

การศึกษาหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกต่อพยาธิสภาพของไตภายหลังการปลูกถ่ายไตโดยใช้  
วายโครโมโซมอินไซโตไฮบริไดเซชัน



นายพิเชฐ ห่อวิจิรัตน์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

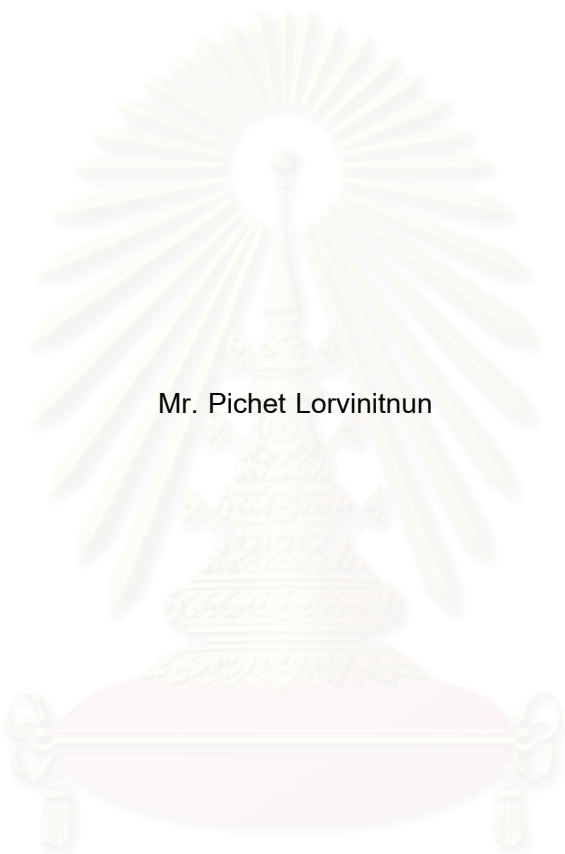
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVIDENCE OF BONE MARROW CELLS IN HISTOPATHOLOGY OF RENAL GRAFT BY  
Y-CHROMOSOME IN SITU HYBRIDIZATION



Mr. Pichet Lorvinitnun

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn university



พิธีกรรม หล่อวินิจนันท์ : การศึกษาหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกต่อพยาธิสภาพของไตภายหลังการปลูกถ่ายไตโดยใช้ วายโครโมโซมอินไซโตไฮบริดเซชัน (EVIDENCE OF BONE MARROW CELLS IN HISTOPATHOLOGY OF RENAL GRAFT BY Y-CHROMOSOME IN SITU HYBRIDIZATION) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. นพ. เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ อ. ที่ปรึกษาร่วม ผศ.พญ. วิภาวี กิตติโกวิท ผศ.พญ. มนต์กานต์ ต้นสถิตย์, 92 หน้า

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเซลล์ไขกระดูกสามารถเดินทางไปยังเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายและทำหน้าที่เปรียบเสมือนเซลล์ซ่อมแซมอวัยวะต่างๆเหล่านั้น ในแบบจำลองของพยาธิสภาพของไตภายหลังจากการทำให้ไตขาดเลือดไปเลี้ยง ยังไม่มีหลักฐานเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าเซลล์ไขกระดูกสามารถที่จะเข้าไปอยู่และเปลี่ยนแปลงสภาพตัวเองไปเป็นเซลล์เยื่อหุ้มไตแทนที่เซลล์เยื่อหุ้มไตเดิมที่หลุดลอกออกไปได้หรือเปล่า คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกว่าสามารถไปปรากฏอยู่ที่ไตได้หรือเปล่า โดยอาศัยแบบจำลองของการปลูกถ่ายไตในผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิง

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิงจำนวน 8 ชิ้น ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตด้วยเหตุผลทางการแพทย์ คณะผู้วิจัยได้ใช้ชิ้นเนื้อไต 1 ชิ้นของผู้ป่วยชายที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายไต ไว้เป็นกลุ่มควบคุมในเชิงบวก และใช้ชิ้นเนื้อไต 1 ชิ้นของผู้ป่วยหญิงที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายไต และชิ้นเนื้อไต 2 ชิ้นของผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตและได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตวันแรกภายหลังการปลูกถ่ายไต ไว้เป็นกลุ่มควบคุมในเชิงลบ หลังจากนั้นทำการตรวจหาวายโครโมโซมโดยใช้วิธีอินไซโตไฮบริดเซชัน วายโครโมโซมที่ตรวจพบ จะปรากฏเป็นจุดสีเขียวอยู่บนนิวเคลียสของเซลล์เยื่อหุ้มไต และทำการนับจำนวนวายโครโมโซมที่ตรวจพบต่อนิวเคลียสของเซลล์เยื่อหุ้มไต 1000 เซลล์

ผลการศึกษา คณะผู้วิจัยสามารถตรวจพบวายโครโมโซมจากชิ้นเนื้อไตที่มีพยาธิสภาพเป็น Acute tubular necrosis (0.71 เปอร์เซ็นต์) Borderline tubulointerstitial rejection (0.36 เปอร์เซ็นต์) และ acute cellular rejection (2.5 เปอร์เซ็นต์) และตรวจไม่พบวายโครโมโซมจากชิ้นเนื้อไตที่มีพยาธิสภาพเป็น chronic allograft nephropathy, cyclosporine nephrotoxicity และ IgA nephropathy

โดยสรุปมีหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกในพยาธิสภาพของไตชนิด Acute kidney injury ภายหลังการปลูกถ่ายไต แต่ไม่พบหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกในพยาธิสภาพของไตชนิด chronic kidney injury จากหลักฐานที่พบจำนวนเซลล์ไขกระดูกในพยาธิสภาพของไตภายหลังการปลูกถ่ายไตจำนวนน้อย จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์ไขกระดูกอาจไม่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมเยื่อหุ้มไต

ภาควิชา อายุรศาสตร์  
สาขาวิชา อายุรศาสตร์  
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต พช  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา เมธ  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Shujit



## 4974759930: MAJOR MEDICINE

KEY WORDS: Y-CHROMOSOME/FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION)/RENAL TRANSPLANTATION

PICHET LORVINITNUN: EVIDENCR OF BONE MARROW CELLS IN HISTOPATHOLOGY OF RENAL GRAFT BY Y-CHROMOSOME IN SITU HYBRIDIZATION. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KEARKIAT PRADITPORN SILPA. THESIS COADVISORS: ASST. PROF. WIPAVEE KITTIKOWIT MD, ASST. PROF. MONTAKARN TANSATIT M.D, 92 pp.

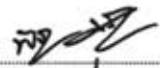
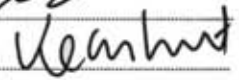
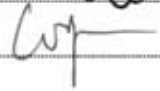
**Background:** Animal studies have demonstrated bone marrow cells migration into the site of damage tissue as reparative cell response to organ injury. In ischemic injury of kidney models, there were substantial evidences, though controversial, of bone marrow stem cells engrafted and differentiated into damage tubular epithelial cells. We studied the possibility of bone marrow cells migration to kidney by using male kidney transplant recipient who received renal graft from female donor.

**Methods:** 8 kidney biopsies of male kidney transplant recipients who received renal graft from female donors were recruited in the study. The kidney biopsies were done by standard clinical indication. Non transplanted kidney biopsy of one male was done as positive control. Two renal allograft biopsies at day zero and one of non transplanted female kidney biopsy samples were done as negative controls. The In Situ Hybridization in short arm of human Y-chromosome at region 12 (Yq12) was done by using satellite III DNA and spectrum green fluorescent dye. Y-chromosome positive tubular epithelial cells were count for total 1000 cells and percentage of positive cells were analyzed.

**Results:** In Situ Hybridization of Y-chromosome were positive namely acute tubular necrosis (0.71%), borderline tubulointerstitial rejection (0.36 %), acute cellular rejection (2.5 %). There was negative staining of Y-chromosome in chronic allograft nephropathy, cyclosporine nephrotoxicity, IgA nephropathy.

**Conclusion:** There was evidence of bone marrow cells present in renal allograft. The low percentages of bone marrow cells may indicate the minor role of bone marrow cells for the tubular cells reparative process. There was no evidence of bone marrow cells in chronic renal allograft injury.

Department Medicine  
Field of study Medicine  
Academic year 2007

Student's signature   
Advisor's signature   
Co-advisor's signature 

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ด้านการปลูกถ่ายไต และการทำวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิภาวี กิตติโกวิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์(ร่วม) ผู้ให้ความรู้ด้านพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง มนต์กานต์ ต้นสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์(ร่วม) ผู้ให้ความรู้ด้านการตรวจ Fluorescent in situ hybridization

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียง ตั้งสง่า ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เขียมอ่อน ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยิงยศ อวิหิงสานนท์ ผู้ให้คำปรึกษาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ณัฐวุฒิ ไทวนาชัย ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์ ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคไตทุกท่านผู้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณ ปิยะ แก้วกระจ่าง ซึ่งคอยช่วยเหลือในขั้นตอนต่างๆของการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และให้กำลังใจสนับสนุนการวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณปรีชา เรืองเวชวรชัย ซึ่งเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณผู้ป่วยทุกคนที่เปรียบเสมือนอาจารย์ที่สอนให้ผู้วิจัยมีความรู้ความสามารถเพิ่มขึ้น

ขอขอบคุณมูลนิธิโรคไตที่อุดหนุนทุนวิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ผู้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	3
1.6 ปัญหาทางจริยธรรม.....	4
1.7 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
Acute renal failure.....	5
Acute tubular necrosis.....	7
Bone marrow transplantation case report .....	8
Renal transplantation .....	11
Stem cells.....	11
Stem cells (source of stem cells).....	12
ความรู้เรื่อง Renal stem cells .....	16
Clinical trials of stem cells in kidney disease.....	23
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	28
ประชากรเป้าหมายและตัวอย่าง.....	28
การสังเกตและการวัด.....	28
เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจ Y-chromosome.....	29

	หน้า
การรวบรวมข้อมูล.....	34
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	35
ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย.....	35
จำนวน Y-chromosome.....	49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	62
สรุปผลการวิจัย.....	62
อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	63
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	92



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	รายละเอียดของ modified RIFLE criteria.....	6
2.2	Adult human stem cells และการพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ.....	14
2.3	ความสามารถของ stem cells ชนิดต่างๆ.....	16
4.1	สัดส่วนของการตรวจพบ ไวยโครโมโซม.....	61



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันตาม RIFLE criteria.....	5
2.2	ร้อยละของการเกิดไตวายเฉียบพลัน.....	7
2.3	Y-chromosome และ X-chromosome.....	9
2.4	Serial-section analysis โดย Y-FISH.....	10
2.5	ตัวอย่างการนำ human embryonic stem cells มาศึกษา.....	13
2.6	การพัฒนาของ metanephros.....	17
2.7	การพัฒนาของไตในช่วงที่เป็นตัวอ่อน.....	18
2.8	การตรวจพบสาร Bromodeoxyuridine.....	20
2.9	คุณลักษณะของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเซลล์ที่แตกต่างกัน.....	21
2.10	เซลล์เพาะเลี้ยง.....	21
2.11	การตรวจพบ apoptotic cells หลังจากไตเกิดการขาดเลือด.....	22
2.12	การตรวจพบ proliferative cell marker KI-67.....	22
2.13	การตรวจ renal papillary cell ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง PKH26.....	23
2.14	การติดสี X-gal staining ของไต.....	25
2.15	ค่า BUN ในเลือดเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับการฉีด HSC กับ MSC.....	26
2.16	การตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับการฉีด normal saline, hematopoietic stem cells (HSC) หรือ mesenchymal stem cells (MSC)	27
3.1	ผลการตรวจหา Y-chromosome โดยใช้วิธี FISH.....	33
4.1	ผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายชื่อที่ 1.....	35
4.2	ผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายชื่อที่ 2.....	36
4.3	ผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายชื่อที่ 3.....	37
4.4	ผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายชื่อที่ 4.....	38
4.5	ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 1.....	40
4.6	ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 2.....	41
4.7	ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 3.....	42
4.8	ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 4.....	43
4.9	ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 4.....	44

รูปที่		หน้า
4.10	ผลทางพยาธิวิทยาของชั้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 5.....	45
4.11	ผลทางพยาธิวิทยาของชั้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 6.....	46
4.12	ผลทางพยาธิวิทยาของชั้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 7.....	47
4.13	ผลทางพยาธิวิทยาของชั้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 8.....	48
4.14	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 1.....	49
4.15	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 2.....	50
4.16	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 3.....	51
4.17	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 4.....	52
4.18	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 1.....	53
4.19	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 2.....	54
4.20	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 3.....	55
4.21	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 4.....	56
4.22	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 5.....	57
4.23	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 6.....	58
4.24	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 7.....	59
4.25	ผลการตรวจหา Y-chromosome ในชั้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 8.....	60

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายโดยการปลูกถ่ายไตมีประสิทธิภาพดีกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาการฟอกไต (1) การรักษาโดยการปลูกถ่ายไตจึงได้รับความนิยมมาก ปัญหาหนึ่งของการปลูกถ่ายไตคือ ผู้บริจาคไตมีจำนวนไม่พอเพียงพอต่อผู้รับ นอกจากนี้ ไตที่ได้รับบริจาค จากผู้ป่วยสมองตาย มักมีภาวะ acute tubular necrosis มาก เป็นปัจจัยหนึ่ง ทำให้อายุการทำงานของไตที่ได้รับการปลูกถ่ายไม่ยืนยาวเท่าที่ควร

นอกจากนั้น แม้การปลูกถ่ายจะประสบความสำเร็จโดยการให้ยากดภูมิคุ้มกัน และประสิทธิภาพของยากดภูมิคุ้มกันดีขึ้นในปัจจุบัน ยากดภูมิคุ้มกันที่ผู้ป่วยได้รับอยู่ก็อาจไม่พอเพียงที่จะกดภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยไม่ให้ทำลายไตที่ได้รับการปลูกถ่ายจนเกิด ภาวะ rejection ภาวะ rejection อาจเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือ acute rejection หรือ chronic rejection พบว่าในผู้ป่วย บางรายเกิดภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะ และการทำงานของไตลดลง การตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต อาจพบ tubular atrophy, interstitial fibrosis, arterial wall thickening with intimal fibrosis, capillary wall thickening and double-contour appearance ซึ่งเข้าได้กับภาวะ chronic allograft nephropathy นอกจากภาวะ rejection ที่ทำให้ไตเสื่อมสภาพแล้ว ยากดภูมิคุ้มกันเองโดยเฉพาะ กลุ่ม calcineurine inhibitor ก็มีผลต่อไตทำให้การทำงานของไตลดลง

มีหลักฐานในสัตว์ทดลอง(2) แสดงให้เห็นถึงบทบาทของเซลล์ไซกระดูกในการซ่อมแซมอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดสมมุติฐานว่า เซลล์ไซกระดูกอาจมีบทบาทในการซ่อมแซมในไตที่ได้รับการปลูกถ่ายกับพยาธิสภาพต่างๆดังกล่าวข้างต้น โดยการใช้หลักฐานของ Y chromosome ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตเพศชายที่ได้รับการปลูกถ่ายจากเพศหญิง จะช่วยพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าว นำมาซึ่งสมมุติฐานของงานวิจัยนี้

ปัจจุบันมีหลักฐานแสดงว่า bone marrow เป็นแหล่งกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ โดยพบหลักฐานของ bone marrow cells สามารถ differentiated ไปเป็น hepatic oval cells (3), biliary epithelial cells (4), endothelial cells (5), skeletal muscle fibers (6), cardiomyocytes (7), neuronal cells (8), epithelial cells ของ liver lung GI tract และ skin (9)

ในสัตว์ทดลอง (10) พบว่า bone marrow cells มีความสัมพันธ์กับการ regeneration ของ renal epithelium และ renal tubule ภายหลังจากภาวะ ischemic injury (2)

การศึกษาของ Richard Poulsom และคณะ (10) พบว่า bone marrow cells มีความสัมพันธ์กับการ turnover ของ renal epithelium และ regeneration หลังจาก renal epithelium ถูกทำลาย ในผู้ชาย 8 ราย ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เป็นผู้หญิง การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนความน่าเชื่อถือจากการวิจัยของ Sandeep Gupta และคณะ (11) ซึ่งพบว่า เซลล์ภายนอกไต มีส่วนร่วมในการซ่อมแซม tubular cells ภายหลังการเกิด acute tubular necrosis

มีการศึกษาในปี ค.ศ. 2001 พบหลักฐานของ bone marrow cells ในผู้ป่วยเพศชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไต 6 ราย ที่เกิดภาวะ chronic rejection (12) โดยการย้อม Y chromosome in situ hybridization อย่างไรก็ตามยังมีข้อตกลงเรื่องความไวและความถูกต้องของการย้อมด้วยเทคนิคดังกล่าว

มีบางการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเซลล์เยื่อผนังท่อไตไม่น่าจะเป็นเซลล์จากภายนอกไต หรือ bone marrow derived stem cells แต่น่าจะมาจากเซลล์ภายในไตนั้นๆมากกว่า (13, 14)

การศึกษานี้จึงออกแบบมา เพื่อพิสูจน์ว่า มีหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกของผู้รับการปลูกถ่ายไตในพยาธิสภาพของไตในภาวะต่างๆกันภายหลังจากการปลูกถ่ายไตจริงหรือไม่

## 1.2 คำถามของการวิจัย

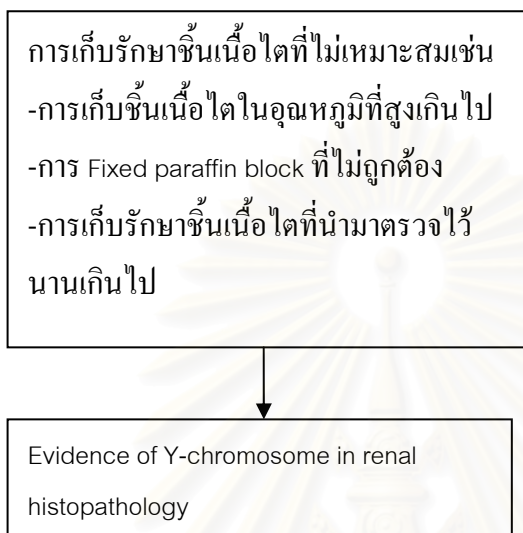
มีหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในพยาธิสภาพของไตหลังการปลูกถ่ายไตหรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหา Y-chromosome ที่ปรากฏอยู่ที่ไตของผู้หญิงที่บริจาคไตให้ผู้ป่วยชายที่เข้ารับการปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเทคนิค Y chromosome in situ hybridization



#### 1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



#### 1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้รูปแบบการวิจัยแบบ Descriptive study โดยการตรวจตรวจหา Y-chromosome ที่ปรากฏอยู่ที่ไตของผู้หญิงที่บริจาคไตให้ผู้ป่วยชายที่เข้ารับการปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเทคนิค Y chromosome in situ hybridization

เริ่มจากการรวบรวมข้อมูลของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตทั้งหมดของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 จนถึง พ.ศ. 2550 ที่ประวัติเป็นผู้ชายและได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้หญิง โดยเคยมีผลการเจาะตรวจไตอย่างน้อย 1 ครั้ง และมีปริมาณเพียงพอแก่การวินิจฉัย ตามผลการอ่านของพยาธิแพทย์

หลังจากนั้น นำผลชิ้นเนื้อไตที่ได้รับการเก็บรักษาไว้ที่แผนกพยาธิวิทยา มาทำการตรวจหา Y chromosome โดยวิธี fluorescent in situ hybridization หลังจากนั้นนำผลที่ได้มาตรวจโดยการส่องกล้อง immunofluorescent ทำการนับจำนวน tubular epithelial cells ที่ตรวจพบ Y chromosome แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ tubular epithelial cells ที่พบ Y chromosome ต่อ จำนวน tubular epithelial cells ทั้งหมด

## 1.6 ปัญหาทางจริยธรรม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาโดยการนำชิ้นเนื้อไตของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่เคยได้รับการเจาะไตเพื่อตรวจรักษาจากในอดีตโดยเหตุผลทางการแพทย์ โดยไม่ได้ทำการเจาะไตของผู้ป่วยใหม่ จึงไม่มีปัญหาทางจริยธรรม

การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในงานวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 1.7 ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากจำนวนผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในแต่ละปีมีจำนวนไม่มาก และโดยเฉพาะผู้บริจาคไตที่เป็นผู้หญิงมีจำนวนน้อย ทำให้ประชากรที่นำมาศึกษาทั้งหมดมีจำนวนน้อยตามไปด้วย อาจทำให้ผลการศึกษาลดความน่าเชื่อถือลงไปได้

นอกจากนี้ การ Fixed paraffin block ที่ไม่ถูกต้อง และ การเก็บรักษาชิ้นเนื้อไตที่นำมาตรวจไว้นานเกินไป อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบ Y-chromosome ได้

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

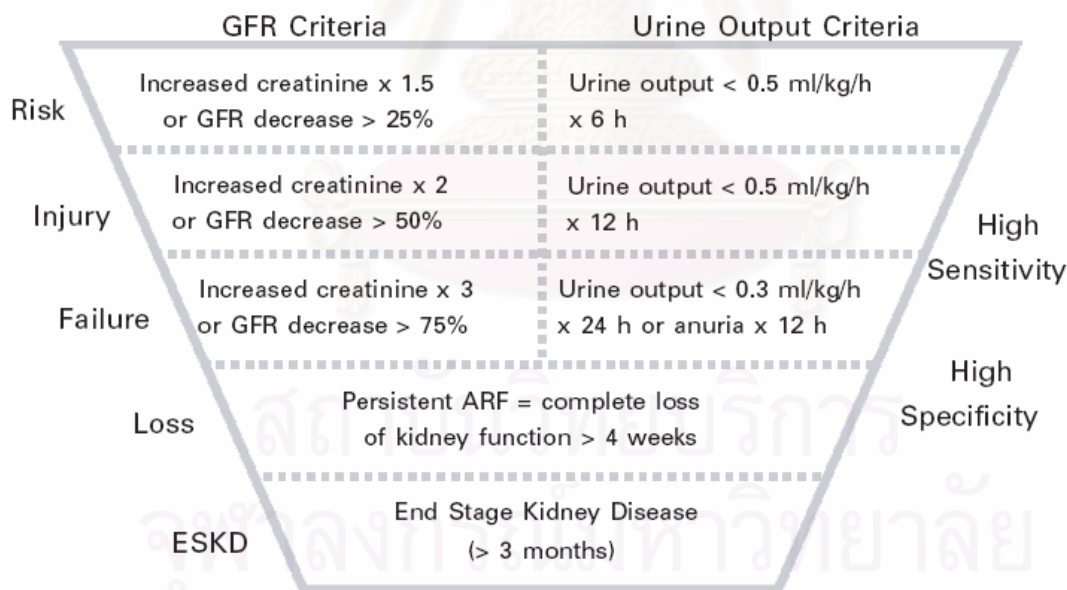
ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาจะสามารถตอบได้ว่า มีเซลล์จากผู้รับการปลูกถ่ายไตไปมีผลต่อพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ไตภายหลังการปลูกถ่ายไตจริงหรือไม่ ซึ่งถ้าเป็นจริง การศึกษานี้อาจเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาอื่นต่อไปที่อาจจะนำมาซึ่งการใช้ Bone marrow stem cells เข้ามามีส่วนร่วมในการรักษาผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตที่มีการเสื่อมลงของการทำงานของไตได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 Acute renal failure

ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) คือ ภาวะที่มีการลดลงของการทำงานของไตอย่างเฉียบพลันจนมีผลทำให้การขับถ่ายของเสีย (nitrogenous waste products, urea nitrogen and creatinine) ทางปัสสาวะลดลง การลดลงของการทำงานของไตมีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่า blood urea nitrogen (BUN) และค่า ซีรั่มครีเอตินีน (SCr) ปัจจุบันอายุรแพทย์โรคไตส่วนใหญ่นิยมใช้ RIFLE Criteria (16) ในการวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันโดยมีการใช้ทั้งค่า GFR และปริมาณปัสสาวะในการจัดกลุ่มผู้ป่วยตามความรุนแรงของโรค และใช้ระยะเวลาของการสูญเสียการทำงานของไตในการบ่งบอกถึงผลลัพธ์ของโรค โดย Criteria ดังกล่าวได้แสดงไว้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันตาม RIFLE criteria (16)

ล่าสุดในปี พ.ศ. 2550 Molitoris (17) และคณะ ได้เสนอรายงานเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันซึ่งดัดแปลงมาจาก RIFLE criteria (ตารางที่ 2.1) ใน modified RIFLE criteria ใหม่นี้ได้เปลี่ยนชื่อ

ของระยะต่างๆในภาวะไตวายเฉียบพลัน จาก Risk, Injury, Failure เป็น stage 1, 2, และ 3 ตามลำดับ แทน และได้ตัดระยะ Loss และ End stage kidney disease ออกจาก criteria คงต้องรอการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ criteria ใหม่ต่อไป

ตารางที่ 2.1 แสดงรายละเอียดของ modified RIFLE criteria (17)

Stage	Serum creatinine criteria	Urine output criteria
1	Increase of $\geq 26.4 \mu\text{mol/l}$ (0.3 mg/dl) OR to 150–200% of baseline (1.5–2.0-fold)	<0.5 ml/kg/h for >6 h
2	Increase to >200–300% of baseline (>2–3-fold)	<0.5 ml/kg/h for >12 h
3	Increase to >300% of baseline (>3-fold; or serum creatinine $\geq 354 \mu\text{mol/l}$ [4.0 mg/dl] with an acute rise of at least $44 \mu\text{mol/l}$ [0.5 mg/dl])	<0.3 ml/kg/h for 24 h OR anuria for 12 h

การแบ่งชนิดของ Acute renal failure อาจแบ่งตามสาเหตุได้ดังนี้

1. Prerenal

- Hypovolemia
- Cardiac failure
- Hepatorenal syndrome

2. Renal

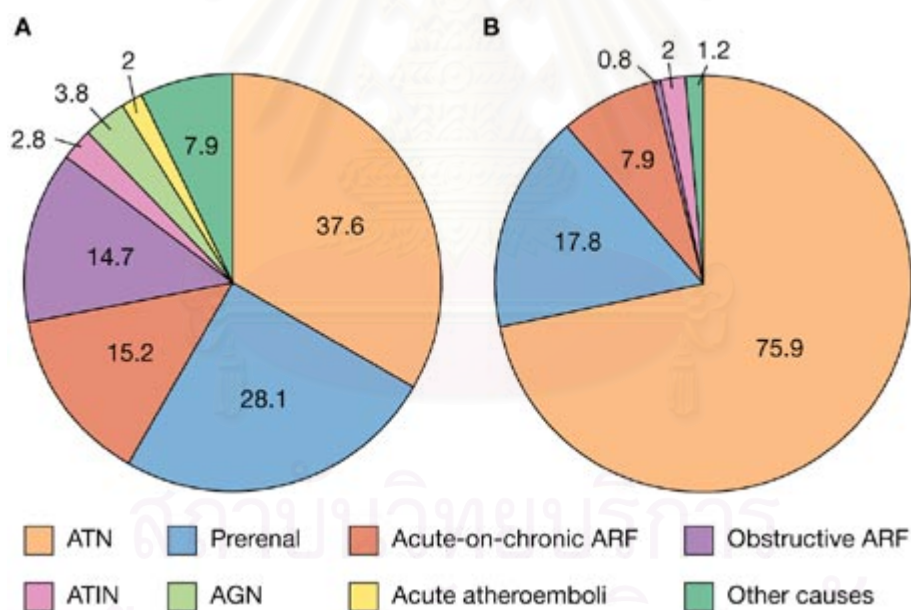
- Vascular disease
- Glomerulonephritis
- Interstitial nephritis
- Tubular necrosis
  - Ischemic
  - Toxins
  - Pigments

### 3. Post renal

- Bladder outlet obstruction
- Tumors
- Renal calculi
- Papillary necrosis
- Retroperitoneal fibrosis

## 2.2 Acute tubular necrosis

ปัจจุบันสาเหตุการเกิด Acute renal failure ที่พบบ่อยที่สุดคือ ภาวะ Acute tubular necrosis ดังแสดงในรูป 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงร้อยละของการเกิดไตวายเฉียบพลันแยกตามสาเหตุการเกิด (A) ผู้ป่วยที่ไม่ได้เข้ารับการรักษาด่วนในหอผู้ป่วยหนัก (non-ICU) (B) ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด่วนในหอผู้ป่วยหนัก (ICU) (18)

โดยสาเหตุของการเกิด Acute tubular necrosis แบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่

1. Ischemic tubular necrosis
2. Nephrotoxic tubular injury



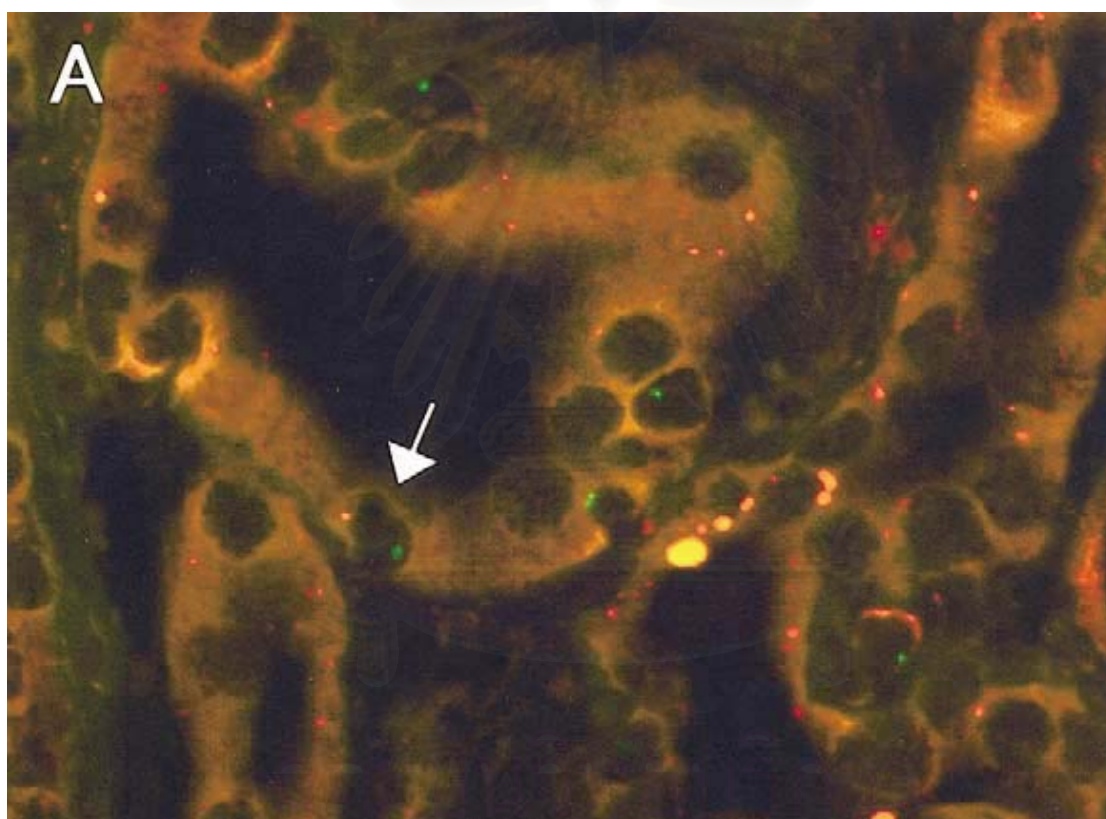
### 3. Pigment induce nephrotoxicity

เมื่อเกิดภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นจะทำให้เยื่อบุท่อไตเกิด Necrosis และ Apoptosis หลุดลอกออกไป เมื่อสาเหตุของการเกิด Acute tubular necrosis หดไป ภายในท่อไตจะเกิดกระบวนการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุท่อไตโดยการเกิด Proliferation ของเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยการตรวจพบ Proliferating nuclear antigen (PCNA) (18) การเกิด Tubular regeneration ทำให้ Tubular epithelial cells กลับมามีโครงสร้างและการทำงานได้เหมือนเดิม อย่างไรก็ตาม ที่มาของ Proliferating cells ยังคงไม่ทราบแน่ชัดซึ่งแต่เดิมเคยเชื่อว่า Proliferating cells อาจมาจาก Tubular epithelial cells ที่ยังหลงเหลืออยู่ Proliferation และ Differentiation ตัวเองไปแทนที่ Tubular epithelial cells ที่หลุดลอกออกไป แต่เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับ Stem cells ที่มีมากขึ้นในปัจจุบันที่พบว่า Stem cells นั้นสามารถที่จะ migrate เข้าไปอยู่ในอวัยวะต่างๆ พร้อมทั้ง Proliferation และ Differentiation ตัวเองไปเป็นเซลล์ในอวัยวะนั้นๆ ได้ เช่น hepatic oval cells(3), biliary epithelial cells (4), endothelial cells(5), skeletal muscle fibers (6), cardiomyocytes (7), neuronal cells (8), epithelial cells ของ liver lung GI tract และ skin (9) ทำให้เกิดการเชื่อว่าการเกิด Tubular regeneration อาจเกิดจาก mesenchymal stem cells migrate เข้าไปอยู่ในไต พร้อมทั้ง Proliferation และ Differentiation ตัวเองไปเป็น Tubular epithelial cells ได้

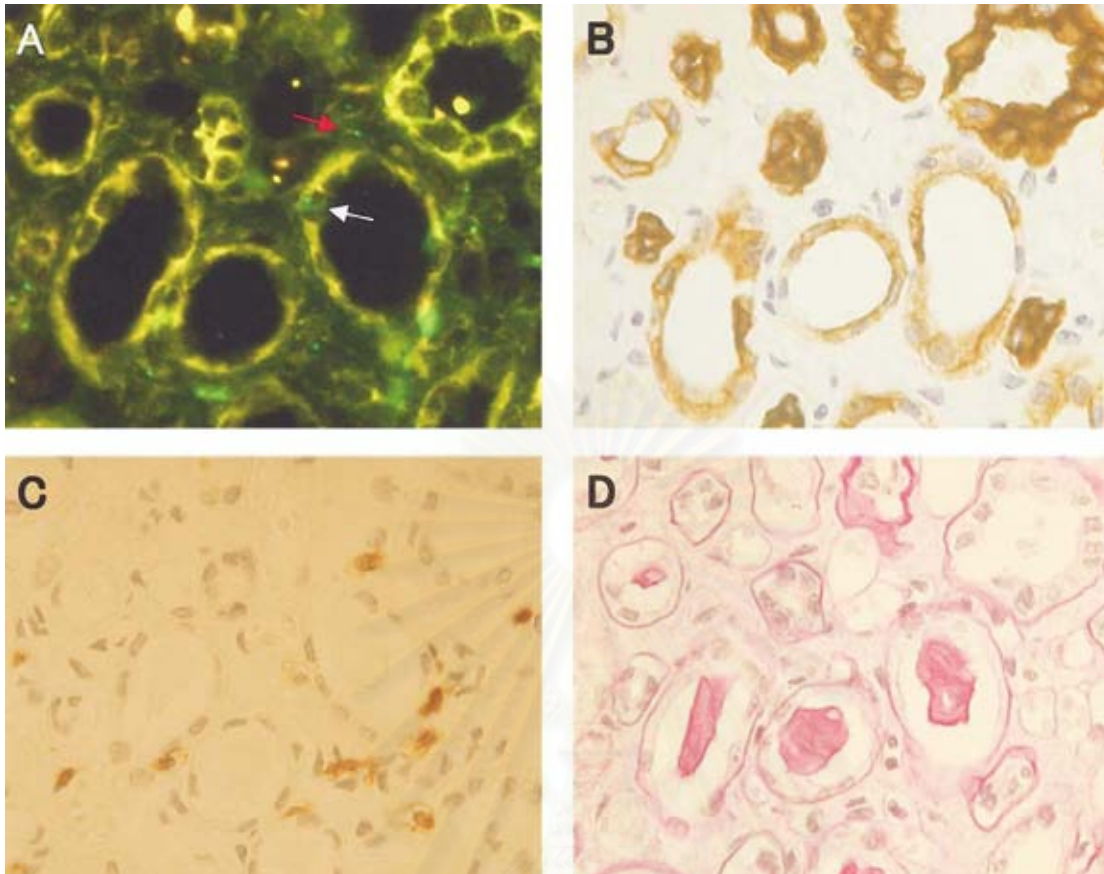
### 2.3 Bone marrow transplantation case report

เมื่อปี 2003 Nishida (19)และคณะได้รายงานผู้ป่วยเด็กหญิงอายุ 7 ขวบ ซึ่งป่วยเป็น chronic active Epstein-Barr virus infection และได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกจากพี่ชายซึ่งมี human leukocyte antigen-matched ภายหลังจากการปลูกถ่ายผู้ป่วยเกิดภาวะ diarrhea ซึ่งเป็นผลมาจาก acute graft-versus-host disease (GVHD), cyclosporine A (CsA)-induced encephalopathy ร่วมกับ generalized convulsion และ sepsis จากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* หลังจากนั้นเกิดภาวะ anuria and azotemia ขึ้นใน 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก หลังจากนั้นผู้ป่วยอาการดีขึ้นจากการรักษาโดยให้ pulse methylprednisolone การควบคุมระดับยา Cyclosporine ให้ได้ระดับในการรักษา ร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะ 8 เดือนหลังการปลูกถ่ายไขกระดูกผู้ป่วยเกิด Chronic graft-versus-host disease และ generalized convulsions หลังจากให้ยา cyclosporine A ผู้ป่วยเกิด hemolytic uremic syndrome การทำงานของไตแยลง ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการทำ Plasma exchange และ hemodialysis แต่ไม่ได้ผล ผู้ป่วยเสียชีวิตจาก multiple organ failure และเสียชีวิตหลังจากปลูกถ่ายไขกระดูกได้ 300 วัน และได้รับการชันสูตรศพโดยได้ทำการเก็บเนื้อเยื่อไต 2 ชั่วโมงภายหลังเสียชีวิตผลการพิสูจน์ชิ้นเนื้อไตพบ มีการเพิ่มขึ้นของ mesangial matrix และการตีบแคบของ capillary lumen ใน glomeruli มีการหลุดลอกและ atrophy ของ tubular epithelial cells และการหนาตัวของชั้น intima ของ arterioles

ชิ้นเนื้อไตส่วนหนึ่งได้รับการตรวจหา Y-chromosome โดยใช้วิธี Fluorescent in situ hybridization (Y-FISH) จาก paraffin- embedded autopsy specimens เพื่อตรวจหาหลักฐานของเซลล์ไข่กระดูกในชิ้นเนื้อไตดังกล่าว โดยใช้ X probe ชนิด CEP X probe Spectrum Orange ที่มีความจำเพาะกับ alpha satellite centromeric region ของ chromosome X และ Y probe ชนิด CEP Y probe Spectrum Green ที่มีความจำเพาะกับ satellite III region ของ chromosome Y (VYS-30-161050; Vysis Inc, Downers Grove, IL) immunoperoxidase staining สำหรับ cytokeratin (an epithelial cell marker) หรือ CD45 (a marker for leukocyte) หรือ PAS stain และตรวจพบ X และ Y-chromosome ดังรูปที่ 2.3 และ 2.4



รูปที่ 2.3 แสดง Y-chromosome (จุดสีเขียว) และ X-chromosome (จุดสีแดง) อยู่บน nucleus ของ tubular epithelial cells (ลูกศรสีขาว)



รูปที่ 2.4 แสดง Serial-section analysis โดย Y-FISH, immunoperoxidase staining สำหรับ cytokeratin and CD45 และ PAS staining ในชิ้นเนื้อไต (A) Fluorescence microscopy โดย Y-FISH (original magnification X 400) (B) Immunoperoxidase staining ของ cytokeratin (original magnification X 400). (C) Immunoperoxidase staining ของ LCA (CD45) (original magnification X 400). (D) PAS staining (original magnification X 400). ในรูป A แสดง Y-FISH+ cells (ลูกศร) ใน tubular epithelial cells และ interstitial cells โดยลูกศรสีขาว แสดง Y-FISH+/ cytokeratin+/CD45- cell ใน tubular epithelial area และลูกศรสีแดงแสดง Y-FISH+/ CD45+ cell ใน interstitial area จากการทำให้ serial-section analysis.

ในการศึกษานี้ตรวจพบ Y-FISH+/ cytokeratin+/CD45- cells ต่อ total cytokeratin-positive tubular epithelial เป็นจำนวน  $1.0 \pm 1.1$  (mean  $\pm$  SD) ต่อ 100 cells counted จากการตรวจด้วยกล้อง microscope ( X 400) ใน 10 randomly selected fields.

จากกรณีตัวอย่างผู้ป่วยรายนี้แสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบหลักฐานของเซลล์ไตในพยาธิสภาพของไตที่มีภาวะ Tubular injury และอาจมีความเป็นไปได้ว่าสามารถใช้เซลล์ไตมาช่วยในการรักษาภาวะ Tubular injury ในอนาคตได้

## 2.4 Renal transplantation

การปลูกถ่ายไตเป็นการนำไตจากผู้ป่วยรายหนึ่งไปใส่ให้ผู้ป่วยอีกรายหนึ่ง กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดภาวะ Kidney injury เกิดขึ้นซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่

1. ในขบวนการนี้จำเป็นจะต้องมีการหนีบเส้นเลือดแดงและดำ ทำให้ไตดังกล่าวเกิดภาวะ Ischemic acute renal injury ได้ ภาวะดังกล่าวทำให้เยื่อบุท่อไต เกิด Necrosis และ Apoptosis หลุดลอกออกไป
2. ในขบวนการของการปลูกถ่ายไตยังจำเป็นที่จะต้องให้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น Cyclosporine ซึ่งยาดังกล่าวมีพิษต่อไต ทำให้เกิดการทำลายของเยื่อบุท่อไตและ เนื้อเยื่อ Interstitium
3. การเกิดการติดเชื้อไม่ว่าจะเป็น ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา หรือ เชื้อปรสิต
4. การเกิดการเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อหรือการปฏิเสธไตใหม่ที่ได้รับการปลูกถ่ายเข้าไปยังร่างกายทำให้เกิดภาวะ Rejection
5. โรคไตเดิมผู้ป่วยเคยเป็นอยู่และเกิดซ้ำขึ้นกับไตใหม่ที่ได้รับการปลูกถ่ายเข้าไป (Recurrent kidney disease)
6. โรคไตซึ่งเกิดขึ้นใหม่โดยที่ผู้ป่วยไม่เคยเป็นมาก่อน (De novo kidney disease)
7. การเกิด Chronic allograft nephropathy

ในขบวนการเกิด Kidney injury ภายหลังจากการปลูกถ่ายไตนี้ มีส่วนหนึ่งที่ทำให้เยื่อบุท่อไตเกิดภาวะ Necrosis และ Apoptosis หลุดลอกออกไป ทางคณะผู้วิจัย จึงได้ใช้ตัวอย่างของผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตเป็นตัวตัวอย่างของภาวะ Kidney injury

## 2.5 Stem cells

Stem cells คือ เซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้หลายชนิด (multiple cell lineages)

Stem cells จำต้องมีคุณสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้ (20)



1. สามารถแบ่งตัวแล้วได้เซลล์ชนิดเดิม (clonogenic) อย่างไม่มีขีดจำกัด เรียกการแบ่งตัวชนิดนี้ว่า symmetric division
  2. สามารถแบ่งตัวแล้วได้เซลล์ชนิดเดิมร่วมกับเซลล์อีกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถที่จะพัฒนาตัวเองไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ต่อไปได้ (transient amplifying precursor) เรียกการแบ่งตัวชนิดนี้ว่า asymmetric division
  3. มีต้นกำเนิดมาจาก embryonic stem cell source หรือ adult stem cell source
- สามารถจำแนกความสามารถของ stem cells ในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆ ออกได้เป็น 4 ชนิด

(21) คือ

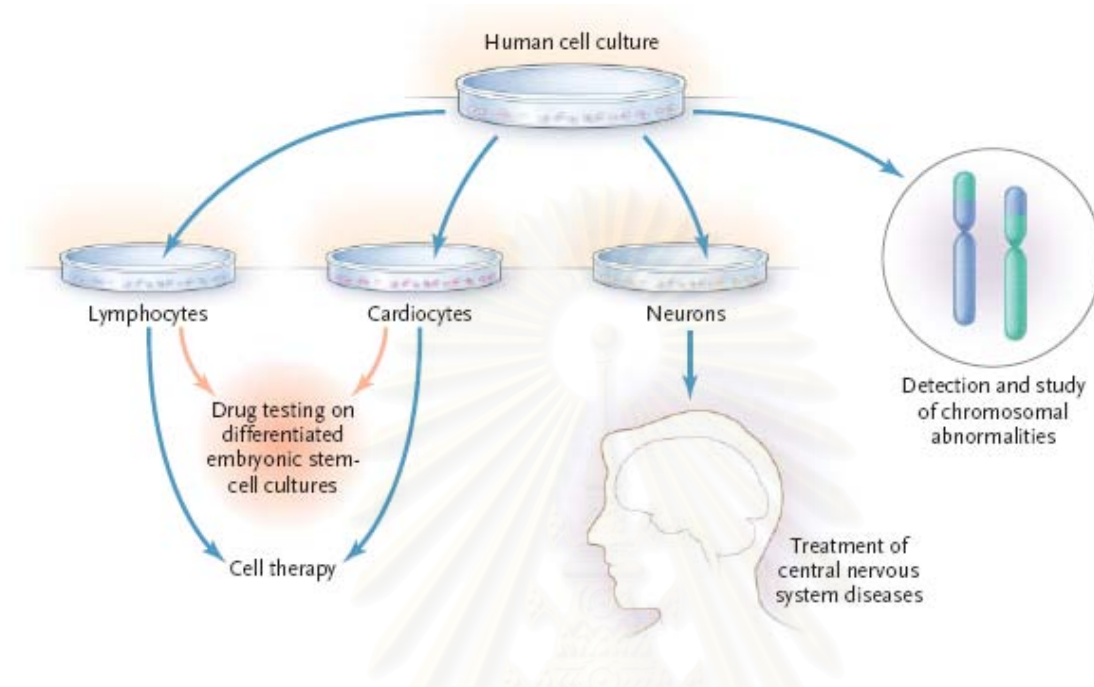
1. Totipotent cell คำว่า “toti” มาจาก totus ในภาษาละติน มีความหมายว่า “ทั้งหมด” ได้แก่ เซลล์ที่มีความสามารถได้อย่างไม่มีขีดจำกัดในการแบ่งเซลล์และพัฒนาได้เป็นเซลล์ทุกชนิด อาทิ เช่น ตัวอ่อนของคนในระยะ zygote และ morula เป็น stem cells ที่สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อของรก เยื่อหุ้มรก และทารกได้
2. Pluripotent cell คำว่า “pluri” มาจาก plures ในภาษาละติน มีความหมายว่า “หลาย” ได้แก่เซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์และพัฒนาตัวเองไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ทั้งใน 3 germ layer อาทิ เช่น เซลล์จาก inner cell mass ภายในตัวอ่อนระยะ blastocyst หรือเซลล์ของตัวอ่อน (fetus) ในระยะ 30-60 วันแรก เป็น stem cells ที่สามารถแบ่งเซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์ใดๆ ก็ได้ภายในร่างกายมนุษย์
3. Multipotent cell คือ เซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้หลายชนิด แต่ไม่ครบทั้ง 3 germ layer multipotent cell จึงมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้น้อยกว่า pluripotent cell ตัวอย่างของเซลล์ชนิดนี้ได้แก่ adult stem cells
4. Unipotent cell คำว่า “uni” มาจาก unus ในภาษาละติน มีความหมายว่า “หนึ่ง” คือเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์และพัฒนาตัวเองไปเป็นเนื้อเยื่อเพียงชนิดเดียว อาทิ เช่น primordial germ cell เป็น stem cells ที่สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์

### 2.5.1 Stem cells (source of stem cells)

1. Embryonic stem cells ได้มาจากตัวอ่อน (embryo) ในระยะ blastocyst มีความสามารถในการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ทุกชนิดทั้งใน 3 germ layer (pluripotent) เนื่องจากความสามารถนี้เองทำให้สามารถนำ human embryonic stem cells มาศึกษาวิจัยเพิ่มเติมได้มากมายทั้งในด้านการวิจัยพื้นฐาน และการศึกษาวิจัยคลินิก เช่น การทดสอบยาโดยใช้เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ที่ได้มาจาก human embryonic stem cells, การศึกษาด้านความผิดปกติของ chromosome ชนิดต่างๆ รวมทั้งในด้านการปลูกถ่าย



อวัยวะ (tissue/organ transplantation) (รูปที่ 2.5) อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญในการศึกษาวิจัย embryonic stem cells คือ ปัญหาทางด้านศีลธรรมเนื่องจากต้องนำเซลล์มาจากตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิแล้ว (22)



รูปที่ 2.5 แสดงตัวอย่างการนำ human embryonic stem cells มาศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านการวิจัยพื้นฐาน และการศึกษาวิจัยทางคลินิก (23)

2. Adult stem cells คือ stem cells ที่พบได้ในผู้ใหญ่ สามารถพบได้หลายอวัยวะ เช่น stem cells ในไขกระดูก หรือในชั้น Basal cell layer ของผิวหนัง เป็นต้น(23) (ตารางที่ 2.2) เดิมมีความเชื่อว่า adult stem cells จะมีข้อจำกัดในการพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เฉพาะใน germ layer เดียวกันเท่านั้นแต่ในปัจจุบันจากข้อมูลการศึกษาในเรื่อง stem cells plasticity ทำให้มีข้อมูลมากขึ้นว่า adult stem cells อาจจะสามารถพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย เราสามารถตรวจหา adult stem cells ชนิดต่างๆ โดยการตรวจหา tissue specific ชนิดต่างๆ โดยวิธีการทาง immunohistochemistry (24)

ตารางที่ 2.2 แสดง Adult human stem cells และการพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

Cell Type	Tissue-Specific Location	Cells or Tissues Produced
Hematopoietic stem cells	Bone marrow, peripheral blood	Bone marrow and blood lymphohematopoietic cells
Mesenchymal stem cells	Bone marrow, peripheral blood	Bone, cartilage, tendon, adipose tissue, muscle, marrow stroma, neural cells
Neural stem cells	Ependymal cells, astrocytes (subventricular zone) of the central nervous system	Neurons, astrocytes, oligodendrocytes
Hepatic stem cells	In or near the terminal bile ductules (canals of Hering)	Oval cells that subsequently generate hepatocytes and ductular cells
Pancreatic stem cells	Intraislet, nestin-positive cells, oval cells, duct cells	Beta cells
Skeletal-muscle stem cells or satellite cells	Muscle fibers	Skeletal muscle fibers
Stem cells of the skin (keratinocytes)	Basal layer of the epidermis, bulge zone of the hair follicles	Epidermis, hair follicles
Epithelial stem cells of the lung	Tracheal basal and mucusecreting cells, bronchiolar Clara cells, alveolar type II pneumocyte	Mucous and ciliated cells, type I and II pneumocytes
Stem cells of the intestinal epithelium	Epithelial cells located around the base of each crypt	Paneth's cells, brush-border enterocytes, mucusecreting goblet cells, enteroendocrine cells of the villi

## Stem cells Plasticity/Transdifferentiation

มีข้อมูลจากการศึกษาต่างๆ พบว่า adult stem cells สามารถพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ต่างชนิดกันหรืออยู่ต่าง germ layer กันได้ เราเรียกความสามารถนี้ว่า stem cells plasticity transdifferentiation ข้อมูลการศึกษาในระยะแรกเริ่มมาจากสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) โดยมีการค้นพบ donor cells จากไขกระดูกสามารถจะพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์ของกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) ซึ่งเป็นเซลล์ต่างชนิดกันได้(25) นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ ที่สนับสนุนว่าเซลล์จากไขกระดูกยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อในระบบประสาท (neurons, oligodendrocytes, and astrocytes) เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ เซลล์ตับ(26,27) การศึกษาในระยะต่อมายังพบว่า adult stem cells ชนิด(ตารางที่1) อื่นๆ บางชนิดเช่น skeletal muscle stem cells neural stem cells อาจมีความสามารถในการเกิด transdifferentiation ไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2.3)

จากความสามารถนี้เอง ทำให้มีการนำ Stem cells ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะจากไขกระดูก (bone marrow derived stem cells) มาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคหรือภาวะต่างๆ ที่มีการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อ เช่นกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) ไตวายฉับพลัน (acute renal failure) โดยคาดว่า stem cells ที่ให้เข้าไปจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เข้าไปช่วยในการซ่อมแซมการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นได้รวมทั้งมีข้อมูลทางการศึกษาในภาวะ acute renal failure ด้วย

ตารางที่ 2.3 แสดงความสามารถของ stem cells ชนิดต่างๆ ในการเกิด transdifferentiation (28, 29)

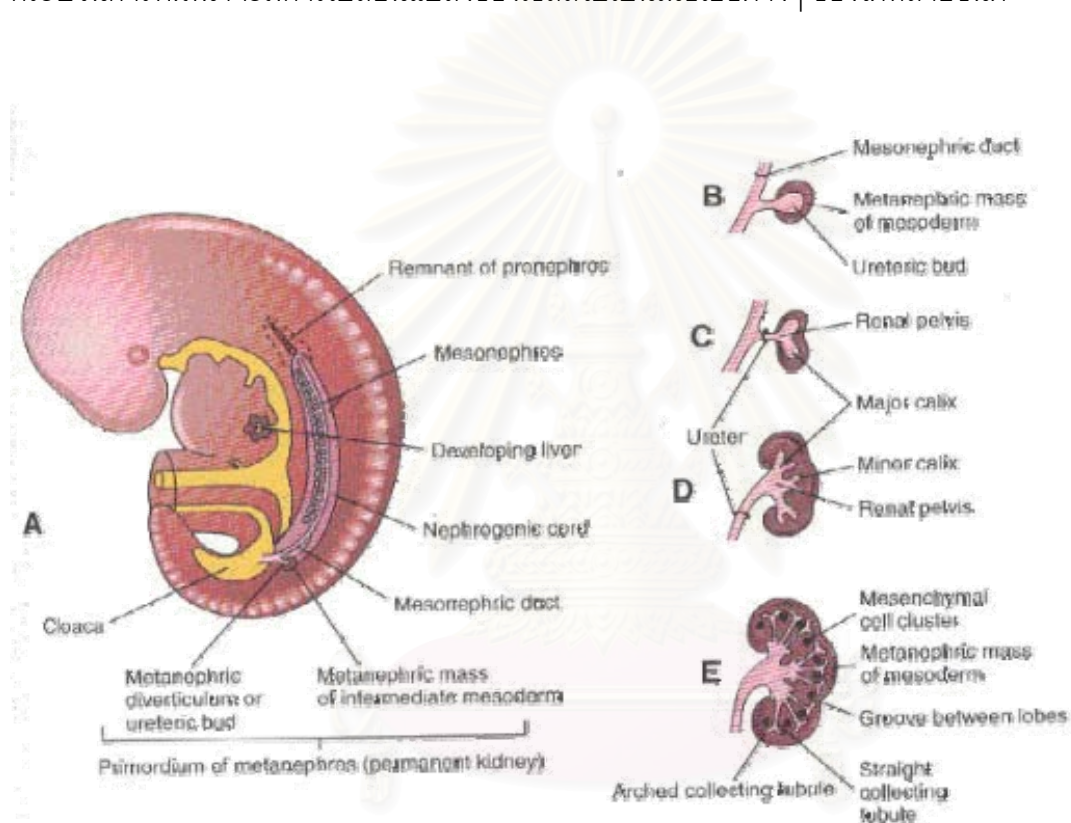
Stem reside	Can become
Brain	neurons, astrocytes, oligodendrites, skeletal muscle, blood cells
bone marrow	neuronal cells, skeletal muscle, cardiac muscle, endothelial cells, blood cells, cartilage, bone, adipocytes, skin, oval cells (liver), cells of gastrointestinal tract, thymus, epithelial cells of the lung
skeletal muscle	skeletal muscle
myocardium	myocytes, endothelial cells
skin	keratinocytes, skin appendages
liver	liver cells
intestine, colon, gastric mucosa	cells of gastrointestinal tract
testis, ovaries	Gonads
pancreatic ducts	islet cells
adipose tissue	bone, cartilage, muscle, fat

## 2.5.2 ความรู้เรื่อง renal stem cells

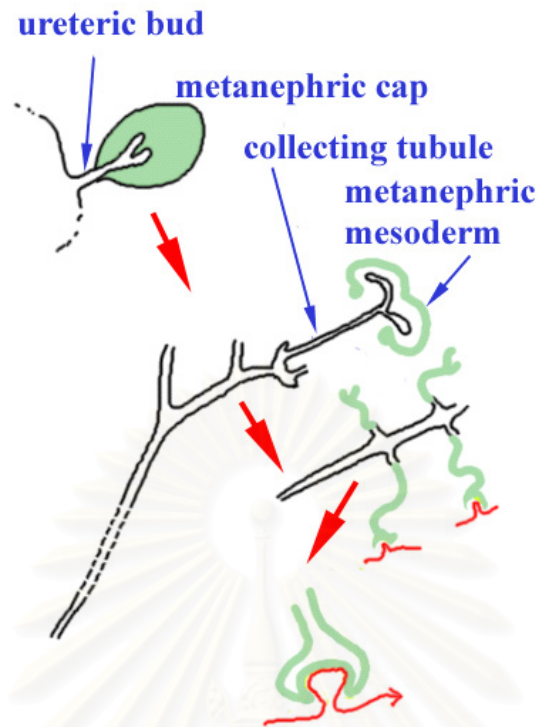
### 2.5.2.1 Embryonic origin of renal cells

ไตของมนุษย์ในช่วงเป็นตัวอ่อนในครรภ์มีการพัฒนาเป็น 3 ส่วน คือ pronephros, mesonephros และ metanephros โดยมีเพียง metanephros เท่านั้นที่จะพัฒนาเป็นไตของทารกต่อไป (รูปที่ 2.6) การพัฒนาจะประกอบไปด้วยการเจริญของเนื้อเยื่อ 2 ส่วนมารวมเข้าด้วยกัน คือ ส่วนของ ureteric bud ที่ยื่นออกมาจาก Wolff's duct จะเจริญและพัฒนาคู่ไปกับอีกส่วนหนึ่งคือ metanephric mesoderm สารที่หลั่งจาก ureteric bud จะชักนำให้เนื้อเยื่อของบริเวณ metanephric mesoderm ให้เข้ามารวมตัวกันและมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นโครงสร้างต่างๆ ของหน่วยไต (nephron) ในขณะนี้ เนื้อเยื่อบริเวณ

metanephric mesoderm ก็จะส่งสัญญาณกลับไปบริเวณของ ureteric bud เพื่อให้เกิดการแบ่งตัวและเจริญต่อไปเช่นเดียวกัน (30)(รูปที่ 2.7) การพัฒนาจะประกอบด้วยกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ 2 แบบใหญ่ๆ คือ epithelium-to-mesenchyme และ mesenchyme-to-epithelium transdifferentiation โดยส่วนของ Wolff's duct จะเกิดจากกระบวนการ epithelium-to- mesenchyme transdifferentiation ของ mesenchymal mesodermic cells ในขณะที่ epithelium ของnephron จะเกิดจากกระบวนการ mesenchyme-to-epithelium transdifferentiation ของ metanephric mesenchyme(31) ในกระบวนการพัฒนาจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ ของไตหลายชนิด



รูปที่ 2.6 แสดงการพัฒนาของ metanephros ภาพ A แสดง lateral view ของ embryo ที่ระยะ 5 สัปดาห์ ภาพ B-E แสดงการพัฒนาของ metanephric diverticulum หรือ ureteric bud และการพัฒนาของ ureter, renal pelvis, calices และcollecting tubules



รูปที่ 2.7 แสดงการพัฒนาของไตในช่วงที่เป็นตัวอ่อน

จะเห็นได้ว่าการเจริญของไตในขณะที่เป็นตัวอ่อนนั้นมีความซับซ้อน และประกอบด้วยการพัฒนาของเนื้อเยื่อ 2 ส่วนไปด้วยกัน จึงทำให้การพยายามศึกษาเพื่อค้นหา Stem cells ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ทั้งหมดที่ประกอบเป็นไตผู้ใหญ่ นั้นจึงกระทำได้ยาก

#### 2.5.2.2 adult renal stem cells

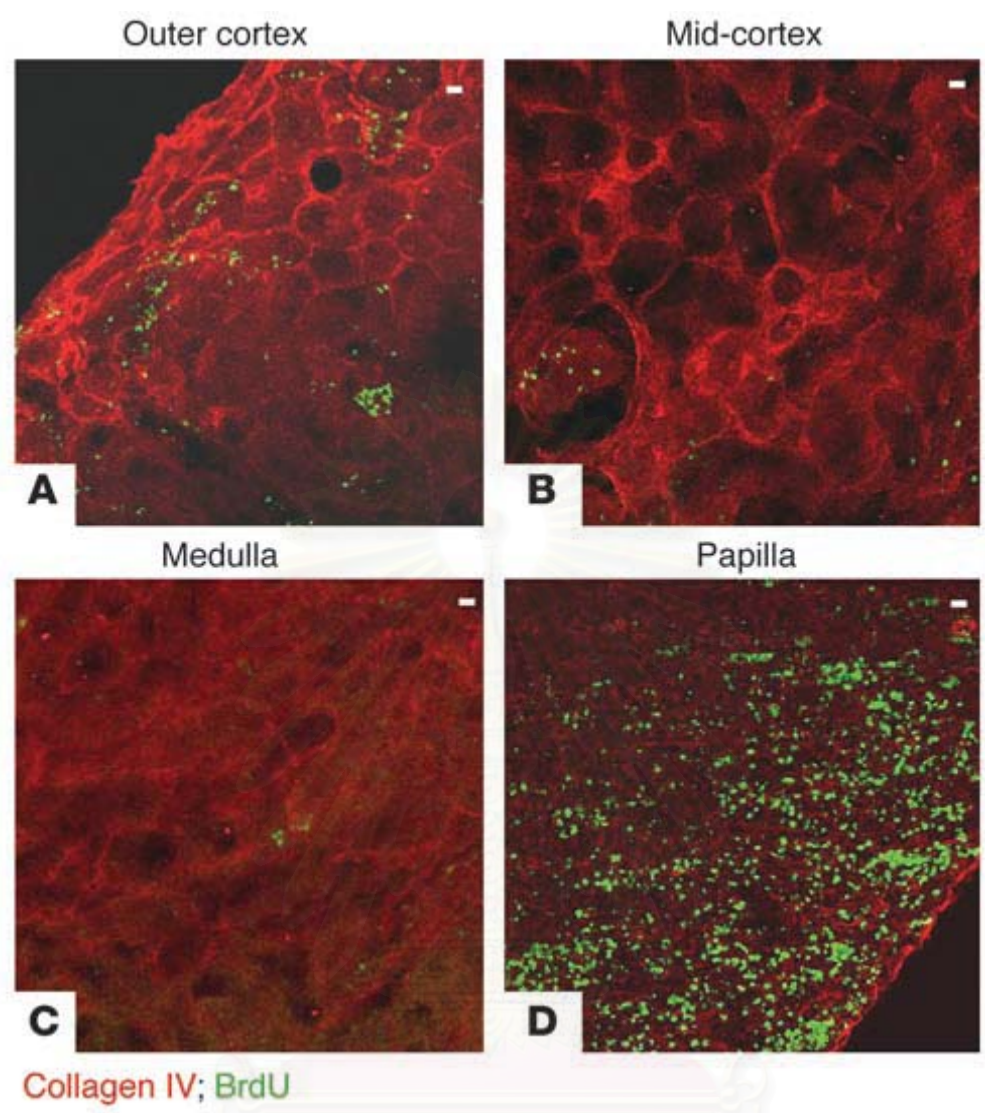
โดยทั่วไปแล้ว ไตเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นน้อย ต่างกับผิวหนัง ทางเดินอาหาร หรือไขกระดูกที่มีการแบ่งตัวเกิดขึ้นอยู่เกือบตลอดเวลา แต่ไตของคนเรา ก็เป็นอวัยวะหนึ่งที่มีความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์และการซ่อมแซมการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นได้ดีพอสมควร ดังจะเห็นได้จากการฟื้นตัวของไตหลังจากการเกิด ไตวายฉับพลันจากการขาดเลือด (ischemic acute tubular necrosis) เป็นต้น พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นมาทดแทนเซลล์เดิมที่เสียไปนั้นไม่ทราบแหล่งที่มาได้ชัดเจนว่ามาจากเซลล์ใด แต่มีหลักฐานพบว่าส่วนหนึ่งมาจากการแบ่งตัวของเซลล์ที่มีการเจริญและพัฒนาเต็มที่แล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับ การซ่อมแซมที่เกิดขึ้นในอวัยวะอื่นๆ จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะเซลล์บางชนิดในไต ที่มี



คุณสมบัติคล้ายกับ stem cells คือสามารถแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหลายๆ ชนิดของไตได้และทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อไตจากภาวะต่างๆ Oliver และคณะ (32) ได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาเซลล์ที่มีคุณลักษณะคล้าย stem cells ในไตโดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะบางอย่าง ได้แก่ เซลล์ชนิดนั้นจะต้องมีการแบ่งตัวช้ามาก หรือ ไม่แบ่งตัวจะอยู่ในบริเวณพิเศษที่เรียกว่า niches และจะพบมีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซมเมื่อมีการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อไต(33-35) ทำการศึกษาดังกล่าวในหนูทดลองอายุ 3 วัน โดยการฉีดสาร Bromodeoxyuridine (BrdU) ที่มีคุณสมบัติสามารถเข้าไปแทรกอยู่ใน DNA ของเซลล์ในระหว่างที่เกิดการสร้าง DNA ของเซลล์ได้(35) เนื่องจากไตของหนูมีการเจริญและพัฒนาต่อหลังจากที่หนูคลอดออกมาแล้ว ทำให้ยังคงพบมีการแบ่งตัวของเซลล์ในไตได้ต่อไปอีกระยะหนึ่ง หลังจากหนูมีอายุได้ 2 เดือน จึงนำไตของหนูที่ได้รับสาร BrdU ตั้งแต่ช่วงแรกคลอดออกมาทำการตรวจ

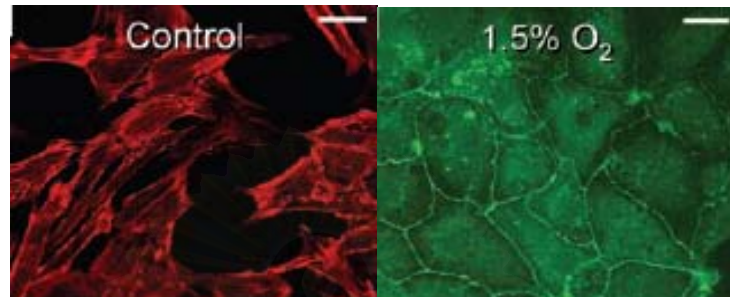
เมื่อเซลล์ของไตที่มีสาร BrdU รวมอยู่เกิดการแบ่งตัว จะทำให้สาร BrdU ที่อยู่ในเซลล์นั้นมีปริมาณลดลงถ้าการแบ่งตัวเกิดขึ้นมากการตรวจพบสาร BrdU ก็ลดลงเรื่อยๆ จนอาจตรวจไม่พบ เมื่อนำเนื้อเยื่อไตส่วนต่างๆ จากหนูมีอายุ 2 เดือน ออกมาตรวจสอบพบว่า ในบริเวณ papilla จะสามารถตรวจพบสาร BrdU ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับบริเวณอื่นๆ (รูปที่ 2.8) แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วน Papilla ของไตนั้นประกอบไปด้วยเซลล์ที่แบ่งตัวช้าหรือไม่แบ่งตัวเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับบริเวณอื่นๆ โดยจะพบเซลล์ดังกล่าวมากในบริเวณ interstitium มีส่วนน้อย ที่พบเป็น tubular epithelial cell

เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวจากบริเวณของ Papilla มาทำการเพาะเลี้ยง ใน 24 ชั่วโมงแรกจะพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะแสดงคุณลักษณะของ epithelium (epithelial phenotype) โดยพบมีการแสดงออกของ ZO-1 ในบริเวณของ tight uncton แต่ในเซลล์บางส่วนกลับพบว่า มีการแสดงออกของ  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) ซึ่งเป็นลักษณะของ mesenchymal cell ด้วยการแสดงออกของเซลล์ในสภาพแวดล้อมต่างกันจะมีความแตกต่างกัน คือ ถ้านำเซลล์มาเพาะเลี้ยงต่อไปที่สภาวะปกติ (5% CO<sub>2</sub> and 95% room air) เซลล์ส่วนใหญ่จะมีลักษณะ เป็นรูปกระสวย (spindle shape) และพบมีการแสดงของ  $\alpha$ -smooth muscle actin แต่ถ้านำเซลล์มาเลี้ยงในสภาพที่ขาดออกซิเจน (hypoxic condition, (5% CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and 93.5% N<sub>2</sub>) เซลล์ส่วนใหญ่จะแสดงลักษณะของ epithelial phenotype โดยพบการแสดงออกของ ZO-1 เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 2.9) นอกจากนั้นยังพบว่า มีเซลล์ส่วนหนึ่งที่เกาะกลุ่มกันเป็นก้อนคล้ายลักษณะของ neurospheres ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง neuronal stem cell จะพบลักษณะนี้บ่อยขึ้นเมื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน serum-free culture media และยังสามารถตรวจพบ nestin ซึ่งเป็น marker ของ neural stem cells จากเซลล์กลุ่มนี้ด้วย (รูปที่ 2.10) การตรวจพบดังกล่าวแสดงถึงคุณลักษณะของเซลล์ที่มีความเป็น pluripotent คือสามารถพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้หลายชนิดซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งของ stem cells

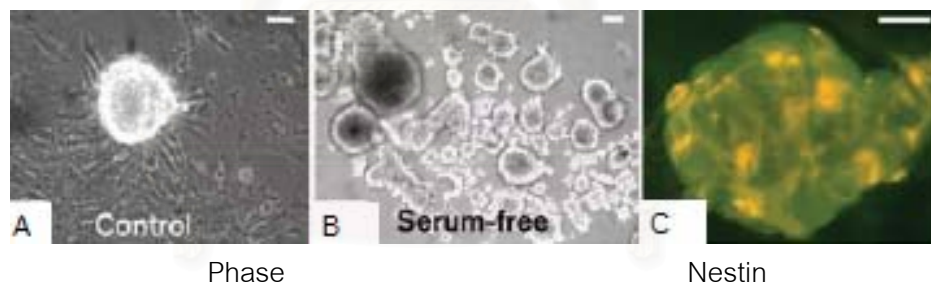


รูปที่ 2.8 แสดงการตรวจพบสาร Bromodeoxyuridine (BrdU) ในส่วยต่างๆของไตหนู อายุ 2 เดือน, A บริเวณของ outer cortex พบเซลล์ที่ย้อมติดสาร BrdU จำนวนเล็กน้อย, B บริเวณของ mid-cortex พบหน่วยไต (glomerulus) บางหน่วยที่มีเซลล์ที่ย้อมติดสาร BrdU จำนวนเล็กน้อย, C บริเวณของ medullar พบเซลล์ที่ย้อมติดสาร BrdU น้อยมาก, D บริเวณ papilla ตรวจพบเซลล์ที่ย้อมติดสาร BrdU เป็นจำนวนมาก ; สีแดงแสดงการติดสีของสาร collagen จากการย้อมด้วยสาร rhodamine สีเขียวแสดงการติดสีของสาร BrdU จากการย้อมด้วย FITC fluorescin(32)

ทางคณะผู้ศึกษาได้ทำการศึกษาต่อไปโดยทำให้เกิดการขาดเลือดที่ไตข้างหนึ่งในหนูที่ได้รับสาร BrdU ในช่วงแรกคลอด แล้วทำการศึกษาดูเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของไตหลังจากที่ไตเกิดการขาดเลือดเปรียบเทียบกับไตอีกข้างที่ปกติ



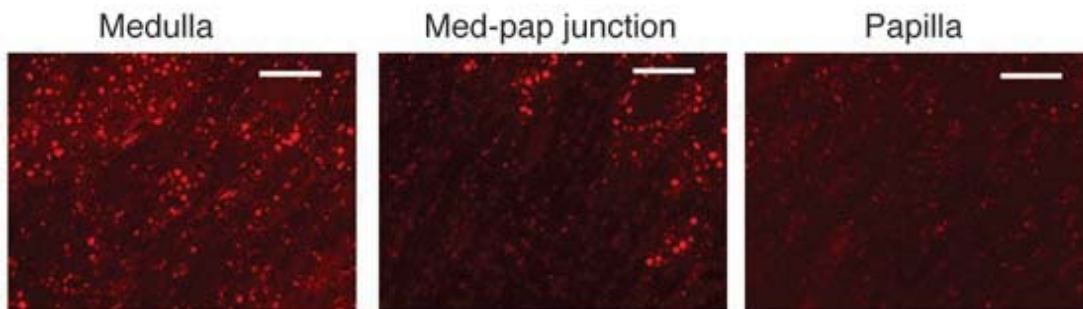
รูปที่ 2.9 แสดงคุณลักษณะของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเซลล์ที่แตกต่างกัน ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน สภาพปกติ(5% CO<sub>2</sub> และ 95% room air) เซลล์ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปกระสวย (spindle shape) และพบมีการแสดงออกของ  $\alpha$ -smooth muscle actin แต่ถ้านำเซลล์มาเลี้ยงในสภาพที่ขาดออกซิเจน (hypoxic condition (5% CO<sub>2</sub>, 1.5% O<sub>2</sub> และ 93.5% N<sub>2</sub>)) เซลล์ส่วนใหญ่จะแสดงลักษณะของ epithelial phenotype โดยพบการแสดงออกของ ZO-1 เป็นจำนวนมาก(32)



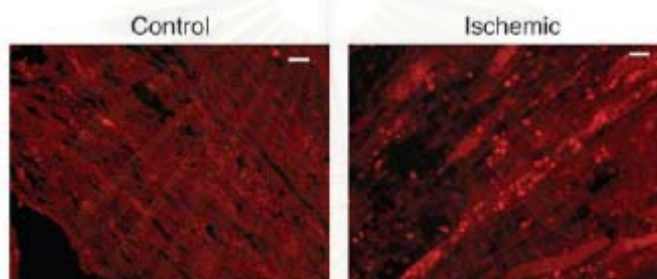
รูปที่ 2.10 A แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนหนึ่งที่เกาะกลุ่มกันเป็นก้อนคล้ายลักษณะของ neurospheres, B เมื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน serumfree culture media จะพบลักษณะของ neurospheres ได้บ่อยขึ้น, C แสดงการตรวจพบ nestin ซึ่งเป็น marker ของ neural stem cells จาก neurospheres(32)

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ จากไตที่ขาดเลือดมาดู จะพบลักษณะของ Apoptotic cell เกิดขึ้นโดยทั่วไปยกเว้นในบริเวณส่วนของ papilla ที่มีการเกิด apoptosis น้อยมาก (รูปที่ 2.11) และเมื่อทำการตรวจหา proliferative cell marker KI-67 ก็จะมีพบมากขึ้นที่บริเวณส่วนของ papilla เช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.12)





รูปที่ 20.11 แสดงการตรวจพบ apoptotic cells หลังจากไตเกิดการขาดเลือด โดยการย้อม Tunnel staining บริเวณของ papilla เป็นส่วนที่ตรวจพบ apoptotic signal น้อยมาก(32)



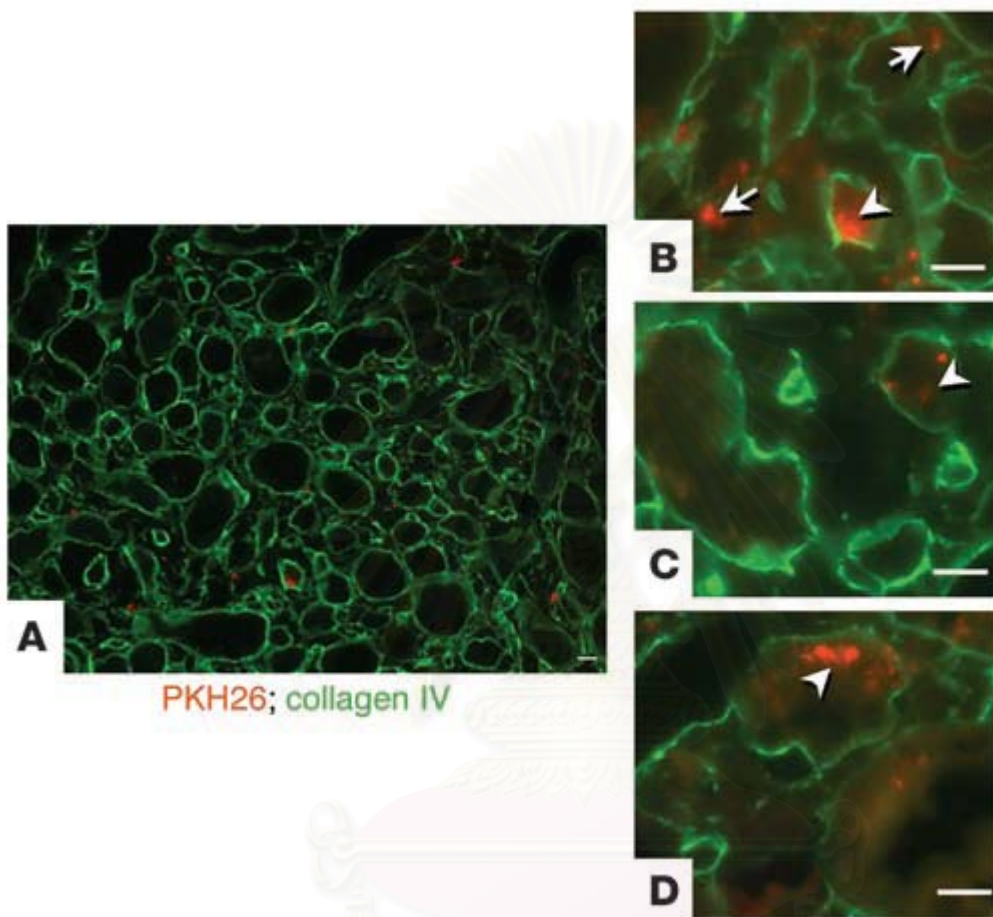
Ki-67 (rhodamine)

รูปที่ 20.12 แสดงการตรวจพบ proliferative cell marker KI-67 หลังจากไตเกิดการขาดเลือดโดยการย้อม rhodamine พบมีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดมากขึ้นในบริเวณของ medulla(32)

นอกจากนำเมื่อนำ Renal papillary cell ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye PKH26) ฉีดเข้าไปที่บริเวณ subcapsular area ของไตข้างที่เกิดจากการขาดเลือด หลังจากนั้น 1 สัปดาห์นำไตทั้ง 2 ข้างนำมาตรวจสอบเพื่อหาเซลล์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง พบว่าเซลล์ดังกล่าวได้มีการเคลื่อนตัวไปยังส่วนต่างๆ ของไตเช่น medulla โดยพบเซลล์กระจายอยู่ทั้งในส่วนของ medulla และ interstitium (รูปที่ 2.13)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อได้ว่า เซลล์ของ renal papilla มีคุณสมบัติที่คล้ายกับ adult renal stem cells คือเป็นเซลล์ที่ปกติและแบ่งตัวซ้ำหรือไม่แบ่งตัว ทนต่อการ injury เช่นการขาดเลือด พบมีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซมเมื่อมีการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อไต และยังสามารถแสดงออกของ marker ต่างๆ ที่แสดงถึงความสามารถในการเกิด differentiation

ปัญหาทางวิจัยที่ยังต้องอาศัยการศึกษาหาคำตอบคือ niches ของ adult renal stem cell ที่ renal papilla เคลื่อนย้ายไปซุ่มแซมเพื่อ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่ถูกทำลายเพื่อทดแทนได้อย่างไรและช่วยกลไกอะไรในการศึกษาเพื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกเพื่อการรักษา โรคไตต่างๆ ในอนาคต



รูปที่ 2.13 A-D แสดงการตรวจ renal papillary cell ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง PKH26 หลังจากที่ถูกฉีดเข้าไปบริเวณ subcapsular ของไต บางเซลล์อยู่ในส่วนของ interstitium (ลูกศรในรูป B) ขณะที่บางส่วนอยู่ในตำแหน่งของ tubule (ลูกศรในรูป B-D)(32)

### 2.5.3 Clinical trials of stem cells in kidney disease

เนื่องจากการศึกษาในด้านของ adult renal stem cells ยังอยู่ในระยะเริ่มแรก การศึกษาในเรื่องของการนำ stem cells มาใช้ในการรักษาโรคไตนั้น ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้ stem cells จากไขกระดูกคือ hematopoietic stem cells หรือ mesenchymal stem cell เป็นหลัก โดยอาศัยความสามารถของ stem cells ในการเกิด transdifferentiation ไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ ต่างชนิดกับตัวของมันเองได้ การศึกษา

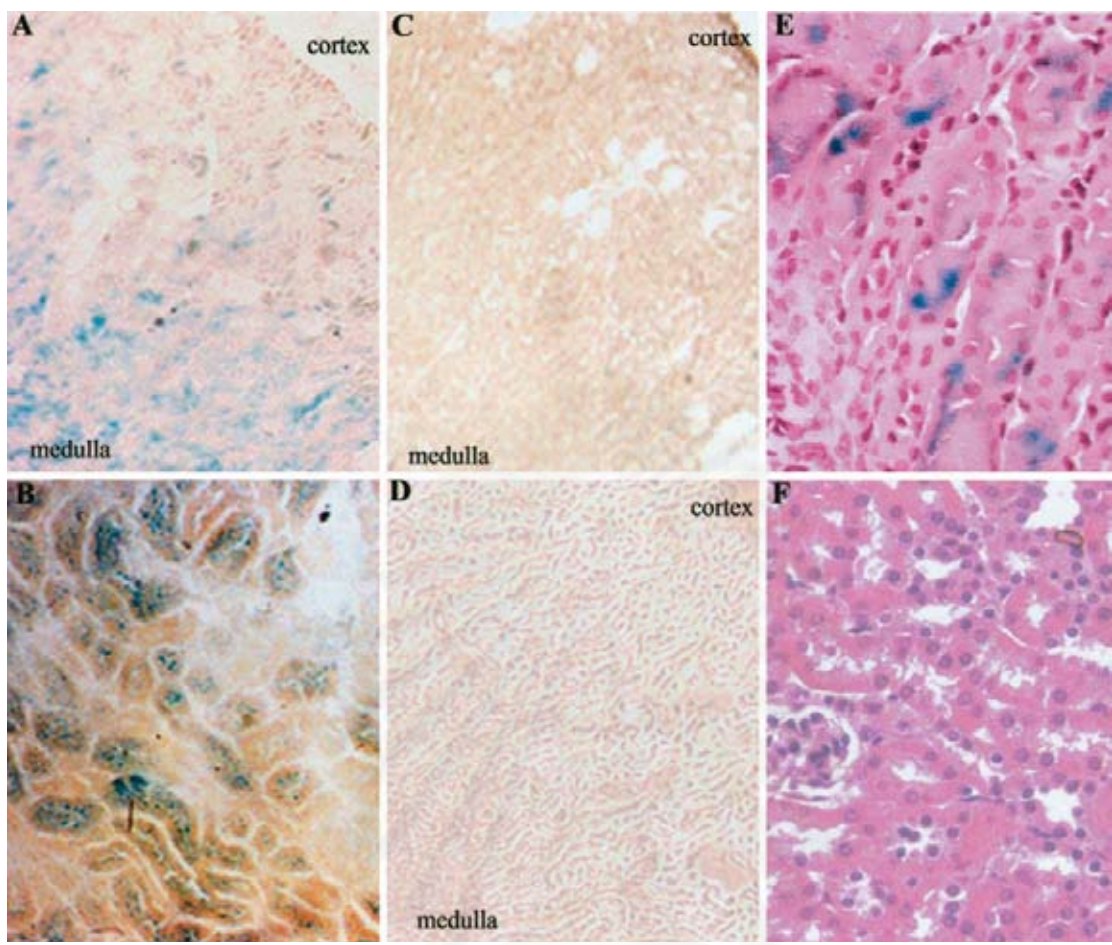


เรื่องการเกิด transdifferentiation ของเซลล์ไขกระดูกไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ เริ่มจากการตรวจพบลักษณะของ Y chromosome อยู่ในไตของผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) จากผู้ป่วยหญิง หรือ ผู้ป่วยหญิงที่รับการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) จากผู้ป่วยชาย โดยจะพบเซลล์ที่ไขกระดูกที่เป็น Y chromosome มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ของ renal vasculature, renal tubule, interstitium และเซลล์ของ Glomerulus(10-12,19) การตรวจไม่พบ marker ของ เม็ดเลือดขาว และการตรวจพบ epithelial marker ในเซลล์นั้นทำให้เชื่อได้ว่ามีการเกิด transdifferentiation ขึ้นจริง ไม่ใช่เป็นเพียงเม็ดเลือดขาวที่อาจพบได้บริเวณนั้น

ข้อมูลจากการตรวจพบดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากการทดลองในสัตว์ทดลองหลายการศึกษา ที่ตรวจพบเซลล์จากไขกระดูกมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อไต Poulsom และคณะได้ศึกษาไตของหนูเพศเมียที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกจากหนูเพศผู้ พบว่าร้อยละ 8 ของ tubular cell ของหนูดังกล่าว ตรวจพบมี Y chromosome อยู่ในเซลล์(10) นอกจากนี้มีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขกระดูกเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ คือ mesangial cell, endothelial cell และ interstitial cell

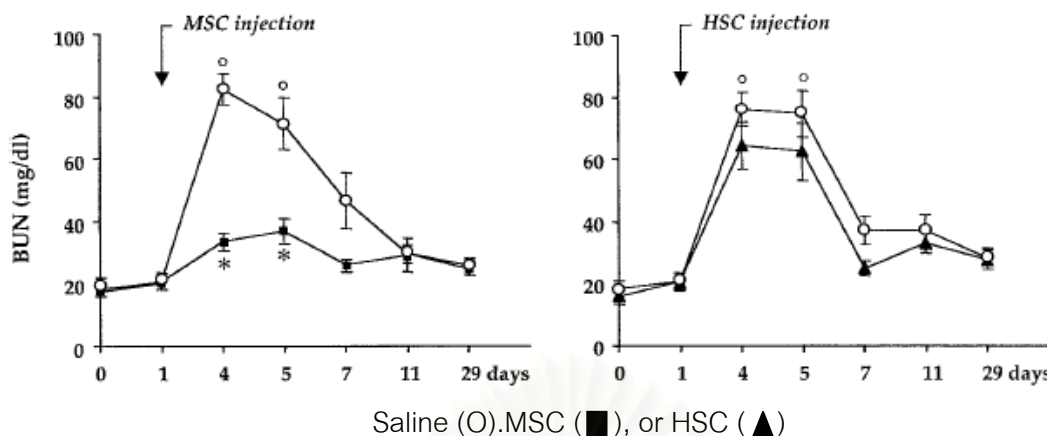
Lin และคณะ(36) ได้ทำการปลูกถ่าย hematopoietic stem cells จากหนูสายพันธุ์ Rosa26 ซึ่งมีการแสดงออกของ  $\beta$ -galactosidase ให้กับหนูสายพันธุ์ปกติที่ได้รับการฉายรังสีเพื่อกดภูมิคุ้มกัน(36) หลังจากทำให้ไตเกิดการขาดเลือดขึ้น (ischemia-reperfusion injury) จะสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีการย้อมติดสี X-gal ในบริเวณของ S3 segment ของ proximal tubule เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ไม่พบเซลล์ชนิดนี้เลยในไตของหนูที่ปกติที่ไม่มีการขาดเลือด (รูปที่ 2.14) การศึกษานี้เป็นหนึ่งในการศึกษาแรกๆ ที่แสดงให้เห็นว่า hematopoietic stem cells สามารถที่จะพัฒนาตัวเองไปเป็น renal tubular cell เพื่อช่วยในการซ่อมแซมไตที่บาดเจ็บได้

Morigi และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยการฉีด normal saline, hematopoietic stem cells หรือ mesenchymal stem cell เข้าไปในหนูทดลองที่ถูกทำให้เกิด acute renal failure จากยาเคมีบำบัด cisplatin (37) ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดยา mesenchymal stem cells เข้าไปใน 1 วัน หลังจากการให้ยา cisplatin จะสามารถช่วยป้องกันการเกิดการบาดเจ็บต่อ tubular cell และการเสื่อมการทำงานของไตได้ (รูปที่ 2.15, 2.16) และยังพบหลักฐานว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ mesenchymal stem cells ไปเป็น tubular epithelial cell อีกด้วย ในขณะที่ไม่พบความสามารถนี้ในกลุ่มของหนูที่ได้รับการฉีดยา hematopoietic stem cells ซึ่งทางผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจาก hematopoietic stem cells ไม่สามารถที่จะเจริญต่อไป และทำให้เกิด engraftment ในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายที่ไม่ได้รับการฉายรังสีมาก่อนได้ ในขณะที่ mesenchymal stem cells ไม่ต้องอาศัยการฉายรังสีเพื่อกดภูมิคุ้มกันหนูที่ได้รับการปลูกถ่าย ก็สามารถทำให้เกิด engraftment ได้ นอกจากนั้นยา cisplatin ซึ่งเป็น cytotoxic drug อาจจะมีผลต่อการแบ่งตัวของ hematopoietic stem cells มากกว่าด้วย



รูปที่ 2.14 แสดงการติดสี X-gal staining ของไตหลังจากเกิด ischemia-reperfusion injury และ hematopoietic stem cell transplantation จากหนูสายพันธุ์ Rosa26, A แสดงการติดสี X-gal staining ของไตหนูที่ได้รับการปลูกถ่าย hematopoietic stem cell หลังจากการเกิด ischemia-reperfusion injury, B : เหมือนรูป A แต่กำลังขยายมากขึ้น , C : X-gal staining ของไตหลังจากการเกิด ischemia-reperfusion injury แต่ไม่ได้รับ hematopoietic stem cell transplantation (กลุ่มควบคุม) , D : X-gal staining ของไตที่ได้รับ hematopoietic stem cell transplantation แต่ไม่มีการทำให้เกิด ischemia-reperfusion injury (กลุ่มควบคุม) E : X-gal staining ของไตหลังจากการเกิด ischemia-reperfusion injury และ hematopoietic stem cell transplantation ย้อม H&E , F: X-gal staining ของไตที่ได้รับ hematopoietic stem cell transplantation แต่ไม่มีการทำให้เกิด ischemia-reperfusion injury (กลุ่มควบคุม) ย้อม counterstain ด้วย H&E(36)

Lange และคณะได้ทำการศึกษาโดยใช้ mesenchymal stem cells ในหนูที่ได้รับทำให้เกิด ischemia/reperfusion injury พบว่าช่วยในการปกป้องการบาดเจ็บต่อไตเช่นเดียวกัน

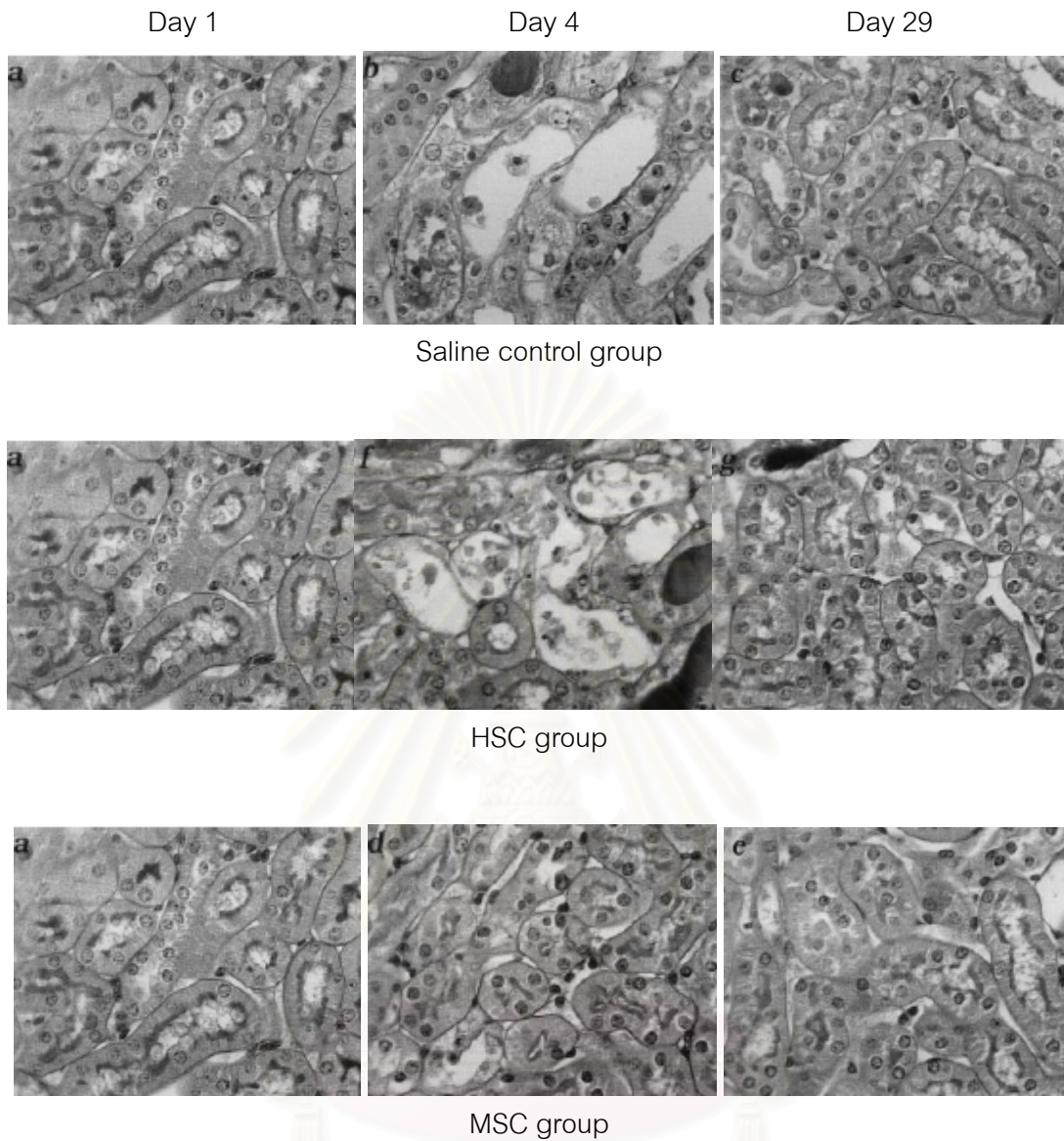


รูปที่ 2.15 แสดงค่า BUN (Blood urea nitrogen) ในเลือดเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับการฉีด hematopoietic stem cells (HSC) หรือ mesenchymal stem cells (MSC) 1 วัน หลังการให้ยา cisplatin จะเห็นได้ว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด mesenchymal stem cells เข้าไปการเพิ่มขึ้นของค่า BUN น้อยกว่าในช่วงอาทิตย์แรกหลังการศึกษา(37)

อย่างไรก็ตามข้อมูลจากบางการศึกษาก็ได้รับการสนับสนุนว่าการใช้เซลล์จากไขกระดูกจะมีประโยชน์ในการช่วยซ่อมแซมการบาดเจ็บต่อไตจาก Ischemia/reperfusion injury เสมอไป Lin และคณะพบว่าแม้ว่าเซลล์จากไขกระดูกจะสามารถเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อไตได้ แต่ปริมาณของเซลล์ที่พบมีเป็นส่วนน้อย(13) เซลล์ใหม่ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นยังคงเกิดการแบ่งตัวมาจากเซลล์ในไตที่บาดเจ็บมากกว่า โดยพบว่าประมาณร้อยละ 90 ของ epithelial cell ที่เกิดขึ้นมาจากเซลล์ของตัวเอง มีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ไขกระดูกเพียงร้อยละ 10 และไม่พบว่าการปลูกถ่ายเซลล์จากไขกระดูกจะช่วยให้การทำงานของไตดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาในด้านของ stem cells เป็นการศึกษาที่ใหม่และมีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นที่สนใจอย่างกว้างขวาง และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาโรคต่างๆ หลายชนิด การใช้ stem cells ในการรักษาโรคที่เกิดจากการบาดเจ็บ หรือเกิดจากความเสื่อมของไตยังคงเป็นการรักษาใหม่ที่ดูจะมีศักยภาพสูงเมื่อเทียบกับการรักษาชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นการค้นพบ Adult renal stem cells เมื่อไม่นานมานี้ ทำให้เกิดการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกให้เกิดประโยชน์สูงสุด อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นข้อมูลที่ศึกษาในสัตว์ทดลอง ยังคงต้องรอข้อมูลการศึกษาวิจัยในมนุษย์ต่อไป เพื่อนำไปสู่การรักษาโรคไตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต





รูปที่ 2.16 แสดงผลการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับการฉีด normal saline, hematopoietic stem cells (HSC) หรือ mesenchymal stem cells (MSC) 1 วัน หลังการให้ยา cisplatin จะเห็นได้ว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด mesenchymal stem cells เข้าไปจะสามารถช่วยป้องกันการเกิดการบาดเจ็บต่อ tubular cell ในวันที่ 4 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ normal saline หรือ hematopoietic stem cells(37)

## บทที่ 3 วิธีการวิจัย

### 3.1 ประชากร

#### 3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เป็นผู้หญิงในประเทศไทย

#### 3.1.2 ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เป็นผู้หญิงที่ได้รับการเจาะไตในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ.2550

#### 3.1.3 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (inclusion criteria)

- ผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เป็นผู้หญิงที่ได้รับการเจาะไตอย่างน้อย 1 ครั้ง ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ.2550

#### 3.1.4 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา exclusion criteria)

- ผู้ที่ผลการตรวจชิ้นเนื้อไม่สามารถนำชิ้นเนื้อนั้นมาวิเคราะห์ได้ เช่น ได้ชิ้นเนื้อมาไม่เพียงพอแก่การวินิจฉัย ตามผลการอ่านของพยาธิแพทย์

#### 3.1.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size determination)

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรทั้งหมด จึงไม่จำเป็นต้องคำนวณขนาดตัวอย่าง

### 3.2 การสังเกตและการวัด

3.2.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ สาเหตุของโรคไตวายเรื้อรัง ชนิดของการปลูกถ่ายไต ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) ผล HLA PRA Cross match



ระยะเวลาตั้งแต่ภายหลังการปลูกถ่ายไตจนถึงวันที่ทำการเจาะชิ้นเนื้อไต ผลการวินิจฉัยทางพยาธิสภาพของไตหลังการปลูกถ่าย

3.2.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้บริจาคไต ได้แก่ เพศ อายุ สาเหตุของสมองตาย (ถ้ามี)

3.2.3 ข้อมูลที่ศึกษา ได้แก่ จำนวนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ

3.2.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

ชิ้นเนื้อที่ได้รับการเข้าร่วมวิจัยจะได้รับการตรวจหา Y-chromosome โดยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยมีวิธีและขั้นตอนการตรวจดังนี้

**เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ**

1. CEP Y (DYZ1, Satellite III) Spectrum green (Cat. No. 32-132024, Vysis, USA)
2. Paraffin Pretreatment Kit II (Cat. No. 32-801210, Vysis, USA)
3. DAPI (Vysis, USA)
4. Xylene
5. Ethanol (70%, 95%, 100%)
6. Purified water
7. Coplinjar
8. 37 °C , 73 °C and 80 °C water baths
9. Micropipette and tips
10. Microcentrifuge tube
11. Denaturation/Hybridization Unit

**การเตรียม Pretreatment solution**

- เป็นขั้นตอนการนำ paraffin ออกจาก slides โดย
- ใช้น้ำยา Paraffin Pretreatment Kit II (Cat. No. 32-801210, Vysis, USA)
- เทน้ำยา Pretreatment solution 50 ml ลงใน Coplin jar
- นำ Coplin jar ไปวางไว้ในอ่างน้ำ (water bath) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่  $80 \pm 1$  °C (โดยต้องให้แน่ใจว่าอุณหภูมิไว้ที่ เท่ากับ  $80 \pm 1$  °C จริงก่อนที่จะนำ slide ใส่งไป)
- ทิ้งน้ำยาหลังจากใช้แล้ว 1 วัน

### การเตรียม Protease solution

- เป็นขั้นตอนการทำการย่อยโปรตีน โดย
- เติมน้ำยา Protease buffer 62.5 ml ลงใน Coplin jar
- นำ Coplin jar ไปวางไว้ในอ่างน้ำ (water bath) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่  $37 \pm 1$  °C (โดยต้องให้แน่ใจว่าอุณหภูมิไว้ที่ เท่ากับ  $37 \pm 1$  °C จริงก่อนที่จะนำ slide ใส่งไป)
- ใส่ Protease 250 mg (1 tube) ใน Protease buffer ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่  $37 \pm 1$  °C
- ทิ้งนํายาหลังจากใช้แล้ว 1 วัน

### การเตรียมน้ำบริสุทธิ์ (Purified water)

- ใต้น้ำบริสุทธิ์ 50 ml ลงใน Coplin jar
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### การเตรียม Post-Hybridization Wash Buffer (2X SSC/0.3% NP-40)

- ใต้นํายาดังนี้
  - 100 ml 20X SSC, pH 5.3
  - 847 ml Purified water
  - 3 ml NP-40
  - 1,000 ml Final Volume
- นํานํายาดังกล่าวผสมรวมกัน
- วัด pH ของสารละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ pH meter
- ปรับ pH ให้ได้ระหว่าง 7.0-7.5 โดยใช้ 1N NaOH
- ปรับปริมาณนํายาให้เป็น 1 ลิตรโดยใต้นํายาบริสุทธิ์
- ทิ้งนํายาเมื่อสิ้นสุดการใช้ในแต่ละวัน
- สามารถเก็บนํายาที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

### การเตรียม Probe

- ใช้สำหรับ 1 slide ประกอบด้วย
  - 1  $\mu$ l probe
  - 7  $\mu$ l hybridization buffer
  - 2  $\mu$ l purified water
  - 10  $\mu$ l total volume

### ขั้นตอนการทำ

#### การเตรียม slides ที่จะทดสอบ

1. ตัดชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ใน paraffin blocks ให้มีขนาดบาง 2-3  $\mu$ m โดยใช้เครื่อง microtome
2. ลอยชิ้นเนื้อที่ตัดได้ในอ่างน้ำ ซึ่งมีน้ำบริสุทธิ์ โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 40 °C
3. ติดชิ้นเนื้อที่ได้เข้ากับ positively charged slides
4. นำ slides ไปผึ่งให้แห้ง
5. อบ slides ค้างคืนที่อุณหภูมิ 56 °C
6. จุ่ม slides ใน Xylene เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
7. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 6 อีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้ Xylene ใหม่
8. Dehydrate slides ด้วย 100% EtOH เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง
9. ผึ่ง slides ให้แห้ง ใช้เวลา 2-5 นาที

#### การเตรียม slides pretreatment

1. จุ่ม slides ลงใน Pretreatment solution ที่ อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที
2. จุ่ม slides ลงในน้ำบริสุทธิ์ เป็นเวลา 3 นาที
3. นำ slides ที่ได้ออกจากเหยือกซึ่งใส่น้ำบริสุทธิ์

- นำน้ำส่วนเกินที่ติดอยู่บน slides ออกโดยใช้กระดาษชำระซับตามขอบของ slides

#### การเตรียม Protease Pretreatment

- จุ่ม slides ลงใน Protease solution ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที
- จุ่ม slides ลงในน้ำบริสุทธิ์ เป็นเวลา 3 นาที
- ผึ่ง slides ให้แห้ง ใช้เวลา 2-5 นาที

#### ขั้นตอนการทำ Hybridization: hybridization โดยใช้วิธี Co-denature with the HYBrite Denaturation/Hybridization Unit

- Dehydrate slides:
  - จุ่ม slides ลงใน 70 % EtOH เป็นเวลา 1 นาที
  - จุ่ม slides ลงใน 95 % EtOH เป็นเวลา 1 นาที
  - จุ่ม slides ลงใน 100 % EtOH เป็นเวลา 1 นาที
- ทำกระดาษซับให้ขึ้นโดยนำไปจุ่มในน้ำ และนำไปวางบนช่องตามแนวของ heating surface ของ HYBrite system
- ตั้ง Melt Temp ที่ อุณหภูมิ 73 °C และ Melt Time ที่ 5 นาที. ตั้ง Hyb Temp ที่ อุณหภูมิ 37 °C and Hyb Time เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- ทำเครื่องหมายตำแหน่งที่ hybridization โดยใช้ขีดกระจกหัวเพชร บน slides
- หยด Probe 10 µl ลงบน slide หลังจากนั้นปิด coverslip ทันที
- Seal coverslip ด้วย rubber cement
- นำ slides ที่ได้เข้าสู่กระบวนการ co-hybridization
- slides ที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการล้างต่อไป

#### ขั้นตอนการเตรียมน้ำยาล้าง slides

- เท 2X SSC/0.3% NP-40 70 ml ลงใน Coplin jar
- วาง Coplin jar ลงในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 73±1 °C อย่างน้อย 30 นาทีก่อนนำไปใช้
- ทิ้งน้ำยาหลังจากใช้แล้ว 1 วัน
- เท 2X SSC/0.3% NP-40 70 ml ลงใน Coplin jar อีกรูป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### ขั้นตอนการล้าง slide

- ลอก rubber cement ออกจากแผ่น slide และจุ่มลงในน้ำยา 2X SSC/0.3% NP-40 ในเหยือกที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำกับ slide แผ่นอื่นๆ ควรแช่แผ่น slide ไว้อย่างน้อย 2-5 นาที เพื่อให้ coverslip หลุดออกจากแผ่น slide

2. จุ่ม slide ลงใน 2X SSC/0.3% NP-40 ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  เขย่า slide เป็นเวลา 1-3 วินาที ทำซ้ำกับ slide แผ่นอื่นๆ

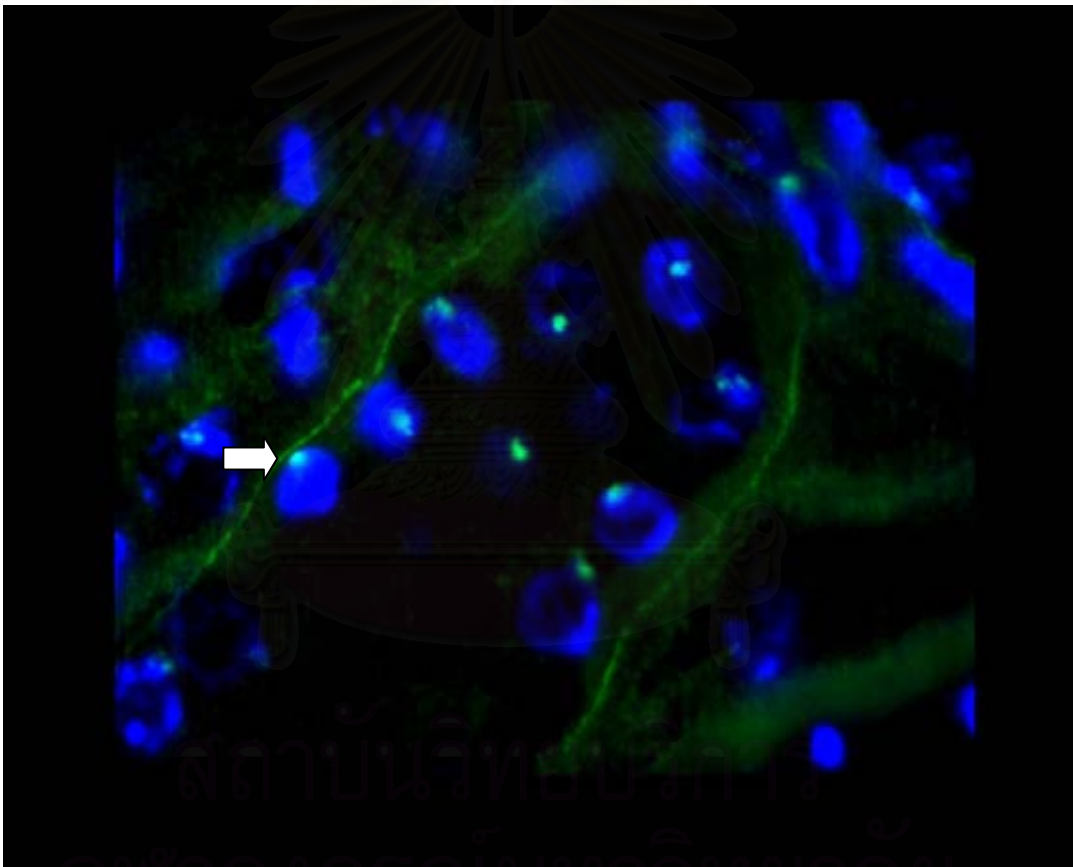
3. แช่ slide ไว้ในน้ำยา 2 นาที (ให้แน่ใจว่าอุณหภูมิของน้ำยาอยู่ที่  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$ )

#### การเตรียม slide เพื่อการตรวจหลังจาก hybridization

1. ผึ่ง slide ให้แห้งในที่มืด

2. หยด DAPI 10 ml ลงบนตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายบน slide และปิดด้วย coverslip

3. นำ slide ที่ได้ไปส่องกล้อง immunofluorescence โดยใช้ filter ที่เหมาะสม ซึ่งจะได้ผลดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยใช้วิธี Fluorescence in situ hybridization ในภาพแสดง Y-chromosome ที่ตรวจพบ เห็นเป็นลักษณะจุดสีเขียวสว่างอยู่บน nucleus ของ tubular epithelial cell สีน้ำเงิน (ลูกศรสีขาว)



### 3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูล และตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูลเพื่อให้ได้ครบถ้วนตามจำนวนที่ต้องการ และนำมาวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการตรวจนับจำนวน Y-chromosome ที่ positive ต่อจำนวน Renal Tubular Epithelial Cells ทั้งหมด 1000 cells ผลที่ได้ นำมาคำนวณออกมาในหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Y-chromosome ที่ตรวจพบ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวน Y-chromosome ที่ ตรวจพบว่า positive}}{\text{จำนวน Renal Tubular Epithelial Cells ทั้งหมด 1000 cells}}$$

และเนื่องจากเราไม่สามารถตรวจพบ Y-chromosome ได้ positive 100% ใน positive control (ซึ่งอันที่จริงเซลล์ทุกเซลล์ของผู้ชายควรตรวจพบ Y-chromosome ได้ 100 %) เนื่องจาก การตัดชิ้นเนื้อที่มีขนาดบาง ทำให้ การตัดชิ้นเนื้อที่ได้นั้น อาจตัดไม่ผ่านส่วนที่เป็น Y-chromosome ทำให้ไม่สามารถย้อมพบ Y-chromosome ได้ในทุกๆ cells ของ Renal Tubular Epithelial Cells เราจึงต้องทำการปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจได้ในกลุ่มทดลอง (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) โดยใช้สูตร

$$\text{Adjusted cell count of positive Y-chromosome (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{เปอร์เซ็นต์ของ Y-chromosome ที่ positive (กลุ่มตัวอย่าง)} \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์ของ Y-chromosome ที่ positive (กลุ่มควบคุม)}}$$

เปอร์เซ็นต์ของ Y-chromosome ที่ positive (กลุ่มควบคุม) คือ เปอร์เซ็นต์ของ Y-chromosome ที่ positive ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายที่ถูกใช้เป็น Positive control

## บทที่ 4

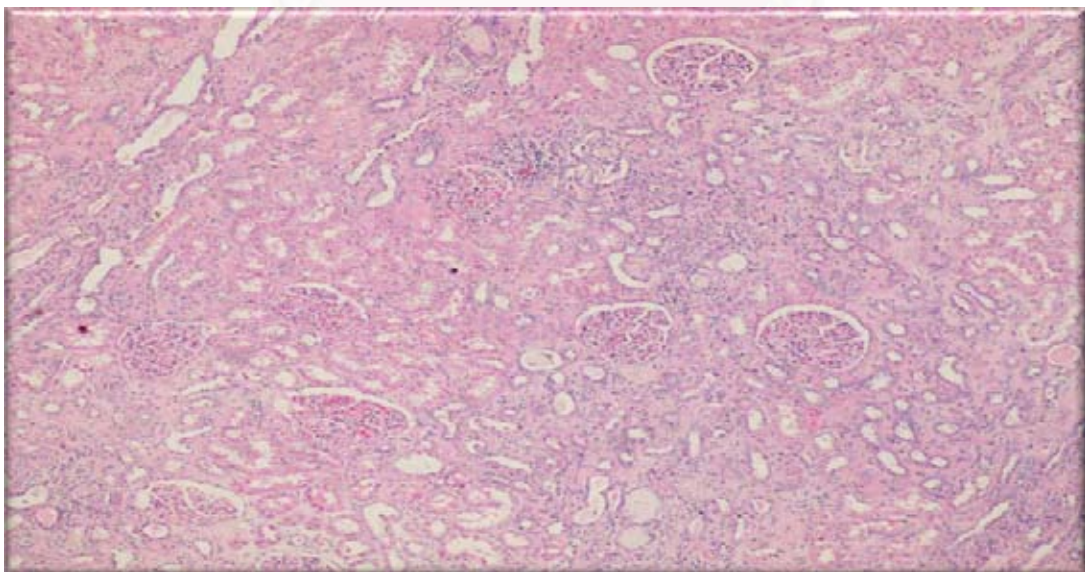
### ผลการวิจัย

#### 4.1 ข้อมูลพื้นฐาน

ในเดือน มกราคม พ.ศ.2543 ถึง กันยายน พ.ศ.2550 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต 175 รายในจำนวนนี้มีผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิง 39 ราย ได้รับการเจาะไตทั้งสิ้น 55 ครั้ง โดยมีชิ้นเนื้อไตที่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา 12 ชิ้น โดยแบ่งเป็นชิ้นเนื้อที่นำมาเป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 4 ชิ้น และ ชิ้นเนื้อที่นำมาเป็นกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 8 ชิ้น โดยมีรายละเอียดดังนี้

##### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชิ้นที่ 1

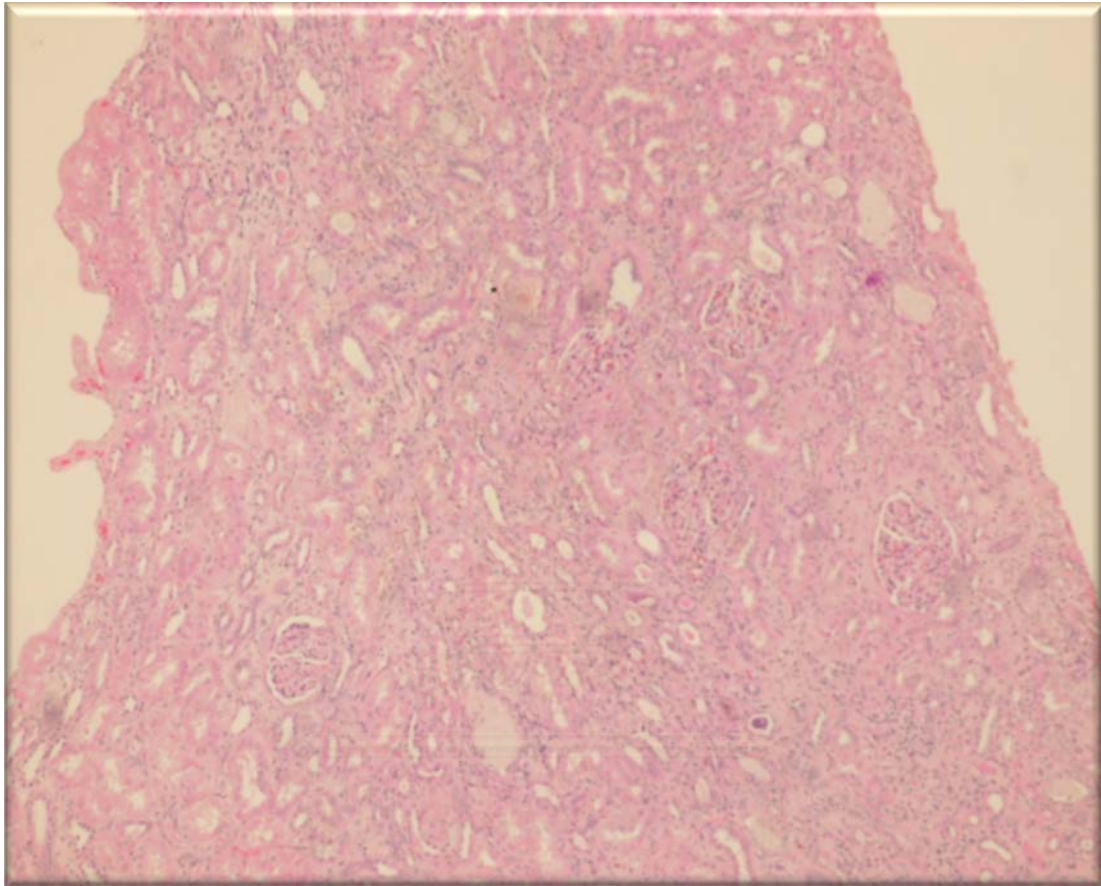
นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 60 ปี ซึ่งได้รับการตัดไตข้างซ้ายออกและนำไตที่ได้ ส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาให้การวินิจฉัยว่าเป็น Urothelial carcinoma in situ of renal pelvis เนื่องจากชิ้นเนื้อนี้เป็นชิ้นเนื้อของผู้ชาย เซลล์ในชิ้นเนื้อจะมี Y-chromosome เราจึงนำชิ้นเนื้อนี้มาเป็นกลุ่มควบคุมในแง่ Positive control ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 1 (positive control) ผลการอ่านทางพยาธิวิทยาวินิจฉัยว่าเป็น Urothelial carcinoma in situ of renal pelvis ชิ้นเนื้อไตที่นำมาใช้เป็นส่วนที่ปกติ

### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 2

นำมาจากผู้ป่วยหญิง อายุ 49 ปี ซึ่งได้รับการตัดไตข้างซ้ายออกและนำไตที่ได้ ส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาให้การวินิจฉัยว่าเป็น Renal cell carcinoma ชิ้นเนื้อนี้เป็นชิ้นเนื้อของผู้หญิง เซลล์ในชิ้นเนื้อนี้จะไม่มี Y-chromosome เราจึงนำชิ้นเนื้อนี้มาเป็นกลุ่มควบคุมในแง่ Negative control ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 2 (negative control) ผลการอ่านทางพยาธิวิทยานิวเคลียสว่าเป็น Renal cell carcinoma ชิ้นเนื้อไตที่นำมาใช้เป็นส่วนที่ปกติ

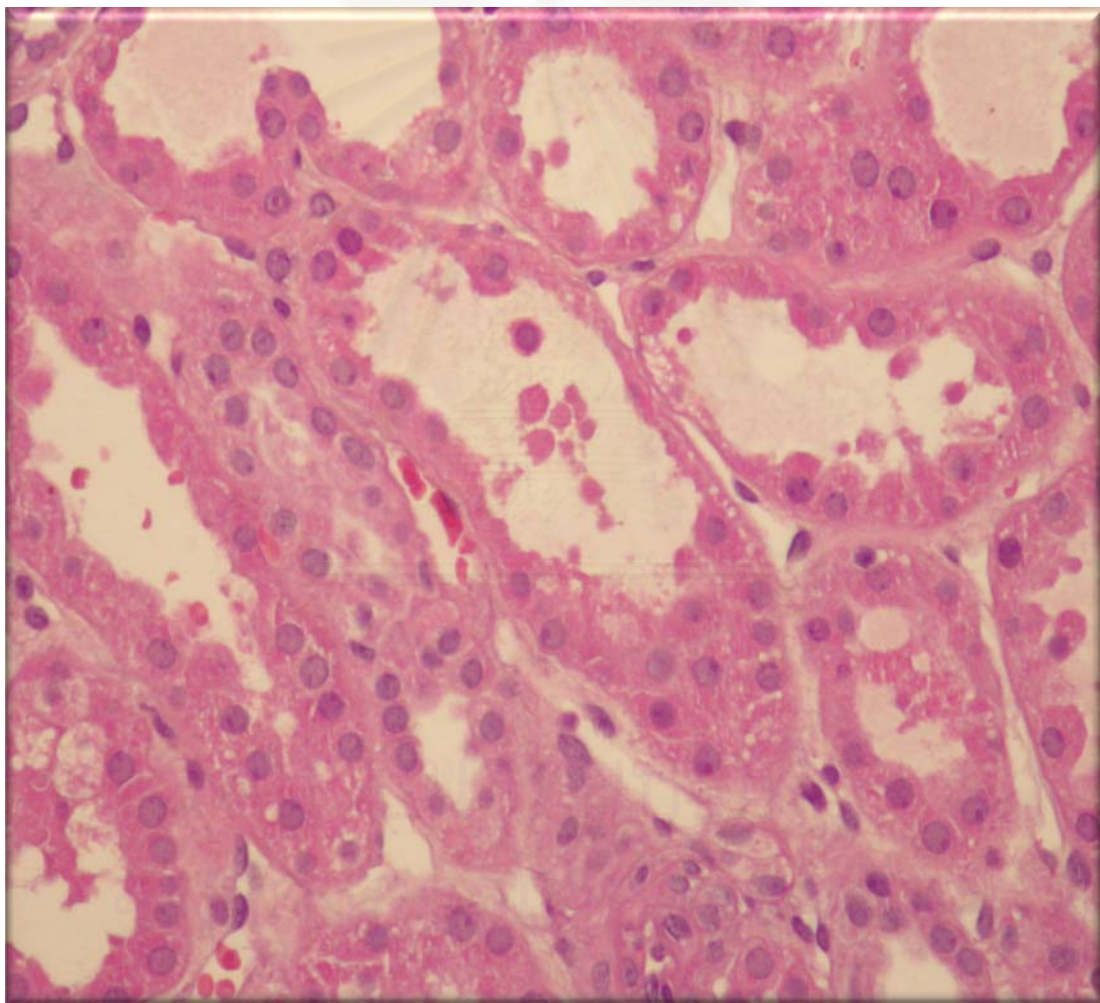
### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 3

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 27 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อเดือน มกราคม ปี พ.ศ. 2543 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 20 มกราคม ปี พ.ศ. 2550 ผลการตรวจ HLA mismatch 2-1-1 ผลการตรวจ Crossmatch B cell IgM positive PRA 0% Blood group A



ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 42 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเลือดออกในสมอง มีปัญหาความดันต่ำขณะรักษาตัวในโรงพยาบาล ระดับ ซีรุ่มครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรุ่มครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 4.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 15 ชั่วโมง

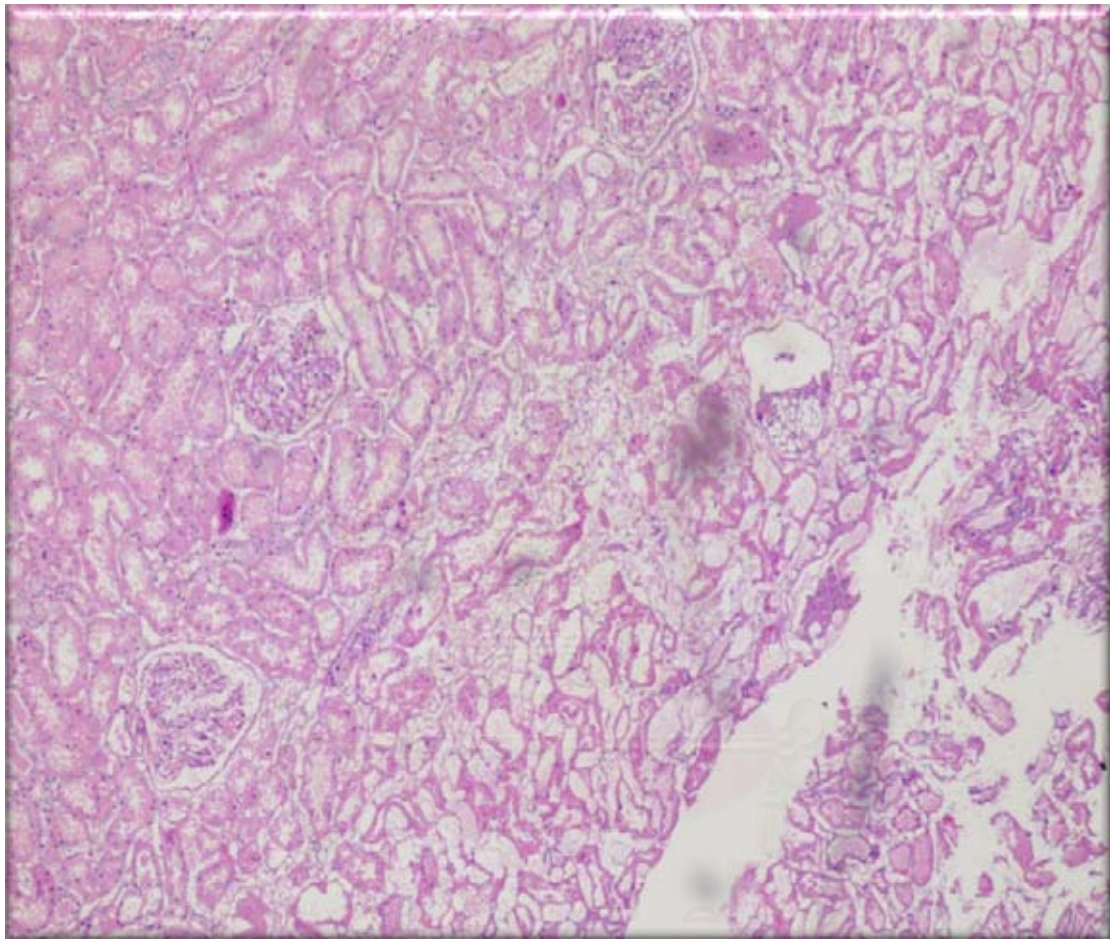
ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตซึ่งได้รับการเจาะไตภายในวันแรกหลังการปลูกถ่ายไต (allograft biopsy at day zero) ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Acute tubular necrosis ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 3 ผลการอ่านทางพยาธิวิทยา วินิจฉัยว่าเป็น Acute tubular necrosis

#### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 4

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 35 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Diabetes nephropathy (DN) ได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม พ.ศ. 2544 ผลการตรวจ HLA mismatch ผลการตรวจ Crossmatch PRA % Blood group O ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงผลชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 4 ผลการอ่านทางพยาธิวิทยา วินิจฉัยว่าเป็น Acute tubular necrosis

มีชิ้นเนื้อไตที่เข้าร่วมในการศึกษากลุ่มตัวอย่างทั้งสิ้น แปด ชิ้น โดยเป็นชิ้นเนื้อไตที่ได้รับการเจาะไตภายหลังการปลูกถ่ายไต ตั้งแต่ 30 ถึง 142 วัน ชิ้นเนื้อแต่ละชิ้น ได้รับการวินิจฉัยโดยพยาธิแพทย์ อันประกอบด้วย ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น (รายละเอียดผลการวินิจฉัย ดูได้ที่ ภาคผนวก)

1. Acute tubular necrosis จำนวน 2 ชิ้น
2. Borderline tubulointerstitial rejection จำนวน 2 ชิ้น



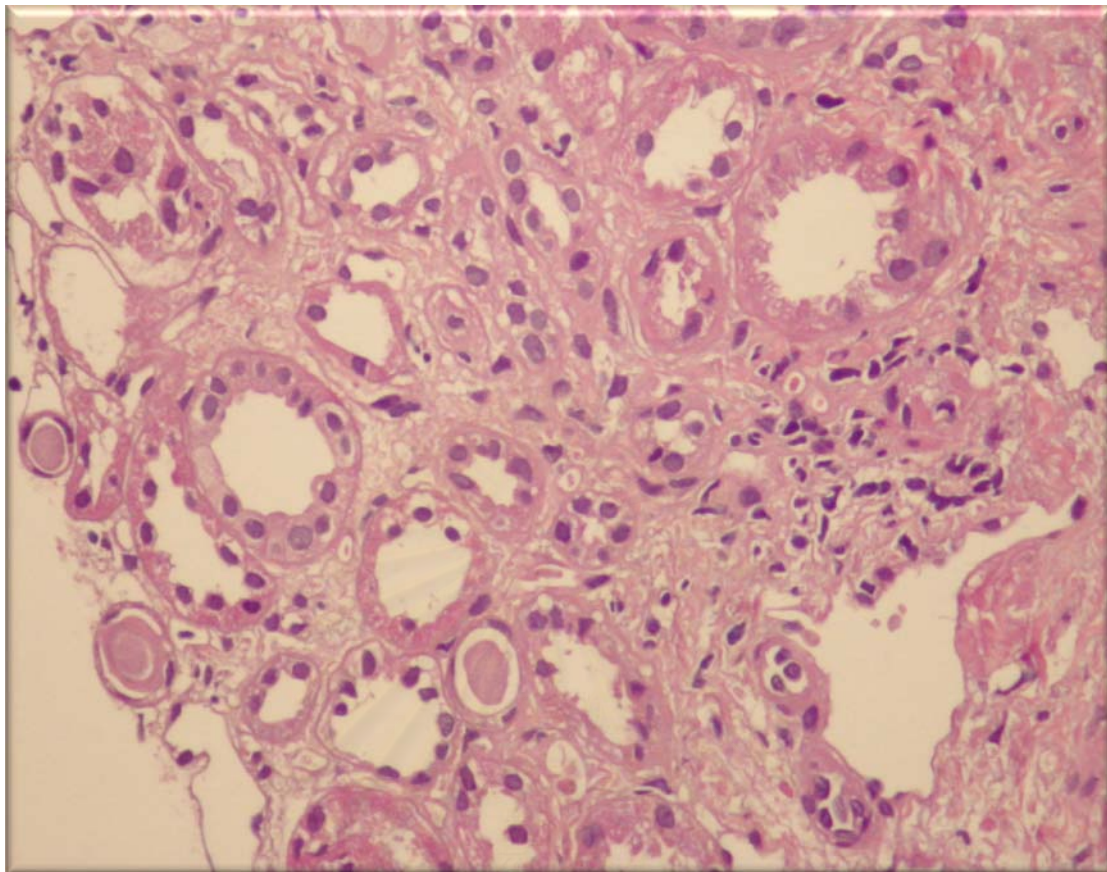
3. Acute cellular rejection จำนวน 1 ชิ้น
4. Cyclosporine nephrotoxicity จำนวน 1 ชิ้น
5. Chronic allograft nephropathy จำนวน 1 ชิ้น
6. IgA nephropathy จำนวน 1 ชิ้น

#### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชิ้นที่ 1

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 41 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Hypertensive nephropathy และมีโรคประจำตัวเดิมคือโรคลมชัก (epilepsy) Ankylosing spondylitis และ Aortic regurgitation ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อวันที่ 13 พฤษภาคม ปี พ.ศ. 2546 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 12 มกราคม ปี พ.ศ. 2550 ผลการตรวจ HLA mismatch 0-0-0 ผลการตรวจ Crossmatch B cell IgM positive PRA 0% Blood group B

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 55 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเส้นโลหิตในสมองแตกและมีเลือดออกในสมอง (intracranial hemorrhage with rupture aneurysm) ระดับ ซีรัมครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรัมครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 2.2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 24 ชั่วโมง

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 90 วันเนื่องจากระดับซีรัมครีเอตินินสูง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Acute tubular injury, Borderline tubulointerstitial lesion. ดังรูปที่ 4.5



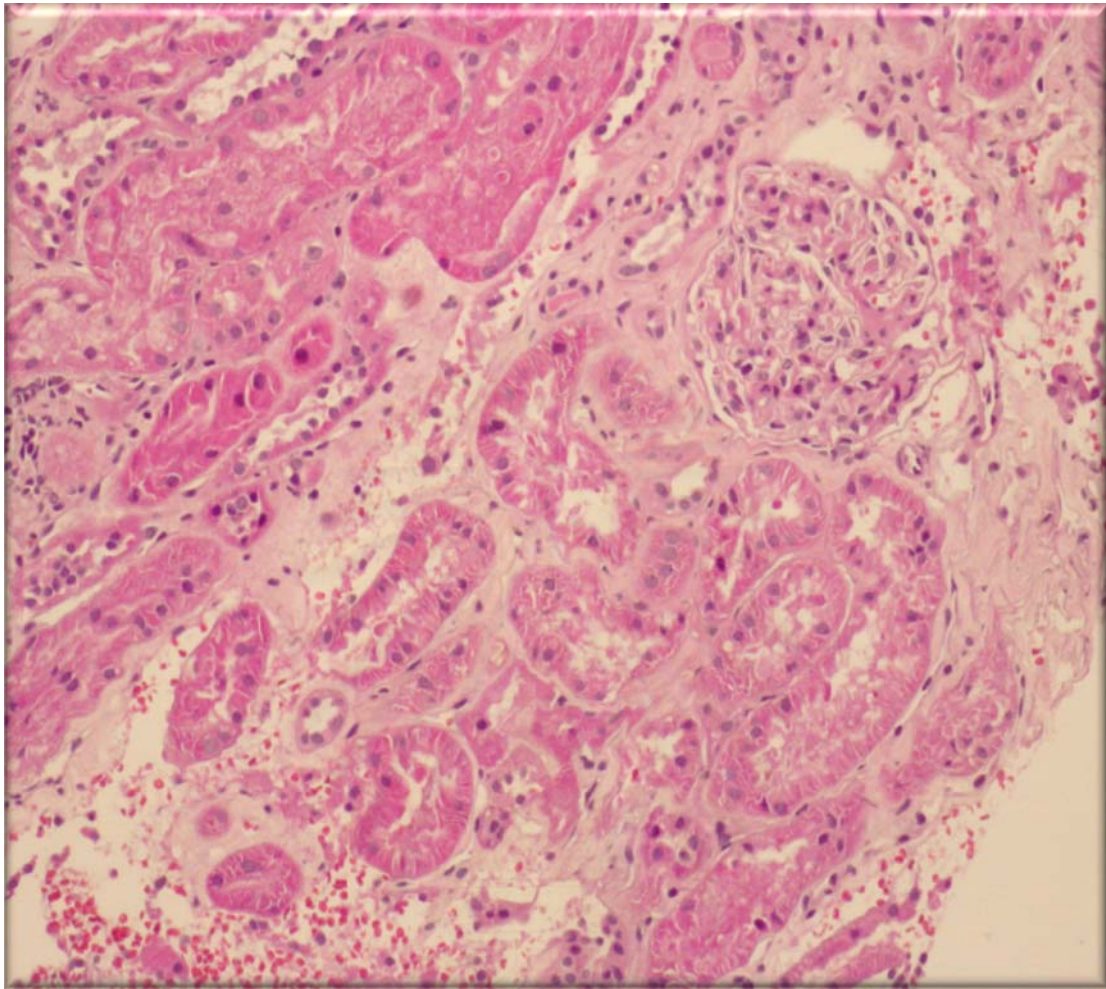
รูปที่ 4.5 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างขั้นที่ 1 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Acute tubular injury, Borderline tubulointerstitial lesion.

#### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ขั้นที่ 2

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 65 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้ไม่ทราบสาเหตุ และมีโรคประจำตัวเดิมคือโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูง ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อ วันที่ 1 กรกฎาคม ปี พ.ศ. 2547 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2549 ผลการตรวจ HLA mismatch 1-1-2 ผลการตรวจ Crossmatch negative PRA 0% Blood group AB

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 45 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเลือดออกในสมอง (intracranial hemorrhage) ระดับ ซีรัมครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 0.9 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรัมครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 24 ชั่วโมง

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 64 วันเนื่องจากระดับซีรัมครีเอตินินสูง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Regenerative phase of tubular injury ดังรูป 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 2 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Regenerative phase of tubular injury

### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 3

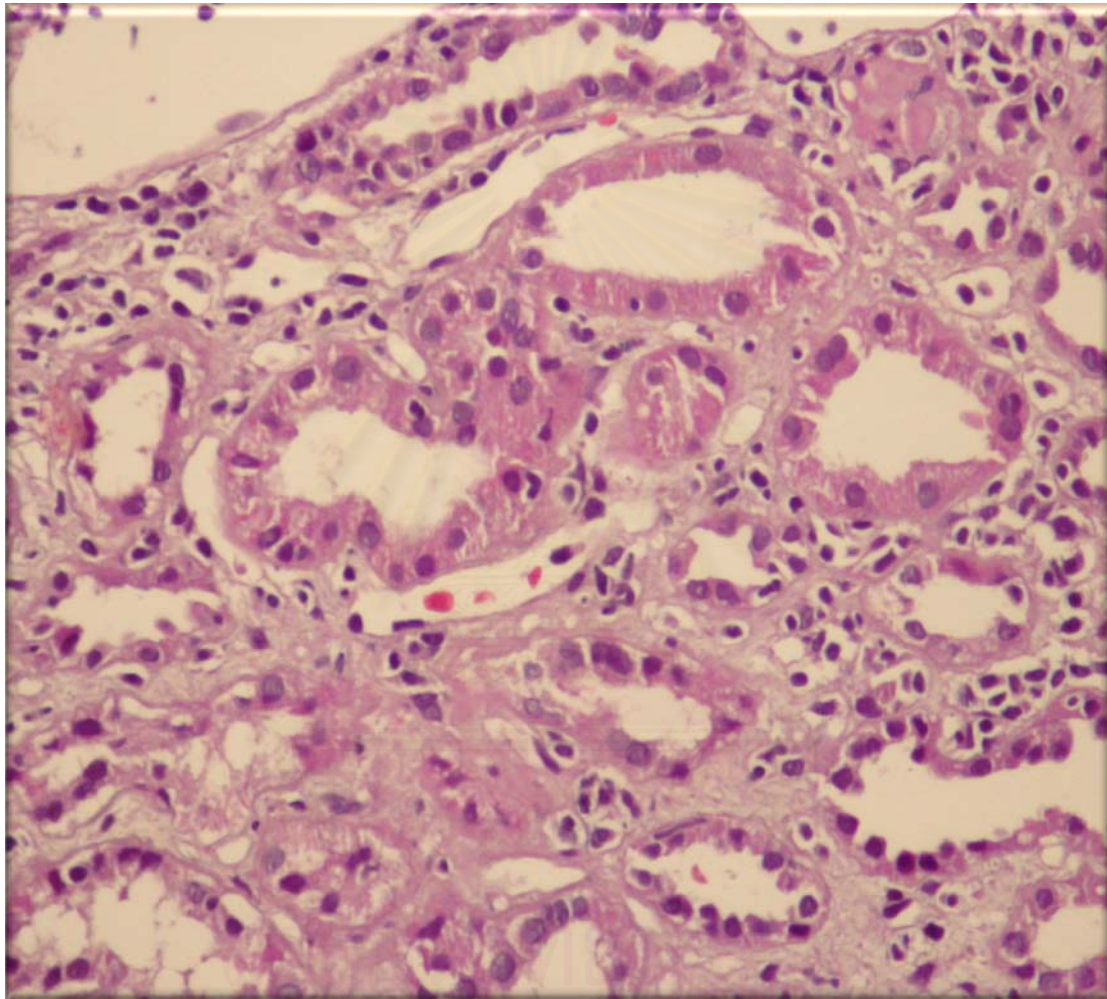
นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 26 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อเดือน มกราคม ปี พ.ศ. 2543 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 20 มกราคม ปี พ.ศ. 2550 ผลการตรวจ HLA mismatch 2-1-1 ผลการตรวจ Crossmatch B cell IgM positive PRA 0% Blood group A

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 42 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเลือดออกในสมอง มีปัญหาความดันต่ำขณะรักษาตัวในโรงพยาบาล ระดับ ซีรัมครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรัมครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออก



เท่ากับ 4.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (Ischemic time) 15 ชั่วโมง

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 130 วันเนื่องจากระดับ ซีรั่มครีเอตินินสูง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Borderline tubulointerstitial rejection and regeneration of tubule ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างขั้นที่ 3 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Borderline tubulointerstitial rejection and regeneration of tubule

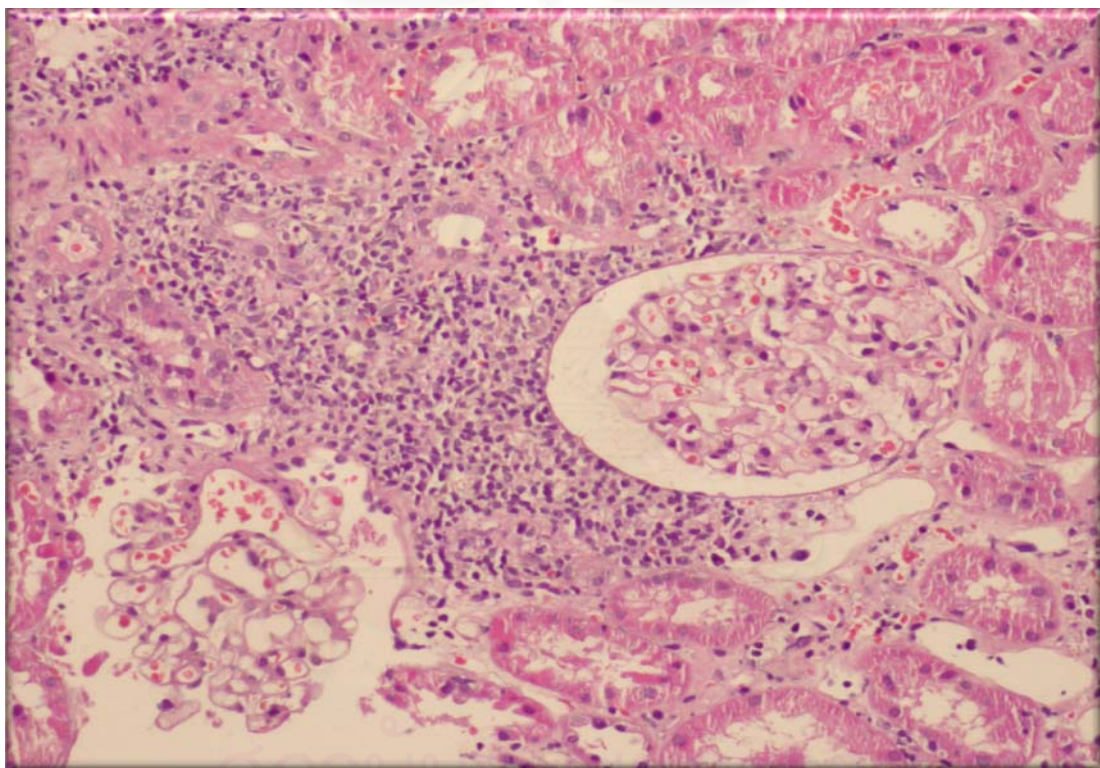
ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ขั้นที่ 4

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 61 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Diabetes nephropathy และมีโรคประจำตัวเดิมคือ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อ วันที่ 21 พฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2548 และได้รับการปลูก

ถ่ายไตชนิด living related kidney transplantation เมื่อวันที่ 24 เมษายน ปี พ.ศ. 2550 ผลการตรวจ HLA mismatch 1-2-2 ผลการตรวจ Crossmatch Negative PRA 0 % Blood group B

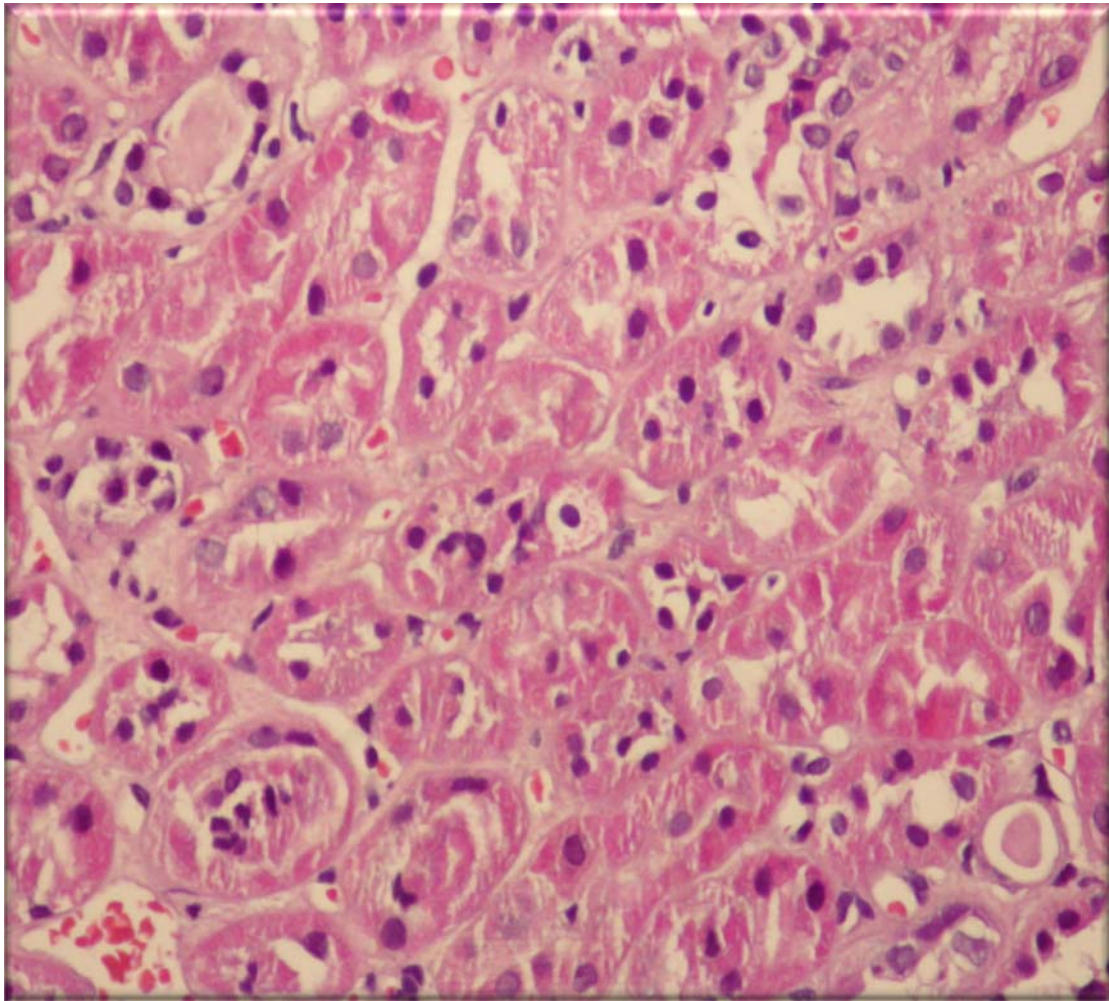
ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 53 ปี (ภรรยา) Blood group O ระดับ ซีรั่มครีเอตินีนก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 142 วันเนื่องจากระดับซีรั่มครีเอตินีนสูง 1.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Borderline tubulointerstitial lesion, probable acute tubulointerstitial cellular rejection. ดังรูปที่ 4.8-9



รูปที่ 4.8 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างขั้นที่ 4 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Borderline tubulointerstitial lesion, probable acute tubulointerstitial cellular rejection.





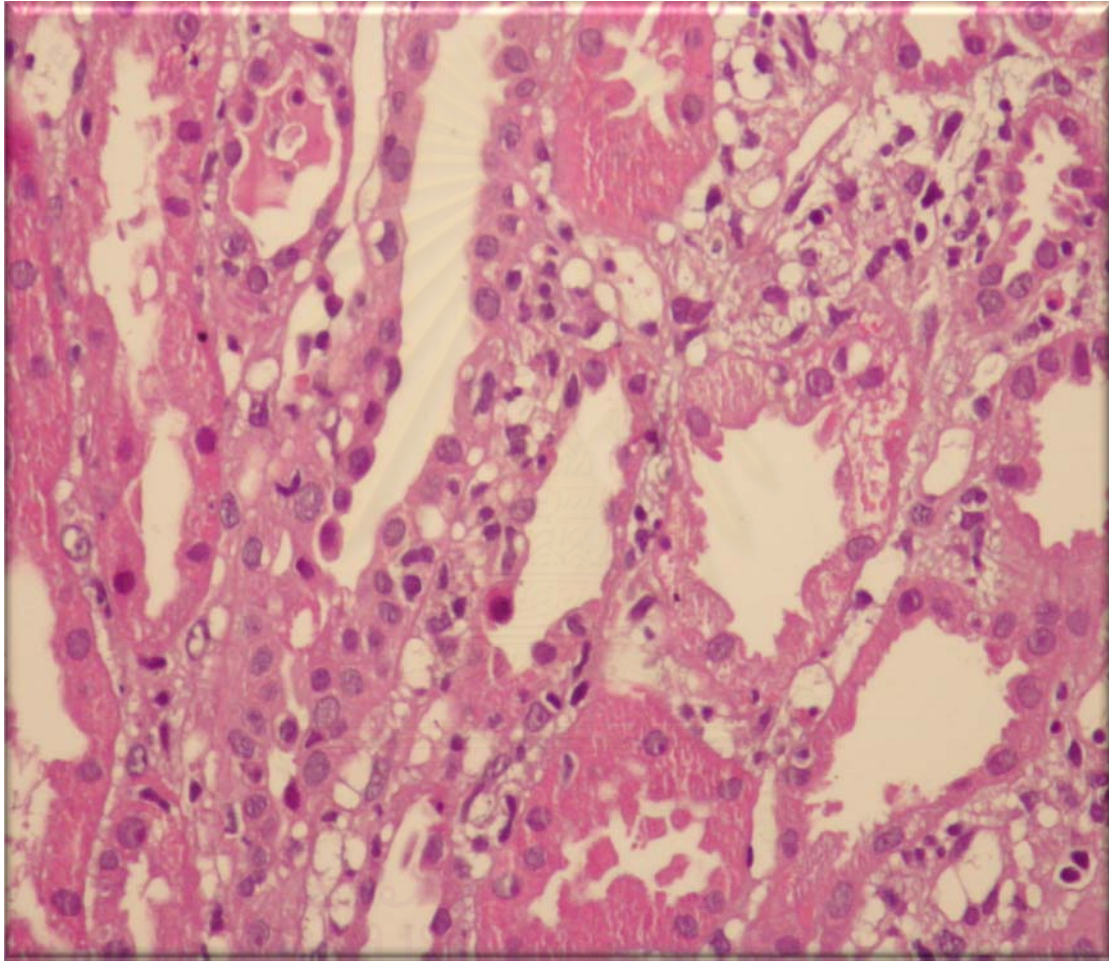
รูปที่ 4.9 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 4 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Borderline tubulointerstitial lesion, probable acute tubulointerstitial cellular rejection.

#### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 5

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 29 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Chronic glomerulonephritis และมีโรคประจำตัวเดิมคือ ความดันโลหิตสูง และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด living related kidney transplantation เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2550 ผลการตรวจ HLA mismatch 0-1-1 ผลการตรวจ Crossmatch negative PRA % Blood group AB

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 47 ปี (มารดา) Blood group B ระดับ ซีรัมครีเอตินีนก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 101 วัน เนื่องจากหลังการปลูกถ่ายไต 2 เดือน ผู้ป่วยป่วยด้วยวัณโรคปอดได้รับยา และได้รับยา isoniazid rifampicin pyrazinamide และ ethambutol หลังจากนั้น ผู้ป่วยมีระดับซีรัมครีเอตินินสูงขึ้นเป็น 6.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Acute cellular rejection ดังรูป 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างขั้นที่ 5 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Acute cellular rejection

ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ขั้นที่ 6

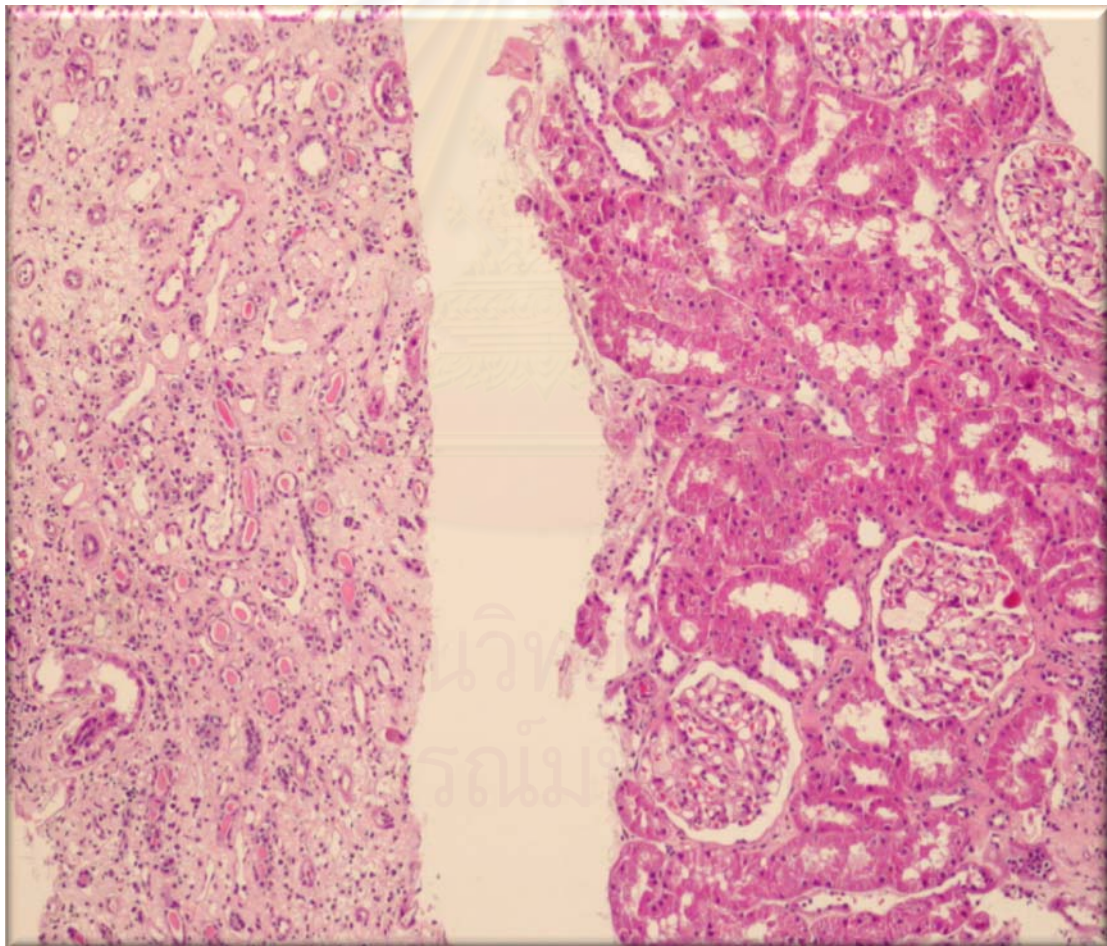
นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 29 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งไม่ทราบสาเหตุ และมีโรคประจำตัวเดิมคือความดันโลหิตสูง และไขมันในเลือดสูง ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อ เดือน มีนาคม ปี พ.ศ. 2546 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric



kidney transplantation เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2548 ผลการตรวจ HLA mismatch 0-0-1 ผลการตรวจ Crossmatch B cell IgM positive PRA 0% Blood group O

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 26 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเลือดออกในสมอง (subdural hematoma) ระดับ ซีรัมครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรัมครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 1.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 11 ชั่วโมง 30 นาที

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 47 วันเนื่องจากระดับซีรัมครีเอตินินสูง 2.2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Cyclosporine nephrotoxicity ดังรูปที่ 4.11



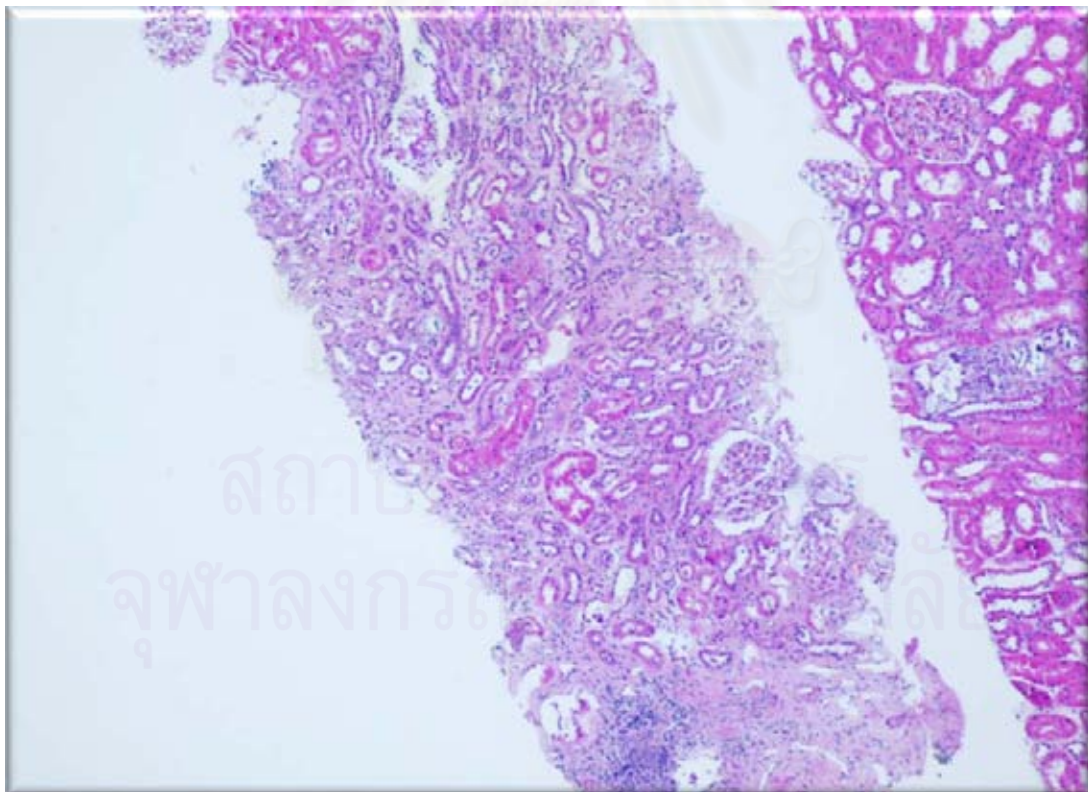
รูปที่ 4.11 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 6 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Cyclosporine nephrotoxicity

### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 7

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 29 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งไม่ทราบสาเหตุ และมีโรคประจำตัวเดิมคือความดันโลหิตสูง และไขมันในเลือดสูง ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อ เดือน มีนาคม ปี พ.ศ. 2546 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด cadaveric kidney transplantation เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2548 ผลการตรวจ HLA mismatch 0-0-1 ผลการตรวจ Crossmatch B cell IgM positive PRA 0% Blood group O

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 26 ปี ซึ่งสมองตายจากภาวะเลือดออกในสมอง (subdural hematoma) ระดับ ซีรัมครีเอตินินเมื่อแรกรับเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ ซีรัมครีเอตินินก่อนการผ่าตัดไตออกเท่ากับ 1.7 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 11 ชั่วโมง 30 นาที

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 137 วันเนื่องจากระดับซีรัมครีเอตินินสูง 2.2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น Chronic allograft nephropthy ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 7 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น Chronic allograft nephropthy

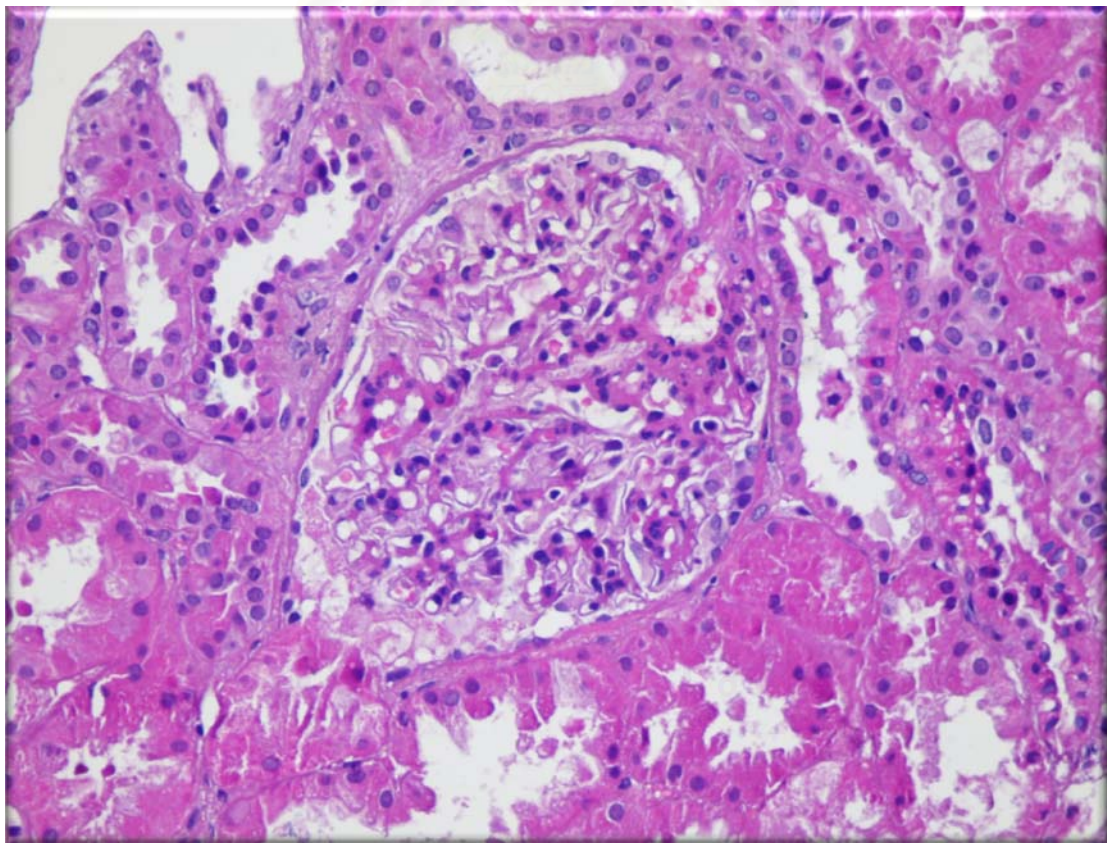


### ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 8

นำมาจากผู้ป่วยชาย อายุ 38 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จากโรคไตเดิมซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Chronic glomerulonephritis ได้รับการฟอกไตทางเส้นเลือดครั้งแรกเมื่อ เดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2543 และได้รับการปลูกถ่ายไตชนิด living related kidney transplantation เมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม ปี พ.ศ. 2544 ผลการตรวจ HLA mismatch 0-0-0 ผลการตรวจ Crossmatch negative PRA 0 % Blood group O

ผู้ป่วยได้รับการบริจาคไตจากผู้หญิง อายุ 34 ปี (พี่สาว) ระดับ ซีรัมครีเอตินีน ก่อนการปลูกถ่ายไต เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายขาดเลือด (ischemic time) 1 ชั่วโมง

ผู้ป่วยได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตภายหลังการปลูกถ่ายไต 30 วันเนื่องจากอยู่ในกลุ่ม Protocol biopsy ระดับซีรัมครีเอตินีนก่อนการเจาะไต เท่ากับ 1.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต ให้การวินิจฉัยว่าเป็น IgA nephropathy ดังรูปที่ 4.13



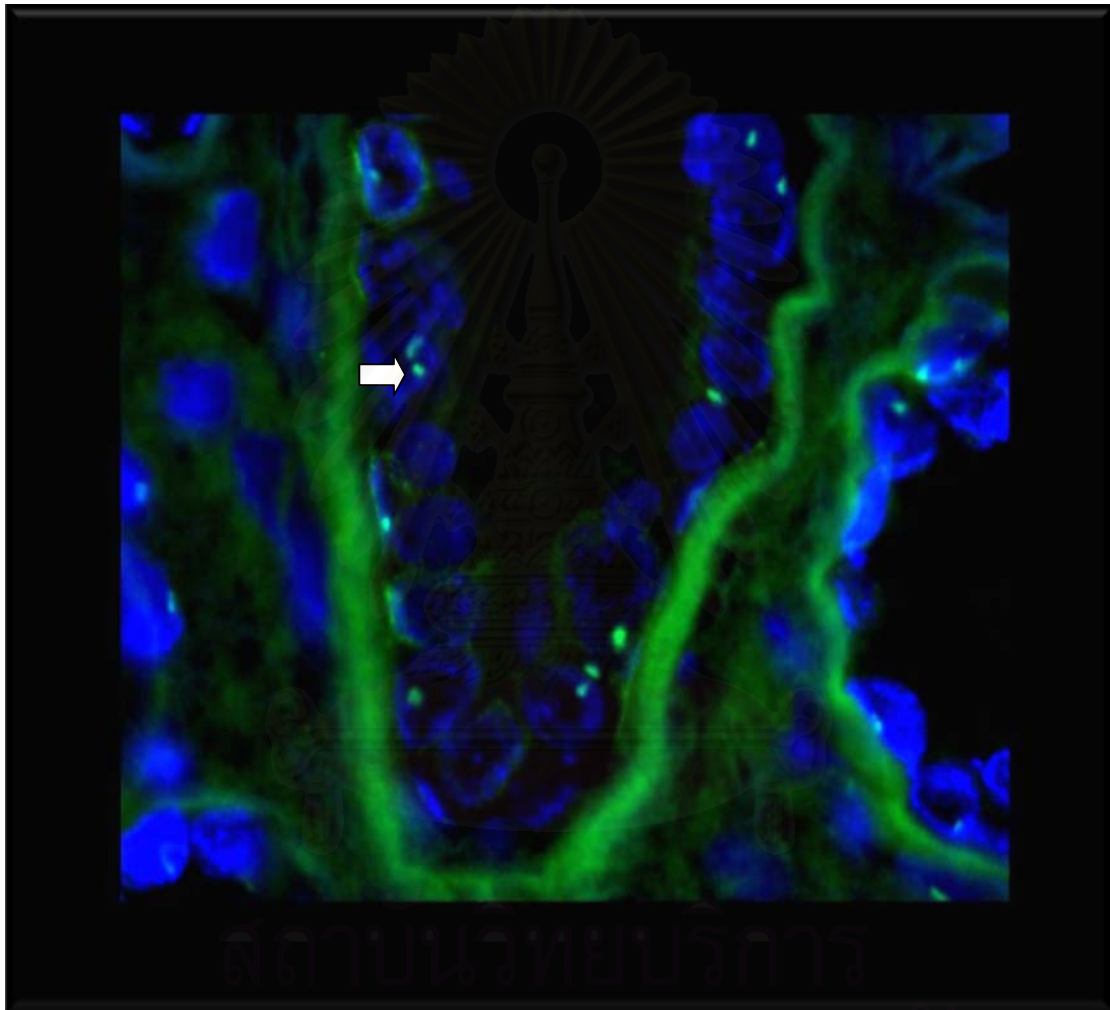
รูปที่ 4.13 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างชั้นที่ 8 ซึ่งให้การวินิจฉัยว่าเป็น IgA nephropathy



## 4.2 จำนวน Y-chromosome

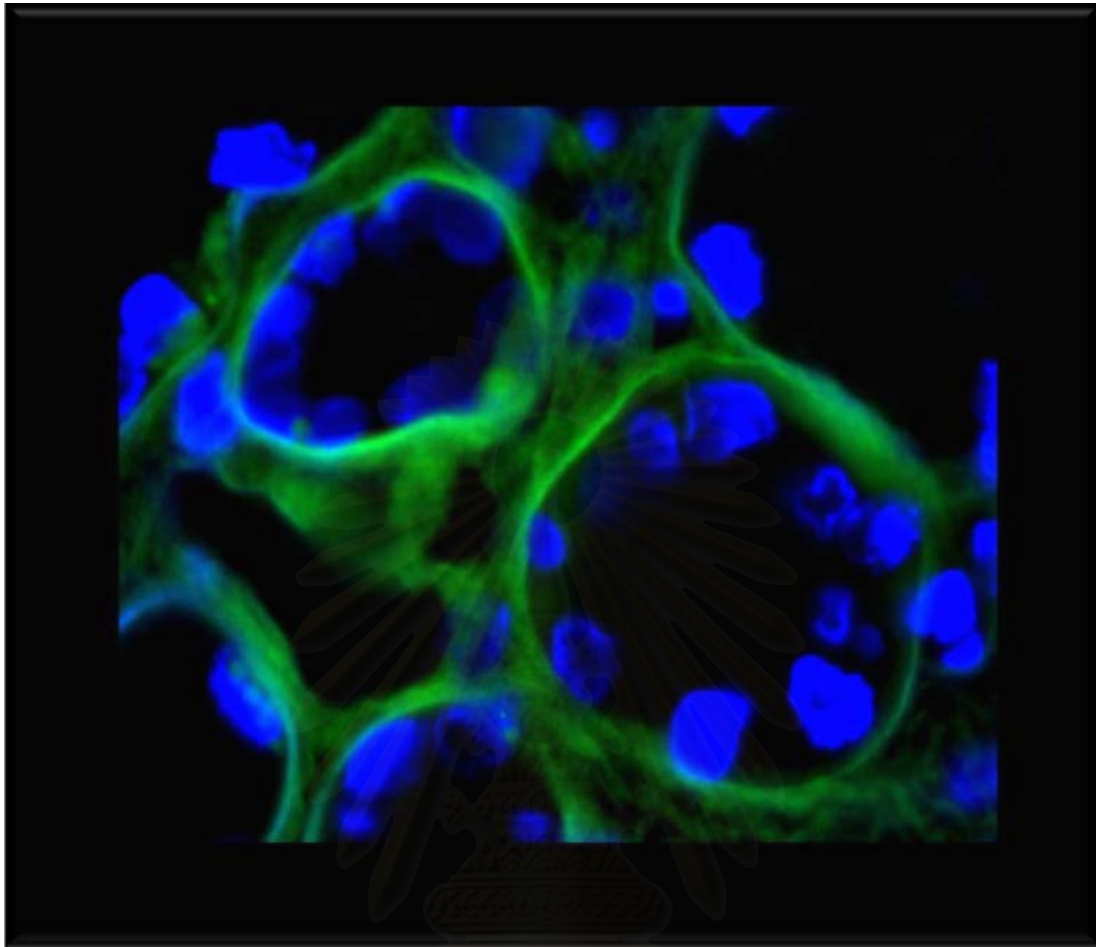
จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตแต่ละชิ้นได้ผลดังนี้

1. จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ได้แก่
  - 1.1 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 1 (positive control) เท่ากับ 56 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.14



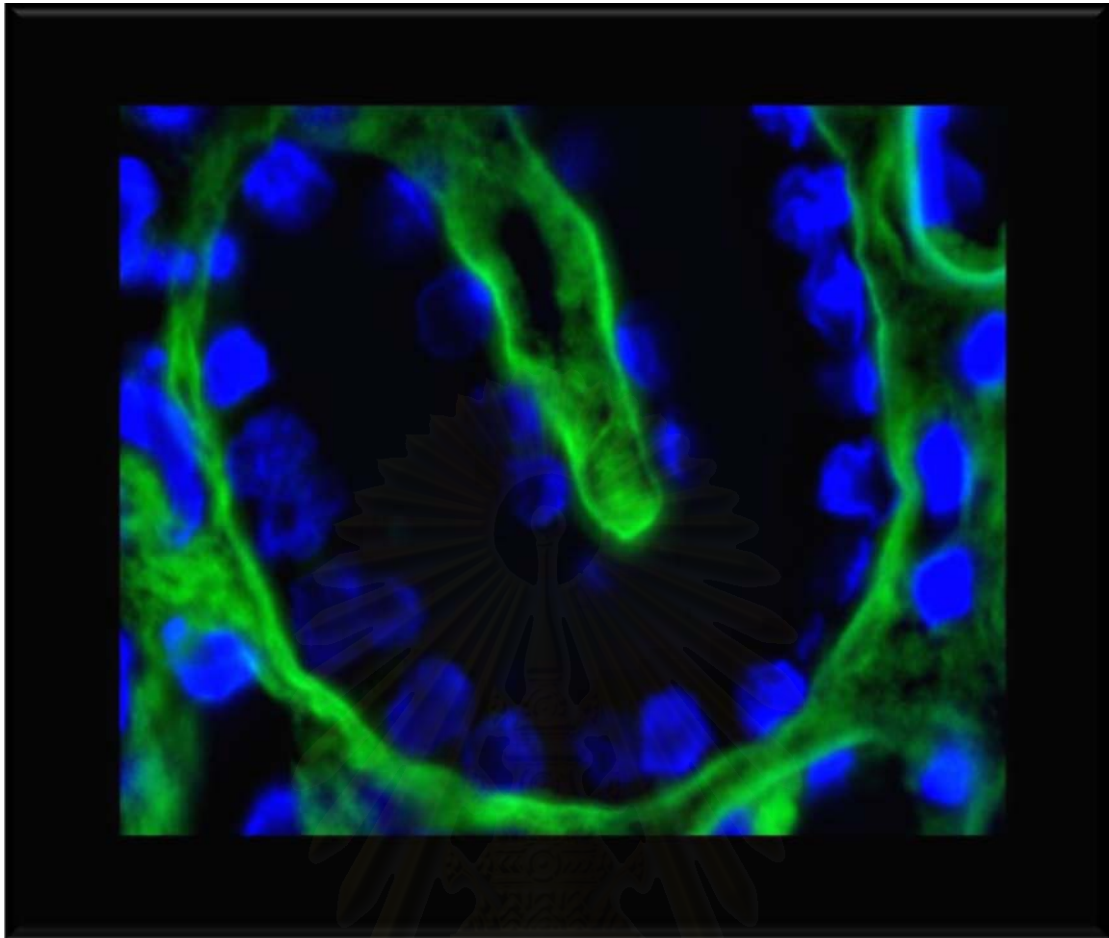
รูปที่ 4.14 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome (ลูกศรสีขาว) โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 1 (positive control) โดย Y-chromosome ที่ตรวจพบจะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

- 1.2 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 2 (negative control) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 2 (negative control) โดยไม่พบ Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

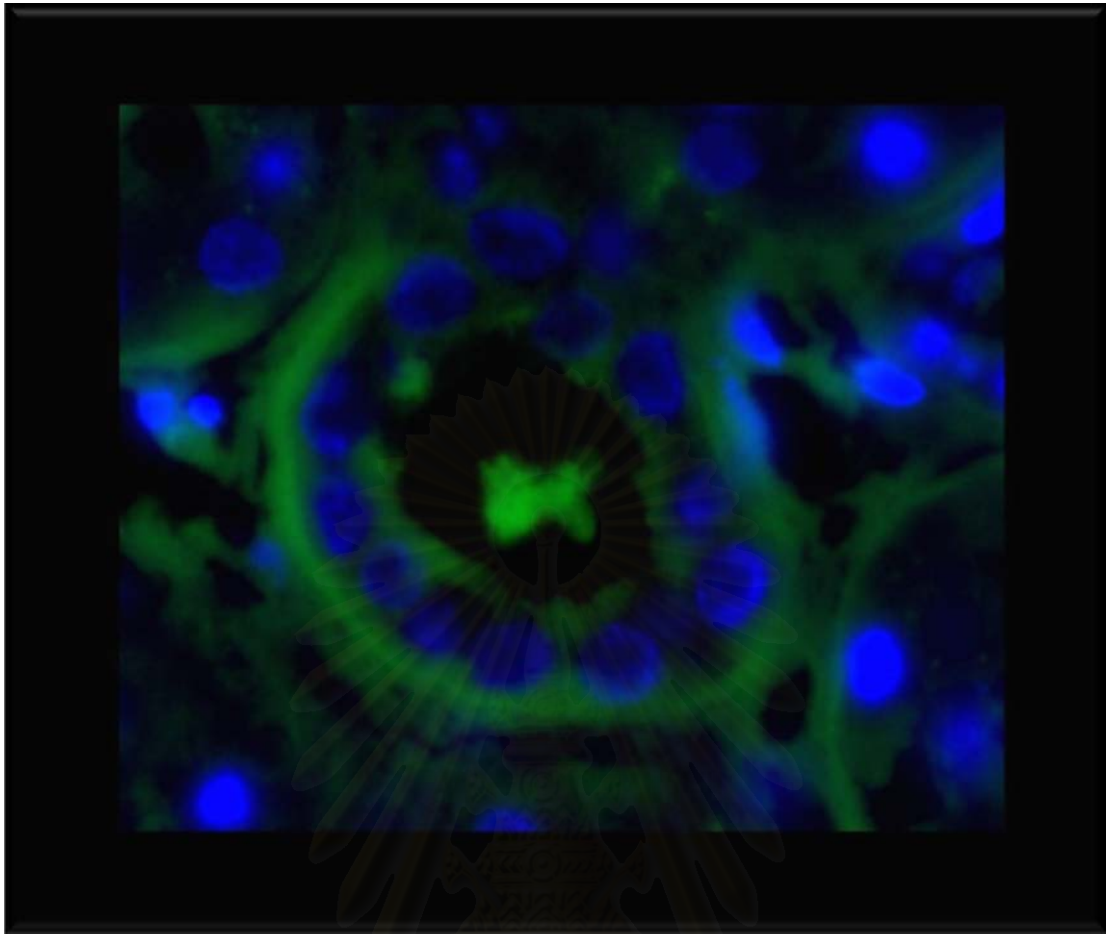
1.3 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 3 (negative control) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 3 (negative control) โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

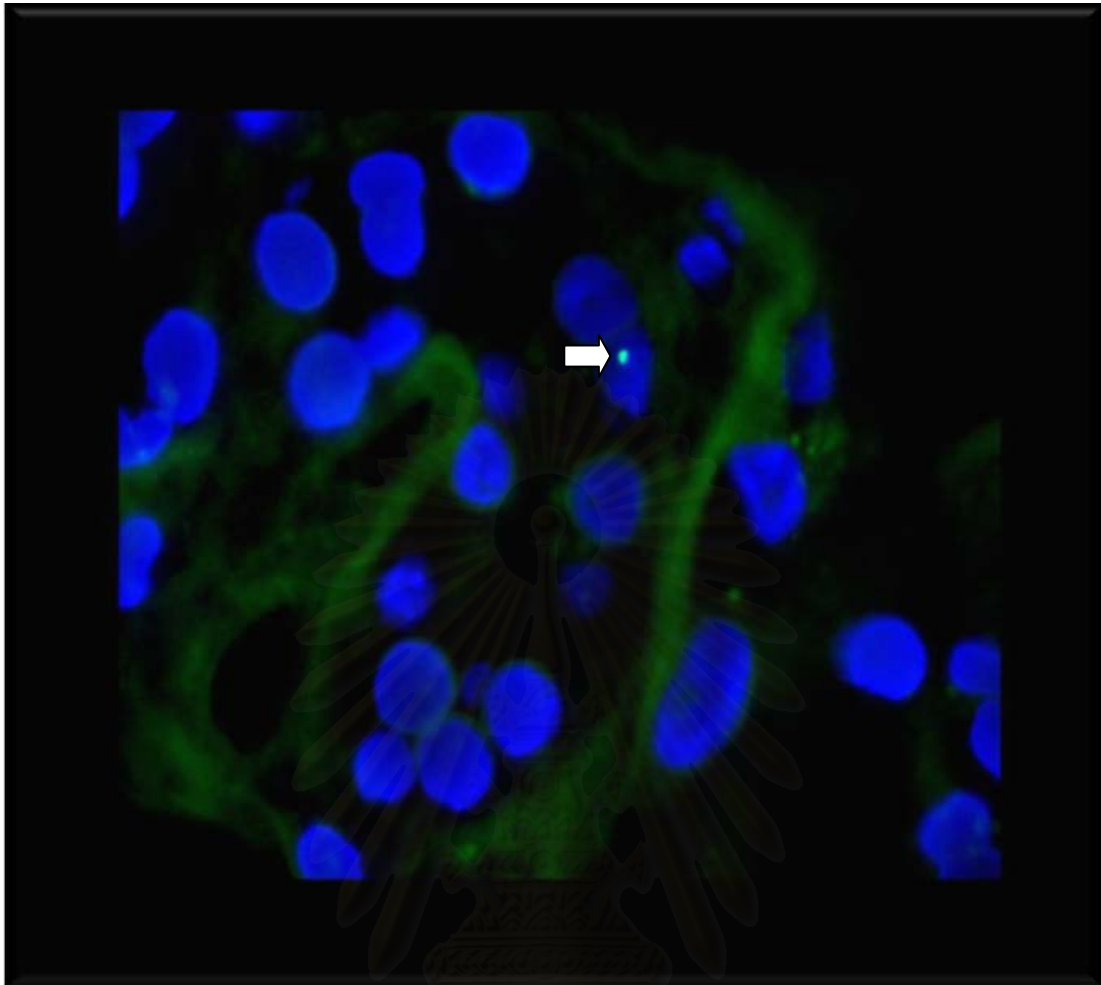
1.4 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 4 (negative control) เท่ากับ 0 เปอร์เซนต์ ดังรูปที่ 4.17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มควบคุม ชั้นที่ 3 (negative control) โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

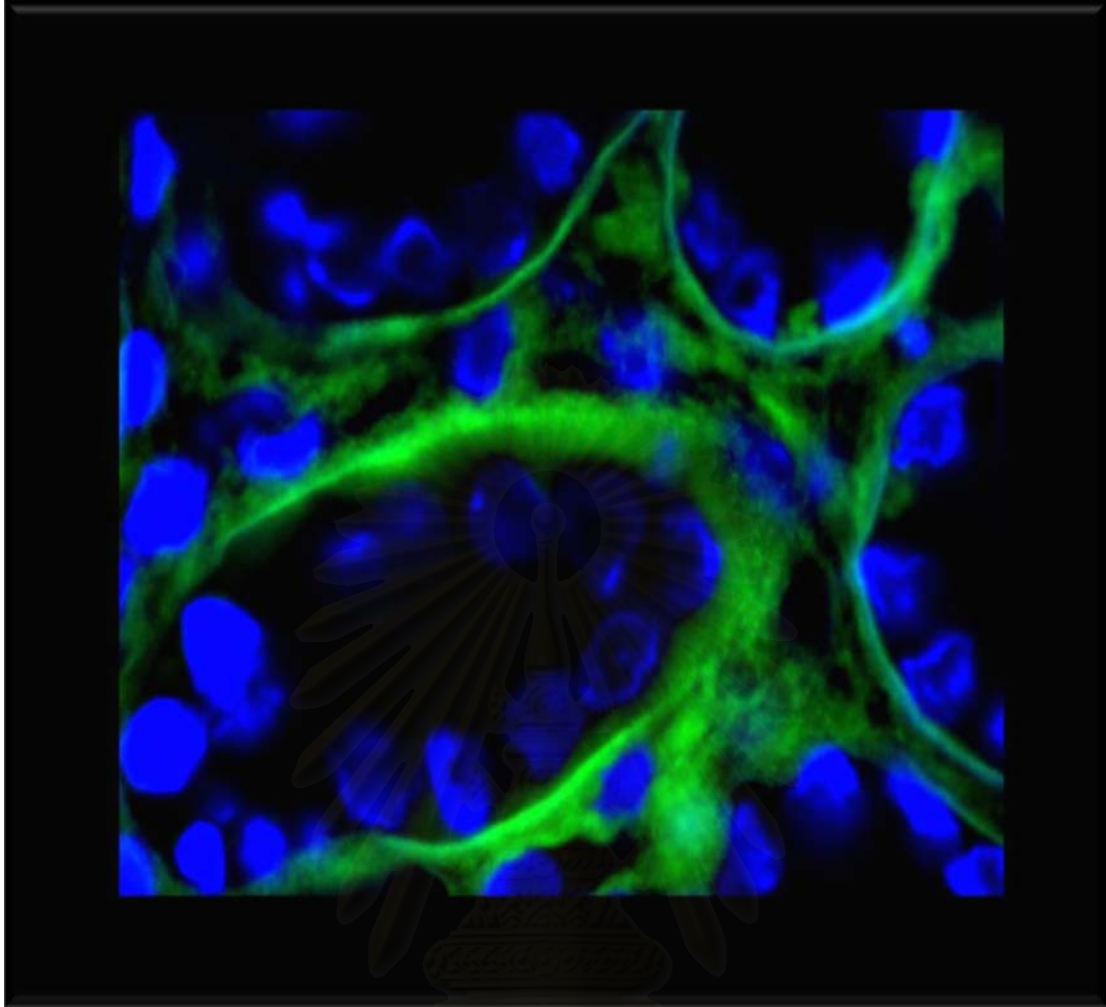
2. จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่
  - 2.1 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 1 เท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 1.43 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome (ลูกศรสีขาว) โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 1 โดย Y-chromosome ที่ตรวจพบจะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

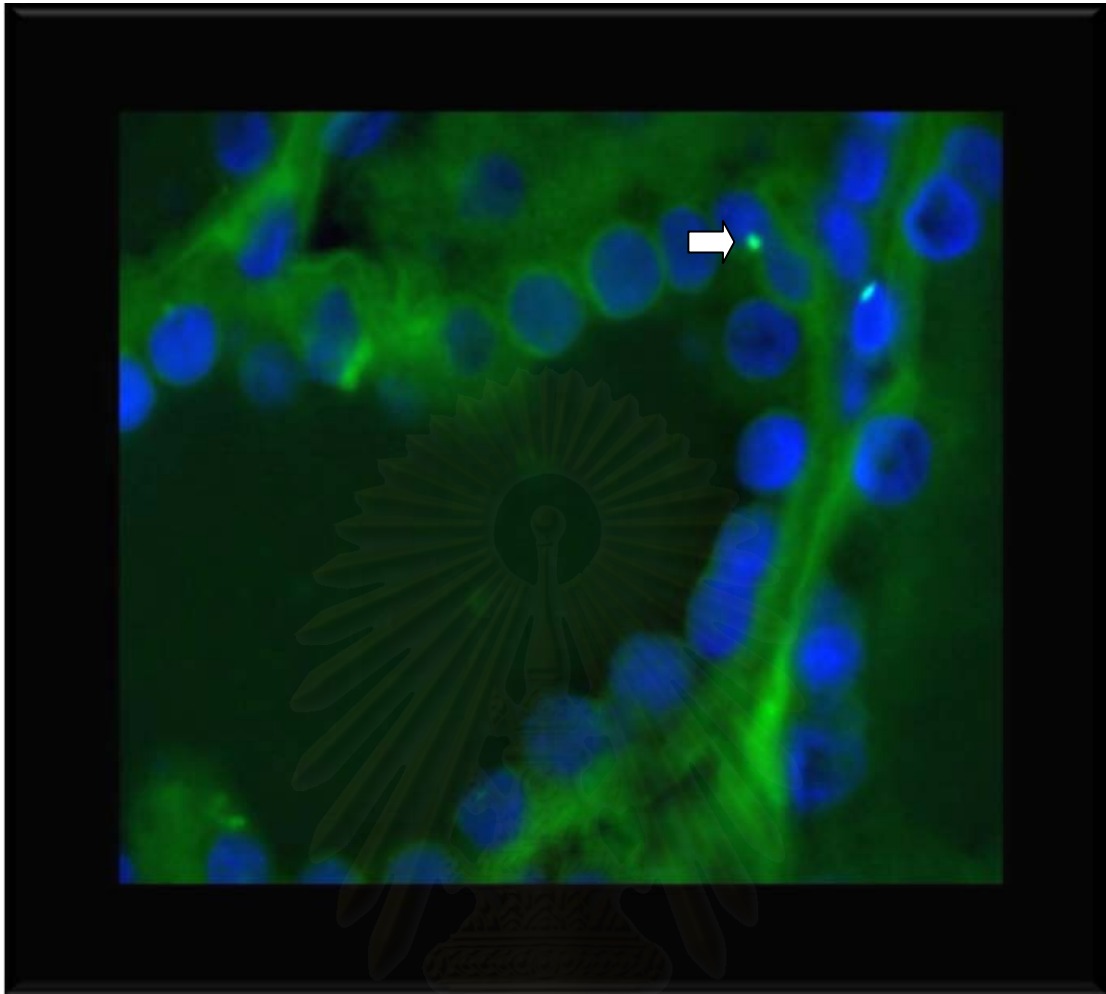
2.2 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 2 เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.19





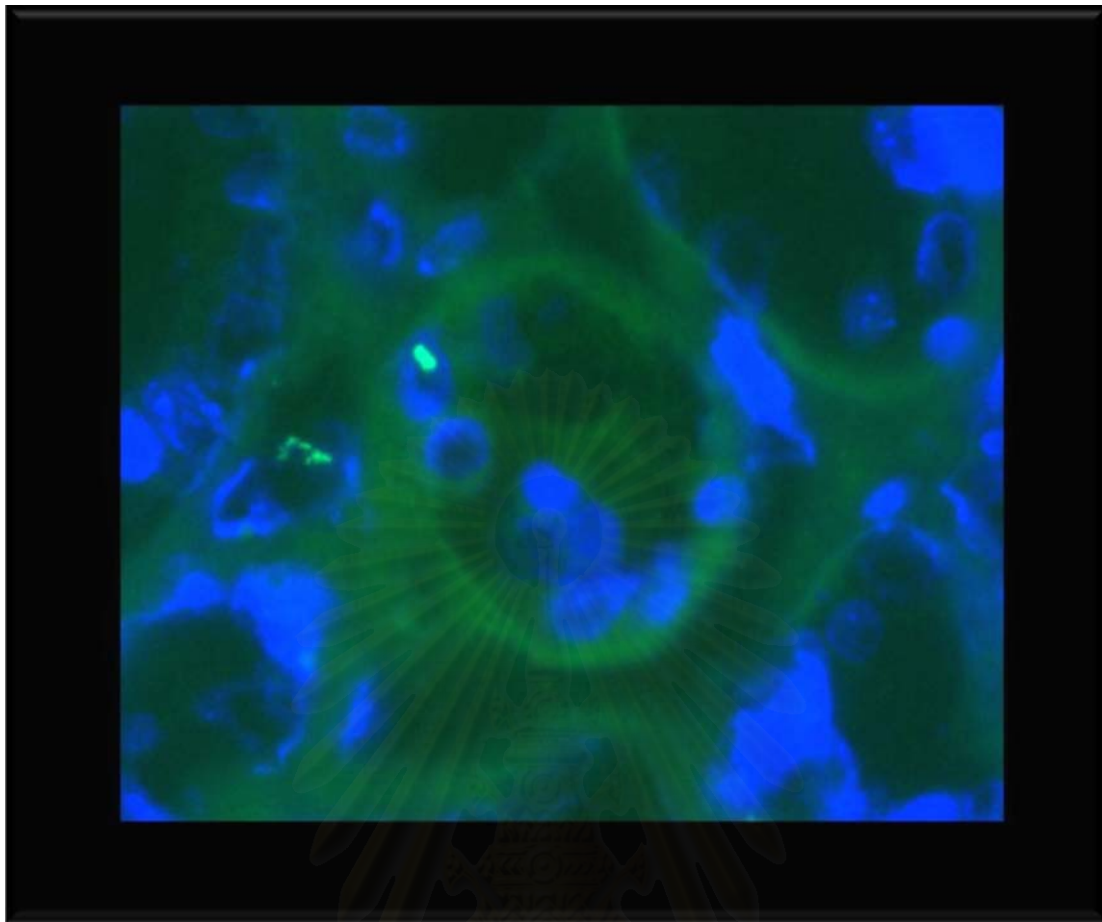
รูปที่ 4.19 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 2 โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

2.3 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 3 เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.20



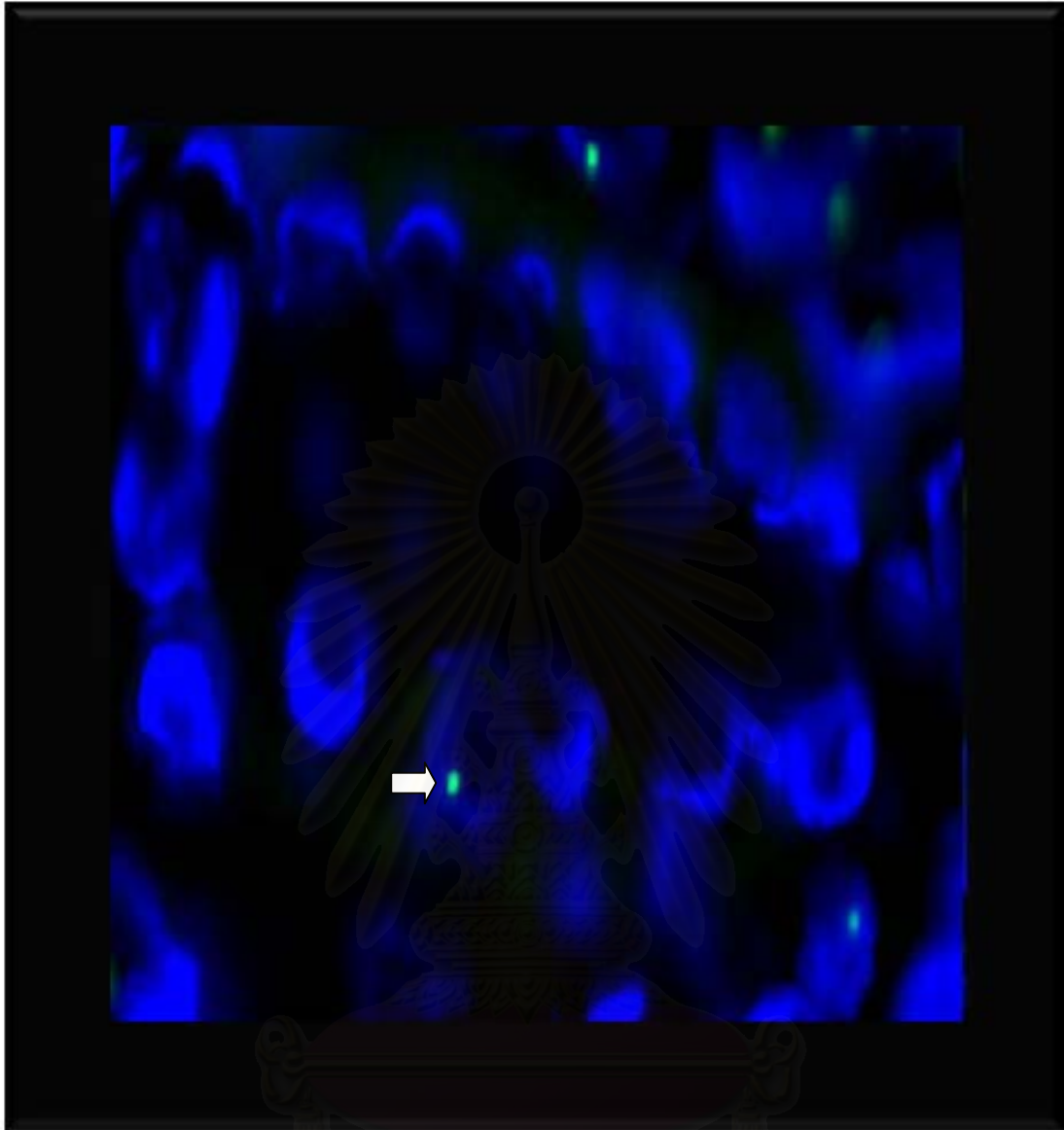
รูปที่ 4.20 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome (ลูกศรสีขาว) โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 3 โดย Y-chromosome ที่ตรวจพบจะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

2.4 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 4 เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบกับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome (ลูกศรสีเขียว) โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 4 โดย Y-chromosome ที่ตรวจพบจะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

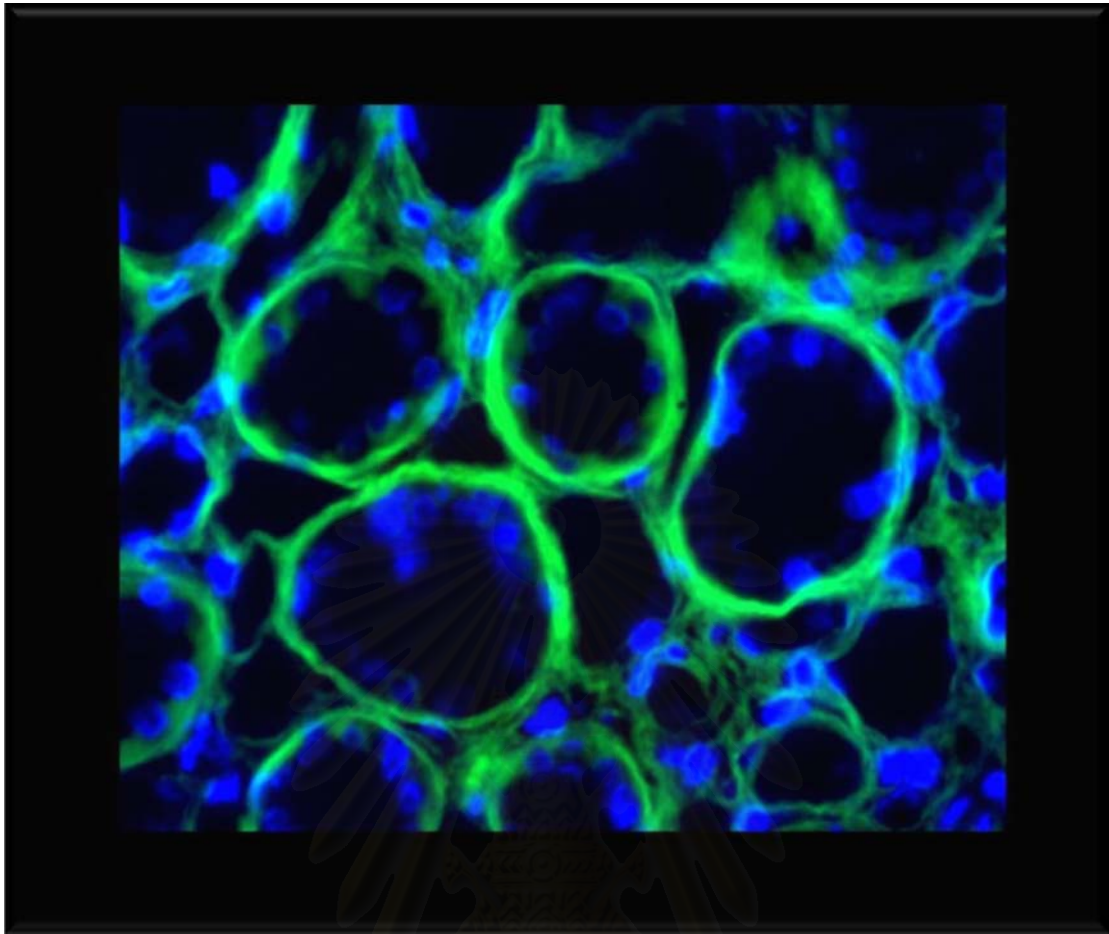
2.5 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 5 เท่ากับ 1.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome (ลูกศรสีเขียว) โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 5 โดย Y-chromosome ที่ตรวจพบจะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

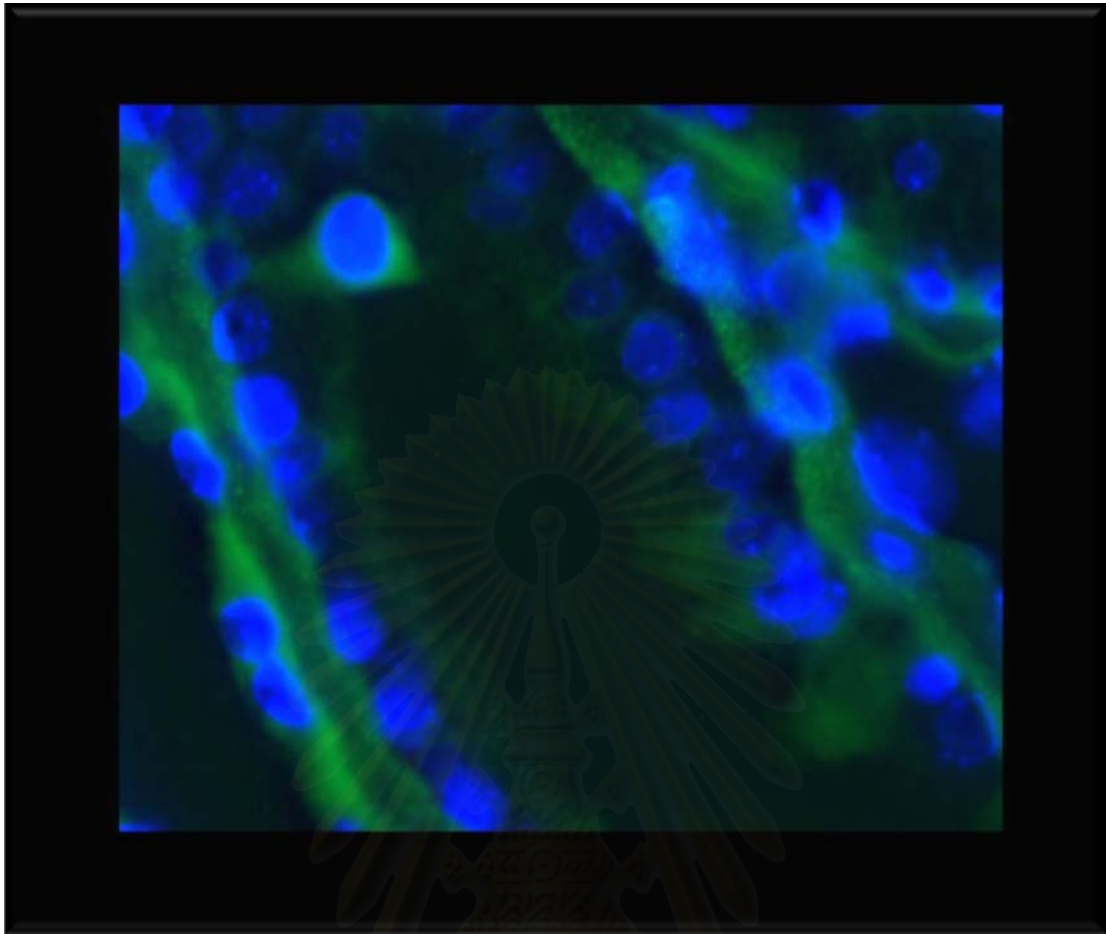
2.6 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 6 เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.23





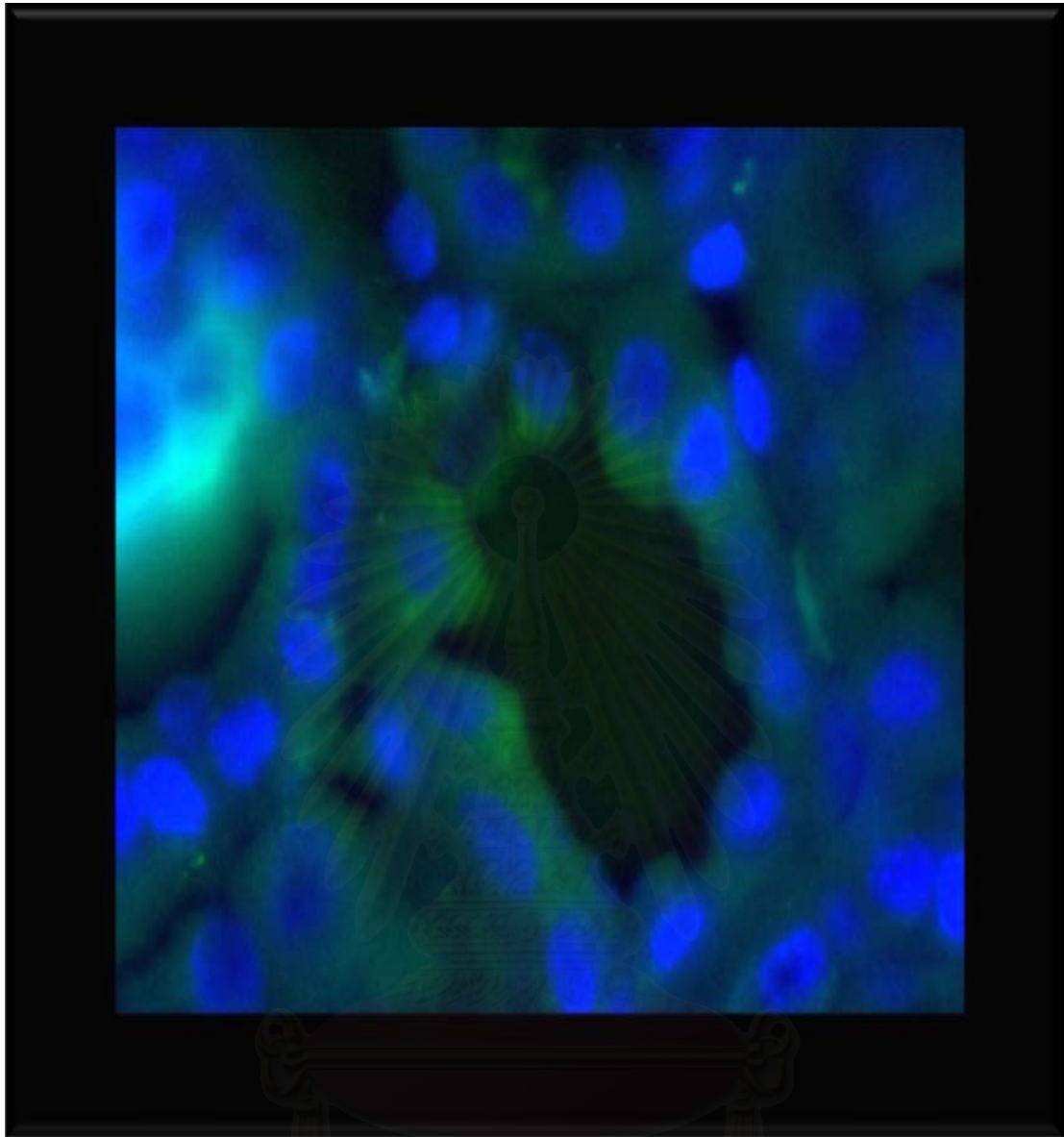
รูปที่ 4.23 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 6 โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

2.7 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 7 เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 7 โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

2.8 จำนวน Y-chromosome ที่ตรวจพบในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 8 เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบปรับสัดส่วนของ Y-chromosome ที่ตรวจพบ กับ positive control (Adjusted cell count of positive Y-chromosome) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 แสดงผลการตรวจหา Y-chromosome โดยการส่องกล้อง immunofluorescence ในชิ้นเนื้อกลุ่มตัวอย่าง ชั้นที่ 8 โดยตรวจ **ไม่พบ** Y-chromosome ที่จะเห็นเป็นจุดสว่างสีเขียวอยู่บน renal tubular epithelial cell สีน้ำเงิน

สรุปผลการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาและการตรวจหา Y-chromosome ได้ดังตาราง  
ที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตผู้ป่วยชายที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิงและสัดส่วนของการตรวจพบ วายโครโมโซม ในเซลล์เยื่อบุท่อไต

ผู้ป่วย รายที่	ระยะเวลา (วัน)*	ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่ตรวจ พบ	วาย โครโมโซม (เปอร์เซ็นต์) <sup>a</sup>	วายโครโมโซม ภายหลังการปรับ กับค่าอ้างอิง (เปอร์เซ็นต์) <sup>n</sup>
1	90	Acute tubular necrosis	0.8	0.71
2	64	Acute tubular necrosis	0	
3	130	Borderline tubulointerstitial rejection	0.2	0.36
4	142	Borderline tubulointerstitial rejection	0.2	
5	101	Acute cellular rejection	1.4	2.5
6	47	Cyclosporine nephrotoxicity	0	0
7	137	Chronic allograft nephropathy	0	0
8	30	IgA nephropathy	0	0

\*ระยะเวลาตั้งแต่ปลูกถ่ายไตจนถึงวันเจาะตรวจชิ้นเนื้อไต(วัน)

<sup>a</sup> จำนวนเซลล์เยื่อบุท่อไตที่ตรวจพบ วายโครโมโซม(เปอร์เซ็นต์)

<sup>n</sup> จำนวนเซลล์เยื่อบุท่อไตที่ตรวจพบ วายโครโมโซม ภายหลังการปรับกับค่าอ้างอิง(เปอร์เซ็นต์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ตรวจพบหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกจากการตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายซึ่งได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิง โดยใช้วิธี fluorescent in situ hybridization จากพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อที่มีลักษณะ Acute kidney injury ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด อันได้แก่ ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น

1. Acute tubular necrosis โดยตรวจพบ Y-chromosome ในอัตรา 0.71 เซลล์ต่อเซลล์เยื่อบุท่อไตจำนวน 100 เซลล์
2. Borderline tubulointerstitial rejection โดยตรวจพบ Y-chromosome ในอัตรา 0.36 เซลล์ต่อเซลล์เยื่อบุท่อไตจำนวน 100 เซลล์
3. Acute cellular rejection โดยตรวจพบ Y-chromosome ในอัตรา 2.5 เซลล์ต่อเซลล์เยื่อบุท่อไตจำนวน 100 เซลล์

โดยสรุป การศึกษานี้ตรวจพบหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกจากการตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายซึ่งได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิง โดยใช้วิธี fluorescent in situ hybridization จากพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อที่มีลักษณะ Acute kidney injury ในอัตรา 0.93 เซลล์ต่อเซลล์เยื่อบุท่อไตจำนวน 100 เซลล์

และตรวจไม่พบหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกจากการตรวจไม่พบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายซึ่งได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคซึ่งเป็นผู้หญิง โดยใช้วิธี fluorescent in situ hybridization จากพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อที่มีลักษณะ Chronic kidney injury ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด อันได้แก่

1. Cyclosporine nephrotoxicity
2. Chronic allograft nephropathy
3. IgA nephropathy

## 5.2 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จุดประสงค์หลักของการศึกษานี้เพื่อเพื่อตรวจหา Y-chromosome ที่ปรากฏอยู่ที่ไตของผู้หญิงที่บริจาคไตให้ ผู้ป่วยชายที่เข้ารับการปลูกถ่ายไต ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเทคนิค Y chromosome in situ hybridization โดยมีคำถามของการวิจัยว่า หากมีหลักฐานของเซลล์จากไขกระดูกของผู้รับการปลูกถ่ายไตเพศชายจริง ควรจะตรวจพบ Y-chromosome (ซึ่งมาจากฝ่ายชาย) ในพยาธิสภาพของไตที่ได้รับการปลูกถ่ายจากผู้บริจาคเพศหญิง ซึ่งในชั้นเนื้อไตดังกล่าวไม่ควรจะตรวจพบ Y-chromosome เนื่องจากไตของผู้หญิงจะมีแต่โครโมโซม XX ในขณะที่ผู้ชายจะมีทั้งโครโมโซม X และ Y

ในการศึกษานี้เราได้ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดบางเพียง 2-3 ไมครอน เพื่อที่จะไม่ให้เกิดการทับซ้อนกันของเซลล์ ซึ่งจะนำมาถึงการแปลผลที่อาจทำได้ยากหากเกิดการทับซ้อนกันของเซลล์ขึ้น และนอกจากนี้ยังทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับด้วย

มีความเป็นไปได้ที่อาจมีเซลล์ชนิดอื่น เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้รับบริจาคไตซึ่งเป็นผู้ชาย เข้าไปที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายทำให้การแปลผลผิดพลาดเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้น หากเข้าไปอยู่ที่ เซลล์เยื่อบุท่อไตจะทำให้ตรวจพบ Y-chromosome ซึ่งเป็นผลบวกหลงได้ คณะผู้วิจัยได้แก้ปัญหาโดยการตรวจชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยชายซึ่งได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาค ซึ่งเป็นผู้หญิง และได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตในวันแรกของการปลูกถ่ายไตภายหลังจากการปล่อยให้มีเลือดของผู้รับบริจาควิ่งเข้าไปยังไตที่ได้รับการปลูกถ่ายแล้ว ซึ่งในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยตรวจไม่พบ Y-chromosome แสดงว่า ไม่มี เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าไปอยู่ที่เซลล์เยื่อบุท่อไต นอกจากนี้ลักษณะของเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาอยู่ที่ท่อไตจะพบลักษณะของนิวเคลียสติดอยู่กับ tubular basement membrane ต่างจาก เซลล์เยื่อบุท่อไต ที่ลักษณะนิวเคลียสจะลอยอยู่เหนือ tubular basement membrane ทำให้สามารถแยก เม็ดเลือดขาวออกจาก เซลล์เยื่อบุท่อไตได้

ผลการศึกษาพบว่า มีหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกปรากฏอยู่ที่ไตของผู้รับบริจาคไตจากการตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไต แต่คณะผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบ Y-chromosome ได้ทั้งหมดในทุกชิ้นเนื้อที่มีพยาธิสภาพแตกต่างกัน หากจะแบ่งชิ้นเนื้อตามลักษณะทางพยาธิวิทยาที่ตรวจพบ Y-chromosome แล้วจะพบว่าคณะผู้วิจัย สามารถตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตที่มีพยาธิสภาพชนิด Acute kidney injury แต่ตรวจไม่พบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อที่มีพยาธิสภาพชนิด Chronic kidney injury และนอกจากนี้ปริมาณของ Y-chromosome ที่ตรวจพบยังพบในปริมาณที่น้อยด้วยคือตรวจพบเพียง 0.36 ถึง 2.5 เปอร์เซนต์ จึงเป็นไปได้ว่า เซลล์ไขกระดูกอาจไม่มีบทบาทสำคัญมากนักในขบวนการซ่อมแซมเยื่อบุท่อไต เป็นเหตุให้ความเชื่อเดิมที่เคยเชื่อว่า

การซ่อมแซมเยื่อบุท่อไตภายหลังจากการหลุดลอกออกของเซลล์ดังกล่าว เกิดจากการ differentiation และ proliferation ของเซลล์เยื่อบุท่อไตที่ยังคงหลงเหลืออยู่ หรือ เป็นไปได้ว่าอาจมี stem cells อื่นที่อาจไม่ใช่ bone marrow stem cells ที่เข้ามาแทนที่เซลล์เยื่อบุท่อไตที่หลุดลอกออกไป

นอกจากนี้ในชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 1 และ 2 ซึ่งวินิจฉัยว่าเป็น acute tubular necrosis ในระยะที่ต่างกันโดย ชิ้นที่ 1 อยู่ในระยะ degenerative phase ในขณะที่ ชิ้นที่ 2 อยู่ในระยะ regenerative phase แต่กลับพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตชิ้นที่ 1 แต่ไม่พบในชิ้นที่ 2 ซึ่งหากคิดตามความเป็นจริง ในขณะที่ไตอยู่ในระยะซ่อมแซม หรือ regenerative phase มีความเป็นไปได้ที่จะตรวจพบ Y-chromosome มากกว่าชิ้นเนื้อไตในระยะที่มีการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุท่อไต หรือ degenerative phase แต่อาจเป็นเพราะการตรวจนับ Y-chromosome ไม่มากพอทำให้ตรวจไม่พบได้ หากมีจำนวนชิ้นเนื้อที่มากกว่านี้อาจได้คำตอบว่าใน acute tubular necrosis ในระยะที่ต่างกัน จะตรวจพบหลักฐานของเซลล์จากไขกระดูกที่ไปปรากฏอยู่ที่เยื่อบุท่อไตต่างกันหรือไม่

มีหลักฐานจากการศึกษาของ Jeremy และคณะ(38) พบว่า intrinsic tubular epithelial cell ทำหน้าที่หลักในการซ่อมแซมเยื่อบุท่อไตภายหลังจากภาวะไตขาดเลือดไปเลี้ยง การศึกษานี้ทำในหนูเพศเมียซึ่งได้รับการทำให้ไตขาดเลือดจากการหนีบ renal artery และได้รับการฉายรังสีเพื่อการทำ Bone marrow transplantation หลังจากนั้นได้ทำการฉีด mesenchymal stem cells ของหนูเพศผู้เข้าไป หลังจากนั้น 15 วันได้ทำการตรวจชิ้นเนื้อไตหา Y-chromosome แต่พบ Y-chromosome ในบริเวณ tubular epithelial cells เพียง 0.06% ซึ่งเมื่อได้ทำการตรวจสอบพบว่าการตรวจพบดังกล่าวเป็นผลบวกหลง ในขณะเดียวกัน tubular epithelial cells ส่วนมาก แสดง proliferating cells nuclear antigen ซึ่งแสดงว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม tubular epithelial cells ที่หลุดลอกออกไปนั้นน่าจะเกิดจากเซลล์เยื่อบุท่อไตที่ยังคงหลงเหลืออยู่ การศึกษานี้ยังสัมพันธ์กับการรายงานของ Lin และคณะ(13) ที่พบว่า intrarenal cells เป็น major source ของ regeneration ภายหลัง ischemic kidney injury

สาเหตุที่ทำให้ทางคณะผู้วิจัยตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตที่มีพยาธิสภาพชนิด Acute kidney injury นั้นเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากในพยาธิสภาพของไตที่เกิดการหลุดลอกออกของเซลล์เยื่อบุท่อไตอย่างรวดเร็วจนทำให้การซ่อมแซมจำเป็นต้องใช้เซลล์ไขกระดูกเข้ามามีส่วนร่วม เนื่องจากการ proliferation และ differentiation ของ tubular epithelial cells ที่เหลืออยู่สร้างมาใหม่ทัน อย่างไรก็ตามแนวคิดนี้เป็นเพียงสมมุติฐาน คงต้องรอการพิสูจน์ถึงความเป็นไปได้ในงานวิจัยชิ้นต่อไป

ในกรณีของชิ้นเนื้อไตที่มีพยาธิสภาพชนิด Chronic kidney injury นั้นเป็นไปได้ว่าพยาธิสภาพของไตที่เกิดการหลุดลอกออกของเซลล์เยื่อบุท่อไตอย่างซ้ำๆ ทำให้การซ่อมแซมไม่มีจำเป็นต้องใช้เซลล์ไขกระดูกเข้ามามีส่วนร่วมเนื่องจากการ proliferation และ differentiation ของ tubular epithelial cells ที่เหลืออยู่สร้างมาแทน ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ Y-chromosome ในชิ้นเนื้อไตดังกล่าวได้ เช่นกันแนวคิดนี้เป็นเพียงสมมุติฐาน คงต้องรอการพิสูจน์ถึงความเป็นไปได้ในงานวิจัยชิ้นต่อไป

เป็นที่น่าเสียดายที่งานวิจัยนี้มีผลชิ้นเนื้อจากการเจาะไตในผู้ป่วยรายเดียวกัน 2 ครั้ง คือ ชิ้นเนื้อไตในกลุ่มตัวอย่างชิ้นที่ 6 และ ผลทางพยาธิวิทยาพบว่าเป็น cyclosporine nephrotoxicity และ chronic allograft nephropathy ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวตรวจไม่พบ Y-chromosome ซึ่งถ้าตรวจพบจะเป็นสิ่งที่บอกได้ชัดเจนว่ามีหลักฐานของเซลล์ไขกระดูกไปปรากฏที่ไตได้ชัดเจนยิ่งขึ้น คงต้องรอการศึกษาที่มีจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ซึ่งอาจตอบคำถามนี้ได้

นอกจากนี้ในรายงานของ Oliver และคณะ (32) ได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาเซลล์ที่มีคุณลักษณะคล้าย stem cells ในไตโดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะบางอย่าง ได้แก่ เซลล์ชนิดนั้นจะต้องมีการแบ่งตัวซ้ำมาก หรือ ไม่แบ่งตัวจะอยู่ในบริเวณพิเศษที่เรียกว่า niches และจะพบมีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซมเมื่อมีการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อไต และได้ทำการศึกษาดังกล่าวในหนูทดลอง ผลการศึกษพบว่า เซลล์ของ renal papilla มีคุณสมบัติที่คล้ายกับ adult renal stem cells คือเป็นเซลล์ที่ปกติและแบ่งตัวซ้ำหรือไม่แบ่งตัว ทนต่อการ injury เช่นการขาดเลือด พบมีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซมเมื่อมีการบาดเจ็บหรือการทำลายของเนื้อเยื่อไต และยังมีมีความสามารถในการแสดงออกของ marker ต่างๆ ที่แสดงถึงความสามารถในการเกิด differentiation ความน่าสนใจในการศึกษานี้ คงต้องหาคำตอบต่อไปให้ได้ว่า renal papilla เคลื่อนย้ายไปซ่อมแซมเพื่อ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่ถูกทำลายเพื่อทดแทนได้อย่างไร มีกลไกอะไรบ้างที่เกิดขึ้นในขบวนการนี้

โดยสรุป เซลล์ไขกระดูกอาจมีบทบาทน้อยในขบวนการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุท่อไตภายหลังภาวะ Acute kidney injury และแทบไม่มีบทบาทเลยในขบวนการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุท่อไตภายหลังภาวะ Chronic kidney injury ดังนั้น การนำเซลล์ไขกระดูกมาใช้ในการรักษาภาวะ Kidney injury อาจเป็นไปได้ยาก คงต้องรอการพิสูจน์หลักฐานอื่นๆและวิธีการหรือแนวทางใหม่ๆในการรักษาภาวะดังกล่าวต่อไป



## รายการอ้างอิง

- [1] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **N Engl J Med** 1999 Dec 2;341(23):1725-30.
- [2] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. **J Clin Invest** 2003 Jul;112(1):42-9.
- [3] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science** 1999 May 14;284(5417):1168-70.
- [4] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. **Hepatology** 2000 Jul;32(1):11-6.
- [5] Lagaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. **Lancet** 2001 Jan 6;357(9249):33-7.
- [6] Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science** 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
- [7] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature** 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
- [8] Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997 Apr 15;94(8):4080-5.
- [9] Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell** 2001 May 4;105(3):369-77.

- [10] Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. **J Pathol** 2001 Sep;195(2):229-35.
- [11] Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. **Kidney Int** 2002 Oct;62(4):1285-90.
- [12] Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. **N Engl J Med** 2001 Jul 12;345(2):93-7.
- [13] Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. **J Clin Invest** 2005 Jul;115(7):1756-64.
- [14] Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. **J Clin Invest** 2005 Jul;115(7):1743-55.
- [15] Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. The ADQI workgroup. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Crit Care**. 2004; 8:R204–R212.
- [16] Molitoris BA, Levin A, Warnock DG, et al. Improving outcomes of acute kidney injury: report of an initiative. **Nat Clin Pract Nephrol**. 2007 Aug; 3(8):439-42.
- [17] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure. **Nat Clin Pract Nephrol**.2006 Jul;2(7):364-77.
- [18] Ralph W, Dennis B, Cordula S, and Joseph VB. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. **J Clin Invest** 1994 May;93(5):2175-88
- [19] Nishida M, Kawakatsu H, Shiraishi I, Renal tubular regeneration by bone marrow-derived cells in a girl after bone marrow transplantation. **Am. J. Kidney Dis**. 2003; 42: E10-12.

- [20] Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003;349:267-74.
- [21] Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002;197:419-23.
- [22] Strom TB, Field LJ, Ruediger M. Allogeneic stem cell-derived "Repair Unit" therapy and the barriers to clinical deployment. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1133-9.
- [23] Korbling M, Estrov Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair A New Therapeutic Concept? *N Engl J Med.* 2003;349:570-82.
- [24] Jackson KA, Majka SM, Wulf GG, Goodell MA. Stem cells: a minireview. *J Cell Biochem Suppl.* 2002;38:1-6.
- [25] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401;390-94, 1999.
- [26] Vieyra DS, Jackson KA, Goodell MA. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem cell Rev.* 2005;1:65-9.
- [27] Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotential adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev.* 2005;1:53-9.
- [28] Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ.* 2002;325:372-6.
- [29] Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation.* 2002;70:397-409.
- [30] Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev.* 1999;79:1157-91.
- [31] Sheld A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10:543-9.
- [32] Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult stem cells. *J Clin Invest.* 2004;114:795-804.

- [33] Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implication on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57:201-9.
- [34] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999;96:25-34.
- [35] Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cell: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13473-5.
- [36] Lin F, Cordes K, Li L. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2003;14:1188-99.
- [37] Morigi M, Imberti B, Zoja C. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2004;15:1794-804.
- [38] Jeremy SD, Kwon MP, Li-Li H, Vicki RK, David TS, Takaharu I, Joseph VB. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005 july;115(7):1743-55.





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ข้อมูลผลการอ่านชิ้นเนื้อของผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 1 (Positive control)

ผู้ป่วยชาย อายุ 60 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

- I. Labeled as “left kidney”, the specimen consists of a left kidney measuring 10x5.5x4.2 cm, including ureter and renal pelvis, measuring 2.5 cm in length, 0.7 cm in diameter. There is a cystic lesion at the upper pole, measuring 2x1.7x1.1 cm. The renal capsule is previously removed, showing roughly irregular surface without erosion. The stoma of ureteral margin was closed by several suture materials. The ureter and renal pelvis are opened, showing smooth and glistening mucosa without gross lesion and then the enface ureteral margin is submitted. Sectioning along the renal pelvis and calyx shows well-defined corticomedullary junction, smooth and glistening pelvico-calyxial mucosa. The cyst is uniloculated lined by smooth and glistening internal wall. The sectioning demonstrate a second uniloculated cyst, measuring 1.5x0.8x0.7 cm. locating at the upper pole 0.5 cm. from the first cyst.

A = vascular margin

B = ureteral margin

C = the first cyst

D = the second cyst

E = sampling upper pole

F = sampling middle pole

G = sampling lower pole

H-J = sampling renal calyx and pelvis

K = sampling perihilar fat

II. Labeled as “left ureter”, the specimen consists of a segment of ureter, measuring 11 cm in length. 0.5-0.7 cm in diameter. Opening along the ureter shows glistening and smooth mucosa.(L-N)

L = both resected margin

M-N = sampling ureter

III. Labeled as “periureter fat lymph node”, the specimen consists of four pieces of fibrofatty tissue, measuring together 5x4x2 cm. (O-R)

O-R = sampling lymph node

#### Microscopic Examination :

I. The section show several small nest, of malignant urothelial cells embedded in the renal parenchyma, adjacent to the renal cyst. The cystic walls are partially lined by flattened epithelium. The renal pelvis shows irregular urothelial lining with irregular nuclear arrangement. These cells exhibit enlarged irregular nuclei with visible nucleoli. The ureter margin is lined by dysplastic urothelial cells, possessing stratified disoriented cells with pleomorphic nuclei and visible nucleoli. No stromal invasion is detected. Sampling of renal calyx and renal pelvis show focal dysplastic urothelium without stromal invasion. The vascular margin is free from tumoe cells. No further malignant cell is found in the samplings of renal parenchyma. The perihilar fat demonstrates foamy histiocytic aggregate without lymph node tissue present.

II. The section of both resected margins and sampling ureter show benign urothelial lining epithelium. No malignant cell is found.

III. The sections of the peripedicular fat demonstrate fibrofatty tissue with focal foam cell aggregation and hemorrhage, No malignant cell is seen.

Diagnosis :

1. (I) Left kidney including renal pelvis and ureter, left nephroureterectomy:
  - Urothelial carcinoma in situ of the renal pelvis with cancerization into the renal parenchyma at the upper pole of kidney.
  - Presence of dysplastic urothelium in the ureteral margin.
  - Free vascular margin.
  - Renal cortical simple cyst.
2. (II) Left ureter, left ureterectomy:
  - No malignancy seen.
  - Free both resected margin.
3. (III) Fatty tissue (peripendicular fat):
  - Patchy hemorrhage, no malignant present.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 2 (Negative control)

ผู้ป่วยหญิง อายุ 49 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

#### Gross Examination:

The specimen consists of a previously bisected left kidney, measuring 15x11x8 cm, including ureter, measuring 10x5 cm. There is a renal mass with well-defined border, measuring 9.5x9.5x7.5 cm. Sectioning shows heterogeneous soft golden-yellow cut surfaces intermixed with gray-white gelatinous area. The mass is located at the upper pole. It is close to, but not invade renal capsule. Sectioning along the ureter and pelvis shows unremarkable mucosa. The pelvicalyceal system is not dilated. Representative sections are submitted as follows:

A = vascular and ureteral margin

B = tumor with anterior renal capsule

C = tumor with posterior capsule

D = tumor with medial renal capsule.

E = tumor with lateral renal capsule

F = tumor with superior renal capsule

G = gelatinous area

H = lower pole of kidney

I = perihilar fat

#### Microscopic Examination :

The sections show tumor cells arranging in solid sheets interspersed by sinusoidal vascular networks. These cells are characterized by round to polygonal shaped, clear cytoplasm, distinct cell membrane and mildly pleomorphic rounded hyperchromatic nuclei. Vascular invasion is not evidence.

Ureteral and vascular resected margins are free. Its peri-nephric fat is not noteworthy.

Diagnosis :

Kidney (left), nephrectomy:

- Renal cell carcinoma, clear cell type, Fuhrman nuclear grad II, confined within the capsule.
- Tumor size = 9.5x4.5x7.5 cm.
- No vascular invasion seen.
- Free ureteral and vascular resected margins.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 3 (Negative control)

ผู้ป่วยชายอายุ 27 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination :

The specimen consists of two pieces of needle-cored tissue, measuring 0.5x0.4x0.3 cm in length submitted in toto.

Microscopic Examination :

1. Light microscopy reveals renal cortical tissue containing 14 glomeruli.  
No globally sclerosed glomeruli are included. All glomeruli reveal no remarkable change.  
There is mild interstitial infiltrate edema. The renal tubules show diffuse mildly flattened lining epithelium. The glomerular arterioles and one interlobular artery are within normal appearance.
2. Fluorescent antibody study reveals 15 glomeruli showing :
 

IgG	=	negative.
IgA	=	negative.
IgM	=	negative.
C3	=	negative.
C1q	=	negative.
Kappa	=	negative.
Lambda	=	negative.
Fibrinogen	=	negative.
Albumin	=	negative.

## ADDENDUM :

3. Electron microscopy reveals a glomerulus with regular lamina densa. The mesangial cellularity is within normal range, 1 to 2 cells per area. No deposit is found in the mesangium and along the glomerular capillary loops. There is focal effacement of the foot processes.

## Diagnosis :

## Kidney allograft biopsy:

- Acute tubular necrosis.
- BANFF score : G0 I0 T0 V0 AH0.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมรายที่ 4 (Negative control)

ผู้ป่วยชายอายุ 35 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination :

The specimen consists of a gray white tissue, 1x1x0.2 cm in (kidney open biopsy)

Microscopic Examination :

Light microscopy of kidney open biopsy reveals renal cortex with small amount of medulla showing global sclerosis of few adjacent glomeruli. The rest about 60 glomeruli are not remarkable, however dilated urinary space containing granular acidophilic material is detected, often with partial collapse of glomerular structure. There is fibrosis in the interstitium focally. Most tubules have degeneration artifact however granular acidophilic material and necrotic cell are often present in the tubular lumen. Red blood cells are occasionally evident in the tubular lumen. Most arteries examined have no obvious change.

Diagnosis :

Kidney open biopsy:

- Light microscopy: Degeneration artifact with evidence of tubular necrosis, no active tuberculous process seen.

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายที่ 1 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 41 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

#### Gross Examination:

The specimen consists of two pieces of needle-cored tissue, measuring 0.8 and 1.8 cm in length submitted in toto.

#### Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary containing 10 glomeruli.

No globally sclerosed glomerulus are included. All of the nonsclerosed glomeruli reveal no remarkable change. One glomerulus shows tubularization of the parietal epithelium. There is patchy mild infiltrate fibrosis and tubular atrophy interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells. More crowded in perivascular regions. Few tubules in the same areas show apithelial cell casts in the lumens. Calcification is observed in some tubules. Some tubules show vacuolar degeneration. Many tubules show epithelial sloughing. One interlobular artery is encountered showing moderata to marked reduplication of the internal elastic lamina. The glomerular arterioles show no remarkable change.

2. Fluorescent antibody study reveals 3 glomeruli showing :one which is globally sclerosed showing

IgG = negative.

IgA = negative.

IgM = trace mesangial staining.

C3 = negative.

C1q = negative.

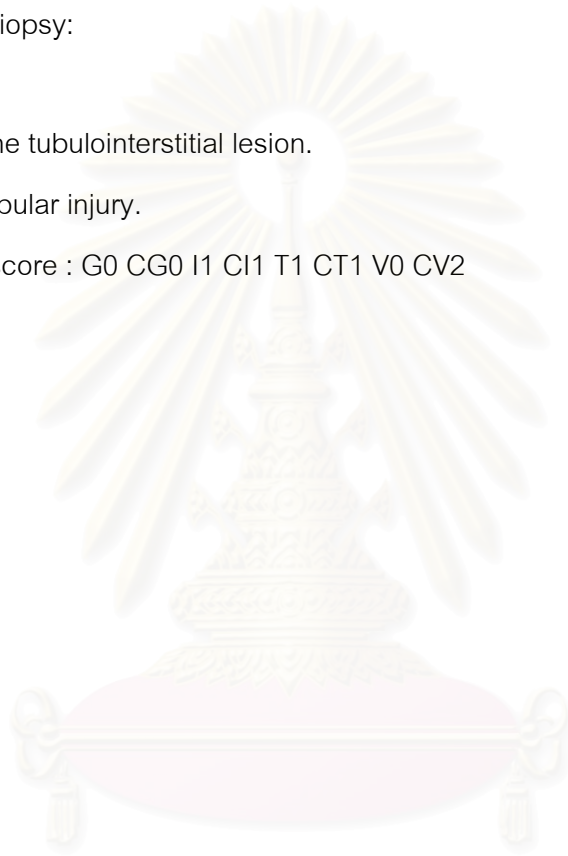
Kappa = negative.

Lambda = negative.  
Fibrinogen = negative.  
Albumin = negative.

Diagnosis :

Kidney allograft biopsy:

- Borderline tubulointerstitial lesion.
- Acute tubular injury.
- BANFF score : G0 CG0 I1 CI1 T1 CT1 V0 CV2



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายชื่อที่ 2 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 65 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

The specimen consists of two pieces of needle-cored tissue, measuring 1.1 and 2 cm in length submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary containing 11 glomeruli. No globally sclerosed glomerulus are included. All glomeruli reveal no remarkable change. There is patchy mild infiltrate fibrosis and tubular atrophy with an accompanying mild interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells. Few nonatrophic tubules in the same area show mild lymphocytic infiltrate, 1-2 cells per cross-section. Some tubules show slightly flattened epithelial cells and apoptosis. No viral-induced cytologic change is present. The glomerular arterioles are within normal appearance. Part of a muscular artery is encountered showing mild fibrous intimal thickening. No arteritis is present.

2. Fluorescent antibody study reveals 0 glomeruli showing :

IgG	=	negative.
IgA	=	negative.
IgM	=	negative.
C3	=	negative.
C1q	=	negative.
Kappa	=	negative.
Lambda	=	negative.



Fibrinogen = negative.

Albumin = negative.

ADDENDUM:

Staining for C4d is negative.

Diagnosis:

Kidney allograft biopsy:

- Minimal non-specific tubulointerstitial change.
- Regenerative phase of tubular injury.
- BANFF score: G0 I0 T1 V0 CV1 AH0 MM0.
- Negative C4d staining.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายที่ 3 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 27 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

The specimen consists of a piece of needle-cored tissue, measuring 1.8 cm in length submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical tissue containing 19 glomeruli. No globally sclerosed glomeruli are included. All glomeruli reveal normal to mild widening of the mesangial area with normal mesangial cellularity. The glomerular capillary loops are not thickened. There is patchy mild interstitial fibrosis and tubular atrophy with an accompanying mild to moderate patchy interstitial aggregate of the mononuclear inflammatory cells. Mild lymphocytic infiltrate is observed in some nonatrophic tubules. Some tubules show red blood cells and epithelial debris in the lumens. Many tubules show distalization of the tubular epithelium. Calcification is observed in a few tubules. The glomerular arterioles and one interlobular artery are within normal appearance.
2. No tissue for immunofluorescence is obtained.

Diagnosis:

Kidney allograft biopsy:

- Borderline tubulointerstitial rejection and regeneration of tubules.
- BANFF score = G0 CG0 I1 C1 T1 CT1 V0 CV0 AH0 MM0.

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายที่ 4 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 27 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

The specimen consists of two pieces of needle-cored tissue, measuring 1.3 cm in length submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary tissue containing 12 glomeruli.

One globally sclerosed glomerulus is included. All of the nonsclerosed glomeruli reveal no remarkable change. There is patchy mild infiltrate fibrosis and tubular atrophy and patchy interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells and few eosinophils, less than 25% of the presented cortical tissue. A few nonatrophic tubules show mononuclear leukocytic infiltrate.

The glomerular arterioles and one interlobular artery are normal appearance.

2. Fluorescent antibody study reveals no glomeruli.

Diagnosis:

Kidney biopsy:

- Borderline tubulointerstitial lesion, probable acute tubulointerstitial cellular rejection.
- BANFF score = G0 CG0 I1 C11 T1 CT1 V0 CV0 AH0 MM0.

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายชื่อที่ 5 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 30 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

The specimen consists of two pieces of needle-cored tissue, measuring 0.3 and 1.1 cm in length submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary tissue containing 2 glomeruli.

No globally sclerosed glomeruli are included. Both glomeruli reveal no remarkable change.

There is interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells and numerous eosinophils.

Some tubules show mild tubulitis in PAS staining section. Two arterioles show eccentric nodular hyaline change. One interlobular artery is present showing no remarkable change.

2. Fluorescent antibody study reveals 3 glomeruli showing :

IgG = negative.

IgA = negative.

IgM = trace mesangial staining.

C3 = negative.

C1q = negative.

Kappa = negative.

Lambda = negative.

Fibrinogen = negative.



Albumin = negative.

Diagnosis:

Kidney needle, biopsy:

- Acute interstitial inflammation with prominent eosinophils, borderline or early acute cellular rejection versus acute interstitial nephritis.
- BANFF score = G0 CG0 I3 C10 T1 CT0 V0 CV0 AH2 MM0.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายชื่อที่ 6 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 29 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination :

The specimen consists of 4 pieces of needle-cored tissue, measuring 0.2,0.5,0.6  
And 2cm in length.Submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary tissue containing 12 glomeruli.

One globally sclerosed glomerulus is included. Four of the nonsclerosed glomeruli reveal

Periglomerular fibrosis with leukocytic infiltrate in the surrounding interstitium.

The other glomeruli show no remarkable change. There patchy nearly diffuse interstitial fibrosis and tubular atrophy with an accompanying marked patchy interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells, more prominent in the medullary tissue which focal extravasation of red blood cells is encountered.

Two areas show moderate lymphocytes and monocyte infiltration among the tubular epithelial cells. The glomerular arterioles and one interlobular artery are within normal appearance.

2. No tissue for immunofluorescent study was submitted.

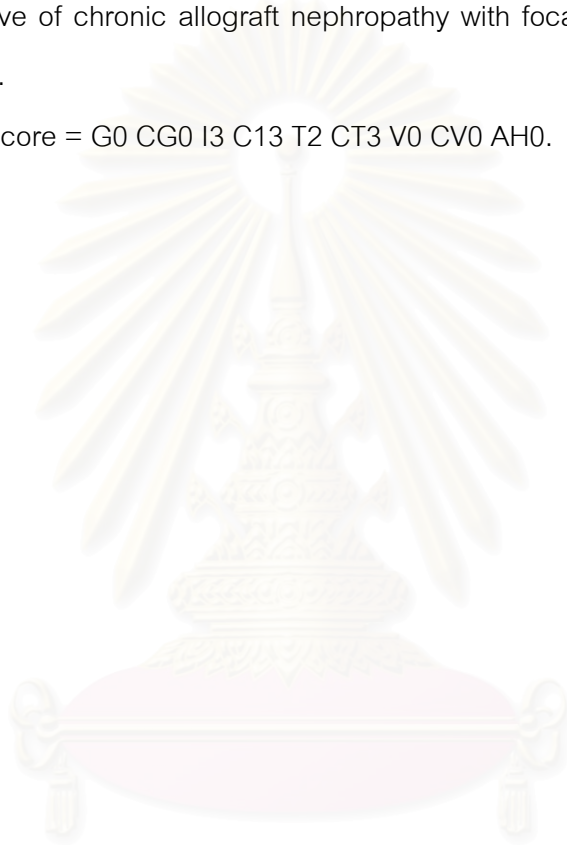
ADDENDUM:

3. No glomerulus is present for electron microscopic study.

Diagnosis:

Kidney allograft biopsy:

- Extensive chronic tubulointerstitial lesion with heavy leukocytic infiltrate suggestive of chronic allograft nephropathy with focal mild tubulointerstitial rejection.
- BANFF score = G0 CG0 I3 C13 T2 CT3 V0 CV0 AH0.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายที่ 7 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 29 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

The specimen consists of 4 pieces of needle-cored tissue, measuring 0.2,0.5,0.6 and 2 cm in length. Submitted in toto.

Microscopic Examination:

1. Light microscopy reveals renal cortical and medullary tissue containing 12 glomeruli.

One globally sclerosed glomerulus is included. All of the nonsclerosed glomeruli reveal no remarkable change. There is patchy mild infiltrate fibrosis and tubular atrophy with an accompanying mild interstitial infiltrate of the mononuclear inflammatory cells, 10% approximately. Some tubules show intratubular calcification. Many the tubules contain red blood cells and red blood cell casts Lipofuchsin pigments are occasionally found in tubular epithelium. No tubulitis is present. The glomerular arterioles are Within normal appearance. No larger artery is present.

2. Fluorescent antibody study reveals 5 glomeruli showing :

IgG	=	Negative.
IgA	=	Negative.
IgG	=	Mild mesangial staining.
C3	=	Moderate staining in arteriolar wall.
C1q	=	Negative.
Kappa	=	Negative.

Lambda = Negative.

Fibrinogen = Negative.

Albumin = Negative.

ADDENDUM:

3. Electron microscopy reveals no glomerulus. There is patchy interstitial edema and fibrosis with atrophic tubules. Focal tubular cell loss is encountered. No viral particle is identified.

Diagnosis:

Kidney allograft biopsy:

- Focal tubular calcification, probable cyclosporine nephrotoxicity.
- BANFF score = G0 CG0 I1 C11 T0 CT1 Vx CVx AH0.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างรายที่ 8 (Study group)

ผู้ป่วยชายอายุ 38 ปี

ผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

Gross Examination:

Specimen consists of a core of renal tissue, 0.9 cm in length.

1. Light microscopy of kidney needle biopsy reveals renal cortex containing about 9 glomeruli. Most glomeruli reveal normal mesangial cellularity and matrix areas with thin capillary walls. A small focus of fibrosis bearing atrophic tubules is event. Most tubules appear degeneration however no tubulitis is present. Few arterioles and intralobular areteries examined are not remarkable.
2. Fluorescent antibody study shows IgA (trace) deposits mesangial areas, scattered in all 2 glomeruli.

Diagnosis:

Kidney needle biopsy:

- No evidence of rejection seen.
- Unremarkable glomeruli with trace deposits of IgA and chronic tubulointerstitial change, small focus.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายแพทย์ พิเชฐ หล่อวินิจันท์ จบการศึกษาระดับปริญญาตรี แพทยศาสตรบัณฑิต จาก คณะ  
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร เมื่อปีพุทธศักราช 2540

พุทธศักราช 2540-2541 เข้าทำงานในตำแหน่งแพทย์นายแพทย์ 4 โรงพยาบาลเลย

พุทธศักราช 2541-2542 เข้าทำงานในตำแหน่งแพทย์นายแพทย์ 5 โรงพยาบาลนาด้วง

พุทธศักราช 2542-2543 เข้าทำงานในตำแหน่งแพทย์นายแพทย์ 5 โรงพยาบาลวารินชำ  
ราบ

พุทธศักราช 2543-2546 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขา อักษรศาสตร์  
วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล และได้รับวุฒิปริญญาอักษรศาสตร์ทั่วไป  
เมื่อปีพุทธศักราช 2546

พุทธศักราช 2546-2549 เข้าทำงานในตำแหน่งแพทย์นายแพทย์ 6 โรงพยาบาล  
อำนาจเจริญ

ปัจจุบันเป็นแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2549 จนถึงปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย