

บทคัดย่อ

ภาวะไตวายเฉียบพลันเป็นภาวะที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องและมีความเสี่ยงสูงภายหลังจากการเกิดภาวะหัวใจวายเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามกลไกของพยาธิกำเนิดของภาวะไตวายเฉียบพลันหลังจากเกิดภาวะหัวใจวายเฉียบพลันยังคงมีความซับซ้อนและยังต้องการวิธีการป้องกันการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันที่รวดเร็ว โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 ซึ่งพบมากที่ผนังเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตด้านที่ติดกับหลอดเลือดที่บริเวณท่อไตส่วนต้น มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารจำพวกสารอินทรีย์ประจุลบออกจากร่างกาย รวมทั้ง สารพาราอะมิโนฮิปปูเรต (para-aminohippurate, PAH) ที่ถูกขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 และ เอสโตรนซัลเฟต (estrone sulfate, ES) ที่ถูกขนส่งผ่านเฉพาะโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาผลและกลไกของภาวะไตวายเฉียบพลันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดอย่างเฉียบพลันต่อการขนส่งสารออกฤทธิ์ประจุลบในท่อไต โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมกลุ่มหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันโดยทำการผูกที่เส้นเลือดแดง left anterior descending coronary artery เป็น เวลา 30 นาที และกลุ่มหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่โดยการผูกเส้นเลือด เป็น เวลา 30 นาทีแล้วตามด้วยให้เลือดกลับมาเลี้ยงใหม่เป็นเวลา 120 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำการวัดค่าการไหลเวียนเลือดไปยังไต การทำงานของไต การทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่ไต การทำงานของไมโทคอนเดรียที่ท่อไต และตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีต่อภาวะไตวายเฉียบพลัน ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันมีความเร็วในการไหลเวียนเลือดเข้าสู่ไตและแรงดันเลือดที่ไตลดลงประมาณ 40% ในขณะที่ปัจจัยเหล่านี้สามารถกลับคืนสู่ค่าปกติได้ในช่วงมีเลือดมาเลี้ยงใหม่ที่หัวใจ อีกทั้งพบว่าการเหนี่ยวนำในสองสภาวะทำให้การทำงานของไตลดลง ซึ่งบ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับยูเรียไนโตรเจนในเลือดและค่าครีเอตินินในเลือด ทั้งนี้หนูในกลุ่มหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่จะมีภาวะเครียดออกซิเดชันอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับค่ามาลอนไดไฮด์และการลดลงของยีนต้านอนุมูลอิสระ อาทิ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และแคตาเลส ในขณะที่สารที่ตอบสนองต่อการอักเสบ อาทิ ทีเอ็นเอฟแอลฟา อินเตอร์ลิวคินชนิด 1 เบต้า เอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนสชนิดที่ 2 เอนไซม์ไนโตรริกออกไซด์ซินเทสชนิด inducible และยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน อาทิ นิโคตินาไมด์อะดีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตออกซิเดสชนิดที่ 2 และ 4 และแซนทีนออกซิเดส มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ยังพบว่ามีแนวโน้มการทำงานของไมโทคอนเดรียในท่อไต บ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับสารอนุมูลอิสระ การเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ การบวมของไมโทคอนเดรีย กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเปสชนิดที่ 3 และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของไมโทคอนเดรียในท่อไตอย่างต่อเนื่องตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น ตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บที่ท่อไตบริเวณส่วนต้น ได้แก่ kidney injury molecule-1 และอินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 18 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากผลดังกล่าว ทำให้มีการขนส่งสาร PAH ลดลงในกลุ่มหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน โดยสอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 ที่ท่อไตลดลงด้วย โดยการเหนี่ยวนำดังกล่าวไม่มีผลต่อการขนส่งสาร ES ด้วยโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าการเหนี่ยวนำทั้งสองสภาวะทำให้อัตราการหมุนเวียนของการขนส่งโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ซึ่งมีวิถีทางเดียวกันบกพร่องไป โดยพบว่าทำให้การทำงานของโปรตีน PKC ζ /Akt ลดลงและการทำงานของโปรตีน PKC α /NFkB เพิ่มขึ้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่า การเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ส่งผลทำให้เกิด ความบกพร่องของการขนส่งและการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง

สารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 รวมทั้ง โปรตีนที่ควบคุมการหมุนเวียนการขนส่งโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ส่งผลทำให้ภาวะไตวายเฉียบพลันมีอาการแย่ลงได้

ฮิวแมนินซึ่งเป็นเปปไทด์ที่พบในไมโทคอนเดรียซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารฮิวแมนินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถลดภาวะหัวใจขาดเลือด ทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้นผ่านทางโปรตีนที่ส่งสัญญาณผ่านทาง AMPK และ eNOS ในหนูถีบจักรที่มีภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ นอกจากนี้สารฮิวแมนินยังสามารถช่วยลดภาวะดื้ออินซูลินโดยการเพิ่มการทำงานของโปรตีนตัวรับรู้อินซูลินชนิดที่ 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2) และโปรตีน Akt ในหนูที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไตจากภาวะเบาหวานได้ ฮิวแมนินยังช่วยลดภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดภายในไตได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของฮิวแมนินในการป้องกันภาวะไตวายเฉียบพลัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษาภาวะไตวายเฉียบพลันยังไม่มีการศึกษา โดยในการวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลและกลไกของการให้สารฮิวแมนินในภาวะก่อนเหนี่ยวนำภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ และผลและกลไกของการให้สารฮิวแมนินในช่วงปล่อยเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ต่อภาวะไตวายเฉียบพลันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดอย่างเฉียบพลันต่อการขนส่งสารออกฤทธิ์ประจุลบในท่อไต ผลการศึกษาพบว่า การให้สารฮิวแมนิน ในภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ไม่กระทบต่อความเร็วในการไหลเวียนเลือดเข้าสู่ไตและแรงดันเลือดที่ไต และยังสามารถช่วยลดค่าครีเอตินินในเลือดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ได้ ในขณะที่การให้สารฮิวแมนินในช่วงปล่อยเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่มีผลต่อไหลเวียนเลือดเข้าสู่ไตและแรงดันเลือดที่ไตเล็กน้อยทำให้การทำงานของไตลดลง ซึ่งบ่งชี้ได้จากการเพิ่มขึ้นของทั้งระดับยูเรียไนโตรเจนในเลือดและค่าครีเอตินินในเลือด ทั้งนี้หนูในกลุ่มที่ได้รับสารฮิวแมนินก่อนเหนี่ยวนำภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่จะทำให้ภาวะเครียดออกซิเดชันลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับค่ามาลอนไดไฮโดรในเลือดและแนวโน้มการลดลงในเนื้อเยื่อไตส่วนนอก ทั้งนี้ยังพบว่ามีแนวโน้มลดความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในท่อไต บ่งชี้ได้จากการลดลงของระดับสารอนุมูลอิสระ การเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ การบวมและการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยาของไมโทคอนเดรียในท่อไต โดยผลดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนนักในหนูกลุ่มที่ให้สารฮิวแมนินในช่วงปล่อยเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ ซึ่งพบว่า สามารถช่วยลดระดับสารอนุมูลอิสระของไมโทคอนเดรียในท่อไตได้เพียงอย่างเดียวโดยไม่ช่วยเรื่องการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ การบวมและการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยาของไมโทคอนเดรียในท่อไตได้ อย่างไรก็ตามสารฮิวแมนินไม่สามารถทำให้การขนส่งสาร PAH และอัตราการหมุนเวียนของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 ลดลงได้ในหนูทั้งในกลุ่มทั้งกลุ่มที่ให้สารฮิวแมนินก่อนการเหนี่ยวนำและกลุ่มที่ให้สารในช่วงปล่อยเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่ ทั้งนี้ผลของการให้สารฮิวแมนินทั้ง 2 กลุ่ม ยังสามารถช่วยลดการทำงานของโปรตีน PKC α ซึ่งเกี่ยวข้องกับภาวะออกซิเดชันภายในเซลล์ได้ แต่ไม่มีผลกับการทำงานของโปรตีน Akt ซึ่งเกี่ยวข้องกับอัตราการหมุนเวียนของการขนส่งโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 และ 3 นอกจากนี้เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เนื้อเยื่อไต พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนฮิวแมนินในเซลล์เนื้อเยื่อไตชั้นนอก ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่า การให้สารฮิวแมนินก่อนการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและภาวะหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่จะสามารถช่วยลดภาวะหัวใจขาดเลือด ลดระดับสารอนุมูลอิสระทั้งในเลือดและในเซลล์ไตได้ แต่ไม่สามารถลดความบกพร่องการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิดที่ 1 ซึ่งอาจส่งผลต่อภาวะไตวายเฉียบพลันได้ ดังนั้นการให้สารฮิวแมนินร่วมกับยาหรือสารที่ช่วยลดภาวะไตวายเฉียบพลันน่าจะเป็นกลยุทธ์การฟื้นฟูภาวะหัวใจวายเฉียบพลันและเพื่อป้องกันการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันได้ดีที่สุด

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a high frequent and common complication following acute myocardial infarction (AMI). However, the precisely pathophysiological consequences of AKI after AMI are complicated and needed a better define for early prevention. Renal tubular organic anion transporter 1 (Oat1) and 3 (Oat3) are highly expressed on basolateral membrane and play a pivotal role in active clearance of organic anions including para-aminohippurate (PAH) which can be transported by Oat1 and Oat3 while estrone sulfate (ES) is specific for Oat3, and uremic toxins produced from organ dysfunctions. This study examined and identified the effect of AKI induced by myocardial infarction on renal basolateral transporter function using clinical setting of pre-renal AKI model. Cardiac ischemia (CI) and cardiac ischemic and reperfusion (CIR) were induced in rats by 30-min left anterior descending coronary artery occlusion and 30-min occlusion followed by 120-min of reperfusion, respectively. The renal hemodynamic parameters, kidney function, renal transporter and renal mitochondrial function were subsequently determined along with renal biochemical markers. Results showed that CI markedly reduced renal blood flow velocity and perfusion pressure by approximately 40% while these parameters were recovered during reperfusion phase. CI and CIR progressively declined renal function as indicated by increasing BUN and creatinine. Moreover, CIR significantly increased malondialdehyde levels and decreased antioxidant genes; superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, resulted in generation of oxidative stress. In addition, pro-inflammatory cytokines; tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 beta, cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase, and stress-response genes, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) 2, NOX4, xanthine oxidase, were dominantly increased in CIR. Mitochondria dysfunction as indicated by increasing reactive oxygen species, membrane depolarization, swelling, caspase 3 activation and the changes of mitochondrial morphology were also exacerbated in CIR. Furthermore, an early significant detection of proximal tubular injury biomarkers including kidney injury molecule-1 and interleukin-18 were highly detectable in CI and CIR, respectively. All of which deteriorated renal transport of PAH, but not ES, mainly mediated by down-regulating Oat1 expression during a sudden ischemia. Moreover, trafficking rate of Oat1 and Oat3 transport that share a common pathway were continuously blunted by down-regulating PKC α /Akt and up-regulating PKC α /NFkB during CI and CIR. Thus, this promising study indicates that a

sudden myocardial ischemia and I/R condition abruptly impaired renal basolateral transporter 1 and their regulatory proteins which could potentially worsen AKI.

Humanin (HN), a novel mitochondrial peptide, ameliorated cardiac infarction size and improved cardiac function through AMPK-eNOS signaling pathway in myocardial I/R mice. HN has also shown to improve insulin resistance by restoring insulin receptor substrate 2 (IRS2)/Akt phosphorylation in diabetic kidney disease. In addition, HN has shown to reduce renal microvascular remodeling in the early stage of kidney disease both *in vitro* and *in vivo* models, suggesting that HN could be a novel therapeutic intervention to prevent early stage kidney disease. However, the potential role of HN on the impact of renal transport function has not yet been completely addressed. This study aims to examine the effects and the mechanisms of humanin on renal organic anion transporter functions induced by myocardial I/R injury under pre-humanin treatment 15-min before ischemic period (pre-HN) and post-humanin treatment 15-min after reperfusion (post-HN). Results showed that humanin did not alter on renal blood flow velocity, perfusion pressure, and improved renal function in pre-H group as indicated by reducing creatinine while these parameters were not markedly recovered during reperfusion phase (post-HN). Moreover, pre-HN group significantly reduced oxidative stress as indicated by reduced malondialdehyde levels in both in plasma and renal cortical tissues. Mitochondria dysfunction caused by increasing reactive oxygen species, membrane depolarization, swelling, and the changes of mitochondrial morphology were also restored in pre-H treatment. Nonetheless, these anti-oxidative effects of humanin in both systemic and renal cortical tissues did not significantly change in post-H treatment due to humanin was only prevented mitochondrial ROS in myocardial I/R. Furthermore, neither deteriorated renal transport of PAH, mediated by Oat1 and Oat3, nor trafficking rate of Oat1 and Oat3 improved by pre- or post-humanin treatments. In addition, both indirect and direct administration of humanin *in vivo* and *in vitro*, respectively, did not alter humanin protein expression in renal cortical tissues. Therefore, this study suggests that pre-treatment with humanin could rather exert mitoprotective effects against renal mitochondria dysfunction in AMI induced AKI. Combination of humanin with pharmacological intervention that restored renal Oat1/3, such as, indomethacin might allow for more effective therapeutic strategy for early reversing AMI and preventing AKI.