิลิตการตกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
(รองศาสตราจารย์ดร. พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. วชิร ลิมปนสิทธิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์แพทย์หญิงดร. ปาจริย์ ลิลิตการตกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิงดร. รัตยา ลือชาพุมิพร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. อรพิน วงศ์สวัสดิ์กุล)

ณัฐพัชร นามจัด : การศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี Sirolimus. (A STUDY OF CARDIOVASCULAR RISK MARKERS IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS RECEIVING SIROLIMUS-BASED REGIMEN) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สุพีชา วิชาเลิศปัญญา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. พญ. ดร. ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล 85 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus จำนวน 21 คน เปรียบเทียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาในกลุ่ม calcineurin inhibitor based regimen (CNI) จำนวน 21 คน ตรวจวัดระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือด 4 พารามิเตอร์หลัก ได้แก่ asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitric oxide, homocysteine และ total antioxidant capacity ในพลาสมา พบว่าระดับความเข้มข้น ADMA ในผู้ป่วยกลุ่ม CNI และ sirolimus มีค่า $0.60 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ และ $0.52 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระดับความเข้มข้น nitric oxide ในกลุ่มผู้ป่วย CNI และ sirolimus มีค่า $138.68 \pm 28.91 \mu\text{mol/L}$ และ $82.01 \pm 9.46 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระดับความเข้มข้น homocysteine ในกลุ่มผู้ป่วย CNI และ sirolimus มีค่า $14.34 \pm 0.87 \mu\text{mol/L}$ และ $17.33 \pm 1.65 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และระดับ total antioxidant capacity ในกลุ่มผู้ป่วย CNI และ sirolimus มีค่า $1072.40 \pm 51.67 \mu\text{mol/L}$ และ $1000.51 \pm 65.15 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่รับยา CNI มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยา sirolimus จากการตรวจวัดระดับ ADMA จึงเป็นไปได้ว่า sirolimus น่าจะมีผลในการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....
ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5187161220 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE/ HOMOCYSTEINE/ NITRIC OXIDE/
TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY/ SIROLIMUS/ RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

NUTTAPHAT NAMJUD: A STUDY OF CARDIOVASCULAR RISK MARKERS IN
RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS RECEIVING SIROLIMUS-BASED
REGIMEN. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF SUPEECHA
WITTAYALERTPAN, THESIS CO-ADVISOR: LECTURER DR. PAJAREE
LILITKARNTAKUL, 85 pp.

The aim of this study was to investigate cardiovascular risk markers in renal transplant recipients receiving sirolimus-based regimen (n=21) compared to calcineurin inhibitor based regimen (CNI) based (n=21). Cardiovascular risk markers including asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitric oxide, homocysteine and total antioxidant capacity were measured in plasma. Plasma ADMA concentrations for CNI-based and sirolimus-based regimen were $0.60 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ and $0.52 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, respectively ($P < 0.05$). Plasma concentrations of nitric oxide for CNI-based and sirolimus-based patients were $138.68 \pm 28.91 \mu\text{mol/L}$ and $82.01 \pm 9.46 \mu\text{mol/L}$, respectively. A level of homocysteine in CNI-based and sirolimus-based groups were $14.34 \pm 0.87 \mu\text{mol/L}$ and $17.33 \pm 1.65 \mu\text{mol/L}$ and a level of total antioxidant capacity were $1072.40 \pm 51.67 \mu\text{mol/L}$ and $1000.51 \pm 65.15 \mu\text{mol/L}$. These results suggested the higher cardiovascular disease risk in CNI-based than in sirolimus patients as shown by increased ADMA levels and may support the role of sirolimus-based regimen in reducing the cardiovascular disease risk in this group of patients.

Field of Study : Pharmacology.....

Academic Year : 2010.....

Student's Signature Nuttaphat Namjud

Advisor's Signature Supecha Wittayalertpan

Co-Advisor's Signature Pajaree Lilitkarntakul

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ ลีลิตการตกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่เมตตาให้ความรู้ อบรม ตักเตือน ช่วยชี้แนะแนวทาง คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนแนวทางการแก้ไขปัญหาในวิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นอย่างดี และซาบซึ้งพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณคุณวันดี เข้มศรี ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษา ตลอดจนแนะแนวทางในการปฏิบัติงานในงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ทุกแผนก และทุกภาคส่วนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และ Chula pharmacokinetic center ที่เอื้อเฟื้อ และสละเวลามาช่วยเก็บตัวอย่างเลือด และดูแลให้ความช่วยเหลือตลอดเวลาในการศึกษางานวิจัย

ท้ายที่สุด ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ช่วยเป็นกำลังใจ ช่วยผลักดันให้ก้าวต่อไปอย่างเข้มแข็ง ไม่ย่อท้อ และหวังใยเสมอมา ตลอดจนสนับสนุนเงินทุนการศึกษา ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญภาพ..... | ญ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... | ฎ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| สมมติฐานการวิจัย..... | 3 |
| คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... | 3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 3. วิธีดำเนินการวิจัย..... | 27 |
| ขนาดตัวอย่าง..... | 27 |
| รูปแบบการวิจัย..... | 29 |
| เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... | 30 |
| 4. ผลการทดลอง..... | 42 |
| 5. สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง..... | 52 |
| สรุปผลการวิจัย..... | 57 |
| รายการอ้างอิง..... | 58 |
| ภาคผนวก..... | 65 |
| ภาคผนวก ก..... | 66 |
| ภาคผนวก ข..... | 68 |

| บทที่ | หน้า |
|---------------------------------|------|
| ภาคผนวก ค..... | 71 |
| ภาคผนวก ง..... | 73 |
| ภาคผนวก จ..... | 74 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 85 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1. | ความเข้มข้นที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานของ nitrate..... | 36 |
| 2. | สารละลายความเข้มข้นมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 40 |
| 3. | แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus..... | 42 |
| 4. | แสดงระดับความเข้มข้นของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus..... | 43 |
| 5. | ระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีความดันโลหิตสูง..... | 48 |
| 6. | ระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคเบาหวาน..... | 48 |
| 7. | ระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคหัวใจขาดเลือด..... | 48 |
| 8. | ระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคไขมันในเลือดสูง..... | 49 |
| 9. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ arginine ในสารละลายในวันเดียวกัน..... | 79 |
| 10. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ADMA ในสารละลายในวันเดียวกัน..... | 79 |
| 11. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ SDMA ในสารละลายในวันเดียวกัน..... | 80 |
| 12. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ arginine ในสารละลายในต่างวัน. | 80 |
| 13. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ADMA ในสารละลายในต่างวัน.... | 81 |
| 14. | ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ SDMA ในสารละลายในต่างวัน.... | 81 |

สารบัญญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 1. การปลูกถ่ายไต..... | 4 |
| 2. ลักษณะการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ..... | 5 |
| 3. การเกิด graft rejection ของหนู chronic rejection | 7 |
| 4. แสดงให้เห็นการยอมรับและการไม่ยอมรับในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อของหนูคนละสายพันธุ์ A และ B | 8 |
| 5. โครงสร้างของ cyclosporine..... | 10 |
| 6. กลไกการออกฤทธิ์ของยา cyclosporine หรือ tacrolimus..... | 11 |
| 7. ภาพแสดงโครงสร้างของ sirolimus | 14 |
| 8. Sirolimus: mechanism of action | 15 |
| 9. โครงสร้างโมเลกุลของ L-arginine และผลิตภัณฑ์ของ methylarginines | 18 |
| 10. บทบาทของ ADMA ซึ่งส่งผลให้ให้เกิดโรคทางพยาธิสภาพต่างๆ | 19 |
| 11. เมแทบอลิซึมของ methylarginines | 20 |
| 12. กลไกการทำงานของเอนไซม์ DDAH ในควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ | 21 |
| 13. การเพิ่มขึ้นของระดับ ADMA ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด... | 22 |
| 14. กระบวนการทางชีวเคมีของ homocysteine | 23 |
| 15. กลไกการเกิด endothelial dysfunction | 24 |
| 16. Homocysteine และ oxidative stress | 26 |
| 17. คอลัมน์ SPE ขนาด 1 มิลลิเมตร | 33 |
| 18. คุณสมบัติทางเคมีของปฏิกิริยา Griess Reagents..... | 35 |
| 19. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay..... | 39 |
| 20. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ arginine ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 43 |
| 21. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ ADMA ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 44 |
| 22. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ SDMA ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 44 |

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 23. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ nitric oxide (NOx) ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 45 |
| 24. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 45 |
| 25. กราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ total antioxidant capacity ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus..... | 46 |
| 26. ระดับ ADMA ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ..... | 49 |
| 27. ระดับ nitric oxide ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ..... | 50 |
| 28. ระดับ homocysteine ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ..... | 50 |
| 29. ระดับ total antioxidant capacity ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ..... | 51 |
| 30. สารละลายที่ไร้สารตัวอย่าง (Blank solution)..... | 74 |
| 31. สารละลายที่มี arginine, ADMA, SDMA และ MMA..... | 75 |
| 32. กราฟมาตรฐานของ arginine ในสารละลาย..... | 76 |
| 33. กราฟมาตรฐานของ ADMA ในสารละลาย..... | 77 |
| 34. กราฟมาตรฐานของ SDMA ในสารละลาย..... | 77 |
| 35. กราฟมาตรฐานของ nitric oxide..... | 83 |
| 36. กราฟมาตรฐานของ total antioxidant capacity..... | 84 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|-----------------------------|---|--|
| ADMA | = | asymmetric dimethylarginine |
| CNI | = | calcineurin inhibitor |
| CSA | = | cyclosporine (cyclosporin A) |
| CYP3A4 | = | cytochrome P450 3A4 |
| DDAH | = | dimethylarginine dimethylaminohydrolase |
| DGF | = | delayed graft function |
| EDRF | = | endothelium-derived relaxing factor |
| FKBP | = | FK binding protein |
| HLA | = | human leukocyte antigen |
| IL | = | Interleukin |
| L-NMMA | = | N ^G -monomethyl L-arginine |
| MHC | = | major histocompatibility complex |
| MMA | = | N ^G -Methyl-L-arginine acetate salt |
| mTOR | = | mammalian target of rapamycin |
| NF-ATc | = | nuclear factor of activated T cells |
| NO | = | nitric oxide |
| NOS | = | nitric oxide synthase |
| NOx | = | total nitric oxide (nitrate + nitrite) |
| O ₂ ⁻ | = | superoxide |
| PRMT | = | arginine methyltransferase |
| SAM | = | S-adenosylmethionine |
| SDMA | = | symmetric dimethylarginine |
| SRL | = | sirolimus |
| TAC | = | total antioxidant capacity |
| TGF-β | = | transforming growth factor β |

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การปลูกถ่ายไต หรือ การผ่าตัดเปลี่ยนไตเป็นการรักษาผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้าย (end stage renal disease) ซึ่งผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตนั้น จำเป็นต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันและรักษาการเกิดภาวะไม่ยอมรับอวัยวะที่ปลูกถ่าย (graft rejection) ที่เกิดจากอวัยวะของผู้ให้ (donor) และผู้รับ (recipients) นั้นมีเยื่อที่ต่างกัน กระตุ้นทำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบ cell mediated immune response อันเป็นอันตรายต่ออวัยวะที่ผู้ป่วยได้รับ ผู้ป่วยต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันก่อนและหลังการปลูกถ่ายไต ซึ่งสามารถรักษา graft rejection ได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีการสูญเสียกราฟท์ (graft loss) และเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดการเสียชีวิต สาเหตุหลักที่สำคัญในการทำให้เสียชีวิตได้แก่ การเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด (cardiovascular disease) มากถึงร้อยละ 55 [1] และเป็นปัญหาที่สำคัญในการดูแลผู้ป่วยปลูกถ่ายไต ตั้งแต่อดีตการใช้ยากดภูมิคุ้มกันในกลุ่ม calcineurin inhibitor (CNI) เช่น cyclosporine และ tacrolimus สามารถลดอุบัติการณ์การเกิด graft rejection ได้ดี แต่ก็พบว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตกลับมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นหลังจากผู้ป่วยได้รับยาทั้งสองตัวนี้ [2, 3] โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีผลข้างเคียงต่อเนื่องจากการเป็นพิษต่อไต (nephrotoxicity) ในระยะยาว [4] โดยกลไกสำคัญหนึ่งคือ การเกิดความดันโลหิตสูง โดยมีกลไกได้หลายทาง ดังเช่น 1) ภาวะไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ออกฤทธิ์ได้ลดลง เนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงทำให้กลไกการควบคุมความตึงของหลอดเลือดผิดปกติและความสามารถในการยืดหยุ่นของหลอดเลือดแดง (arterial elasticity) ลดลง [5] 2) การที่มีปริมาณ asymmetric dimethylarginine (ADMA) เพิ่มขึ้น มีผลยับยั้งเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ของเซลล์เอนโดทีเลียม ทำให้ไม่สามารถสร้าง nitric oxide ได้ 3) ภาวะระบบประสาทซิมพาเทติกทำงานมากขึ้นจากการที่หลอดเลือดเพิ่มความไวของการตอบสนองต่อสารสื่อประสาทซิมพาเทติก และ 4) มีการรายงานว่ายาน cyclosporine ไปกระตุ้นให้มีการสร้าง angiotensinogen ส่งผลให้ระบบ renin-angiotensin ทำงานมากขึ้น [6] นอกจากนี้ยาทั้งสองตัวนี้ยังออกฤทธิ์กระตุ้น transforming growth factor- β ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดความดันโลหิตสูงขึ้นด้วย [7] และการที่มีผลต่อหลอดเลือดทำให้ไม่สามารถหลีกเลี่ยงพยาธิสภาพ proliferative arteriopathy ซึ่งมีผลต่อเซลล์

บุผนังหลอดเลือดแดงอย่างมาก [8] จนกระทั่งมีการค้นพบยากดภูมิคุ้มกันในกลุ่ม mTOR inhibitor เช่น sirolimus ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง mammalian target of rapamycin (mTOR) ซึ่งเป็น regulatory kinase ที่สำคัญในการควบคุมกลไกในวัฏจักรของเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม mTOR คือ ยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดหลัง signal III ในกระบวนการรับรู้ความจำของเซลล์ใน T-cell activation ทำให้เกิดการยับยั้ง cytokine dependent proliferation [9] ในการศึกษาทางคลินิกพบว่ายา sirolimus สามารถลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ [10] sirolimus มีความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดง, migration และการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ [11] มีการศึกษาในลิง cynomolgus ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนหลอดเลือดแดงหัวใจเอออร์ตาในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันแต่แตกต่างกันพันธุกรรม พบว่ายา sirolimus สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดภาวะเสื่อมของหลอดเลือด [12] ซึ่งพบได้มากในยากดภูมิคุ้มกันกลุ่ม CNI [13] ผลของยา sirolimus ต่อความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต พบว่า sirolimus สามารถป้องกันความผิดปกติของเยื่อบุผิวหลอดเลือดแดงภายในร่างกาย ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้มีความดันเลือดช่วงหัวใจบีบตัวลดลง [14]

ตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดเป็นดัชนีที่ช่วยทำนายได้ว่าผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงหรือแนวโน้มที่จะนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดมากน้อยเท่าใด โดยตัวชี้วัดที่น่าสนใจและยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยในปัจจุบัน คือ asymmetric dimethylarginine (ADMA)

ADMA เป็นสารตัวกลางที่สามารถบ่งบอกความผิดปกติของการปฏิบัติหน้าที่ในเซลล์เยื่อบุผิว และยังเป็นตัวชี้วัดของโรคหลอดเลือด (vascular disease) [15] ADMA เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง และ ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เพราะมีการยับยั้ง nitric oxide (NO) ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งที่สร้างมาจากเซลล์เยื่อบุผิวหลอดเลือด มีคุณสมบัติขยายหลอดเลือด และมีบทบาทในการป้องกันการเกิดโรคของหลอดเลือด ส่งผลให้ NO ลดลงทำให้หลอดเลือดขาดความยืดหยุ่น เพราะความตึงตัวของหลอดเลือดส่งผลให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นโรคหัวใจหลอดเลือดได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังมีตัวชี้วัดที่สัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) นั่นคือ homocysteine [16] มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการทำ haemodialysis จะมีการสะสมของ homocysteine เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าปกติ [17] การเพิ่มขึ้นของ homocysteine ส่งผลให้เกิดภาวะ homocysteinemia [18] และมีผลต่อเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดโดย homocysteine ไปกระตุ้น superoxide (O_2^-) ซึ่งเป็น free radical เพิ่มขึ้น และยับยั้ง superoxide dismutase และ

glutathione peroxidase ซึ่งเป็น antioxidant ส่งผลทำให้เซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือดเสื่อมจากการเกิด oxidative stress [19]

ผู้วิจัยมีแนวความคิดที่จะศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยา CNI-based regimen เปรียบเทียบกับยา sirolimus-based regimen ผลการศึกษาอาจเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในการเลือกยากดภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม เพื่อป้องกันความเสี่ยงจากโรคหัวใจหลอดเลือดที่เกิดจากยากดภูมิคุ้มกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาระดับของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดได้แก่ ADMA, NO, homocysteine และ total antioxidant capacity ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus เปรียบเทียบกับกลุ่มยาที่ได้รับ CNI

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus มีระดับของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดได้แก่ ADMA, NO, homocysteine และ total antioxidant capacity แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition)

- CNI-based regimen คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา cyclosporine หรือ tacrolimus ร่วมกับ azathioprine หรือ mycophenolate mofetil และ prednisolone
- Sirolimus-based regimen คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา sirolimus ร่วมกับยา cyclosporine ในขนาดต่ำมาก และ prednisolone

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน sirolimus จะมีตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยา CNI โดยกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา sirolimus จะมีระดับตัวชี้วัดลดลง ก็จะสนับสนุนได้ว่าผู้ป่วยน่าจะมีความเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดน้อยลง

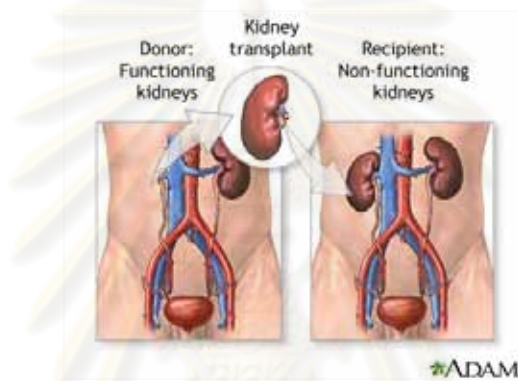
ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยากดภูมิคุ้มกันในการรักษาผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจหลอดเลือดเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures)

การปลูกถ่ายไต (Renal transplantation) [20]

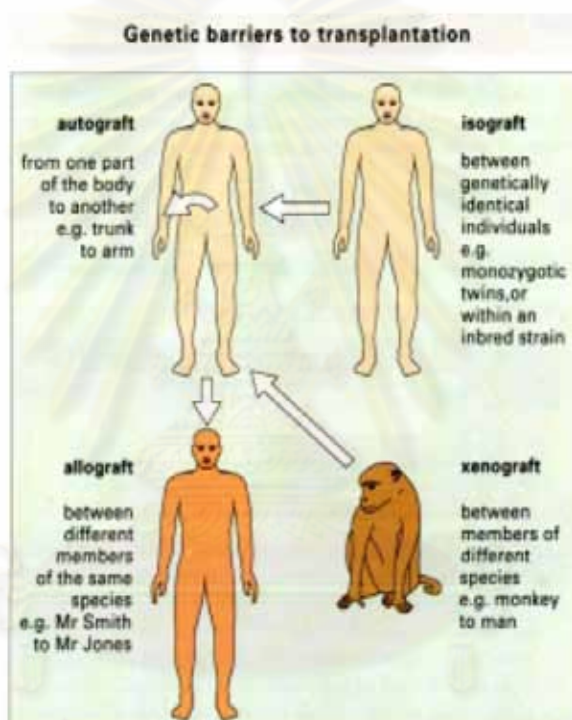


ภาพที่ 1 การปลูกถ่ายไต

การปลูกถ่ายไต (ภาพที่ 1) เป็นการปลูกถ่ายอวัยวะที่ได้รับการยอมรับและกระทำกันอย่างแพร่หลาย เพื่อทดแทนการทำงานของไตในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal diseases) แต่หลังจากการปลูกถ่ายไต ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตจำเป็นที่จะต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเกิดปัญหาการต่อต้านอวัยวะที่ปลูกถ่าย (graft rejection) อันเป็นขบวนการปกติที่ร่างกายใช้กำจัดหรือต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่แฝงเข้ามา เรียกอวัยวะที่นำมาทำการปลูกถ่ายว่า graft สามารถจำแนก graft ตามความสัมพันธ์ระหว่างผู้ให้ (donor) และผู้รับ (recipient) ออกได้ 4 ประเภท [21] (ภาพที่ 2)

- 1) Autograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นคนคนเดียวกัน เช่น การปลูกถ่ายผิวหนังบริเวณปกติไปยังบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ
- 2) Syngraft (isograft) หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นคนละคนกัน แต่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ จึงไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้าน graft เช่นเดียวกับ autograft ได้แก่ การปลูกถ่ายอวัยวะจากพี่น้องฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน

- 3) Allograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นสัตว์สายพันธุ์เดียวกัน แต่มีลักษณะพันธุกรรมแตกต่างกัน ยิ่งต่างกันเท่าไร โอกาสที่จะเกิดการปฏิเสธ graft ยิ่งเพิ่มมากขึ้น เป็น graft ที่ทำการปลูกถ่ายมากที่สุดในปัจจุบัน
- 4) Xenograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นสัตว์คนละสายพันธุ์กัน กำลังมีการศึกษา xenograft transplantation มากขึ้นในปัจจุบัน แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ในบทความนี้จะใช้ graft แทนคำว่า allograft เนื่องจาก autograft และ syngraft จะไม่เกิดปฏิกิริยา graft rejection และยังไม่สามารถทำ xenograft transplantation ในคน



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ [22]

การต่อต้านอวัยวะที่ปลูกถ่าย

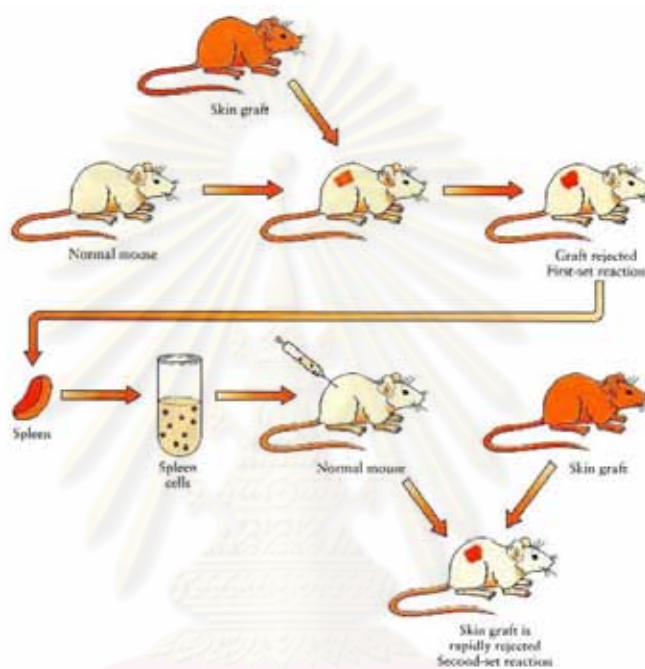
การต่อต้านอวัยวะที่ปลูกถ่าย (graft rejection) เกิดขึ้นได้จากการที่ผู้รับมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนบนเนื้อเยื่อของอวัยวะที่นำมาปลูกถ่าย ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตแบ่ง Graft rejection โดยอาศัยระยะเวลาในการต่อต้าน graft ออกเป็น 3 ชนิด คือ [23]

- 1) *Hyperacute graft rejection* หมายถึง การต่อต้าน graft ที่เกิดขึ้นทันทีภายในระยะเวลาอันสั้นเพียง 10-15 นาทีภายหลังจากการปลูกถ่ายไต กลไกเกิดจากปฏิกิริยาแอนติบอดีต่อสิ่งแปลกปลอมที่เคยรู้จัก (preformed antibodies) โดย preformed antibodies นี้จะทำปฏิกิริยากับ HLA class I และหมู่เลือด ABO ของผู้บริจาคบนเยื่อบุผนังหลอดเลือด ส่งผลให้

เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complement) การอุดตันและการทำลายหลอดเลือดอย่างมาก นำมาซึ่งการสูญเสียการทำงานของไตใหม่ในระยะเวลาอันสั้นจากการขาดเลือด มักพบในผู้ป่วยที่เคยผ่านการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ การตั้งครอรัหรือการได้รับเลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือด ก่อนหน้าทำการปลูกถ่ายอวัยวะ สามารถป้องกันภาวะ hyperacute graft rejection ได้โดยการตรวจสอบ preformed antibodies ต่อ graft ด้วยวิธี cross match ระหว่างซีรัมของผู้ให้กับ T-lymphocyte ของผู้รับ หากพบปฏิกิริยาต่อกัน ก็ควรเปลี่ยนผู้ให้หรือผู้รับ พบปฏิกิริยานิดนี้น้อยมากในปัจจุบัน Cerilli และคณะ ได้รายงานในปี 1985 [24] พบว่าเกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันตรงบริเวณ vascular endothelium เป็นผลให้มีการตรึงคอมพลีเมนต์ แล้วกระตุ้นให้เกิด clotting pathway ในเวลาต่อมา กรณีที่เกิดปฏิกิริยารุนแรงพอจะมีผลทำให้เกิด microthrombi อุดหลอดเลือดขนาดเล็กของ glomeruli ได้แก่ส่วน capillary และ arteriole จึงเกิดการตายของกราฟท์เนื่องจากขาดเลือดมาเลี้ยง [21]

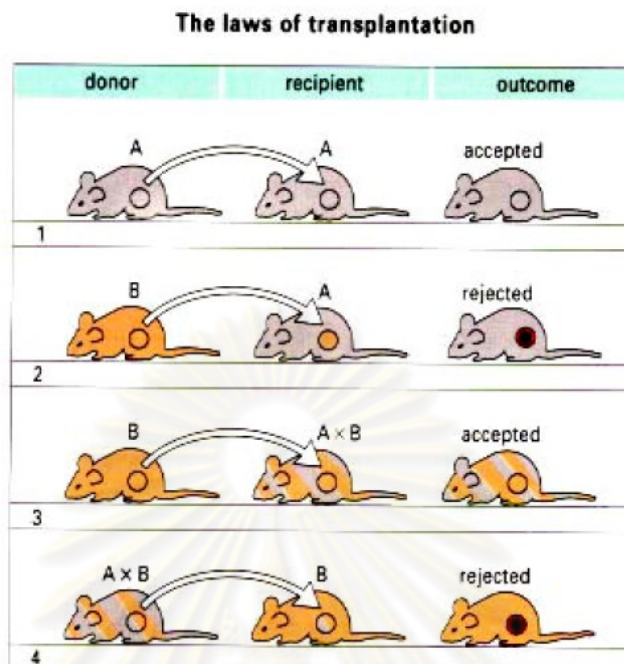
- 2) *Acute graft rejection* หมายถึง การต่อต้านไตแบบเฉียบพลันเป็นสาเหตุหลักของการเกิดความล้มเหลวในการปลูกถ่ายไต ใช้เวลาหลายวันหรือเป็นสัปดาห์ หลังการปลูกถ่ายไต เกิดขึ้นเนื่องจากกลไกจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันผ่าน T – lymphocyte เป็นหลัก ส่งผลให้เกิดการทำลาย graft ผ่านเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ macrophage โดยปฏิกิริยา delayed type hypersensitivity (DTH), B-cell โดยปฏิกิริยาแอนติบอดี และ cytotoxic T cell โดยปฏิกิริยา cell mediated cytotoxic [21]
- 3) *Chronic allograft rejection* หมายถึง อาการที่แสดงถึงความเสื่อมสมรรถภาพของกราฟท์ที่ปลูกถ่ายไตบริเวณ glomerular basement membrane มีการเปลี่ยนแปลงค่อยเป็นค่อยไป เกิดหลังการปลูกถ่ายไต 6 เดือนถึง 1 ปี ไปแล้ว [21] ลักษณะทางพยาธิสภาพและการดำเนินโรคเช่นเดียวกับ Chronic renal failure คือพบ atherosclerotic change, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis และ tubular atrophy ยังไม่ทราบกลไกการเกิด chronic rejection แต่คาดว่าเป็นผลจาก immunologic injury signal 2-3 อย่าง เช่น monocyte ปลดปล่อย IL-1 ส่วนเกล็ดเลือดและเซลล์เอนโดทีเลียลจะปล่อยสารที่เรียกว่า platelet derived growth factor ทำให้เกิดการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดทีเลียลที่อยู่บริเวณ vascular bed ส่งผลให้ basement membrane หนาขึ้น ต่อมาเกิด fibrotic change ภายในหลอดเลือดจนทำให้ lumen ของ vascular artery ตีบเล็กลงเกิด

graft ischemia ตามมา นอกจากนี้ยังเชื่อว่าเกิดจากปฏิกิริยาทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ภาวะแทรกซ้อนจากความดันโลหิตสูง, ไขมันในเลือดสูง และยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ดังนั้นอาจเรียก chronic rejection ใหม่ ให้ถูกต้องว่า chronic allograft nephropathy [23] (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การเกิด graft rejection ของหนู chronic rejection [22]

การที่ร่างกายจะเกิดปฏิกิริยาต่อต้านหรือยอมรับ graft ได้นั้น แสดงว่าร่างกายจะต้องมีความสามารถในการแยกแยะความเป็นตัวของตัวเองออกจากผู้อื่น ซึ่งต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันคือ T lymphocyte และสารประกอบเชิงซ้อนที่อยู่บนผิวของเซลล์ต่างๆ (glycoprotein) เรียกกลุ่มของ glycoprotein ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ และมีหน้าที่บอกความเป็นตนเองนี้ว่า major histocompatibility complex (MHC) ในมนุษย์เรียก MHC อีกชื่อว่า human leukocyte antigen (HLA) ระบบ HLA นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก (polymorphism) ทำให้โอกาสที่บุคคล 2 คนจะมี HLA เหมือนกันทุกประการเป็นไปได้ยาก นอกจากเป็นพี่น้องฝาแฝดกัน [22] (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงให้เห็นการยอมรับและการไม่ยอมรับในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อของหนูคนละสายพันธุ์ A และ B [22]

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมแฝงเข้ามาในร่างกายในที่นี้คือ allograft T lymphocyte จะทำหน้าที่ตรวจสอบดูว่า graft นั้นมี HLA ตรงกับของตนเองหรือไม่ หากตรงกันก็เกิดปฏิกิริยายอมรับ graft แต่หากไม่ตรงกันก็เกิดปฏิกิริยาต่อต้านขึ้น (graft rejection) นำมาซึ่งการทำลายและการสูญเสียหน้าที่ของอวัยวะที่นำมาปลูกถ่าย แบ่งการตอบสนองของร่างกายต่อ allograft ออก เป็น 5 ระยะ [23] คือ

- 1) ระยะรับรู้ alloantigen (allorecognition phase)
- 2) ระยะการกระตุ้น T lymphocyte (T cell activation phase)
- 3) ระยะการตอบสนองของ helper T cell (T_H cell effector phase)
- 4) ระยะทำลาย alloantigen (effector phase)
- 5) ระยะสิ้นสุดหรือควบคุมการตอบสนอง (self regulatory phase)

ยากดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive drugs) [25]

การปลูกถ่ายอวัยวะ จำเป็นต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันแก่ผู้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ เพื่อป้องกันมิให้ผู้รับมีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันอันจะทำให้เกิดการต่อต้านอวัยวะที่ปลูกถ่ายเกิดขึ้นได้โดยทั่วไป เมื่อได้รับยากดภูมิคุ้มกันการตอบสนองทุกชนิดของระบบภูมิคุ้มกันจะลดลง ยากดภูมิคุ้มกันร่างกายแบ่งออกได้ดังนี้

- 1) calcineurin inhibitor: cyclosporine, tacrolimus
- 2) cytotoxic agents: azathioprine, mycophenolate mofetil, methotrexate, cyclophosphamide
- 3) corticosteroids: prednisolone, methylprednisolone
- 4) mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor: sirolimus, everolimus
- 5) antibodies: anti-lymphocyte globulin, anti-CD3 antibody, anti-IL2 receptor antibody

หลักการให้ยากดภูมิคุ้มกัน [26]

ปัจจุบันการให้ยากดภูมิคุ้มกันจะนิยมให้ยาหลายชนิดร่วมกันเพราะยาแต่ละตัวมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การให้ยาในผู้ป่วยแต่ละรายจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงกลไกการออกฤทธิ์ ผลข้างเคียงของยา เกสซ์วิทยาของยาและหลักฐานทางคลินิกที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลของยาแต่ละตัว กล่าวโดยรวม หลักการให้ยากดภูมิคุ้มกันแก่ผู้ป่วยแต่ละราย ควรพิจารณาเลือกให้ยาแก่ผู้ป่วยเป็นรายๆ ตามเหตุผลและความจำเป็นมากกว่าการให้ยาตายตัว โดยส่วนใหญ่นิยมให้ยาในกลุ่ม calcineurin inhibitor เป็นหลัก เพราะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการต่อต้านไตในช่วงแรกของการปลูกถ่ายที่ดี หลังจากนั้นมักจะพบว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตมีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้น โดยสาเหตุส่วนใหญ่ในการเสียชีวิตของผู้ป่วยปลูกถ่ายไต คือการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด โดยพบมากถึงร้อยละ 55 [1] จนกระทั่งมีการค้นพบยาในกลุ่ม mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor ว่าสามารถลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดได้ [9]

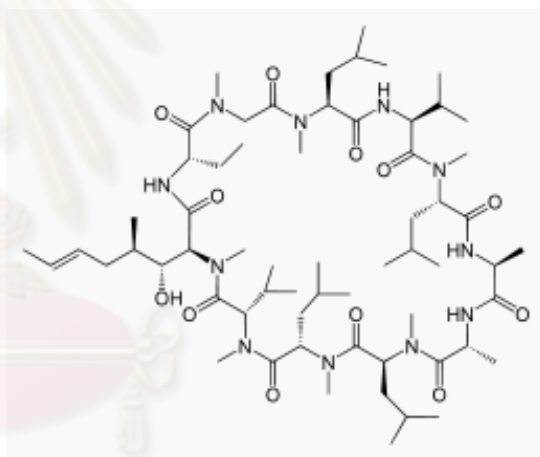
1) Calcineurin inhibitor (CNI)

ยาในกลุ่ม calcineurin inhibitor ได้แก่ ยา cyclosporine โดยยาจะไปจับกับ cyclophilin (CpN) ในเซลล์ส่วนไซโตพลาสซึม อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน cyclosporine–CpN complex ต่อจากนั้นจะจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calcineurin (CaN) ซึ่งเป็น serine/threonine phosphatase ทำให้ nuclear factor of activated T cells (NF-ATc) ไม่เกิด dephosphorylation ไม่มีการขนส่ง NF-ATc เข้าสู่ nucleus ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้น interleukin 2 (IL-2) gene ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของ T-cell activation (ภาพที่ 6)

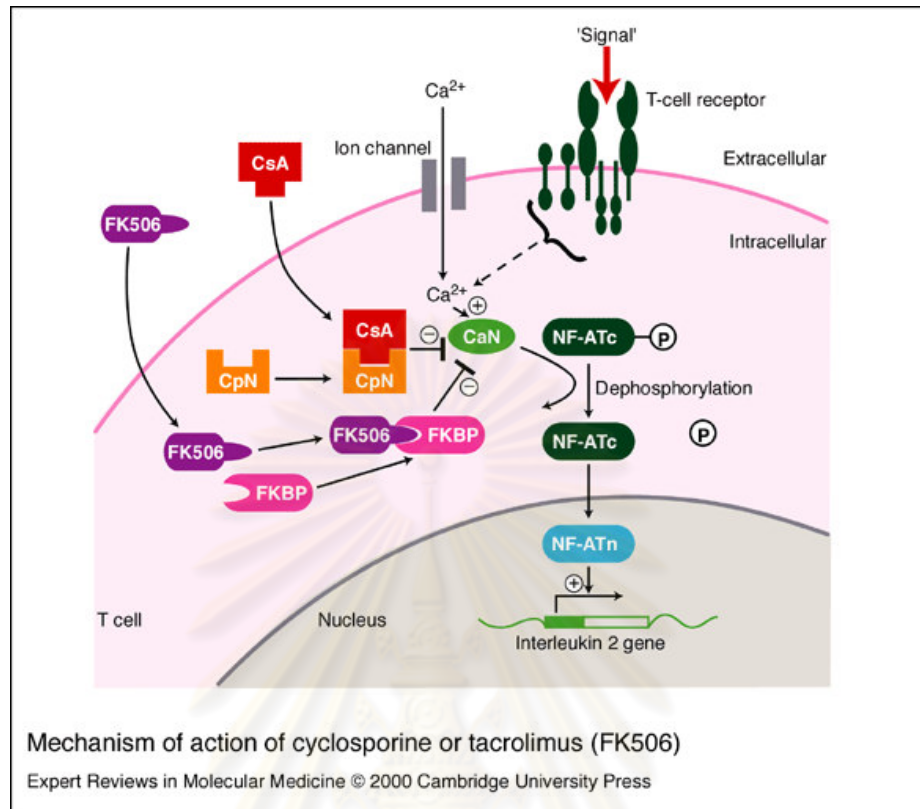
Cyclosporine (Cyclosporin A)

Cyclosporin A (CSA) เป็น cyclic hydrophobic decapeptide [27] สร้างจากเชื้อรา *tolypocladium inflatum* Gums โดยพบเชื้อรานี้ครั้งแรกที่ประเทศ Norway ปี 1986 มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยยาจับกับตัวรับที่เรียกว่า cyclophilin ภายในเซลล์ได้เป็น CSA–cyclophilin complex ที่จับและยับยั้งการออกฤทธิ์ของ calcineurin ดังกล่าวข้างต้น ทำให้ยับยั้งการสร้าง IL-2 จาก T cell นอกจากนี้ยายังกระตุ้นการสร้าง transforming growth factor β (TGF- β) ที่ออกฤทธิ์ต้าน IL-2 ได้

ภาพที่ 5 โครงสร้างของ cyclosporine



ศูนย์วิทยาศาสตร์การ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยา cyclosporine หรือ tacrolimus

เภสัชวิทยาของ microemulsion cyclosporine

microemulsion cyclosporine ถูกดูดซึมทางลำไส้เล็กโดยมีค่า peak concentration (C_{max}) ประมาณ 1-2 ชั่วโมงและมีค่า half life เท่ากับ 7.3 ± 1.6 ชั่วโมง ซึ่งทำให้จำเป็นต้องรับประทานยาทุก 12 ชั่วโมง ในผู้ป่วยเด็กอาจมี half life สั้นลง จนต้องบริหารยาทุก 6-8 ชั่วโมง การดูดซึมของยาหรือ bioavailability ของยาขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP3A4) และ P-glycoprotein ที่ enterocyte CYP3A4 เป็น superfamily ของ heme protein ทำหน้าที่ metabolize สารต่างๆ หลายชนิด

เภสัชจลนศาสตร์ [28]

มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา cyclosporine หลังจากที่ได้รับยาโดยรับประทานในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ผู้ป่วยเด็กที่ทำ dialysis ผู้ป่วยโรคตับ และผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนไต ดังนี้

การดูดซึม

ส่วนใหญ่ของ cyclosporine ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก การดูดซึมของยาจะคงที่ไม่ขึ้นกับปริมาณยา แต่จะขึ้นกับระยะเวลาที่ยาอยู่ในทางเดินอาหาร และน้ำดีเป็นหลัก เนื่องจากการดูดซึมต้องอาศัยน้ำดีเป็นตัวช่วย cyclosporine มี bioavailability ประมาณ 30% ระยะเวลาตั้งแต่การบริหารยา จนระดับยาในเลือดสูงสุด (Tmax) มีค่าแตกต่างกันมากในแต่ละบุคคลตั้งแต่ 1- 8 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับระบบย่อยอาหาร และระดับน้ำดี

การกระจายตัวของยา

เมื่อยาถูกดูดซึมแล้ว จะอยู่ในกระแสเลือด จะจับกับ lipoproteins ในเม็ดเลือดแดง ประมาณ 35-55% การจับตัวของ cyclosporine กับเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มขึ้นถ้าอุณหภูมิลดลง และจะอึดตัว เมื่อระดับยาอยู่ที่ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมแทบอลิซึมของยา

Cyclosporine ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ cytochrome (CYP450) ในตับ โดยเฉพาะ P450 ที่คุมโดย P-450 III gene family เอนไซม์นี้เป็นตัวเดียวกับที่ย่อยสลายยาและฮอร์โมนหลายชนิด ภายหลังจากย่อยสลายแล้วจะได้ เมแทบอลิท์ประมาณ 15 ชนิด พบว่าเมแทบอลิท์ ยังมีฤทธิ์ของ cyclosporine เหลือเพียง 10-20%

การขจัดยา

ส่วนใหญ่ของการทำลายยา cyclosporine เกิดโดยขบวนการเมแทบอลิซึม โดยมีค่าครึ่งชีวิตเฉลี่ย 6.4-8.7 ชั่วโมง อัตราการขจัดยาในเด็กจะสูงกว่าผู้ใหญ่ 40% ในเด็กยังมีการดูดซึมยาดต่ำกว่าผู้ใหญ่ ร่วมกับปริมาตรการกระจายยาเพิ่มขึ้น ทำให้เด็กต้องใช้ยาในขนาดที่สูงและถี่กว่า การขจัดยาจะช้าลงในผู้สูงอายุ ผู้ที่เป็นโรคตับ และผู้ที่มีระดับ low density lipoprotein ต่ำ ผู้ที่ระดับบิลิรูบิน และ alanine aminotransferase ในเลือดสูงผิดปกติ ควรได้รับยาห่างออกไป 90% ของยาจะถูกขับทางน้ำดี 6% ถูกขับออกทางปัสสาวะ

ผลข้างเคียงของ Cyclosporine [28]

Cyclosporine เป็นยาที่มีผลข้างเคียงมากมาย ได้แก่ nephrotoxicity, microvascular disease, cardiovascular morbidities, ความผิดปกติของ electrolyte, ความผิดปกติทาง metabolic เช่น เบาหวาน ไชมันในเลือดสูง และการติดเชื้อ

Cyclosporine nephrotoxicity มีความสัมพันธ์กับระดับยาและเกิดขึ้นได้ทั้ง acute toxicity และ chronic toxicity acute toxicities เกิดจาก severe vasoconstriction ของ afferent arteriole ของ glomerulus เมื่อผู้ป่วยมีระดับยา cyclosporine สูงๆ การศึกษาพบว่า ผลเสียของ cyclosporine ต่อ glomerular microcirculation เกิดจากการเพิ่มขึ้นของการบีบตัว หลอดเลือดต่างๆ เช่น thromboxane และ endothelin, หรือการลดลงของการขยายตัวของหลอดเลือด ได้แก่ NO ในระยะต้นๆ ของการเริ่มใช้ cyclosporine มีการใช้ cyclosporine ในรูปแบบ ทางหลอดเลือดดำในช่วงแรกหลังผ่าตัด พบว่าการบริหารยาในรูปแบบดังกล่าวมีผลทำให้เกิด microvascular toxicity มาก เนื่องจากระดับยา cyclosporine จะมีระดับสูงและคงที่อยู่ที่ตลอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยซึ่งได้รับไตจากผู้ให้ที่มี ischemic time เป็นเวลานาน ทำให้มีโอกาส เกิด delayed graft function (DGF) สูง DGF ก่อให้เกิดผลเสียต่อ graft กล่าวคือ ทำให้เกิดความ เสี่ยงต่อการเกิด acute rejection ทำให้ผู้ป่วยต้องอยู่โรงพยาบาลนานขึ้นและอาจจำเป็นต้องทำ dialysis หลังปลูกถ่ายไต

ปัจจุบันนอกจากไม่แนะนำบริหารยาในรูปแบบทางหลอดเลือดดำแล้ว ยังแนะนำให้ บริหารยาให้ได้ระดับที่เหมาะสม เร็วที่สุดขณะเดียวกันไม่สูงเกินไป มีกลยุทธ์หลายวิธีที่จะลดความ เป็นพิษของ cyclosporine ในระยะแรกหลังผ่าตัดเพื่อบรรเทาการเกิด DGF วิธีต่างๆ ได้แก่ การใช้ ยาควบคุมภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ๆ ร่วมด้วย เช่น การใช้ anti IL-2R และ/หรือ sirolimus ร่วมด้วย ทำให้ไม่ จำเป็นต้องใช้ cyclosporine ในขนาดสูง ทำให้สามารถลดระดับยา cyclosporine ในระยะต้นๆ หลังผ่าตัดเพื่อหลีกเลี่ยง acute toxicities มีการศึกษาพบว่าหากใช้ anti IL-2R ร่วมกับ sirolimus อาจละเว้น cyclosporine ในช่วงต้นได้ โดยไปเริ่มให้ cyclosporine เมื่อภาวะ DGF หายเป็นปกติ แล้ว หรือเมื่อค่า serum creatinine น้อยกว่า 2.3 mg/dl

Nephrotoxicity ของ cyclosporine อีกลักษณะหนึ่งคือ chronic nephrotoxicity โดยเกิด ในผู้ป่วยที่มีระดับยา cyclosporine ขนาดสูงเป็นระยะเวลานานๆ ทำให้เกิด interstitial fibrosis เรียกว่า striped fibrosis

กลไกที่ Cyclosporine มีผลต่อหลอดเลือด

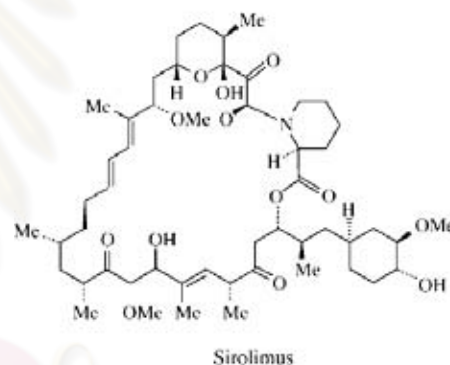
มีการศึกษาผลของ cyclosporine ต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด ในระยะยาวโดยกลไก สำคัญหนึ่งคือ การเกิดความดันโลหิตสูง [29] ความดันโลหิตสูง เกิดจากร่างกายไม่สามารถปรับ ระดับความดันเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นไปกลับไปยังในช่วงปกติได้ มีรายงานการกระตุ้นการสังเคราะห์ และการหลั่ง renin angiotensin aldosterone จากการให้ยา cyclosporine โดยมีผลโดยตรงต่อ

การทำงานของ Juxtaglomerular cells ที่ไต โดย cyclosporine ทำให้อัตราการหลั่งของเรนินจาก เซลล์ส่วนเปลือกนอกของไต (renal cortical cells) สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณ เรนินในกระแสเลือด เป็นตัวจำกัดอัตราสร้าง (rate – limiting step) ของแองจิโอเทนซินทู (angiotensin II) ดังนั้นการ กระตุ้นการสร้างเรนิน จึงมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของระบบเรนิน – แองจิโอเทนซิน (renin-angiotensin system) เมื่อ cyclosporine สามารถกระตุ้นให้ระดับของเรนินเพิ่มสูงขึ้น ระดับของแองจิโอเทนซินทูจึงเพิ่มสูงตามไปด้วย ซึ่งแองจิโอเทนซินทู จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ทาง ชีวภาพ (biological effect) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (physiological effect) และ พยาธิวิทยา (pathological effect) ของหลอดเลือดไต [28]

2) mTOR inhibitor [9]

Sirolimus

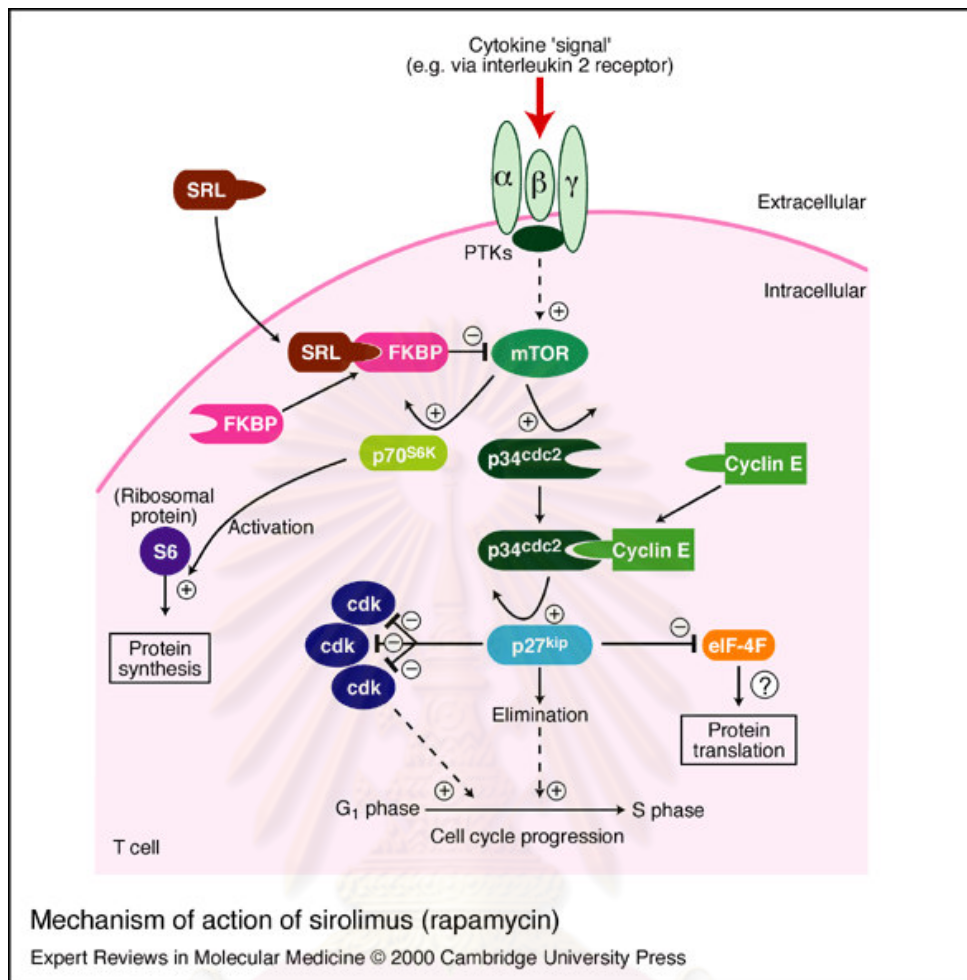
เป็น macrolide antibiotic ที่มีฤทธิ์ในการกด ภูมิคุ้มกัน sirolimus เป็นแลคโตนที่เป็นวงขนาดใหญ่มีสูตร โครงสร้างคล้ายคลึงกับ tacrolimus ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* หรือเป็นที่รู้จักอีกชื่อหนึ่ง ว่า Rapamycin สูตรโมเลกุล คือ $C_{51}H_{79}NO_{13}$ และน้ำหนัก โมเลกุลเท่ากับ 914.2 สูตรโครงสร้างของ sirolimus ดัง แสดงใน (ภาพที่ 7) [30]



ภาพที่ 7 โครงสร้างของ sirolimus

เภสัชวิทยา

ยา sirolimus มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ที่เกิดขึ้นจาก การตอบสนองต่อการกระตุ้นของ antigen และ cytokine อันได้แก่ IL-2, IL-4 และ IL-15 โดย กลไกที่แตกต่างจากยากดภูมิคุ้มกันชนิดอื่นๆ คือ sirolimus จับกับ FK Binding Protein-12 (FKBP-12) และไปจับกับ mTOR (mammalian target of rapamycin) อยู่ในรูปสารประกอบ เิงซ้อนมีผลยับยั้งการดำเนินวงจรชีวิตของเซลล์จากระยะ G_1 ไปสู่ระยะ S (ภาพที่ 8) [31]



ภาพที่ 8 Sirolimus: mechanism of action

Sirolimus ทำให้ระยะเวลาของการรอดชีวิตของหนูขนาดเล็ก (mice) หนูขาว (rat) และหมู หรือสัตว์จำพวกลิงที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ (เช่น ไต หัวใจ ไชกระดูก) ยาวนานขึ้น ทำให้ไม่เกิดการปฏิเสธอวัยวะแบบเฉียบพลัน (acute rejection) จากการผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจและไตในหนูขาว [31] ในบางการศึกษาพบว่าฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกันของ sirolimus จะคงอยู่นานถึง 6 เดือนหลังจากหยุดรักษา ซึ่งผลนี้จะมีความจำเพาะกับแอนติเจนแต่ละชนิด [32]

เภสัชจลนศาสตร์

มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา sirolimus หลังจากที่ได้รับยาโดยรับประทานในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ผู้ป่วยเด็กที่ทำ dialysis ผู้ป่วยโรคตับ และผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนไต ดังนี้

การดูดซึม

ยา sirolimus ถูกดูดซึมได้เร็วภายหลังจากการให้ยาจากทางเดินอาหาร โดยระยะเวลาเฉลี่ยที่ยาขึ้นถึงระดับความเข้มข้นสูงสุด (Tmax) คือประมาณ 1 ชั่วโมงหลังจากให้ยาเพียงครั้งเดียวในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง และ 2 ชั่วโมงหลังจากให้ยาโดยการรับประทานหลายครั้งในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไต [26] sirolimus มี systemic availability ประมาณ 14% ความเข้มข้นของยา sirolimus ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในภาวะการทำงานของไตคงที่ จะเป็นสัดส่วนกับขนาดยาที่ได้รับ [25] โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 3 และ 12 มิลลิกรัมต่อตารางเมตรพื้นที่ผิวร่างกาย

การกระจายตัวของยา

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของอัตราส่วนระหว่างยา sirolimus ในเลือดและในพลาสมาคือ 36 ± 17.9 ในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนไตที่ภาวะการทำงานของไตคงที่ แสดงให้เห็นว่ายา sirolimus กระจายอยู่ในองค์ประกอบต่างๆ ของเลือด ปริมาตรการกระจายเฉลี่ย (Vss/F) ของยา sirolimus คือ 12 ± 7.52 L/kg ยาจับกับโปรตีนในพลาสมาส่วนใหญ่เป็น albumin ประมาณ 40%

เมแทบอลิซึมของยา

Sirolimus เป็น substrate ของ cytochrome P450 (CYP3A4) และ P-glycoprotein ถูกเมแทบอลิซึมอย่างมากโดยปฏิกิริยา O-demethylation และ/หรือ ปฏิกิริยา hydroxylation สารเมแทบอลิซึมหลัก 3 ชนิดของยา sirolimus คือ hydroxyl, demethyl และ hydrodemethyl สามารถตรวจพบในเลือด เมแทบอลิซึมบางชนิดสามารถตรวจพบในตัวอย่างจากพลาสมา อูจจาระ และปัสสาวะ ไม่พบ glucuronide และ sulfate conjugate มีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ประมาณ 62 ชั่วโมง แม้ว่าเมแทบอลิซึมบางตัวจะมีฤทธิ์ แต่ sirolimus เองเป็นตัวที่ออกฤทธิ์ก่อกำเนิดมากกว่า 90%

การขจัดยา

หลังจากที่ได้รับยา sirolimus ที่มี ^{14}C เพียงครั้งเดียวแก่อาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่าส่วนใหญ่ 91% ของ ^{14}C ตรวจพบในอุจจาระ และมีเพียงส่วนน้อยที่ขับออกทางปัสสาวะ 2.2%

ถึงแม้ว่าการได้รับยา cyclosporine จะช่วยทำให้อัตราการอยู่รอดของกราฟที่ตีขึ้นมากก็ตาม แต่ก็พบปัญหาในระยะยาว เช่น โรคแทรกซ้อนจากโรคหัวใจหลอดเลือด และผลกระทบต่อการทำงานของไต การค้นพบยากดภูมิคุ้มกันใหม่ที่มีประสิทธิภาพดี ผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่อาจลดปัญหาดังกล่าวได้ โดยเฉพาะยาที่ออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันที่คนละตำแหน่งกับยาเดิม จะทำให้เสริมฤทธิ์กับยาที่ให้อยู่ก่อน และสามารถลดขนาดยาทั้งหมดลงได้ด้วย

การศึกษาพบว่ายา sirolimus มีผลป้องกันการเกิด acute graft rejection เท่ากับยา CNI แต่มีข้อดีกว่าคือ sirolimus ออกฤทธิ์คนละตำแหน่งกับยา CNI [9] อีกทั้งพบว่า sirolimus สามารถลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ [10] sirolimus มีความสามารถในการยับยั้ง vascular smooth muscle cell activation, migration และ proliferation [11] การศึกษาในลิง cynomolgus ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนหลอดเลือดแดงหัวใจ เออร์ตาในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันแต่แตกต่างพันธุกรรม พบว่ายา sirolimus สามารถยับยั้งกระบวนการการเกิดภาวะเสื่อมของหลอดเลือด [12] ซึ่งพบได้มากในยากดภูมิคุ้มกันกลุ่ม CNI [13] และผลของยา sirolimus ต่อความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต พบว่า sirolimus สามารถป้องกันความผิดปกติของเยื่อบุผิวหลอดเลือดแดงภายในร่างกาย ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้มีการลดลงของความดันช่วงหัวใจบีบตัว [14] และมีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า sirolimus มีฤทธิ์ anti-proliferative และ anti-atherogenic [33] แสดงให้เห็นว่ายาชนิดนี้อาจมีผลดีต่อผู้ป่วยโรคไตที่มักพบโรคแทรกซ้อนจากโรคหัวใจหลอดเลือดสูง

โรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

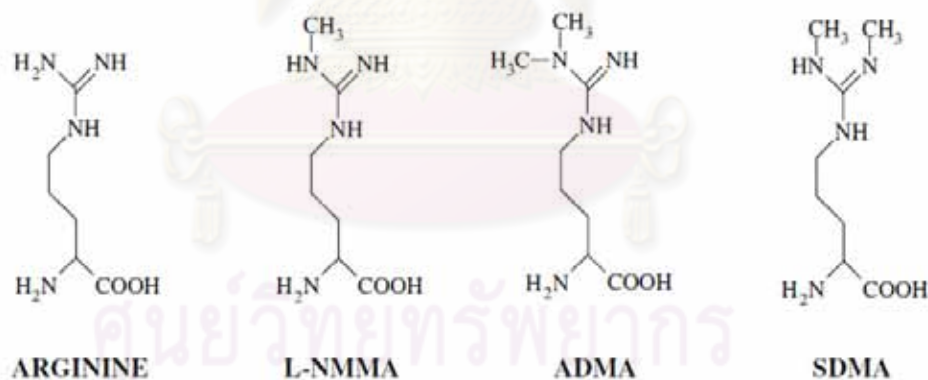
Kasike และคณะ [34] ซึ่งติดตามผู้ป่วยปลูกถ่ายไตเป็นเวลาประมาณ 46 เดือน พบว่าความชุกในการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดเป็นร้อยละ 21.3 โดยผู้ป่วยร้อยละ 15.8 ไม่มีประวัติการเป็นโรคหัวใจหลอดเลือดมาก่อน และอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) เป็นร้อยละ 15.1 โดยผู้ป่วยร้อยละ 1.1 ไม่มีประวัติการเป็นโรคหัวใจขาดเลือดมาก่อน

ในขณะที่อุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) เป็นร้อยละ 7.3 โดยผู้ป่วยร้อยละ 6.0 เป็นผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเป็นโรคหลอดเลือดสมองมาก่อน [34] ส่วนในการศึกษาแบบ cross-sectional ของ Aakhus และคณะ [1] พบว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมองและโรคหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral vascular disease) เป็นร้อยละ 14, 3, และ 2 ตามลำดับ

ตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดเป็นดัชนีที่สามารถทำนายอาการของโรคได้ว่าผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงหรือแนวโน้มที่จะนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดมากขึ้นเพียงใด โดยตัวชี้วัดที่น่าสนใจตัวแรกและยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยในปัจจุบัน คือ asymmetric dimethylarginine (ADMA) พบว่าผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่องจะมีระดับของพลาสมา ADMA ที่สูงขึ้น [35] จึงส่งผลให้ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตมีอัตราเสี่ยงและส่งผลทำให้มีการดำเนินของโรคหัวใจหลอดเลือดใน 1 ปีแรกหลังจากการปลูกถ่ายไต [36] ดังนั้น ADMA จึงเป็นดัชนีตัวชี้วัดโรคหัวใจหลอดเลือดที่ค้นพบใหม่ที่สำคัญในผู้ป่วยโรคไต [37]

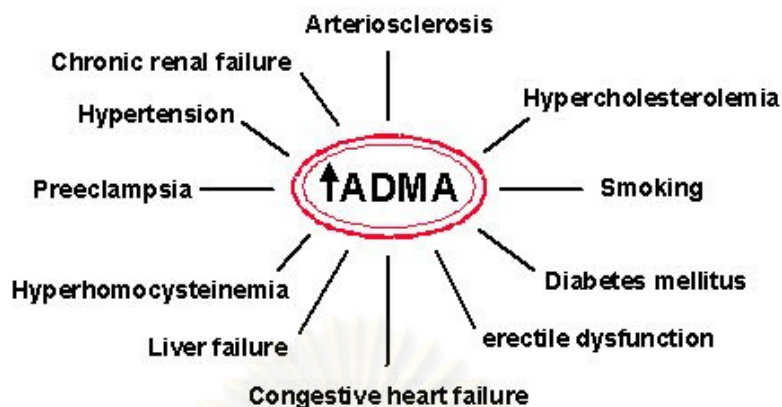
Asymmetric dimethylarginine (ADMA)

ADMA เป็น endogenous nitric oxide synthase inhibitor [15] ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ methylation ของ arginine residues ของโปรตีนภายในเซลล์ ทั่วไปของร่างกายที่สามารถพบได้ในองค์ประกอบของเลือดหรือพลาสมาของมนุษย์ (ภาพที่ 9) [38] มีรายงานความผิดปกติของ ADMA ทางพยาธิสรีรวิทยาถึง สาเหตุ ความรุนแรงและผลของการเกิดโรค ตลอดจนการดำเนินความก้าวหน้าของโรคหัวใจหลอดเลือดและภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง



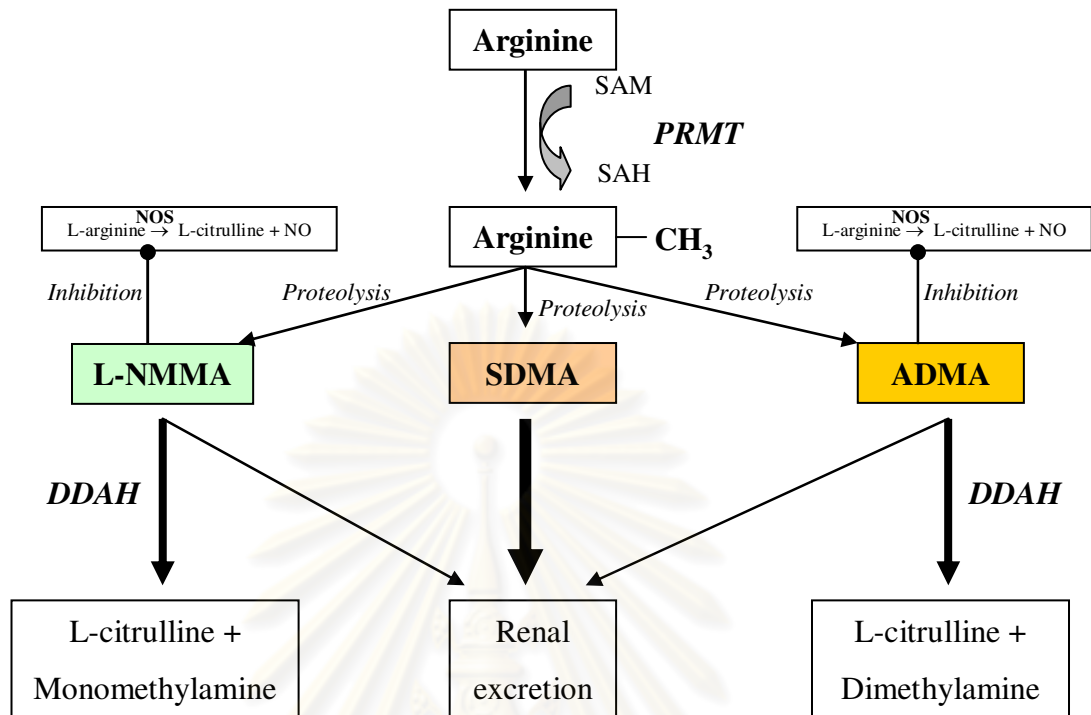
ภาพที่ 9 โครงสร้างโมเลกุลของ L-arginine และผลิตภัณฑ์ของ methylarginines [39]

จากการศึกษาทางคลินิกพบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ ADMA เป็นสาเหตุส่วนหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและโรคอื่นๆ เช่น โรคของหลอดเลือด, ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง, ภาวะที่มี homocysteine ในเลือดสูง, เบาหวาน, ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง, ความดันโลหิตสูง, โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด, ภาวะหัวใจล้มเหลว และ ภาวะกลุ่มอาการภูมิคุ้มกันโรคบกพร่องมากมาย (ภาพที่ 10) [40-43]



ภาพที่ 10 แสดงบทบาทของ ADMA ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคทางพยาธิสภาพต่างๆ [43]

ADMA เกิดขึ้นจาก methylation ของ arginine residues ของโปรตีนภายในเซลล์ทั่วไปของร่างกายโดยผ่านเอนไซม์ arginine methyltransferase (PRMT) methyl donor ของกระบวนการนี้คือ S-adenosylmethionine (SAM) โดย arginine ที่ถูกเติมด้วยหมู่ methyl จะถูก proteolysis ด้วยการดึงหมู่อะมิโน (NH_2) ออกจากโมเลกุลกลายเป็น ADMA ในกระบวนการสังเคราะห์ ADMA จะมีการสังเคราะห์สารอื่นอีกสองตัวพร้อมกันคือ N^G -monomethyl L-arginine (L-NMMA) และ symmetric dimethyl arginine (SDMA) ส่วนใหญ่ของ ADMA จะถูกเมแทบอลิซึม โดยเอนไซม์ dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) ได้เป็น L-citrulline และ dimethylamine ส่วนน้อยของ ADMA จะถูกขับออกทางไต ในขณะที่ SDMA ไม่มีผลต่อ NOS และเยื่อบุผิวของหลอดเลือดแดง และถูกขับออกทางไตเป็นส่วนมาก (ภาพที่ 11) [42]



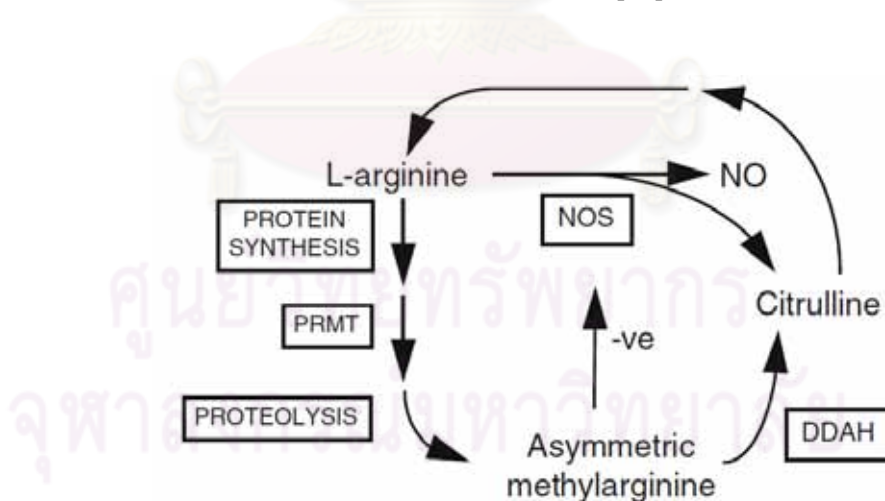
ภาพที่ 11 แสดงเมแทบอลิซึมของ methylarginines [44]

Nitric oxide (NO)

NO เป็น endothelium-derived relaxing factor (EDRF) เนื่องจากพบว่า acetylcholine สามารถทำให้เส้นเลือดเกิดการขยายตัวก็ต่อเมื่อมีเซลล์เยื่อผนังเส้นเลือดเท่านั้น จึงเชื่อว่าเซลล์ของเอนโดทีเลียมสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติขยายหลอดเลือด ซึ่งต่อมาพิสูจน์ได้ในภายหลังว่าสารนั้น คือ NO [45]

NO มีประจุเป็นกลาง (uncharged) ทำให้ NO สามารถผ่านเข้าและออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ และมีคุณสมบัติที่เรียกว่า “radical molecule” กล่าวคือ เป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ (unpaired electron) ทำให้ NO พยายามดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียง ผลที่ตามมาคือ โมเลกุลที่ถูกดึงอิเล็กตรอนเกิดการเปลี่ยนแปลงและมีคุณสมบัติเป็น radical molecule แทน เพราะ โมเลกุลที่ไม่ครบคู่จะส่งผลให้ NO เกิดปฏิกิริยากับสารต่างๆ มากมาย [46]

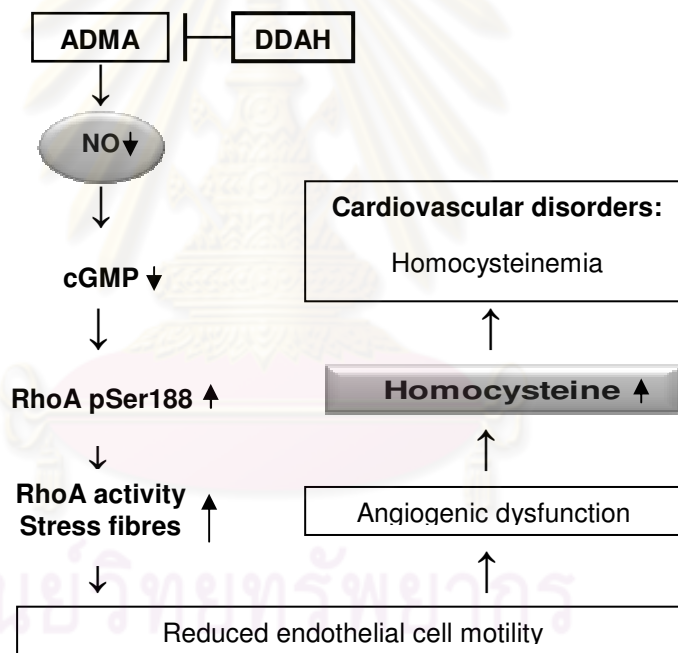
NO ถูกสร้างจากกรดอะมิโน L-arginine โดยอาศัยขบวนการ oxidation ขนส่งอิเล็กตรอน โดยใช้ nitric oxide synthase (NOS) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา และการสร้าง NO นี้จะได้ L-citrulline เป็น byproduct เปลี่ยนกลับมาเป็น L-arginine ใช้สร้าง NO ได้อีก (recycling of L-citrulline) มีเอนไซม์ N^G, N^G dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) ช่วยในการยับยั้งการเก็บสะสมของ ADMA ในการยับยั้ง NOS ทางอ้อม [39] (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 กลไกการทำงานของเอนไซม์ DDAH ในควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ [39]

พบว่าภาวะพร่อง NO อาจมีบทบาทต่อการเกิดความดันโลหิตสูง [47] ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่เกิดขึ้นเอง, ผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ไวต่อเกลือ, ผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่เกิดจากหลอดเลือดแดงที่ไต, และผู้ป่วยความดันโลหิตสูงจากการเกิดโรคกรรมเป็นพิษ ซึ่งเกิดจาก NO ถูกยับยั้งโดย ADMA ทำให้เกิดการลดลงของ NO ดังกล่าว ซึ่งเป็นกลไกประการหนึ่งของการเกิดความดันโลหิตสูง และการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในภาวะไตวายเรื้อรังด้วย [48]

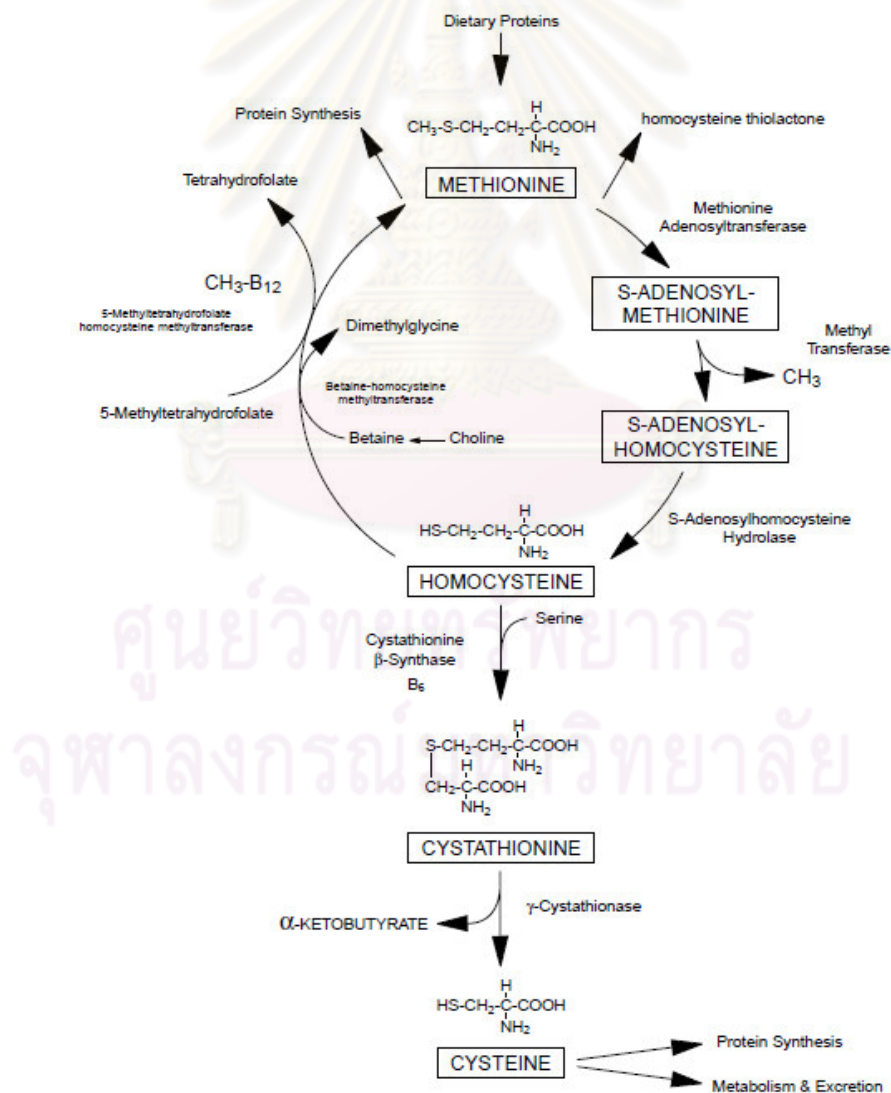
ทั้ง ADMA และ NO มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมา เนื่องจากถ้าระดับ ADMA เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ระดับ NO ลดลง จะไปมีผลลดการเคลื่อนที่ของเซลล์เยื่อผิว ก็จะทำให้ระดับ homocysteine เพิ่มขึ้น เกิดภาวะ homocysteinemia ซึ่งเป็นภาวะที่สัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับโรคหัวใจหลอดเลือด [49] (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13. การเพิ่มขึ้นของระดับ ADMA ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด

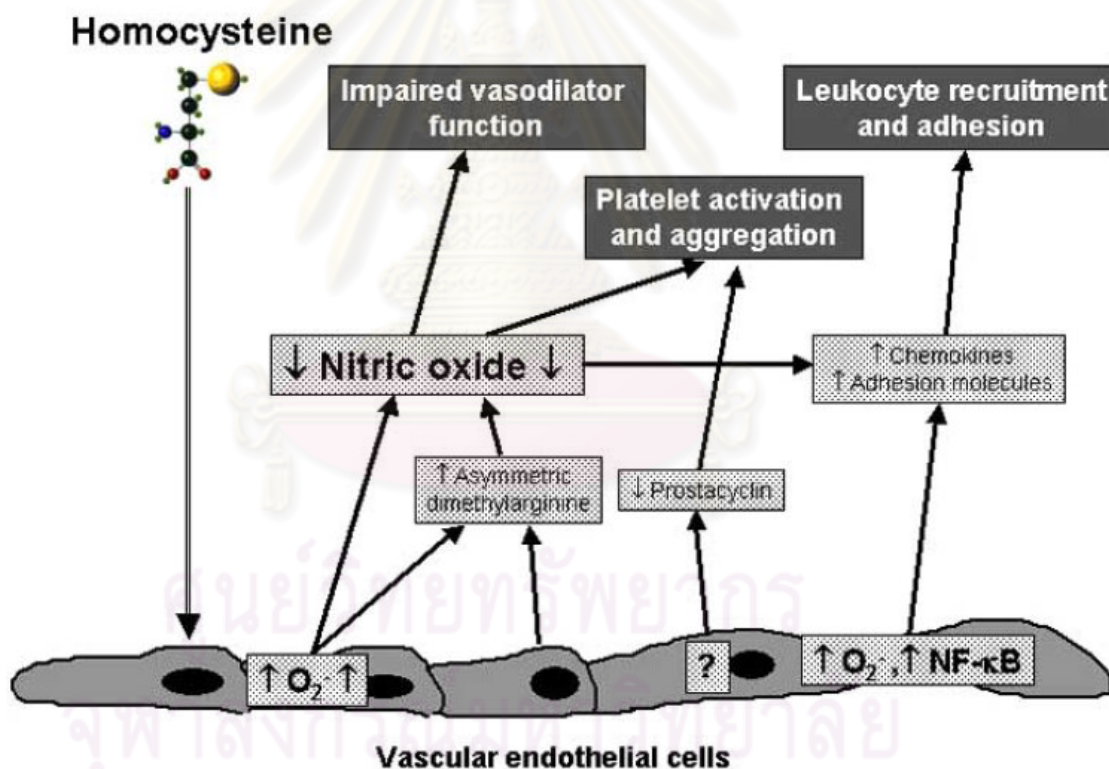
Homocysteine

Homocysteine เป็น sulfur amino acid อีกระยะใน sulfhydryl group ที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของ methionine ถูกค้นพบโดย du Vigneaud และคณะในปี 1950 [50] โดยปกติระดับของ homocysteine ในเลือดอยู่ระหว่าง 5-15 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine จะถูกร่างกายใช้สร้างกรดอะมิโนอื่นได้อีกสองตัวคือ methionine ซึ่งต้องมีกรดโฟลิกและวิตามินบี 12 เป็นตัวช่วย หรือสร้างเป็น cysteine ซึ่งต้องมีวิตามินบี 6 เป็นตัวช่วย ในกรณีที่ร่างกายขาดสารอาหารดังกล่าวหรือร่างกายมีภาวะบกพร่องต่อหน้าที่การทำงานของระบบเผาผลาญก็จะส่งผลให้มีการเกิดภาวะครึ่งของ homocysteine ได้ [51] (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 กระบวนการทางชีวเคมีของ homocysteine [16]

ถ้าระดับของ homocysteine ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นก็จะทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังด้านในของหลอดเลือด (endothelial damage) ที่ละน้อย จนในที่สุดทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง การศึกษาวิจัย พบว่าถ้าในร่างกายมีปริมาณของ homocysteine สูงขึ้นจะเพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด การอุดตันของเส้นโลหิตที่ไปเลี้ยงสมอง และ โรคหลอดเลือดส่วนปลายได้ [52] สันนิษฐานว่าสาเหตุที่ homocysteine เพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคเหล่านี้ เกิดจาก homocysteine ทำให้ความหนืดของเกร็ดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้โอกาสที่จะเกิดการแข็งตัวของเลือดมากขึ้น นอกจากนี้แล้วพบว่า homocysteine ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้หลอดเลือดขาดความยืดหยุ่นอีกด้วย (ภาพที่ 15) [53]



ภาพที่ 15 กลไกการเกิด endothelial dysfunction เนื่องจากระดับ homocysteine ในเลือดที่สูงขึ้นไปมีผลเพิ่ม superoxide (O₂⁻) โดย O₂⁻ ทำให้ระดับ asymmetric dimethylarginine (ADMA) สูงขึ้น ซึ่งระดับ ADMA ที่สูงขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ทำให้การสร้าง NO ได้น้อยลง เกิด endothelial dysfunction ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต [53]

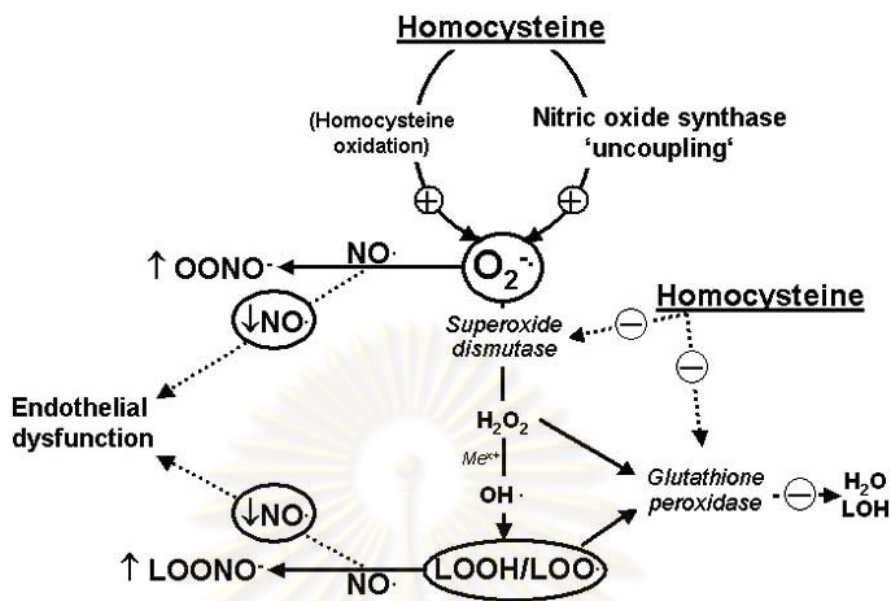
homocysteine เป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังและผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้าย [54] ในปี 1980 Wilcken และคณะพบว่าผู้ป่วยที่ทำ hemodialysis และผู้ป่วยโรคไตวายระยะสุดท้ายมีระดับของ homocysteine เพิ่มขึ้น อยู่ในช่วง 25-30 $\mu\text{mol/L}$ (เมื่อเปรียบเทียบกับค่าปกติอยู่ในช่วง 12-15 $\mu\text{mol/L}$) [17, 55] ผลของการเพิ่มขึ้นของ homocysteine ดังกล่าวอาจจะเหนี่ยวนำให้เกิด endothelial dysfunction หรือความผิดปกติของการแข็งตัวของเกร็ดเลือด ได้ [56]

นอกจากภาวะ homocysteinemia จะเป็นตัวบ่งบอกสำคัญในการเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดแล้ว [57] homocysteine ยังทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มผิว โดย homocysteine ไปกระตุ้น superoxide (O_2^-) ซึ่งเป็น free radical เพิ่มมากขึ้น และยับยั้ง superoxide dismutase และ glutathione peroxidase ซึ่งเป็น antioxidant ส่งผลทำให้เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดเสื่อมจากการเกิด oxidative stress [53]

Oxidative stress

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) คือภาวะที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ จนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ และจากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลาย DNA โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ โดยการทำลายดังกล่าวจัดเป็น oxidative damage ซึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage จะแตกต่างกันไป [58]

พบว่า homocysteine มีผลทำให้ระดับของ total antioxidant capacity (TAC) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของ oxidative stress ที่ได้จากขบวนการเมแทบอลิซึมของออกซิเจน superoxide, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx)/oxidized glutathione reductase (GSSGRD) ลดลง เนื่องจากการสูญเสียสมดุลปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันในร่างกาย โดย homocysteine จะไปยับยั้งเอนไซม์ GPx, SOD ทำให้ระดับ NO ลดลง จนเกิดภาวะ endothelial dysfunction ซึ่งเป็นสัญญาณอันตรายนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด [53] (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 Homocysteine และ oxidative stress [53]

Oxidative stress มีความเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โดยไปเพิ่มการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl radical ($OH\cdot$), lipid radical ($LO\cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ peroxynitrite ($ONOO^-$) ทำให้ NO activity ลดลง เกิด endothelial dysfunction [53] พบว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคหัวใจหลอดเลือด จะมีระดับของ reactive oxygen species และ homocysteine เพิ่มสูงขึ้น ระดับของ glutathione ลดลง จึงกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่าถ้าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ไม่มีโรคหัวใจหลอดเลือดมาก่อน แต่มี oxidative stress ในระดับที่สูงก็อาจจะทำให้ผู้ป่วยนั้นพัฒนาทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคหัวใจหลอดเลือด ได้ในเวลาต่อมา [19]

ผู้วิจัยมีแนวความคิดที่จะศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยา CNI-based regimen และ sirolimus-based regimen ซึ่งผลการศึกษาอาจเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในการเลือกยากดภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม เพื่อป้องกันความเสี่ยงจากโรคหัวใจหลอดเลือดที่เกิดจากยากดภูมิคุ้มกัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ศึกษาในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตจากงานวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ของ ยากดภูมิคุ้มกันต่อระดับ asymmetric dimethylarginine ในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไต (Immunosuppressive therapy in renal transplant recipients: relationships to plasma levels of asymmetric dimethylarginine) (รายละเอียดดูในภาคผนวก ก)

ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

กลุ่มตัวอย่าง (sample)

ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่มารับการปลูกถ่ายไต และเข้ารับการตรวจติดตามที่คลินิก ปลูกถ่ายไต ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ การคำนวณตัวอย่างอ้างอิงจากรายงานของ Potena และคณะ [10] ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{กำหนด } \alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.10$$

$$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$Z_{\beta} = Z_{0.10} = 1.28$$

$$\text{สูตร } n/\text{group} = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

การคำนวณขนาดตัวอย่างอ้างอิงจากงานวิจัยของ Potena และคณะ [10]

$$X_1 = \text{Baseline ADMA ในกลุ่มที่ 1} = 0.77$$

$$X_2 = \text{Baseline ADMA ในกลุ่มที่ 2} = 0.65$$

$$\sigma^2 = \text{Pooled variance}$$

$$= \frac{SD_1^2 + SD_2^2}{2} \quad \text{ในกรณี } n_1 = n_2$$

$$2$$

$$= (0.1^2 + 0.12^2)/2$$

$$= 0.012 \quad \text{นำไปแทนค่า สูตร } n/\text{group}$$

$$\begin{aligned} n/\text{group} &= \frac{2(1.96 + 1.28)^2 (0.012)}{0.12^2} \\ &= 17.49 \approx 18 \text{ คน} \end{aligned}$$

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยควรมีอย่างน้อยไม่ต่ำกว่ากลุ่มละ 18 คน และการวิจัยครั้งนี้มีการแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนั้นผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมดต้องไม่ต่ำกว่า 36 คน ในงานวิจัยนี้มีผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 42 คน

การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องได้รับข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (รายละเอียดดูในภาคผนวก ข) เพื่อทราบถึงวัตถุประสงค์ วิธีการ และประโยชน์ที่อาจได้รับ และได้ลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา (รายละเอียดดูในภาคผนวก ค) ก่อนทำการศึกษารวบรวมข้อมูล การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว สามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของผู้เข้าร่วมโครงการแต่อย่างใด

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวันที่ 11 พฤศจิกายน 2553 (รายละเอียดดูในภาคผนวก ง)

โครงการวิจัยนี้จะปฏิบัติตามเกณฑ์การปฏิบัติการวิจัยที่ดี (Good Clinical Practice – GCP) สิทธิ ความเป็นส่วนตัวและความเป็นอยู่ดีของอาสาสมัคร/ ผู้ป่วยจะได้รับความคุ้มครองตามหลักการแห่งคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) โครงร่างการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมก่อนเริ่มดำเนินการศึกษา ผู้วิจัยได้ขอความยินยอมจากอาสาสมัคร/ ผู้ป่วย โดยอาสาสมัคร/ ผู้ป่วยได้รับคำชี้แจงถึงประโยชน์ ความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการวิจัยอย่างครบถ้วนเป็นที่พอใจและเข้าใจดี อาสาสมัคร/ ผู้ป่วยมีเวลาเพียงพอในการตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความเต็มใจ โดยลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมไว้เป็นหลักฐาน

ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันได้รับยาที่เหมาะสมต่อภาวะของผู้ป่วยในขณะนั้น และจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงการรักษาเพียงเพื่อให้ผู้ป่วยสามารถเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้วิจัยได้ดูแล

อาสาสมัครและดำเนินการวิจัยด้วยความระมัดระวังอย่างดีที่สุดเพื่อมิให้เกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัย

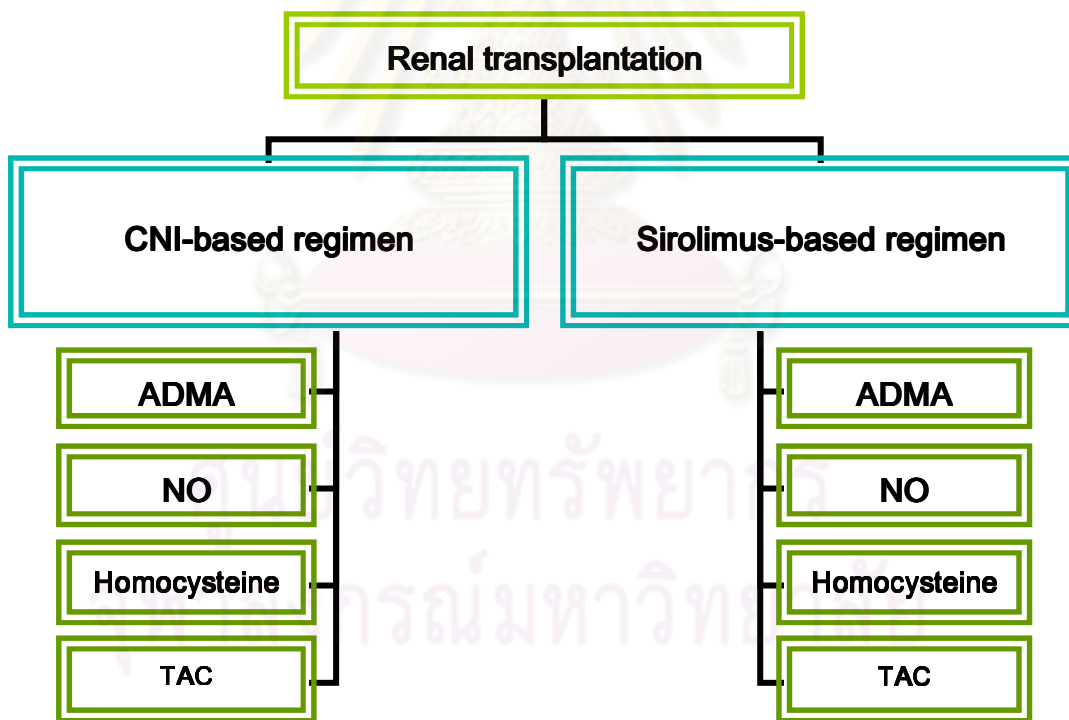
ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลการวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับอาสาสมัครและผู้ป่วยไว้เป็นความลับ ในกรณีที่มีการรายงานผลการวิจัย ข้อมูลของอาสาสมัครและผู้ป่วยจะแสดงในรูปของเลขที่ของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย โดยที่ไม่สามารถระบุชื่อบุคคลได้

รูปแบบการวิจัย (Research design)

Cross-sectional design, analytical study

การวางแผนการวิจัย

ศึกษาและทำการตรวจวัดระดับตัวชี้วัดต่างๆ ในพลาสมาของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้ง 2 กลุ่ม ดังนี้ ADMA, NO, homocysteine และ total antioxidant capacity (TAC)



เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. การตรวจวิเคราะห์ระดับ Asymmetrical dimethylarginine (ADMA)

วิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography system (HPLC) [41, 59]

วัสดุและอุปกรณ์

สารเคมี:

- Arginine [Fluka, Switzerland]
- Asymmetric dimethylarginine (ADMA) [Sigma, USA]
- Symmetric dimethylarginine (SDMA) [Sigma, USA]
- N^G-Methyl-L-arginine acetate salt (MMA) [Sigma, USA]
- Dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) [Fluka, Switzerland]
- Acetonitrile [Lab-Scan, Thailand]
- Methanol [Merck, Germany]
- Borax (sodium tetraborate) [Sigma, USA]
- Boric acid [vivantis, USA]
- Hydrochloric acid [Merck, Germany]
- Phosphate buffer saline (pH 7)
- 25% Ammonia solution [Merck, Germany]
- Ortho-phthaldialdehyde (OPA) (derivatization) [Sigma, USA]
- 3-mercaptopropionic acid, (derivatization) [Sigma, USA]

วัสดุและอุปกรณ์

- High Performance Liquid Chromatography system [Shimadzu]
- Symmetry C18 Column 3.9x150mm 5um [Waters, USA]
- Symmetry Sentry C18 Guard Column 3.9x20mm 5um [Waters, USA]
- Vortex mixer
- Water bath
- Volumetric flask
- Ultrasonic bath

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ ADMA, SDMA และ arginine

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของ ADMA (stock solution)
เตรียม stock solution ของความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ADMA โดยชั่ง ADMA น้ก 2.8 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ HCl จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของ SDMA (stock solution)
เตรียม stock solution ของความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ SDMA โดยชั่ง SDMA น้ก 7.6 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ HCl จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของ arginine (stock solution)
เตรียม stock solution ของความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ Arginine โดยชั่ง Arginine น้ก 17.4 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ HCl จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของ MMA (stock solution)
เตรียม stock solution ของความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ MMA โดยชั่ง MMA น้ก 2.5 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิโมลาร์ HCl จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
เตรียม working internal standard solution 5 ไมโครโมลาร์ MMA ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) โดยเตรียม PBS จาก 10 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate, 140 มิลลิโมลาร์ NaCl, pH 7.0
5. การเตรียม derivatization solution
ชั่ง orthophthaldialdehyde (OPA) น้ก 10 มิลลิกรัม ละลายใน methanol 200 ไมโครลิตร เติม 200 มิลลิโมลาร์ borate buffer (pH 9.5) 1.8 มิลลิลิตร และ 3-mercaptopropionic acid 10 ไมโครลิตร สารละลายใช้ภายใน 48 ชั่วโมง

Working derivatization solution เตรียมด้วยการเจือจาง 5 เท่าด้วย borate buffer ความเข้มข้นสุดท้ายของ OPA และ 3-mercaptopropionic acid คือ 7.5 และ 11.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การเตรียมสารละลายของ ADMA, SDMA และ arginine ในพลาสมาเพื่อสร้าง กราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ ADMA/SDMA ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ไมโครโมลาร์ ADMA/SDMA ในน้ำ โดยการทำ serial dilution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) 1 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ arginine ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 100, 200 ไมโครโมลาร์ ในน้ำ โดยการทำ serial dilution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) 10 มิลลิโมลาร์

ตอนที่ 3 การสกัดสารตัวอย่าง (Sample extraction)

ขั้นตอนพื้นฐานในการสกัดพลาสมาโดยการใช้ solid phase extraction (SPE) มี 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การปรับสภาวะสารสกัด (Condition)

สารสกัดเฟสของแข็งโดยปกติจะอยู่ในสภาพที่แห้ง ก่อนนำมาใช้จึงต้องทำให้สารสกัดชื้นก่อนด้วยตัวทำละลายที่เข้ากันได้กับสารสกัด ซึ่งจำเป็นในกรณีที่สารสกัดเป็นซิลิกา แต่ในการวิจัยนี้ใช้สารสกัดจากพอลิเมออร์ จึงข้ามขั้นตอนนี้ไป

2. การเติมสารละลายตัวอย่างลงบนสารสกัด (Sample loading)

พลาสมาที่ต้องการสกัดที่อยู่ในสารละลาย ต้องอยู่บนสภาวะที่พร้อมถูกดูดซับหรือจับกับผิวหน้าของสารสกัดได้หมด ในงานวิจัยนี้จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์เจือจางพลาสมาที่ใช้กับสารสกัดที่เป็นชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (Oasis[®] MCX SPE)

3. การล้างสารสกัด (Wash)

การล้างสารสกัดที่ดูดซับหรือจับกับสาร เป็นการใช้ตัวทำละลายไปชะล้างสิ่งอื่นๆ ที่อาจจับสารสกัดออกมาให้หมดเหลือไว้แต่ตัวสารที่ต้องการ นั่นคือ ตัวทำละลายที่ใช้ล้างควรเป็นตัวทำละลายหรือสารละลายที่ตัวสารที่ถูกสกัดไว้ไม่ชอบที่สุดหรือไม่ละลาย

4. การชะสารเป้าหมาย (Elution of target analyte)

การชะตัวสารให้หลุดออกมาจากสารสกัด เป็นการใช้ตัวทำละลายที่มีความแรงมากพอไปรบกวนต่ออันตรกิริยาของตัวสารกับสารสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ควรเป็นตัวทำละลายที่มีตัวสารชอบหรือละลายได้ดี



ภาพที่ 17 คอลัมน์ SPE ขนาด 1 มิลลิลิตร (Oasis[®] MCX SPE; Waters)

การเตรียมตัวอย่างชีวสารในการสกัด

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ADMA/SDMA/arginine อย่างละ 10 ไมโครลิตร และ internal standard MMA 100 ไมโครลิตร เติมลงในพลาสติกมา 200 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย PBS จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปสกัดด้วยสารสกัดชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (cation exchange solid phase extraction cartridges) (Oasis[®] MCX SPE; Waters)

ขั้นตอนการสกัดด้วย Oasis[®] MCX SPE

1. การเติมสารละลายตัวอย่างลงบนสารสกัด (sample loading)
2. การล้างสารสกัด (Wash) ด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร และ methanol 1 มิลลิลิตร
3. Elution ด้วย methanol: H₂O: ammonia = 50:40:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
4. นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 60°C – 80 °C
5. ละลายกลับด้วยน้ำ 200 ไมโครลิตรและ derivatizing agent 200 ไมโครลิตร
6. ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 7°C

ตอนที่ 4 การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC

| | |
|--------------------|--|
| เฟสเคลื่อนที่ A | : 50 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6.5): Acetonitrile = 92.2: 7.8 |
| เฟสเคลื่อนที่ B | : Acetonitrile: H ₂ O = 50: 50 |
| คอลัมน์ | : Symmetry C18 column 3.9 x 150 mm; 5 µm 100 Å |
| การ์ดคอลัมน์ | : Symmetry Sentry C18 Guard Column 3.9x20 mm 5 µm |
| อัตราการไหล | : 1.40 มิลลิลิตรต่อนาที |
| เวลาในการวิเคราะห์ | : 30 นาที |
| เครื่องตรวจ | : ฟลูออเรสเซนซ์ excitation 340 nm emission 455 nm |
| ปริมาตรฉีด | : 10 ไมโครลิตร |
| อุณหภูมิคอลัมน์ | : 33 องศาเซลเซียส |

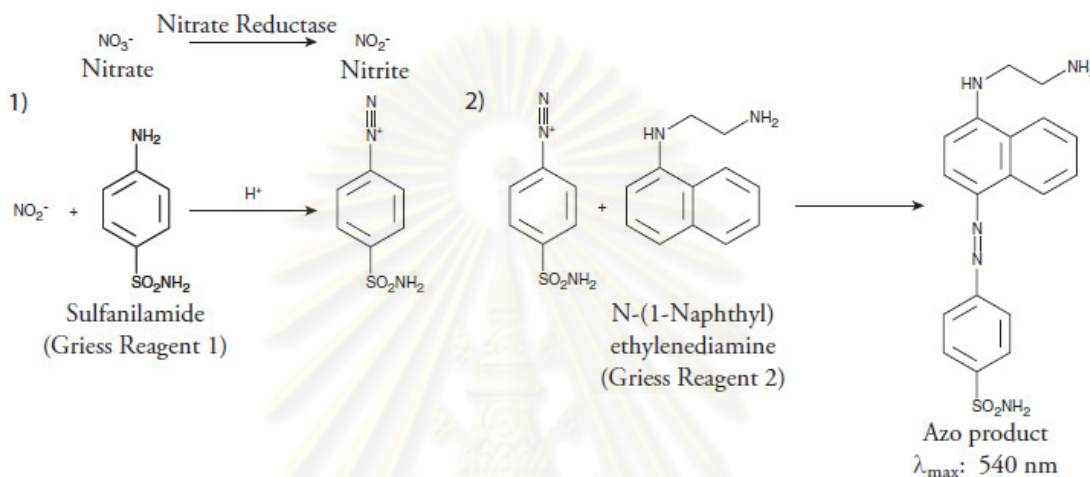
ตอนที่ 5 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

แยกเฟสเคลื่อนที่ A 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5): 7.8% acetonitrile และเฟสเคลื่อนที่ B acetonitrile: water = 50: 50 ปรับสภาวะเครื่องเป็น gradient conditions ด้วย 100% เฟสเคลื่อนที่ A หลังจากตัวสารออกหมดแล้วทำการขจัดขยะออกด้วย 50% เฟสเคลื่อนที่ B จากนั้นที่ 22 - 24 หลังจากนั้นปรับสภาพคอลัมน์ให้ปกติในนาที 24-25 ด้วยเฟสเคลื่อนที่ A แล้วปรับสมดุลคอลัมน์อีก 5 นาทีด้วยเฟสเคลื่อนที่ A ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 30 นาที

ตอนที่ 6 การยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ระดับ ADMA, SDMA และ arginine ในพลาสมา อ้างอิงตาม US FDA guideline method validation [60] ดูรายละเอียดในภาคผนวก ๑

2. การตรวจวิเคราะห์ระดับ Nitric oxide

วิเคราะห์ด้วย nitrate/nitrite colorimetric assay kit ในพลาสติกมาของตู้ปวยปลูกถ่ายไต โดยใช้วิธี Griess reaction assay ซึ่งเป็นการวัดปริมาณรวม total nitrite และ nitrate (NOx) [61-67]



ภาพที่ 18 คุณสมบัติทางเคมีของปฏิกิริยา Griess reagents

หลักการ Griess reaction assay

Griess reaction assay เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นรวมทั้งหมดของ nitrite และ nitrate (NOx) มีกระบวนการ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกจะมีการเปลี่ยนรูปของไนเตรตเป็นไนไตรต์ (NO_3^- เป็น NO_2^-) ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน ขั้นตอนที่ 2 เป็นการเติม Griess Reagents ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบ azo product ที่ให้สีม่วงน้ำเงิน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (ภาพที่ 18)

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Assay buffer: สารละลายบัฟเฟอร์ มีหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารต่างๆ ในการวิเคราะห์
2. Nitrate reductase enzyme: เอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนปฏิกิริยา NO_3^- เป็น NO_2^-
3. Nitrate reductase cofactors: สารประกอบร่วมในการเปลี่ยนปฏิกิริยา NO_3^- เป็น NO_2^-
4. Nitrate standard : สารละลายมาตรฐานไนเตรต
5. Griess reagent 1: สารละลาย sulfanilamide
6. Griess reagent 2: สารละลาย N-(1-Naphthyl ethylenediamine)

การเตรียมสารละลาย

1. Assay buffer ละลายด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร
2. Nitrate reductase enzyme preparation ละลายด้วย assay buffer 1.2 มิลลิลิตร
3. Nitrate reductase cofactors preparation ละลายด้วย assay buffer 1.2 มิลลิลิตร
4. Nitrate standard (stock solution) ละลายด้วย assay buffer 1 มิลลิลิตร
5. Griess reagent R1 and R2
6. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) nitrate standard 200 ไมโครโมลาร์ 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วย assay buffer 900 ไมโครลิตร นำไปเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ไมโครโมลาร์ ใน assay buffer (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานของ nitrate

| Nitrate standard (μ l) | Assay Buffer (μ l) | ความเข้มข้นสุดท้าย ของไนเตรต (μ M) |
|--------------------------------|-------------------------|--|
| 0 | 80 | 0 |
| 5 | 75 | 5 |
| 10 | 70 | 10 |
| 15 | 65 | 15 |
| 20 | 60 | 20 |
| 25 | 55 | 25 |
| 30 | 50 | 30 |
| 35 | 45 | 35 |

การเตรียมตัวอย่างพลาสมาผู้ป่วย

1. กรองพลาสมา 200 มิลลิลิตร ด้วยชุดกรอง ultrafilter 30 kDa MWCO filter
2. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 g เป็นเวลา 15 นาที
3. กลับหัวชุดตัวกรองเพื่อทำความสะอาด ที่ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 2 นาที
4. เก็บพลาสมาส่วนใสที่กรองแล้วนำไปวิเคราะห์ใน 96 well plate

วิธีดำเนินการวิจัย

ตรวจวิเคราะห์ระดับ total nitrite และ nitrate (NOx)

1. เติม assay buffer 200 ไมโครลิตรลงใน well plate ที่ตำแหน่ง blank
2. เติม plasma 40 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย assay buffer ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 80 ไมโครลิตร
3. เติม enzyme cofactor mixture 10 ไมโครลิตร
4. เติม nitrate reductase mixture 10 ไมโครลิตร
5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง ไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
6. เติม Griess Reagent R1 50 ไมโครลิตร
7. เติม Griess Reagent R2 50 ไมโครลิตร
8. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ 540 nm
10. นำค่าที่ได้ไปคำนวณด้วยสมการ

$$[\text{Nitrate} + \text{Nitrite}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y\text{-intercept}}{\text{slope}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{l}}{\text{volume of sample used } (\mu\text{l})} \right) \times \text{dilution}$$

11. บันทึกค่าผลการทดลองและนำไปวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การตรวจวิเคราะห์ระดับ Homocysteine

วิเคราะห์ด้วย ARCHITECT[®] homocysteine assay ในพลาสมา โดยใช้วิธี Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)[68]

หลักการ Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)

เป็นการตรวจหาแอนติเจน โดยใช้ paramagnetic particle เป็น solid phase ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อตัวอย่างทดสอบ เมื่อใส่ตัวอย่างทดสอบลงไป แอนติเจนในตัวอย่างทดสอบ และแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารเปล่งแสง (luminescence) ได้แก่ acridinium จะแย่งจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบน particle เมื่อเติมน้ำยาที่กระตุ้นหรือเร่งให้สาร acridinium เปล่งแสงออกมา ทำให้เกิด chemiluminescence เครื่องก็จะวัดปริมาณแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี โดยถ้าในตัวอย่างทดสอบมีแอนติเจนที่ต้องการวัดอยู่มาก ก็จะไปแย่งจับกับ solid phase ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสาร acridinium จะไปจับได้น้อย ทำให้ปริมาณแสงที่วัดได้มีค่าน้อยลงซึ่งมีความไว (sensitivity) และมีความจำเพาะ (specificity) สูง [69]

หลักการทำงานของ ARCHITECT homocysteine assay

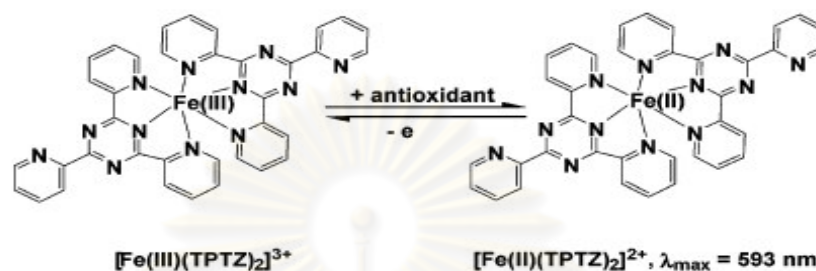
Homocysteine ในรูปของ bound หรือ dimerised (oxidized form) จะถูกรีดิวซ์ด้วย dithiothreitol (DTT) เป็น free homocysteine ซึ่งจะถูกเอนไซม์ S-adenosyl homocysteine hydrolase (rSAHHase) เปลี่ยนเป็น S-adenosyl homocysteine (SAH) จากนั้น SAH และ S-adenosyl cysteine ที่ติดฉลากด้วย acridinium ซึ่งเป็นสารเปล่งแสง จะแย่งกันจับกับ particle-bound monoclonal antibody ต่อจากนั้นทำการล้างด้วย phosphate buffered saline และแยกด้วย magnetic separation เติมสารละลาย pre-trigger (1.32% hydrogen peroxide) และ trigger (sodium hydroxide) เข้าไปเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่ให้พลังงานสูง จะปลดปล่อยพลังงานแสงออกมา (photon) ทำให้เกิด chemiluminescence เป็น relative light units อ่านปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเครื่อง automate ARCHITECT[®] [70]

วิธีดำเนินการวิจัย

เตรียมกราฟมาตรฐาน homocysteine 6 ความเข้มข้น ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 50 ไมโครโมลต่อลิตร บรรจุขวด homocysteine reagent kit และ พลาสมาปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (ARCHITECT[®]) ใช้เวลาการตรวจวัดระดับ homocysteine ทั้งสิ้น 30 นาที บันทึกค่าผลการทดลองและนำไปวิเคราะห์

4. การตรวจวิเคราะห์ Total antioxidant capacity

วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay ซึ่งเป็นการตรวจวัดความสามารถโดยรวมของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ total antioxidant capacity [71]



ภาพที่ 19 Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay

วิธีนี้จะเป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสาร antioxidant โดยอาศัยหลักการที่ Ferric (Fe^{3+}) รับ e^- จากสารต้านออกซิเดชันแล้วกลายเป็น Ferrous (Fe^{2+}) จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+} ซึ่ง Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex เป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านออกซิเดชัน เป็น Ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) complex สารละลายจะเป็นสีม่วงน้ำเงิน นั่นคือถ้าตัวอย่างที่ทดสอบมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง จะเกิด Fe^{2+} -TPTZ มากทำให้ค่า absorbance ที่ 600 nm มีค่ามากขึ้น [72]

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Ferrous sulfate heptahydrate

เตรียมสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดยชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.28 กรัม ละลายในน้ำ จนครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2. การเตรียมสารละลาย $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: Sodium acetate buffer (pH 3.6)

เตรียมสารละลาย $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ โดยชั่ง $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ หนัก 3.1 กรัม ละลายในน้ำ และเติม acetic acid 16 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร แล้วปรับ pH ให้ได้ pH 3.6

3. การเตรียมสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์ HCl
เตรียมสารละลาย HCl ของความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ HCl โดยตวง 37% HCl มา 3.33 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร
4. การเตรียมสารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)
เตรียมสารละลาย TPTZ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ โดยชั่ง TPTZ หนัก 0.0312 กรัม ละลายใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
5. การเตรียมสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Ferric chloride hexahydrate
เตรียมสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ โดยชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.0541 กรัม ละลายในน้ำ จนครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
6. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Standard solution
เตรียม Standard solution โดยใช้ 20 มิลลิโมลาร์ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น standard โดยเตรียมความเข้มข้นเป็น 100, 250, 500, 1000, 1500 และ 2000 ไมโครโมลาร์ และใช้ deionized water เป็นสารละลายที่ไร้สารทดสอบ (blank solution)

ตารางที่ 2 สารละลายความเข้มข้นมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

| Final $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration (μM) | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standard | ปริมาตร (μl) | H_2O (μl) |
|--|--|------------------------------|---|
| 2000 | 20 mM | 100 | 900 |
| 1500 | 2000 μM | 375 | 125 |
| 1000 | 2000 μM | 250 | 250 |
| 500 | 1000 μM | 250 | 250 |
| 250 | 500 μM | 250 | 250 |
| 100 | 250 μM | 200 | 300 |

7. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent

เตรียม FRAP reagent ประกอบด้วย

- 300 มิลลิโมลาร์ sodium acetate buffer, pH 3.6
- 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ
- 20 มิลลิโมลาร์ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

อัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ ชุ่่นสารละลาย FRAP reagent ที่อุณหภูมิ 37°C โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

ตรวจวิเคราะห์ระดับ Total antioxidant capacity

1. เติม deionized water 200 ไมโครลิตรลงใน well plate ที่ตำแหน่ง Blank
2. เติม plasma และ Standard อย่างละ 10 ไมโครลิตร ลงใน well plate
3. เติม FRAP reagent 180 ไมโครลิตร ชุ่่นๆ ที่อุณหภูมิ 37°C
4. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
5. นำไปค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader 600 nm
6. คำนวณค่า total antioxidant capacity จากกราฟ FRAP standard และแสดงผลเป็นหน่วยไมโครโมลต่อลิตร ($\mu\text{mol/l}$)
7. บันทึกค่าผลการทดลองและนำไปวิเคราะห์

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection and data analysis)

การเก็บบันทึกและรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยแต่ละรายโดยใช้โปรแกรม Statistical Packages for the Social Science (SPSS) วิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลข้อมูลที่ได้เป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm standard error of the mean) ของแต่ละกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI หรือ sirolimus

วิเคราะห์ความแตกต่างของ ADMA, NO, homocysteine และ total antioxidants capacity ของทั้งสองกลุ่มโดยใช้ unpaired t-test หรือ Mann Whitney U Test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาในผู้ร่วมเข้าโครงการวิจัย

1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ผู้เข้าร่วมโครงการที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือก 42 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับยา CNI จำนวน 21 คน และกลุ่มที่ได้รับยา sirolimus จำนวน 21 คน

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus

| | CNI-based regimen (n= 21) | | Sirolimus-based regimen (n = 21) | |
|-------------|------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
| | Female = 8 | Male = 13 | Female = 4 | Male = 17 |
| Age (y) | 50.50 ± 2.74 | 49.69 ± 2.35 | 47.71 ± 3.63 | 50.01 ± 2.31 |
| Hb (g/dL) | 12.77 ± 0.37 | 13.05 ± 0.40 | 13.03 ± 0.33 | 12.91 ± 0.28 |
| Hct (%) | 40.01 ± 1.13 | 39.90 ± 1.20 | 41.07 ± 0.83 | 40.15 ± 0.77 |
| SBP (mmHg) | 122.00 ± 2.00 | 135.27 ± 3.63 | 135.00 ± 6.09 | 131.51 ± 2.86 |
| DBP (mmHg) | 72.00 ± 1.91 | 80.62 ± 2.46 | 84.25 ± 5.25 | 79.88 ± 1.91 |
| Cr (mg/dL) | 0.97 ± 0.05 | 1.30 ± 0.06 | 1.13 ± 0.16 | 1.35 ± 0.09 |
| BUN (mg/dL) | 16.51 ± 0.73 | 18.75 ± 1.02 | 15.90 ± 1.14 | 17.99 ± 1.64 |
| HT (n(%)) | 4(19.05) | | 12(57.14) | |
| DM (n(%)) | 19(90.48) | | 10(47.62) | |
| IHD (n(%)) | 20(95.24) | | 10(47.62) | |
| DLD (n(%)) | 20(95.24) | | 11(52.38) | |

Hb hemoglobin, *Hct* Hematocrit, *SBP* Systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *Cr* Creatinine, *BUN* Blood urea nitrogen, *HT* Hypertension, *DM* Diabetic mellitus, *IHD* Ischemic heart disease, *DLD* Dyslipidemia

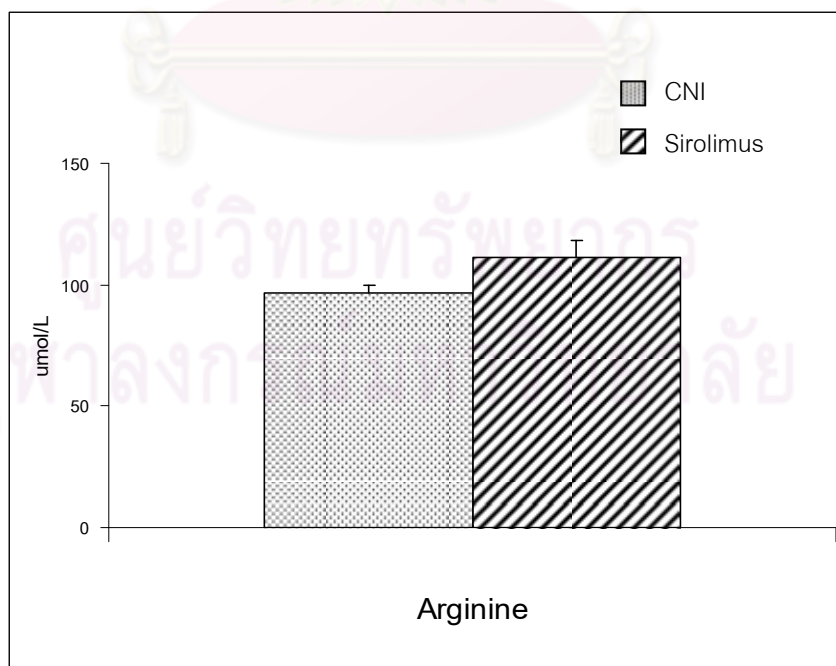
2. ระดับความเข้มข้นของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus

ตารางที่ 4 แสดงระดับความเข้มข้นของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus

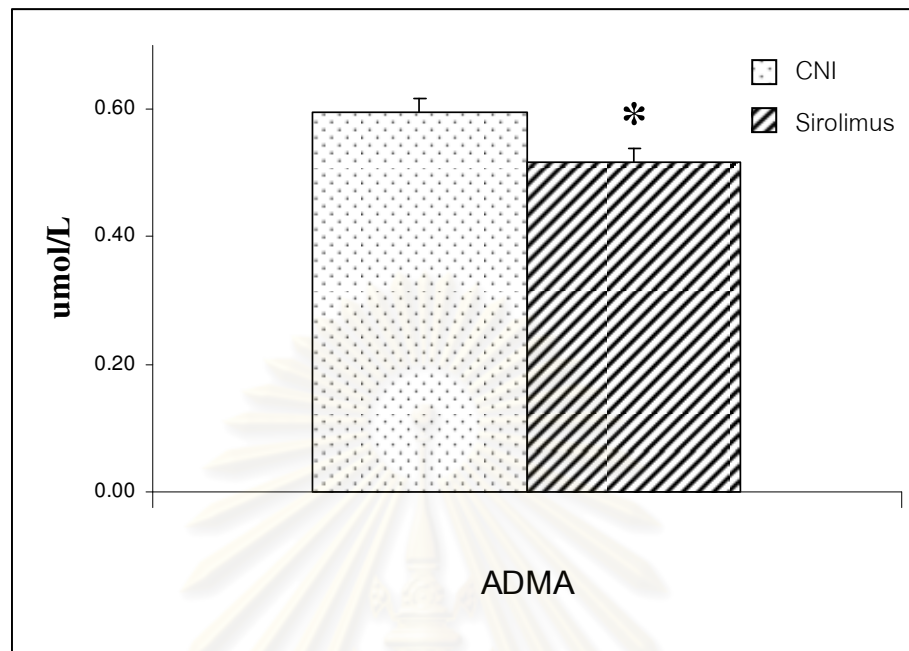
| ตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือด | CNI-based regimen (n= 21: 8 F, 13 M) | Sirolimus-based regimen (n = 21: 4 F, 17 M) | P value |
|--------------------------------------|---|---|---------|
| Arginine (µmol/L) | 96.48 ± 3.14 | 111.30 ± 7.18 | 0.122 |
| ADMA (µmol/L) | 0.60 ± 0.02* | 0.52 ± 0.02* | 0.024* |
| SDMA (µmol/L) | 0.83 ± 0.06 | 0.73 ± 0.03 | 0.242 |
| NOx (µmol/L) | 138.68 ± 28.91 | 82.01 ± 9.46 | 0.116 |
| Homocysteine (µmol/L) | 14.34 ± 0.87 | 17.33 ± 1.65 | 0.137 |
| Total antioxidant capacity | 1072.40 ± 51.67 | 1000.51 ± 65.15 | 0.163 |

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า mean ± standard error of the mean

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *P values by Mann Whitney U Test ที่ระดับความเชื่อมั่น < 0.05

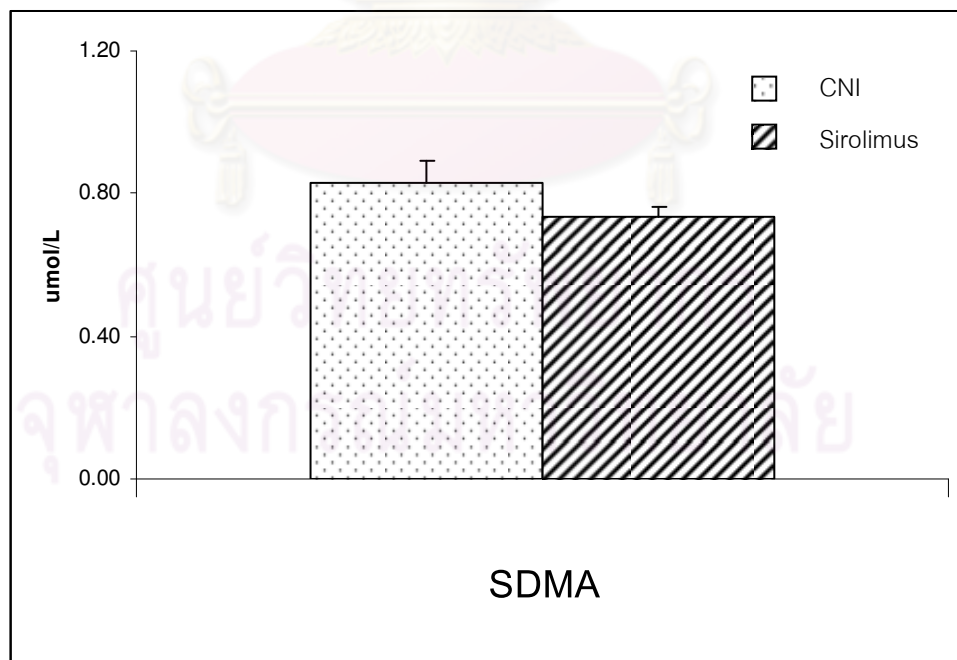


ภาพที่ 20 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ arginine ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus

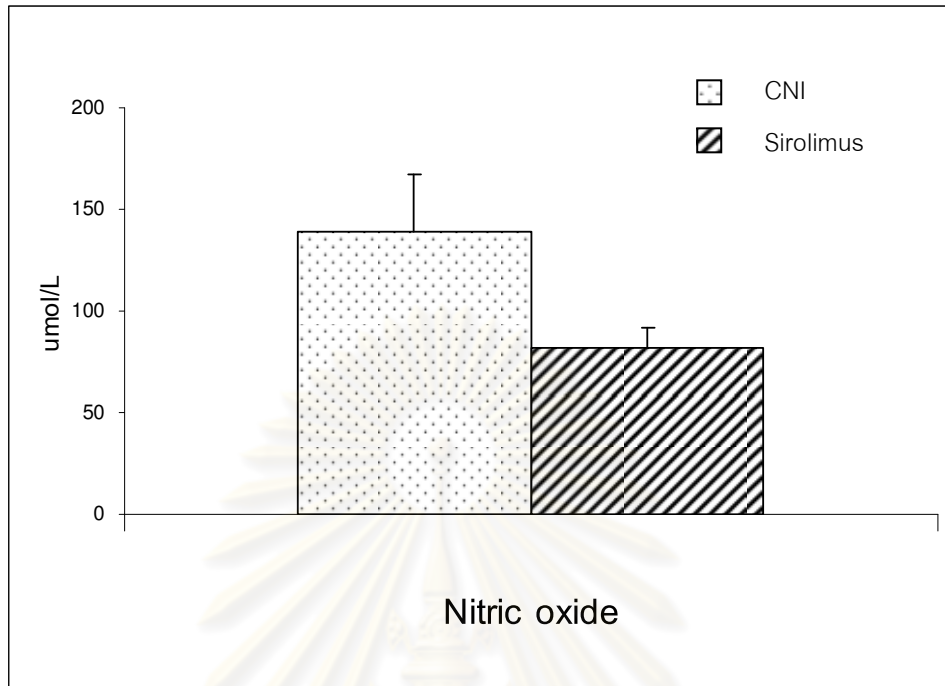


*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *P values by Mann Whitney U Test ที่ระดับความเชื่อมั่น < 0.05

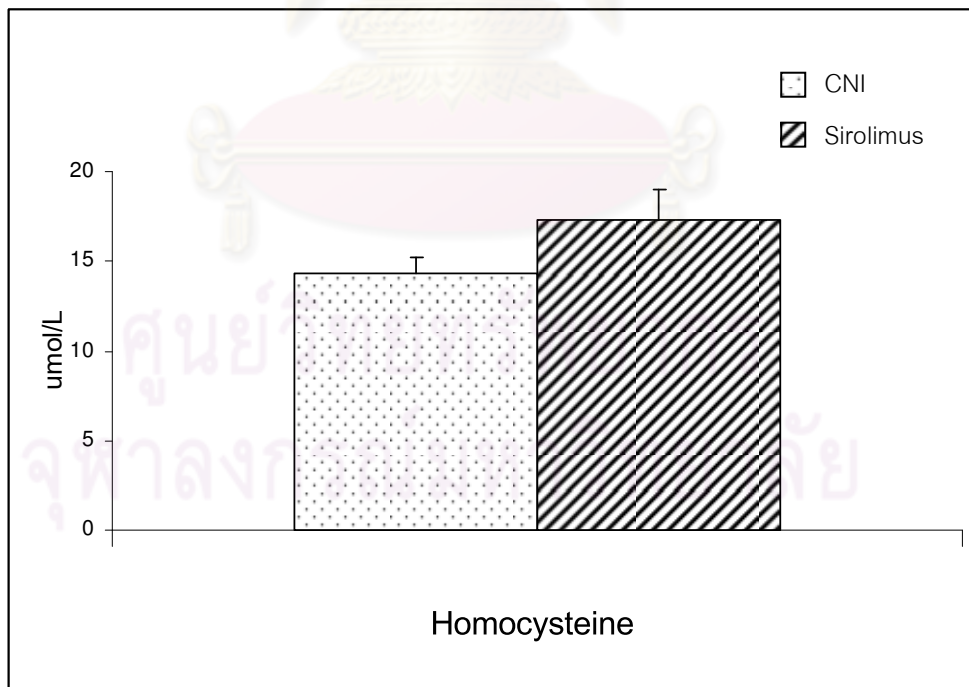
ภาพที่ 21 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ ADMA ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus



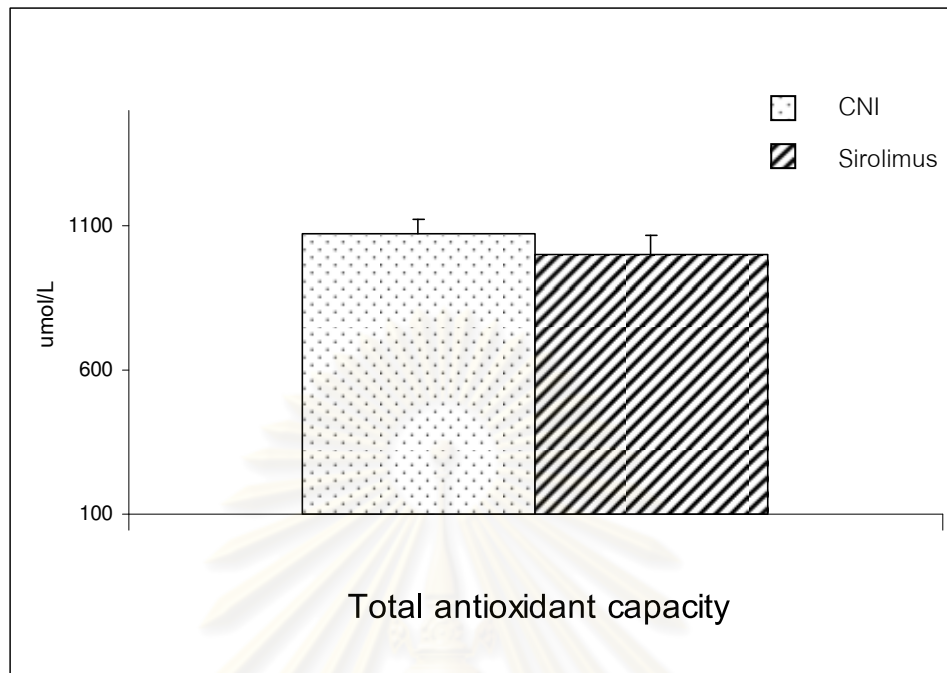
ภาพที่ 22 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ SDMA ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus



ภาพที่ 23 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ nitric oxide ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus



ภาพที่ 24 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus



ภาพที่ 25 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ total antioxidant capacity ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา CNI และยา sirolimus

3. การศึกษาระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคประจำตัวต่างๆ ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง, โรคเบาหวาน, โรคหัวใจขาดเลือด และโรคไขมันในเลือดสูง

ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคความดันโลหิตสูง ที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ nitric oxide เท่ากับ $79.60 \pm 9.98 \mu\text{mol/L}$ และ $130.71 \pm 9.59 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 5)

ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคเบาหวาน ที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ ADMA เท่ากับ $0.49 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ และ $0.60 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 6)

ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคหัวใจขาดเลือด ที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ ADMA เท่ากับ $0.48 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ และ $0.60 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 7)

ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคไขมันในเลือดสูง ที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ ADMA เท่ากับ $0.50 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ และ $0.59 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 5 แสดงระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีความดันโลหิตสูง

| Hypertension | CNI based regimen | Sirolimus-based regimen | P < 0.05 |
|----------------------------|-------------------|-------------------------|----------|
| ADMA (µmol/L) | 0.56 ± 0.02 | 0.55 ± 0.01 | 0.808 |
| NOx (µmol/L) | 130.71 ± 9.59 | 79.60 ± 9.98 | 0.052* |
| Homocysteine (µmol/L) | 16.91 ± 0.99 | 18.75 ± 1.98 | 0.808 |
| Total antioxidant capacity | 1304.21 ± 66.66 | 990.78 ± 79.83 | 0.052 |

ตารางที่ 6 แสดงระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคเบาหวาน

| Diabetic mellitus | CNI based regimen | Sirolimus-based regimen | P < 0.05 |
|----------------------------|-------------------|-------------------------|----------|
| ADMA (µmol/L) | 0.60 ± 0.02 | 0.49 ± 0.01 | 0.003* |
| NOx (µmol/L) | 125.61 ± 26.20 | 87.95 ± 7.44 | 0.582 |
| Homocysteine (µmol/L) | 14.61 ± 0.89 | 16.69 ± 0.94 | 0.279 |
| Total antioxidant capacity | 1073.92 ± 54.45 | 1112.27 ± 79.11 | 1.000 |

ตารางที่ 7 แสดงระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคหัวใจขาดเลือด

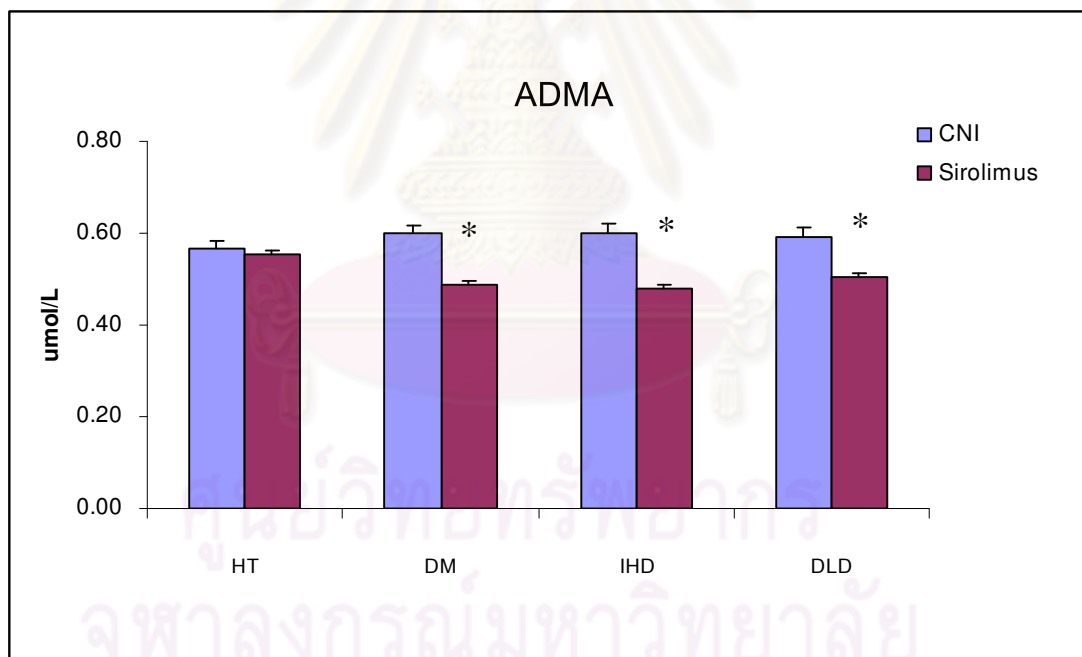
| Ischemic heart disease | CNI based regimen | Sirolimus-based regimen | P < 0.05 |
|----------------------------|-------------------|-------------------------|----------|
| ADMA (µmol/L) | 0.60 ± 0.02 | 0.48 ± 0.01 | 0.003* |
| NOx (µmol/L) | 143.73 ± 29.21 | 96.39 ± 11.64 | 0.454 |
| Homocysteine (µmol/L) | 14.37 ± 0.89 | 14.38 ± 0.97 | 0.906 |
| Total antioxidant capacity | 1073.73 ± 53.00 | 979.32 ± 46.73 | 0.379 |

ตารางที่ 8 แสดงระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคไขมันในเลือดสูง

| Dyslipidemia | CNI based regimen | Sirolimus-based regimen | $P < 0.05$ |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------|------------|
| ADMA ($\mu\text{mol/L}$) | 0.59 ± 0.02 | 0.50 ± 0.01 | 0.016* |
| NOx ($\mu\text{mol/L}$) | 133.24 ± 29.13 | 69.89 ± 5.84 | 0.083 |
| Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$) | 14.13 ± 0.87 | 15.98 ± 0.74 | 0.143 |
| Total antioxidant capacity | 1056.43 ± 50.42 | 1040.08 ± 76.90 | 0.409 |

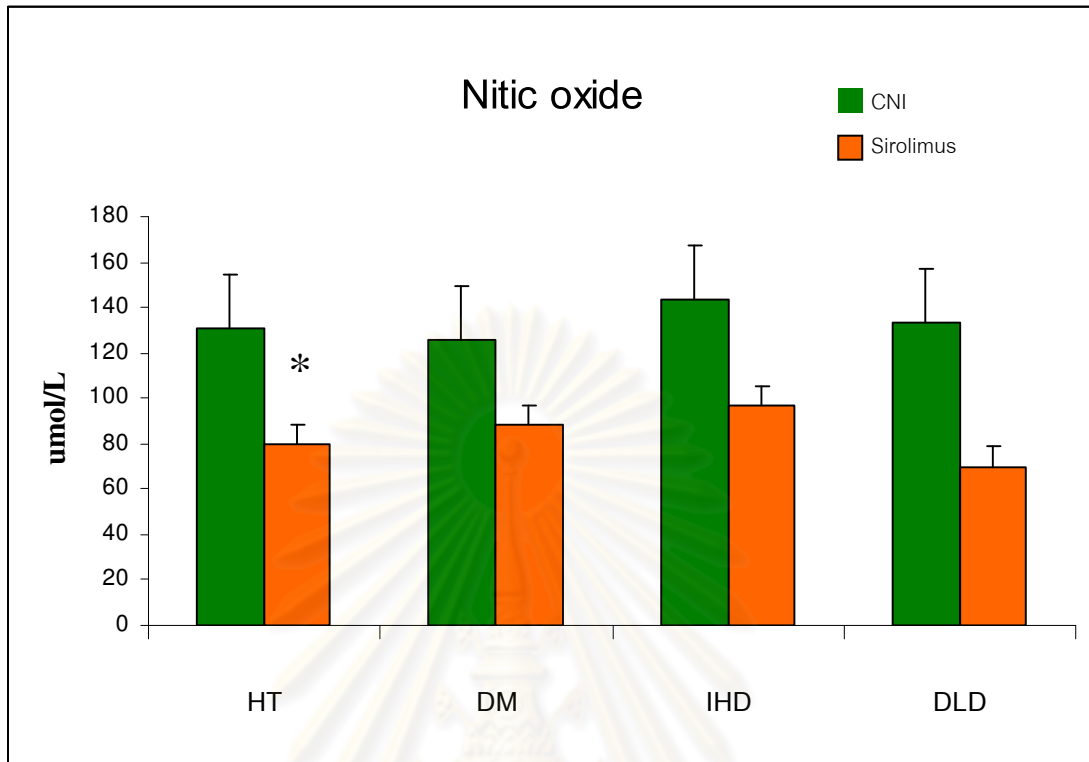
ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า mean \pm standard error of the mean

*พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P values by Mann Whitney U Test ที่ระดับความเชื่อมั่น < 0.05

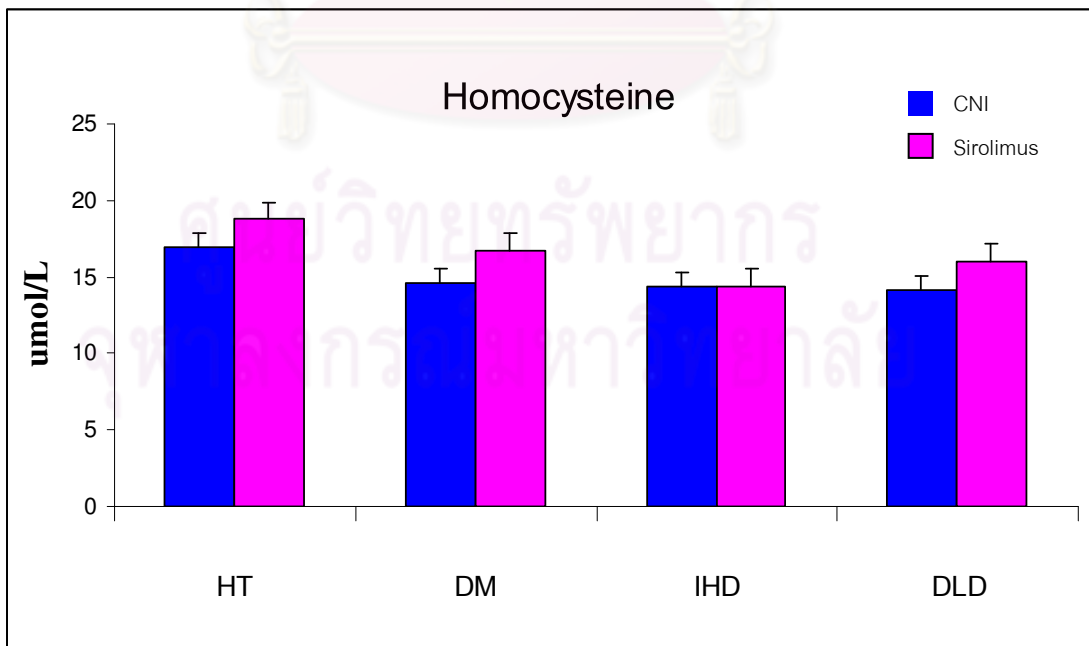


*พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P values by Mann Whitney U Test ที่ระดับความเชื่อมั่น < 0.05

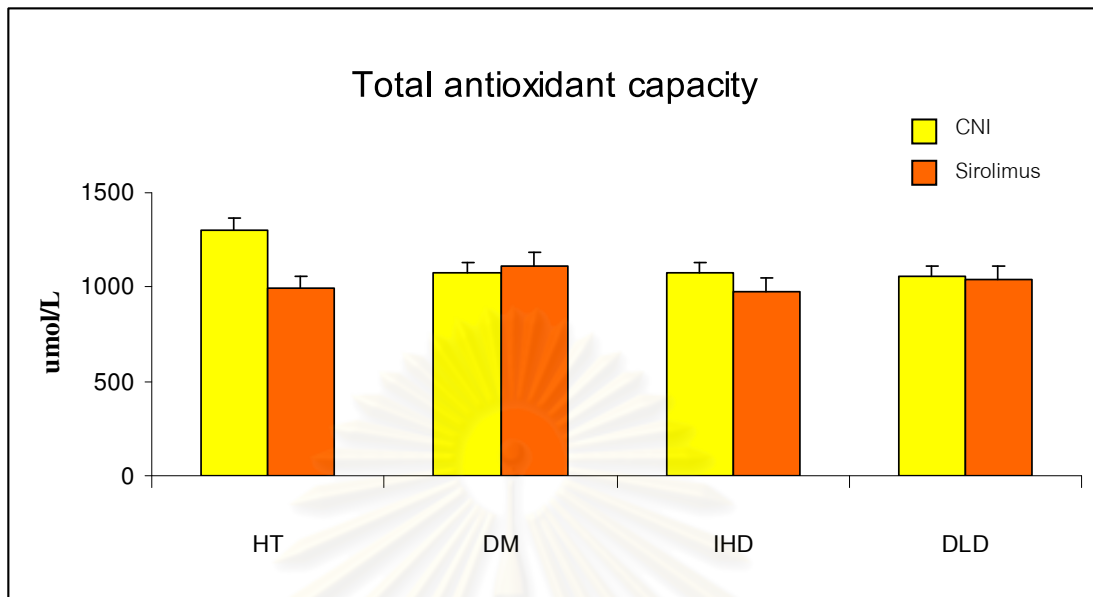
ภาพที่ 26 ระดับ ADMA ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ



*พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P values by Mann Whitney U Test ที่ระดับความเชื่อมั่น < 0.05
 ภาพที่ 27 ระดับ nitric oxide ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ



ภาพที่ 28 ระดับ homocysteine ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ



ภาพที่ 29 ระดับ total antioxidant capacity ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI และกลุ่มที่ได้รับ sirolimus

การวิจัยเป็นแบบเชิงวิเคราะห์ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (cross sectional analytic study) ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้งหมด 42 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ได้รับสูตรยา CNI-based regimen จำนวน 21 ราย และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen จำนวน 21 ราย ผลการวิจัย ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา CNI-based regimen แบ่งเป็นเพศหญิง 8 ราย และเพศชาย 13 ราย อายุเฉลี่ย 50.50 ± 2.74 ปี และ 49.69 ± 2.35 ปี ตามลำดับ มีค่าทางชีวเคมีในเลือด ได้แก่ ฮีโมโกลบิน, ฮีมาโตคริต, ความดันโลหิต, ค่าครีเอตินีน ค่ายูเรียไนโตรเจน อยู่ในเกณฑ์ปกติทั้งหมด และในกลุ่มที่ได้รับยา sirolimus-based regimen แบ่งเป็นเพศหญิง 4 ราย และ เพศชาย 17 ราย อายุเฉลี่ย 47.71 ± 3.63 ปี และ 50.01 ± 2.31 ปี ตามลำดับ มีค่าทางชีวเคมี ได้แก่ ฮีโมโกลบิน, ฮีมาโตคริต, ความดันโลหิต, ค่าครีเอตินีน ค่ายูเรียไนโตรเจน อยู่ในเกณฑ์ปกติทั้งหมด จากข้อมูลพื้นฐานทางชีวเคมีของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเป็นข้อดีที่จะสามารถทำให้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มีความแปรปรวนน้อยลง

การศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ ADMA ในพลาสมาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาในกลุ่ม CNI-based regimen และ sirolimus-based regimen

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ ADMA ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ ADMA เท่ากับ 0.52 ± 0.02 $\mu\text{mol/L}$ และ 0.60 ± 0.02 $\mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาที่มี sirolimus มีระดับความเข้มข้นของ ADMA ในพลาสมาต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Potena และคณะปี 2008 [10] พบว่าการรักษาด้วยยา sirolimus มีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ ADMA และสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด การที่มีระดับ ADMA เพิ่มมากขึ้น จะมีความสัมพันธ์ทำให้เกิดภาวะ coronary intimal hyperplasia ซึ่งเกิดจากผนังด้านในของหลอดเลือดมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติ การศึกษาของ Morath และคณะ [9] กล่าวว่า

ยา sirolimus มีบทบาทในการเป็นยากดภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพช่วยลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ หลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีปัญหาโรคไตเรื้อรังเกิดขึ้นหลังการปลูกถ่ายไต (Chronic allograft nephropathy) เมื่อเทียบกับยาในกลุ่ม CNI เพราะยา sirolimus ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของไต (nephrotoxicity) และไม่มีกลไกที่ทำให้ความดันโลหิตสูง สำหรับกลไกที่ทำให้ลดการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดของ sirolimus ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาของ Esposito ปี 2009 [36] ได้ศึกษาในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต 1 ปี จำนวน 42 ราย พบว่าระดับ ADMA ลดลงในผู้ป่วยที่ได้รับยา sirolimus หรือ everolimus จึงกล่าวได้ว่า ADMA มีบทบาทต่อการเกิด endothelium dysfunction ในการพัฒนาไปเป็น acute rejection ได้ การศึกษาของ Sehgal และคณะ ในปี 1998 [31] และ Raichlin และคณะ ปี 2007 [12] พบว่า ยา sirolimus เป็นยาที่ยับยั้งการทำงานของกลไกในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ไม่ให้เซลล์มีการแบ่งตัวจากระยะ G₁ phase ไปยังระยะ S phase อาจเป็นไปได้ว่ายา sirolimus มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (antiproliferative)

การศึกษาของ Leiper และ Vallance ปี 2006 กล่าวว่า การเพิ่มขึ้นของ ADMA เนื่องจากการเพิ่มการทำงานของ protein arginine N-methyltransferases (PRMT) หรือยับยั้งการทำงานของ dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ ADMA [39] ดังกล่าวจะมี ผลยับยั้งกลไกการทำงานของ eNOS ทำให้การสร้าง NO ลดลง เกิดความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เยื่อหุ้ม (endothelial dysfunction) จึงทำให้ ADMA เป็นตัวชี้วัดที่สามารถบ่งบอกและทำนายได้ว่า ถ้ามีระดับ ADMA เพิ่มมากขึ้นในกระแสเลือด ผู้ป่วยรายนั้นจะมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและโรคอื่นๆตามมา จากการรายงานของ Bregenz ในปี 2008 [43] พบว่าถ้าระดับ ADMA ในเลือดสูงจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (arteriosclerosis), เบาหวาน, ความดันโลหิตสูง และภาวะหัวใจล้มเหลว เป็นต้น และจากการศึกษาของ Legendre และคณะ ปี 2003 [32] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบยา sirolimus กับ ยา cyclosporine ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา sirolimus มีความถี่ในการเกิดโรคความดันโลหิตสูงน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา cyclosporine และไม่พบความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา sirolimus เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา cyclosporine และจากข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยปลูกถ่ายไต (ตารางที่ 3) ในกลุ่มที่ได้รับยา sirolimus จะพิจารณาได้ว่ามีผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงถึง 57.14% ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยา CNI-based regimen มีผู้ป่วยเป็นโรคความดันโลหิตสูงเพียง 19.05% เป็นการแสดงผลและยืนยันได้ว่า ถึงแม้จะมีผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตร

ยาที่มี sirolimus เป็นโรคความดันโลหิตสูงมากกว่า แต่กลับมีระดับความเข้มข้นของ ADMA ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือดน้อยกว่าอีกกลุ่ม นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lenzen และคณะปี 2006 [73] ยังกล่าวระบุอีกว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ ADMA จะเป็นการชี้ชัดได้ว่าผู้ป่วยจะมีโอกาสสูงที่จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดได้ และยังสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเป็นโรคและอัตราการตาย ตลอดจนการเกิดความเสี่ยงของกราฟไตในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตด้วย [40]

จากการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ ADMA ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ SDMA และ arginine พร้อมกัน และจากการศึกษาผลการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ SDMA และ arginine ดังนี้

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ SDMA ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ SDMA เท่ากับ $0.73 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$ และ $0.83 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องจาก SDMA เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์มาพร้อมกับ ADMA แต่ไม่มีผลต่อกระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ (NOS) และเยื่อผิวของหลอดเลือดแดง และ SDMA ยังถูกขับออกทางไตเป็นส่วนมาก จึงไม่ได้เป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงของโรคหัวใจหลอดเลือด

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ arginine ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ arginine เท่ากับ $111.30 \pm 7.18 \mu\text{mol/L}$ และ $96.48 \pm 3.14 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ arginine มีบทบาทที่สำคัญในการช่วยส่งเสริมระบบหัวใจหลอดเลือด โดย arginine จะถูกร่างกายเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เพราะมีบทบาทหน้าที่ต่อเยื่อผิวหลอดเลือดจากปฏิกิริยา endothelium nitric oxide synthesis (eNOS) ซึ่งช่วยในการขยายหลอดเลือด และเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับหลอดเลือด ผลคือโลหิตหมุนเวียนดีและลดความดันโลหิต ทำให้ผู้ป่วยต่างๆ ได้รับออกซิเจนจากเลือดมากขึ้น [74] เมื่อพิจารณาจากกลไกของ arginine ในวัฏจักร citrulline-NO cycle จะพบว่าเมื่อมี arginine เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา NOS และเมื่อมี arginine เพิ่มมากขึ้นก็จะเปลี่ยนเป็นสารไนตริกออกไซด์ได้มากขึ้นเช่นกัน [39] จากวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ arginine สูง จึงอาจกล่าวได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus อาจจะมีแนวโน้มของหลอดเลือดที่มีสุขภาพดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาสูตรยา CNI-based regimen

การศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ nitric oxide ในพลาสมา ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาในกลุ่ม CNI-based regimen และ sirolimus-based regimen

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ NO ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ NO เท่ากับ $82.01 \pm 9.46 \mu\text{mol/L}$ และ $138.68 \pm 28.91 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ปกติการสร้างไนตริกออกไซด์ในร่างกาย ต้องอาศัยเอนไซม์ NOS เอนไซม์นี้มี 3 ชนิด คือ nNOS, eNOS และ iNOS [48] จากการศึกษาของ Tain และคณะ ปี 2008 [75] ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง 2 แบบ คือ allografts และ isografts ที่ได้รับ sirolimus เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำ graft ไปตรวจ histology และศึกษา endothelial (e)NOS และ neuronal (n)NOS protein พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ nNOS ในสมอง ส่วน medullary และมีการลดลงของ eNOS ในส่วนของเปลือกไต (cortical) จึงเห็นได้ว่าระดับของ NOS เปลี่ยนแปลงตามความจำเพาะของเนื้อเยื่อนั้นๆ การวิจัยนี้มีข้อจำกัดในการศึกษา ที่ไม่สามารถวัดระดับ NOS ที่จำเพาะได้ ระดับ NO ที่วัดได้เป็นค่าของ NO ทั้งหมดในเลือดซึ่งอาจจะไม่จำเพาะและไม่ไวพอที่จะแยกความแตกต่างของการได้รับยาในสองกลุ่ม

การศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาในกลุ่ม CNI-based regimen และ sirolimus-based regimen

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ homocysteine เท่ากับ $17.33 \pm 1.65 \mu\text{mol/L}$ และ $14.34 \pm 0.87 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในงานวิจัยของ Sessa และคณะ ปี 2009 [4] เปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยา sirolimus ร่วมกับ mycophenolate Mofeti และ steroids พบว่าระดับของ homocysteine สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยา cyclosporine ร่วมกับยา everolimus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปได้ว่าเมื่อมีการให้ cyclosporine ร่วมกันกับ everolimus ขนาดของยา cyclosporine ที่ใช้ลดลงจากขนาดที่ให้ตามปกติ ผลการวิจัยอื่นได้ผลที่แตกต่างออกไป ได้แก่งานวิจัยของ Farsetti และคณะปี 2010 [76] ได้ทำการประเมินผลกระทบของยา everolimus เปรียบเทียบกับยากดภูมิคุ้มกันชนิดอื่น เช่น cyclosporine, steroids และ mycophenolate ด้วยการวัดระดับ homocysteine ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต 1 ปี พบว่ากลุ่ม everolimus มีระดับ homocysteine ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ

ยากดภูมิคุ้มกันชนิดอื่นๆ กลไกของ homocysteine ต่อ vascular dysfunction ยังมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อยและยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับหน้าที่ความผิดปกติของ vascular endothelium และมีบทบาทต่อ oxidative stress [77] การสร้าง homocysteine ถูกควบคุมด้วยการรับประทานอาหาร โดยพบว่าถ้าผู้ป่วยมีภาวะบกพร่องของวิตามิน B6 กรดโฟลิก และวิตามิน B12 จะทำให้มีระดับของ homocysteine เพิ่มขึ้น ดังนั้นการวัดระดับ homocysteine จึงอาจต้องควบคุมตัวรบกวนต่างๆที่อาจส่งผลต่อค่าของสารนี้ในร่างกาย

การศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ total antioxidant capacity ในพลาสมาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยาในกลุ่ม CNI-based regimen และ sirolimus-based regimen

ผลของการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ total antioxidant capacity ในพลาสมา พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ total antioxidant เท่ากับ $1000.51 \pm 65.15 \mu\text{mol/L}$ และ $1072.40 \pm 51.67 \mu\text{mol/L}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยของ Shoskes และคณะปี 2001 [78] ศึกษาใน urine ของผู้ป่วยปลูกถ่ายไต delayed graft function พบว่ามีระดับของ total antioxidant สูงมากกว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไต early graft function [79, 80] การศึกษาของ El-Ghar และคณะปี 2006 ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ไม่มีโรคหัวใจหลอดเลือด แต่ถ้ามีระดับของ oxidative stress สูงก็จะส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดได้ในเวลาต่อมา และในการศึกษาของ Suyani และคณะปี 2009 [81] ได้ศึกษาในผู้ป่วย renal ischemia-reperfusion injury โดยกล่าวว่ายากดภูมิคุ้มกันในกลุ่ม mTOR มีประสิทธิภาพที่ดีและเป็นประโยชน์ต่อ cytokine และ oxidative stress จากการที่ reactive oxygen species (ROS) ถูกกระตุ้นให้ทำงานเพิ่มขึ้นได้ด้วย cytokine ชนิดต่างๆ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress ส่งผลให้ NO เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปกติแล้วในปริมาณน้อยๆ จะมีฤทธิ์เป็นสารสื่อทางสรีรวิทยาที่สำคัญมากต่อเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย แต่กลับมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ และเมื่อ NO จับกับ O_2^- ได้เป็น peroxynitrite (ONOO^-) จะยังมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้รุนแรงมาก ดังนั้นถ้าหากมีการป้องกัน โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้ reactive oxygen species ถูกกระตุ้น ก็จะส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress น้อยลง ก็จะช่วยป้องกันภาวะหลอดเลือดถูกทำลาย

การศึกษาระดับตัวชี้วัดความเสี่ยงหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคประจำตัวต่างๆ ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง, โรคเบาหวาน, โรคหัวใจขาดเลือด และโรคไขมันในเลือดสูง (ตารางที่ 5-8)

จากข้อมูลในการศึกษาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคประจำตัวต่างๆ ส่วนใหญ่ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหัวใจขาดเลือด และโรคไขมันในเลือดสูง ในกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus-based regimen มีระดับความเข้มข้นของ ADMA ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI-based regimen ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จึงกล่าวได้ว่า ADMA น่าจะเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดที่ดีที่สุด เพราะสามารถบ่งบอกความแตกต่างได้ชัดเจนทั้งในกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้งหมดและในกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีโรคประจำตัวต่างๆ ทั้งนี้การที่ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตมีระดับ ADMA ลดลงจะส่งผลดีทำให้ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus เปรียบเทียบกับกลุ่มยาที่ได้รับ CNI จะมีระดับของตัวชี้วัดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดแตกต่างกันอย่างไร พบว่าในกลุ่มของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มี sirolimus และกลุ่มที่ได้รับสูตรยาที่มี CNI มีระดับความเข้มข้นของ ADMA ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นยาในกลุ่ม sirolimus น่าจะมีผลในการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันได้ ผลการศึกษาที่ได้ อาจเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในการเลือกยากดภูมิคุ้มกันที่ถูกต้องและเหมาะสมในอนาคต เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันผลข้างเคียงจากยากดภูมิคุ้มกัน จนทำให้เสียชีวิตจากโรคหัวใจหลอดเลือด

ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้มีรูปแบบการวิจัยแบบ cross section ไม่ได้ติดตามผู้ป่วยไปข้างหน้าแบบระยะยาว ดังนั้นการวิจัยนี้จะบ่งบอกได้เฉพาะความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดต่อชนิดของยากดภูมิคุ้มกัน ณ เวลาที่ทำการศึกษา แต่ไม่สามารถยืนยันว่าการใช้ยากดภูมิคุ้มกันชนิดนั้นๆ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยกลุ่มนี้ นอกจากนี้การศึกษายังทำในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตเท่านั้น ผลการศึกษาน่าจะไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะชนิดอื่นๆ ได้โดยตรง

รายการอ้างอิง

1. Aakhus, S., Dahl, K., and Wideroe, T. E. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. Nephrol Dial Transplant. 14(1999): 648-54.
2. Ligtenberg, G., hene, R. J., Blankestijn, P. J., and Koomans, H. A. Cardiovascular risk factors in renal transplant patients: cyclosporin A versus tacrolimus. J Am Soc Nephrol. 12(2001): 368–373.
3. Tavares, P., Reis, F., Ribeiro, F., and Teixeira, F. Cardiovascular effects of cyclosporin treatment in an experimental model. Rev Port Cardiol. 2(2002): 141-155.
4. Sessa, A., *et al.* Immunosuppressive agents and metabolic factors of cardiovascular risk in renal transplant recipients. Transplant Proc. 41(2009): 1178-1182.
5. Kukongviriyapan, U. Vascular dysfunction in metabolic syndrome: the role of oxidant stress. Srinagarind Med J. 22(2007): 7-16.
6. Gerkens, J. F. Cyclosporine treatment of normal rats produces a rise in blood pressure and decreased renal vascular responses to nerve stimulation, vasoconstrictors and endothelium-dependent dilators. JPET. 250(1989): 1105-1112.
7. Futrakul, N. Glomerular endothelial dysfunction and microvascular disorder in chronic kidney disease Microcirc ann. 21(2005).
8. Krämer, B. K., *et al.* Cardiovascular risk estimates and risk factors in renal transplant recipients. Transplant Proc. 37(2005): 1868–1870.
9. Morath, C., *et al.* Sirolimus in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant. 22(2007): viii61–viii65.
10. Potena, L., *et al.* Asymmetric dimethylarginine and cardiac allograft vasculopathy progression: modulation by sirolimus. Transplantation. 85(2008): 827-33.

11. Yilmaz, M. I., *et al.* Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. Transplantation. 80(2005): 1660-6.
12. Raichlin, E., *et al.* Conversion to sirolimus as primary immunosuppression attenuates the progression of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. Circulation. 116(2007): 2726-33.
13. Dupont, P., and Warrens, A. N. The evolving role of sirolimus in renal transplantation. Qjm. 96(2003): 401-9.
14. Joannides, R., *et al.* Comparative effects of sirolimus and cyclosporin on conduit arteries endothelial function in kidney recipients. ESOT. 23(2010): 1135–1143.
15. Boger, R. ADMA: A mediator of endothelial dysfunction and marker of vascular disease. Vasc Med. (2004).
16. Solomon, B. P., and Duda, C. T. Homocysteine determination in plasma. Curr. Sep. 17(1998).
17. Wilcken, D. E. L., Gupta, V. J., and Reddy, S. G. Accumulation of sulphur-containing amino acids including cysteine-homocysteine in patients on maintenance haemodialysis. Clin Sci. 58(1980): 427-430.
18. Guldener, C. V. Homocysteine and the kidney. Curr Drug Metab. 6(2005): 23-6.
19. El-Ghar, S., Qureshi, M., Shoker, A., and Prasad, K. Oxidative stress in renal transplant patients who develop cardiovascular disease J Cardiovasc Pharmacol Ther. 11(2006): 203-210.
20. Bernard, M., *et al.* Organ Transplantation. Inserm. (2007).
21. Charoenwong, P., and Hirankarn, N., Basic and Clinical Immunology. Microbiology, Medicine Chulalongkorn University. 2552
22. Chaeychomsri, W., Transplantation immunology. Zoology, Science Kasetsart university. 2007
23. Julasarekul, W. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil after renal allografttransplantation in thai recipients. NSTDA. (2543): 23-24.

24. Cerilli, J., Brasile, L., Galouzis, T., Lempert, N., and Clarke, J. The vascular endothelial cell antigen system. Transplantation. 39(1985): 286-289.
25. Diasio, R. B., and LoBuglio, A. F., Immunomodulators: Immunosuppressive agent and immunostimulants. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 11th McGraw-Hill. 2006
26. Babuto, J. A. M., Eva, M. H., and Salmon, S. E. Immunopharmacology. Basic & Clinical Pharmacology. Kutzung B. 10th(2007).
27. Kahan, B. D. Cyclosporin. N Engl J Med. 321(1989): 1725-38.
28. Trakarnvanich, T., and Eiam-ong, S. Cylosporin. J Kidney Found Thai. (2539): 1042-1061.
29. Ouisuwan, S. Effects of cyclosporin a (CsA) on baroreceptor reflex and renal function : role of angiotensin II. . Vet. sci. (2542): 1993-2004.
30. Peddi, V. R., and First, M. R. Recent advances in immunosuppressive therapy for renal transplantation. Semin Dial. 14(2001): 218-22.
31. Sehgal, S. N. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. Clin Biochem. 31(1998): 335-40.
32. Legendre, C., Campistol, J. M., Squifflet, J. P., and Burke, J. T. Cardiovascular risk factors of sirolimus compared with cyclosporine: early experience from two randomized trials in renal transplantation. Transplant Proc. 35(2003): 151S-153S.
33. Zhao, L., *et al*. Low-dose oral sirolimus reduces atherogenesis, vascular inflammation and modulates plaque composition in mice lacking the LDL receptor. Br J Pharmacol. 156(2009): 774-85.
34. Kasiske, B. L., Guijarro, C., Massy, Z. A., Wiederkehr, M. R., and Ma, J. Z. Cardiovascular disease after renal transplantation. J Am Soc Nephrol. 7(1996): 158-65.
35. Abedini, S., *et al*. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. Kidney Int. (2009).

36. Esposito, C., *et al.* Increased asymmetric dimethylarginine serum levels are associated with acute rejection in kidney transplant recipients. Transplant Proc. 41(2009): 1570-3.
37. Ueda, S., Yamagishi, S., Kaida, Y., and Okuda, S. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. Nephrology (Carlton). 12(2007): 582-90.
38. Cable, D. G., Celotto, A. C., Evora, P. R., and Schaff, H. V. Asymmetric dimethylarginine endogenous inhibition of nitric oxide synthase causes differential vasculature effects. Med Sci Monit. 15(2009): BR248-53.
39. Leiper, J. M., and Vallance, P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). Eur J Clin Pharmacol. 62(2006): 33-38.
40. Abedini, S., *et al.* Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. Kidney Int. 77(2009): 44-50.
41. Teerlink, T., Nijveldt, R. J., Jong, S. D., Paul, A. M., and Leeuwent, v. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological sample by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 303(2002): 131-137.
42. Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z., and Wilcox, C. S. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(2007): H3227-45.
43. Bregenz, L. C. ADMA 2008 4th International Symposium on ADMA [online]. 2008. Available from: <http://www.allaboutadma.com>
44. Teerlink, T. ADMA metabolism and clearance. Vasc Med. 10 Suppl 1(2005): S73-81.
45. Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288(1980): 373-376.

46. Lowenstein, C. L., Dincman, J. L., and Snyder, S. H. Nitric oxide: A physiologic mesanger. Ann Inter Med. 120(1994): 227-37.
47. Thuillez, C., and Richard, V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. J Hum Hypertens. 19 Suppl 1(2005): S21-5.
48. Kaitwatcharachai, C., and Eiam-ong, S. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor, prostacyclin and endothelium-derived contracting factor (EDCF). J Kidney Found Thai. (2539): 1150.
49. Fiedler, L. The DDAH/ADMA pathway is a critical regulator of NO signalling in vascular homeostasis. Cell Adh Migr. 2(2008): 149-50.
50. du Vigneaud, V., Ressler, C., and Rachele, J. R. The biological synthesis of labile methyl groups Science 112(1950): 267-271.
51. Refsum, H., Ueland, P. M., Nygard, O., and Vollset, S. E. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med. 49(1998): 31-62.
52. Potter, K., Hankey, G. J., Green, D. J., Eikelboom, J. W., and Arnolda, L. F. Homocysteine or renal impairment: which is the real cardiovascular risk factor? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28(2008): 1158-64.
53. van Guldener, C. Homocysteine and the kidney. Curr Drug Metab. 6(2005): 23-6.
54. Robinson, K. Renal disease, homocysteine, and cardiovascular complications. Circulation. 109(2004): 294-295.
55. Moustapha, A., Naso, A., and Nahlawi, M. Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end stage renal disease. Circulation. 97(1998): 138-141.
56. Perna, A. F., Ingrosso, D., and Lombardi, C. Possible mechanisms of homocysteine toxicity. Kidney Int Suppl. 63(2003): S137-S140.
57. van der Griend, R., Biesma, D. H., and Banga, J. D. Hyperhomocysteinemia as a cardiovascular risk factor: an update. Neth J Med. 56(2000): 119-30.
58. Willcox, J. K. Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit Rev Food Sci Nutr. 44(2004): 275-295.

59. Blackwell, S., O'Reilly, D. S., and Talwar, D. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. Eur J Clin Invest. 37(2007): 364-71.
60. U.S. Department of health and human services FDA, CDER, CVM. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. (2001).
61. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., and Fein, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. Sensors. 3(2003): 276-284.
62. Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J. R., and Jansen, P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin Chem. 41(1995): 892-6.
63. Ghasemi, A., Hedayati, M., and Biabani, H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. J medical Sci Research. 2(2007).
64. Moncada, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. Acta physiol. Scand. 145(1992): 201-227.
65. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB Journal. 6(1992): 3051-3064.
66. Green, L. C., Wagner, D. A., and Glogowski, J. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126(1982): 131-138.
67. Nims, R. W., Darbyshire, J. F., and Saavedra, J. E. Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solution. Methods. 7(1995): 48-54.
68. Christine, M. P., Della, T., Jessie, S., and Shelley, R. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott IMx analyzer and an HPLC assay with Internal standardization. Clin Chem. No.1(1999): 45.
69. Thongnopnua, P., Advanced biomedical analysis. Pharmaceutical chemistry, Chulalongkorn university. 2553
70. Abbott. Homocysteine. Archit Syst. 1-877-4ABBOTT(2008).

71. Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem. 239(1996): 70–76.
72. Griffina, S. P., and Bhagooli, R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302(2004): 201-211.
73. Lenzen, H., Tsikas, D., and Böger, R. H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the risk for coronary heart disease: the multicenter cardiac study. Eur J Clin Pharmacol. 62(2006): 45-49.
74. Wu, G., and Morris, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J. 336(1998): 1-17.
75. Tain, Y.-L., *et al.* Renal cortex neuronal nitric oxide synthase in response to rapamycin in kidney transplantation. Nitric Oxide. 18(2008): 80-86.
76. Farsetti, S., *et al.* Lower homocysteine levels in renal transplant recipients treated with everolimus: a possible link with a decreased cardiovascular risk? Transplant Proc. 42(2010): 1381–1382.
77. Lentz, S. R. Homocysteine and vascular dysfunction. Life Sci. 61(1997): 1205-15.
78. Shoskes, D. A., *et al.* Oxidant stress and antioxidant capacity in urine of renal transplant recipients predict early graft function. Transplant Proc. 33(2001): 984.
79. Jones, E. A., Shahed, A., and Shoskes, D. A. Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. UROLOGY. 56(2000): 346-351.
80. Sugino, N., *et al.* Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum: Induction by prolactin and placental lactogens. Biol Reprod. 59(1998): 599–605.
81. Suyani, E., *et al.* Effects of everolimus on cytokines, oxidative stress, and renal histology in ischemia-reperfusion injury of the kidney. Ren Fail. 31(2009): 698–703.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

คำอธิบายที่มาของตัวอย่างพลาสมา

ประชากรที่ศึกษา

ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตจากงานวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ของยากดภูมิคุ้มกันต่อระดับ asymmetric dimethylarginine ในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไต (Immunosuppressive therapy in renal transplant recipients: relationships to plasma levels of asymmetric dimethylarginine)

เกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria)

ผู้วิจัยจะดำเนินการ recruit ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไตที่มาตรวจติดตามที่คลินิกโรคไตของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัยมีดังนี้

- ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไต อายุ 18-70 ปี
- เพศชายและหญิง
- รับประทานยากดภูมิคุ้มกัน CNI-based หรือ sirolimus-based with CSA minimisation โดยได้รับยาอย่างสม่ำเสมอและไม่มีการปรับขนาดยาหรือเปลี่ยนชนิดยากดภูมิคุ้มกันอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเข้าร่วมการวิจัย

เกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการ (Exclusion criteria)

- มีประวัติ familial hypercholesterolaemia
- Drug abuse or alcoholic
- Pregnancy

ขั้นตอนการวิจัย

เก็บข้อมูลจากผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไตสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นชนิด CNI-based (ได้รับยา CSA หรือ tacrolimus ร่วมกับ azathioprine หรือ mycophenolate mofetil และ prednisolone) และกลุ่มที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นชนิด sirolimus-based with CSA minimisation (ได้รับยา sirolimus ร่วมกับยา CSA ในขนาดต่ำมาก และ prednisolone)

การเก็บตัวอย่างเลือด

ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดจากที่มาตรวจติดตาม ณ คลินิกผู้ป่วยนอกปกติ โดยปริมาณเลือดคือ 10 ซีซี จะเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้หลอดสุญญากาศที่มี EDTA เคลือบอยู่ในหลอดเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว หลังจากนั้นนำเลือดไปปั่นแยก plasma และแบ่งเก็บเป็นสองหลอดที่อุณหภูมิ -70°C และนำไปวิเคราะห์ในโครงการวิจัยต่อไป

เกณฑ์การถอนตัวออกจากการศึกษา

1. ผู้ป่วยเกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่แพทย์เห็นควรให้ออกจากการศึกษา
2. ผู้ป่วยไม่ปฏิบัติตามข้อกำหนดของการศึกษา
3. ผู้ป่วยต้องการถอนตัวออกจากการศึกษา

การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ในการศึกษา ผู้วิจัยจะดำเนินการในขั้นตอนการขอความยินยอมจากอาสาสมัคร/ผู้ป่วย โดยให้ข้อมูลด้วยการอธิบายและให้เอกสารคำอธิบายเพื่อให้อาสาสมัคร/ ผู้ป่วยเข้าใจเกี่ยวกับรายละเอียดของการวิจัย ได้แก่ ขั้นตอนที่ผู้วิจัยจะปฏิบัติต่ออาสาสมัคร/ ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย ความเสี่ยงและประโยชน์ที่อาสาสมัคร/ ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยอาจได้รับ การเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร/ ผู้ป่วยผู้เข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะให้เวลาแก่อาสาสมัคร/ ผู้ป่วยในการตัดสินใจยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความสมัครใจ และลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

การศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มีซัยโรลิมัส

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาวณัฐพัชร นามจัด

ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 089-4971957

ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา

ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 081-4219164

ชื่อ อาจารย์แพทย์หญิงปาจรรย์ ลิลิตการตกุล

ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 081-6134664

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ในการขออนุญาตในการนำตัวอย่างเลือดของท่านที่เก็บจากงานวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ของยากดภูมิคุ้มกันต่อระดับอะซิเมเทริก ไดเมทิลอาร์จินีนในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไตไปวิเคราะห์วิจัยเพิ่มเติมในโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มีซัยโรลิมัส อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านจะตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆเพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของผู้ทำวิจัย หรือผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือด ได้แก่ ระดับอะซิเมเทริก ไดเมทิลอาร์จินีน ไนตริกออกไซด์ ไฮโมซิสเตอิน และสารอนุมูลอิสระโดยรวม ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มีซัยโรลิมัส

จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 42 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างเลือดของท่านที่ได้มีการเก็บตัวอย่างไปแล้วจากโครงการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ของยากดภูมิคุ้มกันต่อระดับอะซิเมเทริก ไดเมทิลอาร์จินีน ในเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไตไปทำการวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อตรวจวัดระดับของอะซิเมเทริก ไดเมทิลอาร์จินีน ไนตริกออกไซด์ ไฮโมซิสเตอิน และสารอนุมูลอิสระโดยรวม เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของสารดังกล่าวในการเป็นตัวชี้วัดโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต โดยทั้งนี้จะไม่มีการเจาะเลือดใดๆเพิ่มเติม

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการศึกษาในครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาอาจเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในการเลือกยากดภูมิคุ้มกันที่ถูกต้องและเหมาะสมในอนาคต เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันผลข้างเคียงจากยากดภูมิคุ้มกัน จนทำให้เสียชีวิตจากโรคหัวใจหลอดเลือด การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น หรืออาจจะลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่าน จะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
4. ประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้นท่านจะได้รับสำเนาเอกสารยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
7. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านมีข้อสงสัยหรือต้องการทราบข้อมูลเพิ่มเติม ท่านสามารถติดต่อโดยตรงได้ที่ นางสาวณัฐพัชร นามจัด ผู้วิจัยหลักในโครงการวิจัยนี้ หรือถ้าท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิตล ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

ภาคผนวก ค

ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา

การวิจัยเรื่อง การศึกษาตัวชี้วัดความเสี่ยงโรคหัวใจหลอดเลือดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ได้รับสูตรยาที่มีชัยโรลิมีส

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และวันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีวิจัย ตลอดจนประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย หรือผู้ที่ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้ร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย ผลหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้ร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้วิจัย
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....



ภาคผนวก ง

Protocol Number 212/53

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

Approval of Documents related to Study Protocol

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : A STUDY OF CARDIOVASCULAR RISK MARKERS IN RENAL TRANSPLANTS RECIPIENTS RECEIVING SIROLIMUS BASED REGIMEN


Study Code : -

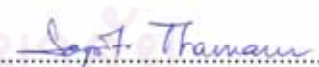
Principal Investigator : Miss Nuttaphat Namjud

Study Center : Department of Pharmacology
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Document Approval :

1. Protocol Version 2.0 Dated 6 September 2010
2. คำอธิบายที่มาของตัวอย่างพลาสมา Version 2.0 Dated 6 September 2010

Signature: 
(Professor Tada Sueblinvong MD)
Chairperson of
The Institutional Review Board

Signature: 
(Associate Professor Sopit Thamaree)
Committee and Secretary of
The Institutional Review Board

Date of Approval : November 11, 2010

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

ภาคผนวก จ

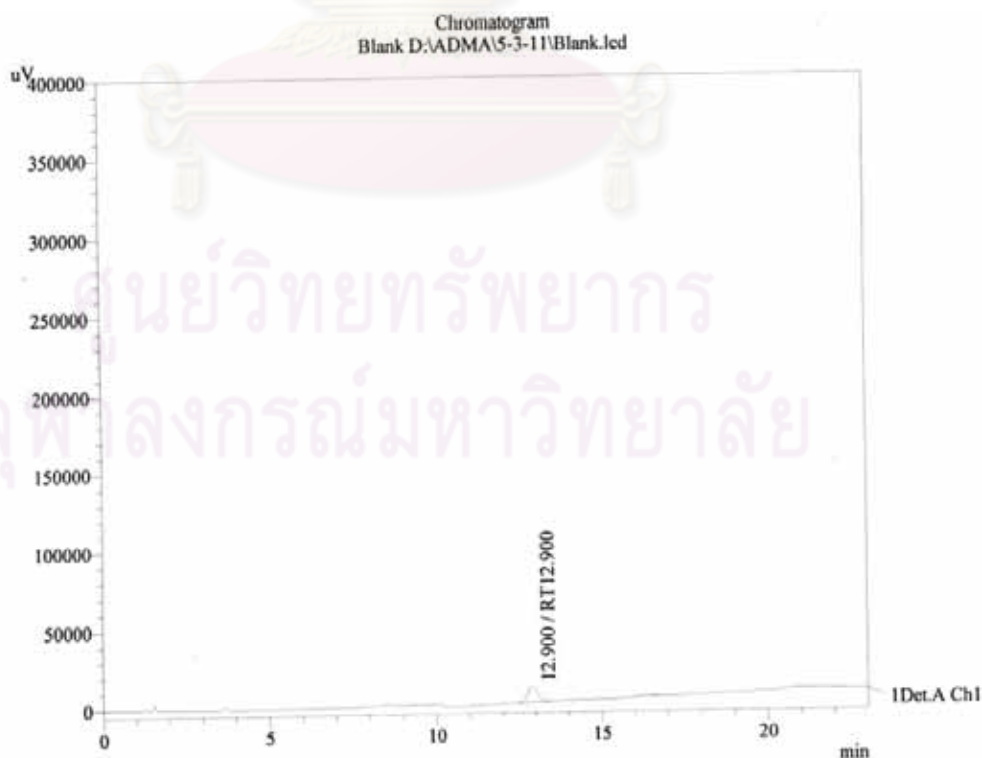
การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

วิธีการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธี เพื่อเป็นการยืนยันผลของข้อมูลที่ได้ว่ามีความถูกต้อง เชื่อถือได้ อ้างอิงตาม USFDA Guideline [60]

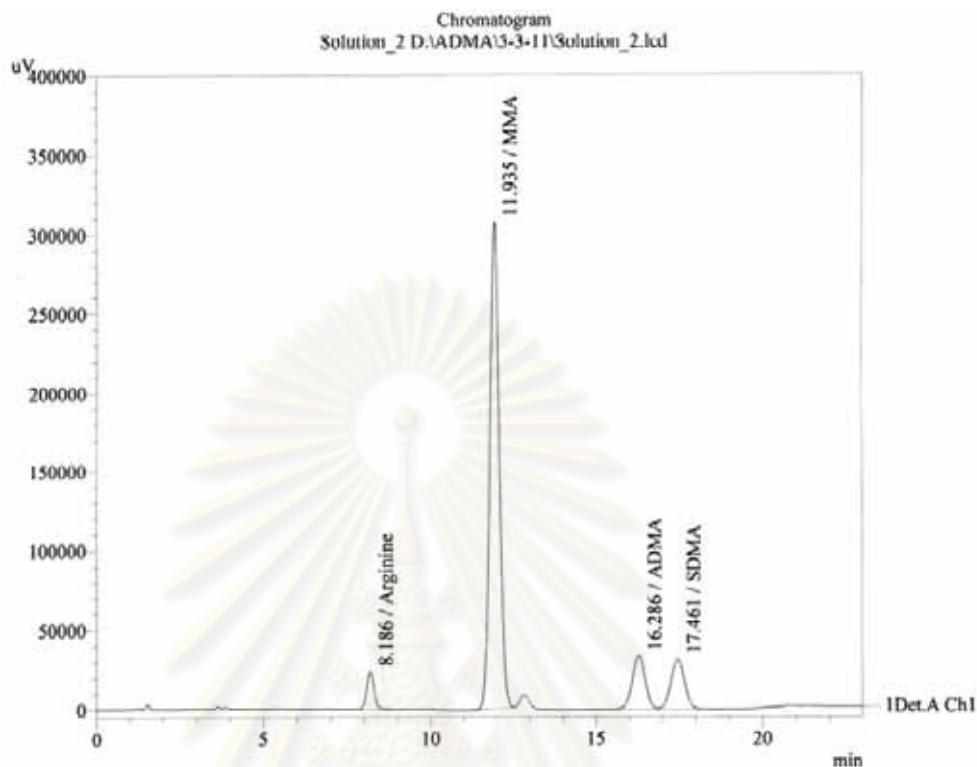
ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ระดับ ADMA, SDMA และ arginine ในสารละลาย

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ (Specificity / selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม ใน (ภาพที่ 30) พบว่าค่า retention time ของ ADMA, SDMA และ ในน้ำ โดย arginine มีค่า retention time อยู่ระหว่าง 8.186 ± 0.5 นาที, ADMA มีค่า retention time อยู่ระหว่าง 16.286 ± 0.5 นาที และ SDMA มีค่า retention time อยู่ระหว่าง 17.461 ± 0.5 นาที ส่วน internal standard MMA มีค่า retention time อยู่ระหว่าง 11.935 ± 0.5 นาที (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 30 สารละลายที่ไร้สารตัวอย่าง (Blank solution)



ภาพที่ 31 สารละลายที่มี arginine, ADMA, SDMA และ MMA

พบว่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสติก โดยการวิเคราะห์ blank samples จำนวนอย่างน้อย 6 ตัวอย่างโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ผลโครมาโตแกรมของ Arginine, ADMA และ SDMA ไม่ถูกรบกวน

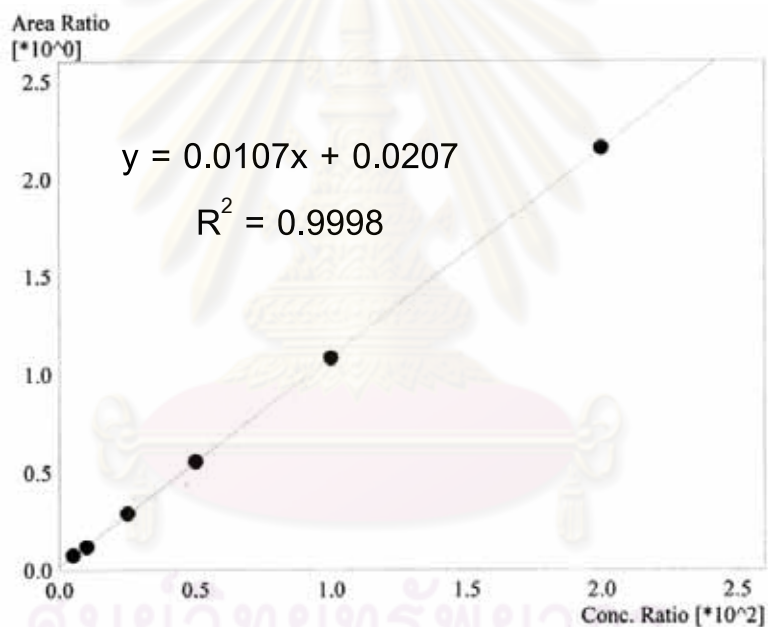
2. การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้ของ arginine, ADMA และ SDMA Lower limit of quantification (LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ arginine, ADMA และ SDMA ในน้ำที่สามารถวิเคราะห์ได้ 5 ไมโครโมลาร์, 0.2 ไมโครโมลาร์ และ 0.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยมีค่า precision แสดงด้วยค่า %CV ของ arginine เท่ากับ 6.30 ($n=5$) และค่า % accuracy เท่ากับ 94.69 ± 5.96 ค่า %CV ของ ADMA เท่ากับ 12.17 ($n=5$) และค่า % accuracy เท่ากับ 103.20 ± 12.56 และค่า %CV ของ SDMA เท่ากับ 3.39 ($n=5$) และค่า % accuracy เท่ากับ 99.09 ± 3.36 ตามลำดับ

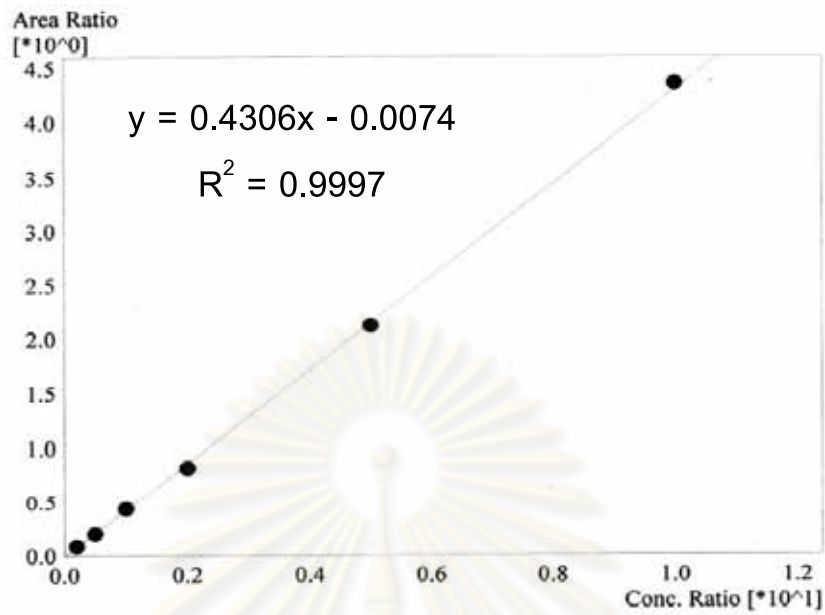
พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้ คือ 5, 0.2 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อคำนวณ % accuracy และหาค่า precision (%CV) ค่า % accuracy อยู่ระหว่าง 80-120 และ %CV ไม่เกิน 20 %

3. Linearity/Standard calibration curve

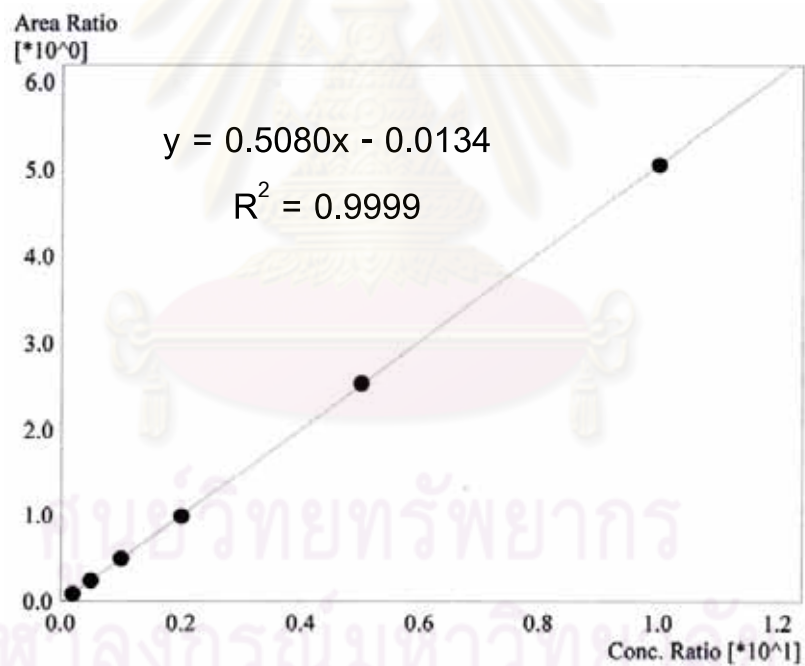
กราฟมาตรฐานของสารละลาย arginine, ADMA และ SDMA ได้ค่า $y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ X เป็นค่าความเข้มข้นของ arginine, ADMA และ SDMA ในสารละลาย ค่า coefficient of determination (R^2) ของ arginine, ADMA และ SDMA เท่ากับ 0.9998, 0.9997 และ 0.9999 ตามลำดับ



ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานของ arginine ในสารละลาย



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานของ ADMA ในสารละลาย



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานของ SDMA ในสารละลาย

ความเข้มข้นของ arginine, ADMA และ SDMA ที่ระดับต่างๆ โดยใช้ regression equation และคำนวณหาค่า coefficient of determination (r^2) ค่า r^2 ที่คำนวณได้มีค่า 0.9998, 0.9997 และ 0.9999 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.99 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และค่าความเข้มข้นที่วัดได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นไม่เบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่เติมลงไปเกิน 15%

4. Accuracy ความถูกต้องของการวิเคราะห์

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมา แสดงด้วยค่า % accuracy ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง พบว่าค่าเฉลี่ยความถูกต้องของการวิเคราะห์ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมา 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 98.87 ± 1.03 , 94.87 ± 5.47 และ 99.45 ± 0.16 ตามลำดับ (ตารางที่ 9-14)

พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับของ arginine, ADMA และ SDMA คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HOQ) ค่าความถูกต้อง % accuracy ที่ได้อยู่ระหว่าง 85-115% และที่ LLOQ อยู่ระหว่าง 80-120% แสดงว่าวิเคราะห์วิธีมีความถูกต้องเชื่อถือได้

5. Precision ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมา แบ่งเป็นการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day precision) และวิเคราะห์ในต่างวันกัน (inter-day precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ค่า %CV เฉลี่ยของการวิเคราะห์ arginine, ADMA และ SDMA ในวันเดียวกันเท่ากับ 0.68, 0.85 และ 0.84 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ Arginine, ADMA และ SDMA ต่างวันกันเท่ากับ 2.54, 10.36 และ 2.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 9-14)

ทำการสกัดและวิเคราะห์สาร arginine, ADMA และ SDMA โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ภายในรอบการดำเนินการวิเคราะห์เดียวกัน (intra-day) และรอบการดำเนินการวิเคราะห์ต่างกัน (inter-day) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) ค่า % CV ไม่เกิน 15% และ LLOQ ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิเคราะห์วิธีมีความแม่นยำ เที่ยงตรง

6. Recovery of extraction การหาประสิทธิภาพในการสกัด

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมาโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LOQ) กลาง (MQC) และสูง (HOQ) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน คำนวณ % recovery มีค่าเท่ากับ 98.67 ± 4.92

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมาโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LOQ) กลาง (MQC) และสูง (HOQ) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน คำนวณ % recovery มีค่า 98.67 ± 4.92 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 100% และไม่ต่ำกว่า 60%

ตารางที่ 9 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ arginine ในสารละลายในวันเดียวกัน

| Accuracy & Precision Arginine | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 15 ($\mu\text{mol/L}$) | 75 ($\mu\text{mol/L}$) | 150 ($\mu\text{mol/L}$) |
| No. 1 | 14.8355 | 73.4957 | 146.5511 |
| No. 2 | 14.8997 | 74.2066 | 146.8381 |
| No. 3 | 14.6171 | 73.5608 | 145.4411 |
| Average | 14.7841 | 73.7544 | 146.2768 |
| % accuracy | 98.56 ± 0.15 | 98.34 ± 0.39 | 97.52 ± 0.74 |
| %CV | 1.00 | 0.53 | 0.50 |

ตารางที่ 10 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ADMA ในสารละลายในวันเดียวกัน

| Accuracy & Precision ADMA | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 1.5 ($\mu\text{mol/L}$) | 4 ($\mu\text{mol/L}$) | 9 ($\mu\text{mol/L}$) |
| No. 1 | 1.4974 | 4.0038 | 8.8761 |
| No. 2 | 1.4814 | 3.8554 | 8.8992 |
| No. 3 | 1.4880 | 3.9261 | 8.8848 |
| Average | 1.4889 | 3.9284 | 8.8867 |
| % accuracy | 99.26 ± 0.01 | 98.21 ± 0.07 | 98.74 ± 0.01 |
| %CV | 0.54 | 1.89 | 0.13 |

ตารางที่ 11 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ SDMA ในสารละลายในวันเดียวกัน

| Accuracy & Precision SDMA | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 0.6 ($\mu\text{mol/L}$) | 4 ($\mu\text{mol/L}$) | 8 ($\mu\text{mol/L}$) |
| No. 1 | 0.6001 | 3.9431 | 8.0633 |
| No. 2 | 0.6027 | 3.8918 | 8.1682 |
| No. 3 | 0.5900 | 3.9048 | 8.0687 |
| Average | 0.5976 | 3.9132 | 8.1001 |
| % accuracy | 99.60 ± 0.01 | 97.83 ± 0.03 | 101.25 ± 0.06 |
| %CV | 1.12 | 0.68 | 0.73 |

ตารางที่ 12 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ arginine ในสารละลายในต่างวัน

| Accuracy & Precision arginine | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 15 ($\mu\text{mol/L}$) | 75 ($\mu\text{mol/L}$) | 150 ($\mu\text{mol/L}$) |
| Day 1 | 14.9831 | 73.7544 | 146.9041 |
| Day 2 | 15.3867 | 72.9352 | 146.2768 |
| Day 3 | 14.7841 | 73.4124 | 159.7298 |
| Average | 15.0513 | 73.3673 | 150.9702 |
| % accuracy | 100.34 ± 0.31 | 97.82 ± 0.41 | 100.65 ± 7.59 |
| %CV | 2.04 | 0.56 | 5.03 |

ตารางที่ 13 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ADMA ในสารละลายในต่างวัน

| Accuracy & Precision ADMA | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 1.5 ($\mu\text{mol/L}$) | 5 ($\mu\text{mol/L}$) | 9 ($\mu\text{mol/L}$) |
| Day 1 | 1.4889 | 4.8490 | 8.8867 |
| Day 2 | 1.3943 | 4.4823 | 8.9442 |
| Day 3 | 1.1148 | 3.8796 | 8.1132 |
| Average | 1.3327 | 4.4036 | 8.6480 |
| % accuracy | 88.84 \pm 0.19 | 88.07 \pm 0.49 | 96.09 \pm 0.46 |
| %CV | 14.60 | 11.12 | 5.37 |

ตารางที่ 14 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ SDMA ในสารละลายในต่างวัน

| Accuracy & Precision SDMA | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Level | Low | Medium | High |
| Concentrations | 0.6 ($\mu\text{mol/L}$) | 4 ($\mu\text{mol/L}$) | 8 ($\mu\text{mol/L}$) |
| Day 1 | 0.5976 | 3.9780 | 8.1001 |
| Day 2 | 0.5986 | 4.0975 | 8.1121 |
| Day 3 | 0.5835 | 3.9132 | 7.6030 |
| Average | 0.5932 | 3.9962 | 7.9384 |
| % accuracy | 98.87 \pm 0.01 | 99.91 \pm 0.09 | 99.23 \pm 0.29 |
| %CV | 1.43 | 2.34 | 3.66 |

Study Phase Validation

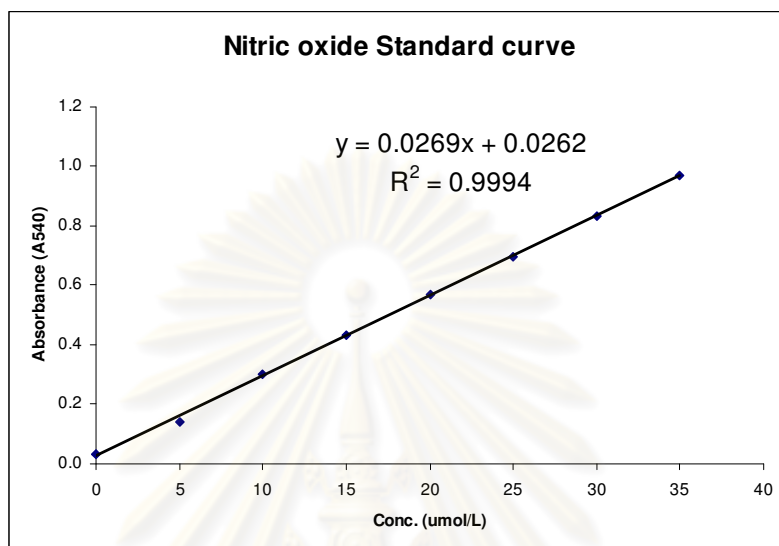
เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ และทำการวิเคราะห์ Quality control samples (QC sample) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (LQC), กลาง (MOQ) และสูง (HQC) ความเข้มข้นละ 2 ชุด พบว่า QC Samples มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

จากการยืนยันความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมาด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง มีความถูกต้องแม่นยำ เพียงตรง และมีประสิทธิภาพในการสกัดดีมาก ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ ที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ arginine, ADMA และ SDMA ในพลาสมาได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nitric oxide ในพลาสมา



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานของ nitric oxide

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ nitric oxide (NOx) ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % accuracy ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 98.95 ± 1.22

ค่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nitric oxide (NOx) ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % CV ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ในวันเดียวกัน เท่ากับ 0.60 ± 1.21 และในต่างวันกัน เท่ากับ 1.17 ± 0.97 ตามลำดับ

1.3 ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ homocysteine ในพลาสมา

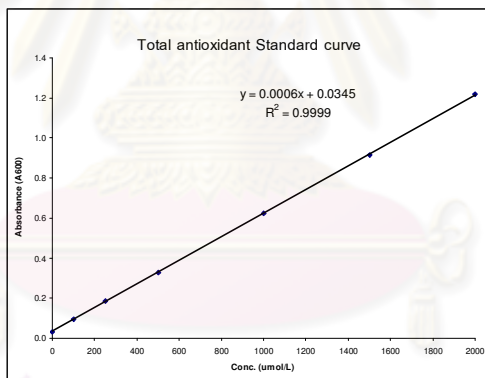
ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ homocysteine ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % accuracy ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 91.2%

ค่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ homocysteine ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % CV ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ในวันเดียวกัน เท่ากับ 3.20% และในต่างวันกันเท่ากับ 4.32% ตามลำดับ

1.4 ผลการศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ total antioxidant capacity ในพลาสมา



ภาพที่ 36 แสดงกราฟมาตรฐานของ total antioxidant capacity

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ total antioxidant capacity ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % accuracy ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 96.24 ± 2.38

ค่าความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ total antioxidant capacity ในพลาสมา แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % CV ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ในวันเดียวกัน เท่ากับ 2.75 ± 1.92 และในต่างวันกันเท่ากับ 1.96 ± 0.81 ตามลำดับ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐพัชร นามจัด เกิด 17 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่โรงพยาบาลราชบุรี จังหวัดราชบุรี เติบโตที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาอาหารและโภชนาการ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

ประสบการณ์ทำงาน

- Guest service manager trainee Barrier Island Resort Station NC,USA 2005
- Apprentice Chef Trade Winds Chinese & American Restaurant NC,USA 2005
- Childcare Assistance Trainee NC,USA 2005
- Internship Program with the Education Department, British Council Thailand 2006
- Presentation Sale Thai Edible Oil Limited (King rice bran oil) 2006
- Pharmaceutical Accounting Officer/Document Controller Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, King Chulalongkorn Memorial Hospital 2008

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย