

การศึกษาเปรียบเทียบภาวะภูกระดานของเซลล์เยื่อบุชนิดพาราไธล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน  
แบบส่องผ่านในผู้ป่วยกลุ่มอาการเนฟโฟรติก โรคเอพเอดจีเอส และโรคมินิมัลเซนจ์ชนิดปฐมภูมิ



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

An Analysis of Activated Parietal Epithelial Cells in Patients with  
Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis and Minimal Change Disease Using  
Transmission Electron Microscopy

Mr. Pongpratch Puapatanakul



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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาเปรียบเทียบภาวะถูกกระตุ้นของเซลล์เยื่อบุชนิด  
พาไรทัล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านใน  
ผู้ป่วยกลุ่มอาการเนฟโรติก โรคเอสเอสดี และโรค  
มินิมัลเซนจ์ชนิดปฐมภูมิ

โดย

นายปองปราชญ์ พัวพัฒนกุล

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. ปวย อุ๋นใจ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ธนินทร์ อัครวิเชียรจินดา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. ปวย อุ๋นใจ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ แพทย์หญิง เลลानी ไพฑูรย์พงศ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(พันตรี นายแพทย์ มงคล เจริญพิทักษ์ชัย)

ปองปราชญ์ พัวพัฒนกุล : การศึกษาเปรียบเทียบภาวะถูกกระตุ้นของเซลล์เยื่อบุชนิดพารีทัล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในผู้ป่วยกลุ่มอาการเนฟโรติก โรคเอฟเอสจีเอส และโรคมินิมัลเชนจ์ ชนิดปฐมภูมิ (An Analysis of Activated Parietal Epithelial Cells in Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis and Minimal Change Disease Using Transmission Electron Microscopy) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ปวย อุ๋นใจ, 80 หน้า.

ที่มาของงานวิจัย: บทบาทของเซลล์เยื่อบุชนิดพารีทัล (parietal epithelial cells, PECs) ในโกลเมอรูลัส (glomerulus) เริ่มเป็นที่ทราบกันมากขึ้น และมีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยโรค focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) จะพบ PECs ที่ถูกกระตุ้น (activated PECs) โดยการตรวจจิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีนสัญลักษ์ CD44 และสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคจากโรค minimal change disease (MCD) ได้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาที่วิเคราะห์ความแตกต่างของ activated PECs โดยใช้ลักษณะโครงสร้างของเซลล์จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบการตรวจพบ activated PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS ผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ

วิธีการศึกษา: ทบทวนข้อมูลผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 ถึง 2559 คัดเลือกผู้ป่วยที่มีข้อมูลทางพยาธิวิทยาครบถ้วน และได้รับการวินิจฉัยโรคถูกต้องตามเกณฑ์การวินิจฉัย นำชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่บรรจุอยู่ในเรซินมาทำการตัดชิ้นเนื้อ และวางลงบน slot grid ที่ถูกหุ้มด้วยฟิล์ม formvar เพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ทำการบันทึกภาพของทั้ง glomerulus และ PECs ทุกเซลล์ใน glomerulus ด้วยเทคนิค montage ที่กำลังขยายสูง

ผลการศึกษา: จากการทบทวน พบผู้ป่วยโรค FSGS 7 ราย และผู้ป่วยโรค MCD 8 รายที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์การศึกษาและมีชิ้นเนื้อเพียงพอสำหรับการตรวจเพิ่มเติมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการศึกษาพบ activated PECs ในผู้ป่วยโรค FSGS ทุกราย (ร้อยละ 100) และพบในผู้ป่วยโรค MCD 6 จาก 8 ราย (ร้อยละ 80) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.467$ ) ผู้ป่วยโรค FSGS พบ activated PECs เฉลี่ยร้อยละ 53.6 (95% CI = 26.6 - 80.6) ของ PECs ทั้งหมด มากกว่าผู้ป่วยโรค MCD ซึ่งพบ activated PECs เฉลี่ยร้อยละ 15.8 (95% CI = 3.1 - 28.5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.004$ )

สรุป: Activated PECs สามารถพบได้ทั้งในผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD แต่พบปริมาณที่มากกว่าในโรค FSGS การพบ activated PECs ในปริมาณมากอาจสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกโรค FSGS ออกจากโรค MCD ได้ แต่ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นต่อไป

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5874045630 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS / MINIMAL CHANGE DISEASE / PARIETAL EPITHELIAL CELL / TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

PONGPRATCH PUAPATANAKUL: An Analysis of Activated Parietal Epithelial Cells in Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis and Minimal Change Disease Using Transmission Electron Microscopy. ADVISOR: PROF. TALERNGSAK KANJANABUCH, M.D., CO-ADVISOR: DR. PUEY OUNJAI, Ph.D., 80 pp.

Background: Demonstration of activated glomerular parietal epithelial cells (PECs) using immunohistochemistry of CD44 has been proposed to help distinguishing focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) patients from minimal change disease (MCD). However, the comparison of activated PECs by using morphologic criteria under transmission electron microscopy (TEM) between these 2 diseases has never been studied.

Objectives: To study the presence of activated PECs in FSGS patients in comparison to those in MCD patients.

Methods: Renal specimens of patients with primary FSGS and MCD at King Chulalongkorn Memorial Hospital from 2013 to 2016 were retrieved. The adequate glomerular sections (diameter > 100  $\mu\text{m}$ ) were placed on formvar-coated slot grid and analyzed under montage TEM providing high magnification images of each PECs.

Results: Seven FSGS and 8 MCD patients had adequate renal specimens for the TEM studies. Activated PECs were observed in all FSGS patients (100%) and 6 out of 8 MCD patients (80%) of which the difference was not statistically significant ( $p = 0.467$ ). The mean percentage of activated PECs in FSGS patients was significantly higher than MCD patients (53.6%, 95% CI = 26.6 - 80.6 vs 15.8%, 95% CI = 3.1 - 28.5;  $p = 0.004$ ).

Conclusions: Activated PECs can be observed in patients with primary FSGS and MCD but at a significantly higher proportion in FSGS patients. The markedly increased activated PECs might provide a new diagnostic approach to distinguish FSGS from MCD. Further validation in a larger sample is still needed.

Department: Medicine

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความกรุณา และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ศ.นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ และ ดร.ปวิญ อุ่่นใจ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมตามลำดับ ที่ได้เสียสละเวลาช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในขั้นตอนการวิจัยอย่างดีเสมอมา ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยา และเจ้าหน้าที่แผนกกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการตัดชิ้นเนื้อไต การย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยา และช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	10
สารบัญรูปภาพ.....	12
สารบัญแผนภูมิ.....	13
บทที่ 1.....	14
บทนำ.....	14
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	14
1.2 คำถามการวิจัย.....	16
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	16
1.4 สมมติฐาน.....	17
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	17
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	18
1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย.....	18
1.8 รูปแบบการวิจัย.....	20
1.9 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	20
1.10 ปัญหาทางจริยธรรม.....	21
1.11 ข้อจำกัดในการวิจัย.....	21
1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	22
1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข.....	22

บทที่ 2 .....	23
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....	23
2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ PECs และพยาธิกำเนิดของโรคไตอักเสบ .....	23
2.2 ความรู้เกี่ยวกับ activated PECs .....	25
2.3 ลักษณะของ PECs ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	27
2.4 ภาวะ autophagy .....	28
2.5 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และการบันทึกภาพด้วยเทคนิค montage .....	31
บทที่ 3 .....	32
วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	32
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	32
3.3 ขนาดตัวอย่าง.....	33
3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย .....	34
3.5 การรวบรวมข้อมูล.....	42
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย.....	43
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	43
บทที่ 4 .....	45
ผลการวิจัย.....	45
4.1 คุณลักษณะของประชากรที่ศึกษา.....	45
4.2 ลักษณะพื้นฐานของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	46
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิก กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ของ PECs.....	53



4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิง ละเอียดต่างๆ ที่พบใน PECs .....	57
4.7 การเปรียบเทียบโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ของ activated PECs และ PECs ที่ไม่ถูก กระตุ้น .....	60
4.8 การตรวจชิ้นเนื้อไตด้วยการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีนสัญลักษณ์ CD44.....	65
บทที่ 5 .....	69
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ.....	69
5.1 อภิปรายผล .....	69
5.2 สรุปผล .....	70
5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า.....	71
5.4 ข้อดีของการศึกษานี้.....	73
5.5 ข้อด้อยของการศึกษานี้.....	73
5.6 ข้อเสนอแนะ .....	74
รายการอ้างอิง.....	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	80

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: สาเหตุของโรค FSGS และโรค MCD ที่พบได้บ่อย (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 13 และ 14).....	20
ตารางที่ 2: โพรตีนสัญลักษณ์ที่พบบน PECs และ podocyte (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 8).....	30
ตารางที่ 3: เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ใน การศึกษา.....	46
ตารางที่ 4: เปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD เมื่อ ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	47
ตารางที่ 5: เปรียบเทียบลักษณะนิวเคลียสของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่านระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD .....	49
ตารางที่ 6: เปรียบเทียบการตรวจพบ activated PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่านระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD .....	50
ตารางที่ 7: เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน .....	53
ตารางที่ 8: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ autophagy ของ PECs..	54
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ apoptosis ของ PECs.....	55
ตารางที่ 10: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ ER stress ของ PECs...	56
ตารางที่ 11: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบ activated PECs.....	57
ตารางที่ 12: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ autophagy....	58
ตารางที่ 13: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ apoptosis.....	59
ตารางที่ 14: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ ER stress .....	60
ตารางที่ 15: เปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ activated PECs และ PECs ปกติ .....	62
ตารางที่ 16: เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดที่สำคัญระหว่าง activated PECs กับ PECs ปกติ.....	64

ตารางที่ 17: ข้อมูลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 .....	67
---	----



## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1: เครื่องตัดชิ้นเนื้อ “ultramicrotome” สำหรับตัดชิ้นเนื้อ ultra-thin section เพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	35
รูปที่ 2: ชิ้นเนื้อที่ตัดด้วย ultramicrotome จนมีความหนา 70 - 90 นม. จะมีสีทอง .....	35
รูปที่ 3: เปรียบเทียบ maze grid ซึ่งใช้กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านตามปกติ (ซ้าย) กับ slot grid ที่ใช้ในการศึกษานี้ (ขวา).....	36
รูปที่ 4: แผ่นฟิล์ม formvar ที่ลอกจากแผ่นสไลด์แก้วและลอยอยู่บนผิวน้ำ (ลูกศร) .....	37
รูปที่ 5: นำ slot grid ที่สะอาดวางลงบนแผ่นฟิล์ม formvar ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำโดยให้ด้านเงาของกริดคว่ำลงบนแผ่นฟิล์ม .....	37
รูปที่ 6: แผ่นฟิล์ม formvar ที่วาง slot grid เรียบร้อยแล้วจะถูกซ้อนขึ้นมาโดนใช้แผ่น parafilm ตั้งไว้จนแห้งจึงจะสามารถนำกริดไปใช้ได้ .....	38
รูปที่ 7: เครื่อง carbon evaporator ให้ความร้อนแก่เส้นใยคาร์บอน จนเกิดเป็นละอองคาร์บอนลงมาเคลือบอยู่บนผิวของ slot grid ที่เคลือบ formvar ไว้แล้ว .....	38
รูปที่ 8: กริดที่เคลือบด้วยคาร์บอนแล้วจะมีสีดำเข้ม .....	39
รูปที่ 9: ภาพถ่าย montage ของ glomerulus ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 100 ไมโครเมตร ลูกศรแสดงตำแหน่งของ PECs ที่พบใน glomerulus .....	40
รูปที่ 10: PECs แต่ละเซลล์ใน glomerulus จะถูกบันทึกภาพเก็บไว้ แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ .....	41
รูปที่ 11: แสดง activated PECs ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญคือ เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มากกว่า 3.5 ไมโครเมตร และมีการเพิ่มขึ้นของโครมาตินชนิด euchromatin.....	50
รูปที่ 12: แสดงภาวะ autophagy ของ PECs โดยพบลักษณะถุงน้ำในไซโตพลาสซึมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้น ภายในบรรจุไซโตพลาสซึมของเซลล์ (autophagosome).....	51
รูปที่ 13: PECs ที่มีภาวะ apoptosis จะพบการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ การโป่งพอง (ballooning) หรือการคอด (fissure).....	52
รูปที่ 14: การย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีนสัญญาณ CD44 ให้ผลลบ (รูปซ้าย) และผลบวก (รูปขวา).....	65

## สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1: แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย .....	17
แผนภูมิที่ 2: แสดงรูปร่างนิวเคลียสของ PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD.....	48
แผนภูมิที่ 3: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ autophagy เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น .....	63
แผนภูมิที่ 4: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ apoptosis เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น .....	63
แผนภูมิที่ 5: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ ER stress เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น .....	64
แผนภูมิที่ 6: แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 ที่เซลล์เยื่อในตำแหน่ง parietal และตำแหน่ง visceral ด้วยการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD .....	66
แผนภูมิที่ 7: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ activated PECs ตามนิยามของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กับร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง parietal ( $r = 0.80, p = 0.001$ ).....	68
แผนภูมิที่ 8: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ activated PECs ตามนิยามของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กับร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง visceral ( $r = 0.59, p = 0.027$ ).....	68

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรค focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) ชนิดปฐมภูมิ เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการเนฟโรติก (nephrotic syndrome) ที่สำคัญทั้งในผู้ป่วยเด็ก และผู้ใหญ่<sup>(1, 2)</sup> ลักษณะสำคัญของโรค FSGS คือการตรวจพบรอยโรคพังผืดเฉพาะที่ (segmental sclerosis) บนโกลเมอรูลัส (glomerulus) ในการตรวจพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต<sup>(3)</sup> ส่วนโรค minimal change disease (MCD) ชนิดปฐมภูมิ เป็นอีกหนึ่งสาเหตุสำคัญของ nephrotic syndrome ในผู้ป่วยทั้งเด็ก และผู้ใหญ่ แต่ต่างจากโรค FSGS ตรงที่การตรวจพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตจะพบว่า glomerulus มีลักษณะปกติ ไม่พบรอยโรค segmental sclerosis<sup>(4)</sup> ทั้งสองโรคเกิดจากความผิดปกติของพอดไซต์ (podocyte) ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อบุชนิดพิเศษ ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างสำคัญของ glomerular filtration barrier ช่วยไม่ให้โปรตีนที่สำคัญหลุดร่วออกไปในปัสสาวะ การตรวจชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในผู้ป่วยโรค FSGS และ โรค MCD จะพบการแบนลงของ podocyte foot process ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

เนื่องจากทั้งสองโรคมีอาการทางคลินิกใกล้เคียงกันมาก การวินิจฉัยแยกโรคออกจากกันจึงอาศัยพยาธิแพทย์วิเคราะห์ลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตพบรอยโรค segmental sclerosis ที่เป็นลักษณะจำเพาะของโรค FSGS อย่างไรก็ดี เนื่องจากรอยโรค segmental sclerosis มีลักษณะที่พบได้เฉพาะที่ (focal lesion) ทำให้หากชิ้นเนื้อไตที่ส่งตรวจทางพยาธิวิทยามีจำนวน glomerulus ไม่เพียงพอ พยาธิแพทย์อาจไม่สามารถวินิจฉัยโรค FSGS ได้ และให้การวินิจฉัยผิดเป็นโรค MCD ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่ามาก กล่าวคือผู้ป่วยโรค FSGS ร้อยละ 39 อาจไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ และเกิด end-stage renal disease (ESRD) มากถึงร้อยละ 80 ที่ระยะเวลา 10 ปี<sup>(5)</sup> ในขณะที่ผู้ป่วยโรค MCD ร้อยละ 80 จะตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ และมีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 4 เท่านั้นที่ดำเนินโรคเข้าสู่ ESRD ที่ระยะเวลา 6 ปี โดยผู้ป่วยโรค MCD ทั้งหมดที่เกิด ESRD ตรวจพบรอยโรค segmental sclerosis เมื่อทำการเจาะชิ้นเนื้อไตซ้ำ<sup>(6)</sup> การหาแนวทางวินิจฉัยแยกโรค FSGS จากโรค MCD นอกเหนือจากการตรวจพบ segmental sclerosis ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง จึงมีความสำคัญ แนวทางหนึ่งในการวินิจฉัยแยกโรคที่เริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นคือการตรวจพบเซลล์เยื่อบุชนิดพาราไทล (parietal epithelial cells, PECs) ที่ถูกกระตุ้น (activated PECs) ใน glomerulus ของผู้ป่วยโรค FSGS<sup>(7)</sup>

PECs คือเซลล์เยื่อบุผิวที่วางอยู่บน Bowman's capsule เป็นเหมือนเปลือกหุ้ม glomerulus ของหน่วยไต เดิมเชื่อว่า PECs เป็นเซลล์ที่ไม่มีบทบาทสำคัญในการทำงานของหน่วยไต แต่ในช่วง 10 ปีหลัง เริ่มมีผู้ให้ความสนใจ PECs มากขึ้น เนื่องจากมีการศึกษามากมายในสัตว์ทดลอง และมนุษย์ที่แสดงให้เห็นว่า PECs มีบทบาทสำคัญทั้งในด้านการฟื้นฟูโครงสร้างของ glomerulus และการก่อโรค โดยเฉพาะโรคที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน Bowman's space ได้แก่ crescentic glomerulonephritis และ collapsing glomerulopathy หรือ segmental sclerosis ในโรค FSGS<sup>(8)</sup>

Activated PECs จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และมีการสร้างโปรตีนสัญญาณ (markers) ที่แตกต่างไปจากภาวะปกติ โดยเฉพาะโปรตีน CD44 ซึ่งเป็น adhesion molecule อยู่บนผิวเซลล์ บทบาทของโปรตีน CD44 ใน activated PECs ยังไม่ชัดเจน แต่ถูกนำมาใช้เป็น activation marker ของ PECs<sup>(9)</sup> การย้อมโปรตีน CD44 ด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) หรือเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกโรค FSGS จากโรค MCD โดยพบว่าโปรตีน CD44 จะย้อมติดที่ PECs ของผู้ป่วยโรค FSGS มากกว่าผู้ป่วยโรค MCD นอกจากนี้ในผู้ป่วยโรค FSGS ยังย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ในตำแหน่ง glomerular tuft ของ glomerulus ด้วยเนื่องจาก activated PECs จะเคลื่อนที่จาก Bowman's capsule ไปยัง glomerulus ส่วนที่ podocyte บาดเจ็บจนหลุดลอกไป เป็นรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนที่พัฒนาไปเป็นรอยโรค segmental sclerosis ของโรค FSGS แต่จะไม่พบการย้อมติดโปรตีน CD44 ที่บริเวณดังกล่าวในผู้ป่วยโรค MCD ทำให้สามารถช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคทั้งสองจากกันได้แม้จะไม่พบรอยโรค segmental sclerosis ที่ชัดเจนใน glomerulus<sup>(10)</sup>

เนื่องจากการย้อมโปรตีน CD44 ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาทั่วไป แต่การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope) เริ่มแพร่หลายมากขึ้นในการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต การวิเคราะห์ความแตกต่างของโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อาจจำแนก activated PECs ออกจาก PECs ปกติได้ และความแตกต่างนี้ อาจสามารถช่วยในการวินิจฉัยแยกโรค FSGS ออกจากโรค MCD ได้ แม้ไม่พบรอยโรค segmental sclerosis ที่ชัดเจนจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

มีการศึกษาในอดีตที่บรรยายลักษณะของ PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ในโรคไตอักเสบหลายชนิดรวมถึงโรค FSGS ด้วย พบว่า PECs บางเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างเชิงละเอียดบางอย่าง<sup>(11)</sup> ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ตามความรู้ที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เชื่อว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก activated PECs

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs ในผู้ป่วย nephrotic syndrome ที่ได้รับการวินิจฉัยโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ จากการตรวจยืนยันทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต โดยเน้นเปรียบเทียบการพบ activated PECs และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นของ PECs ได้แก่ การเกิดภาวะอโตฟาจี (autophagy) ภาวะ apoptosis เป็นต้น ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ร่วมกับการย้อมภูมิโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ซึ่งยังไม่ได้รับการศึกษามาก่อน

## 1.2 คำถามการวิจัย

### 1.2.1 คำถามหลัก:

ก. การตรวจพบ activated PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในผู้ป่วยโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ แตกต่างจากผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิหรือไม่

### 1.2.2 คำถามรอง:

ก. ลักษณะพื้นฐานและโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางของ PECs ขนาดของนิวเคลียส ภาวะ apoptosis autophagy และ ER stress ในผู้ป่วยโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ แตกต่างจากผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิหรือไม่

ข. ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ได้แก่ อายุ เพศ ความดันโลหิต ค่าการทำงานของไต ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และการได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ มีความสัมพันธ์กับการพบ activated PECs และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ของ PECs หรือไม่

ค. อัตราส่วนของ activated PECs ต่อ PECs ทั้งหมดของผู้ป่วยจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีความสัมพันธ์กับอัตราการย้อมติดโปรตีน CD44 ด้วยเทคนิคภูมิโนพยาธิวิทยาหรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการตรวจพบ activated PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ



1.3.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานและโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ

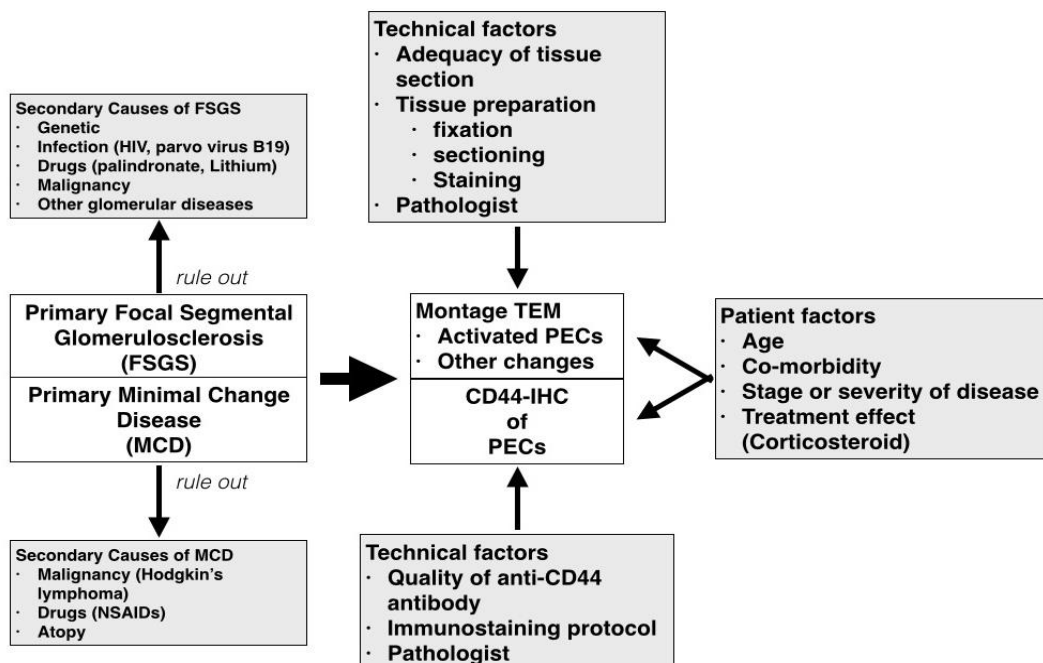
1.3.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ กับการพบ activated PECs และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านหรือไม่

1.3.4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการพบ activated PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกับการย้อมติดโปรตีน CD44 ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา

## 1.4 สมมติฐาน

พบภาวะ activated PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในผู้ป่วยโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิได้มากกว่าในผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ

## 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภูมิที่ 1: แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

## 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิทุกรายที่เข้าร่วมในการศึกษา ต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องตามเกณฑ์ทางพยาธิวิทยาในการวินิจฉัยโรค และต้องมีชิ้นเนื้อไตเพียงพอสำหรับการส่งตรวจทางพยาธิวิทยาเพิ่มเติม กล่าวคือต้องมีจำนวน glomerulus ในชิ้นเนื้อไตตั้งแต่ 20 glomerulus ขึ้นไป หรือน้อยกว่า 20 glomerulus แต่ตรวจพบรอยโรค segmental sclerosis

## 1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย<sup>(12)</sup>

1.7.1 ชิ้นเนื้อไตที่เพียงพอในการวินิจฉัยโรค FSGS และโรค MCD จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงต้องพบ glomeruli อย่างน้อย 20 ตัว หรืออาจน้อยกว่า 20 glomeruli แต่ไม่น้อยกว่า 8 glomeruli ในกรณีที่พบรอยโรค segmental sclerosis ชัดเจน

1.7.2 Nephrotic syndrome คือ กลุ่มอาการทางไตที่ประกอบด้วยอาการบวม ร่วมกับระดับ albumin ในเลือดต่ำ (น้อยกว่า 3.5 ก./ดล.) และมีโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (มากกว่า 3.5 ก./วัน)

1.7.3 โรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ วินิจฉัยโดยผู้ป่วยมีอาการของ nephrotic syndrome ร่วมกับผลตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตพบรอยโรค segmental sclerosis โดยไม่พบรอยโรค proliferative lesions อื่นๆ จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และตรวจไม่พบการสะสมของสารทีบิอิลีกตรอนจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่พบ foot process effacement ของ podocyte เป็นบริเวณกว้าง ทั้งนี้ต้องไม่พบสาเหตุของโรค FSGS จากการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1)<sup>(13)</sup>

1.7.4 โรค MCD ชนิดปฐมภูมิ วินิจฉัยโดยผู้ป่วยมีอาการของ nephrotic syndrome ร่วมกับผลตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตไม่พบความผิดปกติของ glomerulus จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และตรวจไม่พบการสะสมของสารทีบิอิลีกตรอนจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่พบ foot process effacement ของ podocyte เป็นบริเวณกว้าง ทั้งนี้ต้องไม่พบสาเหตุของโรค MCD จากการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1)<sup>(14)</sup>

1.7.5 ชิ้นเนื้อไตที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ต้องประกอบด้วยอย่างน้อย 1 glomerulus ที่สมบูรณ์ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ glomerulus ตั้งแต่ 100 ไมโครเมตรขึ้นไป เพื่อแสดงว่าตัดผ่านในระดับที่ใกล้เคียงกับระนาบที่กว้างที่สุดของ glomerulus

1.7.6 PECs คือ เซลล์เยื่อหุ้มที่วางอยู่บนเยื่อพื้นฐาน (basement membrane) ของ Bowman's capsule โดยไม่จำกัดรูปร่างของเซลล์

1.7.7 เส้นผ่านศูนย์กลาง PECs คือ ระยะที่กว้างที่สุด วัดจากผิวเซลล์ที่ระดับนิวเคลียสตั้งฉากกับเยื่อพื้นฐานของเซลล์

1.7.8 ความสูงของนิวเคลียส วัดระยะที่กว้างที่สุดของนิวเคลียสในระนาบตั้งฉากกับเยื่อพื้นฐานของเซลล์ (ความสูง) ร่วมกับวัดระยะที่กว้างที่สุดในระนาบที่ตั้งฉากกับความสูงของนิวเคลียส (ความกว้าง)

1.7.9 รูปร่างของนิวเคลียส แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ รูปร่างแบน (flat shape) รูปไข่ (oval shape) หรือกลม (round shape) โดยอาศัยอัตราส่วนของ ความสูง : ความกว้างของนิวเคลียส

- อัตราส่วนของความสูง : ความกว้างของนิวเคลียส  $< 0.5$  = นิวเคลียสรูปแบน
- อัตราส่วนของความสูง : ความกว้างของนิวเคลียส  $0.5 - 0.8$  = นิวเคลียสรูปไข่
- อัตราส่วนของความสูง : ความกว้างของนิวเคลียส  $> 0.8$  = นิวเคลียสรูปกลม

1.7.10 ลักษณะของโครมาติน แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ heterochromatin คือ โครมาตินในนิวเคลียสจับกันเป็นก้อนทั่วไป และ increased euchromatin คือ โครมาตินมีการคลายตัวจนไม่เห็นจับกันเป็นก้อนในนิวเคลียส หรือเห็นน้อยมาก

1.7.11 Apoptosis คือ การตายของเซลล์รูปแบบหนึ่ง นิยามโดยการพบลักษณะข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

- Chromatin condensation คือ มีการกระจุกรวมกันเป็นก้อนของโครมาติน
- Chromatin fragmentation คือ มีการแตกหักของโครมาติน
- การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย โดยพบการโป่งออกของเยื่อไมโทคอนเดรีย (ballooning) หรือการคอด (fissure)

1.7.12 Autophagy คือ กระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ นิยามโดยการพบ autophagosome ภายใน cytoplasm ของเซลล์ ซึ่งจะเห็นเป็นถุงน้ำที่ประกอบด้วยเยื่อเซลล์สองชั้น ภายในมีไซโตพลาสซึม (cytoplasm) หรือส่วนของ organelle อยู่

1.7.13 Endoplasmic reticulum (ER) stress นิยามโดยพบการขยายขนาดของ ER มากกว่าปกติ

1.7.14 Ultrathin section คือ ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดด้วยมีด ultramicrotome จนมีความหนา 70 - 90 นาโนเมตร ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

1.7.15 การถ่ายภาพด้วยเทคนิคมอนตาจ (montage) คือ การถ่ายภาพพื้นบริเวณกว้างโดยถ่ายภาพย่อยขนาดเล็ก แล้วจึงนำภาพย่อยมาประกอบกันเป็นภาพขนาดใหญ่ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1: สาเหตุของโรค FSGS และโรค MCD ที่พบได้บ่อย (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 13 และ 14)

สาเหตุของโรค FSGS	สาเหตุของโรค MCD
โรคทางพันธุกรรม เช่น การกลายพันธุ์ของยีน NPHS1 และ NPHS2 เป็นต้น	โรคมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Hodgkin's lymphoma
การติดเชื้อไวรัส เช่น HIV-associated nephropathy	ยา เช่น NSAIDs
ยา เช่น palmidronate, interferon, lithium เป็นต้น	ปฏิกิริยาแพ้ต่อสารต่างๆ
โรคมะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง	
เกิดตามหลังโรคไตอักเสบอื่นๆ	
<b>คำย่อ:</b> HIV, human immunodeficiency virus; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.	

## 1.8 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) โดยเปรียบเทียบอัตราการพบภาวะ activated PECs จากการตรวจชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ

## 1.9 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

คัดเลือกผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ จากฐานข้อมูลโรคไตอักเสบโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ย้อนหลังตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ปี พ.ศ. 2556 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 นำชิ้นเนื้อไตที่ถูกบรรจุไว้ในเรซิน ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มาตัดด้วยมีด ultramicrotome จนได้ ultra-thin section วางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วลงบนกริดชนิดพิเศษสำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และทำการย้อม

ชิ้นเนื้อด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate ก่อนนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโดยพยาธิแพทย์ คัดเลือกเฉพาะชิ้นเนื้อที่ตัดได้เส้นผ่านศูนย์กลางของ glomerulus ตั้งแต่ 100 ไมโครเมตรขึ้นไป เพื่อเข้าสู่การศึกษา บันทึกภาพ glomerulus ทั้ง glomerulus ด้วยเทคนิค montage ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า หลังจากนั้นบันทึกภาพ PECs ด้วยเทคนิค montage ที่กำลังขยาย 12,000 - 14,000 เท่า ก่อนนำภาพถ่ายของ PECs ไปวิเคราะห์ต่อไป

## 1.10 ปัญหาทางจริยธรรม

### 1.10.1 หลักความเคารพในบุคคล (respect for person)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาย้อนหลังจากชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วย โดยไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจะเคารพในการเก็บรักษาความลับของผู้ป่วย และจะดำเนินการออกหนังสือถึงผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อขออนุญาตใช้เวชระเบียน และชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยให้ถูกต้องตามขั้นตอน

### 1.10.2 หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence)

การวิจัยนี้มีความเสี่ยงเพียงเล็กน้อยกับผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัย เช่น ความลับของผู้เข้าร่วมวิจัยอาจถูกเปิดเผย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมวิจัย โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่ระบุถึงตัวผู้เข้าร่วมวิจัย การวิจัยนี้ไม่มีผลประโยชน์โดยตรงต่อการรักษาของผู้เข้าร่วมวิจัย แต่ผลการวิจัยอาจมีส่วนช่วยในการวินิจฉัยโรค FSGS หรือโรค MCD ในผู้ป่วยรายอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

### 1.10.3 หลักความยุติธรรม (justice)

คือ มีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าและออกจากการวิจัยชัดเจน อนึ่ง ตามพระราชบัญญัติสุขภาพแห่งชาติ พ.ศ. 2550 ที่ผู้วิจัยต้องขอความยินยอมจากผู้ป่วย แต่เมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อใช้ชิ้นเนื้อที่เหลืออยู่ของผู้ป่วยในการวิจัย

## 1.11 ข้อจำกัดในการวิจัย

ก. เป็นการศึกษาย้อนหลัง และใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่ถูกเก็บรักษาไว้ จึงอาจได้ชิ้นเนื้อไตที่ไม่เพียงพอ หรือไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจเพิ่มเติมในการศึกษา ทำให้อาจมีปัญหาระยะจำนวนผู้ป่วยที่สามารถเข้าร่วมการวิจัยได้

ข. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แม้จะได้ภาพกำลังขยายสูง แต่จะทำให้ดูภาพได้บริเวณแคบลง และได้ภาพของ glomerulus ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

แบบใช้แสงที่กำลังขยายต่ำกว่า จึงอาจไม่สามารถสื่อถึงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นใน glomerulus อื่นๆ ที่เหลือทั้งหมดได้ อย่างไรก็ตาม โรค nephrotic syndrome ชนิดปฐมภูมิทั้งโรค FSGS และโรค MCD เป็นโรคที่เชื่อว่าพยาธิสภาพมีลักษณะที่เกิดทั่วๆ กับทุก glomerulus (diffuse disease) แม้จะไม่เห็นรอยโรค segmental sclerosis ในทุก glomerulus ของผู้ป่วยโรค FSGS

ค. ผู้ป่วย nephrotic syndrome ที่สงสัยโรค FSGS หรือ โรค MCD มักได้รับการรักษาด้วย ยาสเตียรอยด์ก่อนการเจาะไต เนื่องจากมีอาการบวมรุนแรง จึงอาจไม่สามารถคัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์เท่านั้นเข้าสู่การศึกษาได้

### 1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างเชิงละเอียดของ activated PECs และ abnormal PECs ในโรค FSGS ซึ่งคาดว่าจะแตกต่างจาก PECs ของผู้ป่วยโรค MCD และอาจนำไปช่วยในการวินิจฉัยแยกจากโรค MCD ในกรณีขึ้นเนื้อไตมีจำนวน glomerulus น้อย

### 1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข

ก. ชิ้นเนื้อที่ตัดส่งตรวจเพื่อการวิเคราะห์โครงสร้างเชิงละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อาจไม่ได้ชิ้นเนื้อที่ตัดผ่านระนาบกลางของ glomerulus อาจทำให้การวัดโครงสร้างต่างๆ ไม่แม่นยำ

แก้ไขโดยทำการตัดชิ้นเนื้อต่อเนื่องหลายชิ้น แล้วเลือกดูชิ้นเนื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางยาวเกินกว่า 100 ไมโครเมตร

ข. การย้อมโปรตีนสัญลักษณ์ CD44 ซึ่งใช้แอนติบอดีชนิดใหม่ อาจมีปัญหาในการย้อมติด และปัญหาในการแปลผล ว่าเป็นผลบวกสูง หรือผลลบสูงหรือไม่

แก้ไขโดยการปรับแนวทางการย้อมตามการศึกษาที่เคยมีรายงานการใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกัน และมีการย้อมในชิ้นเนื้อควบคุมชนิดให้ผลบวก และผลลบ ได้แก่ ชิ้นเนื้อไตจากผู้ป่วยที่เป็นโรค crescentic glomerulonephritis ซึ่งจะมี activated PECs และชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่ไม่มีโรคของ glomerulus ตามลำดับ

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ PECs และพยาธิกำเนิดของโรคไตอักเสบ

โครงสร้างของ glomerulus ประกอบด้วยเซลล์ 4 ชนิดคือเซลล์มีแซงเจียม (mesangial cell), เซลล์เอนโดทีเลียล (endothelial cell) เซลล์ podocyte และ PECs โดยเซลล์ 3 ชนิดแรกจะประกอบกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า glomerular tuft ซึ่งเป็นส่วนของเส้นเลือดฝอยในไตที่พัฒนาจนกลายเป็นโครงสร้างพิเศษทำหน้าที่กรองของเสียออกจากเลือด ขณะที่ PECs เป็นเพียงเซลล์ที่วางเรียงอยู่บน Bowman's capsule ซึ่งล้อมรอบ glomerular tuft อยู่อีกทีหนึ่ง ช่องว่างระหว่าง glomerular tuft และ Bowman's capsule เรียกว่า Bowman's space หรือ urinary space เป็นช่องว่างที่ใช้อรับพลาสมา (plasma) ที่ถูกกรองผ่าน glomerular basement membrane (GBM) ออกมา ก่อนรวมลงสู่ท่อไต และกลายเป็นปัสสาวะในที่สุด<sup>(9)</sup>

โรคของ glomerulus เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ชนิดต่างๆ ใน glomerulus กล่าวคือ ความผิดปกติของแต่ละเซลล์ จะทำให้เกิดโรค หรือกลุ่มอาการที่แตกต่างกันออกไป เช่น ความผิดปกติของ endothelial cell ทำให้เกิด thrombotic microangiopathy (TMA) การบาดเจ็บ mesangial cell ทำให้เกิดโรคในกลุ่ม mesangioproliferative glomerulonephritis เช่น โรคไตอักเสบไอจีเอ (immunoglobulin A [IgA] nephropathy) การบาดเจ็บต่อ podocyte ทำให้เกิด nephrotic syndrome ทั้งโรค minimal change disease, FSGS และ membranous nephropathy จนถึงปัจจุบันยังไม่มี การค้นพบโรคไตที่เกิดจากความผิดปกติของ PECs โดยตรง อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ PECs ทั้งในภาวะปกติ และภาวะที่เกิดโรค

PECs เป็นเซลล์เยื่อบุผิวที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกับ podocyte ระหว่างพัฒนาการของตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิต จนถึงระยะ S-shaped ซึ่งเป็นระยะที่ 2 ของกระบวนการพัฒนา glomerulus เซลล์ทั้ง 2 จะเริ่มมีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน โดย podocyte จะยังคงสร้างโปรตีน Wilm's tumor suppressor protein 1 (WT-1) และมีการสร้างโปรตีนชนิดใหม่ๆ เช่น vimentin ในขณะที่ PECs หยุดสร้างโปรตีน WT-1 แต่สร้างโปรตีน CD10 และ claudin-1 ที่ไม่มีใน podocyte ขึ้นมาแทน<sup>(8)</sup>

PECs เป็นเซลล์เยื่อบุที่มีลักษณะแบนบางคล้ายเซลล์ squamous epithelial cell มีความหนาตั้งแต่ 0.1 - 0.3 ไมครอน ขึ้นไปจนถึง 2.0 - 3.5 ไมครอนที่ตำแหน่งนิวเคลียสของเซลล์<sup>(8)</sup> มี

ปริมาณร้อยละ 14.8 ของเซลล์ทั้งหมดใน glomerulus ของหนู<sup>(15)</sup> PECs เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อน เรียกว่า tight junction และ desmosome ที่ผิวของ PECs มีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าไมโครวิลไล (microvilli) และซิเลีย (cilia) โดยมีความแตกต่างของปริมาณ cilia ตั้งแต่ 0 - 2 อันต่อเซลล์ โดยที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด<sup>(16)</sup>

ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของ PECs ในภาวะปกติแน่ชัดทั้งหมด พบหลักฐานจากหลายการศึกษาสนับสนุนความสามารถของ PECs ในการพัฒนาไปเป็น podocyte เพื่อทดแทน podocyte ที่ตายไปในภาวะต่างๆ สมมติฐานดังกล่าวเริ่มจากพบว่า PECs สร้างโปรตีน CD24 และ CD133 ซึ่งพบในเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ (human stem cells) ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า PECs จะมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด<sup>(17, 18)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่า PECs แต่ละเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้แตกต่างกัน เช่น PECs ที่อยู่ติดกับท่อไต (urinary pole) หากสร้างโปรตีนของเซลล์ต้นกำเนิด แต่ไม่สร้างโปรตีนสัญลักษณ์ของ podocyte จะสามารถพัฒนาไปเป็นได้ทั้งเซลล์เยื่อท่อไต (renal tubular cell) และ podocyte ในขณะที่ PECs ที่สร้างทั้งโปรตีนของเซลล์ต้นกำเนิดและ podocyte จะพัฒนาไปเป็น podocyte ได้เท่านั้นไม่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์เยื่อท่อไตได้ ส่วน PECs ที่อยู่ติดกับฐานของ glomerular tuft (vascular pole) จะไม่สร้างโปรตีนของเซลล์ต้นกำเนิดเลย แต่สร้างโปรตีนสัญลักษณ์ของ podocyte ผู้วิจัยบางกลุ่มเรียก PECs กลุ่มนี้ว่า parietal podocyte<sup>(19)</sup> การแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันของ PECs แต่ละตำแหน่งพบได้เช่นกันในหนูทดลอง<sup>(20)</sup> แสดงให้เห็นว่า PECs ในแต่ละตำแหน่งมีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อทดแทนเซลล์บริเวณข้างเคียงที่สูญเสียไปโดยเฉพาะ podocyte

หน้าที่ที่เป็นไปได้อีกอย่างหนึ่งของ PECs คือการเก็บกักโปรตีน albumin ที่รั่วออกมาจาก glomerulus ไว้ไม่ให้หลุดออกไปนอกหน่วยไต เนื่องจาก PECs มีการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ด้วย tight junction protein ที่แน่นหนา ได้แก่ claudin-1, occludin และ ZO-1<sup>(21)</sup> และยังพบว่า PECs สามารถเก็บกิน (endocytosis) โปรตีน albumin เข้าสู่เซลล์เพื่อช่วยลดการสูญเสียโปรตีน albumin ไปทางปัสสาวะได้ แต่ก็มีการศึกษาพบว่า การมีโปรตีน albumin ในเซลล์ปริมาณมากอาจทำให้ PECs ตายได้โดยผ่านทางกระบวนการ apoptosis<sup>(22)</sup>

ในแง่บทบาทของการก่อโรคพบว่า PECs มีบทบาทเป็นเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นในรอยโรค crescent ของโรคไตอักเสบชนิด crescentic glomerulonephritis ซึ่งในอดีตเคยเป็นที่ถกเถียงกันว่าเซลล์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นใน Bowman's space และกดเบียด glomerulus เป็นเซลล์ชนิดใดกันแน่ ระหว่าง podocyte หรือ PECs เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในรอยโรค crescent มีการแสดงโปรตีนที่เป็นสัญลักษณ์ของทั้ง podocyte และ PECs แต่ข้อถกเถียงดังกล่าวได้ยุติลงในภายหลัง จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค genetic lineage tracing ซึ่งแสดงต้นกำเนิดของเซลล์โดยดูจากการแสดงออกของ



โปรตีนที่ถูกกำหนดโดยสารพันธุกรรมซึ่งพบว่าเซลล์ในรอยโรค crescent มีต้นกำเนิดมาจาก PECs<sup>(23)</sup> การเพิ่มจำนวนของ PECs ในรอยโรค crescent เกิดขึ้นเมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือดฝอยใน glomerulus (glomerular capillary) และ GBM จนมีการรั่วของพลาสมา ออกมาใน Bowman's space พลาสมาจะสัมผัสกับ PECs และกระตุ้นให้ PECs เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น สนับสนุนโดยการศึกษาที่พบว่า PECs ของหนูและมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจะมีการแบ่งตัวมากขึ้นเมื่อสัมผัสกับพลาสมา<sup>(24)</sup> นอกจากนี้การศึกษาด้วยเทคนิค genetic-lineage tracing ในโรค collapsing FSGS ซึ่งมีเซลล์เพิ่มจำนวนใน Bowman's space คล้ายรอยโรค crescent (pseudo-crescent) พบว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นแท้จริงแล้วคือ PECs เช่นเดียวกัน โดยเป็นการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของ podocyte อย่างรุนแรง

อีกบทบาทหนึ่งของ PECs ในการเกิดโรคของ glomerulus คือ การเกิดรอยโรค segmental sclerosis ซึ่งเริ่มต้นจากการบาดเจ็บและหลุดลอกของ podocyte ออกจาก GBM ตามมาด้วยการเชื่อมติดกัน (adhesion) ของ glomerular tuft .ในบริเวณดังกล่าว กับ Bowman's capsule และเกิดรอยโรค segmental sclerosis ขึ้น มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า PECs เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเชื่อมติดกันดังกล่าว และเคลื่อนที่เข้าไปใน glomerular tuft โดยการย้อมทางอิมมูโนพยาธิวิทยาของรอยโรค segmental sclerosis พบว่ามีเซลล์ที่แสดงโปรตีนสัญลักษณ์ของ PECs ในรอยโรค segmental sclerosis<sup>(25)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่ารอยโรค segmental sclerosis ที่เกิดขึ้นใน glomerulus ประกอบด้วยโปรตีนแมทริกซ์ (matrix protein) ชนิดเดียวกับเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule แตกต่างจาก GBM โดยจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ LKVI69 ซึ่งจำเพาะกับสารเฮปารันซัลเฟต (heparan sulfate) ของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule และโปรตีนแมทริกซ์ดังกล่าวพบว่าย้อมติดโปรตีน LKVI69 บริเวณรอยโรค segmental sclerosis ร่วมกับเซลล์ที่แสดงสัญลักษณ์ของ PECs เสมอ ทำให้เชื่อได้ว่า พังผืดที่เกิดขึ้นใน glomerulus สร้างมาจาก PECs ที่เคลื่อนที่เข้าไปใน glomerular tuft ไม่ได้สร้างจาก endothelial cell เช่นเดียวกับ GBM

## 2.2 ความรู้เกี่ยวกับ activated PECs

PECs ที่พบในรอยโรค segmental sclerosis จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และเพิ่มการสร้างโปรตีนแมทริกซ์ออกมาสะสมนอกเซลล์ ทำให้เยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule หนาตัวขึ้น หรืออาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ดังที่พบใน crescentic glomerulonephritis และ collapsing FSGS PECs เหล่านี้ถูกเรียกว่า activated PECs จากการศึกษาในอดีต พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CD44 ที่ผิวของ PECs ในบริเวณรอยโรค crescent และรอยโรคที่ PECs เชื่อมติดกับ glomerular tuft ใน FSGS โดยโปรตีน CD44 คือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่อยู่บนเยื่อผิวเซลล์ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ

การเชื่อมติดระหว่างเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์มะเร็ง แต่จะไม่พบการแสดงออกของโปรตีน CD44 ใน PECs หรือเซลล์อื่นๆ ของ glomerulus ในภาวะปกติ<sup>(23, 25)</sup> กล่าวคือ PECs จะแสดงออกของโปรตีน CD44 เฉพาะในภาวะที่เกิดโรคของ glomerulus เท่านั้น โปรตีน CD44 จึงเป็นเหมือนโปรตีนสัญลักษณ์ของ activated PECs

มีการศึกษาที่พยายามนำความรู้เกี่ยวกับ activated PECs และการแสดงออกของโปรตีน CD44 มาช่วยในการวินิจฉัยแยกโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิออกจากโรค MCD<sup>(10, 26)</sup> เนื่องจากแม้ FSGS จะเป็นโรคที่สามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงโดยการตรวจพบรอยโรค segmental sclerosis เฉพาะที่ แต่ในบางครั้งชิ้นเนื้อไตที่ได้จากผู้ป่วยโรค FSGS อาจมีปริมาณของ glomerulus ไม่เพียงพอ ทำให้ไม่เห็นรอยโรคดังกล่าว เห็นเพียง glomerulus ที่ปกติไม่สามารถแยกจากโรค MCD ได้ และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในทั้งสองโรค จะพบการแบนลงแบบต่างๆ ของ podocyte foot process เช่นเดียวกันจึงไม่ช่วยในการแยกโรค

Fatima และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วย ESRD จากโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) และมีปัญหาโปรตีนรั่วในปัสสาวะตั้งแต่ 1 วันถึง 2 เดือนหลังปลูกถ่ายไต ซึ่งสงสัยว่าอาจเกิดจากการกลับเป็นซ้ำของโรค FSGS ร่วมกับผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบการแบนลงแบบต่างๆ ของ podocyte foot process โดยไม่พบรอยโรค segmental sclerosis เฉพาะที่ เมื่อทำการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ของผู้ป่วยดังกล่าว เปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อไตจากผู้ป่วยโรค MCD และผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรค พบว่าผู้ป่วยที่สงสัยโรค FSGS กลับเป็นซ้ำมีการแสดงออกของโปรตีน CD44 ภายใน glomerulus และ PECs ที่บุอยู่รอบนอกมากกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 29 ของ glomerulus เปรียบเทียบกับ ร้อยละ 2.6,  $p < 0.01$ ) และไม่พบการแสดงออกของโปรตีน CD44 เลยในผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรค<sup>(26)</sup>

Smeets และคณะได้ทำการย้อมโปรตีนสัญลักษณ์ที่จำเพาะกับ PECs (claudin-1) activated PECs (CD44) และโปรตีนแมทริกซ์ที่สร้างจาก PECs (LKIV69) ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยโรค FSGS 38 ราย และผู้ป่วยโรค MCD 57 ราย<sup>(10)</sup> พบเซลล์ที่แสดงโปรตีนสัญลักษณ์ของ PECs ใน glomerular tuft ร้อยละ 87 ของผู้ป่วย FSGS ในขณะที่ร้อยละ 25 ของผู้ป่วยกลุ่ม MCD พบการย้อมติดโปรตีนสัญลักษณ์ของ PECs (ทั้ง claudin-1 และ CD44) และโปรตีนแมทริกซ์ในส่วนอง glomerular tuft ที่ดูปกติในการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง พยาธิแพทย์จึงได้ทบทวนการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อซ้ำและให้ความเห็นใหม่ที่ว่าตำแหน่งที่ย้อมติด claudin-1, CD44 และ LKIV69 ใน glomerulus ของผู้ป่วยโรค MCD เป็นรอยโรค segmental sclerosis ระยะเริ่มต้นของโรค FSGS ที่สังเกตได้ยาก และเปลี่ยนการวินิจฉัยจากโรค MCD เป็น FSGS ในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว

นอกจากนี้ ใน glomerulus ที่มีรอยโรค segmental sclerosis ของ FSGS ก็ย้อมติดทั้งโปรตีน สัญลักษณ์ของ PECs และโปรตีนแมทริกซ์ที่สร้างจาก PECs ช่วยยืนยันว่ารอยโรคดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนตัวเข้าไปของ PECs และสร้างโปรตีนแมทริกซ์ออกมา ผู้วิจัยให้ความเห็นว่าการพบการ แสดงออกของโปรตีน CD44 ใน glomerulus ที่ไม่พบรอยโรค segmental sclerosis สามารถช่วย ให้จำแนกรโรค FSGS ระยะเริ่มต้น ออกจากโรค MCD ได้

อย่างไรก็ตาม ยังสามารถพบการแสดงออกของโปรตีน CD44 บน PECs ได้ในภาวะอื่นๆ เช่น ในการศึกษาของ Roeder และคณะที่ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD44 บน PECs ของหนูที่อายุ 3 เดือน เปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์เดียวกันที่อายุ 27 เดือน (เทียบเท่ากับมนุษย์อายุ 78 ปี) ผล พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CD44 บน PECs ของหนูอายุ 27 เดือน มากกว่า PECs ของหนูอายุ 3 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่พบรอยโรคของไตชนิดอื่น และผู้วิจัยให้ข้อสรุปว่า activated PECs สามารถพบได้ในไตที่มีความเสื่อมตามวัย<sup>(27)</sup>

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดย Holderied และคณะ<sup>(28)</sup> ที่ศึกษาการแสดงโปรตีน CD44 ของ PECs ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน 12 ราย พบว่า PECs ของผู้ป่วยโรคเบาหวานแสดงโปรตีน CD44 แตกต่างจากผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน 6 รายอย่างชัดเจน และการแสดงโปรตีน CD44 สัมพันธ์กับการหนาตัวของเยื่อ Bowman's capsule ที่พบในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ทำให้ทราบว่าภาวะความ ผิดปกติทางเมตาบอลิซึมในผู้ป่วยโรคเบาหวานทำให้เกิดการกระตุ้น PECs ได้ และทำให้ activated PECs สร้างโปรตีนคอลลาเจนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule ใน การศึกษานี้ ผู้วิจัยได้บรรยายลักษณะที่แตกต่างกันของ activated PECs กับ PECs ปกติเอาไว้ด้วย คือ activated PECs จะมีขนาดที่ระดับนิวเคลียสมากกว่า 3.5 ไมโครเมตร และมีสารโครมาตินใน นิวเคลียสเป็น euchromatin

### 2.3 ลักษณะของ PECs ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

Gaffney และคณะได้เคยบรรยายการเปลี่ยนแปลงของ PECs ในโรคไตอักเสบชนิดต่างๆ เอาไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525<sup>(11)</sup> โดยรายงานผลตรวจทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วย 77 รายที่ได้รับการเจาะ ตรวจชิ้นเนื้อไตระหว่างปี พ.ศ. 2522 - 2523 พบว่าผลตรวจชิ้นเนื้อของผู้ป่วย 57 ราย มีการ เปลี่ยนแปลงของ PECs ซึ่งผู้วิจัยได้บรรยายไว้ว่า “prominent parietal epithelium” (PPE) คือ เมื่อเปรียบเทียบกับ PECs ปกติด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแล้ว พบว่า PECs ปกติ จะมีลักษณะแบนบาง มีนิวเคลียสยี่ดยาว เต็มไปด้วยสารโครมาตินชนิด heterochromatin มีไซโตพลาสซึมน้อย และทีบิเล็กตรอน เป็นลักษณะของเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ในขณะที่ PPE นั้นมี ลักษณะที่แตกต่างออกไปโดยสิ้นเชิง คือ มีนิวเคลียสกลม หรือรูปไข่ ภายในนิวเคลียสมีสารโครมาติน

ชนิด euchromatin มากขึ้น มีนิวคลีโอลัสที่เห็นชัดเจนอยู่บริเวณขอบของนิวเคลียส ปริมาณซัยโตพลาสซึมมากและทีบอิลีคตรอนน้อยกว่า PEC ปกติ ในซัยโตพลาสซึมมีโรโบโซมปริมาณมาก ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว แต่ในขณะที่เดียวกันก็พบลักษณะของการบาดเจ็บในระดับเซลล์ด้วย ได้แก่ การเกิด vesiculation of cytoplasmic membrane compartment, pyknosis และ ballooned out mitochondria ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในการตายของเซลล์แบบ apoptosis การขยายขนาดของ ER ซึ่งเข้าได้กับภาวะ ER stress ในเวลาต่อมา เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวพบในโรคของ glomerulus หลายชนิด ได้แก่ diabetic nephropathy, membranous nephropathy, diffuse proliferative lupus nephritis รวมถึงโรค FSGS ด้วย นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังให้ข้อสังเกตไว้ว่า เซลล์ในรอยโรค crescent ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเชิงละเอียด และการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เหมือน PECs จึงตั้งสมมติฐานว่าเซลล์ในรอยโรค crescent เกิดจาก PECs ที่แบ่งตัว ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการศึกษาในภายหลัง

## 2.4 ภาวะ autophagy

Autophagy มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก แปลว่าการกินตัวเอง เป็นกระบวนการในระดับเซลล์ที่ถูกค้นพบในภายหลัง และมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคของอวัยวะต่างๆ โดยส่วนประกอบในซัยโตพลาสซึม และ organelles ที่เสื่อมสภาพ จะถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่อโตฟาโกโซม (autophagosome) ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงน้ำในเซลล์เกิดเป็นถุงที่มีเยื่อบุเซลล์ 2 ชั้น autophagosome นี้จะไปรวมกับไลโซโซม (lysosome) เกิดเป็น autolysosome เพื่ออาศัยเอนไซม์ต่างๆ ใน lysosome ช่วยย่อยสลายส่วนประกอบของเซลล์และ organelles ดังกล่าวเป็นโปรตีนและพลังงานให้เซลล์นำไปใช้ใหม่ได้<sup>(29)</sup> autophagy ถูกกระตุ้นจากภาวะขาดสารอาหาร หรือภาวะบาดเจ็บของเซลล์ ได้แก่การขาดเลือด การได้รับสารพิษ ความผิดปกติทางภูมิคุ้มกัน หรือภาวะ oxidative stress โดยเป็นกลไกที่เชื่อว่ามีส่วนช่วยปกป้องเซลล์จากภาวะอันตรายต่างๆ เหล่านี้

ความผิดปกติของ autophagy อาจนำไปสู่การเกิดโรคไตได้ เช่น การที่ podocyte มีภาวะ autophagy ลดลง ทำให้เกิดการสูญเสีย podocyte และเกิดพังผืดขึ้นใน glomerulus มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรค MCD บางส่วน ที่พัฒนาไปเป็นโรค FSGS ในเวลาต่อมา มีการเกิด autophagy ของ podocyte น้อยกว่าผู้ป่วย MCD ที่ไม่พัฒนาไปเป็นโรค FSGS การศึกษาในหลอดทดลองที่นำ podocyte ของมนุษย์มาเพาะเลี้ยงในสาร puromycin aminonucleoside (PAN) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการตายชนิด apoptosis ของ podocyte ร่วมกับการให้สารอื่นๆ ที่ยับยั้งหรือส่งเสริม autophagy ของเซลล์พบว่าเมื่อใส่สาร 3-methyladenine (3-MA) หรือสาร chloroquine ซึ่งมีผลยับยั้ง autophagy ลงไปร่วมด้วย จะทำให้ podocyte เกิดการตายชนิด apoptosis มากขึ้น และ

ในทางกลับกัน การใส่สาร rapamycin ซึ่งสนับสนุนการเกิด autophagy จะทำให้ลดการตายของ podocyte สนับสนุนว่า autophagy เป็นกระบวนการที่ช่วยปกป้องเซลล์<sup>(30)</sup>

อย่างไรก็ดี มีการศึกษาที่พบว่า autophagy อาจเป็นกลไกทำให้เกิดการบาดเจ็บของไตในภาวะขาดเลือด เช่น การศึกษาการขาดเลือดของไตหนูทดลอง โดยการรัดเส้นเลือดไตเป็นเวลา 60 นาที พบว่าการขาดเลือดทำให้เกิดการตายของเซลล์ชนิด apoptosis และเกิด autophagy ซึ่งสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของไตที่รุนแรง ในขณะที่หากมีการปล่อยให้เลือดไปเลี้ยงไต 2-3 นาที หลังจากรัดเส้นเลือดนาน 30 นาที แล้วจึงรัดเส้นเลือดไตใหม่อีก 30 นาที พบว่าการที่มีเลือดไปเลี้ยงช่วยลดการเกิด apoptosis และ autophagy และเกิดการบาดเจ็บต่อไตที่น้อยลง<sup>(31)</sup>

การเกิด autophagy ของ PECs ยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก แต่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงของ PECs ในหนูทดลองที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของ podocyte ด้วยยา adriamycin พบว่าเมื่อมีการบาดเจ็บและหลุดลอกของ podocyte จะพบการขยายขนาดของ PECs และมีการสร้างถุงน้ำขนาดใหญ่ (vacuoles) ในเซลล์ โดยผู้วิจัยไม่ได้บรรยายว่าถุงน้ำเหล่านั้น เข้าได้กับ autophagosome หรือ autolysosome ที่พบใน autophagy หรือไม่<sup>(32)</sup> และในการศึกษาของ Gaffney และคณะ<sup>(11)</sup> ที่ศึกษาโครงสร้างเชิงละเอียดของ PPE ดังกล่าวข้างต้น เป็นช่วงก่อนที่จะมีความรู้เกี่ยวกับ autophagy จึงยังไม่เคยมีการบรรยายไว้ชัดเจน แต่มีลักษณะบางอย่างที่อาจเข้าได้กับภาวะ autophagy ของ PECs ใน PPE อีกทั้งการศึกษาในอดีต ยังไม่มีการใช้เทคนิคทางอิมมูโนพยาธิวิทยาในการระบุประเภทของเซลล์ ต่างจากปัจจุบันที่มีโปรตีนสัญลักษณ์หลายชนิดที่พบบน PECs โดยไม่พบบน podocyte ทำให้สามารถจำแนกเซลล์ได้อย่างถูกต้องมากขึ้นกว่าการใช้เพียงตำแหน่งของเซลล์ (ตารางที่ 2)<sup>(8)</sup>

ตารางที่ 2: โปรตีนสัญลักษณ์ที่พบบน PECs และ podocyte (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 8)

ประเภทของโปรตีน	โปรตีน	PECs	Podocyte
Transcription factor	PAX2	+++	-
	PAX8	+++	-
	WT-1	-	+
Tight junction	Claudin-1	+	-
	Claudin-2	+	-
	ZO-1	+	+
Glycoprotein	Podocalyxin	-	+
	CD44	+	-
Slit diaphragm	Nephrin	-	+
	Podocin	-	+
Actin-associated protein	Alpha-ACTN4	-	+
	Synaptopodin	-	+
Growth factor	VEGF	-	+

วิธีมาตรฐานในการแสดงว่ามีภาวะ autophagy เกิดขึ้น คือ การเห็น autophagosome ที่เก็บกินซัยโทพลาสซึม หรือ organelles เข้าไป โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเห็นถุงน้ำในเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้น หรือใช้วิธีตรวจการแสดงออกของโปรตีนสัญลักษณ์ที่มีความจำเพาะต่อกระบวนการ autophagy ได้แก่ microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) -II โดยการย้อมด้วยเทคนิคทางอิมมูโนพยาธิวิทยา

เมื่อนำความรู้ทางอิมมูโนพยาธิวิทยา ที่แสดงได้ว่า PECs มีการถูกกระตุ้น โดยดูการแสดงออกของโปรตีน CD44 ร่วมกับความรู้โครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs ในโรคไตอักเสบชนิดต่างๆ รวมถึงโรค FSGS การวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างเชิงละเอียด รวมถึงภาวะ autophagy ของ PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD อาจพบความแตกต่างที่สำคัญ และนำไปใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคทั้งสองออกจากกันโดยไม่ต้องใช้การย้อมทางอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ซึ่งยังไม่มีแพร่หลายในทางคลินิก ในกรณีที่ผลตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงไม่ชัดเจน

## 2.5 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และการบันทึกภาพด้วยเทคนิค montage

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนถูกพัฒนาขึ้นมาเนื่องจากข้อจำกัดในความคมชัด และกำลังขยายของภาพเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง การทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอาศัยคุณสมบัติพิเศษของอิเล็กตรอนที่เป็นทั้งอนุภาค และมีความเป็นคลื่นด้วย ข้อดีของการใช้คลื่นอิเล็กตรอนแทนคลื่นแสง คือ คลื่นอิเล็กตรอนมีความยาวคลื่นสั้นกว่าคลื่นแสงมากถึง 100,000 เท่า จึงสามารถสร้างภาพที่มีความละเอียดสูงมากได้ ในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะมีแหล่งกำเนิดอนุภาคอิเล็กตรอน ซึ่งส่วนมากใช้ขั้วโลหะทังสเตน (tungsten) อนุภาคอิเล็กตรอนจะเร่งความเร็วด้วยความต่างศักย์ ให้วิ่งเข้าสู่เนื้อเยื่อที่ศึกษา การสร้างภาพอาศัยคุณสมบัติของเนื้อเยื่อที่มีความสามารถในการให้อนุภาคอิเล็กตรอนทะลุผ่านได้แตกต่างกัน อนุภาคอิเล็กตรอนบางส่วนจะถูกสะท้อน หรือหักเหออก และนำข้อมูลภาพของพื้นผิวเนื้อเยื่อไปยังตัวรับ เพื่อประมวลผลออกมาเป็นภาพบนหน้าจอคอมพิวเตอร์อีกทีหนึ่ง<sup>(33)</sup>

การบันทึกภาพที่กำลังขยายสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะทำให้บันทึกภาพได้เพียงส่วนเล็กๆ ของชิ้นเนื้อเท่านั้น หากต้องการภาพในบริเวณที่กว้างขึ้นจำเป็นต้องใช้วิธีการบันทึกบริเวณที่ต่อเนื่องกันหลายภาพ แล้วจึงนำมาประกอบกันเป็นภาพใหญ่ เรียกการบันทึกภาพในลักษณะนี้ว่า ภาพ montage ซึ่งในปัจจุบันตัวกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถทำการบันทึกภาพด้วยเทคนิค montage ได้โดยอัตโนมัติอยู่แล้ว หรือหากต้องการบันทึกภาพ montage ขนาดใหญ่มาก ก็มีโปรแกรมเสริมผลิตรายออกมามากมาย การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างเชิงละเอียดของ glomerulus หลายการศึกษาเริ่มนำการบันทึกภาพด้วยเทคนิค montage มาใช้ ทำให้ได้ภาพที่มีกำลังขยายสูงของ glomerulus ในบริเวณกว้าง<sup>(34, 35)</sup>

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study)

#### 3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

##### 3.2.1 ประชากร (population)

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับ nephrotic syndrome ชนิดปฐมภูมิ ได้แก่ มีอาการบวม มีระดับ albumin ในเลือดต่ำ ( $< 3.5$  ก./ดล.) และระดับโปรตีนในปัสสาวะ  $> 3.5$  ก./วัน และมีผลการตรวจชิ้นเนื้อไตเข้าได้กับโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ หรือโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ ซึ่งประเมินจากประวัติในเวชระเบียน และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบสาเหตุของโรค (ตารางที่ 1)<sup>(13, 14)</sup>

ประชากรตัวอย่าง (sample) คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรค FSGS ชนิดปฐมภูมิ หรือโรค MCD ชนิดปฐมภูมิในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เลือกผู้ป่วยด้วยวิธี consecutive case

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย (inclusion criteria)

ก. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยโรค FSGS หรือโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2556 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ยืนยันด้วยผลตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต

ข. ไม่พบสาเหตุของโรค FSGS หรือ MCD จากประวัติ การตรวจร่างกายตามเวชระเบียน และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ค. ผู้ป่วยมีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป

ง. มีชิ้นเนื้อไตส่งตรวจที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (exclusion criteria)

ก. มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาไม่ครบถ้วน ได้แก่ การขาดผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ผลย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) หรือผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อย่างใดอย่างหนึ่ง



ข. ชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงมีจำนวน glomerulus น้อยกว่า 20 ในกรณีที่ไม่พบรอยโรค segmental sclerosis ใน glomerulus

ค. ชิ้นเนื้อไตสำหรับส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนไม่เหมาะสม คือ ไม่มี glomerulus ที่สมบูรณ์ หรือเมื่อตัดชิ้นเนื้อแล้วไม่มีชิ้นเนื้อที่ตัดผ่านระนาบกึ่งกลางของ glomerulus (glomerulus ควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 100 ไมโครเมตรขึ้นไป)

### 3.3 ขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบการพบ activated PECs ในผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ โดยวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมาก่อน แต่มีการศึกษาที่ใช้การย้อมโปรตีนสัญลักษณ์ CD44 ในทั้ง 2 โรคดังกล่าว พบว่าอัตราการพบ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บน PECs ของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD เป็นร้อยละ 41 และร้อยละ 2.6 ของจำนวน glomerulus ทั้งหมด ตามลำดับ<sup>(26)</sup> เมื่อคิดรูปแบบการวิจัยชนิด experimental study เปรียบเทียบประชากร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยยอมรับความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 (type-1 error;  $\alpha$ ) ร้อยละ 5 และ power ร้อยละ 80 จะสามารถคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างได้ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$n_1 = \left[ \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\bar{p}\bar{q}(1+\frac{1}{r})} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1 q_1 + \frac{p_2 q_2}{r}}}{\Delta} \right]^2$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, q_1 = 1 - p_1, q_2 = 1 - p_2$$

$$\bar{p} = \frac{p_1 + p_2 r}{1+r}, \bar{q} = 1 - \bar{p}$$

$P_1$  = อัตราการพบปัจจัยศึกษาในกลุ่มศึกษา ( $P_1 = 0.41$ )

$P_2$  = อัตราการพบปัจจัยศึกษาในกลุ่มควบคุม ( $P_2 = 0.026$ )

$Z_\beta$  = ค่าความแปรปรวนมาตรฐานที่ power ใดๆ (ในการศึกษานี้กำหนด power = ร้อยละ 80,  $Z_\beta = 0.84$ )

$Z_{\alpha/2}$  = ค่าความแปรปรวนมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่นที่ยอมรับความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 ใดๆ (ในการศึกษานี้ยอมรับความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 ร้อยละ 5,  $Z_{\alpha/2} = 1.96$ )

คำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างได้กลุ่มละ 17 ตัวอย่าง หากมีจำนวนผู้ป่วยเกินจากขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการจะเลือกผู้ป่วยด้วยวิธี consecutive case

### 3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

ก. ขอใบรับรองจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. ผู้วิจัยทบทวนผู้ป่วยในฐานข้อมูลโรคไตอักเสบของหน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อหาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมีย้อนหลังนับตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2556 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559

ค. ออกหนังสือขออนุญาตใช้เวชระเบียน และชิ้นเนื้อไตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์

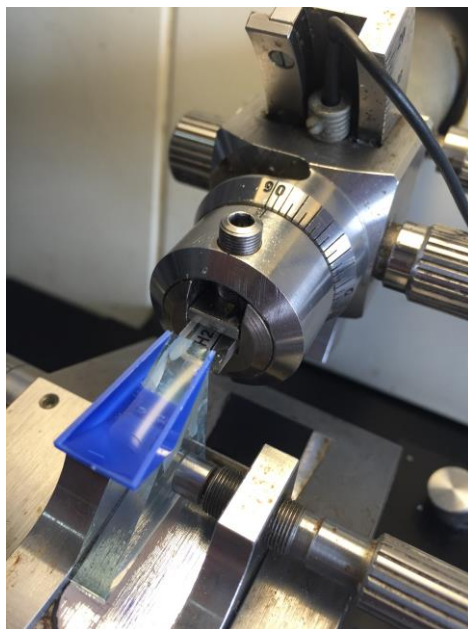
ง. ทบทวนข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยจากเวชระเบียน ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และผลตรวจทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยทุกราย เพื่อค้นหาผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์การคัดเลือกของการศึกษา บันทึกข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยได้แก่ อายุ เพศ โรคประจำตัว ค่าครีเอตินินในเลือด และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ณ วันที่วินิจฉัยโรค

จ. ทบทวนชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อยืนยันการวินิจฉัย และความเหมาะสมของชิ้นเนื้อ

#### 3.4.1 การเตรียมชิ้นเนื้อไตสำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ก. ทบทวนเนื้อไตของผู้ป่วยซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ใน epoxy resin block ประเมินความเหมาะสมของ glomerulus ด้วยการตัด thick-section (ความหนาของชิ้นเนื้อ ประมาณ 2 ไมโครเมตร) และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง เลือก glomerulus ที่มีความสมบูรณ์ ไม่มีรอยโรค segmental sclerosis และมีขนาดใหญ่ที่สุดมาใช้ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ข. ตัดชิ้นเนื้อไตใน resin block ด้วยมีด ultramicrotome ให้ได้ชิ้นเนื้อที่มีความหนาประมาณ 70 - 90 นาโนเมตร (ultrathin section) (รูปที่ 1 และ 2)



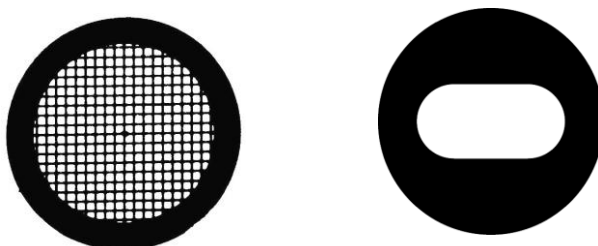
รูปที่ 1: เครื่องตัดชิ้นเนื้อ “ultramicrotome” สำหรับตัดชิ้นเนื้อ ultra-thin section เพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



รูปที่ 2: ชิ้นเนื้อที่ตัดด้วย ultramicrotome จนมีความหนา 70 - 90 นม. จะมีสีทอง

### 3.4.2 การเตรียมกริดสำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ก. เลือกใช้กริดทองแดงชนิด slot grid 2 x 1 มม. (รูปที่ 3) เนื่องจากมีรูขนาดใหญ่ตรงกลางสำหรับวางชิ้นเนื้อ ทำให้สามารถถ่ายภาพ glomerulus ได้ทุกส่วนโดยไม่มีแถบทองแดงมาดบังเหมือนกับ maze grid ซึ่งใช้กันทั่วไปในทางคลินิก



รูปที่ 3: เปรียบเทียบ maze grid ซึ่งใช้กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านตามปกติ (ซ้าย) กับ slot grid ที่ใช้ในการศึกษานี้ (ขวา)

ข. เตรียมแผ่นฟิล์มฟอร์มวาร์ (Formvar) สำหรับหุ้มผิวกริด เพื่อรองรับชิ้นเนื้อไตที่จะวางลงบน slot grid เตรียมสารละลาย formvar โดยละลายในอะซิโตน 100% จนได้ความเข้มข้นของ formvar 0.88% จากนั้นนำสไลด์แก้วสะอาดจุ่มลงในสารละลาย formvar จนเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ หุ้มบนผิวสไลด์แก้ว รอจนแห้งแล้วจึงชุบขอบสไลด์ให้ฟิล์ม formvar หลุดออกจากผิวสไลด์ จากนั้นจึงนำสไลด์แก้วไปจุ่มลงในน้ำกลั่นช้าๆ แผ่นฟิล์ม formvar จะหลุดออกจากสไลด์แก้วแล้วลอยอยู่บนผิวน้ำ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4: แผ่นฟิล์ม formvar ที่ลอกจากแผ่นสไลด์แก้วและลอยอยู่บนผิวน้ำ (ลูกศร)

ค. นำกริดทองแดงที่เตรียมไว้ไปวางลงบนฟิล์ม formvar ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำ (รูปที่ 5) แล้วจึงซ้อนฟิล์ม formvar ขึ้นมาโดยใช้แผ่น parafilm รोजनแห้ง (รูปที่ 6) ตัด formvar ตามแนวกริดจนได้เป็นกริดที่หุ้มด้วย formvar (formvar-coated grid)



รูปที่ 5: นำ slot grid ที่สะอาดวางลงบนแผ่นฟิล์ม formvar ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำโดยให้ด้านเงาของกริดคว่ำลงบนแผ่นฟิล์ม

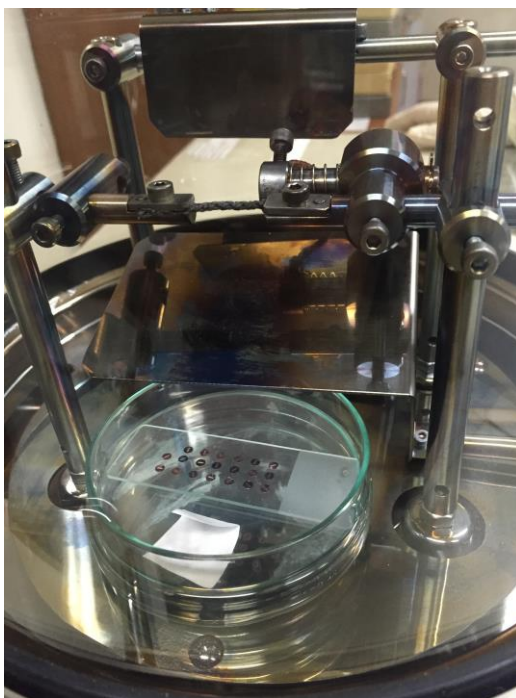


รูปที่ 6: แผ่นฟิล์ม formvar ที่วาง slot grid เรียบร้อยแล้วจะถูกซ้อนขึ้นมาโดยใช้แผ่น parafilm ตั้งไว้จนแห้งจึงจะสามารถนำกริดไปใช้ได้

ง. นำกริดที่หุ้มด้วย formvar เรียบร้อยแล้วไปเคลือบด้วยละอองคาร์บอน โดยใช้เครื่อง carbon evaporator (รูปที่ 7) ฟิล์ม formvar ที่หุ้มอยู่บนกริดจะมีความแข็งแรงมากขึ้น



รูปที่ 7: เครื่อง carbon evaporator ให้ความร้อนแก่เส้นใยคาร์บอน จนเกิดเป็นละอองคาร์บอนลงมาเคลือบอยู่บนผิวของ slot grid ที่เคลือบ formvar ไว้แล้ว



รูปที่ 8: กริดที่เคลือบด้วยคาร์บอนแล้วจะมีสีดำเข้ม

### 3.4.3 การวางชิ้นเนื้อลงบนกริดและการย้อมสี

ก. ซ้อนชิ้นเนื้อที่ตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome โดยใช้ลูบแล้ววางลงบนกริดที่หุ้มด้วย formvar เรียบร้อยแล้ว ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง

ข. ย้อมสีด้วย 5% uranyl acetate เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

ค. ล้างสี uranyl acetate ในน้ำกลั่น

ง. ย้อมสี lead citrate เป็นเวลา 30 นาที

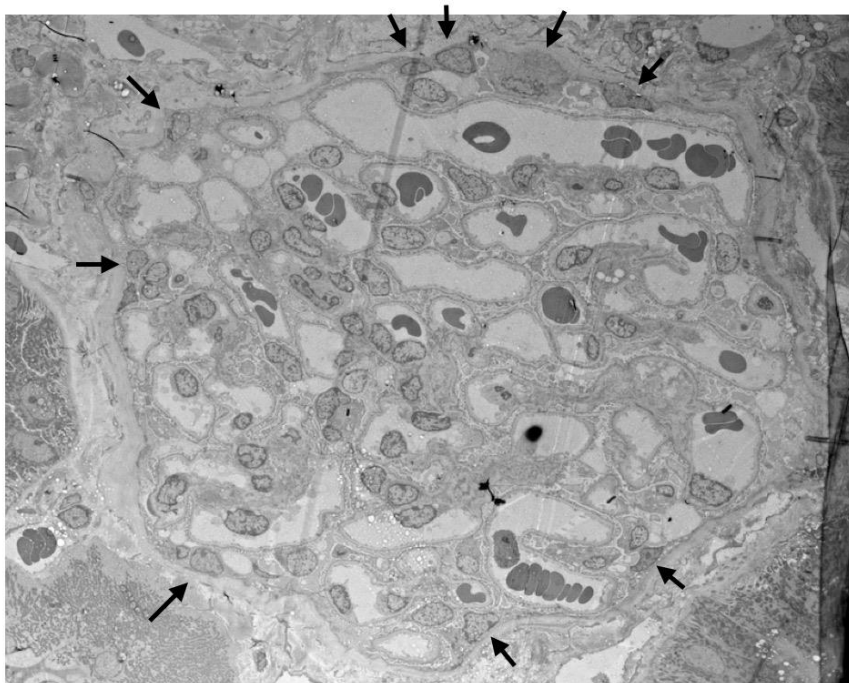
จ. ล้างสี lead citrate ในน้ำกลั่น หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนกริดแห้ง

### 3.4.4 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ก. ตรวจชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน JEOL รุ่น 1400Plus

ข. ใช้กำลังขยาย 1,000 เท่าทำการบันทึกภาพ glomerulus ด้วยเทคนิค montage โดยใช้โปรแกรมของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะได้ภาพที่ประกอบกันเป็น glomerulus ขนาดใหญ่ 1 ภาพ (รูปที่ 9) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ glomerulus ที่ได้ ต้องมีความกว้างอย่างน้อย 100

ไมโครเมตร ไม่เช่นนั้นจะถือว่าเป็นชั้นเนื้อที่ไม่ตัดผ่านระนาบกลางของ glomerulus และไม่ถูกนำไปศึกษาต่อ

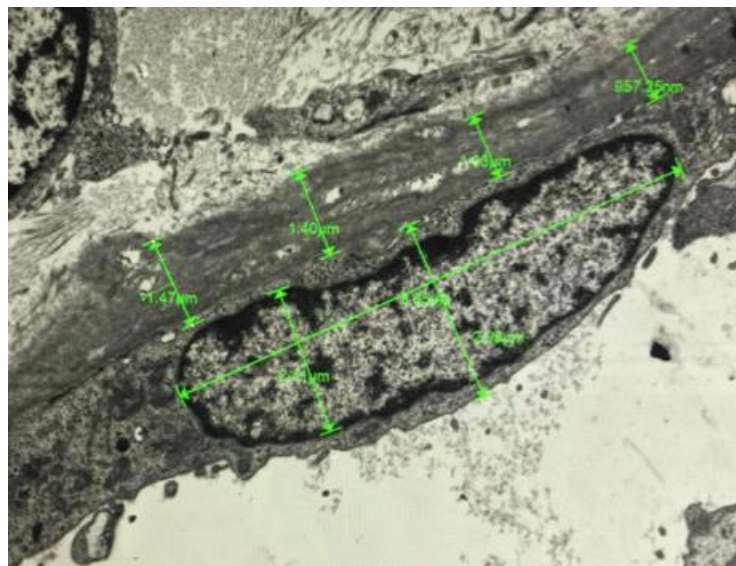


รูปที่ 9: ภาพถ่าย montage ของ glomerulus ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 100 ไมโครเมตร ลูกศรแสดงตำแหน่งของ PECs ที่พบใน glomerulus

ค. ศึกษาโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs ที่กำลังขยาย 12,000 ถึง 14,000 เท่า และถ่ายภาพด้วยเทคนิค montage จนได้ภาพของ PECs ทั้งเซลล์ที่กำลังขยายสูง (รูปที่ 10)



ง. ดำเนินการบันทึกภาพ PECs ทุกเซลล์ที่เห็นในระนาบของชิ้นเนื้อไตที่เลือกไว้



รูปที่ 10: PECs แต่ละเซลล์ใน glomerulus จะถูกบันทึกภาพเก็บไว้ แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

### 3.4.5 การวิเคราะห์โครงสร้างเชิงละเอียดของเซลล์

ก. วัดขนาดของ PECs โดยวัดระยะจากเยื่อเซลล์ที่ระดับนิวเคลียสลาไปตั้งฉากกับเยื่อพื้นฐานของเซลล์

ข. วัดขนาดของนิวเคลียส โดยวัดความสูงในระนาบตั้งฉากกับเยื่อพื้นฐาน และวัดความกว้างในระนาบที่ตั้งฉากกับความสูงของนิวเคลียส คำนวณอัตราส่วนระหว่างความสูงและความกว้างของนิวเคลียส

ค. บรรยายรูปร่างของนิวเคลียส โดยอาศัยอัตราส่วนของความสูงต่อความกว้างของนิวเคลียส

ง. บรรยายลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียส และการพบนิวคลีโอลัส (nucleolus) ในนิวเคลียส

จ. บันทึกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ เช่น การพบ activated PECs, autophagy, apoptosis หรือ ER stress

### 3.4.6 การย้อมภูมิโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44

ก. นำชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่ถูกเก็บไว้ใน paraffin block มาตัดด้วยมีดไมโครทอม (microtome) จนได้ชิ้นเนื้อที่มีความหนาประมาณ 2 ไมครอน

ข. ละลาย paraffin ออกจากชิ้นเนื้อ (deparaffinization) ด้วยสารไซลีน (xylene) และ แอลกอฮอล์

ค. กระตุ้นการย้อมติดของแอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยความร้อน และสารละลาย EDTA buffer ที่มีค่า pH 9 เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

ง. ล้างชิ้นเนื้อ และทำการยับยั้งเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่อยู่ในชิ้นเนื้อ ด้วย สารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% hydrogen peroxide)

จ. นำชิ้นเนื้อมาบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิ ได้แก่ CD44 antibody (Ab 16728; บริษัท Abcam ประเทศอังกฤษ mouse antibody) ที่ผ่านการเจือจางมาแล้ว 1:200 ส่วน เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ฉ. นำชิ้นเนื้อมาบ่มกับแอนติบอดีทุติยภูมิ ได้แก่ anti-mouse antibody (K4065 HRP, บริษัท Dako) ที่ติดเอนไซม์ peroxidase เป็นเวลา 30 นาที

ช. ทำการให้สีด้วยระบบของ EnVision Detection System (บริษัท Dako) โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase กับสาร diaminobenzidine

ซ. บันทึกผลการย้อมภูมิโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 บน PECs โดยพยาธิแพทย์ที่ไม่ทราบข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย รายงานการติดสีของ PECs ที่ตำแหน่งปกติบริเวณ Bowman's capsule (parietal location) และการย้อมติดบริเวณ glomerular tuft (visceral location) ซึ่งบ่งถึงการเคลื่อนที่ของ activated PECs เข้าสู่ glomerulus<sup>(10)</sup>

ณ. ทำการย้อมชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยโรค crescentic glomerulonephritis เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกของการย้อมโปรตีน CD44 (positive control)

### 3.5 การรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐาน และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ณ วันที่ทำการเจาะไต ได้แก่ ค่าโปรตีนในปัสสาวะ ค่าครีเอตินินในเลือด บันทึกลงในแบบฟอร์มสำหรับบันทึกข้อมูล (case record form: CRF) และบันทึกผลการตรวจทบทวนทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง ผลตรวจพบจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และผลตรวจการย้อมภูมิโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 โดยพยาธิแพทย์

### 3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

ก. เป็นการศึกษาโครงสร้างของ activated PECs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แต่ไม่ได้ทำการตรวจอิมมูโนพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อที่ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จึงไม่สามารถยืนยันการแสดงออกของโปรตีนสัญลักษณ์ที่แสดงถึงภาวะถูกกระตุ้นของ PECs ใน PECs ที่เห็นจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้โดยตรง

ข. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แม้จะได้ภาพกำลังขยายสูง แต่จะทำให้คุณภาพได้แคบลง และได้ภาพของ glomerulus เพียง 1 glomerulus ในผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งน้อยกว่าการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงที่ใช้กำลังขยายต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม nephrotic syndrome ชนิดปฐมภูมิทั้งโรค FSGS และโรค MCD เป็นโรคที่พยาธิสภาพเกิดกับทุก glomerulus (diffuse disease) จึงควรมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับทุก glomeruli

ค. การตรวจชิ้นเนื้อไตในระนาบเดียว ทำให้ไม่สามารถตรวจ PECs ทุกเซลล์ของ glomerulus นั้นๆ ได้

ง. เป็นการศึกษาย้อนหลัง และใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่ถูกเก็บรักษาไว้ จึงอาจได้ชิ้นเนื้อไตที่ไม่เพียงพอ หรือไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจเพิ่มเติมในการศึกษา ทำให้อาจมีปัญหารื่องจำนวนผู้ป่วยที่สามารถเข้าร่วมการวิจัยได้

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ก. ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 22 และ Stata MP version 14

ข. ข้อมูลเชิงปริมาณ (continuous variables) แสดงข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย independent Student's *t*-test สำหรับข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) และใช้ Mann-Whitney U test สำหรับข้อมูลที่มีการแจกแจงไม่ปกติ

ค. ข้อมูลเชิงคุณภาพ (categorical variables) แสดงข้อมูลที่ได้เป็นจำนวนนับ และร้อยละ (percent) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Chi-square test หรือ Fisher's exact test

ง. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการพบภาวะ autophagy และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ กับผลการวินิจฉัยโรคและการย้อมติดโปรตีน CD44 บน PECs โดยใช้ Chi-square test

จ. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเชิงปริมาณ Pearson's correlation

ฉ. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเชิงคุณภาพด้วย logistic regression

ช. การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมด ยอมรับความผิดพลาดชนิดที่ 1 (type 1 error) ที่น้อยกว่าร้อยละ 5



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 คุณลักษณะของประชากรที่ศึกษา

เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ของการศึกษา พบว่ามีผู้ป่วยโรค FSGS 7 ราย และผู้ป่วยโรค MCD 8 ราย ผู้ป่วยโรค FSGS เป็นเพศชาย 6 ราย (ร้อยละ 85.7) อายุเฉลี่ย 32.9 ปี (95% confidence interval [CI] = 10.1 - 55.7) ค่าครีเอตินินในเลือดเฉลี่ย 1.63 มก./ดล. (95% CI = 0.74 - 2.56) ค่าเฉลี่ย esmimated glomerular filtration rate (eGFR) 90.5 มล./นาที/1.73 ตร.ม. (95% CI = 51.1 - 129.9) ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 10.5 ก./วัน (95% CI = 3.5 - 17.5) ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนการเจาะไต 4 ราย (ร้อยละ 57.1) ค่า systolic blood pressure (BP) เฉลี่ย 135.3 มม.ปรอท (95% CI = 126.0 - 144.6) ค่า diastolic BP เฉลี่ย 77.6 มม.ปรอท (95% CI = 67.2 - 88.0) และค่า mean arterial pressue (MAP) เฉลี่ย 96.8 มม.ปรอท (95% CI = 90.0 - 103.6)

ผู้ป่วยโรค MCD เป็นเพศชาย 5 ราย (ร้อยละ 62.5) อายุเฉลี่ย 48.1 ปี (95% CI = 24.1 - 72.1) ค่าครีเอตินินในเลือดเฉลี่ย 1.14 มก./ดล. (95% CI = 0.82 - 1.46) ค่าเฉลี่ย eGFR 84.3 มล./นาที/1.73 ตร.ม. (95% CI = 50.0 - 118.6) ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 6.8 ก./วัน (95% CI = 0 - 17.2) ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนการเจาะไต 4 ราย (ร้อยละ 50) ค่า systolic BP เฉลี่ย 130.0 มม.ปรอท (95% CI = 119.4 - 140.6) ค่า diastolic BP เฉลี่ย 77.4 มม.ปรอท (95% CI = 70.6 - 84.2) และค่า MAP เฉลี่ย 95.3 มม.ปรอท (95% CI = 89.6 - 101.0)

เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม พบว่าสัดส่วนของเพศชายไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.569$ ) อายุเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.231$ ) ค่าครีเอตินินในเลือดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.178$ ) ค่าเฉลี่ย eGFR ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.757$ ) ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในปัสสาวะไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.443$ ) ผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มได้รับยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไตไม่แตกต่างกัน ( $p = 1.000$ ) ค่า systolic BP เฉลี่ย ( $p = 0.746$ ) ค่า diastolic BP เฉลี่ย ( $p = 0.488$ ) และค่า MAP เฉลี่ย ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.639$ ) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3: เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ในการศึกษา

ข้อมูล	ผู้ป่วยโรค FSGS (n = 7)	ผู้ป่วยโรค MCD (n = 8)	p value
อายุ (ปี)	32.9 (10.1 - 55.7) <sup>#</sup>	48.1 (24.1 - 72.1) <sup>#</sup>	0.231
เพศชาย (%)	6 (85.7)	5 (62.5)	0.569
ค่าครีเอตินินในเลือด (มก./ดล.)	1.63 (0.74 - 2.52) <sup>#</sup>	1.14 (0.82 - 1.46) <sup>#</sup>	0.178
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	90.5 (51.1 - 129.9) <sup>#</sup>	84.3 (50 - 118.6) <sup>#</sup>	0.757
ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (ก./วัน)	10.5 (3.5 - 17.5) <sup>#</sup>	6.8 (0 - 17.2) <sup>#</sup>	0.443
การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไต (%)	4 (57.1)	4 (50)	1.000
Systolic BP (มม.ปรอท)	135.3 (126.0 - 144.6) <sup>#</sup>	130.0 (119.4 - 140.6) <sup>#</sup>	0.746
Diastolic BP (มม.ปรอท)	77.6 (67.2 - 88.0) <sup>#</sup>	77.4 (70.6 - 84.2) <sup>#</sup>	0.488
MAP (มม.ปรอท)	96.8 (90.0 - 103.6) <sup>#</sup>	95.3 (89.6 - 101.0) <sup>#</sup>	0.639
<sup>#</sup> แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (95% confidence interval)			
คำย่อ: eGFR, estimated glomerular filtration rate; BP, blood pressure; MAP, mean arterial pressure.			

#### 4.2 ลักษณะพื้นฐานของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การตรวจชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยโรค FSGS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบจำนวน PECs เฉลี่ยต่อ glomerulus 11.4 เซลล์ (95% CI = 5.6 - 17.2) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ PECs 5.50 ไมโครเมตร (95% CI = 4.03 - 6.97) ความสูงเฉลี่ยของนิวเคลียส 3.97 ไมโครเมตร (95% CI = 2.92 - 5.02) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมของ PECs เฉลี่ย 0.70 (95% CI = 0.63 - 0.77) ความหนาของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule เฉลี่ย 1.85 ไมโครเมตร (95% CI = 1.19 - 2.51)

สำหรับผู้ป่วยโรค MCD ตรวจพบจำนวน PECs เฉลี่ยต่อ glomerulus 10.4 เซลล์ (95% CI = 6.0 - 14.8) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ PECs 4.20 ไมโครเมตร (95% CI = 3.45 - 4.95) ความ

สูงเฉลี่ยของนิวเคลียส 3.00 ไมโครเมตร (95% CI = 2.57 - 3.43) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อซีโตพลาสซึมของ PECs เฉลี่ย 0.74 (95% CI = 0.63 - 0.85) ความหนาของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule เฉลี่ย 2.38 ไมโครเมตร (95% CI = 1.99 - 2.77)

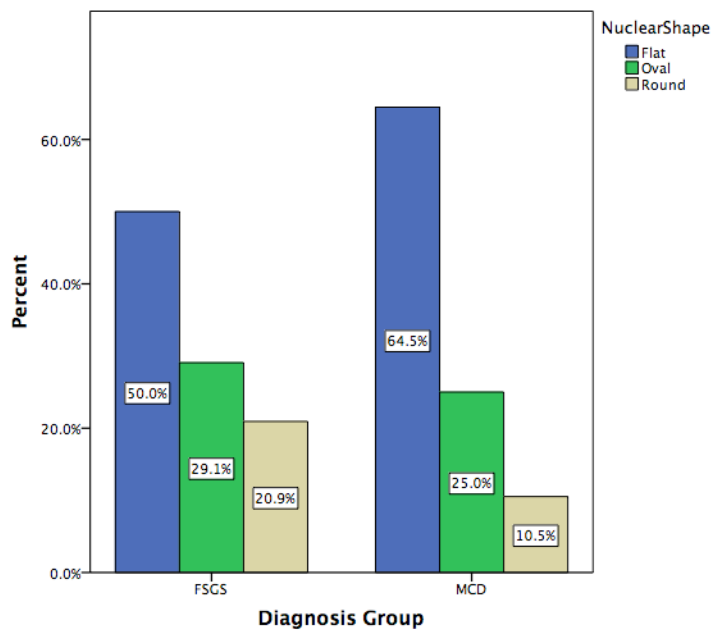
เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ PECs ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม พบว่าผู้ป่วยโรค FSGS มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ PECs ( $p = 0.032$ ) และความสูงเฉลี่ยของนิวเคลียส ( $p = 0.032$ ) มากกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน PECs เฉลี่ยต่อ glomerulus ( $p = 0.696$ ) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อซีโตพลาสซึมของ PECs เฉลี่ย ( $p = 0.437$ ) และความหนาเฉลี่ยของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule ( $p = 0.078$ ) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4: เปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ลักษณะของ PECs	ผู้ป่วย FSGS (n = 7)	ผู้ป่วย MCD (n = 8)	p value
PECs number/glomerulus	11.4 (5.6 - 17.2)	10.4 (6.0 - 14.8)	0.696
PECs diameter ( $\mu\text{m}$ )	5.50 (4.03 - 6.97)	4.20 (3.45 - 4.95)	0.045
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	3.97 (2.92 - 5.02)	3.00 (2.57 - 3.43)	0.032
Nuclear/cytoplasmic ratio	0.70 (0.63 - 0.77)	0.74 (0.63 - 0.85)	0.437
Bowman's basement membrane thickness ( $\mu\text{m}$ )	1.85 (1.19 - 2.51)	2.38 (1.99 - 2.77)	0.078
หมายเหตุ: แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (95% confidence interval)			

ศึกษาลักษณะนิวเคลียสของ PECs พบว่าในผู้ป่วยโรค FSGS นิวเคลียสของ PECs มีรูปร่างแบน ร้อยละ 50 รูปไข่ ร้อยละ 29.1 และมีรูปกลม ร้อยละ 20.9 ลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสเป็น heterochromatin ร้อยละ 34.9 มีการเพิ่มขึ้นของ euchromatin ร้อยละ 65.1 และพบนิวคลีโอไลต์ในนิวเคลียสร้อยละ 22.1 ส่วนในผู้ป่วยโรค MCD นิวเคลียสของ PECs มีรูปร่างแบน ร้อยละ 64.5 รูปไข่ ร้อยละ 25 และมีรูปกลม ร้อยละ 10.5 ลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสเป็น heterochromatin ปกติ ร้อยละ 69.7 มีการเพิ่มขึ้นของ euchromatin ร้อยละ 30.3 และพบนิวคลีโอไลต์ในนิวเคลียสร้อยละ 19.2 (แผนภูมิที่ 2)

แผนภูมิที่ 2: แสดงรูปร่างนิวเคลียสของ PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD



เปรียบเทียบลักษณะนิวเคลียสของ PECs พบว่าผู้ป่วยโรค FSGS มีนิวเคลียสที่มี euchromatin เพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่มากกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ในขณะที่รูปร่างของนิวเคลียส ( $p = 0.108$ ) และการพบนิวคลีโอไลส์ใน PECs ( $p = 0.652$ ) ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5)

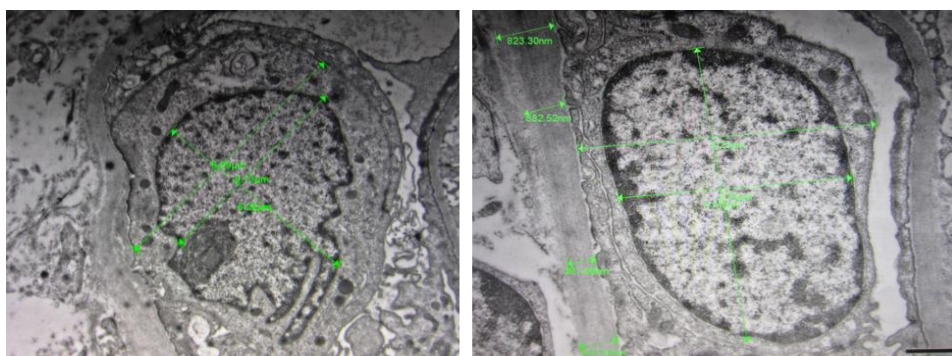


ตารางที่ 5: เปรียบเทียบลักษณะนิวเคลียสของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD

ลักษณะของ PECs	ผู้ป่วย FSGS (n = 7)	ผู้ป่วย MCD (n = 8)	p value
จำนวน PECs	86	76	NA
รูปร่างของนิวเคลียส			
- รูปร่างแบน	43 (50%)	49 (64.5%)	0.108
- รูปร่างไข่	25 (29.1%)	19 (25%)	
- รูปร่างกลม	18 (20.9%)	8 (10.5%)	
ลักษณะโครมาติน			
- Heterochromatin	30 (34.9%)	53 (69.7%)	< 0.001
- Increased euchromatin	56 (65.1%)	23 (30.3%)	
นิวคลีโอลัส			
- ไม่พบ	67 (77.9%)	59 (80.8%)	0.652
- พบ	19 (22.1%)	14 (19.2%)	

#### 4.3 การพบ activated PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

อาศัยนิยามจากการศึกษาในอดีตในการระบุเซลล์ที่มีลักษณะเข้าได้กับ activated PECs (รูปที่ 11) พบว่าในผู้ป่วย FSGS ทุกรายพบมี activated PECs อย่างน้อย 1 เซลล์ใน glomerulus โดยอัตราส่วนของ activated PECs ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 53.6 (95% CI = 26.6 - 80.6) ในขณะที่ผู้ป่วยโรค MCD ตรวจพบ activated PECs อย่างน้อย 1 เซลล์ใน glomerulus ในผู้ป่วย 6 ราย (ร้อยละ 75) อัตราส่วนของ activated PECs ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 15.8 (95% CI = 3.1 - 28.5)



รูปที่ 11: แสดง activated PECs ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญคือ เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มากกว่า 3.5 ไมโครเมตร และมีการเพิ่มขึ้นของโครมาตินชนิด euchromatin

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม พบว่าผู้ป่วยโรค FSGS มีอัตราส่วนของ activated PECs ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดมากกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.004$ ) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6: เปรียบเทียบการตรวจพบ activated PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD

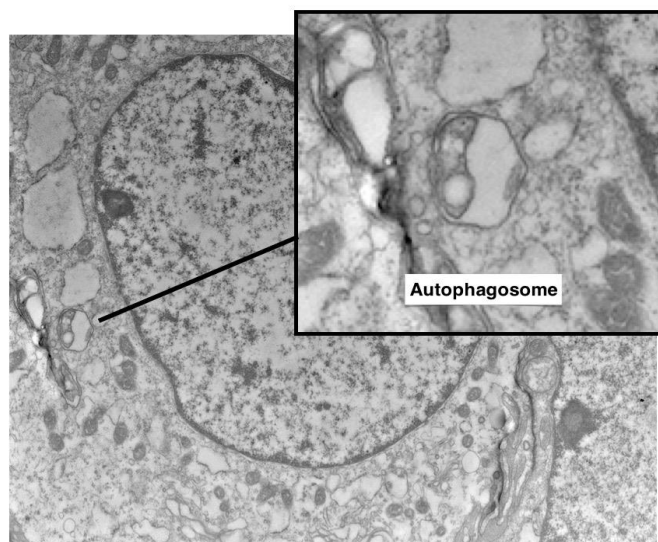
Parameters	ผู้ป่วย FSGS (n = 7)	ผู้ป่วย MCD (n=8)	p value
Presence of activated PECs	7 of 7 (100%)	6 of 8 (75%)	0.467
Percentage of activated PECs (%)	53.6 (26.6 - 80.6)	15.8 (3.1 - 28.5)	0.004

#### 4.4 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ของ PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

##### 4.4.1 Autophagy (รูปที่ 12)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบภาวะ autophagy ของ PECs ในผู้ป่วยโรค FSGS 4 ราย (ร้อยละ 57.1) อัตราส่วนของ PECs ที่มีภาวะ autophagy ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 12.5 (95% CI = 0.0 - 30.4) ส่วนผู้ป่วยโรค MCD พบภาวะ autophagy ของ PECs ในผู้ป่วย 2 ราย (ร้อยละ 25) อัตราส่วนของ PECs ที่มีภาวะ autophagy ต่อจำนวน PECs

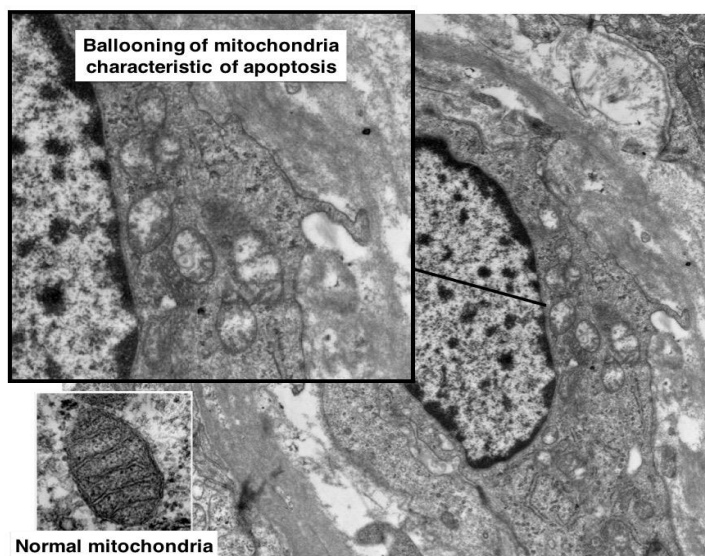
ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 7.4 (95% CI = 0.0 - 24.9) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม พบการเกิด autophagy ของ PECs ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.584$ ) (ตารางที่ 7)



รูปที่ 12: แสดงภาวะ autophagy ของ PECs โดยพบลักษณะถุงน้ำในไซโตพลาสซึมที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้น ภายในบรรจุไซโตพลาสซึมของเซลล์ (autophagosome)

#### 4.4.2 Apoptosis (รูปที่ 13)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ไม่พบลักษณะ chromatin condensation, nuclear fragmentation แต่พบลักษณะ ballooning และ fissure ของไมโทคอนเดรียซึ่งบ่งบอกถึงการเกิด apoptosis ของ PECs โดยในผู้ป่วยโรค FSGS พบ apoptosis ในผู้ป่วย 3 ราย (ร้อยละ 42.9) และอัตราส่วนของ PECs ที่มีลักษณะ apoptosis ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 9.2 (95% CI 0 - 22.1) ส่วนผู้ป่วยโรค MCD พบ apoptosis ของ PECs ในผู้ป่วย 2 ราย (ร้อยละ 25) และอัตราส่วนของ PECs ที่มีลักษณะ apoptosis ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 4.6 (95% CI 0 - 13.1) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของการพบ apoptosis ของ PECs ( $p = 0.425$ ) (ตารางที่ 7)



รูปที่ 13: PECs ที่มีภาวะ apoptosis จะพบการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ การโป่งพอง (ballooning) หรือการคอด (fissure)

#### 4.4.3 ER stress

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบการขยายตัวของ ER ที่เข้าได้กับภาวะ ER stress ของ PECs ในผู้ป่วยโรค FSGS 3 ราย (ร้อยละ 42.9) อัตราส่วนของ PECs ที่พบภาวะ ER stress ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 16.5 (95% CI = 0.0 - 39.2) ส่วนผู้ป่วยโรค MCD พบภาวะ ER stress ของ PECs ในผู้ป่วย 2 ราย (ร้อยละ 25) อัตราส่วนของ PECs ที่พบภาวะ ER stress ต่อจำนวน PECs ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 7.1 (95% CI = 0.0 - 21.6) เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่ม พบว่าอัตราการพบภาวะ ER stress ของ PECs ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.350$ ) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7: เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs	ผู้ป่วย FSGS (n = 7)	ผู้ป่วย MCD (n = 8)	p value
Presence of apoptosis (%)	3 of 7 (42.9%)	2 of 8 (25%)	0.608
Percent apoptosis*	9.2 (0 - 22.1)	4.6 (0 - 13.1)	0.425
Presence of autophagy (%)	4 of 7 (57.1%)	2 of 8 (25%)	0.315
Percent autophagy*	12.5 (0 - 30.4)	7.4 (0 - 24.9)	0.584
Presence of ER stress (%)	3 of 7 (42.9%)	2 of 8 (25%)	0.608
Percent ER stress*	16.5 (0 - 39.2)	7.1 (0 - 21.6)	0.350

\*แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (95% confidence interval)

#### 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิก กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ของ PECs

จากผลการศึกษาในตอนต้น พบว่าลักษณะทางคลินิก ได้แก่ อายุ เพศ ค่าการทำงานของไต ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และการได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ไม่แตกต่างกัน และพบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียด ได้แก่ autophagy, apoptosis และ ER stress ไม่แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางคลินิกที่สำคัญกับการพบ หรือไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ

จากจำนวนผู้ป่วยโรค FSGS 7 ราย และผู้ป่วยโรค MCD 8 ราย สามารถบันทึกภาพ PECs ที่กำลังขยายสูงได้ทั้งหมด 162 เซลล์ พบเซลล์ที่มีภาวะ autophagy 9 เซลล์ apoptosis 10 เซลล์ ER stress 14 เซลล์ และ activated PECs 47 เซลล์ วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ autophagy โดยใช้ logistic regression พบว่า อายุที่มากขึ้น (odd ratio [OR] = 1.04, 95% CI = 1.01 - 1.07,  $p = 0.003$ ) และการมีความดันโลหิตสูง (OR = 29.96, 95% CI = 5.73 - 156.76,  $p < 0.001$ ) สัมพันธ์กับการพบ autophagy ของ PECs ในขณะที่ eGFR ที่มากขึ้น (OR = 0.98, 95% CI = 0.96 - 0.99,  $p = 0.037$ ) และการได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ (OR = 0.16, 95% CI = 0.03 - 0.80,  $p = 0.028$ ) จะลดโอกาสเกิด autophagy ของ PECs อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ส่วน อายุ เพศ systolic BP, diastolic BP, MAP และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะไม่สัมพันธ์กับการพบภาวะ autophagy ของ PECs (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ autophagy ของ PECs

ลักษณะทางคลินิก	Odd ratio (95% CI)	p value
อายุ (ปี)	1.04 (1.01 - 1.07)	0.003
เพศชาย	0.62 (0.12 - 3.17)	0.565
Systolic BP (มม.ปรอท)	1.09 (0.99 - 1.18)	0.056
Diastolic BP (มม.ปรอท)	1.03 (0.98 - 1.09)	0.266
MAP (มม.ปรอท)	1.09 (0.99 - 1.20)	0.066
ความดันโลหิตสูง	29.96 (5.73 - 156.76)	< 0.001
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	0.98 (0.96 - 0.99)	0.037
ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (ก./วัน)	1.00 (0.93 - 1.07)	0.990
การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไต	0.16 (0.03 - 0.80)	0.025

**คำย่อ:** BP, blood pressure; MAP, mean arterial pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

สำหรับภาวะ apoptosis ของ PECs พบว่า diastolic BP ที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.19, 95% CI = 1.08 - 1.30,  $p < 0.001$ ) และ MAP ที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.25, 95% CI = 1.12 - 1.41,  $p < 0.001$ ) สัมพันธ์กับการพบ apoptosis ของ PECs ในขณะที่ systolic BP ที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.03, 95% CI = 0.95 - 1.11,  $p = 0.476$ ) และการพบความดันโลหิตสูง (OR = 1.56, 95% CI = 0.31 - 7.85,  $p = 0.590$ ) ไม่สัมพันธ์กับการพบ apoptosis ของ PECs ลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่ อายุที่เพิ่มขึ้น เพศ eGFR ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและการได้รับยาสเตียรอยด์ ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะ apoptosis ของ PECs (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ apoptosis ของ PECs

ลักษณะทางคลินิก	Odd ratio (95% CI)	p value
อายุ (ปี)	1.01 (0.98 - 1.03)	0.672
เพศชาย	0.71 (0.14 - 3.57)	0.681
Systolic BP (มม.ปรอท)	1.03 (0.95 - 1.11)	0.470
Diastolic BP (มม.ปรอท)	1.19 (1.08 - 1.30)	< 0.001
MAP (มม.ปรอท)	1.25 (1.12 - 1.41)	< 0.001
ความดันโลหิตสูง	1.56 (0.31 - 7.85)	0.590
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	0.99 (0.97 - 1.01)	0.197
ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (ก./วัน)	0.93 (0.84 - 1.02)	0.126
การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไต	0.93 (0.25 - 3.42)	0.908
<b>คำย่อ:</b> BP, blood pressure; MAP, mean arterial pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate.		

สำหรับภาวะ ER stress พบว่า อายุที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.04, 95% CI = 1.02 - 1.06,  $p = 0.001$ ) diastolic BP ที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.08, 95% CI = 1.02 - 1.15,  $p = 0.008$ ) MAP ที่เพิ่มขึ้น (OR = 1.11, 95% CI = 1.03 - 1.20,  $p = 0.006$ ) และการมีความดันโลหิตสูง (OR = 17.23, 95% CI = 5.07 - 58.59,  $p < 0.001$ ) สัมพันธ์กับการพบ ER stress ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ เพศชาย (OR = 0.28, 95% CI = 0.09 - 0.93,  $p = 0.037$ ) และการได้รับยาสเตียรอยด์ (OR = 0.04, 95% CI = 0.01 - 0.30,  $p = 0.002$ ) สัมพันธ์กับการพบภาวะ ER stress ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่ systolic BP ค่า eGFR และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่เพิ่มขึ้น ไม่มีความสัมพันธ์กับการพบภาวะ ER stress (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบภาวะ ER stress ของ PECs

ลักษณะทางคลินิก	Odd ratio (95% CI)	p value
อายุ (ปี)	1.04 (1.02 - 1.06)	0.001
เพศชาย	0.28 (0.09 - 0.93)	0.037
Systolic BP (มม.ปรอท)	0.99 (0.93 - 1.06)	0.794
Diastolic BP (มม.ปรอท)	1.08 (1.02 - 1.15)	0.008
MAP (มม.ปรอท)	1.11 (1.03 - 1.20)	0.006
ความดันโลหิตสูง	17.23 (5.07 - 58.59)	< 0.001
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	0.99 (0.97 - 1.00)	0.144
ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (ก./วัน)	0.98 (0.92 - 1.04)	0.546
การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไต	0.04 (0.01 - 0.30)	0.002

**คำย่อ:** BP, blood pressure; MAP, mean arterial pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบ activated PECs โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างของเซลล์จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ามีเพียงการมีความดันโลหิตสูงเท่านั้นที่สัมพันธ์กับการพบ activated PECs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 5.00, 95% CI = 1.98 - 12.59,  $p = 0.001$ ) ในขณะที่ อายุ เพศ systolic BP, diastolic BP, MAP ค่า eGFR ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และการได้รับยาสเตียรอยด์ ไม่มีความสัมพันธ์กับการพบ activated PECs (ตารางที่ 11)



ตารางที่ 11: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกกับการพบ activated PECs

ลักษณะทางคลินิก	Odd ratio (95% CI)	p value
อายุ (ปี)	1.00 (0.99 - 1.02)	0.650
เพศชาย	1.06 (0.41 - 2.74)	0.903
Systolic BP (มม.ปรอท)	1.06 (1.02 - 1.11)	0.006
Diastolic BP (มม.ปรอท)	0.99 (0.98 - 1.01)	0.572
MAP (มม.ปรอท)	1.03 (0.97 - 1.08)	0.322
ความดันโลหิตสูง	5.00 (1.98 - 12.59)	0.001
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	1.00 (0.99 - 1.00)	0.367
ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (ก./วัน)	0.99 (0.96 - 1.03)	0.732
การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนเจาะไต	1.29 (0.64 - 2.62)	0.479
คำย่อ: BP, blood pressure; MAP, mean arterial pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate.		

#### 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ที่พบใน PECs

จากจำนวนผู้ป่วยโรค FSGS 7 ราย และผู้ป่วยโรค MCD 8 ราย สามารถบันทึกภาพ PECs ที่กำลังขยายสูงได้ทั้งหมด 162 เซลล์ ในจำนวนนี้ พบเซลล์ที่มีภาวะ autophagy 9 เซลล์ (ร้อยละ 5.56) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานต่างๆ ของ PECs กับการพบภาวะ autophagy ด้วย univariable logistic regression พบว่าความสูงของนิวเคลียส (OR = 1.496, 95% CI = 1.025 - 2.184,  $p = 0.037$ ) ความหนาเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule (OR = 2.002, 95% CI = 1.031 - 3.885,  $p = 0.040$ ) และรูปร่างของนิวเคลียสรูปไข่ (OR = 5.769, 95% CI = 1.073 - 31.027,  $p = 0.041$ ) มีความสัมพันธ์กับภาวะ autophagy ของ PECs อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของ PECs (OR = 1.285, 95% CI = 0.966 - 1.709,  $p = 0.115$ ) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อซัยโตพลาสซึมของ PECs (OR = 0.035, 95% CI = 0.001 - 2.027,  $p = 0.729$ ) นิวเคลียสรูปกลม (OR = 2.870, 95% CI = 0.600 - 13.734,  $p = 0.198$ ) การเพิ่มขึ้นของ euchromatin ในนิวเคลียส (OR = 2.593, 95% CI = 0.646 - 10.403,  $p = 0.279$ ) และการพบนิวคลีโอลัส (OR = 0.406, 95% CI = 0.050 - 3.326,  $p = 0.244$ ) ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะ autophagy ของ PECs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ autophagy

ลักษณะของ PECs	Odd ratio (95% CI)	$p$ value
PECs diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.271 (0.943 - 1.713)	0.115
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.496 (1.025 - 2.184)	0.037
Nuclear/cytoplasmic ratio	1.621 (0.105 - 24.947)	0.729
Bowman's basement membrane thickness ( $\mu\text{m}$ )	2.002 (1.031 - 3.885)	0.040
Oval-shaped nucleus	5.769 (1.075 - 31.027)	0.041
Round-shaped nucleus	3.750 (0.502 - 28.016)	0.198
Increased euchromatin	2.192 (0.529 - 9.084)	0.279
Presence of nucleolus	2.420 (0.548 - 10.696)	0.244

จากจำนวน PECs ที่กำลังขยายสูง 162 เซลล์ พบเซลล์ที่มีภาวะ apoptosis 10 เซลล์ (ร้อยละ 6.62) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานต่างๆ ของ PECs กับการพบภาวะ apoptosis ด้วย univariable logistic regression พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของ PECs (OR = 1.285, 95% CI = 0.966 - 1.709,  $p = 0.084$ ) ความสูงของนิวเคลียส (OR = 1.267, 95% CI = 0.862 - 1.863,  $p = 0.229$ ) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อซัยโตพลาสซึมของ PECs (OR = 0.035, 95% CI = 0.001 - 2.027,  $p = 0.105$ ) ความหนาเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule (OR = 0.931, 95% CI = 0.476 - 1.821,  $p = 0.834$ ) รูปร่างของนิวเคลียสรูปไข่ (OR = 1.610, 95% CI = 0.344 - 7.525,  $p = 0.545$ ) นิวเคลียสรูปกลม (OR = 2.870, 95% CI = 0.600 - 13.734,  $p =$

0.187) การเพิ่มขึ้นของ euchromatin ในนิวเคลียส (OR = 2.593, 95% CI = 0.646 - 10.403,  $p = 0.179$ ) และการพบนิวคลีโอลัส (OR = 0.406, 95% CI = 0.050 - 3.326,  $p = 0.406$ ) ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะ apoptosis ของ PECs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ apoptosis

ลักษณะพื้นฐาน	Odd ratio (95% CI)	<i>p</i> value
PECs diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.285 (0.966 - 1.709)	0.084
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.267 (0.862 - 1.863)	0.229
Nuclear/cytoplasmic ratio	0.035 (0.001 - 2.027)	0.105
Bowman's basement membrane thickness ( $\mu\text{m}$ )	0.931 (0.476 - 1.821)	0.834
Oval-shaped nucleus	1.610 (0.344 - 7.525)	0.545
Round-shaped nucleus	2.870 (0.600 - 12.734)	0.187
Increased euchromatin	2.593 (0.646 - 10.403)	0.179
Presence of nucleolus	0.406 (0.050 - 3.326)	0.406

จากจำนวน PECs ที่กำลังขยายสูง 162 เซลล์ พบเซลล์ที่มีภาวะ ER stress 14 เซลล์ (ร้อยละ 8.64) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานต่างๆ ของ PECs กับการพบภาวะ ER stress ด้วย univariable logistic regression พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของ PECs (OR = 1.201, 95% CI = 0.929 - 1.553,  $p = 0.161$ ) ความสูงของนิวเคลียส (OR = 1.180, 95% CI = 0.833 - 1.673,  $p = 0.352$ ) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมของ PECs (OR 0.104, 95% CI 0.003 - 4.172,  $p = 0.229$ ) ความหนาเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule (OR = 0.938, 95% CI = 0.518 - 1.698,  $p = 0.833$ ) รูปร่างของนิวเคลียสรูปไข่ (OR = 0.768, 95% CI = 0.194 - 3.049,  $p = 0.708$ ) นิวเคลียสรูปกลม (OR = 1.370, 95% CI = 0.336 - 5.580,  $p = 0.661$ ) การเพิ่มขึ้นของ euchromatin ในนิวเคลียส (OR = 2.006, 95% CI = 0.642 - 6.270,  $p = 0.231$ ) และการพบ

นิวคลีโอไลส์ (OR = 1.049, 95% CI = 0.274 - 3.986,  $p = 0.948$ ) ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะ ER stress ของ PECs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14: ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานของ PECs กับการพบภาวะ ER stress

ลักษณะพื้นฐาน	Odd ratio (95% CI)	$p$ value
PECs diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.201 (0.929 - 1.553)	0.161
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.180 (0.833 - 1.673)	0.352
Nuclear/cytoplasmic ratio	0.104 (0.003 - 4.172)	0.229
Bowman's basement membrane thickness ( $\mu\text{m}$ )	0.938 (0.518 - 1.698)	0.833
Oval-shaped nucleus	0.768 (0.194 - 3.049)	0.708
Round-shaped nucleus	1.370 (0.336 - 5.580)	0.661
Increased euchromatin	2.006 (0.642 - 6.270)	0.231
Presence of nucleolus	1.049 (0.274 - 3.986)	0.948

#### 4.7 การเปรียบเทียบโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ของ activated PECs และ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น

จากจำนวน PECs 162 เซลล์ พบว่ามี PECs 47 เซลล์ที่มีลักษณะเข้าเกณฑ์ของ activated PECs คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มากกว่า 3.5 ไมโครเมตร ร่วมกับมีโครมาตินชนิด euchromatin เพิ่มขึ้น

Activated PECs มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.54 ไมโครเมตร (95% CI = 4.78 - 8.30) ความสูงเฉลี่ยของนิวเคลียส 4.88 ไมโครเมตร (95% CI = 3.54 - 6.22) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมของ PECs เฉลี่ย 0.75 (95% CI = 0.65 - 0.85) ความหนาเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule เฉลี่ย 2.13 ไมโครเมตร (95% CI = 1.02 - 3.25) นิวเคลียสมีรูปร่างแบน ร้อยละ 17 รูปไข่ร้อยละ 40.4 รูปกลมร้อยละ 42.6 มีการเพิ่มขึ้นของ euchromatin ร้อยละ 100 และตรวจพบนิวคลีโอไลส์ร้อยละ 34

PECs อื่นๆ ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 3.80 ไมโครเมตร (95% CI 2.57 - 5.03) ความสูงเฉลี่ยของนิวเคลียส 2.63 ไมโครเมตร (95% CI = 1.86 - 3.40) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมของ PECs เฉลี่ย 0.73 (95% = CI 0.51 - 0.95) ความหนาของเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule เฉลี่ย 2.02 ไมโครเมตร (95% CI = 1.19 - 2.94) นิวเคลียสมีรูปร่างแบน ร้อยละ 73 รูปไข่ร้อยละ 21.7 รูปกลมร้อยละ 5.2 มีการเพิ่มขึ้นของ euchromatin ร้อยละ 27.8 และตรวจพบนิวคลีโอไล์ร้อยละ 15.2

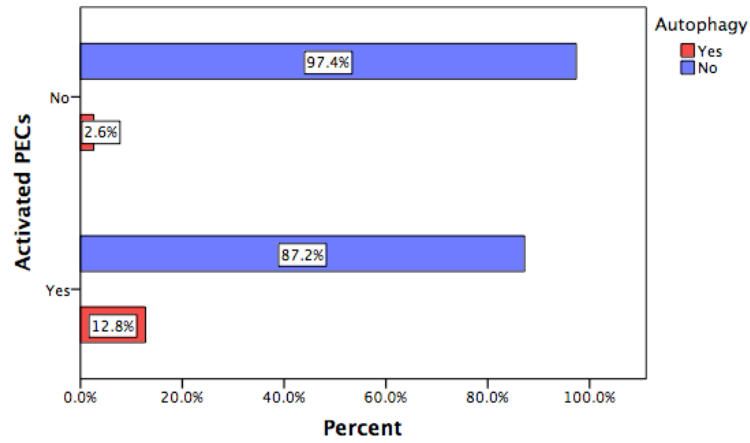
เปรียบเทียบโครงสร้างเชิงละเอียดพื้นฐานของ PECs พบว่า activated PECs มีเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงของนิวเคลียสมากกว่า PECs อื่นๆ ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , ตามลำดับ) นอกจากนี้ activated PECs ยังมีรูปร่างของนิวเคลียสแตกต่างจาก PECs อื่นๆ โดย activated PECs มีนิวเคลียสรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ นิวเคลียสรูปปร่างแบนเป็นส่วนน้อย ในขณะที่ PECs อื่นๆ ส่วนใหญ่มีนิวเคลียสรูปปร่างแบน พบนิวเคลียสรูปกลมเป็นส่วนน้อย ( $p < 0.001$ ) นอกจากนี้ activated PECs ยังพบการเพิ่มขึ้นของโครมาตินชนิด euchromatin มากกว่า ( $p < 0.001$ ) และพบนิวคลีโอไล์ได้มากกว่า PECs อื่นๆ ( $p = 0.007$ ) ส่วนโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ได้แก่ อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึม ความหนาเยื่อพื้นฐานของ Bowman's capsule ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.431$  และ  $p = 0.509$  ตามลำดับ) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15: เปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ activated PECs และ PECs ปกติ

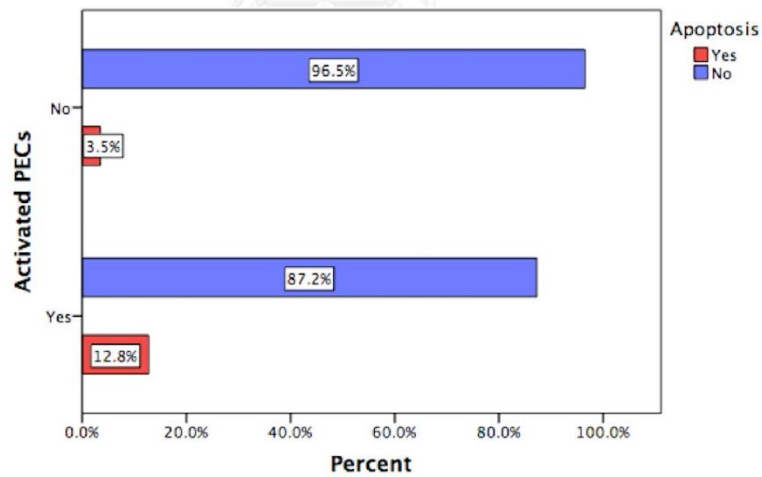
ลักษณะพื้นฐาน	Activated PECs (n = 47)	PECs ปกติ (n = 115)	p value
Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )	6.54 (4.78 - 8.30)	3.80 (2.57 - 5.03)	< 0.001
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	4.88 (3.54 - 6.22)	2.63 (1.86 - 3.40)	< 0.001
Nuclear/cytoplasmic ratio	0.75 (0.65 - 0.85)	0.73 (0.51 - 0.95)	0.431
Bowman's basement membrane thickness ( $\mu\text{m}$ )	2.13 (1.02 - 3.25)	2.02 (1.19 - 2.94)	0.509
Nuclear shape			
- flat	8 (17%)	84 (73%)	< 0.001
- oval	19 (40.4%)	25 (21.7%)	
- round	20 (42.6%)	6 (5.2%)	
Increased euchromatin	47 (100%)	32 (27.8%)	< 0.001
Presence of nucleolus	16 (34%)	17 (15.2%)	0.007

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะถูกกระตุ้นของ PECs กับการเกิดภาวะ apoptosis autophagy และ ER stress พบว่าจาก activated PECs ทั้งหมด 47 เซลล์ พบภาวะ autophagy 6 เซลล์ (ร้อยละ 12.8) ภาวะ apoptosis 6 เซลล์ (ร้อยละ 12.8) และภาวะ ER stress 5 เซลล์ (ร้อยละ 10.6) ในขณะที่ PECs อื่นๆ จำนวน 115 เซลล์ พบภาวะ autophagy 3 เซลล์ (ร้อยละ 2.6) ภาวะ apoptosis 4 เซลล์ (ร้อยละ 3.5) และภาวะ ER stress 9 เซลล์ (ร้อยละ 7.8) (แผนภูมิที่ 3-5)

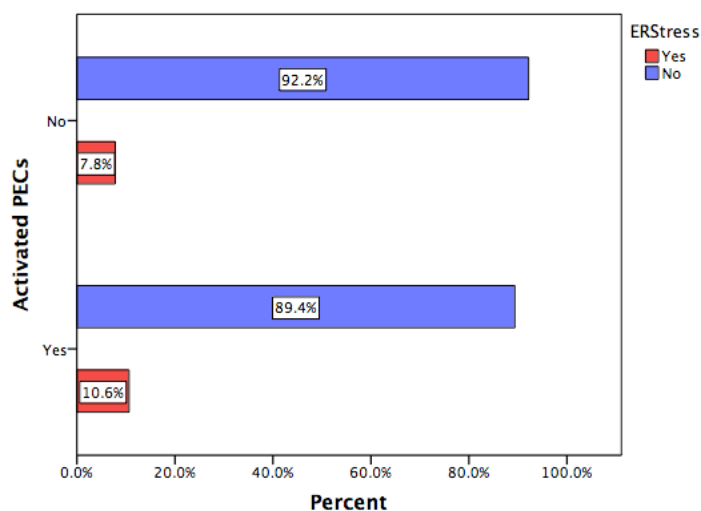
แผนภูมิที่ 3: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ autophagy เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น



แผนภูมิที่ 4: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ apoptosis เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น



แผนภูมิที่ 5: แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีภาวะ ER stress เปรียบเทียบระหว่าง activated PECs กับ PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น



เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง activated PECs และ PECs อื่นๆ พบว่า activated PECs พบภาวะ autophagy และ apoptosis ได้มากกว่า PECs ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.018$  และ  $p = 0.036$  ตามลำดับ) ในขณะที่พบภาวะ ER stress ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.550$ ) (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16: เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดที่สำคัญระหว่าง activated PECs กับ PECs ปกติ

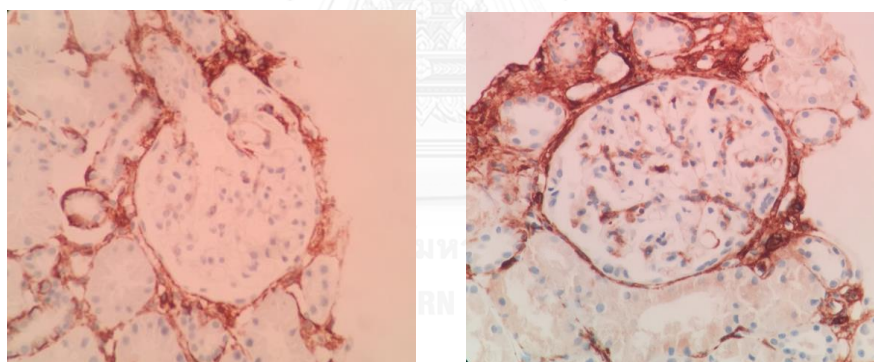
การเปลี่ยนแปลงของ PECs	Activated PECs n = 47	PECs ปกติ n = 115	p value
Autophagy	6 (12.8%)	3 (2.6%)	0.018
Apoptosis	6 (12.8%)	4 (3.5%)	0.036
ER stress	5 (10.6%)	9 (7.8%)	0.550



#### 4.8 การตรวจชิ้นเนื้อไตด้วยการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีนสัญลักษณ์ CD44

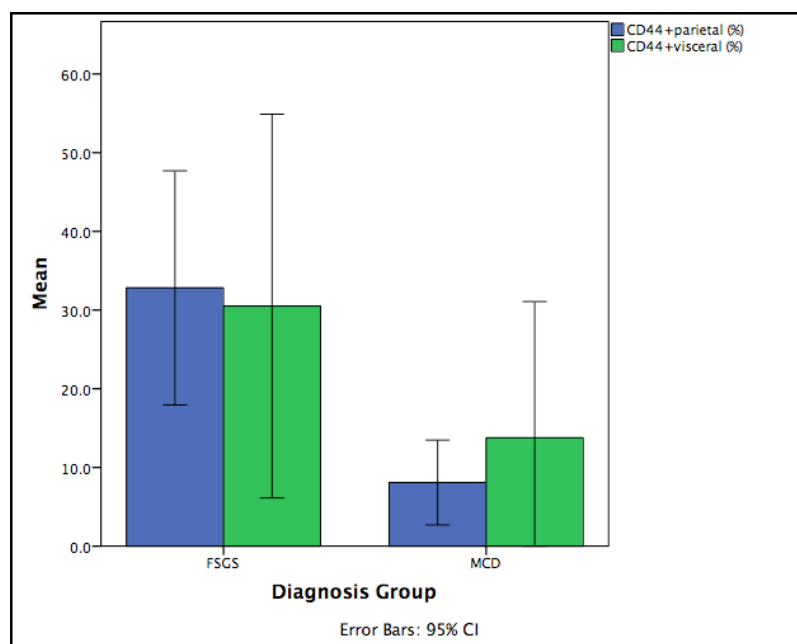
ผู้ป่วยโรค FSGS มีจำนวน glomerulus เฉลี่ย 24 glomerulus (95% CI = 12.4 - 35.6) ผู้ป่วยโรค MCD มีจำนวน glomerulus เฉลี่ย 29.8 glomerulus (95% CI = 16.8 - 42.8)

แบ่งการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 (รูปที่ 14) ให้ผลบวกใน glomerulus เป็น 2 ประเภท คือย้อมติดเซลล์เยื่อซึ่งอยู่บน Bowman's capsule (ตำแหน่ง parietal) หรือย้อมติดเซลล์ที่อยู่บนหลอดเลือดฝอยของ glomerulus (ตำแหน่ง visceral) ในผู้ป่วยโรค FSGS พบว่าการย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง parietal ในผู้ป่วยทุกราย โดยเฉลี่ยย้อมติดใน glomerulus ร้อยละ 32 (95% CI = 16.7 - 48.9) ของจำนวน glomerulus ทั้งหมด ส่วนการย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง visceral พบในผู้ป่วย 6 ราย (ร้อยละ 85.7) โดยเฉลี่ยย้อมติดใน glomerulus ร้อยละ 30.5 (95% CI = 4.1 - 56.9) ส่วนในผู้ป่วยโรค MCD พบการย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง parietal ในผู้ป่วย 7 ราย (ร้อยละ 87.5) โดยเฉลี่ยย้อมติดใน glomerulus ร้อยละ 8.1 (95% CI = 2.3 - 13.9) ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง visceral ในผู้ป่วย 5 ราย (ร้อยละ 62.5) เฉลี่ยย้อมติดใน glomerulus ร้อยละ 13.8 (95% CI = 0 - 32.6) (แผนภูมิที่ 6)



รูปที่ 14: การย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีนสัญลักษณ์ CD44 ให้ผลลบ (รูปซ้าย) และผลบวก (รูปขวา)

แผนภูมิที่ 6: แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 ที่เซลล์เยื่อในตำแหน่ง parietal และตำแหน่ง visceral ด้วยการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD



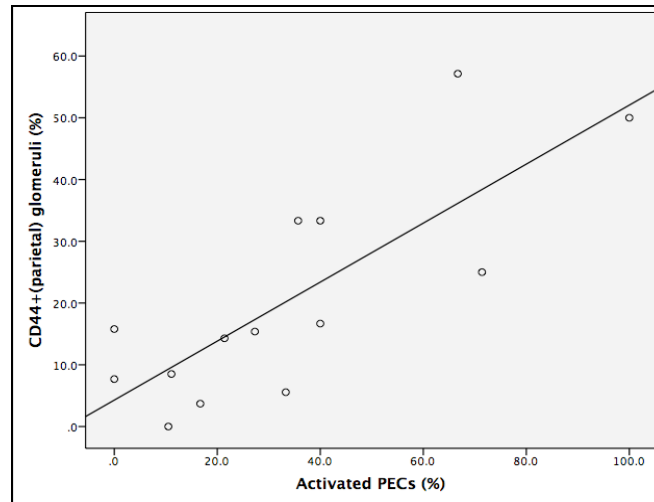
เปรียบเทียบร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD พบว่าผู้ป่วยโรค FSGS มีร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 ที่เซลล์ตำแหน่ง parietal มากกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.002$ ) แต่ร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 ที่เซลล์ในตำแหน่ง visceral ไม่แตกต่างกัน ( $p = 0.196$ ) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17: ข้อมูลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44

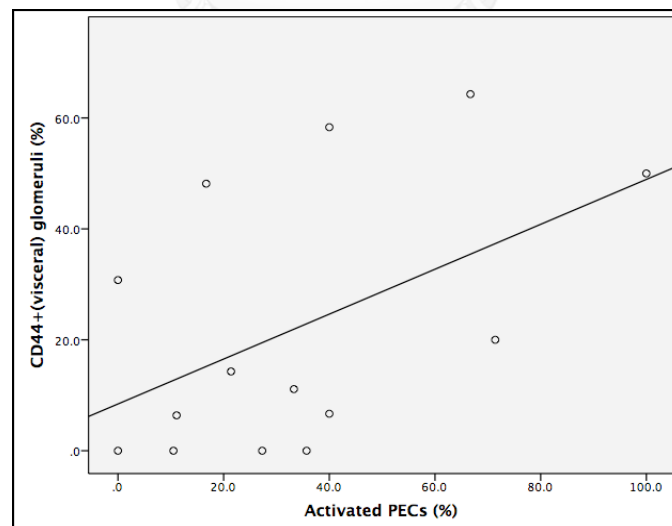
ข้อมูล	ผู้ป่วยโรค FSGS (n = 7)	ผู้ป่วยโรค MCD (n = 8)	p value
Mean glomerulus number*	24 (12.4 - 35.6)	29.8 (16.8 - 42.8)	0.387
CD44-positive (parietal)*	32.8 (16.7 - 48.9)	8.1 (2.3 - 13.9)	0.002
CD44-positive (visceral)*	30.5 (4.1 - 56.9)	13.8 (0 - 32.6)	0.196
*แสดงผลเป็นร้อยละ (95% confidence interval)			

เมื่อคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ activated PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กับปริมาณการย้อมติดโปรตีน CD44 ซึ่งสะท้อนถึง activated PECs โดยอาศัยคุณสมบัติของเซลล์ในการแสดงออกของโปรตีนสัญลักษณ์ CD44 พบว่าร้อยละของ activated PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีความสัมพันธ์กับร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง parietal ( $r = 0.80, p = 0.001$ ) และร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง visceral ( $r = 0.59, p = 0.027$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แผนภูมิที่ 7 และ 8)

แผนภูมิที่ 7: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ activated PECs ตามนิยามของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กับร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง parietal ( $r = 0.80, p = 0.001$ )



แผนภูมิที่ 8: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ activated PECs ตามนิยามของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กับร้อยละของ glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์ตำแหน่ง visceral ( $r = 0.59, p = 0.027$ )



## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผล

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดที่สำคัญของ PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD โดยแสดงให้เห็นว่าแม้ไม่พบความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย แต่พบความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานของ PECs ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม กล่าวคือ PECs ของผู้ป่วยโรค FSGS มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและความสูงเฉลี่ยของนิวเคลียสมากกว่า PECs ของผู้ป่วยโรค MCD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างของรูปร่างของนิวเคลียส แต่พบลักษณะโครมาตินชนิด euchromatin มากกว่าในผู้ป่วยโรค FSGS

การวิเคราะห์ activated PECs โดยใช้นิยามทางลักษณะโครงสร้างของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน<sup>(28)</sup> พบว่าสามารถพบ activated PECs ได้ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แต่พบ activated PECs ในอัตราส่วนที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยโรค FSGS เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรค MCD (ร้อยละ 53.6 และร้อยละ 15.8 ตามลำดับ) การวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานของ PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ระหว่าง activated PECs กับ PECs อื่นๆ พบว่า activated PECs มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ และความสูงของนิวเคลียสมากกว่า และรูปร่างของนิวเคลียสมีรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ ต่างจาก PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้น ซึ่งมักมีรูปร่างแบนเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ใน activated PECs ยังพบการเพิ่มขึ้นของโครมาตินชนิด euchromatin และพบนิวคลีโอลัสในนิวเคลียสมากกว่า PECs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย

ส่วนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ในคำถาถามงานวิจัยทุกขุมมี มีแนวโน้มพบภาวะ autophagy, apoptosis และ ER stress ใน PECs ของผู้ป่วยโรค FSGS ได้มากกว่า PECs ของผู้ป่วยโรค MCD สอดคล้องกับการพบ activated PECs แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนน้อยกว่าที่กำหนดไว้ ทำให้ power ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลดลง หากเพิ่มจำนวนผู้ป่วยในการศึกษาได้ตามที่กำหนดอาจทำให้ความแตกต่างดังกล่าวมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม จำนวนผู้ป่วยที่สามารถเข้าร่วมในการศึกษาได้มีจำกัดมาก เนื่องจากต้องนำชิ้นเนื้อไตเก่าที่เก็บไว้มาใช้ ทำให้แม้มีจำนวนผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD จำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่ชิ้นเนื้อไตที่เหลืออยู่จะไม่เพียงพอ หรือไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาจึงไม่สามารถใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาได้ในที่สุด

ลักษณะทางคลินิกมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดของ PECs โดยอายุที่เพิ่มขึ้น และการมีความดันโลหิตสูง สัมพันธ์กับการพบ autophagy ของ PECs ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า eGFR ที่เพิ่มขึ้น และการได้รับยาสเตียรอยด์ สัมพันธ์กับการพบ autophagy ของ PECs ที่ลดลง diastolic BP และ MAP ที่เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ของ PECs ที่เพิ่มขึ้น อายุที่เพิ่มขึ้น diastolic BP, MAP และการพบความดันโลหิตสูง สัมพันธ์กับการเกิด ER stress ของ PECs ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ เพศชาย และการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ สัมพันธ์กับการพบ ER stress ของ PECs ที่ลดลง ส่วนการพบ activated PECs ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการมีความดันโลหิตสูง และพบว่า ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะไม่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดใดๆ ของ PECs เลย

Activated PECs สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดอื่นๆ ได้แก่ ภาวะ autophagy และ apoptosis ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์มีการบาดเจ็บ สะท้อนว่าการถูกกระตุ้นของ PECs อาจเกิดจากการบาดเจ็บต่อ PECs ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งเช่นกัน แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับภาวะ ER stress

เมื่อนำข้อมูลจากศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 พบว่าอัตราส่วนของจำนวน activated PECs ต่อจำนวน PECs ทั้งหมด มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับอัตราส่วนของจำนวน glomerulus ที่ย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาติดโปรตีน CD44 ทั้งที่ตำแหน่ง parietal และตำแหน่ง visceral แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันของการระบุ activated PECs ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา กับการใช้นิยามทางโครงสร้างของ PECs เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

## 5.2 สรุปผล

สามารถพบ activated PECs ได้ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แต่ผู้ป่วยโรค FSGS จะมีอัตราส่วนของ activated PECs ต่อจำนวน PECs ทั้งหมดสูงกว่าผู้ป่วยโรค MCD อย่างชัดเจน ดังนั้นอาจนำการพบ activated PECs ในอัตราส่วนที่มากมาช่วยสนับสนุน และวินิจฉัยแยกโรค FSGS ออกจากโรค MCD ได้ โดยเฉพาะกรณีที่ยื่นเนื้อไตมีจำนวน glomerulus น้อยกว่า 20 glomeruli และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง ไม่พบรอยโรค segmental sclerosis ที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรค FSGS โดยใช้เกณฑ์ทางพยาธิวิทยาตามปกติ

### 5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่เปรียบเทียบการพบ activated PECs ระหว่างผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD ชนิดปฐมภูมิ โดยใช้นิยามทางลักษณะโครงสร้างของ PECs ที่วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า activated PECs สามารถพบได้ในทั้งผู้ป่วยโรค FSGS และผู้ป่วยโรค MCD

การศึกษาก่อนหน้าโดย Fatima และคณะ<sup>(26)</sup> ศึกษาการพบ activated PECs เพื่อใช้วินิจฉัยแยกโรค FSGS ออกจากโรค MCD เช่นเดียวกัน แต่ใช้เทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยาโดยย้อมโปรตีน CD44 เพื่อระบุ activated PECs พบว่าผู้ป่วยโรค FSGS ย้อมติดโปรตีน CD44 ร้อยละ 41 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง parietal และร้อยละ 32.7 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง visceral ในขณะที่ผู้ป่วยโรค MCD ย้อมติดโปรตีน CD44 ร้อยละ 0.7 บนเซลล์ที่ตำแหน่ง parietal และร้อยละ 2.6 ที่ตำแหน่ง visceral

ข้อมูลจากการศึกษาของ Fatima และการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในโรค MCD ที่พยากรณ์โรคของโรคไม่ควรเกิดการกระตุ้น PECs แต่ก็สามารถพบการเปลี่ยนแปลงของ PECs ทั้งการสร้างโปรตีนสัญลักษณ์ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เป็นลักษณะของ activated PECs ได้ แต่ในอัตราส่วนที่น้อยกว่ามาก

การย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ในการศึกษานี้ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Fatima และคณะ คือ เนื่องจากย้อมติดโปรตีน CD44 ในเซลล์เยื่อที่ตำแหน่ง parietal และตำแหน่ง visceral ของผู้ป่วยโรค MCD สูงถึงร้อยละ 13.8 และร้อยละ 8.1 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการย้อมติดร้อยละ 2.6 และร้อยละ 0.7 ที่ตำแหน่งเดียวกันในการศึกษาของ Fatima และคณะ การย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์เยื่อที่ตำแหน่ง visceral นั้นแสดงถึงการเคลื่อนที่เข้าสู่ glomerular tuft ของ PECs ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดรอยโรค segmental sclerosis ระยะต้นของโรค FSGS ไม่ควรพบใน glomerulus ของผู้ป่วยโรค MCD สาเหตุที่อาจอธิบายการตรวจพบนี้ ได้แก่ 1). ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยผิด โดยแท้จริงแล้วผู้ป่วยเป็นโรค FSGS แต่ตรวจไม่พบรอยโรค segmental sclerosis แม้จะตัดชิ้นเนื้อไตได้ปริมาณ glomerulus มากกว่า 20 glomerulus ก็ตาม และตำแหน่งที่ย้อมติดโปรตีน CD44 บริเวณ visceral อาจเป็นรอยเริ่ม segmental sclerosis ระยะเริ่มต้นจริง มีการศึกษาของ Smeets และคณะ ที่ย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของโปรตีน CD44 ในผู้ป่วยโรค MCD และพบว่าร้อยละ 25 ของผู้ป่วยพบการย้อมติดโปรตีน CD44 ที่เซลล์เยื่อในตำแหน่ง visceral ทำให้พยาธิแพทย์ทบทวนรอยโรคในบริเวณดังกล่าวซ้ำ พบว่ามีลักษณะเข้าได้กับรอยโรค segmental sclerosis ของโรค FSGS และเปลี่ยนการวินิจฉัยจากโรค MCD เป็นโรค FSGS<sup>(10)</sup> 2). ปัจจัยเรื่องเทคนิคการย้อมและการแปลผล เนื่องจากการย้อมโปรตีนชนิดใหม่ แม้จะใช้แอนติบอดีปฐมภูมิชนิดเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า แต่แอนติบอดีทุติยภูมิและเทคนิคการย้อมสีที่ใช้แตกต่างกัน

ประกอบกับการแปลผลโดยพยาธิแพทย์คนละคนในแต่ละการศึกษา จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนในการแปลผลการย้อมโปรตีน CD44 ได้ 3). ผู้ป่วยโรค MCD ในการศึกษานี้มีอายุเฉลี่ย 48.1 ปี มากกว่าผู้ป่วยในการศึกษาของ Fatima ซึ่งอายุ 38.4 ปี อาจเป็นสาเหตุของการย้อมติดโปรตีน CD44 ที่มากขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาในหนูทดลองที่พบว่าการย้อมติดโปรตีน CD44 ของ PECs เพิ่มมากขึ้นในหนูสูงอายุ<sup>(27)</sup> 4). การย้อมติดโปรตีน CD44 เป็นผลบวกสูง โดยอาจย้อมติดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนที่เข้ามาอยู่ใน glomerulus ซึ่งเม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนสัญลักษณ์ CD44 เป็นปกติ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงอาจไม่สามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดขาวใน glomerulus ออกจากเซลล์เยื่อบุผิวได้ชัดเจน แต่การย้อมติดโปรตีน CD44 บนเซลล์เยื่อบุผิวที่ตำแหน่ง parietal มีโอกาสผิดพลาดน้อยกว่า เนื่องจากมีตำแหน่งของเซลล์วางอยู่บนเยื่อบุพื้นฐานของ Bowman's capsule ชัดเจน และมักไม่มีเซลล์ชนิดอื่นๆ เข้ามาในบริเวณดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยคิดว่าการวินิจฉัยโรคยังควรยึดเกณฑ์การวินิจฉัยปัจจุบัน คือการใช้ลักษณะทางพยาธิวิทยาจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงโดยพยาธิแพทย์เป็นมาตรฐาน (gold standard) เพราะการตรวจย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ยังไม่เป็นที่ยอมรับแพร่หลาย และยังไม่ใช้แนวทางมาตรฐาน อาจสรุปได้ว่าการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44 ยังขาดความจำเพาะ (specificity) เพราะสามารถให้ผลบวกได้ในผู้ป่วยทั้งสองโรค แต่อาจนำปริมาณ activated PECs จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือจำนวน glomerulus ที่ย้อมติดโปรตีน CD44 มาใช้ในการช่วยจำแนกโรคทั้งสองออกจากกันได้

การศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาแรกที่บรรยายการพบภาวะ autophagy บน PECs แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่เกิดโรค PECs จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงละเอียดต่างๆ ขึ้นได้ แม้จะไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มโรคที่นำมาศึกษา

ส่วนภาวะ autophagy และ ER stress ของ PECs เคยมีการบรรยายว่าพบใน PECs<sup>(32)</sup> แต่ไม่มีการศึกษาเชิงปริมาณที่จะวิเคราะห์เปรียบเทียบภาวะดังกล่าวใน glomerulus ที่มีความผิดปกติ การศึกษานี้จึงถือเป็นการศึกษาแรกที่บรรยายข้อมูลดังกล่าว

การตรวจพบที่สำคัญอย่างหนึ่งของการศึกษา คือ พบว่าภาวะ autophagy ของ PECs สัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยที่เพิ่มมากขึ้น การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า autophagy เป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้เพื่อรักษาสมดุลของพลังงาน และต่อสู้กับกระบวนการเสื่อมสภาพของเซลล์ตามวัย เนื่องจากเซลล์ที่มีอายุเพิ่มขึ้นจะมี organelles และโปรตีนที่เสื่อมสภาพอยู่ในเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ กระบวนการ autophagy จะคอยสลาย organelles เหล่านั้น และนำไปสร้างพลังงานขึ้นมาให้เซลล์ใช้ได้ใหม่ การศึกษาภาวะ autophagy กับโรคของ glomerulus มักให้ความสนใจไปที่ podocyte เป็นหลัก ซึ่งพบว่า การยับยั้งยีน Atg5 ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิด autophagy ในหนูทดลองทำให้ปริมาณของ



podocyte ลดลงมากกว่าปกติเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น และเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะ ในทางกลับกัน การให้ยา rapamycin ซึ่งกระตุ้นให้เกิด autophagy มากขึ้น จะมีผลช่วยปกป้อง podocyte แม้จะยังไม่ มีข้อมูลลักษณะเดียวกันใน PECs แต่คาดว่า autophagy ที่พบมากขึ้นในผู้ป่วยที่อายุมากขึ้น เป็น กลไกของเซลล์ที่อายุมากขึ้นในการต่อสู้กับการบาดเจ็บต่างๆ<sup>(36)</sup> ส่วนการเกิด autophagy ที่สัมพันธ์ กับภาวะความดันโลหิตสูงยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนจึงยังไม่ทราบกลไก หรือความสำคัญที่แน่ชัด มี เพียงรายงานการเกิด autophagy ของ podocyte ในภาวะน้ำตาลสูง ซึ่งพบในผู้ป่วยโรคเบาหวาน<sup>(37)</sup> ส่วนการพบภาวะ autophagy ลดลงในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ อาจเกิดจาก สเตียรอยด์มีผลลดการอักเสบต่อเซลล์ใน glomerulus ที่เป็นสาเหตุของโรค FSGS และโรค MCD ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อ PECs ลดลงไปด้วย เซลล์จึงลดการตอบสนองต่อภาวะเครียดดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ดี มีการศึกษาในแมลงที่พบว่าสเตียรอยด์มีผลกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ autophagy ใน กระบวนการพัฒนาตัวอ่อนของแมลงได้เช่นกัน<sup>(38, 39)</sup>

#### 5.4 ข้อดีของการศึกษานี้

ก. เป็นการศึกษาแรกที่วิเคราะห์ลักษณะของ activated PECs ในผู้ป่วยโรค FSGS และโรค MCD ชนิดปฐมภูมิซึ่งมีลักษณะทางคลินิกใกล้เคียงกัน รวมถึงยังบรรยายการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เซิงละเอียดอื่นๆ ของ PECs ได้แก่การเกิดภาวะ autophagy, apoptosis และ ER stress ในเชิง ปริมาณ

ข. เป็นการศึกษาแรกที่ใช้ 2 เทคนิคในการระบุ activated PECs ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาของโปรตีน CD44

#### 5.5 ข้อด้อยของการศึกษานี้

ก. เนื่องจากเป็นการศึกษาที่ใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่เก็บไว้ในอดีต และต้องใช้เทคนิคการ เตรียมชิ้นเนื้อสำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ซับซ้อน ทำให้มีจำนวน ผู้ป่วยที่สามารถเข้าร่วมในการศึกษาได้น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ ส่งผลต่อ power ของการศึกษา

ข. ไม่สามารถกำจัดปัจจัยที่อาจมีผลต่อผลการศึกษาออกไปได้ทั้งหมด เช่น การได้รับการ รักษาด้วยยาสเตียรอยด์ก่อนการเจาะชิ้นเนื้อไต เนื่องจากข้อจำกัดด้านจำนวนผู้ป่วย

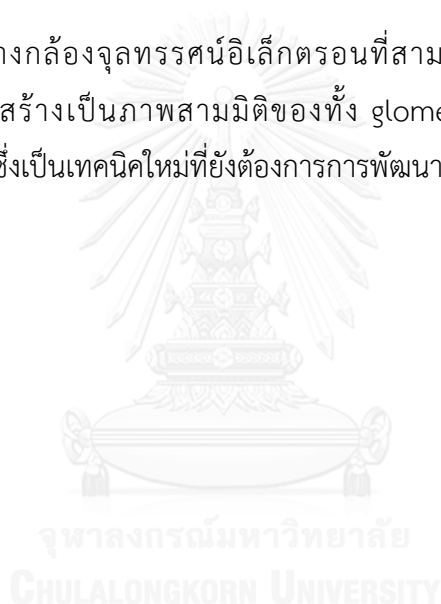
ค. การถ่ายภาพชิ้นเนื้อไตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในการศึกษานี้ เป็น การตรวจเพียงระนาบเดียวของ glomerulus แม้จะเป็นระนาบที่กว้างที่สุด แต่ก็ไม่สามารถเป็น ตัวแทนของเซลล์ใน glomerulus ทั้งหมดได้

ง. การเปรียบเทียบ PECs ที่ระบุจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกับการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยา ไม่ได้ทำในชิ้นเนื้อไตชิ้นเดียวกัน ทำให้ไม่สามารถประเมินความสอดคล้องกันของทั้งสองเทคนิคการตรวจได้

## 5.6 ข้อเสนอแนะ

ก. ควรทำการเก็บตัวอย่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มเพิ่มเติม และทำการตรวจอิมมูโนพยาธิวิทยาในชิ้นเนื้อสำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (immuno-electron microscopy) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ยาก ต้องอาศัยประสบการณ์ และการปรับปรุงพัฒนาขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อไตอีกมาก

ข. ใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่สามารถถ่ายภาพแต่ละระนาบของ glomerulus และนำมาสร้างเป็นภาพสามมิติของทั้ง glomerulus เช่น blockface scanning electron microscopy ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ที่ยังต้องการการพัฒนาต่อไป



1. Haas M, Spargo BH, Coventry S. Increasing incidence of focal-segmental glomerulosclerosis among adult nephropathies: a 20-year renal biopsy study. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(5):740-50.
2. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(5):621-31.
3. Fogo AB. Glomerular diseases. In: Fogo AB, Kashgarian M, editors. *Diagnostic atlas of renal pathology.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 19-294.
4. Cameron JS. The nephrotic syndrome and its complications. *Am J Kidney Dis.* 1987;10(3):157-71.
5. D'Agati VD, Alster JM, Jennette JC, Thomas DB, Pullman J, Savino DA, et al. Association of histologic variants in FSGS clinical trial with presenting features and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(3):399-406.
6. Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Busch J, Stokes B, Markowitz G, et al. Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(3):445-53.
7. Shankland SJ, Smeets B, Pippin JW, Moeller MJ. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(3):158-73.
8. Ohse T, Pippin JW, Chang AM, Krofft RD, Miner JH, Vaughan MR, et al. The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney Int.* 2009;76(12):1225-38.
9. Shankland SJ, Anders HJ, Romagnani P. Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(3):302-9.
10. Smeets B, Stucker F, Wetzels J, Brocheriou I, Ronco P, Grone HJ, et al. Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from minimal change disease. *Am J Pathol.* 2014;184(12):3239-48.
11. Gaffney EF. Prominent parietal epithelium: a common sign of renal glomerular injury. *Hum Pathol.* 1982;13(7):651-60.

12. Tinari A, Giammarioli AM, Manganelli V, Ciarlo L, Malorni W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. *Methods Enzymol.* 2008;442:1-26.
13. Sethi S, Glassock RJ, Fervenza FC. Focal segmental glomerulosclerosis: towards a better understanding for the practicing nephrologist. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(3):375-84.
14. Glassock RJ. Secondary minimal change disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 6:vi52-8.
15. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res.* 1992;270(1):37-45.
16. Arakawa M, Tokunaga J. A scanning electron microscope study of the human Bowman's epithelium. *Contrib Nephrol.* 1977;6:73-8.
17. Lasagni L, Romagnani P. Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(10):1612-9.
18. Romagnani P, Remuzzi G. Renal progenitors in non-diabetic and diabetic nephropathies. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(1):13-20.
19. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):322-32.
20. Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):333-43.
21. Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, Alpers CE, et al. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(6):F1566-74.
22. Chang AM, Ohse T, Krofft RD, Wu JS, Eddy AA, Pippin JW, et al. Albumin-induced apoptosis of glomerular parietal epithelial cells is modulated by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(4):1330-43.

23. Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JF, Floege J, et al. Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(12):2604-15.
24. Ryu M, Migliorini A, Miosge N, Gross O, Shankland S, Brinkkoetter PT, et al. Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury. *J Pathol.* 2012;228(4):482-94.
25. Smeets B, Kuppe C, Sicking EM, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, et al. Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(7):1262-74.
26. Fatima H, Moeller MJ, Smeets B, Yang HC, D'Agati VD, Alpers CE, et al. Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(11):1852-8.
27. Roeder SS, Stefanska A, Eng DG, Kaverina N, Sunseri MW, McNicholas BA, et al. Changes in glomerular parietal epithelial cells in mouse kidneys with advanced age. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;309(2):F164-78.
28. Holderied A, Romoli S, Eberhard J, Konrad LA, Devarapu SK, Marschner JA, et al. Glomerular parietal epithelial cell activation induces collagen secretion and thickening of Bowman's capsule in diabetes. *Lab Invest.* 2015;95(3):273-82.
29. De Rechter S, Decuypere JP, Ivanova E, van den Heuvel LP, De Smedt H, Levtchenko E, et al. Autophagy in renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(5):737-52.
30. Zeng C, Fan Y, Wu J, Shi S, Chen Z, Zhong Y, et al. Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies. *J Pathol.* 2014;234(2):203-13.
31. Wu HH, Hsiao TY, Chien CT, Lai MK. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. *J Biomed Sci.* 2009;16:19.
32. Hakrroush S, Cebulla A, Schaldecker T, Behr D, Mundel P, Weins A. Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):927-38.

33. Williams DB, Carter CB. The Transmission Electron Microscope. In: Williams DB, Carter CB, editors. *Transmission Electron Microscopy - A Text for Materials Science*. 1st ed. Huntsville: Springer; 2009. p. 3-22.
34. Najafian B, Mauer M. Quantitating glomerular endothelial fenestration: an unbiased stereological approach. *Am J Nephrol*. 2011;33 Suppl 1:34-9.
35. Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2012;82(9):1010-7.
36. Lenoir O, Tharaux PL, Huber TB. Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models. *Kidney Int*. 2016;90(5):950-64.
37. Ma T, Zhu J, Chen X, Zha D, Singhal PC, Ding G. High glucose induces autophagy in podocytes. *Exp Cell Res*. 2013;319(6):779-89.
38. Lee CY, Baehrecke EH. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*. 2001;128(8):1443-55.
39. Thummel CS. Steroid-triggered death by autophagy. *Bioessays*. 2001;23(8):677-82.

รายการอ้างอิง



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายปองปราชญ์ พัวพัฒนกุล

วันเดือนปีเกิด 30 ตุลาคม พ.ศ. 2529 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต  
ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

พ.ศ. 2548 - 2553 แพทย์ศาสตร์บัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
(เกียรตินิยมอันดับ 1)

พ.ศ. 2554 - 2555 แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี

พ.ศ. 2555 - 2558 แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

พ.ศ. 2558 - 2560 แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต โรงพยาบาล  
จุฬาลงกรณ์

ปริญญาและประกาศนียบัตร:

พ.ศ. 2553 แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1)

พ.ศ. 2558 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขา  
อายุรศาสตร์



