ผลของซิเตรตต่อการเกิดพังผืดของไต ในหนูที่ถูกตัดไต 5/6 ส่วน

นาย กฤษณพงศ์ มโนธรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0658-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF CITRATE ON TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS IN 5/6 NEPRECTOMIZED RATS

Mr. Krissanapong Manotham

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic year 2001

ISBN 974-17-0658-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของซิเตรตต่อการเกิดพังผืดของไต ในหนูที่ถูกตัดไต 5/6ส่วน
โดย	นาย กฤษณพงศ์ มโนธรรม
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พินิจ กุลละวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชุษณา สวนกระต่าย)

..... กรรมการ

(ดอกเตอร์ สมจิตร์ เอี่ยมอ่อง)

กฤษณพงศ์ มโนธรรม : ผลของซิเตรตต่อการเกิดพังผืดของไต ในหนูที่ถูกตัดไต 5 / 6 ส่วน (EFFECT OF CITRATE ON TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS IN 5/6 NEPRECTOMIZED RATS) อ. ที่ปรึกษา : ศ. นพ. สมชาย เอี่ยมอ่อง; 68หน้า. ISBN 974-17-0658-8

การศึกษานี้เป็นการศึกษาดูผลของ citrate ในการลดการเกิด fibrosis,ชะลอการเสื่อมของไตในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดไตวาย และศึกษากลไกในการลดการเกิด fibrosis ของ citrate โดยกระบวนการ tubular transdifferentiation และระดับ tissue TGFß1 ทำการศึกษาโดยให้หนูทดลองซึ่งกระตุ้นให้เกิดไตวายด้วยการตัดไตไป 5ใน 6ส่วนจำนวน 18 ตัว แบ่งให้กินสารละลาย citrate 9 ตัว ส่วนอีก 9 ตัวที่เหลือจะได้กินน้ำปกติ โดยมีหนูอีก 6 ตัวเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าที่8สัปดาห์หลังของการทดลอง หนูกลุ่มที่ได้รับ citrate มีแนวโน้มที่จะมีค่าการทำงานของไตดีกว่า(2.17±0.35 เทียบกับ1.43±0.63) การศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่ามีการเกิด fibrosis น้อยกว่า (fibrosis score 1.83±0.4 เทียบกับ 3±0.37 $p<0.05$) และมีแนวโน้มที่จะตรวจพบเซลล์ myofibroblast ได้น้อยกว่า การวัดระดับ tissue TGFß1พบว่ากลุ่มที่ได้รับ citrate มีค่าต่ำกว่ามาก (2104.4±379.4 เทียบกับ4326.9±609.6$p<0.02$) ชี้ให้เห็นว่า citrate สามารถลดการเกิด fibrosis ชะลอการเสื่อมของไตโดยผ่านการลดลงของ tissue TGFß1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

4375201630 : MAJOR MEDICINE (NEPHROLOGY)
KEYWORD : CITRATE/CHRONIC RENAL FAILURE/TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS/5/6 NEPRECTOMIZED/SMOOTH MUSCLE ACTIN/TGF/TGFß

KRISSANAPONG MANOTHAM : EFFECT OF CITRATE ON TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS IN 5/6 NEPRECTOMIZED RATS. THESIS ADVISOR : PROF. SOMCHAI EIAM-ONG, M.D. 68 pp. ISBN 974-17-0658-8.

Objective: To explore the anti-fibrosis effect of citrate in 5/6 nephrectomized rats model, which represents chronic renal progression in human.

Method: 18 Male Wistar rats, weight 250-300g were performed 5/6 nephrectomized (5/6). 6 age and size match rats were performed sham operation as a control(S). After the operation all rats were placed in a metabolic cage for 24 hr to obtain baseline GFR. The 5/6 group was divided into two groups $5/6_{tap}$ (n=9) and $5/6_{cit}$ (n=9) and was assign to drink tap water and citrate in tap water (61 mEq/L) respectively. In the same way, the control group were divided to S_{tap} (n=3), S_{cit} (n=3).At 8th week all rats were scarified. Renal tissues were analyzed for tubulointerstial fibrosis using scoring system on PAS and Masson section. Imunoperoxidase staining for α-SMA was done and semi quantitative score was performed. Tissue TGF, from each rat was measured, in homogenate supernatant, using double antibody ELISA method.

Results: After the surgery means GFR (cc/Kg/min) for control was 5.03 and 2.34, 2.39 for 5/6cit and 5/6 tap. At the end of the study the mean GFR trend to lower in citrate (2.17 ± 0.35 vs. 1.43 ± 0.63).The difference in pH,HCO3and potassium were not observed. Significant difference in fibrosis between the neprectomized groups were observed (fibrosis score1.83 for5/6cit vs. 3.0 for 5/6 tap). α-SMA positive cell shown trend to lower in 5/6cit but not reach statistical significant. Tissue $TGF\beta_1$ also highly significant lower in the citrate group compare to tap water group 2104 vs. 4326 pg/mg protein ($p< 0.002$)

Conclusion: Citrate revealed the anti fibrosis effect in 5/6 nephrectomized rats model by decreased tissue $TGF\beta_1$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Medicine Student's signature
Field of study Medicine Advisor's signature
Academic year 2001 Co-advisor's signature -

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้ให้คำปรึกษา แนะแนวทาง สอนและให้การสนับสนุนตลอดจนประสานงานให้ในทุกๆด้าน

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.สมจิตร เอี่ยมอ่อง ผู้ให้คำปรึกษาแนะแนวทาง สอนพัฒนาศักยภาพของผู้วิจัย และอนุเคราะห์ร่วมทำวิจัยโดยตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ ผู้ให้คำแนะนำ สอน อุทิศเวลา และอนุเคราะห์ร่วมทำวิจัยโดยเฉพาะในด้านอณูชีววิทยา

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียง ตั้งสง่า ผู้ให้แนวความคิดหลักในการวิจัย ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย สนับสนุนทุนวิจัยทั้งหมด ตลอดจนให้การสนับสนุนทุกด้านมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ ผู้ให้คำแนะนำ อุทิศเวลาและให้ความอนุเคราะห์ร่วมทำการวิจัยโดยเฉพาะด้านอณูพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ ชูศิลป์ ผู้ให้คำปรึกษาและแนวทางข้อคิดเห็นที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณ พงษ์ศักดิ์ พันธสิน ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ในด้านห้องปฏิบัติการโดยตลอด

ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดโรคไตในช่วง 2 ปีที่ผ่านมาทุกท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยชิ้นนี้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ภาควิชาสรีรวิทยา และ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ที่ให้การอนุเคราะห์ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการในการวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญแผนภูมิกราฟ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 2
3. วิธีการวิจัย..... 37
4. ผลการวิจัย..... 43
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 64

รายการอ้างอิง..... 66

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Relative contraindication ต่อการทำ hemodialysis.....	24
2.	ข้อมูลพื้นฐาน.....	44
3.	ปริมาณ tissue TGFß ในหนูกลุ่มต่างๆ 1.....	62
4.	ปริมาณ tissue TGFß ในหนูกลุ่มต่างๆ 2.....	63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิกราฟ

กราฟที่		หน้า
1.	แสดงการเปลี่ยนแปลงของGFR.....	45
2.	Fibrosis score ของหนูกลุ่มต่างๆ.....	53
3.	SMA positive cell ในหนูกลุ่มต่างๆ.....	61
4.	แสดงปริมาณ tissue TGFß ในหนูกลุ่มต่างๆ.....	63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1.	แสดง metabolic cage ที่ใช้ในงานวิจัย.....	41
2.	แสดง micropate reader ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	42
3.	เนื้อไตหนูกลุ่มควบคุม Sham ย้อมด้วย PAS.....	47
4.	แสดงเนื้อไตของหนูกลุ่ม Sham ย้อม Masson.....	48
5.	เนื้อไตหนูกลุ่ม 5/6 tap 8 สัปดาห์ย้อม PAS.....	49
6.	เนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6 tap ย้อมด้วย Masson.....	50
7.	เนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6 cit ย้อม PAS.....	51
8.	แสดงเนื้อไตหนูกลุ่ม 5/6cit ย้อมด้วย Masson.....	52
9.	เนื้อไตหนูกลุ่ม negative control ย้อมด้วย anti SMA.....	55
10.	เนื้อไตกลุ่ม positive control ย้อมด้วย anti SMA.....	56
11.	แสดงการย้อมติด SMA ในเนื้อไตหนูกลุ่ม Sham.....	57
12.	แสดงการย้อมติด SMA ในเนื้อไตหนูกลุ่ม5/6tap.....	58
13.	ภาพกำลังขยายสูง แสดงการย้อมติด SMA ในเนื้อไตหนูกลุ่ม5/6tap.....	59
14.	แสดงการย้อมติด SMA ในเนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6cit.....	60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาผลของ citrate ที่มีต่อกระบวนการเกิด fibrosis และกลไกในการออกฤทธิ์ของ citrate

สมมุติฐานการวิจัย (Hypothesis)

Citrate มีผลชะลอการเสื่อมของไต ลดปริมาณการเกิด fibrosis และ ลดปริมาณเซลล์ myofibroblast โดยผ่านการเปลี่ยนแปลงปริมาณ TGF_{β_1}

ข้อตกลงเบื้องต้น มีการประเมินสภาวะการทำงานของไตในหนูทุกตัวที่ใช้ก่อนการทดลอง โดยใช้ระดับ BUN ที่ < 30 mg%

คำสำคัญ (Key Word)

citrate

chronic renal failure

tubulointerstial fibrosis

5/6 nephrectomized

smooth muscle actin

TGF_{β_1}

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

cit หมายถึงหนูทดลองที่กินน้ำที่มีสารละลายซิเตรต

S หมายถึงหนูทดลองกลุ่มควบคุมด้วยการทำ Sham operation

tap หมายถึงหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่กินน้ำประปา

5/6 หมายถึงหนูทดลองที่ได้รับการตัดไตไป 5 ใน 6 ส่วน

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

Experimental study

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเรื่องไตวายเรื้อรัง[1]

โรคไตวายเรื้อรัง หมายถึงโรคที่มีการทำงานของไตบกพร่องเป็นเวลานาน ซึ่งการทำงานของไตไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ และถึงแม้แก้ไขสาเหตุที่ทำให้เกิด การทำลายไตในระยะแรกแล้ว การเสื่อมของไตจะยังคงดำเนินต่อไป จนในที่สุดเกิดเป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (End stage renal disease) การวินิจฉัยโรคไตวายเรื้อรังอาศัยเกณฑ์ข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้ คือ

1. มีภาวะ azotemia ติดต่อกันนานเกิน 3 เดือน
2. ขนาดของไตทั้งสองข้างเล็กกว่าปกติ
3. ตรวจพบ renal osteodystrophy
4. ตรวจปัสสาวะพบ broad cast คือ ความกว้างของ cast มากกว่าความยาวของเม็ดเลือดขาว 3 ตัว รวมกัน

การเปลี่ยนแปลงที่พบในโรคไตวายเรื้อรังดังกล่าว ส่วนหนึ่งเป็นผลจากมีการปรับตัว (compensation) ของท่อไต (renal tubule) ทำให้มี tubular hypertrophy และ มี tubular dilatation ตามมา ตลอดจนการมีพังผืดในเนื้อไต (interstitial fibrosis)

นอกจากเกณฑ์การวินิจฉัยข้างต้นแล้ว ยังมีหลักฐานอื่นๆ ซึ่งบ่งว่าน่าจะเป็นโรคไตวายเรื้อรัง ได้แก่

1. ตรวจพบระดับ carbamylated hemoglobin มีค่าสูง
2. มีอาการของ uremia มานานเกิน 3 เดือน
3. ตรวจพบภาวะซีดที่ไม่มีสาเหตุอื่นอธิบาย ร่วมกับการตรวจพบ azotemia

อย่างไรก็ตาม อาการของ uremia มักไม่มีลักษณะเฉพาะจึงนำมาใช้เป็นเกณฑ์ได้ยากสำหรับการตรวจภาวะซีดอาจไม่สามารถใช้บอกแน่นอนว่า เป็นโรคไตวายเรื้อรัง เพราะในโรคไตวายเฉียบพลันที่มีการดำเนินโรคมานานพอควร ก็อาจสามารถพบภาวะซีดร่วมด้วยได้เช่นกัน และการตรวจ carbamylated hemoglobin มีขั้นตอนยุ่งยาก จึงยังไม่มีการใช้แพร่หลาย

เกณฑ์การวินิจฉัย 4 ข้อแรกข้างต้น ใช้ได้เมื่อการทำงานของไตบกพร่องมาก และเป็นเวลานานพอสมควรแล้ว แต่ไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคไตวายเรื้อรังในระยะแรกๆ ได้ ในทางกลับกันถ้าสามารถวินิจฉัยโรค ได้ตั้งแต่เริ่มเป็นก็จะยิ่งเป็นประโยชน์ในด้านการรักษา แต่เนื่องจาก โรคไตวาย

เรื้อรังในระยะเริ่มต้นมักไม่มีอาการผิดปกติ จึงไม่สามารถใช้อาการ หรือ อาการแสดงอื่นใดมาเป็นเกณฑ์วินิจฉัยได้เลย สิ่งที่มีประโยชน์ในการค้นหาผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะแรก คือ การตรวจวัดการทำงานของไต โดยวิธีวัด glomerular filtration rate (GFR) และการตรวจหาโปรตีนในปัสสาวะ

1. การวัดการทำงานของไต

โครงสร้างของไตประกอบด้วย glomerulaus, renal tubules หลอดเลือดที่นำเลือดมาเลี้ยงและนำเลือดออกจากไต และ interstitial tissue glomerulus ทำหน้าที่กรองพลาสมา (จากเลือด) เป็น glomerular filtrate อยู่ใน Bowman's space ซึ่งจะไหลผ่าน tubules ส่วนต่างๆ จนออกมาเป็นน้ำปัสสาวะในที่สุด ไตทำหน้าที่ขับสารต่างๆ ออกทางปัสสาวะ โดยอาศัยกลไกสำคัญ 2 ส่วน คือ กรองผ่าน glomerulus (glomerulur filtration) และการปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของ glomerulur filtrate ที่ renal tubular cells โดยอาศัยกระบวนการ tubular reabsorption เพื่อดูดซึมกลับสารที่ร่างกายต้องการใช้ หรือ โดยกระบวนการ tubular secretion เพื่อหลั่งสารที่ร่างกายต้องการกำจัดออก

ในการประเมินโรคไตวายนิยมวัดการทำงานของไต ทำโดยวัดหน้าที่ส่วน glomerular filtration เป็นหลัก ซึ่งสามารถวัดได้หลายวิธีดังต่อไปนี้

1.1 การวัดค่า Glomerular Filtration Rate (GFR)

สามารถทำได้หลายวิธี วิธีมาตรฐาน คือ การวัด inulin clearance เนื่องจาก inulin เป็นสารที่ถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ โดยอาศัยการกรองผ่านโกลเมอรูลัส glomerular (glomerular filtration) เพียงอย่างเดียว โดยไม่มี tubular secretion หรือ reabsorption และ inulin ไม่ถูกสังเคราะห์หรือ ย่อยสลาย (metabolized) ที่ไต แต่การวัด GFR โดยวิธีดังกล่าว มีความยุ่งยาก ต้องมีการหยด inulin เข้าหลอดเลือดดำ และ เก็บปัสสาวะ เป็นช่วงๆ จึงไม่นิยม ในปัจจุบันการวัดค่า GFR ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิคมี 2 วิธีคือ

ก. <u>การวัดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope)</u>

สามารถใช้วัด GFR ได้ถูกต้อง ในกรณีที่ GFR มากกว่า 30 มล./นาที การวัดวิธีนี้จะได้ผลใกล้เคียงกับการวัดด้วยวิธี inulin clearance สาร radioisotope ที่นิยมใช้คือ Cr-ethylenediamenetetraacetic acid (EDTA) , Tc-diethylenediamenetetraacetic acid (DTPA) การวัดวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถบอกค่าการทำงานของไตแต่ละข้างแยกจากกันได้ แต่มีข้อเสีย คือ ต้องมีเครื่องมือเฉพาะสำหรับตรวจวัดกัมมันตภาพรังสี เสียค่าใช้จ่ายสูง การวัดด้วยสารบางตัว เช่น Cr EDTA ต้องใช้เวลาตรวจนาน และต้องมีการเจาะเลือดหลายครั้ง จึงมีข้อจำกัด และยังไม่สามารถ

นำมาใช้ทางคลีนิกเป็นประจำแทนวิธีที่จะได้กล่าวในลำดับต่อไปได้ ดังนั้นการวัดโดยใช้สารกัมมันตรังสีส่วนใหญ่จะใช้ในการวิจัยมากกว่า

ข. การวัดค่า endogenous creatinine clearance (CCr)

อาศัยหลักการที่ว่า creatinine เป็นสารที่ถูกสร้างจาก creatine และ creatine phosphate ในกล้ามเนื้อ creatinine ถูกขับออกทางปัสสาวะส่วนใหญ่โดยการกรอง ส่วนน้อยโดยกระบวนการ tubular secretion พบว่า creatinine ไม่ถูกย่อยสลายที่ไต ในสภาพปกติค่า CCr มีค่าใกล้เคียงกับ GFR ที่วัดโดยวิธี inulin clearance จึงถูกนำมาใช้ทางคลินิคเพื่อติดตามโรคได้ดี การวัดค่า CCr มีข้อเสียคือ เมื่อ GFR ลดลงต่ำมาก ไตจะปรับตัวด้วยการขับ creatinine โดยกระบวนการ tubular secretion มากขึ้น ทำให้ค่า CCr ที่วัดได้สูงกว่าค่า GFR จริง และอาจสูงมากกว่า GFR 2 เท่าได้ มีการนำ cimetidine มาใช้ร่วมกับการวัด CCr โดยอาศัยหลักที่ว่า cimetidine สามารถยับยั้งการคัดหลั่ง (secrete) creatinine ของไตได้ ทำให้ค่า CCr มีค่าใกล้เคียงกับค่า GFR จริง ของไต อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาการใช้วิธีนี้ไม่มากนัก และยังไม่เป็นวิธีวัด GFR ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย

ถึงแม้การวัด CCr ในขณะที่การทำงานของไตบกพร่องไปมาก จะทำให้ได้ค่าที่สูงกว่าค่า GFR จริงของไต แต่เนื่องจากวิธีการตรวจง่ายค่า CCr จึงยังมีประโยชน์มาก นิยมใช้แพร่หลายทางคลินิค สามารถวัด CCR ได้โดยการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง วัดปริมาตรปัสสาวะ ค่าความเข้มข้นของ Cr ในปัสสาวะ และเจาะเลือดหาค่า creatinine และนำมาคำนวณดังนี้

$$CCr = \frac{UCr \times Uvol}{Scr}$$

โดย Ucr หมายถึง ความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะ

Uvol หมายถึง ปริมาตรปัสาสวะ

Scr หมายถึง creatinine ใน serum

เมื่อค่า creatinine ในเลือดมีค่าคงที่ การคำนวณด้วยสูตรดังกล่าวจะให้ค่า CCr ที่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากวิธีการเก็บปัสสาวะ แต่ถ้าการทำงานของไตบกพร่อง และกำลังเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ไม่ควรนำวิธีการคำนวณจากสูตรมาใช้เพราะค่าที่คำนวณได้จากสูตรจะสูงกว่าค่าที่ได้จากการวัดโดยวิธีการเก็บปัสสาวะ

1.2. การวัดค่าซีรั่ม creatinine

เป็นการวัดที่ใช้บ่อยที่สุดทางคลินิก เพราะว่าทำได้ง่าย แต่มีความไวในการตรวจหาภาวะไตวายต่ำกว่าวิธีวัด GFR ความสัมพันธ์ระหว่าง CCr และ ซีรั่ม creatinine มีลักษณะเป็น Hyperbolic

curve เมื่อค่าซีรั่ม creatinine เพิ่มเป็น 2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสูงกว่าปกติค่า CCr ที่วัดได้จะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 40-50 ของค่าปกติเท่านั้น และเมื่อซีรั่ม creatinine เพิ่มขึ้นเป็น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่า CCr ที่วัดได้จะลดลงเหลือ ร้อยละ 20-30 และร้อยละ 15-20 ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อค่าซีรั่ม creatinine อยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่ได้หมายความว่าการทำงานของไตเป็นปกติเสมอไป

การตรวจได้ค่า ซีรั่ม cretinine มากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร มักบ่งว่าเป็นโรคไตวายเรื้อรังมากแล้ว ในเนื้อไตมักมี glomerulosclerosis และ tubulointerstitrial fibrosis เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งยากแก่การรักษา โรคมักจะดำเนินต่อจนเกิดเป็นไตวายระยะสุดท้าย

2. การตรวจโปรตีนในปัสสาวะ

การตรวจโปรตีนในปัสสาวะโดยใช้วิธี dipstick ขึ้นกับความเข้มข้นของปัสสาวะที่นำมาตรวจ ถ้าปัสสาวะเจือจางมากอาจให้ผลลบ หรือ ถ้าโปรตีนที่รั่วออกมาไม่ใช่ albumin ก็อาจให้ผลตรวจเป็นลบเช่นกัน ถ้าต้องการวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะให้แน่นอนควรใช้วิธีวัดโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง หรือเก็บ randomized urine หาค่า urine protein creatinine index (UPCI) โดยส่งหาค่าโปรตีนและ creatinine ในปัสสาวะ หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร นำค่าโปรตีนตั้งหารด้วยค่า creatinine ค่าที่ได้จะใกล้เคียงกับค่าโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นกรัมในเวลา 24 ชั่วโมง ปกติโปรตีนในปัสสาวะมีปริมาณน้อยกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน

3. ระยะของโรคไตวายเรื้อรัง

สามารแบ่งระยะของโรคไตวายเรื้อรังออกได้เป็น 4 ระยะ ตามความรุนแรงของโรคดังนี้

3.1 <u>ระยะที่มี renal reserve ลดลง</u>

ระยะนี้ผู้ป่วยยังไม่มีอาการผิดปกติ ค่าซีรั่ม creatinine จะสูงกว่าปกติเล็กน้อย คือ อยู่ระหว่าง 1.5-2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่า CCr ประมาณ 40-50 มล./นาที แต่มักพบมีโปรตีนในปัสสาวะเพิ่มขึ้นกว่าเกณฑ์ปกติ

3.2 <u>ระยะ chronic renal insufficiency</u>

อาจเริ่มมีอาการผิดปกติ คือ ปัสสาวะกลางคืน ความดันโลหิตสูง หรือบางรายยังไม่มีอาการ ซีรั่ม creatinine ประมาณ 2.4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร CCr ประมาณ 20-40 มล./นาที

3.2 ระยะ renal failure

มีอาการปัสสาวะกลางคืนทุกราย อ่อนเพลีย เหนื่อยง่ายเนื่องจากมีภาวะซีด ความดันโลหิตสูง ค่าซีรั่ม creatinine ประมาณ 4.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร CCr ประมาณ 10-20 มล./นาที

3.3 ระยะสุดท้าย end stage

มีอาการผิดปกติตามระบบต่างๆ ชัดเจน ที่พบบ่อย คือ คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ซึมลง เป็นต้น ระยะนี้ serum creatinine มากกว่า 8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่า CCr น้อยกว่า 10 มล./นาที

โรคไตแต่ละชนิดมีการดำเนินของโรคไตวาย จากระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 แตกต่างกัน โรคไตวายเรื้อรังจาก chronic glomerulonephritis มีอัตราการลดลงของ GFR ประมาณ 3-6 มล./นาที/ปี โรคไตวายเรื้อรังจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) มีอัตราการลดลงของ GFR เร็วกว่า คือ ประมาณ 6-10 มล./นาที/ปี กลุ่ม chronic glomerulonephritis ถ้าเริ่มต้นด้วยซีรั่ม creatinine 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะใช้เวลาประมาณ 10-15 เดือน กว่าจะถึงโรคไตระยะสุดท้าย ในขณะที่กลุ่มโรคไตจากเบาหวานจะใช้เวลาประมาณ 6-12 เดือน

4. พยาธิสรีรวิทยาของการเกิด uremic syndrome

ไตทำหน้าที่สำคัญ 3 ประการคือ

1. Excretory function ได้แก่การขับของเสีย (waste product) ซึ่งเกิดจาก metobolism ของร่างกายออกทางปัสสาวะ เช่น urea, creatinine, กรด เป็นต้น

2. Regulatory function ได้แก่ การควบคุมสมดุลต่างๆ ของร่างกาย เช่น น้ำ, เกลือแร่, ความเป็นกรดด่าง ซึ่งไตอาศัย หน้าที่ในข้อแรกช่วยควบคุมสมดุลด้วย

3. Synthetic function ไตสังเคราะห์ active form ของ vitamin D, erythropoietin, mediators และ growth factors ต่างๆ

ในโรคไตวายเรื้อรังเมื่อการทำงานของไตบกพร่อง หน้าที่ต่างๆ ของไตจะลดลง หน้าที่บางอย่างจะลดลงเมื่อการทำงานของไตบกพร่องไปไม่มากนัก หรือ หน้าที่บางอย่างจะลดลงเมื่อการทำงานของไตเสียไปมากแล้ว เรียกกลุ่มอาการและอาการแสดง ซึ่งเกิดจากไต ทำงานน้อยมากกว่านี้ว่า uremic syndrome และเรียกภาวะของร่างการในขณะไตไม่ทำงาน หรือ ทำงานน้อยว่าภาวะ uremia เชื่อว่าพยาธิสรีรวิทยาของ uremic syndrome เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

4.1 Uremic toxin

ในโรคไตวายเรื้อรังเกิดการสะสมของ uremic toxins ทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย ในปัจจุบันพบว่ามีหลายตัว เช่น urea, creatinine, indole, ADMA, และ purine เป็นต้น

4.2 ความผิดปกติของระดับฮอร์โมนในร่างกาย

ได้แก่ การที่มีฮอร์โมนในร่างกายบางตัวมากเกินไป หรือน้อยเกินไป เช่น parathyroid hormone สูง ขณะที่ erythropoietin ต่ำ

4.3 การเปลี่ยนแปลงของ extracellular environment

extracellular environment ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีความสำคัญ คือ การเกิด metabolic acidosis, hyperkalemia, hyperphospatemia, และ hypermagnesemia การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เซลล์ และอวัยวะต่างๆ ทำงานผิดปกติ เกิดอาการและอาการแสดงของ uremic syndrome

4.4 การเปลี่ยนแปลงของ intracellular milieus

ion transport ของเซลล์ในโรคไตวาย ทำงานผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวนี้เป็นเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติตาม ส่งผลให้อวัยวะในระบบต่างๆ ทำงานผิดปกติตามไปด้วย การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญได้แก่

4.4.1 การทำงาน Na+, K+-ATPase (Na+ pump) ลดลง

ปกติ Na+ pump ทำหน้าที่ขนส่ง Na+ ออกจากเซลล์และขนส่ง K+ เข้า เซลล์ ต้านกับ concentration gradient เมื่อ Na+ pump ทำงานลดลง ทำให้ระดับโซเดียมในเซลล์สูงขึ้น และระดับโปแตสเซียมในเซลล์ลดต่ำลงกว่าปกติ การแลกเปลี่ยนระหว่างโซเดียมในเซลล์กับโปรตอนนอกเซลล์ลดลงทำให้การทำงานของ organelles, และเอ็นไซม์ต่างๆ ในเซลล์เสียไป ระดับโซเดียมที่สูงขึ้นทำให้ปริมาตรเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ และอวัยวะต่างๆ เพราะ pH หรือ co-factors ต่างๆ ในเซลล์จะขึ้นกับปริมาตรเซลล์ ปริมาตรเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะ เช่น ถ้าเป็น endothelial cells ที่มีปริมาตรเซล์เพิ่มขึ้น จะทำให้ vascular resistance สูงขึ้น มีผลต่อการทำงานของหัวใจ หรือมีผลต่อปริมาณเลือดที่ไปเลี่ยงอวัยวะต่างๆ เป็นต้น

4.4.2 การทำงานของ Ca^{++}-ATPase ลดลง

ปกติ Ca^{++}-ATPase ทำหน้าที่ขนส่ง Ca^{++} จาก cytoplasm ออกนอกเซลล์ เมื่อ Ca^{++}-ATPase ทำงานลดลง ระดับแคลเซียมในเซลล์ต่างๆ จะสูงขึ้น ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ และนำไปสู่การตายของเซลล์ได้

4.4.3 การลดลงของ resting membrane potential

การที่ Na^{+} pump ทำงานลดลง ทำให้ resting membrane potential ของเซลล์ต่างๆ ลดลงตาม ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ คือ เซลล์ ถูกกระตุ้นให้เกิด action potential ง่ายขึ้น เช่น เซลล์กล้ามเนื้อลายถูกกระตุ้นให้หดตัวง่ายขึ้น

4.4.4 ความผิดปกติของส่วนประกอบ (composition) และ หน้าที่ (function) ของ membrane

โรคไตวายทำให้มี membrane composition เปลี่ยนแปลง เช่นมีปริมาณ non-esterfied fatty acid (NEFAs) และ lysophospholipids เพิ่มขึ้น membrane ก็ทำงานผิดปกติด้วย เช่น membrane fluidity และ permeability ผิดปกติ หรือ ทำให้การทำงานของ Na^+ pump ผิดปกติ

4.4.5 ความผิดปกติของ cation transport อื่นๆ

เช่น มี Na^+ -K^+ -2Cl^- cotransport ลดลง ทำให้ Na+ efflux ออกจากเซลล์ลดลง มี Na^+/Cl^- exchange เพิ่มขึ้น เป็นต้น

5. อาการแสดงทางคลินิก ของ uremic syndrome

อาการแสดงทางคลินิก ของ uremic syndrome ประกอบด้วยอาการของระบบต่างๆ หลายระบบ ในโรคไตวายเรื้อรัง แต่ละรายอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องอาการแสดง ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขึ้นกับระยะเวลาการเสียหน้าที่ของไตว่าเกิดขึ้นเร็วหรือช้า ถ้าเกิดขึ้นเร็วอาการบางอย่างก็มักจะเด่นชัด เช่น อาการทางสมอง คลื่นไส้ เป็นต้น หรือขึ้นกับระดับของเสียในร่างกาย ถ้าระดับของเสียยิ่งสูงมากอาการก็จะเด่นชัด และยังขึ้นอยู่กับตัวผู้ป่วยด้วยว่ามีสภาพเป็นอย่างไร เช่น ถ้าผู้ป่วยมีอายุมาก อาการทางสมองก็เกิดได้เร็ว

5.1 <u>ความผิดปกติของสมดุลน้ำ เกลือแร่ และความเป็นกรดเป็นด่าง</u>

เมื่อไตเสื่อมมากขึ้น ไตจะขับน้ำออกจากร่างกายได้ลดลง ถ้าร่างกายได้รับน้ำในปริมาณที่มากเกินไป อาจเกิดอาการของภาวะน้ำเกินได้ง่าย เช่น อาการบวม, อาการเหนื่อยหอบจากภาวะหัวใจวาย, hyponatremia ถ้ามีความดันโลหิตสูง หรือ มีหัวใจทำงานผิดปกติร่วมด้วย จะเกิดอาการเหล่านี้ง่ายขึ้น

สมดุลเกลือแร่มักเปลี่ยนแปลงไปในภาวะ uremia พบการเปลี่ยนแปลงของสมดุลเกลือแร่ที่สำคัญ คือ

5.1.1 Hyponatremia

เกิดจากหลายสาเหตุ คือ ไตมีความสามารถในการขับน้ำลดลง เอ็นไซม์ Na+, K+-ATPase ทำงานลดลง ร่างกายได้รับน้ำในปริมาณมากเกินไป อาการแสดงที่สำคัญ คือ อาการจากภาวะสมองบวม เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ระดับความรู้สึกตัวลดลง ตั้งแต่ซึมจนถึงหมดสติชัก เป็นต้น

5.1.2 Hyperkalemia

มีหลายสาเหตุคือเกิดจากการขับโปแตสเซียมออกทางปัสสาวะลดลง (การขับโปแตสเซียมออกทางปัสสาวะลดลงเมื่อ GFR ต่ำกว่า 10-15 มล./นาที) เกิดจากการทำงานจอง Na^+ K^+-ATPase

ลดลง และการตอบสนองเซลล์ต่อ cathecholamine และ insulin ลดลง ทำให้การกระจายตัว (distribution) ของโปแตสเซียมผิดปกติ มีโปแตสเซียมเคลื่อนย้ายจากพลาสมาเข้าในเซลล์ได้น้อยลง เกิดจากการได้รับอาหารที่มีโปแตสเซียมร่วมด้วย เกิดจากการใช้ยาบางอย่าง เช่น ACE-Inhitors ที่ลด aldosterone ซึ่ง aldosterone มีหน้าที่ช่วยขับโปแตสเซียมออกทางปัสสาวะ ยา beta blocker ซึ่งยับยั้งโปแตสเซียมเข้าเซลล์ และเกิดจากภาวะ metabolic acidosis ทำให้มี โปแตสเซียมเคลื่อนออกนอกเซลล์ อาการแสดงที่สำคัญของภาวะ hyperkalemia คือ หัวใจเต้นผิดปกติ ได้แก่มี P-wave ใน EKG เตี้ยลง PR interval ยาวออก QRS complex ยาวออก tall peak T ชีพจรเต้นช้า ถ้ารุนแรงอาจมีอันตรายถึงชีวิต และอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง โดยมักเป็นที่กล้ามเนื้อมัดใหญ่

5.1.3 Hyperphosphatemia

สาเหตุหลักที่สำคัญ คือ มีการขับฟอสเฟต ออกทางปัสสาวะลดลง ภาวะฟอสเฟตในเลือดสูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสำคัญหลายอย่าง เช่น hypocalcemia, secondary hypeprarathyroidism ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

5.1.4 Hypocalcemia

จะได้กล่าวในรายละเอียดอีกครั้งในส่วนของ secondary hyperarathyroidism อาการแสดงที่สำคัญของภาวะ Hypocalcemia คือ อาการทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ได้แก่ อาการชา tetany ชัก ความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นผิดปกติ เป็นต้น

5.1.5 Hypermagnesemia

เมื่อ GFR น้อยลงกว่า 30 มล/นาที แมกนีเซียมจะถูกขับออกทางปัสสาวะลดลงทำให้เกิดภาวะ Hypermagnesemia ถ้าผู้ป่วยได้รับยาที่มีแมกนีเซียมร่วมด้วยจะพบภาวะ Hypermagnesemia ได้บ่อยขึ้น อาการแสดงที่สำคัญ ได้แก่ กล้ามเนื้ออ่อนแรง หัวใจเต้นผิดปกติ และอาการจะเด่นชัดมากขึ้นถ้ามี Hypocalcemia ร่วมด้วย

5.1.6 Metabolic acidosis

ในภาวะไตวาย renal tubule ขับโปรตอน ออกไปทางปัสสาวะลดลง การสร้าง ammonia ลดลง และ การขับ tritrable acid ลดลงทำให้มีการคั่งของ fixed acid เช่น sulfuric acid, phosphoric acid, organic acids ที่เกิดจาก metabolism ของ โปรตีน ไขมัน และ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น fixed acid ในร่างกายที่สูงขึ้น จะใช้ระบบ buffer ของร่างกาย เพื่อช่วยทำปฏิกริยากับโปรตอน ไม่ให้เกิดระบบโปรตอนอิสระ (free [H+]) สะสมในร่างกาย ระบบ buffer ที่สำคัญของร่างกาย คือ extracellular และ intra cellular buffer ระบบ extracellular buffer ที่สำคัญ คือ ไบคาร์บอเนต รองลงมา คือ โปรตีนในพลาสมา และ ฟอสเฟต ระบบ intracellular buffer ที่สำคัญ คือ โปรตีนในเซลล์ ฟอสเฟตในเซลล์ ฮีโมโกลบิน และ กระดูก หรือ อาศัยระบบ intra-extracellular ion exchange ระบบดังกล่าวมี

ขีดจำกัด เมื่อมีโปรตอนสะสมมากเกินความสามารถของระบบ buffer ทั้งสองจะรับไว้ได้ ก็จะเกิดภาวะ metabolic acidosis ซึ่งมีผลเสียหลายประการต่อร่างกายดังนี้

1. เกิดภาวะกระดูกผุ เพราะมีการเคลื่อนของแคลเซียมออกจากการกระดูก

2. มีผลต่อ protein metabolism คือ ทำให้มี protein catabolism เพิ่มมากขึ้น และ protein synthesis ลดลง catabolism ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากในภาวะ metabolic acidosis มีการกระตุ้น ATP-ubiquitin proteasome proteolytic pathway และมีการกระตุ้นเอ็นไซม์ branched chain keto-acid (BCKA) dehydrogenase ในกล้ามเนื้อทำให้มีการสลาย BCKA ในกล้ามเนื้อ BCKA ตัวสำคัญที่ลดลง คือ alphaketoisocaproate ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำลายโปรตีน ส่วนการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) ที่ลดลงเกิดจากกระบวนการ branched achain amino acid decarboxylation ถูกกระตุ้น ทำให้กรดอะมิโนบางตัว เช่น valine, isoleucine ลดลง

3. ทำให้มีการหลั่ง PTH ออกมาง่ายขึ้น เป็นผลจากการลด threshold ของต่อม parathyroid

4. เกิดภาวะ intracellular acidsis ซึ่งเชื่อว่ากระตุ้นให้เกิด renal hypertrophy และ tubulointerstitial fibrosis ทำให้เกิดการเสื่อมของไตมากขึ้น

5.2 <u>อาการแสดงทางระบบโลหิตวิทยา</u>

Uremia ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาหลายประกาย ที่สำคัญ คือ ทำให้เกิดภาวะซีด หรือ โลหิตจาง (anemia) การเกิดลิ่มเลือด (hemostasis) ผิดปกติ และการทำงานของเม็ดเลือดขาวผิดปกติ

5.2.1 ผลของ uremia ต่อภาวะโลหิตจาง

ภาวะโลหิตจาง เป็นอาการแสดงที่สำคัญ อาการหนึ่งที่พบบ่อยในโรคไตวายเรื้อรัง ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังชนิด chronic tubulointerstitial disease มักแสดงอาการซีดเด่นชัดกว่าผู้ป่วย chronic glomerulonephritis แต่ในระยะท้ายผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่เกิดจากทั้ง 2 โรค ไม่ได้รับการแก้ไขอาจมีภาวะโลหิตจางได้รุนแรงมากพอกัน กลไกในการเกิดภาวะโลหิตจาง มีหลายประการ ดังนี้

ก. การสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง

เป็นกลไกหลัก เกิดจากการขาด erythropoietien (EPO) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ไตสังเคราะห์ EPO ประกอบด้วยกรดอะมิโน 165 ตัว ปกติระดับ EPO ในเลือดประมาณ 6-32 มิลลิยูนิต/มล. ในผู้ใหญ่ประมาณร้อยละ 85-90 หรือมากกว่าของ EPO ถูกสังเคราะห์ที่ไต น้อยกว่าร้อยละ 10 ถูกสังเคราะห์ที่ตับ อวัยวะอื่นก็สามารถสังเคราะห์ EPO ได้ แต่น้อยมาก เช่น ม้าม ถุงน้ำดี ต่อมน้ำลาย ไขกระดูก เป็นต้น การสังเคราะห์ EPO ที่ไตมี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก คือ oxygen sensor โดยอาศัยเซลล์ endothelium บริเวณเนื้อไตส่วน medulla และ residence fibroblast ทำหน้าที่เป็น oxygen sensor

cell มีหน้าที่ส่งสัญญาณไปยังเนื้อไตส่วน cortex เพื่อให้เกิดขั้นตอนที่ 2 คือ การสังเคราะห์ EPO เซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ EPO ได้แก่เซลล์ บริเวณ peritubular capillary, เซลล์ epithelium ของ glomenulus และ tubules ตัวกระตุ้นการสร้าง EPO ที่สำคัญ คือ ภาวะ hypoxia ในโรคไตวายเรื้อรังจะเกิด ความผิดปกติในการสังเคราะห์ EPO ทั้ง 2 ขั้นตอน

นอกจากภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจากการขาด erythropoietin แล้ว การสร้างเม็ดเลือดแดง อาจลดลงเนื่องจากไขกระดูกตอบสนองต่อ erythropoietin เช่น aluminum intoxication, ภาวะ malnutrition หรือ เนื่องจากการสูญเสียสารอาหารไปในช่วงการฟอกเลือด

ข. มีการทำลายเม็ดเลือดแดงมากขึ้น

เป็นกลไกร่วมที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีอายุของเม็ดเลือดแดงสั้นกว่าปกติ เชื่อว่าเกิดจากการสะสมของ uremic toxins ในภาวะ uremia แต่ไม่ได้เกิด จากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงโดยตรง เพราะ ถ้านำเม็ดเลือดแดงที่ได้จากผู้ป่วย uremia ไปให้คนปกติ พบว่า เม็ดเลือดแดงจะมีอายุเท่ากับคนปกติ และถ้านำเม็ดเลือดแดงของคนปกติไปให้ผู้ป่วย uremia พบว่าเม็ดเลือดแดง จะมีอายุสั้นลง

ค. มีการสูญเสียเลือด

Uremia ทำให้มีความผิดปกติของ hemostasis เกิดภาวะเลือดออกง่าย ภาวะเลือดออกง่ายอาจทำให้มีการสูญเสียเลือด เช่น มีเลือดออกจากเยื่อบุทางเดินอาหาร นอกจากนี้ uremia ยังอาจทำให้เกิดกระเพาะอาหารอักเสบ และเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้น ทำให้เลือดออกในระบบทางเดินอาหารได้ง่ายขึ้น

5.2.2 ผลของ uremia ต่อการแข็งตัวของเลือด

การเปลี่ยนแปลงของการแข็งตัวของเลือดใน uremia ที่สำคัญ คือ มีความผิดปกติของ VSP เลือด อาจมีระดับ coagulation factors ผิดปกติ และมี fibrinolytic activity ลดลง แต่เมื่อตรวจด้วย prothrombin time, activated partial thrombolastin time และ thrombin time จะปกติ

พบความผิดปกติของ VSP เลือด คือ platelet adhesion และ aggregation ลดลง ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายอย่างในภาวะ uremia คือ

1. ระดับ platelet serotonin, ADP ลดลง
2. platelet active cyclic AMP เพิ่มขึ้น

3. การสร้าง thromboxane A2 ที่ plateleet ลดลง ซึ่งเป็นผลจาก uremic toxin ได้แก่ phenolic acid, phenol และ guanidino succinic acid ทำให้มีการสร้าง platelet factor III ลดลง

4. metobolism ของ arachidonic acid ผิดปกติ

5. ระดับ prostaglandin I2 (PGI2) สูงขึ้น และ มีการลดลงของ PGI2 conversion

6. ความผิดปกติ ในการทำงานของ factor VIII-Von Willibrand's factor

7. ขณะที่ hematocrit น้อยกว่า 30 vol% จะทำให้ platelet ทำปฏิกริยา adhesion กับ endothelium ของหลอดเลือดลดลง

8. การเพิ่มขึ้นของ nitric oxide (NO)

อาการแสดงที่สำคัญ คือ มีเลือดออกง่าย (bleeding diathesis) เช่น เลือดออกจากเยื่อบุ เช่น เยื่อบุช่องปาก หรือ เยื่อบุทางเดินอาหาร การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ คือ มี bleeding time ยาวขึ้น อาจแก้ไขได้หลายวิธี เช่นการให้ยา desmopressin (DDAVP) เพื่อกระตุ้นการสร้าง Von Willibrand's factor การให้ cryoprecipitate ซึ่งมี factor VIII ปริมาณมาก การทำ dialysis การให้เลือดเพื่อให้ hematocrit เพิ่มขึ้นมากกว่า 30 vol% การใช้ยา conjugated estrogen หรือ การให้ VSP เลือด ซึ่งจะมีประโยชน์ เฉพาะในกรณีที่มี VSP เลือดต่ำร่วมด้วย

5.2.3 ผลของ uremia ต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาว

ในผู้ป่วย uremia เม็ดเลือดขาวทำงานผิดปกติ มี circulating inhibitor ต่อ chemotaxis, มีการลดลงของ cyclic GMP/cyclic AMP ratio ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และมี plasma factor ยับยั้ง receptor ที่เยื่อบุเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ chemotaxis ลดลง มีความผิดปกติของ phagocytosis คือ มีความผิดปกติของ oxidative metabolism ของ hexose monophosphate pathway มี intracellular calcium ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น มีภาวะ acidosis และ malnutrition เกิดร่วม ทำให้กระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงได้ uremia ยังมีผลทำให้ monocyte ทำงานลดลง มีการสร้าง interleukin-2 (IL-2) ลดลง ทำให้การสร้าง IL-2 receptor (IL-2R) ที่ lymphocyte ลดลงตามการลดลงของ IL-2 ทำให้มี T-lymphocyte proliferation ลดลงหลังการกระตุ้นด้วย antigen ชนิดต่างๆ

5.3 <u>อาการแสดงทางระบบหัวใจและหลอดเลือด</u>

พบความดันโลหิตสูง ในโรคไตวายเรื้อรังชนิด glomerulonephritis เกิดจากมีการคั่งของโซเดียม มีการกระตุ้นระบบ Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) มี endothelin (ET)

เพิ่มขึ้น และมี NO ลดลง เชื่อว่า accelerated atherosclerosis ใน uremia เกี่ยวข้องกับสาเหตุหลายประการ คือ ภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะ hyperparathyroidism (ทำให้เกิด calcification ที่หลอดเลือด) ระดับ oxalate และ homocysteine ที่สูงขึ้น รวมถึงการสูบบุหรี่ หรือ โรคเบาหวาน ที่พบร่วมด้วยพบ cardiomyopathy ประมาณ ร้อยละ 60 ของผู้ป่วย พบได้ทั้ง dilated cardiomyopathy และ hypertrophic hyperkinetic cardiomyopathy สาเหตุที่ทำให้เกิดได้แก่ ischemia, calcification ที่กล้ามเนื้อหัวใจ การสะสมของ oxalate และ β2 microglobulin ที่กล้ามเนื้อหัวใจ ภาวะ malnutrition นอกจากนี้ metabolic acidosis ยังทำให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานลดลง

อาจเกิด cardiac arrhythmia เกิดได้ทั้งจากตัวโรคหัวใจเอง และจากเกลือแร่ในเลือดที่ผิดปกติ ได้แก่ hyperkalemia, hypermagnesemia, hypercalcemia, severe acidosis มักพบ pericarditis เมื่อ blood urea nitrogen (BUN) สูงเกิน 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ผู้ป่วยมีอาการเจ็บหน้าอก ตรวจพบ pericardial rub ถ้าเป็นมากจะพบ pericardial effusion จนเกิดเป็น cardiac tamponade ได้

5.4 <u>อาการแสดงทางระบบประสาท</u>

พบได้ทั้งความผิดปกติของระบบประสาท ส่วนกลาง ส่วนปลาย และระบบประสาทอัตโนมัติ ความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ สมองส่วนต่างๆ ทำงานผิดปกติ เช่น ไม่มีสมาธิในการทำงาน เฉื่อยชา พูดช้า cognitive function ต่างๆ ลดลง เช่น หลงลืมง่าย มี disorientation ระดับความรู้สึกตัวผิดปกติ ตั้งแต่ง่วงซึมเวลากลางวัน ซึมลง พบ asterixis, myoclonus จนถึงชัก และ coma ได้ในที่สุด

ความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลาย และระบบประสาทอัตโนมัติ ได้แก่ เช่น peripheral neurophathy ซึ่งอาจมีอาการชา หรือมี burning sensation ถ้าเป็นมากจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงร่วมด้วย restless leg syndrome ตะคริว ต่อมเหงื่อทำงานลดลง impotence หรือ พบ postural hypotension

เชื่อว่าอาการทางระบบประสาทเกี่ยวข้องกับ uremic toxins และมี neurotransmitters ที่ผิดปกติไป เช่น gamma-aminobutyric acid (GABA) ลดลง การทำงานของ NA+, K+-ATPase ลดลง มีการเพิ่มขึ้นของ cerebral permeability มีการเพิ่มขึ้นของ intracellular calcium และ ภาวะ secondary hyperparathyroidism

5.5 <u>อาการแสดงทางระบบทางเดินอาหาร</u>

มักเริ่มต้นด้วยอาการเบื่ออาหาร ถ้าเป็นมากจะมีคลื่นไส้ อาเจียน มี urea ในน้ำลายสูงขึ้น และถูกแบคทีเรีย เปลี่ยนเป็น ammonia ทำให้ลมหายใจมีกลิ่น urea หรือที่เรียกว่า urea fetor พบเยื่อบุ

ช่องปาก และเหงือกอักเสบ และอาจพบแผลอักเสบได้ตลอดทางเดินอาหาร เช่น ที่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ เป็นต้น ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหารได้ โดยเฉพาะเมื่อมีการแข็งตัวของเลือดผิดปกติเข้าร่วมด้วย เชื่อว่าการอักเสบ และแผลของเยื่อบุเกิดจากแบคทีเรียเปลี่ยน urea เป็น ammonia ทำให้ mucosal barrier เสียไป ร่วมกับเกิดจาก musocal edema ในภาวะ hypoalbuminemia พบต่อมน้ำลายอักเสบได้เชื่อว่าเกิดจากการอุดตันของท่อต่อมน้ำลายจาก urea หรือ จาก calcium phosphate precipitation พบอาการสะอึกโดยเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ diaphragmania neuromuscular irritability พบ diverticulosis เนื่องจาก autonomic neurophthy และ uremic toxins ที่ทำให้ muscular function ของลำไส้ลดลง อาจพบตับโตจาก fatty liver หรือจาก passive congestion จากภาวะหัวใจวายพบ pancreatitis ได้แต่ไม่บ่อยนัก

5.6 <u>อาการแสดงทางระบบหายใจ</u>

พบ atypical pulmonary edema, pneumonitis และ fibrinous pleuritis จนถึง pleural effusion นอกจากนี้อาจพบ pulmonary fibrosis ได้ในโรคที่มีความผิดปกติทั้งไต และปอดร่วมด้วย เช่น goodpasture syndrome

5.7 <u>อาการแสดงทางต่อมไร้ท่อและ metabolism</u>

5.7.1 Hyperparathyroidism

ส่วนใหญ่เป็นชนิด secondary (2^0) ส่วนน้อยเป็นชนิด tertiary (3^0) hyperparathyroidism ปัจจุบันเชื่อว่ากลไกการเกิด 2^0 hyperparathyroidism ใน uremia มีหลายกลไกดังต่อไปนี้

การคั่งของฟอสเฟตในเลือด

เมื่อ GFR ลดต่ำกว่า 30-50 มิลลิลิตรต่อนาที การกรองฟอสเฟตออกจากไตผ่านทาง glomerular filtration จะลดลงตามลำดับ เกิดการคั่งของฟอสเฟตในร่างกาย นอกจากนี้ภาวะ metabolic acidosis ยังทำให้ระดับฟอสเฟตในเลือดสูงขึ้นด้วย

ระยะแรกเชื่อว่าฟอสเฟตในเซลล์สูงขึ้นก่อน ต่อมาระดับฟอสเฟตในเลือดสูงขึ้นตาม เมื่อระดับฟอสเฟตในเลือดสูงขึ้น จะเกิด calcium phosphate precipitation ในเนื้อเยื่อต่างๆ และการทำงานของเอ็นไซม์ 1α-hydroxylase ที่ใช้ในการสร้าง calcitriol จะลดลง การสร้าง calcitriol ที่ลดลงทำให้ระดับแคลเซียมลดลงตามซึ่งกระตุ้นให้ต่อม parathyroid ให้เกิด parthyroid hyperplasia มีการสร้างและหลั่ง PTH ออกมามากขึ้น เพื่อเพิ่มระดับแคลเซียมในเลือดให้เป็นปกติ ฟอสเฟตเองยังมีผลโดยตรงต่อการสร้าง และหลั่ง PTH โดยไม่ผ่านทางการลดลงของแคลเซียม

หรือ calcitriol PTH ออกฤทธิ์ที่อวัยวะสำคัญ คือ ไต โดยการลดการขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะ และเพิ่มการดูดกลับแคลเซียมที่ cortical thick ascending limb of Henle's loop (TALH), distal convoluted tubule (DCT) และ connecting tubule และที่กระดูกทำให้มีการเคลื่อน ของแคลเซียม ออกจากกระดูกเข้าสู่เลือด และ extracellular fluid อื่นๆ

2^0 hyperparathyroidism อาจเกิดขึ้นในขณะที่ ระดับฟอสเฟตในเลือดปกติ เชื่อว่ากลไกการเกิด คือ การมีระดับฟอสเฟตในเซลล์ที่สูงไปขึ้นไปยับยั้งการทำงานของ 1α-hydroxylase ที่ไต หรือมีการ transcellular flux ของฟอสเฟต ที่ tubular cell ซึ่งเซลล์ดังกล่าว ทำหน้าที่สร้าง calcitriol ด้วย

มีการขาด Vitamin D

ไตทำหน้าที่สร้าง active form ของ vitamin D คือ 1,25 $(OH)_2$ D_3 หรือ calcitriol ซึ่งมีฤทธิ์สำคัญที่ไต ทำให้มีการดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้น มีฤทธิ์ที่ทางเดินอาหารทำให้ดูดแคลเซียมเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ที่ต่อม parathyroid กระตุ้นการสร้างและหลั่ง PTH ด้วย แต่การสร้าง calcitriol ที่ไต ต้องอาศัย PTH เช่นกัน PTH กระตุ้น enzyme 1α-hydroxylase ที่ proximal tubule ผ่านทาง cyclic AMP ทำให้มีการเปลี่ยน 25 (OH) D_3 เป็น 1 ,25 $(OH)_2$ D_3 ซึ่งเป็น active metabolite ของ vitamin D ใน uremia ถึงแม้มี PTH มากขึ้น แต่ active form ของ vitamin D กลับลดลง เนื่องจากการเสื่อมของเนื้อไต ระดับฟอสเฟตที่สูงขึ้น และภาวะ metabolic acidosis ยังมีผลยับยั้ง การสร้าง calcitriol

การตอบสนองต่อ vitamin D ลดลง (vitamin D resistance)

ในภาวะปกติ ระดับซีรั่ม calcium ควบคุมการสร้างและการหลั่ง PTH เมื่อระดับซีรั่ม calcium ลดลง จะมีการกระตุ้นการสร้างและการหลั่ง PTH มากขึ้น ค่า set point ของซีรั่ม calcium คือ ค่าซีรั่ม calcium ที่ (ถูกทำให้เพิ่มขึ้นจน) ทำให้มีการยับยั้งการหลั่ง PTH ทำให้ค่า PTH ในเลือดเป็นครึ่งหนึ่งของค่า PTH สูงสุด ที่ผู้ป่วยรายนี้อาจมีได้ ความสัมพันธ์ระหว่าง PTH และ ระดับแคลเซี่ยมในเลือด มีลักษณะเป็น sigmoid curve ปกติ vitamin D ช่วยกระตุ้นการหลั่ง PTH โดยผ่านทาง vitamin D receptor ใน uremia ต่อม parathyroid มี vitamin D receptor ลดลง ทำให้ต่อม parathyroid ถูกกระตุ้นโดยหลั่ง PTH ได้น้อยลงทำให้ค่า set point ของการหลั่ง PTH สูงขึ้น มีการเคลื่อนที่ของ curve นี้ไปทางขวา ซึ่งหมายความว่า ถ้ามีระดับซีรัม calcium เท่ากัน ผู้ป่วย uremia มีการสร้าง PTH มากกว่า และมีการกระตุ้น ให้ parathyroid cell แบ่งตัวเพิ่มขึ้น เกิดเป็น parathyroid hyperplasia (เพราะ sigmoid curve ดังกล่าวเคลื่อนไปทางขวา) ผู้ป่วย uremia จะ

มีระดับ PTH ในเลือดสูงกว่า และยังพบ inhibitor ของ vitamin D receptor binding และ inhibitor ของการออกฤทธิ์ของ vitamin D ร่วมด้วย ทำให้ vitamin D ออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อต่างๆ ลดลง

กระดูกตอบสนองต่อ PTH ลดลง (PTH resistance)

ใน uremia พบว่า กระดูกตอบสนองต่อ PTH ลดลง ทำให้แคลเซียมเคลื่อนออกจากกระดูกเข้ากระแสโลหิตลดลง กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ ถ้าควบคุมให้มีแคลเซี่ยมเคลื่อนออกจากกระดูกในปริมาณเท่ากับคนปกติ ผู้ป่วย uremia ต้องการ PTH ที่สูงกว่าเดิม จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ต่อม parathyroid ต้องหลั่ง PTH ออกมามากขึ้น เชื่อว่าการตอบสนองที่ลดลง เป็นผลมาจาก uremic toxins และอาจเป็นผลจากการมีการสะสมของ aluminum ในกระดูก หรือ ระดับ calcitonin ที่สูงขึ้น ได้อีกด้วย

มีการทำลาย PTH น้อยกว่าปกติ

ปกติไตทำหน้าที่ทำลาย PTH เมื่อมีโรคไตวายเรื้อรัง จะมีการทำลาย PTH ลดลง ถ้ามีการกระตุ้นต่อม parathyroid ใน secondary hyperparathyroidism อยู่เป็นเวลานาน อาจเกิดเป็น autonomous function ของ ต่อม parathyroid เรียกภาวะนี้ว่า tertiary hyperparathyroidism

5.7.2 Carbohydrate intolerance

ภาวะ Carbohydrate intolerance เป็นผลมาจากภาวะ insulin resistance ร่วมกับ peripheral tissues ที่ใช้ glucose ลดลง นอกจากนี้ growth hormone หรือ glucagon ที่เพิ่มขึ้นในภาวะ uremia ก็ช่วยทำให้มี carbohydrate intolerance ได้เช่นกัน สามารถวินิจฉัยความผิดปกติดังกล่าวได้ โดยการทำ glucose tolerance test

5.7.3 ภาวะไขมันในเลือดสูง

มักเป็นชนิด type IV hyperlipidemia เกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การมี lipolytic enzyme activities ต่างๆ ลดลง เช่น lipoprotein lipase, lectithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), hepatic triglyceride lipase, ส่วนประกอบของ lipoprotein ผิดปกติ หรือมีความผิดปกติ ที่ receptor ภาวะ insulin resistance ฮอร์โมนอื่นๆ ที่มีมากผิดปกติ เช่น glucagon, PTH ทำให้มี triglyceride สูงขึ้น very low density liproprotein (VLDL) และ low density lipoprotein (LDL) สูงขึ้น high density lipoprotein (HDL) ลดลง สำหรับ total cholesterol มักปกติ นอกจากนี้ การมี glucose

metabolism ที่ผิดปกติ และอาหารประเภทแป้ง และไขมันที่สูงขึ้นจากการจำกัดอาหารโปรตีน ล้วนมีส่วนทำให้เกิดความผิดปกติของไขมันด้วย

6 การรักษาโรคไตวายเรื้อรังในระยะแรก

6.1 การรักษาโรคไตแบบดั้งเดิม

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการตรวจพบภาวะไตวายเรื้อรังในระยะแรกนั้นทำได้ยาก แต่ถ้าสามารถตรวจพบและรีบทำการรักษาผลการรักษาที่ได้จะดีกว่า การรักษาในขั้นต้นจะมุ่งไปที่ การควบคุมสาเหตุของโรคไต เช่น การควบคุมระดับน้ำตาลในผู้ป่วย diabetic nephropathy การแก้ไขภาวะ obstructive uropathy เป็นต้น

6.2 Pharmacologic therapy

Phosphate binders

ใช้เพื่อควบคุมฟอสเฟตในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ เพื่อช่วยชะลอการเสื่อมของไต ร่วมกับการควบคุมอาหารฟอสเฟต ยาที่มีคุณสมบัติเป็น phosphate binder มีหลายชนิด โดยออกฤทธิ์จับฟอสเฟตในลำไส้ ได้แก่ เกลือแคลเซียม เกลืออลูมินัม และเกลือแมกนีเซียม ชนิดของเกลืออลูมินัม เช่น aluminum hydroxide มีบทบาทค่อนข้างจำกัด เนื่องจาก ถ้าให้ในระยะยาวจะทำให้เกิด aluminum toxicity ได้ มีอาการที่สำคัญ คือ เกิด osteodystrophy และ encephalopathy เมื่อใช้เกลือแคลเซียมแล้วระดับฟอสเฟตของผู้ป่วยยังสูงอยู่ ควรเลือกใช้เกลืออลูมินัมเพื่อเสริมกับเกลือแคลเซียม หรือในกรณีที่ระดับฟอสเฟตในเลือดสูงมาก ถ้านำเกลือแคลเซียมมาใช้ก่อน แคลเซียมอาจถูกดูดซึมเข้าร่างกาย ทำให้ calcium phosphate product สูงขึ้น อาจเกิด calcium phosphate precipitation ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ก็ควรเลือกใช้เกลืออลูมินัมในระยะแรกก่อน เมื่อระดับฟอสเฟตในเลือดลดลงบ้างแล้ว จึงเปลี่ยนมาใช้เกลือแคลเซียมแทน ควรหลีกเลี่ยงยาชนิดเกลือแมกนีเซียม เพื่อป้องกันภาวะ hypermagnesemia เนื่องจากระดับแมกนีเซียมมีแนวโน้มที่จะสูงอยู่แล้วในโรคไตวายเรื้อรัง สำหรับเกลือแคลเซียมมีอยู่หลายชนิด เช่น calcium carbonate, calcium acetate, calcium gluconate และ calcium citrate ชนิดที่นิยมใช้มากที่สุดในประเทศไทย คือ calcium carbonate เนื่องจากมีคุณสมบัติจับฟอสเฟตได้ดี ราคาถูก ปรับขนาดยาตามระดับฟอสเฟตในเลือดและฟอสเฟตในอาหาร ควรรับประทานยาให้มี elemental calcium ไม่น้อยกว่า 1 กรัมต่อวัน (calcium carbonate 2.5 กรัม มี elemental calcium 1 กรัม) การใช้ยา calcium carbonate อาจทำให้เกิดภาวะ hypercalcemia ร่วมด้วย ซึ่งเป็นผลจากแคลเซียมถูกดูดซึมผ่านทางลำไส้ มักพบภาวะดังกล่าวในกรณีที่ได้รับ vitamin D ร่วมด้วย หรือได้รับ

การรักษาด้วยการฟอกเลือดร่วมด้วย การลดปริมาณแคลเซียมที่ถูกดูดซึมให้น้อยลงสามารถทำได้โดยการให้รับประทานยาพร้อมอาหาร ยาอีกชนิดหนึ่งที่เริ่มมีการนำใช้มากขึ้น คือ calcium acetate ซึ่งมีข้อดีคือ ฤทธิ์แรงกว่า calcium carbonate 2 เท่า และ แคลเซียมจากยาถูกดูดซึมกลับเข้าร่างกายน้อย แต่ปัจจุบันยังมีราคาแพง สำหรับ calcium citrate ไม่ควรใช้เพราะ ทำให้การดูดซึมอลูมินัมผ่านลำไส้มากขึ้น ซึ่งเป็นผลจาก citrate ไม่ควรลดระดับฟอสเฟตลงมาให้ต่ำกว่าปกติ เพราะจะทำให้เกิดปัญหา osteomalacia ได้

การใช้ยาลดความดันโลหิต

การควบคุมความดันโลหิตมีความสำคัญมากในการชะลอการเสื่อมของไต ปัจจุบันแนะนำให้พยายามควบคุมความดันโลหิตให้เท่ากับหรือต่ำกว่า 130/85 มม. ปรอท หรือ mean arterial pressure (MAP) เท่ากับ หรือต่ำกว่า 92 มม. ปรอท ยาที่มีคุณสมบัติช่วยชะลอการเสื่อมของไตได้โดยกลไกอื่น ๆ นอกเหนือจากการลดความดันโลหิต และเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ

1) Angiotensin coverting enzyme inhibitors (ACE-Inhibitors)

การศึกษาในสัตว์ทดลองและในคนพบว่า ACE-Inhibitors มีกลไกอื่น ๆ นอกเหนือจากฤทธิ์ลดความดันโลหิตที่ช่วยในการชะลอการเสื่อมของไต ได้แก่ ลดลงของ intraglomerular pressure, glomerular hypertrophy, mesangial cell proliferation, mesangial uptake ของ macromolecule และ matrix expansion, antiinflammation, ลดplatelet aggregation นอกจากนี้ยังเป็น oxygen radical scavenger และลดโปรตีนในปัสสาวะ ปัจจุบันมีข้อมูลการศึกษามากพอที่จะสรุปว่า ACE-Inhibitors สามารถลดโปรตีนในปัสสาวะ และชะลอการเสื่อมของไตได้ในโรคไตวายเรื้อรังจากเบาหวานทั้งชนิด IDDM และ NIDDMทั้งชนิดที่มีความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง และในโรคไตวายเรื้อรังที่ไม่ได้เกิดจากเบาหวาน ACE-Inhibitors ก็สามารถลดโปรตีนในปัสสาวะ และชะลอการเสื่อมของไตได้เช่นกัน ยกเว้นในโรค polycystic kidney disease ชนิด ADPKD พบว่าไม่ได้ผล

ผลข้างเคียงที่พบบ่อยในยากลุ่มนี้คือ อาการไอซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 30, azotemia และ hyperkalemia มักพบ azotemia ในกรณีที่ร่างกายขาดน้ำ ขาดโซเดียมจากการจำกัดเกลือ หรือจากการใช้ยาขับปัสสาวะหรือมีภาวะหัวใจวายร่วมด้วย จึงควรเริ่มยาขนาดต่ำ ๆ ก่อนและติดตามดูค่าโปแตสเซียม และซีรั่ม creatinine ทุกสัปดาห์ในระยะ 2 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นติดตามเดือนละ 1 ครั้ง ถ้าระดับโปแตสซียมในเลือด หรือ ซีรั่ม cratinine เพิ่มขึ้นโดยไม่พบสาเหตุอื่นมาอธิบายได้ก็ควรหยุดยา และใช้ยาลดความดันโลหิตกลุ่มอื่นแทนยาในกลุ่มนี้มีหลายชนิด แต่เชื่อว่าผลดังกล่าวเป็น class effect ซึ่งมีในยาทุกตัวมากกว่า จึงควรเลือกใช้ยาจากคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น ระยะเวลาการออก

ฤทธิ์ กลไกการขับถ่ายยาออกจากร่างกายมากกว่า ควรหลีกเลี่ยง (แต่ไม่ได้ห้ามเด็ดขาด) การใช้ยา ACE-Inhibitors ถ้าซีรั่ม cratinine มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

2) Calcium channel blockers

เป็นยาอีกกลุ่มที่มีกลไกอื่น ๆ ช่วยในการชะลอการเสื่อมของไตนอกเหนือจากฤทธิ์ลดความดันโลหิตเช่นกัน กลไกเหล่านี้ ได้แก่ การลดลงของ glomerular hypertrophy, tubular adaptive hypermetabolism, uremic nephrocalcinosis, mitogenic effect ของ growth factors ต่าง ๆ เช่น platelet activating factor (PAF), platelet derived growth factor (PDGF), การสร้าง reactive oxygen species (ROS), mesangial uptake ของ macromolecule, แคลเซียมในเซลล์ซึ่งเป็นตัวทำให้ cellular function เลวลง, และลดโปรตีนในปัสสาวะ ยังมีการศึกษาในคนค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับใช้ยากลุ่มนี้ในโรคไตวายเรื้อรัง แต่ถ้ามองในแง่กลไกการออกฤทธิ์แล้ว ยากลุ่มนี้น่าจะมีประโยชน์ในการรักษาโรคไตวายเรื้อรัง ข้อดีของยากลุ่มนี้ คือ ใช้ได้ในโรคไตวายทุกระยะ และไม่ทำให้เกิดปัญหาโปแตสเซียมในเลือดสูง ผลข้างเคียงที่พบได้แก่ บวม เวียนศีรษะ ใจสั่นจากการขยายตัวของหลอดเลือดอย่างรวดเร็ว แพ้ยา เป็นต้น ควรหลีกเลี่ยงการใช้ short-acting calcium antagonist (เช่น nefedepine) ในผู้ป่วยที่มีโรคหลอดเลือดหัวใจ หรือโรค myocardial ischemia ร่วมด้วย เพราะ ภาวะ reflex tachycardia ที่เกิดขึ้นภายหลังผู้ป่วยได้รับยา short-acting calcium antagonist ดังกล่าว อาจรุนแรงจนกระตุ้นให้เกิด cardiac arrhythmia ได้

อาจใช้ยาลดความดันโลหิตกลุ่มอื่นได้เช่นกัน ควรหลีกเลี่ยงยากลุ่ม beta blocker เพราะอาจทำให้ renal vascular resistance สูงขึ้นและเกิดภาวะโปแตสเซียมในเลือดสูง ยกเว้นในกรณีอื่น เช่น มีโรคหลอดเลือดหัวใจตีบร่วมด้วย ยากลุ่ม vasodilator เช่น minoxidil, hydralazine อาจทำให้เกิดการคั่งของเกลือและน้ำ ยาขับปัสสาวะ อาจทำให้เกิดภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ ซึ่งจะทำให้มี intracellular acidosis ซึ่งมีผลเสียต่อการทำงานของไตในระยะยาว

3) Alkali therapy

มีประโยชน์ในการแก้ไขภาวะ metabolic acidosis ซึ่งมีผลเสียต่อร่างกายหลายประการดังได้กล่าวมาแล้ว ควรรักษาระดับไบคาร์บอเนตในเลือดให้อยู่ในระดับ ไม่ต่ำกว่า 22 มิลลิโมลต่อลิตร โดยใช้ยา sodium bicarbonate ซึ่งอาจต้องใช้ขนาดสูงถึง 5-7 กรัมต่อวัน (sodium bicarbonate 300 มิลลิกรัม มี bicarbonate 3.5 มิลลิโมล) ผลข้างเคียงจากการใช้ยาขนาดสูง คือ การได้รับโซเดียมมาก อาจมีอันตรายได้ โดยเฉพาะในกรณีที่มีหัวใจวายร่วมด้วย

4) Antiplatelets and anticoagulants

Platelet เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของไตในหลายๆ ด้าน ได้แก่ การเกิด microthrombosis และตัว platelet เองสามารถสร้าง growth factors ต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ

เสื่อมของไต เช่น PDGF จึงมีการนำ antiplatelets มาใช้ในการรักษาโรคไตวายเรื้อรังทั้งที่เกิดจากเบาหวานและโรคไตชนิด glomerulonephritis นอกจาก anticoagulants ช่วยป้องกัน microthrombosis แล้วยังมีฤทธิ์อื่นด้วย เช่น heparin สามารถลดการแบ่งตัวของ mesangial cell และช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ membrane charge selectivity อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปว่าการใช้ antiplatelets และ anticoagulant ช่วยชะลอการเสื่อมของไตได้ชัดเจน จึงควรพิจารณาใช้เป็นการรักษาเสริมเท่านั้น

5) Fish oil

ประกอบด้วย omega -3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) ปริมาณสูง 2 ชนิด คือ eiscosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexanoic acid (DHA) fish oil มีผลต่อร่างกายหลายประการ มีผลต่อ arachidonic metabolism คือ เพิ่มการสร้าง prostagladin "3" series เพิ่มการสร้าง PGI_2 และลดการสร้าง thromboxane A_2 ลด platelet aggregation ลดไขมันในเลือด ลดการอักเสบ ลด viscosity ของเลือด และเพิ่ม deformability ของเม็ดเลือดแดง มีการนำมาใช้รักษาโรคไตชนิด glomerulonephritis แต่การรักษาส่วนใหญ่ยังเป็นระยะสั้น ประชากรกลุ่มเล็กและผลที่ได้ไม่แน่นอน ใน IgA nephropathy มีทั้งรายงานว่าได้ประโยชน์และไม่ได้ประโยชน์ การศึกษาล่าสุดใน IgA nephropathy randomized study ติดตามไป 2 ปี พบว่าสามารถลดโปรตีนในปัสสาวะและชะลอการเสื่อมของไตได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ในการรักษาหลังผ่าตัดเปลี่ยนไต พบว่าทำให้การทำงานของไตดีขึ้น อย่างไรก็ตาม คงต้องรอการศึกษาถึงผลของ fish oil ในโรคไตวายเรื้อรังในระยะยาวในโรคต่าง ๆ ต่อไป

6) **ยาลดไขมัน**

ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจนในโรคไตวายเรื้อรัง แต่แนวโน้มในปัจจุบันมีการนำมาใช้มากขึ้น เพราะมีข้อมูลสนับสนุนว่าไขมันในเลือดสูงเกี่ยวข้องกับการเสื่อมของไต ยาที่ค่อนข้างปลอดภัยคือยากลุ่ม HMG CoA reductase inhibior แต่มีราคาแพง ถ้าจะใช้ยากลุ่มอื่นต้องระวังผลข้างเคียง เช่น ยากลุ่ม fibric acid derivatives อาจทำให้เกิด myopathy ได้ การลดไขมันในเลือดจึงควรเริ่มด้วยการควบคุมอาหารให้ถูกต้องก่อน

7.การรักษาโรคไตวายเรื้อรังในระยะรุนแรงและระยะสุดท้าย

การรักษาโรคไตวายเรื้อรังในระยะนี้ การชะลอการเสื่อมของไตมักจะไม่ได้ผล อย่างไรก็ตามควรพยายามนำการรักษาวิธีต่าง ๆ มาใช้อย่างเต็มที่เพื่อชะลอการเสื่อมของไต โรคมักจะดำเนินต่อไปตามธรรมชาติของโรคแต่ละชนิด เมื่อ GFR น้อยกว่า 10 มิลลิลิตรต่อนาที จะเป็นไตวายระยะสุดท้าย การรักษาด้วยยาอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะแก้ไขความผิดปกติที่เกิดจากโรคไตวายระยะนี้ได้

จำเป็นต้องให้การรักษาอย่างอื่นร่วมด้วย การรักษาที่นำมาใช้ในโรคไตวายระยะสุดท้ายเรียกว่า การบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy) ซึ่งมี 3 วิธีคือ

1. การปลูกถ่ายไต (renal transplantation)
2. การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis)
3. การล้างไตทางช่องท้อง ซึ่งที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)

ในที่นี้จะกล่าวถึงการรักษาด้วยวิธี hemodialysis เป็นหลัก

7.1 ข้อบ่งชี้ของการทำ Hemodialysis

โดยทั่วไปการทำ hemodialysis ในโรคไตวายอาศัยข้อบ่งชี้ดังต่อไปนี้ คือ

1. มีระดับของเสียในเลือดสูง คือ ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่ไม่ได้เกิดจากเบาหวานที่มีระดับ BUN มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และซีรั่ม creatinine มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ GFR น้อยกว่า 10 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังจากเบาหวานควรพิจารณาทำ dialysis เร็วขึ้น คือ เมื่อ GFR น้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาที เพราะโรคมี metabolic complications สูงกว่า และมีการดำเนินโรคเร็วกว่าโรคไตวายจากสาเหตุอื่น

2. มีภาวะน้ำเกินในร่างกาย ซึ่งทำการรักษาด้วยยาแล้วไม่ได้ผล เช่น มีภาวะหัวใจวาย โดยเฉพาะภาวะน้ำท่วมปอด (acute pulmonary edema)

3. มีภาวะ hyperkalemia ซึ่งให้การรักษาทางยาแล้วไม่ได้ผล เช่น ให้ ion-exchange resin หรือให้กลูโคสและอินซูลินแล้วไม่ได้ผล

4. มีภาวะ metabolic acidosis ซึ่งให้การรักษาด้วย alkali therapy ไม่ได้ผล หรือไม่สามารถให้ alkali therapy ได้ เช่น มีภาวะ metabolic acidosis ร่วมกับภาวะหัวใจวาย ทำให้ไม่สามารถให้ sodium bicarbonate ได้ เนื่องจากจะทำให้ภาวะหัวใจวายเลวลงจากการได้รับโซเดียม

5. มีภาวะแทรกซ้อนของ uremia เช่น encephalopathy, pericarditis, pleuritis, bleeding diathesis

6. Relative indication คือ มีภาวะ malnutrition ทั้ง ๆ ที่ได้รับการรักษาด้วยยาอย่างเต็มที่ โดยอาจดูได้จาก เบื่ออาหารรุนแรง น้ำหนักตัวลดลง ระดับอัลบูมิน หรือ transferrin ในเลือดต่ำลง นอกจากนี้ อาจต้องพิจารณาทำ hemodialysis ในกรณีที่คุณภาพชีวิตเลวลง ซึ่งอาจเกิดจากอาการอ่อนเพลีย ง่วงนอน กล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการคันรุนแรง ถึงแม้จะได้รับการรักษาด้วยยาแล้ว

ข้อบ่งชี้ดังกล่าวใช้ได้ทั้งในโรคไตวายเฉียบพลันและเรื้อรัง สำหรับโรคไตเฉียบพลันอาจมีข้อบ่งชี้ที่แตกต่างไปบ้าง ดังนี้

1. ระดับ BUN และซีรั่ม creatinine ในบางโรคอาจไม่ต้องรอให้ระดับสูงเกิน 100 และ 10 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีกว่า ไตวายเฉียบพลันในบางโรคมักมีการดำเนินของโรคที่รุนแรง หรือ มีภาวะ hypercatabolic state ร่วมด้วย เช่นไตวายเฉียบพลันจากโรคมาเลเรีย, ไตวายเฉียบพลันจาก crush injury จึงพิจารณาทำ hemodialysis เร็ว เพื่อให้การรักษาโรคได้ผลดี

2. ในกรณีที่ได้รับสารพิษ หรือยาเกินขนาดและสารพิษ หรือยานั้นสามารถกำจัดออกจากร่างกายโดยวิธี hemodialysis เช่น ได้รับยา barbiturate เกินขนาด, ได้รับ methanol เป็นต้น

3. ข้อบ่งชี้อื่น ๆ ได้แก่ ภาวะกรดยูริคในเลือดสูง ภาวะ hypercalcemia ภาวะโซเดียมในเลือดผิดปกติอย่างรุนแรงที่มีอาการผิดปกติร่วมด้วย

ในโรคไตวายเรื้อรัง นอกจากอาศัยข้อบ่งชี้ดังกล่าวมาประกอบการพิจารณาทำ hemodialysis ในระยะยาว (chronic hemodialysis) แล้ว ยังต้องประเมินด้านอื่นของผู้ป่วยด้วยว่ามีความเหมาะสมสำหรับการทำ chronic hemodialysis หรือไม่

การประเมินความเหมาะสมสำหรับการทำ Chronic Hemodialysis

การรักษาด้วยวิธี Chronic hemodialysis มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ คือ ต้องการให้ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีคุณภาพชีวิต (quality of life) ดีขึ้น การรักษาดังกล่าวจำเป็นต้องกระทำอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ จึงควรประเมินความพร้อมในด้านต่างๆ นอกเหนือจากข้อบ่งชี้ทางการแพทย์ดังกล่าว

การประเมินสภาพร่างกาย

การทำ chronic hemodialysis อาจมีภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้นได้ จึงควรพิจารณาความพร้อมทางด้านร่างกายก่อนทำ chronic hemodialysis อาจทำได้ง่าย ๆ คือ ประเมินว่ามีข้อห้ามของการทำ hemodialysis หรือไม่ และประเมินความเจ็บป่วยร่วมอื่น ๆ ที่มี เพื่อพิจารณาว่าเมื่อผู้ป่วยได้รับการทำ hemodialysis แล้วจะทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นหรือไม่

ข้อห้ามของการทำ hemodialysis

ไม่มีข้อห้ามสมบูรณ์แบบ (absolute contraindication) สำหรับ hemodialysis แต่มีข้อห้ามสัมพัทธ์ (relative contraindication) ดังแสดงในตารางที่ 1 การทำ hemodialysis ไม่สามารถทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยตามดีขึ้นได้ จึงควรพิจารณาการรับผู้ป่วยดังกล่าวอย่างรอบคอบก่อนเข้าทำ hemodialysis ในกรณีที่ผู้ป่วยมีโรคหัวใจขั้นรุนแรง (severe cardiac disease) จะเกิดภาวะแทรกซ้อนระหว่างทำ hemodialysis ได้ง่าย เนื่องจากขณะที่ใช้เครื่อง hemodialysis จะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน hemodynamics อย่างมาก และภาวะแทรกซ้อนอาจมีอันตรายถึงชีวิต ถ้า

จำเป็นต้องทำ dialysis ในกรณีดังกล่าว ควรพิจารณาการรักษาแบบอื่นแทน เช่น chronic ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) เป็นต้น ผู้ป่วย extensive peripheral vascular disease มักมีปัญหา vascular access จึงควรพิจารณา dialysis แบบอื่น เช่น CAPD มาทดแทนเช่นกัน นอกจากการดูว่ามี contraindication ของการทำ hemodialysis แล้ว การประเมินความเจ็บป่วยร่วมอื่น ๆ ที่มีผลต่อคุณภาพชีวิต ก็มีความสำคัญมากเช่นกัน เพราะวัตถุประสค์สำคัญของการทำ hemodialysis คือ ต้องการให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น ถ้าผู้ป่วยมีโรคอื่นร่วมด้วยที่มีผลต่อคุณภาพชีวิตอย่างมาก เช่นผู้ป่วยที่ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้เป็นระยะเวลานานจากโรคหลอดเลือดในสมอง ผู้ป่วยที่มีโรคถุงลมปอดโป่งพองชนิดรุนแรง เป็นต้น คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเหล่านี้ถูกจำกัดด้วยโรคของผู้ป่วยเอง การทำ hemodialysis ไม่สามารถทำให้คุณภาพชีวิตดีขึ้นได้ จึงควรพิจารณาอย่างรอบคอบ โดยเฉพาะถ้ามองในแง่ปัญหาทางเศรษฐกิจที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมากสำหรับประเทศไทย ควรแนะนำให้ญาติเข้าใจว่า ถึงแม้จะได้รับการทำ hemodialysis ก็ไม่ได้เปลี่ยนให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้น ถ้าสามารถให้เข้าใจและยอมรับได้น่าจะเป็นสิ่งที่ดี

ประเมินสภาพจิต

ผู้ป่วยควรได้รับการประเมินสภาพทางจิตว่าเข้าใจและสามารถรับการรักษาได้สม่ำเสมอ เนื่องจากการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวอาจทำให้เกิดความเครียดหรืออาการซึมเศร้าได้ เพราะต้องมาทำการรักษาในโรงพยาบาล หรือสถานที่ซึ่งรับทำการฟอกเลือด นานครั้งละ 4 - 5 ชั่วโมง สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง และยังต้องถูกแทงเข็มสำหรับฟอกเลือด หรืออาจมีภาวะแทรกซ้อนระหว่างทำ และหลังทำได้ ผู้ป่วยจึงควรได้รับคำอธิบายถึงขั้นตอนการทำ ข้อดีและข้อเสียของการรักษาด้วยวิธีนี้อย่าละเอียด ไม่ควรรับผู้ป่วยเข้าทำ chronic hemodialysis เพียงเพราะญาติต้องการให้ทำ แต่ผู้ป่วยไม่เข้าใจหรือยังไม่ยอมรับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดง relative contraindication สำหรับการทำ hemodialysis

1. Alziemer's disease
2. Multiinfarct dementia
3. Advanced cirrhosis with encephalopathy
4. Advanced malignancy
5. Severe cardiac disease
6. Extensive peripheral vascular disease

การประเมินเรื่องเศรษฐานะ

ยังถือเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการทำ chronic hemodialysis ในประเทศไทย เนื่องจากผู้ป่วยหรือครอบครัวผู้ป่วยในบ้านเราต้องรับภาระค่าใช้จ่ายการรักษาด้วยวิธี chronic hemodialysis เอง ทางรัฐไม่ได้รับเป็นภาระในส่วนนี้ ประกอบกับการรักษาด้วยวิธีนี้ยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในราคาสูง ตัวอย่างเช่น ในกรณีที่ต้องทำ hemodialysis สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ค่าใช้จ่ายจะตกประมาณเดือนละ 20,000 - 30,000 บาท ซึ่งนับว่าเป็นค่าใช้จ่ายที่สูง เนื่องจากต้องทำการรักษาไปตลอด อาจจะหลายๆ ปี หรือจนกว่าผู้ป่วยจะได้รับการปลูกถ่ายไต ก่อนรับผู้ป่วยเข้าทำการรักษาด้วย chronic hemodialysis ต้องคำนึงถึงเรื่องนี้ ถ้าผู้ป่วยหรือครอบครัวไม่สามารถรับภาระค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ได้ ซึ่งจะทำให้การรักษาไม่ต่อเนื่อง การรักษาก็จะไม่มีประโยชน์ เพราะคุณภาพชีวิตจะไม่ดีขึ้น หรือถ้าการรักษาจะทำให้ครอบครัวต้องเดือดร้อนเป็นภาระหนี้สิน ควรแนะนำให้ญาติและผู้ป่วยเข้าใจว่าการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวจะไม่เกิดประโยชน์ในระยะยาว แต่กลับมีผลเสียต่างๆ ตามมา

คำแนะนำสำหรับผู้ป่วยและญาติโรคไตวายเรื้อรังที่ต้องการการบำบัดทดแทนไตร่วมด้วย

ในการดูแลรักษาโรคไตวายเรื้อรังเมื่อโรคลุกลามมากขึ้น จนในที่สุดเข้าสู่ระยะสุดท้าย การรักษาด้วยยาอย่างเดียวจะไม่เพียงพอ จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไตร่วมด้วย แพทย์ผู้ให้การรักษาควรเริ่มให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วยและญาติแต่เนิ่น ๆ ถึงการบำบัดทดแทนไตที่เหมาะสม เพื่อให้ผู้ป่วยและญาติมีเวลาไตร่ตรองเกี่ยวกับการรักษาดังกล่าว คำแนะนำผู้ป่วยและญาติสำหรับการบำบัดทดแทนไตควรประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. เหตุผลหรือความจำเป็นที่ต้องใช้การบำบัดทดแทนไตร่วมด้วย
2. ชนิดต่าง ๆ ของการบำบัดทดแทนไต

3. ข้อดีข้อเสียของการบำบัดทดแทนไตชนิดต่าง ๆ เช่น ประโยชน์ที่จะได้รับ คุณภาพชีวิตดีขึ้นอย่างไรการดูแลรักษาที่เปลี่ยนไป เมื่อได้รับการบำบัดทดแทนไตร่วมด้วย ภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้รวมถึงค่าใช้จ่ายในการรักษา
4. การบำบัดทดแทนไตที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยแต่ละราย
5. ขั้นตอนต่าง ๆ และ การเตรียมตัวล่วงหน้าสำหรับการบำบัดทดแทนไต ที่จะใช้ เช่น ถ้าจะทำ hemodialysis ต้องมีการเตรียม vascular access ล่วงหน้า
6. เวลาที่เหมาะสมในการเริ่มการบำบัดทดแทนไต

การเสื่อมหน้าที่ของไต เป็นลักษณะที่พบร่วมที่พบในโรคไตทุกชนิด[2] อาจมีความแตกต่างกันบ้างในแง่ของอัตราเร็วของการสูญเสียหน้าที่ เช่นโรคโกลเมอรูลัสโดยเฉพาะ กลุ่ม crescentic glomerulonephritis จะพบการสูญเสียหน้าที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมากจนเข้าสู่ภาวะไตวายขั้นสุดท้ายได้ในระยะเวลาเป็นเดือน โรคไตจากเบาหวานจะมีการสูญเสียหน้าที่ของไตช้ากว่าประมาณว่าค่า GFR ในโรคไตจากเบาหวานนี้จะลดลงประมาณ 1 มล.ต่อเดือน ถึงแม้ว่าอัตรานี้จะช้ากว่า crescentic glomerulonephitis ก็ตามแต่ก็ยังถือว่าเร็วเมื่อเทียบกับโรคไตกลุ่ม tubulointerstitial nephritis ถึงแม้ว่าการเสื่อมหน้าที่ของไตนี้จะเกิดขึ้นกับโรคไตทุกชนิดโดยไม่ขึ้นกับสาเหตุตั้งต้นก็ตาม แต่การที่พบว่าอัตราการเสื่อมนั้นแตกต่างกันจึงน่าที่จะมีความสัมพันธ์บางประการระหว่างโรคที่เป็นสาเหตุตั้งต้นและอัตราการเสื่อม การศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อไตที่เกิดภาวะ chronic renal failure และ end stage renal disease จะพบลักษณะร่วมที่สำคัญคือการเกิด interstitial fibrosis พบว่าปริมาณของ interstitial fibrosis ที่เกิดขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์ผกผันกับการทำงานของไต กล่าวได้ว่าเมื่อ interstitial fibrosis เกิดขึ้นมากการทำงานจะเสื่อมไปมาก นอกจากนั้นดูเหมือนว่าปริมาณ fibrosis ที่ส่วน interstitium นี้ยังสามารถทำนายการเสื่อมหน้าที่ของไตในอนาคตได้เป็นอย่างดี ซึ่งเป็นข้อแสดงว่า interstitial fibrosis นั้นเป็นสาเหตุมากกว่าที่จะเป็นเพียงพยาธิสภาพร่วมขั้นสุดท้ายของไต ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อที่จะเข้าใจถึงกลไกและกระบวนการการเกิด fibrosis ที่บริเวณ interstitium รวมทั้งหาวิธีการที่จะลดหรือชะลอการเกิด fibrosis โดยมีความมุ่งหวังที่จะรักษาโรคไตวายเรื้อรังให้ได้ ซึ่งเข้าใจว่าในการเสื่อมหน้าที่ของไตนั้นพยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องคือ tubulointerstitial fibrosis แต่โดยกระบวนการการเกิด fibrosis นั้นมักจะมีลักษณะร่วมที่สำคัญๆคล้ายๆกันไม่ว่าจะเกิดที่ใด เช่น pulmonary fibrosis ก็มีความคล้ายคลึงกันกับ wounded fibrosis ดังนั้นความรู้ที่ได้ส่วนหนึ่งจึงมาจากแบบจำลองนอกไตซึ่งจะมีข้อได้เปรียบบางประการเช่นสังเกตและติดตามได้ง่ายกว่า

ถ้าพิจารณาจากโครงสร้างของไตจะพบส่วนที่เป็น interstituim คิดเป็นเนื้อที่มากกว่าร้อยละ 85 ของเนื้อไตทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่น่าประหลาดใจว่าการเกิด fibrosis ของเนื้อไตส่วนนี้จึงมีผลกระทบ

ต่อหน้าที่การทำงานของไตอย่างรุนแรง เป็นเวลานานกว่า 25 ปี ที่นักวิทยาสาสตร์ได้ให้ความสนใจต่อการเกิด tubulointerstitial fibrosis และความสัมพันธ์ต่อการเกิด progression of renal disease ดังนั้นข้อมูลของ tubulointerstitial fibrosis นั้นจึงมีมิติที่หลายหลากมาก ในระยะแรกความสนใจมุ่งไปที่ กลไกของการเกิด progression ของ renal disease มากกว่าการเกิด fibrosis และการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของทั้งสองยังไม่ชัดเจนเท่าใดนัก รวมทั้งความก้าวหน้าของอณูชีววิทยาก็ยังอยู่ในระยะเริ่มต้น สมมุติฐานและทฤษฎีที่ตั้งขึ้นในช่วงนั้นจึงจำกัดขอบเขตความสนใจอยู่ที่การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เช่นภาวะ hyperperfusion/hyperfiltration ผลกระทบจากการกินโปรตีน ภาวะความเป็นพิษจากกรด แอมโมเนีย เป็นต้น ซึ่งแนวความคิดที่เป็นรากฐานและนำสู่การรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ การพยายามลดการเกิดด้วยจำกัดอาหารโปรตีน

ช่วงคริสต์ทศวรรษ 70 ความสัมพันธ์ระหว่าง tubulointerstitial fibrosis และการ progression ของโรคไตจึงเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป การศึกษาในช่วงเวลานี้จึงนิยมให้ความสำคัญกับการเกิด fibrosis ขึ้น สิ่งที่น่าสนใจที่พบในช่วงนี้คือยาลดความดันโลหิตกลุ่ม ACEI ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบ renin และ angiotensin ซึ่งมีผลต่อ renal hemodynamic ด้วย พบว่ายากลุ่มนี้สามารถลดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ลดความดันในโกลเมอรูลัส ได้เด่นกว่าการลดความดันโลหิต ถึงแม้ยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่มากว่า ACEI นั้นมีความเหนือกว่ายาลดความดันโลหิตอื่นหรือไม่ แต่การศึกษาในระยะเวลาต่อมาพบว่า angiotensin นั้นมีบทบาทมากในการควบคุมการเกิด fibrosis ในระดับเซลล์

การศึกษากระบวนการเกิด fibrosis ของไตและการเกิดการเสื่อมทางหน้าที่ของไตนั้นเริ่มมีผู้ให้ความสนใจมาตั้งแต่ช่วงต้นของคริสต์ทศวรรษที่ 70

การควบคุม wound healing และ การเกิด fibrosis

Fibrosis นั้นเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเกิด wound healing ทางพยาธิวิทยานั้นแบ่ง healing เป็นช่วงต่างๆ ได้ดังนี้ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วกระบวนการทั้งหมดนั้นเกิดขึ้นต่อเนื่องกันและมีการเหลื่อมล้ำกันตลอดเวลา

1. Induction phase ขั้นตอนนี้จะเกิดทันทีหลังจากที่มีอันตรายต่อเนื้อไต เนื้อเยื่อส่วนที่ได้รับอันตรายจะสร้างสารกลุ่ม chemokine ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้ามาชุมนุม ณ.บริเวณที่เกิดอันตราย เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เข้ามาในระยะแรกมักเป็นกลุ่ม innate immunity ซึ่งได้แก่ PMN และ NK cell ระยะถัดมาจึงมีเซลล์ mononuclear cell, macrophage และ lymphocyte เข้ามา แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ท่อไตและระหว่างเซลล์ท่อไตกับ tubular basement membrane ได้บ่อยๆ เรียกลักษณะนี้ว่า tubulitis macrophage และ mononuclear cell ที่ infiltrate เข้ามายังส่วน interstitium นี้จะสร้าง cytokine หลายชนิดด้วยกันซึ่งมีบทบาททั้งกระตุ้นให้เกิด กระบวนการอักเสบดังเช่น TNF

(tumor necrotic factor) หรือกระตุ้นให้มีการ fibrosis เช่น TGF เป็นต้น cytokine ที่มีบทบาทชัดเจนในระยะนี้ได้แก่

MCP (monocyte chemoatractant protein) เป็นสารกลุ่ม chemokine ซึ่งหมายถึง สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวมีการเคลื่อนที่เข้ามา (chemoattractant) MCP มีความจำเพาะในการกระตุ้น monocyte และ macrophage สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่น สามารถพบการเพิ่มขึ้นของ MCP1 ได้ในภาวะ nephrotic ที่เหนี่ยวนำให้เกิด puromicin ด้วย

บทบาทของ Renal fibroblast ขั้นตอนการเกิด fibrosis เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือเซลล์ fibroblast ที่บริเวณ interstitium ซึ่งมีความแตกต่างกับ fibroblast ทั่วไปอยู่หลายประการ ที่สำคัญคือ ตรวจพบ smooth muscle actin ใน cytoplasm ซึ่งปกติจะพบในเซลล์ vascular smooth muscle เท่านั้น เรียก fibroblast ที่มีลักษณะพิเศษนี้ว่า myofibroblast ในภาวะปกติเนื้อไตจะพบเซลล์กลุ่ม fibroblast เป็นปริมาณน้อยมาก เดิมทีเชื่อว่าภายหลังจากกระบวนการ inflammation เซลล์เม็ดเลือดขาวส่วนหนึ่งจะเปลี่ยนเป็น fibroblast หรือกล่าวว่าต้นกำเนิดของ เซลล์กลุ่มนี้มาจากไขกระดูก (bone marrow) แต่ในปัจจุบันจากการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองพบว่าเซลล์ที่เป็นต้นกำเนิดนั้นน่าจะเป็นเซลล์ท่อไตซึ่งเป็นเซลล์ epithelium เมื่อเกิดอันตรายต่อเซลล์เหล่านี้จะทำให้ tubular cell เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายไปเป็นเซลล์ myofibroblast เรียกกระบวนการนี้ว่า tubular cell transdifferentiation ซึ่งเป็นกระบวนการหลักในระดับเซลล์ของการเกิด fibrosis ในการเกิด fibrosis ที่ตับนั้นก็จะพบเหตุการณ์ที่คล้ายคลึงกันโดยเซลล์ Ito (lipocyte) ซึ่งทำหน้าที่ในการเก็บ vitamin A จะหยุดการเก็บ vitamin A และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ไปเป็น myofibroblast เช่นกัน และ resident fibroblast มีบทบาทในการเกิด fibrosis น้อยมาก แต่ในทางกลับกันที่ปอดซึ่งเป็นอวัยวะที่มีปริมาณ fibroblast สูงยังไม่พบว่ามีเซลล์จำเพาะชนิดใดที่มีบทบาทในการเกิด transdifferentiation ขณะนี้จึงเชื่อว่า resident fibroblast ของปอดน่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของ myofibroblast

Myofibroblast มีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการกล่าวคือสามารถสร้าง fibrosin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ mesenchyme เกิดการแบ่งตัว (mitosis) fibroblast ได้สูงกว่า resting fibroblast ในเนื้อไตปกติ และยังพบว่า myofibroblast นั้นสามารถต้านทานฤทธิ์ antiproliferative จาก mitomicin C ได้สูงกว่าเซลล์ทั่วไป มีการ incorporate ของ 3_H proline สูง ซึ่งแสดงถึงการสร้างโครโมโซมขึ้นใหม่ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ทั่วไป จากการศึกษาวัดปริมาณ collagen ที่สร้างโดย myofibroblast มีค่าสูงกว่า fibroblast ทั่วไปถึง 5เท่า

เนื่องจากการ transdifferentiation ของจาก renal tubule นั้นเป็นการเปลี่ยนจาก epithelium ไปสู่ myofibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด mesenchyme บางครั้งจึงนิยมเรียกว่า "Epithelial-Mesenchymal cell Transformation" โดย tubular cell จะมีการสูญเสียโครงสร้างของ epithelial เซลล์ และเสียความเป็น polarity ด้วย แต่อย่างไรก็ดีในกระบวนการ development ของไตถือว่าเนื้อเยื่อของไตนั้นสร้างมาจากเนื้อเยื่อ mesenchymal ซึ่งกำเนิดมาจาก mesoderm ดังนั้นการ transformation ที่เกิดจึงไม่ถือว่าเป็นการเปลี่ยนข้าม cell line

TGFβ และ renal fibrosis [3]

กระบวนการการเกิด fibrosis ในเนื้อไตนั้นเป็นสาเหตุของการสูญเสียหน้าที่ของไต ซึ่งนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังและไตวายเรื้อรังขั้นสุดท้าย การยับยั้งการเกิด fibrosis จึงเป็นความหวังของแพทย์โรคไตที่จะรักษาโรคไตวายเรื้อรัง ความรู้จากความก้าวหน้าด้านอณูชีววิทยาในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่ากระบวนการเกิด fibrosis ในไตนั้นเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน มี cytokine และ growth factor จำนวนมากเข้ามาเกี่ยวข้อง transforming growth factor (TGF) นั้นเป็น growth factor ที่มีบทบาทมากที่สุดและมีการศึกษามากที่สุดในการเกิด fibrosis จะเห็นว่า TGF ถูกนำเข้าไปเกี่ยวข้องในกระบวนพยาธิวิทยาการกำเนิดในโรคไตเกือบทุกโรค ไม่ว่าจะเป็น โรคไตจากเบาหวาน โรคไตวายเรื้อรัง โรคไต glomerular โรคถุงน้ำไต หรือภาวะไตเสื่อมหลังปลูกถ่ายไตเป็นต้น ในระยะเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมามีการตีพิมพ์งานวิจัย (original article) และการรวบรวมรายงานวิจัย (review) จำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับ TGF และการเกิด fibrosis ในไต ดังนั้นในบทความนี้จึงมุ่งที่จะเสนอความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวกับ TGF โดยจะให้ความสำคัญกับการเกิด fibrosis เป็นหลัก

TGF นั้นถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1981จัดเป็น cytokine ที่มีคุณสมบัติเป็น growth factor สำหรับเซลล์ fibroblast และเซลล์ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อ mesenchyme บางชนิด ขณะที่เป็น pro-apoptotic factor สำหรับเซลล์บางชนิดเช่น epithelium และ lymphocyte TGF นั้นถูกจัดอยู่ในตระกูล TGF superfamily สมาชิกอื่นใน superfamily นี้ที่ถูกกล่าวถึงบ่อยๆในการเกิดโรคไตคือ BMP ปัจจุบันเราพบ TGF ทั้งหมด 5 isoform ด้วยกัน เพียง 3 isoform เท่านั้นที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ TGFβ_1,TGFβ_2,TGFβ_3 ถึงแม้ว่าแต่ละ isoform นั้นสร้างมาจากยีนที่แตกต่างกัน แต่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ โดยแต่ละ isoform นั้นมีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 70-80 ของโครงสร้างสายอะมิโน ในสาม isoform นี้ TGFβ_1 เป็นตัวที่มีการศึกษามากที่สุด มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมดัง เช่น TGFβ_1 ของคนและหนูมีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ของโครงสร้าง

โครงสร้างของ TGF

ในขั้นตอนการสร้าง TGF นั้นจะเริ่มจากการสร้าง transcript โปรตีนตั้งต้น (precursor protein) ก่อน จากนั้นจะมีการ modified precursor protein ใน cytoplasm ก่อนที่จะถูก secrete ออกมา โครงสร้างของ TGF precursor นั้นจะประกอบด้วยโครงสร้างสองส่วนด้วยกันคือ

1. Prosegment หรือ "latency associated peptide" อยู่บริเวณปลาย carboxy ป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดในแต่ละ isoform โดยมีความเหมือนกันเพียงร้อยละ 25-35 ของโครงสร้าง แต่จะมีตำแหน่งกรด cystein สำคัญที่ไม่มี เชื่อว่ามีความสำคัญในการทำงาน พบว่า TGF ที่มี pro-segment จะมีคุณสมบัติเป็น inactive form ในการออกฤทธิ์ของ TGF ต้องอาศัยการตัด prosegment ออกด้วยเอ็นไซม์ furrin ซึ่งเป็น protease ชนิดหนึ่ง ในการทดลองใส่ยีน TGF ที่ไม่มีส่วนที่สร้าง prosegment พบว่าส่วน carboxy ที่สร้างขึ้นนั้นไม่สามารถขับออกจากเซลล์ได้แสดงว่า prosegment นั้นน่าจะมีบทบาทในการเป็นเสมือนโปรตีนพี่เลี้ยง (chaperon) ของ active TGF ในระดับเซลล์

2. Active TGF อยู่ที่บริเวณปลายอะมิโน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 112 ตัว เป็นส่วนออกฤทธิ์ของ TGF ในการออกฤทธิ์ของนั้นต้องอาศัยการย่อยโดย มีบทบาทในการที่ไม่มีการเปล พบว่าเซลล์แต่ละชนิดตอบสนองการกระตุ้นจาก isoform แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน สามารถพบ TGF และ TGF receptor ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดในร่างกายแสดงถึงบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในร่างกาย การควบคุมการทำงานของระบบ TGF นั้นจึงมีความสำคัญมาก ในแง่การออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งนั้นขึ้นกับปริมาณโดยเฉพาะปริมาณ active TGF ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นส่วนใหญ่เป็น noxious stimuli มักตามมาด้วยการเพิ่มการ transcription ของ ยีน TGF และ ปริมาณของ total TGF แต่ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมอยู่ที่การตัด TGF ออกจาก TGF binding protein ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าการควบคุมของ TGF นั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของ post transcription control ข้อนี้มีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับ TGF การวัดระดับ mRNA ด้วย quantitative PCR, northern blot อาจไม่ได้แสดงถึง ผลการออกฤทธิ์ของ TGF อย่างแท้จริง

หลังจากสร้างแล้วก่อนที่จะขับออกจากเซลล์ โมเลกุลของ TGF จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ส่วนของ prosegment จะถูกตัดออกจากปลาย carboxy ด้วยเอ็นไซม์ furin หลังจากถูกตัด prosegment ก็ยังยึดอยู่กับโมเลกุลของ TGF ด้วยพันธะ จากนั้นโมเลกุลของ TGFสองตัวจะเข้ามาจับกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า homodimerization ที่ prosegment ส่วนที่เป็น cystein จะมี latent TGF binding protein (LTBP) เข้ามาจับ โครงสร้างทั้งหมดนี้เรียก latent TGF ซึ่งไม่ออกฤทธิ์ แต่เซลล์จะขับออกในรูปนี้ latent TGF จะสามารถออกฤทธิ์ได้เมื่อ LTBP ถูกตัดออกไปเหลือแต่ active TGF ในสภาพธรรมชาติพบว่าปริมาณของ latent TGF นั้นสูงในเนื้อเยื่อที่มีพยาธิสภาพขณะที่ active TGF มีปริมาณต่ำกว่ามาก ดังนั้นขั้นตอนการเปลี่ยนจาก latent ไปเป็น active TGFจึงเป็นขั้นตอนสำคัญใน

การควบคุมการทำงานของ TGF การสลาย LTBP ในการทดลองนั้นทำได้โดยการใช้กรด แต่ในร่างกายนั้นกระบวนการนี้เกิดโดยอาศัยเอ็นไซม์ plasmin เป็นหลักรวมทั้งเอ็นไซม์ urokinase พบว่า activeTGF นั้นมีผลในการลด PAI ซึ่งจะมีผลลด plasmin การลดลงของ plasmin มักนำไปสู่การอธิบายว่าเป็นการลดลงของการสลาย matrix เกิดการสะสมของ matrix ตามมา แต่ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาการทำงานของ TGF จะพบว่าการลดลงของ plasmin นั้นจะทำให้ latent TGF ถูกเปลี่ยนเป็น aactive form ลดลงจึงอาจเป็นกระบวนการ down regulation ของ active TGF เอง

จะเห็นได้ว่าการที่ TGF จะออกฤทธิ์ได้นั้นค่อนข้างซับซ้อน ต้องใช้ขั้นตอนในการควบคุมหลายขั้น ขณะที่เซลล์เกือบทุกชนิดในร่างกายสามารถสร้างสารชนิดนี้ได้ ทำให้ดูเหมือนว่า TGF ส่วนหนึ่งจะไม่ได้ออกฤทธิ์ ประเด็นนี้ส่งผลกระทบหลายประการ และทำไมจึงต้องสร้างในลักษณะนี้ เป็นไปได้ว่ากระบวนการควบคุมปริมาณของ TGF ในระดับการ transcription ของยีนนั้นไม่สามารถทำได้ การควบคุมการทำงานจึงอยู่ที่การกระตุ้น inactive TGF แทน การศึกษาในช่วงหลังจึงให้ความสำคัญต่อ activated TGF มากกว่า total TGF และ ปริมาณ mRNA

TGF receptor

TGF reptor ที่ค้นพบและมีความสำคัญในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขณะนี้มี 3 ชนิดด้วยกันคือ TGF I,II,III ทั้งหมดเป็น serine/thireonine kinase receptor receptor ทั้งสามชนิดนี้เรียกชื่อตามคุณสมบัติการเคลื่อนตัวของโมเลกุลโปรตีนเมื่อทำ protein electroporesis โดย type I receptor นั้นเคลื่อนที่ได้ไกลที่สุดขณะที่ type III เคลื่อนที่ได้น้อยที่สุด ข้อมูลปัจจุบันพบว่า TGF II และ type I เท่านั้นที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์มากที่ขณะที่ type III ทำหน้าที่ช่วยให้ TGF จับกับ type I,II receptor ได้ดีขึ้น

1. TGF receptor type I เป็น transmembrane serine/thireonine receptor ประกอบด้วย extracellular domain ซึ่งมีกรดอะมิโนชนิด cysteine อยู่เป็นจำนวนมากที่มีโครงสร้างคล้าย type II แต่สั้นกว่า, single span transmembrane,short cytoplasmic domain ที่ cytoplasmic domain ถึงแม้จะมีส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ kinase แต่ไม่ได้ยาวถึง kinase domain ดังนั้นจึงไม่สามารถเกิดปฏิกริยา kinase ทำให้เชื่อว่า signal transduction จึงไม่ได้เกิดขึ้นโดยใช้ receptor ชนิดนี้ตามลำพัง นอกจากนั้นสายอะมิโนของ cytoplasmic domain ที่ติดกับเยื่อบุเซลล์จะประกอบด้วย glycine, serine ปริมาณมากเป็นพิเศษ (เรียกส่วนนี้ว่า GS domain ซึ่งจะเป็นส่วนที่ถูก phosphorylation โดย kinase domain ของ type II receptor) ในการทำงานพบว่า type I receptor ทำงานร่วมกับ type II recptor โดย type I เป็น substrate ให้แก่ kinase domainของ type II receptor

2. TGF receptor type II เป็น receptor สำคัญที่มีบทบาทในการเกิด signal transduction ของ TGF บริเวณส่วน extracellular domain ของ type II receptor จะเป็นส่วนที่จับกับโมเลกุลของ TGF ความสามารถในการจับนี้จะแตกต่างกัน พบว่า type II receptor นั้นจับกับ TGFβ1 ได้ดีแต่แทบไม่สามารถจับกับ TGFβ2 การจับนั้นต้องอาศัย type III receptor เป็นตัวช่วย ส่วน cytoplasmic domain ของ type II receptor เป็นส่วนที่มีบทบาทในกระบวนการ kinase และการเกิด signal transduction ในขั้นตอนการทำงานนั้น type II receptor จะจับกันเป็นคู่ homodimerization หรือจับกับ type I receptor (heterodimerization) ถ้าจับกับ type I นั้น cytoplasmic domain ของ type I จะถูกใช้เป็นวัตถุดิบ (substate) สำหรับ phosphorelation

3. TGF receptor type III หรือ Betaglycan receptor type นี้มีขนาดใหญ่ จึงเคลื่อนที่ได้น้อยที่สุดเมื่อทำ protein electrophoresis พบ type III receptor บนเซลล์เกือบทุกชนิดในร่างกายตั้งแต่เป็น embryo ทำให้เดิมเชื่อกันว่า receptor ชนิดนี้มีบทบาทที่สำคัญในการตอบสนองต่อ TGF นอกจากนั้นยังพบ circulating form ของ type III ทำให้ก่อนนี้เคยเชื่อกันว่า type III มีบทบาทสำคัญที่สุดในการทำงานของระบบ TGF ต่อมาเมื่อมีการศึกษาถึงโครงสร้างของ type III โดยละเอียดจึงพบว่าส่วน cytoplasmic domain ของ type III recetor นั้นสั้นมากและไม่มีคุณสมบัติในกระบวนการ signal transduction ปัจจุบันพบว่า betaglycan นั้นทำหน้าที่ในการช่วยยึดโมเลกุล TGF ให้จับกับ type II receptor ได้ดีขึ้นโดยเฉพาะในการออกฤทธิ์ของ TGFβ2 เนื่องจากมี affinity ต่ำมาก พบว่าสามารถเพิ่มฤทธิ์ antiproliferate ของ TGFβ2 ได้ถึง 10 เท่าถ้ามี type III receptor ด้วย circulating from ของ typeIII receptor นั้นยังไม่ทราบบทบาทชัดเจนบางทีอาจมีผลในการจับกับ TGF ทำให้จับกับ receptor ไม่ได้เป็นการยับยั้งการออกฤทธิ์อีกทางหนึ่ง

Signal Transduction ของ TGF

ในระยะแรกการศึกษา signal transduction ของ TGF นั้นพยายามมุ่งไปที่การศึกษาโปรตีนที่เข้ามาจับกับ receptor ขณะที่ถูกกระตุ้นถึงแม้ว่าพบโปรตีนที่เข้ามาจับกับ receptor หลายชนิด แต่ไม่มีความก้าวหน้าเท่าใด ความก้าวหน้าที่สำคัญเกิดจากการศึกษาพันธุกรรมใน Drosophila และ C elegan สัตว์ทั้งสองกลุ่มนี้มี growth cytokine ชื่อ Decapentaplegic (Dpp) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ BMP2/4 ในสัตว์ชั้นสูง growth factor ชนิดนี้มีบทบาทในการพัฒนาส่วน mesoderm และ endoderm ทำให้ค้นพบโปรตีนที่ควบคุมการ transduction ของ Dpp กระบวนการ ทำให้มีการค้นพบระบบ secondary messenger ซึ่งมีบทบาทในการ transduction ของระบบ serine/thireonine กลุ่มใหม่คือ Mad (*m*other *a*gainst *d*ecapentaplegic) ใน Drosophila และ sma celegan นำไปสู่การค้นพบ

homologueของ mad ในสัตว์มีกระดูกสันหลังคือ sad ปัจจุบันพบว่า TGFนั้นอาศัยการเกิด signal transduction ที่สำคัญ 2 ทาง คือผ่าน smad และ MAPKK

1. SMADs homologue ของ Mad และ sma ในสัตว์มีกระดูกสันหลังคือ SMADs ซึ่ง SMADs นี้เป็น cytoplasmic mediator ที่สำคัญที่สุดของ Serine/Thireonine kinase receptor ในการศึกษากลไกของ TGF จึงมุ่งไปที่การทำงานและการควบคุม SMADs ปัจจุบันพบยีนที่ควบคุมการสร้าง SMADs มากกว่า 9 ชนิด โครงสร้างของ SMADs นั้นจะประกอบด้วยสายอะมิโนที่มีขนาดประมาณ 42-60K ซประกอบด้วยส่วนสำคัญสองส่วนคือ MH1 MH2 เชื่อมกันด้วยสายอะมิโนที่มี proline เป็นองค์ประกอบหลักนั้นสามารถเลียนการออกฤทธิ์ได้เหมือน TGF activin และ BMP ในการทำงานนั้นพบว่า smad 2 และ 3 จับเข้ามาเป็น complex กับ cytoplasmic domain ของ TGF receptor type I,II เป็น heteromeric complex smad 2/3 จะถูก phosphorelated และจะไป phosphorylated smad 4 อีกทอดหนึ่งขั้นตอนนี้จะมี smad 6 เป็นตัวยับยั้ง ซึ่ง smad 4จะทำหน้าที่เป็นตัวเข้าไปใน nuclease และเกิด trascriptionของ target gene ซึ่งขั้นตอนนี้ยังไม่ทราบชัดเจน smad 1 นั้นจะมีบทบาทในกระบวนการออกฤทธิ์ ของ BMP คล้ายกับ smad 2/3 แล้วจึงผ่าน smad 4 เช่นกับพบว่าในการออกฤทธิ์ของ BMP นั้นจะมีการ transcription ของ smad 6 เพิ่มขึ้นซึ่งจะเป็นการ down regulate TGF action ทางหนึ่งจึงมีผู้ให้ความหวังไว้ว่าอาจนำ BMP มาใช้ต้านฤทธิ์ในการเกิด fibrosis ของ TGF

2. MAPKK (Mitogen activated Kinase Kinase) เป็นระบบ signal transduction ที่สำคัญในเซลล์ มักพบในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการ proliferative และ differentiated ของเซลล์ โดยอาศัยการเกิด kinase กันเป็นทอดๆไป เมื่อเร็วๆนี้มีการค้นพบว่า protein ในกลุ่ม MAPKKK ที่มีคุณสมบัติจับกับ cytoplasmic domain ของTGF receptor TAK (TGF associating kinase) เมื่อ transfect plasmid ที่มี TAK เข้าไปในเซลล์พบว่าสามารถทำให้เกิดการออกฤทธิ์

นอกจากการ transduction ที่กล่าวแล้วยังพบว่ามีกลุ่มของโปรตีนที่เข้ามามีปฏิสัมพันธ์กับส่วน cytoplasmic domain ของ TGF receptor ในขณะที่ถูกกระตุ้น โปรตีนเหล่านี้ไม่ได้มีบทบาทในการเกิด signal transduction โดยตรงแต่จะมีบทบาทในทางอ้อมโปรตีนดังกล่าว ได้แก่

- FKBP12 เข้ามาจับกับ type I receptor เชื่อว่า การทำงานของFKBP จะเป็นการยับยั้งการเกิด phosphorelation ของ serine และ thireonine ในลักษณะเดียวกับที่พบในการออกฤทธิ์ของ cyclosporin และ FK ที่มีต่อ calcinurin

- apoprotein J จับกับ type I,II receptor TRIP docking protein receptor

TGFเป็นชนิดแรกที่ถูกค้นพบแต่ในเวลาต่อมาจึงพบว่าไม่ได้นำสัญญาณเพียงแต่ทำหน้าที่ยึดโมเลกุล TGF ขณะที่จับกับ recptorชนิดอื่น ดังรขนั้นในบางครั้งจึงไม่ถือว่าเป็น receptor TGF TGF และนั้นมี

โครงสร้างคล้ายกันข้อมูลในระยะหลังชี้ให้เห็นว่าทั้งสองชนิดอาจทำงานร่วมกันโดยhomodimer TGF จับกันเป็น tetramer

ผลของ TGF ต่อ matrix พบว่า TGF มีผลเพิ่มปริมาณ matrix substanceเกือบทุกชนิด การเพิ่มนี้เป็นผลมาจากสาเหตุสองประการคือ การสร้างเพิ่มขึ้น จะพบการ expression ของยีนที่สร้างmatrix และปริมาณ mRNA ทั้งเป็นผลจากตัว TGF หรือผ่านทางการกระตุ้น connective tissue growth factor (CTGF) ประการที่สองคือลดการทำงานของเอ็นไซม์ที่มีบทบาทในการทำลาย matrix เอ็นไซม์กลุ่มนี้ที่สำคัญได้แก่ metalloproteinase และ plasmin

Wound healing fibrosis นั้นเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ healing เช่นเดียวกับ inflammation บางครั้งจึงเป็นการยากที่จะจำแนกว่า cytokine ที่มีการแสดงออกในขณะนั้นทำหน้าที่ใดในกระบวนการใด การศึกษา healing ที่สะดวกที่สุดคือกระบวนการ wound healing ของผิวหนัง ทำไมบางครั้งจึงหายโดยมีแผลเป็นเล็กน้อยบางครั้งแผลเป็นกลับมากจนเกิด keloid wound healing นั้นมีการกระตุ้นของ latent TGF เพิ่มขึ้นชัดเจนสองครั้งด้วยกัน ภายในชั่วโมงแรกหลังจากเกิดแผล และหลังจากนั้นอีกหลายวัน ในหนูทดลองที่มีระดับ circulating TGF สูงการหายของแผลไม่ได้เกิด fibrosis มากกว่าแสดงถึงความสำคัญของ local TGF มากกว่า circulating กระบวนการ healing ของ fetus นั้นแตกต่างไป โดยพบกระบวนการ inflammation และ fibrosis เกิดขึ้นน้อยมากพบว่า fibroblast ของ fetus มีการสร้าง TGF ต่ำมากเมื่อทดลองให้ exogenous TGF จะทำให้เกิด fibrosis มากขึ้น

ผลของ TGF ที่มีต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย

ในการศึกษาผลของ cytokine และ growth factor ที่มีผลในระดับ tissue และ organ นั้นจำเป็นต้องระลึกเสมอว่าสารเหล่านั้นสามารถมีบทบาทหนึ่งในสภาวการณ์หนึ่งกับเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง และสามารถมีบทบาทในทิศทางตรงกันข้ามได้เมื่อสภาวการณ์เปลี่ยนไปหรือเมื่อออกฤทธิ์กับเซลล์อีกชนิดหนึ่ง TGF ชื่อของก็เช่นกันและมักทำให้เกิดความสับสนอยู่เสมอ สำหรับ TGF นั้นถึงแม้จะได้ชื่อว่าเป็น growth factor แต่กลับมีฤทธิ์ anti-proliferation และสนับสนุน differentiation มากกว่าที่จะสนับสนุนการเกิด mitosis อย่างกว้างขวาง

Effect in cell proliferation พบว่า TGF นั้นสนับสนุนการเกิด proliferate ของ เซลล์ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อ mesenchyme ที่สำคัญคือ fibroblast, smooth muscle cell, osteoblast, Schwann cell(ไตนั้น classical embryology ถือว่าพัฒนามาจากเนื้อเยื่อ mesenchyme เช่นกัน) การกระตุ้นนี้มีทั้งที่เกิดโดยตรงและผ่านทางการกระตุ้นให้มีการสร้าง platelet derived growth factor ก่อน นอกจากนั้นการกระตุ้นในลักษณะนี้ยังขึ้นกับปริมาณของ TGF ด้วยพบว่า smooth muscle จะเกิด

การ proliferate ที่ระดับ TGF ต่ำและจะหยุดการ proliferate เมื่อระดับสูง ขณะที่เนื้อเยื่อที่มาจาก epithelium เกือบทั้งหมดรวมทั้ง mesangium ของไต TGF จะยับยั้งการproliferate และยังมีฤทธิ์สนับสนุนกระบวนการ apoptosis ซึ่งเชื่อว่าขั้นตอนนี้จะมีผลต่อการเกิด mesangial expansion และ glomerular hypertrophy ในโรคไต การยับยั้งการ proliferate นั้นเกิดโดยการรบกวนกระบวนการทำงานของ cyclin และ cyclin dependence kinase CDK การศึกษาโดยการเพาะเลี้ยง Mv1lu ซึ่งเป็น epithelial เซลล์พบว่าหลังจากได้รับ TGF เซลล์จะหยุดการแบ่งตัวในระยะที่จะเปลี่ยนจาก G1 เข้าสู่ระยะ S ลักษณะของการหยุดในวงจรเซลล์แบบเดียวกันนี้สามารถกระตุ้นได้เมื่อโดยการทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้ขาดอาหาร หรือได้รับ retinoblastoma ต่อมาจึงสามารถแสดงให้เห็นว่า TGF ขัดขวางการทำงานของโปรตีนในซัยโตพลาซึ่มชื่อ cyclin ซึ่งเป็น โปรตีนที่ควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ cyclin dependence kinaseCDK อีกที ทั้ง cyclin และ CDK จะร่วมกันทำหน้าที่ควบคุม (regulator) วงจรของเซลล์ (cell cycle) เชื่อว่าขั้นตอนนี้จะมีผลต่อการเกิด mesangial expansion และ glomerular hypertrophy ในโรคไต

Effect in Immune system มักพบระดับ TGF เพิ่มขึ้นเสมอในกระบวนการอักเสบเซลล์ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบทุกชนิดนั้นสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง latent TGF latent และเชื่อว่า TGF ที่สร้างขึ้นในภาวะนี้ไปมีผลต่อ environment ที่มีการอักเสบมากกว่ากลับไปมีผลต่อ inflammatory cell และกระบวนการอักเสบเอง และถึงแม้จะพบการเพิ่มขึ้นของ TGF แต่ TGF นั้นไม่ได้เป็น inflammatory cytokine ตรงกันข้ามการศึกษา in vitro ส่วนใหญ่พบว่า TGF กลับมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวทุกชนิด พบว่ายิ่งไปกว่านั้นส่วนหนึ่งของฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันของยา cyclosporine มาจากผลของการกระตุ้นให้มีการสร้าง TGF นี่เอง

การดำเนินโรคของภาวะไตวายเรื้อรังนั้นจะพบการเสื่อมหน้าที่ของไตมากขึ้นเรื่อย พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณพังผืด (fibrosis) ในเนื้อไตส่วน interstitium ซึ่งพังผืดในไตส่วน interstitium นี้มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคไตวายเรื้อรังมาก และเป็นที่ยอมรับกันว่าการเกิดพังผืดนี้เองเป็นสาเหตุที่ทำให้การทำงานของไตลดลง การชะลอหรือลดปริมาณการเกิด fibrosis จึงเป็นความหวังเสมอมาของแพทย์โรคไตในการที่จะรักษาโรคไตวายเรื้อรัง มีทฤษฎีจำนวนมากเพื่ออธิบายกลไกการเกิด fibrosis ทฤษฎีที่น่าสนใจทฤษฎีหนึ่งคือ ภาวะพิษจากแอมโมเนียและแอมโมเนียมต่อเนื้อไตส่วนนี้ ในภาวะไตวายเรื้อรังนั้นร่างกายจะอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ ความเป็นกรดภายในเซลล์นี้มีผลทำให้เซลล์ท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) มีการสร้างแอมโมเนียเพิ่มขึ้นขณะที่จำนวนหน่วยไต (nephron) ที่ยังสามารถทำงานได้มีจำนวนลดลง ดังนั้นหน่วยไตแต่ละหน่วยจึงควบคุมการขนส่งแอมโมเนียในปริมาณที่สูงกว่าปกติมาก จึงเกิดการคั่งของแอมโมเนีย ส่วนหนึ่งอยู่ในเนื้อไตส่วน interstitium และก่อให้เกิดพิษต่อเนื้อไตส่วนนี้ ร่วมกับมีการกระตุ้นระบบคอมพลีเม้นท์ (complement) ที่ทำลายเนื้อไตและเกิดพังผืดขึ้น รวมไปถึงการกระตุ้นให้เกิดการเจริญที่ผิดปกติ

(proliferation) ของเซลล์ท่อไต[4,5] เมื่อพิจารณาตามนี้จะเห็นว่าถ้าสามารถจำกัดปริมาณการสร้างแอมโมเนีย/แอมโมเนียม ควรจะมีผลลดการเกิดการทำลายเนื้อไตส่วนที่เหลือ ลดการเกิดพังผืดในเนื้อไต และชะลอการดำเนินโรคไตวายเรื้อรังได้ การศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึ่มของแอมโมเนียในไต พบว่าเซลล์ท่อไตส่วนต้น ทำหน้าที่สร้างแอมโมเนียโดยใช้ gultamine เป็นวัตถุดิบและพบว่าสารกลุ่ม tircarboxylic acid มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอมโมเนียภายในเซลล์ proximal tubule ได้โดยตรง ซิเตรต (citrate) ซึ่งเป็นสาร tricarboxilic acid จึงมีผลยับยั้งการสร้าง ammonia ซึ่งกระบวนการการขนส่ง citrate ของไต ส่วนใหญ่เกิดการดูดซึมที่เซลล์ท่อไตส่วนต้นโดยผ่านทาง dicarboxylate transporter หลังจากเข้าไปในเซลล์ท่อไต ซิเตรตส่วนหนึ่งจะใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึ่มของเซลล์ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งการสร้าง แอมโมเนียของเซลล์ท่อไต[7] Tanner[8] ได้ทดลองให้โปแตสเซียมซิเตรตผสมในน้ำดื่มในหนูสายพันธ์ที่เกิดโรคถุงน้ำในไต (polycystic kidney) ; (Han:SPRD rat) พบว่าสามารถแสดงผลการลดลงของการเกิดพังผืดในเนื้อไต tubulointerstitial fibrosis การโตขึ้นของถุงน้ำและชะลอการเสื่อมของไตได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ดื่มน้ำตามปกติ

การศึกษาทางพยาธิวิทยานั้นชี้ให้เห็นว่าลักษณะเนื้อเยื่อที่เกิด fibrosis นั้นจะมีปริมาณของ matrix เพิ่มขึ้น มีการเหี่ยวของโครงสร้างท่อไต ส่วนของ matrix นี้จะประกอบไปด้วย collagen type I, III, laminin และ fibronectin ในสัดส่วนที่สูงกว่าที่พบในเนื้อไตทั่วไป แสดงถึงการสูญเสียภาวะสมดุลในการควบคุมปริมาณสาร matrix เหล่านี้ ซึ่งเป็นผลทั้งจากการสร้างเพิ่มขึ้นและมีการทำลายลดลง นอกจากนั้นยังสามารถพบเซลล์ myofibroblast ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญคือมีการแสดงออกของเส้นใย actin ในชัยโตพลาสซึ่ม (smooth muscle a ctin α-SMA) ซึ่งmyofibroblast นี้จะไม่พบในเนื้อไตที่ปกติพบว่า myofibroblast นั้น transdifferntiation มาจากเซลล์ท่อไตภายหลังจากมีภัยอันตรายต่อไต กระบวนการ tramsdifferentiation ของเซลล์ท่อไตนี้เป็นขั้นตอนสำคัญในการเกิด fibrosis ในเนื้อไตทั้งส่วน glomerulus และ interstitium

จากการศึกษาในด้านอณูชีววิทยาปัจจุบันนั้นให้ความสนใจกลไกของ cytokine และ growth factor ต่อการเกิด fibrosis เป็นพิเศษ ข้อมูลจากการศึกษาส่วนใหญ่ชี้ว่าในระดับอณูชีววิทยานั้นการเกิดจะเกิดภายใต้การกระตุ้นผ่าน transforming growth factor TGF ซึ่งเป็น growth factor ที่สำคัญของ mesenchymal cell พบว่า TGF สามารถกระตุ้นให้เซลล์ท่อไตมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น myofibroblast ได้และยังมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ metalloproteinase และ plasmin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำลาย matrix ดังนั้นปริมาณ TGF ในเนื้อไตมีความสำคัญในการกำหนดทิศทางในกระบวนการซ่อมแซม และ การเกิด fibrosis ของไต

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมุ่งที่จะศึกษาผลของซิเตรตในการลดการเกิดพังผืดในเนื้อไต ในแบบจำลองภาวะไตวายเรื้อรังด้วยการทำลายเนื้อไตหนูทดลอง 5 ใน 6 ส่วน โดยการผูกหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยง 2 แขนง และวัดตัวแปรทางพยาธิสภาพในไตและการเกิด transdifferentiation ซึ่งแสดง

โดยการแสดงออกของ α-SMA ตลอดจนศึกษาระดับ regulatory cytokine ที่มีผลต่อการเกิด fibrosis ในเนื้อไต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

ประชากร (population)

หนูทดลองสายพันธ์ Wistar เพศผู้ อายุระหว่าง 4-6 สัปดาห์ น้ำหนัก 250-300 กรัม (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัย มหิดล) จำนวน 50 ตัว หนูทดลองจำนวน 24 ตัวจะถูกทำลายเนื้อไต 5 ใน 6 ส่วน (8 ตัวใช้สำหรับหาปริมาณความเข้มข้นสารละลายซิเตรตที่เหมาะสมก่อนที่จะเริ่มทำการทดลอง) โดยมีขั้นตอนผ่าตัดดังนี้

1. ฉีดยาสลบหนูทดลองด้วย phenobarbital 5 มก/น้ำหนักหนู 100กรัม ฉีดทางช่องท้อง
2. หลังจากหนูสลบจึงผ่าตัดไตหนูด้วยวิธีผ่าเข้าทางด้านหลังเพื่อหาหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงไต (renal artery) ซึ่งจะแยกเป็น 3 เส้นก่อนเข้าสู่ไต
3. จากนั้นทำการผูก renal artery 2 แขนงจาก 3 แขนงของไตข้างซ้าย และ ผูกหลอดเลือดทั้งหมดและท่อปัสสาวะของไตข้างขวา
4. ทำการตัดไตข้างขวาออกแล้วเย็บปิด

หนูทดลองอีก 6 ตัวจะถูกทำการผ่าตัดด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อเข้าไปเขี่ยเส้นเลือดแดงที่ไปเลี้ยงไตทั้งสองข้าง แต่ไม่ทำการผูกและตัดไต เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (sham)

การหาความเข้มข้นของสารละลายซิเตรตที่เหมาะสม (Pilot analysis for citrate dose)

หนูทดลองที่กลุ่ม 5/6 จำนวน 8 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมให้กินน้ำประปา 2 ตัว และได้รับน้ำในรูปสารละลายซิเตรตความเข้มข้นต่างกัน โดยเริ่มจาก 61 mEq/Lจำนวนสองตัว 122 mEq/Lและ 244mEq/L จำนวนกลุ่มละ 2 ตัว จากขั้นตอนนี้พบว่า เฉพาะหนูทดลองที่กินสารละลายซิเตรตความเข้มข้น 61 mEq/L และกินน้ำประปาเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้เกิน 12 สัปดาห์โดยที่สังเกตไม่พบการเจ็บป่วยใดๆ ในหนูทั้งสองกลุ่มที่สัปดาห์ที่ 12 หนูอีกสองกลุ่มมีน้ำหนักลดลงและเสียชีวิตหมดก่อนถึงสัปดาห์ที่ 7

การทดลอง

หลังผ่าตัดได้ 24-72 ชั่วโมง หนูทั้งหมดจากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมจะถูกนำเข้า metabolic cage เพื่อวัดการทำงานของไตเป็นพื้นฐานด้วยการวัดค่าการทำงานไตโดยการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และเจาะเลือดจากปลายหางเพื่อคำนวณค่า GFR = urea clearance

จากนั้นสัตว์ทดลองจะแบ่งออกโดยวิธีสุ่ม (randommized) ดังนี้

กลุ่มควบคุม (S) แบ่งเป็นสองกลุ่มกลุ่มละสามตัว

S_{tap} ได้รับน้ำดื่มเป็นน้ำประปาทั่วไป

S_{cit} ได้รับน้ำดื่มในรูปสารละลาย potassiumcitrate, sodium citrate ในน้ำประปา ความเข้มข้นของ citrate = 61 mEq/L, potassium = 91.5 mEq/L, sodium = 91.5 mEq/L

กลุ่มทดลอง 5/6 nepherctomized 18 ตัวแบ่งเป็น

$5/6_{tap}$ (n=9) ได้รับน้ำดื่มเป็นน้ำประปาทั่วไป

$5/6_{cit}$ (n=9) ได้รับน้ำดื่มในรูปสารละลาย potassium citrate, sodiumcitrate ในน้ำประปา ความเข้มข้นของ citrate = 61 mEq/L, potassium = 91.5 mEq/L, sodium = 91.5 mEq/L

หนูทั้งหมดจะได้รับอาหารหนูสูตรมาตรฐานไม่จำกัดปริมาณ เมื่อครบ 6 สัปดาห์หนูในกลุ่มทดลอง 5/6 cit และ 5/6 tap จะถูกสุ่มออกมากลุ่มละ 3 ตัว นำมาวัดการทำงานของไต โดยใช้ metabolic cage จากนั้นจะทำการเก็บเนื้อไตส่วนที่เหลือโดยวิธีการผ่าตัดเข้าช่องท้องในหนูที่ได้ยาสลบ phenobarbital ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เนื้อไตที่ได้จะแบ่งเป็นสองส่วนส่วนหนึ่งจะแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีเพื่อหยุดกระบวนการทำงานทั้งหมดของเซลล์ จากนั้นจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 C สำหรับใช้วิเคราะห์ระดับ TGFβ1 ในภายหลัง เนื้อไตส่วนที่เหลือจะแช่ในสารละลาย formalin เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ภายหลังจากตัดไตจะทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดแดงใหญ่(aorta)เพื่อนำไปวัดค่า serum chemistry

เมื่อครบ 8 สัปดาห์จึงนำหนูที่เหลือทั้งหมด (18 ตัว) วัดค่าการทำงานของไตด้วย metabolic cage และทำการเก็บเนื้อไตที่เหลือตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ไตหนูทดลองที่แช่ในน้ำยา Formalin จะนำไป fixed ใน paraffin ก่อนทำการตรวจดูความรุนแรงของการเกิดพังผืดไตด้วยการย้อม H&E, PAS และ Masson Trichrome (4 micron section 3 level/1 tissue) เพื่อดูพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วน cortical interstitium ที่ไม่ใช่ส่วนที่เกิดการตายจากการผูกหลอดเลือด โดยจะใช้ระบบคะแนนสำหรับประเมินปริมาณการเกิด fibrosis ดังนี้

0 คะแนน ถ้าไม่พบ fibrosis

1 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน slide นั้น 0-5%

2 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน slide นั้น 5-25%

3 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน slide นั้น 25-50%

4 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน slide นั้น 50-75%

5 คะแนนถ้าพบ fibrosisใน slide นั้น > 75%

การย้อม immunoperoxidase

เพื่อดู α-SMA,PDGF receptor ในเนื้อเยื่อส่วน cortical interstitium (4 micron thickness, 3 level/1 tissue) ย้อม immunoperoxidase 2 micron thickness, paraffin embedded section,3 level/1 tissueโดยใช้ primary antibody α-SMA clone 1A4 (Dako Glostup Denmark), PDGFr ขั้นตอนในการย้อมคร่าวๆมีดังนี้ เคลือบสไลด์ด้วย3-aminopropyllriethoxysilene (Sigma), deparaffin, xylene rehydrate, absolute ethyl alcohol wash, PBS, block endogenous endopeptidase 0.5%, H2O2inPBS microwave 2 step, wash PBS, antigen retrieval, 10 mM citrate buffer microwave 2 step block nonspecific enzyme ด้วย normal horse serum, incubate primary antibodies with 3%NHS overnight, wash PBS NSH Triton X จากนั้นเติม secondary antibody ที่จับกับ biotin counter stain Streptavidin-HRP, wash Tris buffer DAB 3,3'-Diaminobenzidien tetrahydrocholide in Tris buffer เติม 1% ferric chloride incubated 7 min, wash distilled water, counter stain with Hematoxyline 25-30 sec, dehydrate ethyl alcohol ทั้งหมดในส่วนการตรวจพยาธิสภาพนี้จะกระทำโดยที่พยาธิแพทย์ไม่มีโอกาสทราบว่าไตที่ตรวจนั้นเป็นของหนูกลุ่มใด

Positive & Negative control ต่อการ express SMA

เตรียมโดยใช้หนู Wistar น้ำหนัก 150 มก. จำนวน 2 ตัวเป็น positive control โดยกระตุ้นให้เกิด renal fibrosis ด้วยการผูก ureter ข้างซ้าย 7 วัน (double ligated UUO) และใช้ไตหนู Wistar ปกติน้ำหนัก 100 มก. เป็น negative control

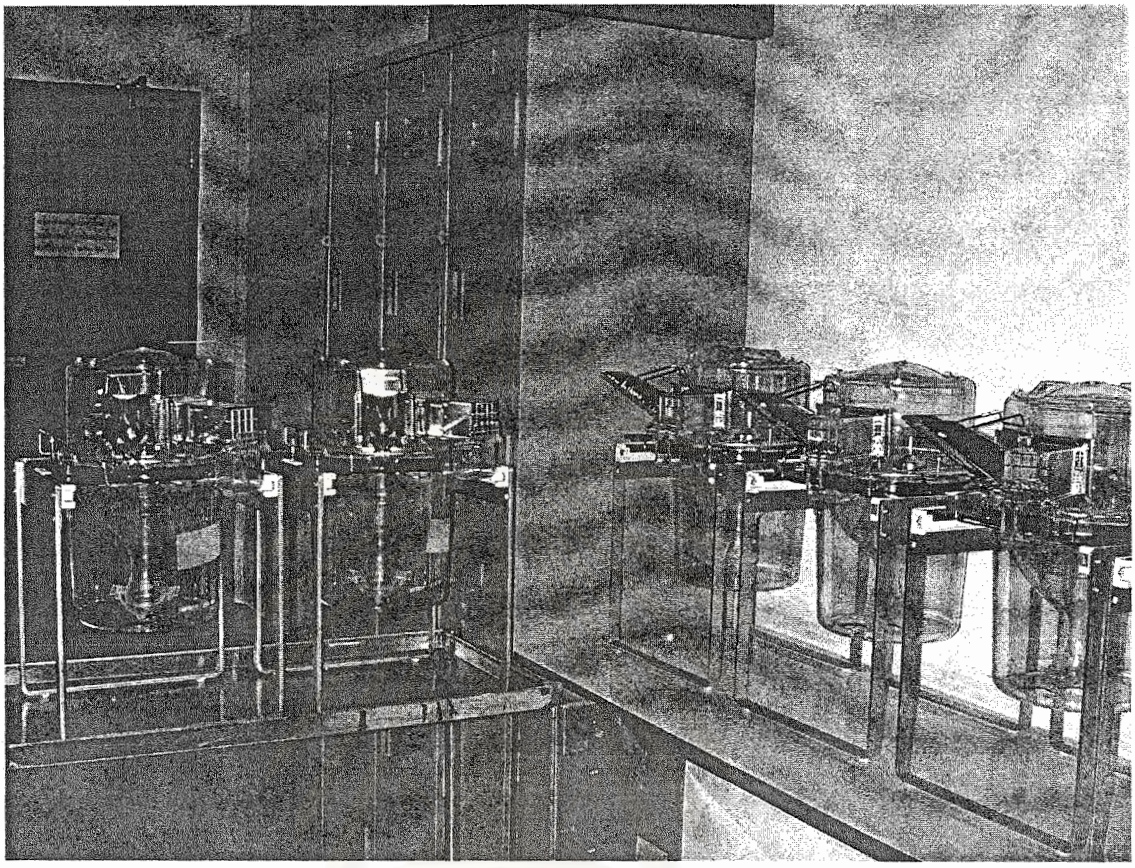
การวัดระดับ total TGFβ1 ในเนื้อไต

เนื้อไตส่วนหนึ่งจะถูกแยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 จนกระทั่งวิเคราะห์ ทำโดยแยกเฉพาะส่วน cortex นำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ที่อุณหภูมิ 4C ใช้สารละลาย 10mM Tris-HCl(pH7.4),2M NaCl,1mM PMSF,1mMEDTA,0.01%Tween 80 เป็น buffer homogenate tissue ที่ได้จะนำมาปั่น (ultracentrifuge)ที่ 15000 g 4C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว (supernate) มาวิเคราะห์ต่อ โดยแยกส่วนหนึ่ง 5 microLต่อตัวอย่างไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี supernate ส่วนที่เหลือจะนำมาวัด TGF โดยวิธี Double antibodies ELISA (Quntikine kit™;R&D Systems) โดยมีขั้นตอนคร่าวๆดังนี้ ผสม supernate กับ buffer R&D 64(R&D system) จากนั้นกระตุ้นให้ TGF แยกตัวออกจาก TGF binding protein โดยผสมสารละลายที่ได้กับ 1 M acetic acid, Urea, แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไป incubate เป็นเวลา 3 ชั่วโมงใน microplate ที่ coated ไว้ก่อนด้วยTGFβ1 receptor ล้างด้วย buffer 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ TGF antibody ซึ่งจับกับ biotin ล้างด้วย แล้วจึงผสม reagent อ่านด้วย microplate reader ที่ wave length 450

การวิเคราะห์ข้อมูล

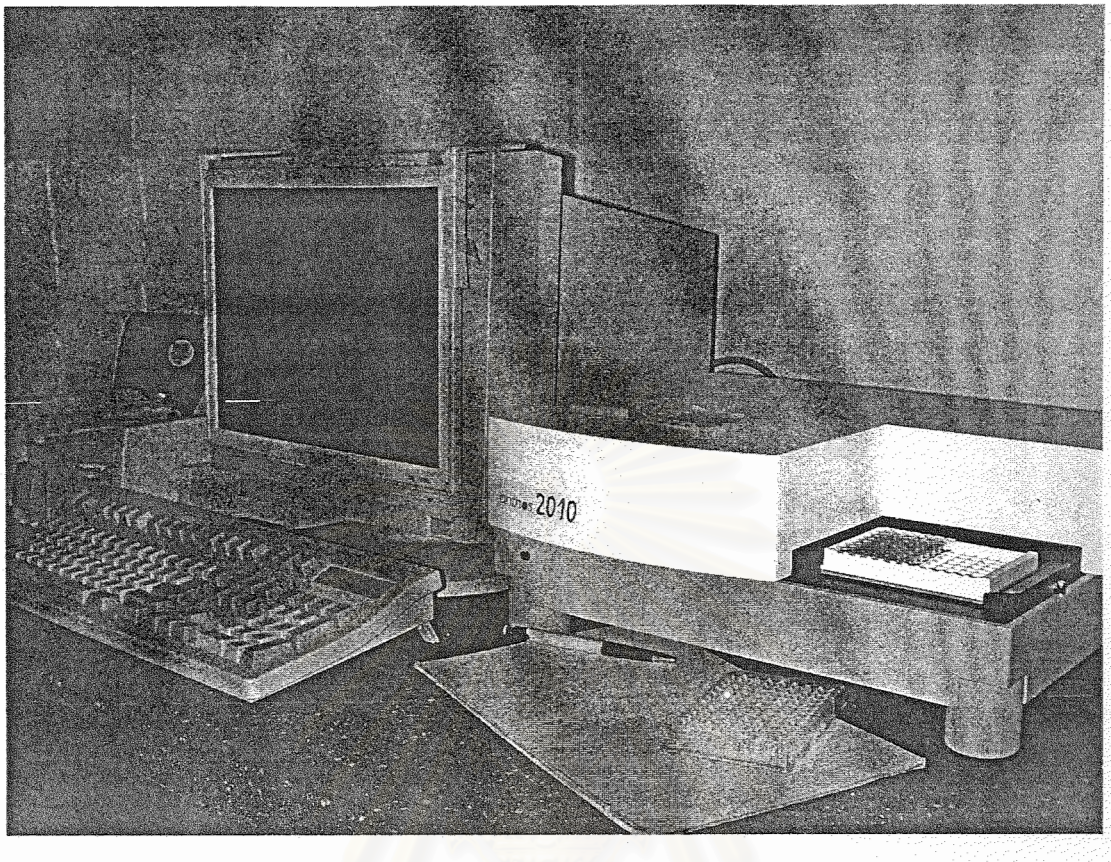
ค่าตัวแปรต่างๆ จะแสดงในรูป mean±SEในการเปรียบเทียบของมูลระหว่างกลุ่มจะใช้ analysis of variant (ANOVA) สำหรับข้อมูลที่เป็น continuous data และใช้ Chi square สำหรับข้อมูลที่ไม่ต่อเนื่อง โดยกำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% confidence

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดง metabolic cage ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดง micropate reader ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาหน้าที่การทำงานของไต

ภายหลังจากลดเนื้อไตไป 5 ใน 6 ส่วน พบว่าระดับ BUN และ creatinine ในเลือดสูงขึ้นอย่างชัดเจน และ พบว่าการทำงานของไตจะลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) ดังตารางที่ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ได้รับสารละลาย citrate กับหนูที่ได้รับน้ำประปา ภายในกลุ่ม sham และ 5/6 ด้วยกันเองพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

หลังจากเวลาผ่านไปได้ 6สัปดาห์พบว่าหนูกลุ่ม5/6ที่ได้รับสารละลายซิเตรตจะมีค่า GFR มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำประปา แต่การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ไม่พบความแตกต่างอันนี้

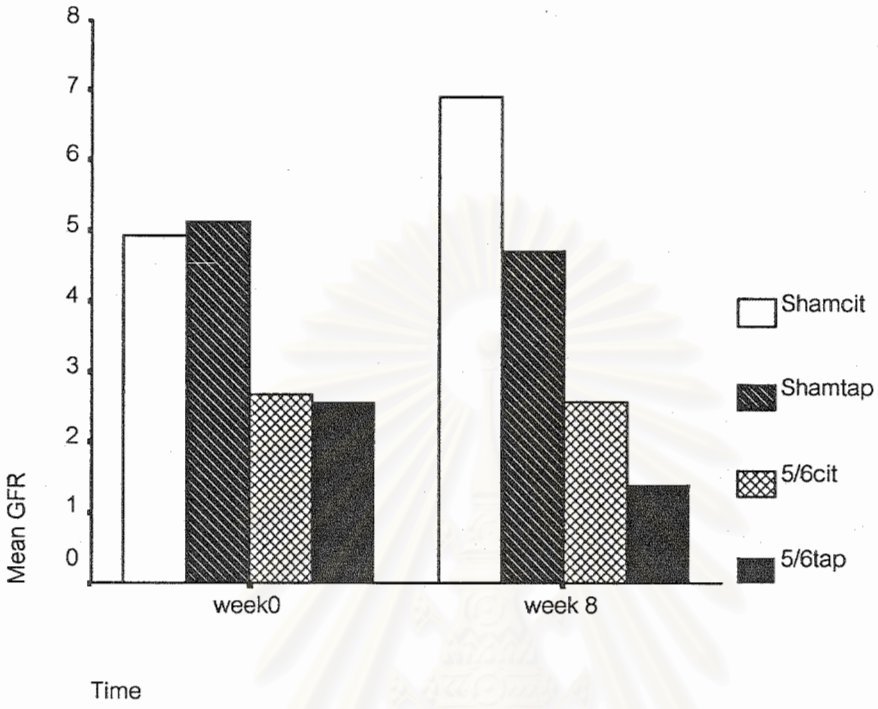
เมื่อครบ 8 สัปดาห์พบว่าหนูกลุ่ม 5/6 มีการทำงานของไตต่ำกว่ากลุ่ม sham อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่ากลุ่ม 5/6 ที่ได้รับ citrate นั้นมีค่าการทำงานสูงกว่า (2.17$\pm$0.36 ml/kg/BW/min) กลุ่มที่ได้รับน้ำประปา (1.43$\pm$0.63 ml/kg/BW/min) การทดสอบทางสถิติพบว่ามีแนวโน้มที่กลุ่ม 5/6 cit จะมีหน้าที่การทำงานของไตดีกว่าแต่นัยยสำคัญที่ 95% confidence

ไม่พบว่าความแตกต่างของค่า arterial blood gas และ serum potassium และ serum bicarbonate ของหนูแต่ละกลุ่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐาน Basic characteristic in each group

	Control(Sham operation)			
	S_{cit}	S_{tap}	$5/6_{cit}$	$5/6_{tap}$
Week 0	(3)	(3)	(9)	(9)
BUN	27.66 ±4.48	26.67±5.24	49.77±4.53	44.62±3.81
Cr	0.63+0.13	0.46+0.03	0.833+0.07	0.88+0.045
GFR ml/kg/BW (Curea)	4.926 ±0.43	5.14±0.28	2.35±0.25	2.39±0.25
Week 6			(3)	(3)
BUN			40.33±3.92	50.0±13
Cr			1.0±0.15	0.95
GFR ml/kg/BW(Curea+CCr) /2			2.55±.48	2.57±0.60
pH			7.47±0.03	7.45±0.04
HCO3			26.66±2.71	26±0.4
Week 8	(3)	(3)	(6)	(6)
BUN	29.5±1.5	41.66±1.45	53.5±3.55	65.83±9.8
Cr	0.55±0.05	0.7±0.057	1.08±0.08	1.2± 0.24
GFRml/kg/BW(Curea+	6.58±0.33	5.19±0.41	2.17±0.355	1.43±0.63
CCr)/2	7.43±0.03	7.41±0.05	7.45±0.04	7.4±0.04
pH	27.55±0.75	23.7±2.49	27.41±1.5	26.5±0.43
HCO_3				
Na	141±0.25	141.6±0.93	140.66±1.66	141.6±0.92
K	4.5±0.25	4.5±0.036	4.7±0.33	4.9±0.47
Cl	102.5±2.5	106±2.3	101.77±1.96	104.8±1.2
Ca	9.5±0.2	9.66±0.12	9.53±0.13	9.7±0.21
PO4	6.1	6.73±0.12	6.3±0.33	7.48±0.40



กราฟ 1 แสดงการค่า GFR ในกลุ่ม shamcit, shamtap, 5/6 cit และ 5/6 tap ในสัปดาห์ที่ 0 และ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยา

ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อไตหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับ citrate และไม่ได้รับ ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสามารถตรวจพบการเกิด tubulointerstitial fibrosis ได้ใกล้เคียงกันโดยค่า mean ของ fibrosis score มีค่าเท่ากับ

เมื่อผ่านไป 8 สัปดาห์พบว่าเนื้อไตของหนูกลุ่ม sham มีการเกิด fibrosis เช่นกันแต่ปริมาณไม่มาก (รูปที่ 3,4)โดยมีค่า fibrosis score เฉลี่ย (0.33 +0.21) ขณะที่ลักษณะทางพยาธิจากเนื้อไตของหนูกลุ่มที่ถูกตัดไตจะพบปริมาณ fibrosis เป็นจำนวนมากและพบ tubular atrophy, glomeruloscerosis ลักษณะแบบ focal segmental ทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 5/6 tap (รูปที่5, 6) และ 5/6 cit (รูปที่7, 8) พบว่ากลุ่มที่ได้รับ citrate มีการเกิด fibrosis น้อยกว่า พบ focal glomeruloscerosis และ tubular atrophy จากการประเมินด้วยการให้คะแนน fibrosis (โดยพยาธิแพทย์ไม่รู้ว่ากำลังตรวจเนื้อเยื่อจากหนูกลุ่มใดอยู่) พบว่าค่า fibrosis score เฉลี่ยสำหรับหนูกลุ่ม 5/6 tap เท่ากับ (3$\pm$0.37) และกลุ่ม 5/6cit (1.83$\pm$0.4) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.001$, Chi sq)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงเนื้อไตหนูกลุ่ม sham ย้อมด้วย PAS พบว่ามี fibrosis เกิดขึ้นน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงเนื้อไตของหนูกลุ่ม sham ย้อมด้วย Masson จะเห็นว่ามีปริมาณการเกิด fibrosis ต่ำและโครงสร้างของเนื้อไตยังปกติอยู่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงเนื้อไตหนูกลุ่ม 5/6 tap 8 สัปดาห์หลังการทดลอง ย้อมด้วย PAS จะพบ tubular atrophy , fibrosis และ glomerulosclerosis ทั่วไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดงเนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6 tap 8 สัปดาหีหลังการทดลองย้อมด้วย Masson จะเห็นการเกิด fibrosis อย่างกว้างขวาง มีการผิดรูปร่างของโครงสร้างท่อไต และมี fibrosis เกิดขึ้นใน glomerulus

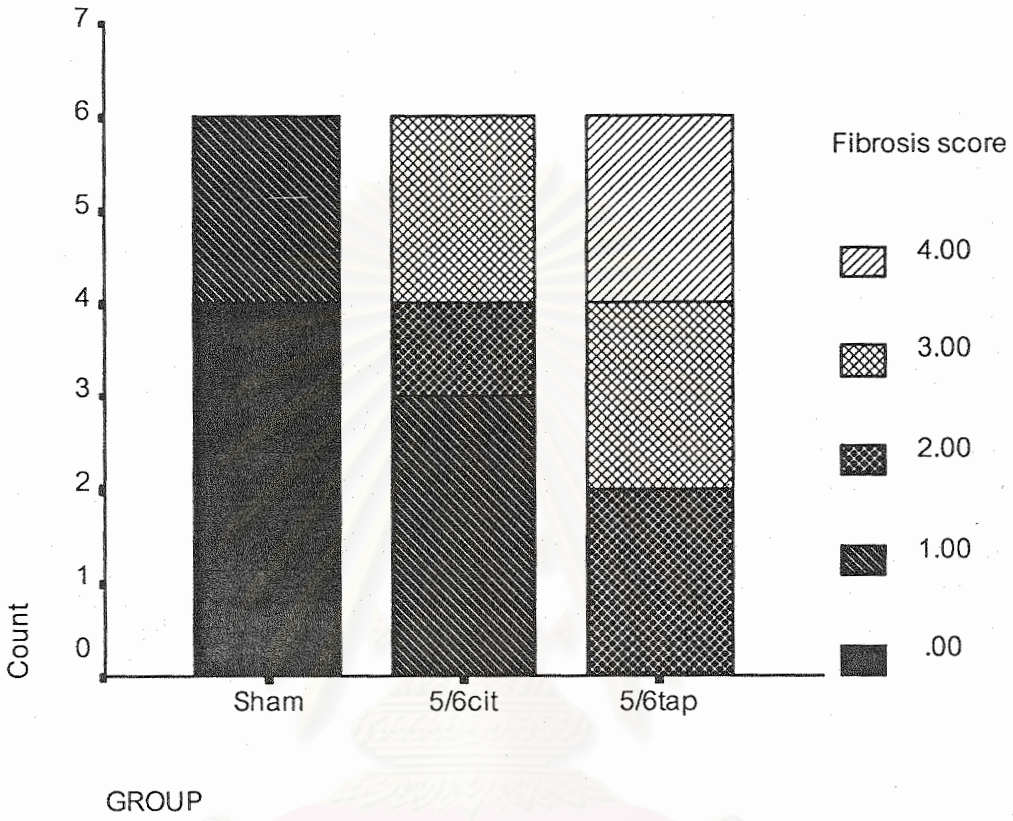
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงเนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6 cit 8 สัปดาห์หลังการทดลอง ย้อม PAS จะเห็นว่ามีการเกิด fibrosis ขึ้นแต่มี tubular atrophy, glomerulosclerosis น้อยกว่ากลุ่ม 5/6 tap

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แสดงเนื้อไตหนูกลุ่ม 5/6 cit 8 สัปดาห์หลังการทดลองย้อมด้วย Masson พบว่ามีปริมาณ fibrosis เพิ่มขึ้น แต่น้อยกว่ากลุ่ม 5/6tap

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปกราฟที่ 2 แสดง fibrosis score ของหนูกลุ่มต่างกัน ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการทดลอง

0 คะแนน ถ้าไม่พบ fibrosis ใน field นั้น

1 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน field นั้น 0-5%

2 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน field นั้น 5-25%

3 คะแนน ถ้าพบ fibrosis ใน field นั้น 25-50%

4 คะแนน ถ้าพบ fibrosisใน field นั้น 50-75%

5 คะแนน ถ้าพบ fibrosisใน field นั้น >75%

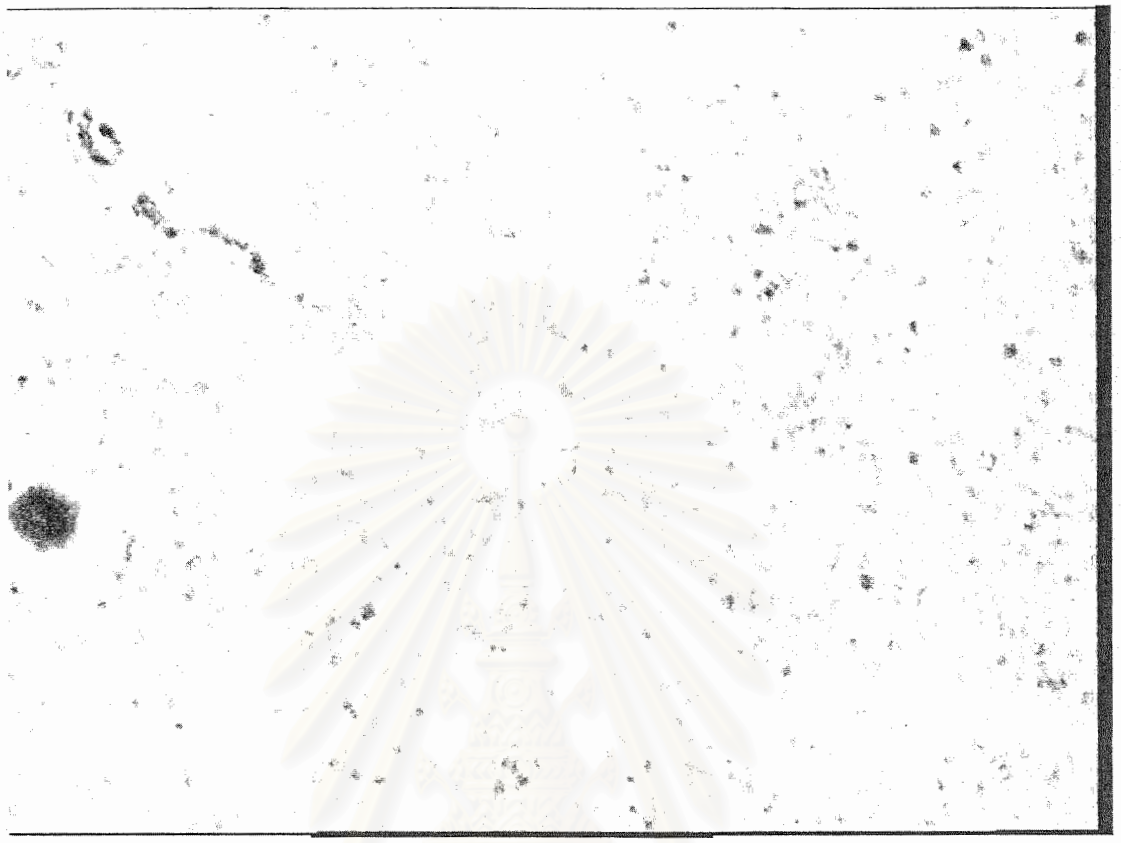
ผลการศึกษา immunohitochemistry ของเนื้อไต

จากการย้อม immunohitochemistry เพื่อตรวจหา α-SMA positive cell พบว่า α-SMA positive cell ในเนื้อไตหนูที่มีอายุน้อยซึ่งใช้เป็น negative control จะย้อมติด α-SMA positive เฉพาะเซลล์ของผนังหลอดเลือดเท่านั้น (รูปที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยของ α-SMA positive cell เป็น 45/ 1000 interstitial cell

การย้อม α-SMA ในหนูที่กระตุ้นให้เกิด fibrosis ด้วยการผูกท่อไตเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งใช้เป็น positive control พบว่ามีการแสดงออกของ α-SMA เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะบริเวณส่วน interstitium (รูปที่ 10) และมีค่า α-SMA positive cell / 1000 interstitial cell เฉลี่ยเท่ากับ 430

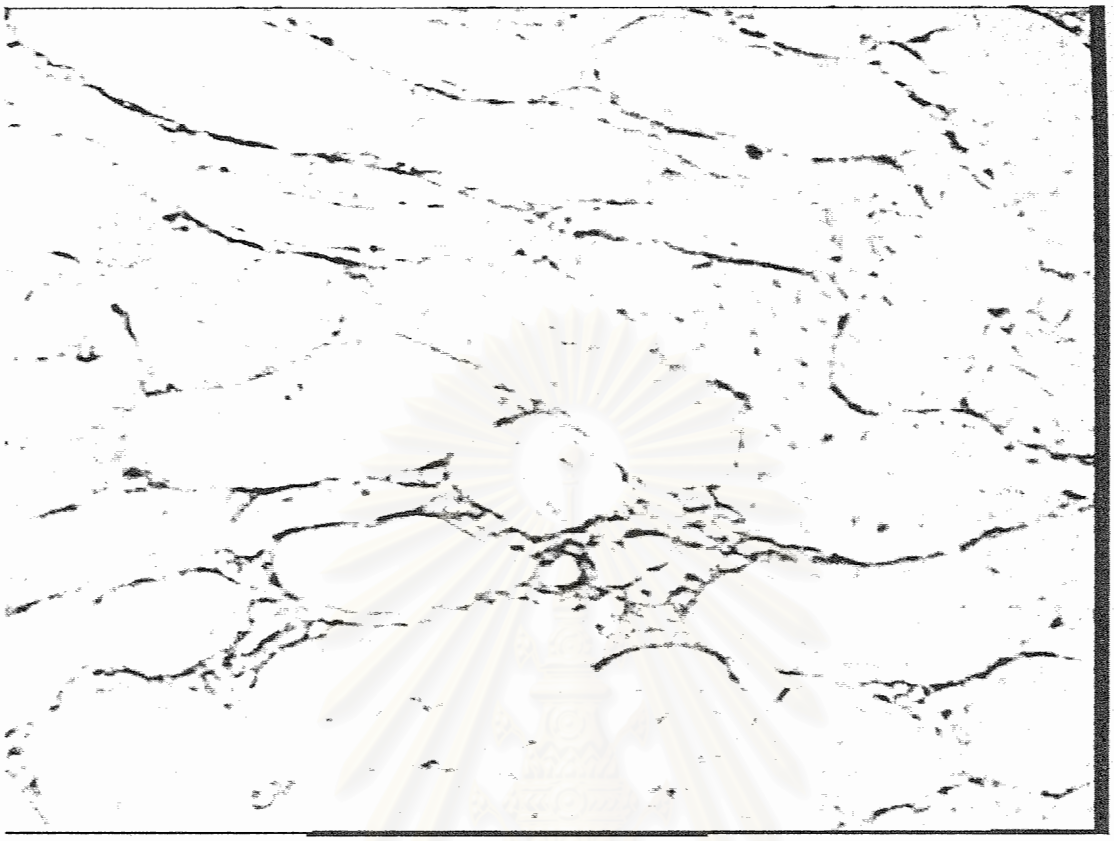
ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการทดลอง หนูกลุ่ม sham จะพบ α-SMA positive เซลล์จำนวนไม่มาก โดยตำแหน่งที่พบมักเป็นผนังหลอดเลือดและบางส่วนของ interstitium (รูปที่11) ส่วนในหนูกลุ่ม 5/6 ที่ได้รับ citrate หรือไม่ได้รับ จะพบ SMA positive cell (รูปที่ 12,13,14) เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากใน บริเวณ interstitium tubular cell และ บางส่วนของ glomerulus สิ่งที่หน้าสนใจประการหนึ่งคือ positive α-SMA ดูเหมือนไม่สัมพันธ์โดยตรงกับ fibrosis ในบริเวณที่มี fibrosis รุนแรงมีแนวโน้มที่จะ พบ α-SMA positive cell น้อย การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 5/6tap และ 5/6 cit พบว่ากลุ่มที่ได้รับ citrate จะพบ α-SMA อยู่เป็นบริเวณแคบๆในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับ citrate จะตรวจพบบริเวณที่มี α-SMA positive cell กินพื้นที่กว้างกว่า (รูปภาพ 12,14) การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ α-SMA positive cell/ 1000 interstitial cell ระหว่างกลุ่ม 5/6cit และ 5/6tap พบว่ามีแนวโน้มที่จะพบ α-SMA positive cell ต่ำกว่าในกลุ่มที่ได้รับcitrate แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปกราฟที่3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



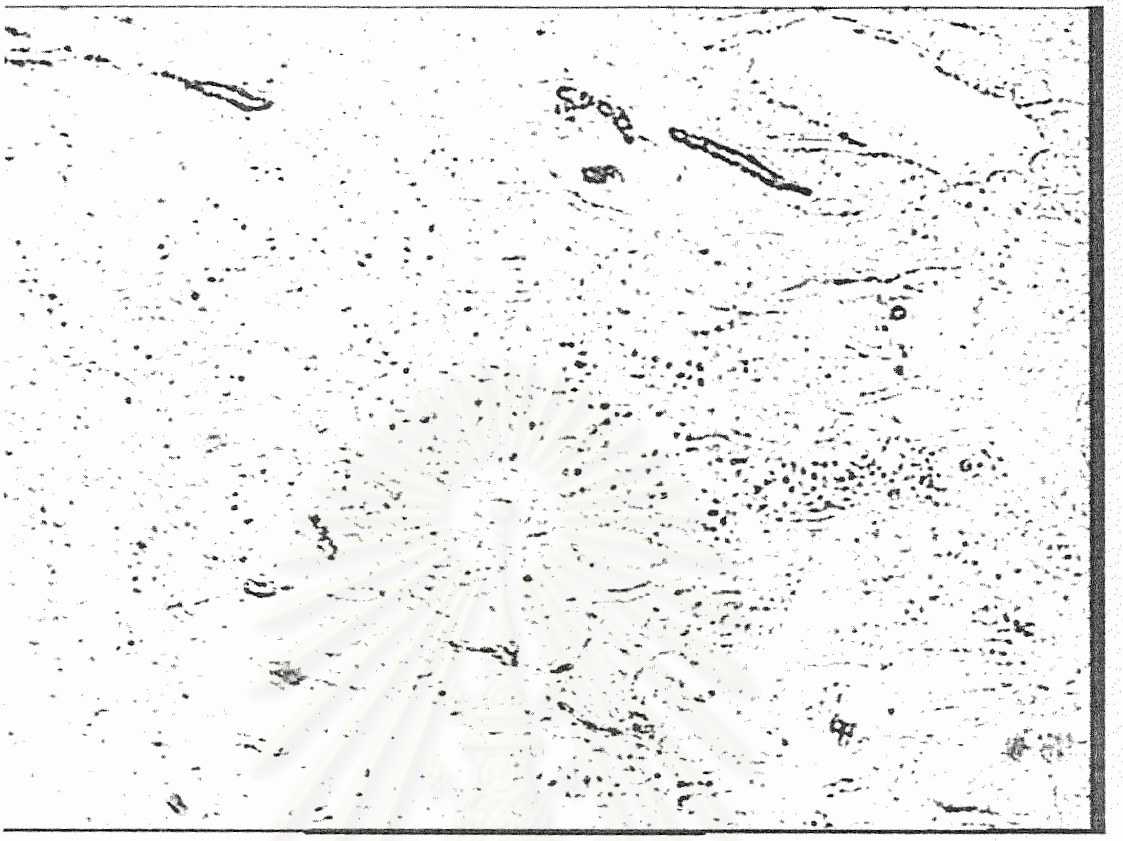
รูปที่ 9 แสดง immunohistochemistry เนื้อไตหนูกลุ่ม negative control ย้อมด้วย anti α-SMA จะพบ α-SMA positive cell น้อยมากโดยพบเฉพาะที่ชั้น media ของหลอดเลือด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



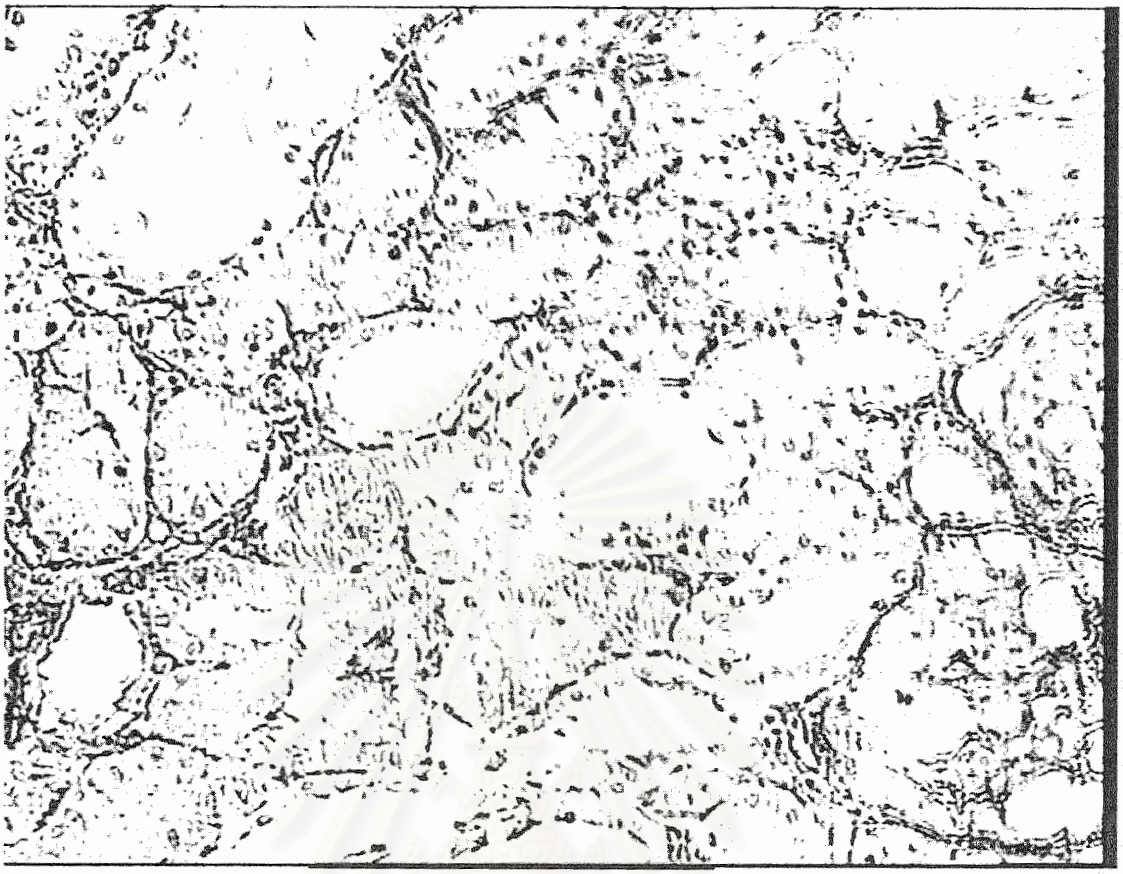
รูปที่ 10 แสดงการย้อมติด SMA ในเนื้อไต positive control ที่กระตุ้นให้เกิด fibrosis หลังจากการผูก ureter ทิ้งไว้ 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



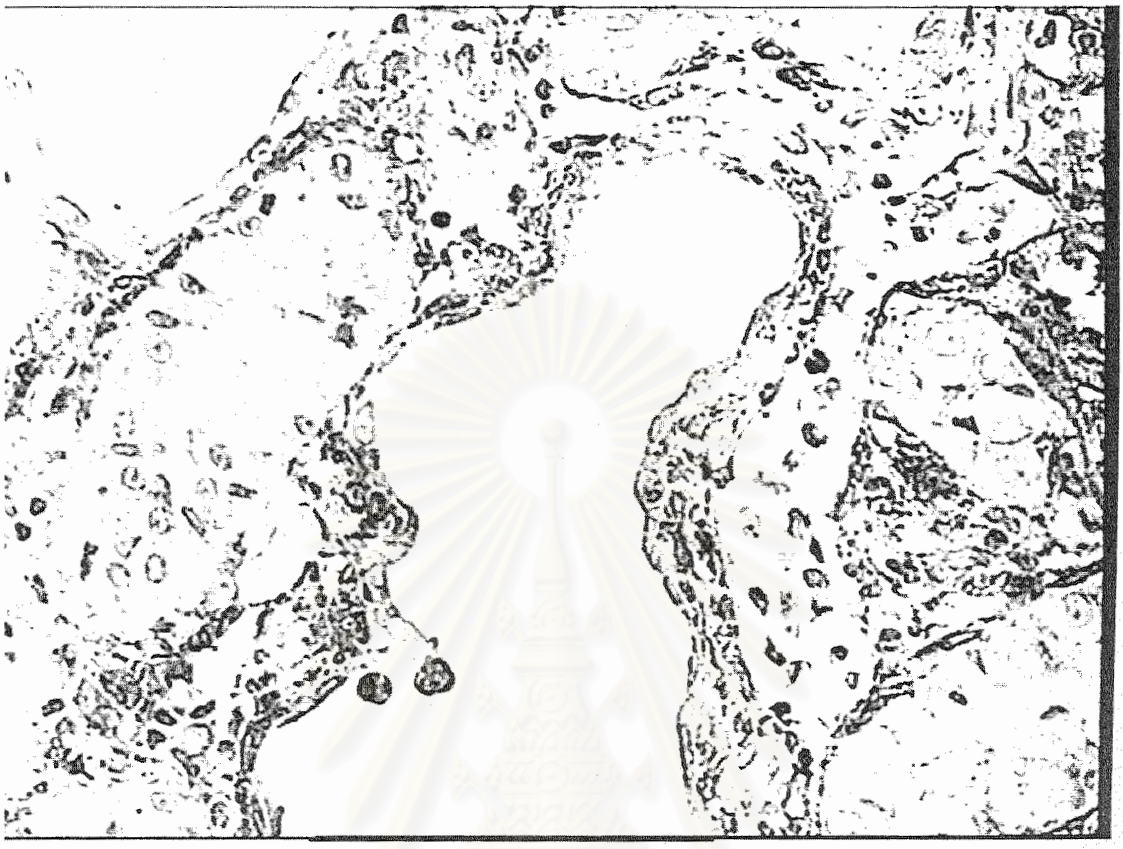
รูปที่ 11 แสดงการย้อมติด α-SMA ในเนื้อไตหนูกลุ่ม sham 8 สัปดาห์หลังการทดลองจะเห็นว่าพบ α-SMA positive cell มากขึ้นกว่า negative control โดยเฉพาะบริเวณ interstitium แต่ส่วนใหญ่ SMA positive ยังคงชัดอยู่ที่หลอดเลือด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



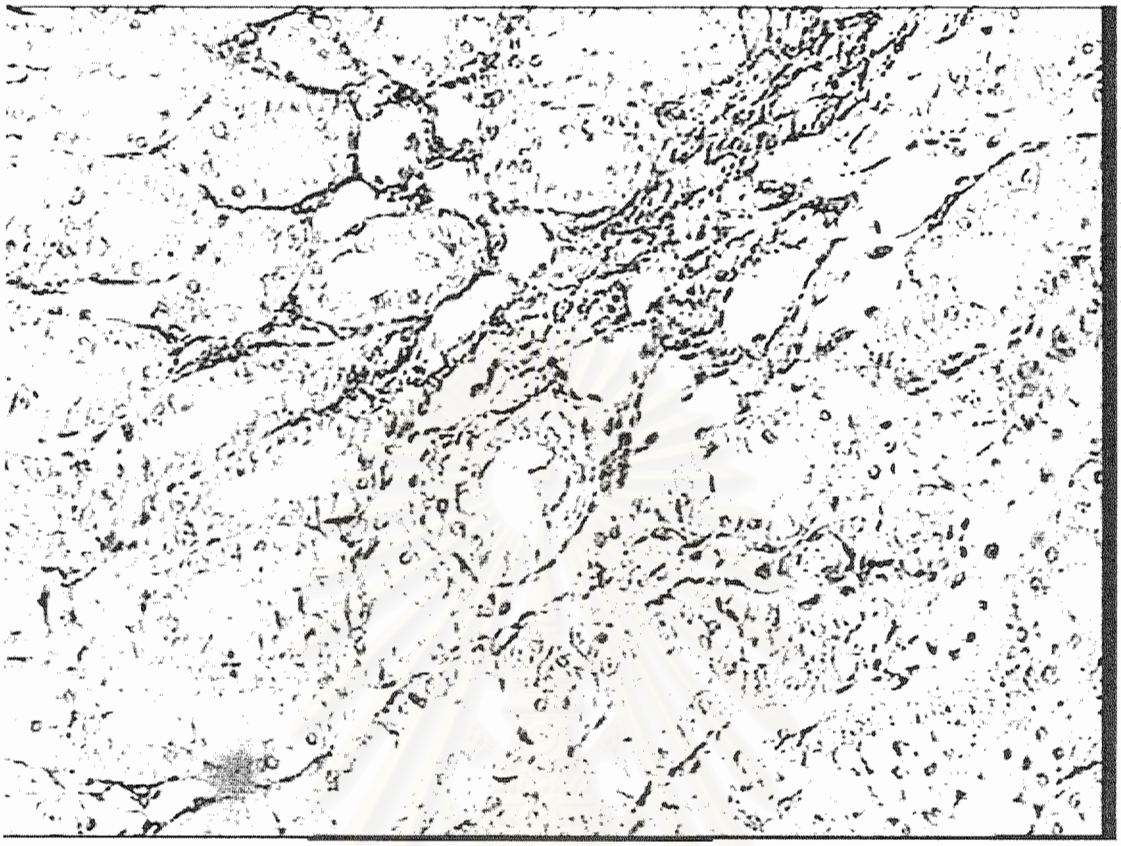
รูปที่ 12 แสดง การย้อม α-SMA ในเนื้อไตหนูกลุ่ม5/6tap จะเห็น SMA positive cell เพิ่มปริมาณขึ้นมาก บริเวณ interstitium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



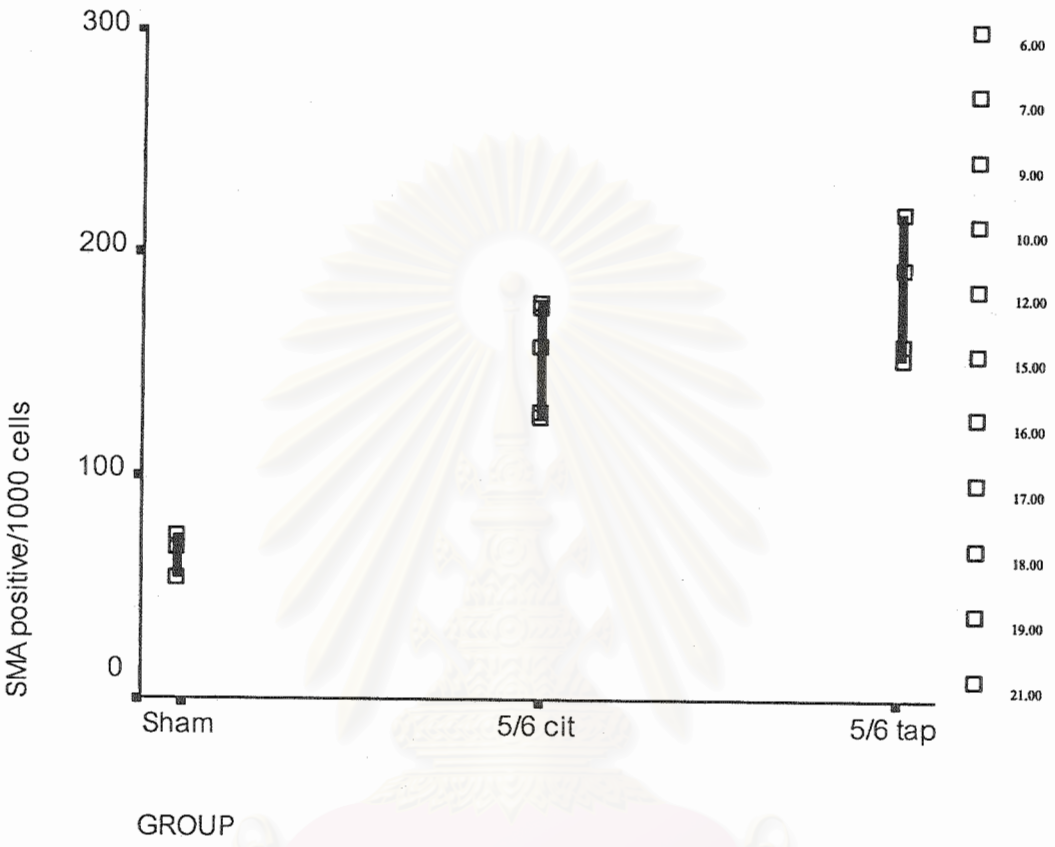
รูปที่ 13 แสดงการย้อมติด α-SMA ในเนื้อไตกลุ่ม 5/6tap (objective len 100X)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงการย้อมติด α-SMA ในเนื้อไตของหนูกลุ่ม 5/6cit สังเกตว่า α-SMA positive cell มีลักษณะเป็นพื้นที่เล็กๆ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม 5/6tap

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปกราฟที่ 3 เปรียบเทียบ α-SMA positive cell ระหว่างหนูทดลองกลุ่มต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาระดับ tissue TGF

ที่ 8 สัปดาห์พบว่าระดับ Tissue TGF ของหนูกลุ่ม sham มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2059.6±260.9 ขณะที่กลุ่ม 5/6 cit มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1771.3±239.5และ กลุ่ม5/6 tap 4716.9±871.2 พบว่ากลุ่มที่ได้ citrate มีค่า tissue TGF ต่ำกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำประปา (ANOVA p value<0.001)

ส่วนที่ 6 สัปดาห์พบว่ามีแนวโน้มที่กลุ่มที่กิน citrate จะมีค่า tissue TGF ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำประปา แต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อวิเคราะห์รวมทั้งในกลุ่มที่ได้รับการรักษา 6 และ 8 สัปดาห์ก็จะยังพบผลดีของ citrate ในการลดปริมาณ tissue TGF อยู่เช่นกัน (ตารางที่ 3 และกราฟที่ 4)

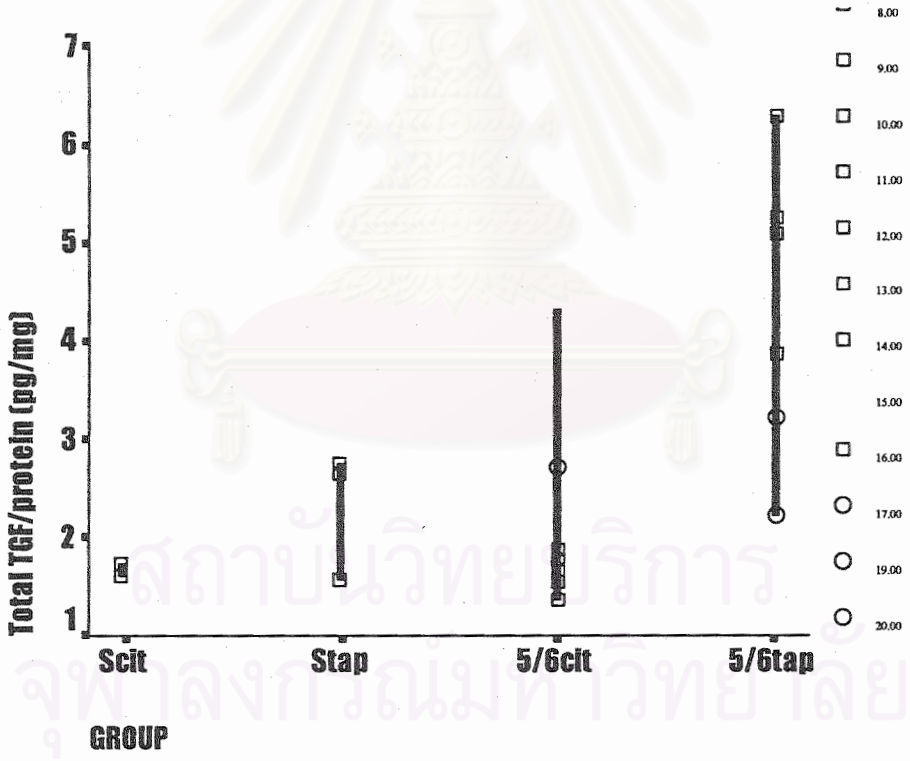
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณ tissue TGF ในหนูทดลองกลุ่มต่างๆ

	Tissue TGF/protein(pg/g)		
	Sham	5/6cit	5/6tap
6wk	-	2659.6±831.9	3546.5±327.6
8wk	2059.6±260.9	1771.3±239.5	4716.9±871.2
Total	2059.6±260.9	2104.4±374.9	4326.8±609.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ปริมาณ tissue TGFß ในหนูกลุ่มต่าง ๆ 2

	Tissue TGFß1 (pg/mg protein)			
	Shamcit	Shamtap	5/6cit	5/6tap
6 wk	-	-	2659.6±831.9	3546.5±327.6
8 wk	1668.2±56.66	2320.5±375.16	1771.3±239.52	4716.9+871.3



กราฟที่ 4 แสดงปริมาณ TGFß1ในเนื้อไตส่วนcortex ของหนูกลุ่มต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ

ผลของ citrate ต่อการชะลอการดำเนินโรคไตนั้น เป็นสิ่งที่แพทย์ให้ความสนใจมานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแนวความคิดที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของแอมโมเนียม Tanner และคณะเป็นกลุ่มแรกที่แสดงผล renoprotective effect ได้ใน model polycystic rats ซึ่งเป็นโรคไตวายที่มีการสูญเสีย citrate ในปัสสาวะเป็นปริมาณมาก และได้เสนอว่า renoprotective ที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้เป็นผลที่เกิดจาก potassium และการลดปริมาณแอมโมเนียดังที่คาด แต่อาจเป็นผลจากการลดภาวะ acidosis[8] แต่ในทางกลับกันจากผลการศึกษาในแบบจำลอง 5/6 nephrectomized โดย Jara และคณะ[10]พบว่าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มี acidosis กลับมีอัตราการเสื่อมของไตต่ำกว่า

ผลการศึกษาที่นำเสนอจากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า citrate มีบทบาทในการชะลอการเสื่อมของไตในแบบจำลอง5/6 nephrectomized ซึ่งผลที่พบนี้คล้ายคลึงกับที่ Tanner และคณะพบใน polycystic kidney model เช่นกัน การวัด GFR ในศึกษาที่นำเสนอนี้มีผลที่คล้ายกับว่า citrate สามารถมีผลเพิ่ม GFR ทั้งในหนูกลุ่ม control ได้โดยตรง ทำให้น่าสนใจว่าการชะลอการลดลงของ GFR ในหนูที่กิน citrate ที่พบนี้สืบเนื่องมาจากการเพิ่ม clearance ของ urea และ creatinine จาก citrate เพียงลำพังหรือไม่ แต่ข้อมูลจากการศึกษาเนื้อได้ไตชี้ให้เห็นว่า citrate นั้นมีคุณสมบัติต้านการเกิด fibrosis ซึ่งเป็นกลไกที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมของโรคไตดังนั้นในแง่การชะลอการลดลงของ GFR นั้นจึงไม่ใช่ผลจากการเพิ่มค่า clearance แต่ในการศึกษานี้พบว่าผลการเปลี่ยนแปลง GFR นั้นดูเหมือนไม่ชัดเจนเท่าที่กลุ่มของ Tanner[8] ได้แสดงไว้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะระยะเวลาในการติดตามสั้นกว่า ปริมาณของ citrate ที่ให้แตกต่างกัน และ polycystic นั้นเป็นโรคที่มีอัตราการสูญเสียของ citrate ในปัสสาวะสูงซึ่งต่างจากโรคไตวายอื่น สิ่งที่พบอีกประการหนึ่งในการศึกษานี้คือผล anorexic effect ของ citrate ในการศึกษา pilot ผู้วิจัยพบว่าการให้ dose ของ citrate ที่สูงเกินไปจะทำให้หนูทดลองกินอาหารและน้ำน้อยลงและมีอาการเลวลงและตาย ปัจจัยนี้มีผลมากในการทดสอบผลของ citrate ดังนั้นเพื่อเลี่ยงปัญหานี้ในงานวิจัยนี้จึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลาย citrate ที่ไม่สูงมากซึ่งที่ความเข้มข้นที่ใช้นี้อาจไม่ใช่ maximum dose ที่จะแสดงฤทธิ์ antifibrosis ข้อแตกต่างอีกประการหนึ่งคือ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของความเป็นกรดในเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม ซึ่งเดิมเชื่อว่าการแก้ไขความเป็นกรดในเลือดด้วย citrate เป็นสาเหตุในการชะลอการเสื่อมของไต ส่วนหนึ่งคงเป็นเพราะในการศึกษานี้มุ่งไปที่การเกิด renal progession ในระยะแรกก่อนที่จะมีการ decompensate ของกระบวนการ acid regulation ของไตซึ่งจะเกิดภายหลัง

ในการศึกษาทางพยาธิวิทยาผู้วิจัยได้พบว่า citrate นั้นมีผลลดการเกิด fibrosis ชัดเจนโดยจะเห็นผลชัดที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์หลังจากการเสีย nephron mass และได้รับ citrate โดยที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์หลัง injury จะสังเกตผลได้ไม่ชัดเจนนัก เมื่อนำมาประมวลกับหน้าที่การทำงานของไตที่ตรวจเห็นว่ามีความสอดคล้องกัน ซึ่งนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า citrate นั้นชะลอการเสื่อมของเนื้อไตได้จริง และหน้าที่การทำงานของไตที่ดีกว่านั้นเนื่องมาจากโครงสร้างของเนื้อไตที่ถูกชะลอไว้ให้เสื่อมน้อยกว่า

จากการตรวจ immunohistochemistry พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ citrate มีแนวโน้มที่จะ express α-SMA ในปริมาณที่ต่ำกว่าแม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ผู้วิจัยได้สังเกตพบประเด็นที่น่าสนใจประการหนึ่งคือ บริเวณที่ตรวจพบการ expression ของ α-SMA รุนแรงนั้นจะไม่ใช่บริเวณที่มี fibrosis ที่เกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง สนับสนุนว่าการแสดงออกของ α-SMA ในกระบวนการเกิด fibrosis นั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เป็น dynamic α-SMA positive cell อาจพบได้มากในช่วงระยะแรกของ post inflammatory phase ซึ่งเป็นช่วงที่ myofibroblast มีบทบาทในการสร้าง extracellular matrix ในปริมาณที่ไม่สมดุลสูง ต่อมาเมื่อกระบวนการ fibrosis เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์แล้ว myofibroblast ส่วนหนึ่งก็จะตายไปซึ่งการตายนี้น่าจะเป็นกระบวนการ apoptosis มากกว่า necrosis ดังนั้นจึงตรวจพบ α-SMA positive cell ได้น้อยในบริเวณที่มี extensive fibrosis ผู้วิจัยยังพบว่ารูปแบบการกระจายของ α-SMA positive cell ที่พบในเนื้อไตของหนูที่ถูกตัดไตกลุ่มที่ได้ citrate และไม่ได้รับ มีความแตกต่างกันโดยกลุ่มที่ได้ citrate มี α-SMA positive cell กระจายตัวเป็นหย่อมๆ ขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับ citrate จะพบ α-SMA positive cell กระจายทั่วไปในเนื้อไต ซึ่งอาจนำไปอธิบายการเกิด fibrosis ที่แตกต่างกันได้ว่าในกลุ่มที่ได้รับcitrate นั้นการ transdifferentiation ไปเป็น myofibroblast จะถูกจำกัดเฉพาะบริเวณจึงนำไปสู่การเกิด fibrosisที่น้อยกว่า

ระดับ tissue TGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิด fibrosis ของไตในทุกแบบจำลอง พบว่าการพยายามลดปริมาณ tissue TGF ด้วยยา เช่น ACEI, AII,Statin, และการให้ anti TGF antibody, antibody ต่อ TGF receptor, decorin พบว่าสามารถลดปริมาณการเกิด fibrosis ในไตได้ ขณะที่การ up regulate ของ TGF จะยิ่งเป็นการเร่งให้เกิด fibrosis มากขึ้น ผลการวัดระดับ tissue TGF ในการศึกษานี้พบว่า citrate สามารถลดปริมาณ tissue TGF ได้ชัดเจน และการลด tissue TGF นี้จึงสามารถนำไปอธิบายการชะลอการเสื่อมของไต และการลดปริมาณการเกิด fibrosis การจำกัดการกระจายของ SMA positive cell ได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยเชื่อว่าผลจากการลด tissue TGF น่าจะมีส่วนสำคัญที่สุดสำหรับคุณสมบัติต้านการเกิด fibrosis ของ citrate

จากการศึกษานี้สามารถนำไปสู่การรักษาไตวายเรื้อรังแบบใหม่ด้วยการให้สารละลาย citrate ควบคู่ไปกับการรักษาเดิมอื่นๆ ในลักษณะ add-on สิ่งที่อาจต้องระวังคือปริมาณ potassium ที่ได้กับสารละลาย citrate ทางที่จะหลีกเลี่ยงคืออาจใช้ sodium citrate หรือ calcium citrate แทน

รายการอ้างอิง

1. โศภณ นภาธร กลไกการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง ใน สมชาย เอี่ยมอ่อง.Hemodiaysis.พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร Text and Journal Publication. 2542 หน้า 1-42
2. Strutz F,Mueller G. Mechanism of Renal Fibrogenesis. In: Nelson EG,Couser WG. **Immunologic Renal Disease**, 2nd edition Lippincott and Wilkins, Philadephia USA 2001, 73-104
3. Derynck R, Choy L. Transfroming growth factor-ß and its receptors. In: Thomson AW.The **Cytokine Handbook** 3rd edition Redwood Books, Wiltshire, UK. 1998,593-634
4. Lotspeich WD. Renal hypertrophy in metabolic acidosis and its relation to ammonia excretion. **Am J Physiol** 1965;208:1135-42.
5. Wolf G, Neilson EG. Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. **Kidney Int** 1991;39:401-20.
6. Hering-Smith KS, Gambala CT, Hamm LL. Citrate and succinate transport in proximal tubule cells. **Am J Physiol** 2000;278:F492-6.
7. Tanner GA.Potassium citrate/citric acid intake improves renal function rats with polyclstic kidney disease. **J Am Soc Nephol**;1998:1242-8.
8. Tanner GA,Tanner JA.Citrate therapy for polycytic kidney disease in rats. **Kidney Int** 2000;58:1859-69.
9. Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP,Yang AH, Mu W,et al. Tubular epithelial – myofibroblast transdifferential in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney Int** 1998;54:869-76.
10. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. **Kidney Int.**2000; 58:1023-1032

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย กฤษณพงศ์ มโนธรรม เกิดเมื่อ วันที่ 25 เมษายน 2512 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมต้นและปลายจาก โรงเรียน บดินทร์เดชา(สิงห์ สิงหเสนี) จบแพทยศาสตร์บัณฑิตจาก คณะแพทยศาสตรศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี 2536 และได้เข้ารับราชการกองโรงพยาบาลเลิดสิน กรมการแพทย์ เข้าศึกษาต่อในสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไปที่ โรงพยาบาลราชวิถี ระหว่างปี 2538-2541 จากนั้นกลับมาทำงานที่โรงพยาบาลเลิดสิน และได้เข้ารับการฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต ณ. หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี 2543 จนถึงปัจจุบัน

สมาชิกสภาพ และรางวัลที่เคยได้รับ

รางวัลแพทย์ประจำบ้านชั้นปีที่ 1 ดีเด่นกลุ่มงานอายุรกรรมโรงพยาบาลราชวิถี ปี 2539

รางวัลแพทย์ประจำบ้านชั้นปีที่ 2และ 3 ดีเด่นกลุ่มงานอายุรกรรมโรงพยาบาลราชวิถี ปี 2540

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

รางวัลชนะเลิศการประกวดผลงานวิจัยการประชุมวิชาการโรงพยาบาลเลิดสินประจำปี 2542

ข้าราชการดีเด่น โรงพยาบาลเลิดสิน ปี 2543

ข้าราชการดีเด่น กรมการแพทย์ ปี 2543

ข้าราชการพลเรือนดีเด่นและรางวัลครุฑทองคำ สำนักนายกรัฐมนตรี ปี 2543

รางวัลรองชนะเลิศการนำเสนอผลงานวิจัย การประชุมประจำปีสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย ปี 2543

ทุนเดินทางจาก Japanese Dialysis Therapy Society เพื่อเสนอผลงานวิจัยในการประชุมประจำปีครั้งที่43 ณ.ประเทศญี่ปุ่น ปี 2545

รางวัลผลงานวิจัยแพทย์ประจำบ้านต่อยอดดีเด่น การประชุมราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ประจำปี 2545

ผลงานทางวิชาการของผู้เขียนวิทยานิพนธ์

1. Manotham K, Eiam-Ong S. Radiocontrast nephropathy. In Nephrology. Eiam-Ong S. editors. Text and Journal Publication Co. Bangkok 2000:1189-1202
2. Manotham K, Eiam-Ong S. Diuretics. In Nephrology. Eiam-Ong S. editors. Text and Journal Publication Co. Bangkok 2000:1659-1690
3. Infectious Control Committee of Department of Medical Service, Criteria to Diagnosis Nosocomial Infection. Meka press Bangkok 2000

4. **Manotham** K, Booranalertpaisarn V, Chusil S,Tungsanga K, Eiam-Ong S.Estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR) from serum creatinine in kidney transplant patients. **JNST 2000;6:394**
5. **Manotham** K, Eiam-Ong S. Integrins and Kidney. **JNST 2001;7:8-24**
6. Pisitkul T, **Manotham** K,Eiam-Ong S,Praditpornsilpa K,Chusil S,Tungsanga K. " Chula Version" Computational Software For Formal Urea Kinetic Modeling (UKM) on Microsoft Excel: The Practical Method For Measurement of Hemodialysis Adequacy. **JNST;7 Suppl 2:46**
7. **Manotham** K, Booranalertpaisarn V, Eiam-Ong S, Praditpornsilpa K,Tungsanga K, Chusil S.Accurately Simple Estimation of Glomerular Filtration Rate in Kidney Transplant Patients.**Transplantation Proceeding 2002;34**(in press)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย