การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟ็อกพีทรี ในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยเอสแอลอี

นางสาวอภิรดี ทองบุญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CORRELATION OF FORKHEAD/WINGED HELIX TRANSCRIPTION FACTOR (FOXP3) MESSENGER RNA IN PERIPHERAL BLOOD AND ACTIVITY OF LUPUS NEPHRITIS

Miss Apiradee Thongboon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn university

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟีอกพีทรี ในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยเอสแอลอี
โดย	นางสาว อภิรดี ทองบุญ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศว์ ทัศณรงค์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิรดี ทองบุญ : การศึกษาความสัมพันธ์ของของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟ็อกพีทรีในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยเอสแอลอี (CORRELATION OF FORKHEAD/ WINGED HELIX TRANSCRIPTION FACTORS (FOXP3) MESSENGER RNA IN PERIPHERAL BLOOD AND ACTIVITY OF LUPUS NEPHRITIS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์. 73 หน้า.

Regulatory T cells มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคทางภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคเอสแอลอี ข้อมูลในปัจจุบันพบว่า FOXP3 เป็น transcription factor ที่มีความจำเพาะที่สุดสำหรับ regulatory T cells ดังนั้นผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีที่มีความรุนแรงแตกต่างกันน่าจะมีระดับ FOXP3 messenger RNA ที่แตกต่างกันด้วย ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FOXP3 ในเลือดกับความรุนแรงทางพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี

การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี จำนวน 39 ราย ซึ่งได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยา ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาตามวิธีมาตรฐานและได้รับการติดตามการรักษาต่อเนื่องในช่วงระยะเวลาที่ได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไต ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ใน เลือดด้วยเทคนิค real - time PCR

ผลการศึกษาพบว่า ระดับ FOXP3 messenger RNA ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงมีระดับต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่รุนแรง (0.42 ± 0.46 และ 1.09 ± 0.65; P value = 0.001) และพบว่าระดับ FOXP3 messenger RNA มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความรุนแรงทางพยาธิสภาพไต (R = -0.330, P value = 0.04) ลักษณะพยาธิสภาพชนิด cellular crescents (R = -0.479, P value = 0.02) และ fibrinoid necrosis (R = -0.461, P value =0.03) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับความเรื้อรังของพยาธิสภาพไตหรือยาสเตียรอยด์ที่ได้รับ นอกจาก นี้ยังพบว่า FOXP3 messenger RNA มีแนวโน้มในการพยากรณ์การทำงานของไตหลังการรักษา โดยมี PPV (Positive Predictive Value) ร้อยละ 82 และ NPV (Negative Predictive Value) ร้อยละ 33

กล่าวโดยสรุปว่า FOXP3 messenger RNA ในเลือดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความรุนแรงทางพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี ในอนาคตอาจสามารถนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดในการประเมินผู้ป่วยติดตามพยากรณ์ผลการรักษาโดยไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	–

4974802130: MAJOR MEDICINE (NEPHROLOGY)
KEY WORDS: FOXP3 / MESSENGER RNA / REGULATORY T CELLS / CRESCENTS / FIBRINOID NECROSIS

APIRADEE THONGBOON: CORRELATION OF FORKHEAD/WINGED HELIX TRANSCRIPTION FACTORS (FOXP3) MESSENGER RNA IN PERIPHERAL BLOOD AND ACTIVITY OF LUPUS NEPHRITIS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. YINGYOS AVIHINGSANON, M.D. 73 pp.

Background: Regulatory T cells play a central role in pathogenesis of autoimmunity in particular lupus. The Forkhead/winged Helix Transcription Factor (FOXP3) regulate functions of regulatory T cells. We evaluated the association between FOXP3 expression and pathological activity of lupus nephritis.

Methods: Thirty nine patients with clinically active lupus nephritis underwent renal biopsy. All patients received standard immunosuppressive treatment. The patients had regular visits monthly. FOXP3 messenger RNA levels in peripheral blood were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results: FOXP3 mRNA levels in peripheral blood from patients with active lupus nephritis were significantly lower than inactive lupus nephritis (0.42 $\pm$ 0.46 vs 1.09 $\pm$ 0.65; P value = 0.001). Expression levels of FOXP3 mRNA were associated with pathological activity index (R = -0.330, P value = 0.04), cellular crescents (R = -0.479, P value = 0.02) and fibrinoid necrosis (R= -0.461, P value = 0.03), but not associated with chronicity index or steroid usage. FOXP3 mRNA levels could accurately predict a stable/improved renal function (MDRD GFR) after treatment (positive predictive value and negative predictive value of 82% and 33%, respectively).

Conclusion: Expression of FOXP3 in peripheral blood is associated with activity of lupus nephritis. This method may provide a non-invasive assessment of lupus nephritis and predict short-term renal outcomes.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Medicine Student's signature
Field of study Medicine Advisor's signature
Academic year 2007 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ด้านโรคไตอักเสบจากเอสแอลอี และการทำวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียง ตั้งสง่า ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ ผู้ให้คำปรึกษาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ทรงเกียรติ หลิวสุวรรณ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ณัฐวุฒิ โตวนำชัย เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นายแพทย์ มนต์ชัย ศิริบำรุงวงศ์ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคไตทุกท่านผู้ให้ความช่วยเหลือและร่วมดูแลรักษาผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีที่เข้าร่วมการวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยโรคไตทุกท่านซึ่งคอยช่วยเหลือในขั้นตอนต่างๆ ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการและให้กำลังสนับสนุนการวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ น้อง ๆ ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการสนับสนุนทุนการวิจัย

ขอขอบคุณ มูลนิธิโรคไตแห่งประเทศไทยที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….... จ

กิตติกรรมประกาศ……... ฉ

สารบัญ……..... ช

สารบัญตาราง……..... ฌ

สารบัญภาพ……..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย…….…… 1

คำถามของการวิจัย…….. 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..... 2

กรอบแนวความคิดในการวิจัย…….. 3

วิธีการดำเนินการวิจัย……... 3

ปัญหาทางจริยธรรม…… 4

ข้อจำกัดของการวิจัย…… 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…… 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……... 5

โรคไตอักเสบลูปุส ……..... 5

พยาธิกำเนิดของโรค……..... 5

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ regulatory T cells และ FOXP3 กับ โรคเอสแอลอี..... 8

การประเมินความรุนแรงของโรคในทางคลินิก …….. 20

การประเมินจาก clinical activity score…… 21

ปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ..... 23

การวัดปริมาณการทำงานของไต……. 25

หน้า

การตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยา..... 27
ความรู้เกี่ยวกับการวัด messenger RNA ด้วยเทคนิค RT- PCR 29
บทที่ 3 วิธีการวิจัย..... 31
ประชากรและตัวอย่าง..... 31
การสังเกตและการวัด..... 32
การวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดด้วยวิธี RT-PCR..... 33
การรวบรวมข้อมูล..... 36
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 37
บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 38
ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย..... 38
ความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 mRNA กับ activity score..... 40
ความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 mRNA กับ cellular crescents..... 41
ความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 mRNA กับ fibrinoid necrosis 41
ความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 mRNA กับ prednisolone 43
Subgroup analysis..... 46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 57
สรุปผลการวิจัย..... 57
อภิปรายผลการวิจัย..... 57
ข้อเสนอแนะ..... 61
รายการอ้างอิง..... 62
ภาคผนวก..... 69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การจัดกลุ่มของ lupus nephritis โดย International Society of Nephrology / Renal Pathology Society 2003.....	19
2.2	SLEDAI-2K score.....	22
2.3	ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงความรุนแรง (activity index) และความเรื้อรัง (chronicity index) ของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี.....	28
3.1	ลำดับเบสของ probe และ primer ที่ใช้	35
4.1	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย	39
4.2	ความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆทางคลินิกกับ activity index	45
4.3	ค่า Mean $\pm$ SD ของตัวชี้วัดต่างๆในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรง (Cellular crescents) และไม่รุนแรง (No cellular crescents)	48
4.4	ค่า Mean $\pm$ SD ของตัวชี้วัดต่างๆในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรง (Fibrinoid necrosis) และไม่รุนแรง (No fibrinoid necrosis).....	50
4.5	ค่า Mean $\pm$ SD ของตัวชี้วัดต่างๆในกลุ่มผู้ป่วยที่ active และ inactive	51
4.6	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยกลุ่ม high FOXP3 mRNA และ low FOXP3 mRNA	56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	กลไกพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอี ……	6
2.2	บทบาทหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย……	9
2.3	Inducible regulatory T cells ……	12
2.4	โครงสร้างของ FOXP3 โปรตีน……	13
2.5	แบบจำลองส่วนประกอบโมเลกุลของ FOXP3 ที่ทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย……..	14
2.6	การเปลี่ยนแปลงของระดับ FOXP3 messenger RNA ในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรค เอสแอลอี 7 ราย ในระยะเวลาต่างๆ……..	17
3.1	หลักการเบื้องต้นในการทำ real-time PCR โดยใช้ TaqMan® Probe ……...	35
4.1	ความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ activity index…….	41
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ cellular crescents……	42
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ fibrinoid necrosis…….....	42
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ prednisolone (mg)……	43
4.5	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ในผู้ป่วยที่ได้รับและไม่ได้รับยา prednisolone	44
4.6	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มี activity index >12 และกลุ่มที่มี activity index ≤ 12 ……	46
4.7	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพ cellular crescents และกลุ่มที่ไม่มี cellular crescents ……	47
4.8	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพ fibrinoid necrosis และกลุ่มที่ไม่มี fibrinoid necrosis ……	49
4.9	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active และ inactive…	52
4.10	เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ในผู้ป่วยกลุ่ม inactive และกลุ่ม active ชนิด class III (A), (A/C) หรือ IV (A), (A/C) และ pure class V ……..	53

รูปที่		หน้า
4.11	ROC curve ของระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่เจาะไตในการพยากรณ์การทำงานของไต MDRD GFR ที่ 4 เดือน	54
4.12	survival analysis ในการพยากรณ์โอกาสการเกิด stable/improved MDRD GFR ที่ 4 เดือน จำแนกตามกลุ่มระดับ FOXP3 (log scale) สูงและต่ำ.....	55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AI	Activity Index
CD	Cluster Designation
CI	Chronicity Index
CTLA-4	Cytotoxic T - lymphocyte - associated protein 4
ESRD	End Stage Renal Disease
FOXP3	Forkhead box P3, forkhead/winged helix transcription factor
GFR	Glomerular Filtration Rate
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
IL	Interleukin
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
ISN/RPS	International Society of Nephrology / Renal Pathology Society
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
TGF- β	Transforming Growth Factor - β

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคเอสแอลอีเป็นโรคทางภูมิคุ้มกันที่พบบ่อยในทางคลินิก ส่งผลต่ออวัยวะร่างกายหลายระบบ ภาวะไตอักเสบจากโรคดังกล่าวมีความรุนแรงในระดับที่แตกต่างกัน บางครั้งพบว่าลักษณะทางคลินิกไม่ไปด้วยกันกับพยาธิสภาพความรุนแรงที่ไต ผู้ป่วยบางส่วนไม่สามารถประเมินการกำเริบจากอาการหรือผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น ระดับครีอะตินินในเลือด ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ซึ่งไม่มีความจำเพาะพอ หากการวินิจฉัยและรักษาเกิดความล่าช้าอาจส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะทุพพลภาพ เช่น ไตวายเรื้อรัง หรืออาจรุนแรงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ในทางกลับกันพบว่ามีผู้ป่วยบางส่วนกลับได้รับยากดภูมิคุ้มกันมากเกินความจำเป็น เกิดภาวะแทรกซ้อนหรือภาวะข้างเคียงจากการรักษา เช่น ภาวะติดเชื้อ ภาวะกดไขกระดูก เป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจด้วยวิธีจำเพาะขึ้นได้แก่ การเจาะไตมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยความรุนแรง ประเมินการให้หรือหยุดยากดภูมิดังกล่าว การเจาะไตเป็นหัตถการที่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยบางราย เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกง่าย ภาวะความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้ บางครั้งเกิดภาวะไม่พึงประสงค์ เช่น เลือดออก อาการเจ็บปวด และด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ยากในการใช้การเจาะไตเพื่อติดตามการรักษา

บทบาทของเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสำคัญในการอธิบายพยาธิกำเนิดของโรคด้านภูมิคุ้มกันที่ไต (Immune mediated renal disease) เป็นที่ทราบว่าในภาวะปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมความสมดุลของปัจจัยกระตุ้นและปัจจัยควบคุม โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์แบบควบคุม (Regulatory T cells) จะทำให้เกิดภาวะทนทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (self tolerance) โรคเอสแอลอีเป็นความผิดปกติที่ร่างกายสูญเสียภาวะ self tolerance มีการกระตุ้นการทำลายเนื้อเยื่อของตัวเอง มีการหลั่งสารสื่อการอักเสบต่างๆ (Inflammatory mediators) เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ และชนิดทีเซลล์ที่บริเวณหลอดเลือดฝอยและเนื่อเยื่อที่ไต เกิดการอักเสบของไตและมีความรุนแรงของโรคต่างๆกันโดยมีหลักฐานทางพยาธิวิทยายืนยัน บทบาทของ regulatory T cells ซึ่งควบคุมภาวะ self tolerance น่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตในโรคเอสแอลอีด้วย จากหลักฐานการศึกษาของ Muthukumar และคณะ

พบความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดต่างๆ เช่น perforin, CD3, CD25 และ FOXP3 โดยพบความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดภาวะปฏิเสธไต (acute rejection) ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต โดยระดับ FOXP3 ซึ่งเป็น transcription factor ของ regulatory T cells เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค จากการศึกษาพบว่า ภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีมีการกระตุ้นและเกาะติดของเม็ดเลือดขาวเช่นเดียวกับภาวะปฏิเสธไต ด้วยข้อจำกัดจากการเจาะไต และปัญหาที่พบในการวินิจฉัย ดูแลผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี ทำให้การวินิจฉัยจำเพาะทำได้ช้า จึงมีแนวคิดในการศึกษาโดยการวัดระดับ FOXP3 ในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพความรุนแรงที่ไตต่างกัน การตรวจหา messenger RNA ของ FOXP3 ในเลือดน่าจะมีความไวสูงด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และผู้ป่วยต้องได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจติดตามรักษาอยู่แล้ว การส่งตรวจทำได้ง่าย ตรวจติดตามเป็นระยะได้ ซึ่งหากสมมุติฐานดังกล่าวข้างต้นเป็นจริง จะมีประโยชน์ในการประเมินความรุนแรงของภาวะไตอักเสบของผู้ป่วยโดยอาจนำมาใช้ทดแทนการเจาะไตตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เพื่อเป็นแนวทางในการดูแลรักษาผู้ป่วยได้

1.2 คำถามของการวิจัย

<u>คำถามหลัก</u>

ระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตหรือไม่

<u>คำถามรอง</u>

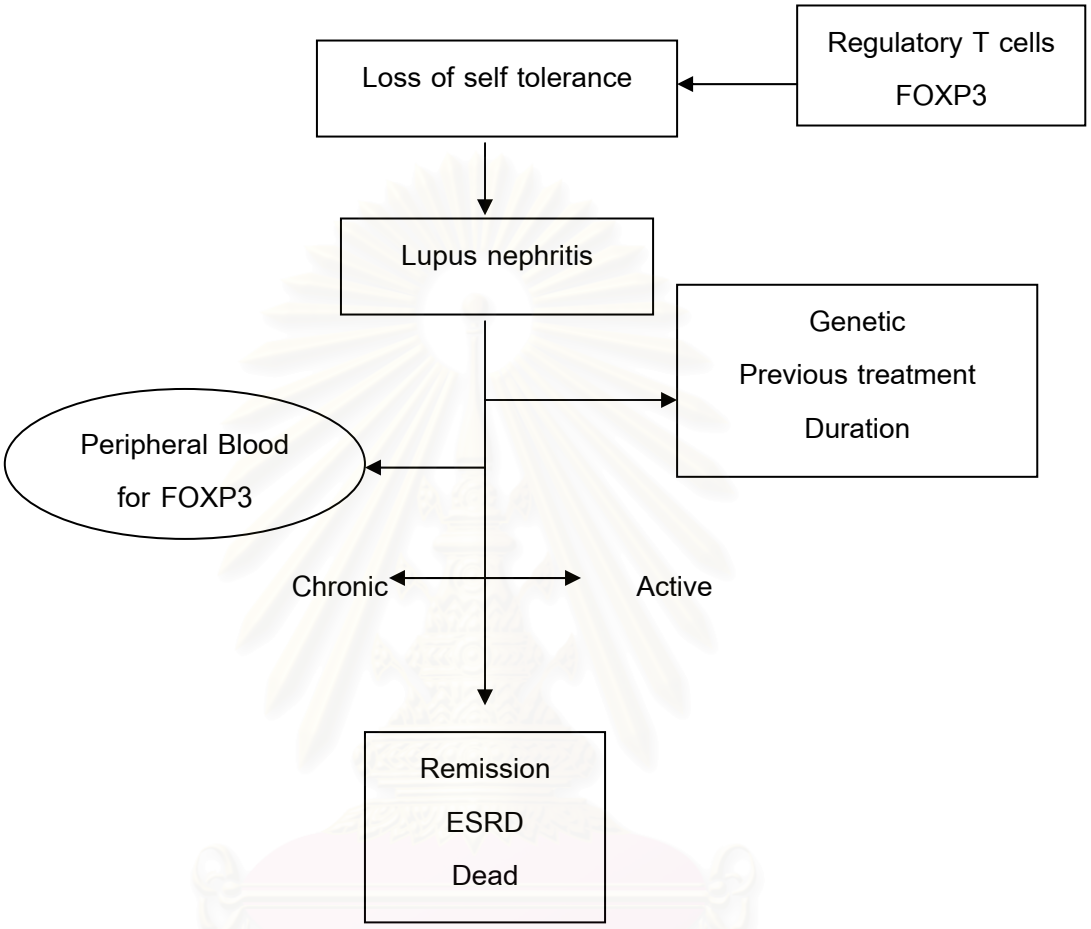
ระดับmessenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับการได้รับยาสเตียรอยด์ในการรักษาหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตและความแม่นยำในการตรวจวินิจฉัย โดยอาจทดแทนการตรวจชิ้นเนื้อไตในอนาคตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

ใช้รูปแบบการวิจัยแบบ cross-sectional descriptive study

- คัดเลือกผู้ป่วยเอสแอลอีซึ่งได้รับการวินิจฉัยเข้าได้ตามเกณฑ์ของ American College of Rheumatology และเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจติดตามการรักษาที่ร.พ.จุฬาลงกรณ์ โดยผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางปฏิบัติการว่าอาจมีการกำเริบของไต โดยผู้ป่วยจะได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาเพื่อการวินิจฉัย
- นำตัวอย่างเลือดจำนวน 5 ซีซี ใส่ tube EDTA blood เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้จากการเจาะเลือดผู้ป่วยในขั้นตอนการเตรียมตัวก่อนรับการเจาะไต

- วัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือด โดยนักวิทยาศาสตร์
- วัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ
- วัดระดับครีอะตินินในเลือด
- อ่านผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตและประเมิน activity index และ chronicity index โดยพยาธิแพทย์
- วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย

1.6 ปัญหาทางจริยธรรม

เนื่องจากการวิจัยเรื่องนี้เป็นการวิจัยโดยอาศัยตัวอย่างเลือด ซึ่งผู้ป่วยจะต้องได้รับการเจาะตรวจในขั้นตอนการเตรียมตัวก่อนการเจาะตรวจชิ้นเนื้อไตอยู่แล้ว สำหรับการเจาะตรวจชิ้นเนื้อไตนั้น ผู้ป่วยมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการตรวจชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคอยู่แล้ว โดยผู้ป่วยจะได้รับการแจ้งจากแพทย์ถึงความเสี่ยงของการเจาะไตก่อนที่จะทำทุกครั้ง ผู้วิจัยจะให้ข้อมูลที่ละเอียดและชัดเจนเพียงพอและได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร

1.7 ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนาการตรวจเซลล์ในเลือด โดยใช้การแสดงออกของ RNA เพื่อบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี บอกพยากรณ์โรคในผู้ป่วยเอสแอลอี ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย ติดตามผลการรักษา ทดแทนการตรวจชิ้นเนื้อไตในอนาคตได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคไตอักเสบลูปุส

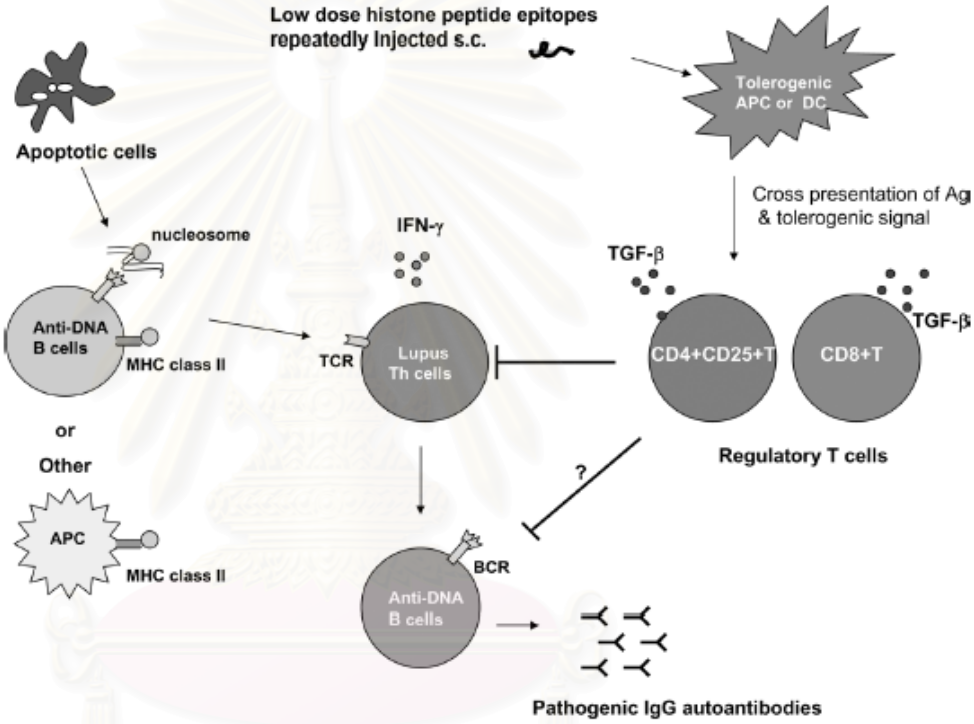
โรคเอสแอลอีเป็นโรคของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของตนเองได้หลายระบบอวัยวะ ไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี หรือ ไตอักเสบลูปุส เป็นอวัยวะที่พบการอักเสบและกำเริบได้บ่อย ส่งผลต่อผู้ป่วยทั้งด้านร่างกาย เกิดความเจ็บป่วย ทุพพลภาพ รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังส่งผลด้านจิตใจ มีผลกระทบต่อครอบครัวและสังคมของผู้ป่วยด้วย

โรคเอสแอลอีเป็นโรคทางภูมิคุ้มกันที่พบบ่อยในทางคลินิก ภาวะไตอักเสบจากโรคมีความรุนแรงต่างๆกัน การประเมินความรุนแรงของการกำเริบจากโรคเอสแอลอี นิยมใช้ SLEDAI (The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) ซึ่งประเมินจากอาการทางคลินิกหรือใช้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น ระดับครีอะตินินในเลือด การตรวจปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ การตรวจดูเซลล์ในปัสสาวะ ปัญหาในปัจจุบันพบว่าผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังกล่าวอาจเจอความผิดปกติได้ทั้งจากโรคที่กำเริบ หรือจากกระบวนการอักเสบเรื้อรังที่เกิดเป็นแผลเป็นแล้ว นอกจากนี้ในกลุ่มที่กำเริบก็มีความรุนแรงมากน้อยต่างกัน ซึ่งบางครั้งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่สามารถจำแนกได้ การรักษาในแต่ละสาเหตุมีความแตกต่างกัน ซึ่งมักต้องได้รับการวินิจฉัยแยกจากการตรวจชิ้นเนื้อไตในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมีข้อจำกัดในการตรวจชิ้นเนื้อไตและบางครั้งไม่สะดวกในการใช้วิธีดังกล่าวตรวจติดตามการรักษาผู้ป่วย ปัจจุบันจึงมีความพยายามในการคิดค้นหาเครื่องชี้วัดที่จะนำมาวินิจฉัยภาวะไตอักเสบและติดตามอาการผู้ป่วยจากตัวชี้วัดได้ดีขึ้น

2.1.1 พยาธิกำเนิดของโรค

ปัจจุบันพยาธิกำเนิดของโรคยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน ได้มีการอธิบายจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและพบหลักฐานที่แสดงถึงการมีภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อของตนเอง (autoantibody) เกิดขึ้น โดยเฉพาะต่อ nuclear components ของเซลล์ autoantigen ที่สำคัญที่พบได้แก่ nucleosomes ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของ chromatin โดยประกอบด้วยสายของ double

stranded DNA (ds-DNA) จับอยู่กับ histone นอกจากนั้นยังมี autoantigen อื่นที่พบร่วมด้วย ได้แก่ ส่วนของribonucleoproteins Ro/SS-A และ La/SS-B, phospholipids [1,2] นอกจากนี้ยังพบการสะสมของimmunoglobulins และ complement breakdown products ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยซึ่งนำไปสู่การอักเสบเรื้อรังของไตจนอาจทำให้เกิดไตวายเรื้อรังได้ กลไกพยาธิกำเนิดโดยสรุปแสดงดังรูปด้านล่าง



รูปที่ 2.1 กลไกพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอี

กลไกอธิบายพยาธิกำเนิดในปัจจุบันได้แก่

1. ความผิดปกติของ apoptosis และการกำจัด apoptotic body

Apoptosis เป็นกระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ซึ่งนำไปสู่การแตกสลายของส่วนประกอบภายในเซลล์ รวมถึงนิวเคลียสของเซลล์ ในระหว่างการเกิด apoptosis นั้น โครมาตินจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เฉพาะทำให้เกิดการปลดปล่อย nucleosome ออกมา พบว่า nucleosome และ lupus antigen ชนิดอื่นเช่น ribonucleoproteins จะปรากฏอยู่บนถุงน้ำ (blebs) ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ที่เกิด apoptosis เราเชื่อว่าถุงน้ำเหล่านี้เองที่เป็นแหล่งของ autoantigen ที่สำคัญในโรคเอสแอลอี

โดยปกติแล้ว apoptotic cells ที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดโดยเม็ดเลือดขาวชนิด macrophage หรือ phagocyte ทำให้ไม่เกิดภาวะ autoimmunity แต่ในผู้ป่วยเอสแอลอีพบว่ามีความผิดปกติในการกำจัด apoptotic cells เกิดขึ้น โดยพบส่วนของ apoptotic material ได้รับการ process และนำเสนอต่อเม็ดเลือดขาวชนิด autoantigen - restricted T-helper cells โดย dendritic cell ที่อยู่ในต่อมน้ำเหลือง ปัจจุบันยังไม่ทราบชัดเจนว่าเหตุใด apoptotic material เหล่านี้แทนที่จะถูกกำจัดโดย macrophage โดยที่ไม่ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบ immune system กลับถูกจัดการโดย dendritic cell ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นระบบ immune system ต่อร่างกายต่อไป [3]

2. บทบาทของ nucleosome/antinucleosome complexes [4]

การตอบสนองของร่างกายในผู้ป่วยเอสแอลอี มีการตรวจพบ antinucleosome antibody ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีและพบว่า titer ของแอนติบอดีจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ในหนูทดลองที่ได้รับการให้ nucleosome/antinucleosome complexes เข้าไปที่ไตจะทำให้เกิดการสะสมของ immune complexes ในบริเวณของ mesangium และเกิดภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะได้ นอกจากนั้นยังมีการตรวจพบ nucleosomal antigens ในบริเวณของ glomerular basement membrane ของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีอีกด้วย [5] มีสมมติฐานว่าบริเวณส่วน histone ของ nucleosome/antinucleosome complexes ซึ่งมีประจุเป็นบวก (cationic) จะเข้าไปจับกับส่วนของ heparin sulfate molecule ของ glomerular basement membrane หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นผ่านทางระบบ complement หรือกลไกที่ไม่ได้อาศัยระบบ complement ทำให้เกิดการอักเสบของหน่วยไตตามมา

การเกิดการสร้างแอนติบอดีในร่างกายจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน มีหลายทฤษฎีพยายามอธิบาย ได้แก่ in situ formation โดยแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่เนื้อเยื่อไตปกติได้ (เกิดจาก cross reaction) หรือ planted antigen ซึ่งสามารถไปเกาะยังตำแหน่งเนื้อเยื่อไตและเกิดการจับของแอนติบอดีภายหลัง [6]

ปัจจุบันพบว่าภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีมีการอธิบายผ่านกลไกหลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ การสูญเสียภาวะ self tolerance การสร้างแอนติบอดีที่ผิดปกติ ความผิดปกติในการกำจัดสารแปลกปลอม การกระตุ้นของไซโตคายน์ ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่ออวัยวะในที่สุด

มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับความผิดปกติของ apoptosis การกำจัด apoptotic body และบทบาทของ nucleosome/antinucleosome complexes แต่การสูญเสียภาวะ self tolerance ในโรคเอสแอลอี ยังมีการศึกษาไม่มากนักและทฤษฎีของการเกิดโรคจากการสูญเสียภาวะ self tolerance ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน ความสัมพันธ์ของภาวะดังกล่าวมีบทบาทของเซลล์ด้านภูมิคุ้มกันมาเกี่ยวข้อง โดยบทบาทหลักเกี่ยวข้องกับ regulatory T cells

3. บทบาทของกรรมพันธุ์ [7]

จากหลักฐานการศึกษาทางพันธุกรรมในหนูที่เป็นโรคเอสแอลอีพบว่าหนูที่เป็นโรคเอสแอลอีไม่จำเป็นต้องพบ ds-DNA, nucleosome หรือ nuclear antigen อื่นๆ และพบว่าตำแหน่งของยีน (gene) ที่ทำให้เกิดภาวะไตอักเสบอยู่คนละตำแหน่งกับยีนที่สร้าง antinuclear antibody บทบาทด้านกรรมพันธุ์จึงอาจมีความเกี่ยวเนื่องด้วย

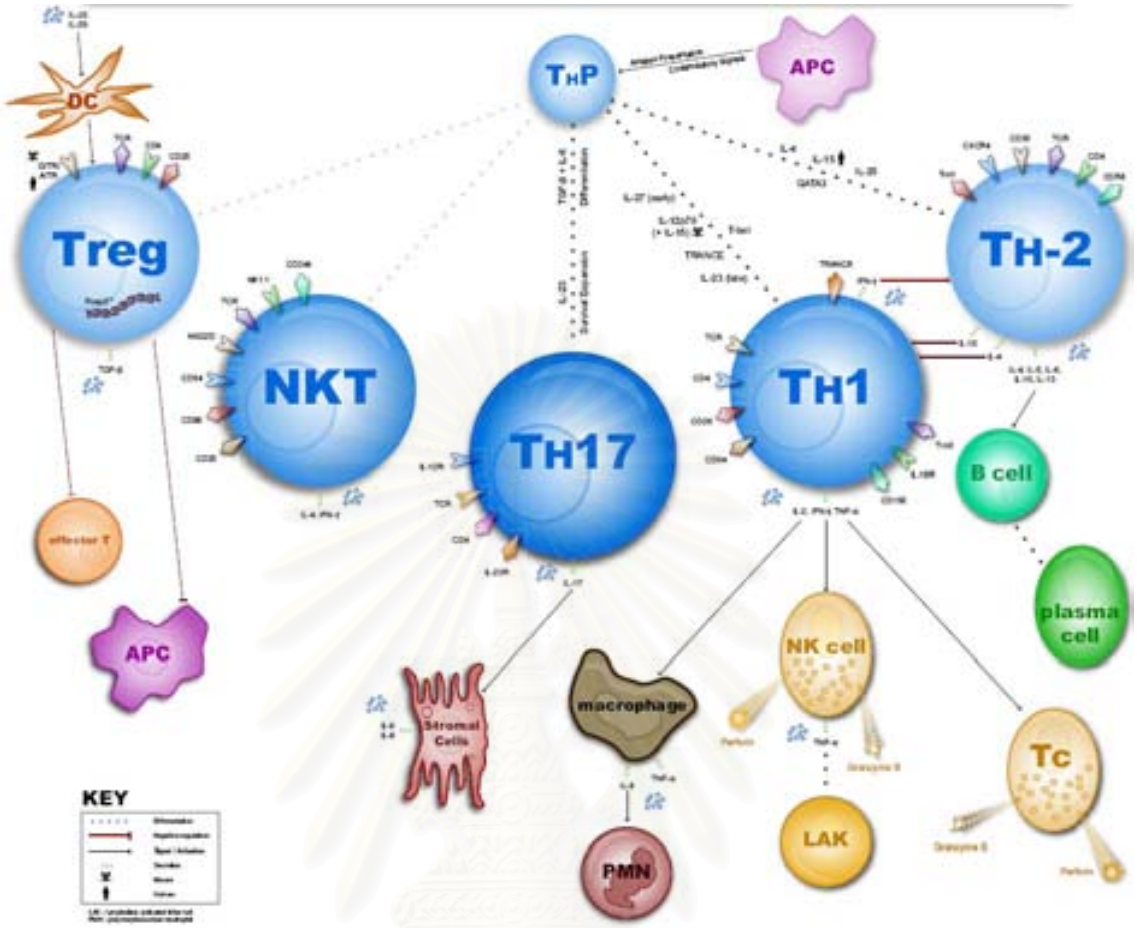
2.1.2 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ regulatory T cells, FOXP3 และโรคเอสแอลอี

พยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอียังไม่ทราบแน่ชัด มีการกล่าวถึงเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ T cells และ B cells

บทบาทของ T cells ในการอธิบายพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอี เซลล์ที่มีบทบาทหลักคือ CD4+T cells โดยเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ต่างๆ เช่น effector T (Teff) cells, T helper cells หรือ regulatory T cells และทีเซลล์ชนิดยับยั้ง (suppressor T cells) ที่มีการแสดงออกของ CD8+, CD28– [8 -10] บทบาทของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะ regulatory T cells (T reg) ทำให้เกิดการควบคุมความสามารถในการทนทานต่อการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง (self tolerance) [11] กล่าวโดยสรุปได้ว่าในภาวะที่มีความผิดปกติของ regulatory T cells ทำให้สูญเสียภาวะ self tolerance และเกิดโรคทางภูมิคุ้มกันต่อเนื่อเยื่อตนเอง

บทบาทของ T cells ในโรคเอสแอลอีทำหน้าที่ประสานงานกันระหว่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและมีการสร้างไซโตคายน์ทั้งชนิดกระตุ้นและควบคุมยับยั้งเซลล์ต่างๆให้อยู่ในเกณฑ์ที่สมดุล โดยแสดงบทบาทของเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญดังรูปที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 แสดงบทบาทหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

กลไกการควบคุม self tolerance ของร่างกายประกอบด้วย

1. Central tolerance

จากการศึกษาในต่อมไทมัสของหนูทดลอง พบว่า T cells ที่จับแน่นกับแอนติเจนของร่างกาย (high affinity autoreactive T cells) นั้นจะเข้าสู่กระบวนการที่ทำให้เกิด tolerance ตามปกติ ระหว่างการพัฒนา T cells ที่ต่อมไทมัส ชนิดของตัวรับสัญญาณบนผิวของ T cells (TCR) ที่อยู่บนผิวของ T cells ตัวอ่อนนั้น เกิดจากการถอดรหัสของ TCR genes แบบสุ่มทำให้ได้ TCR ที่มีความหลากหลาย จากนั้นเซลล์ในต่อมไทมัสจะทำการคัดแยกชนิดของ T cells (repertoire) โดยใช้กลไกหลัก 2 อย่าง คือ

(1) positive selection

เซลล์ในต่อมไทมัสจะทำการคัดเลือก T cells ที่มีคุณภาพออกไปทำหน้าที่ตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยเลือกเอาเซลล์ที่มี TCR ที่ประกบกันได้พอดีกับ self MHC/peptides (class I และ class II) ไว้ เปิดโอกาสให้ได้รับการพัฒนาเต็มที่ (mature T cells) ก่อนที่จะส่งออกไปในกระแสเลือดเพื่อทำหน้าที่ร่วมกับโมเลกุล MHC (MHC restriction) ส่วน T cells กลุ่มที่ไม่ผ่านการคัดเลือกจะถูกปล่อยให้ย่อยสลายตัวตายไป (programmed cell death) ภายในต่อมไทมัส T cells ที่ผ่านกระบวนการคัดเลือกแบบนี้จะมี 2 กลุ่มย่อย คือ พวกที่ประกบได้พอดีกับ MHC class II เรียกว่า CD4+ T cells และพวกที่ประกบได้พอดีกับ MHC class I เรียกว่า CD8+ T cells

(2) negative selection

เซลล์ในต่อมไทมัสจะเข้าจับกับ T cells ที่มี TCR ตอบสนองกับแอนติเจนร่างกาย (self antigen specific TCR) แล้วกำจัดออกไปโดยตรง (deletion) ปล่อย T cells ที่มี TCR ปกติผ่านออกไปทำหน้าที่ตามปกติ

Central tolerance เป็นกลไกหลักที่ใช้กำจัด T cells ที่จับกับแอนติเจนร่างกายได้อย่างเหนียวแน่น (high affinity autoreaction) ภายในต่อมไทมัสจะมีแอนติเจนร่างกายของทุกอวัยวะที่สำคัญ (dominant self antigens) ปรากฏอยู่ [12,13] ยกเว้นแอนติเจนร่างกายที่เกิดขึ้นมาภายหลังเนื่องจากเนื้อเยื่อมีการอักเสบหรือแอนติเจนร่างกายถูกแปรสภาพ (modified) ให้มีโครงสร้างผิดไปจากเดิม [14] autoreactive T cells ที่เล็ดรอดออกไปจากต่อมไทมัสได้จะไปรวมกลุ่มอยู่กับ peripheral T cells ปกติ พักอยู่ในต่อมน้ำเหลืองและม้าม autoreactive T cells เหล่านี้จะถูกกำกับไว้ไม่ให้ถูกกระตุ้นและก่อโรคทางภูมิคุ้มกันขึ้นมาได้โดยกลไกของ peripheral tolerance อีกที

2. Peripheral tolerance

เป็นกลไกที่ร่างกายใช้กำกับ autoreactive T cells ที่หลุดจากต่อมไทมัสมาปนอยู่กับ T cells ปกติ โดยอาศัยวิธีการควบคุม autoreactive T cells ให้อยู่ในภาวะเพิกเฉยไม่เกิดการตอบสนองเมื่อถูกกระตุ้น (ignorant state) ด้วยแอนติเจนร่างกาย เช่น กักกันไม่ให้ autoreactive T cells เดินทางไปยังตำแหน่งเนื้อเยื่อที่กำลังเกิดการอักเสบ กำหนดให้มีเขตปลอดเซลล์ภูมิคุ้มกัน ซึ่งถ้ามีการหลุดรอดของ T cells เข้าไปในเขตดังกล่าวจะถูกกำจัดให้ตายไป ตัวอย่างเช่น บริเวณกระจกตาซึ่งตรวจพบ T cells ได้น้อยมาก เมื่อใดที่ร่างกายสูญเสียคุณสมบัติดังกล่าวไปก็จะเกิดเป็นโรคทางภูมิคุ้มกันขึ้นมาได้ เช่น มีการรั่วไหลของแอนติเจนร่างกายเปิดเผยตัวต่อเซลล์ของภูมิคุ้มกันอยู่ตลอดเวลา เขตปลอดเซลล์ภูมิคุ้มกันถูกทำลาย มีการนำเสนอโมเลกุล MHC class II ออกมาที่ผิว

เซลล์มาก หรือautoreactive T cells ถูกกระตุ้นด้วยการติดเชื้อ ทำให้อยู่ในสภาพพร้อมปฏิบัติงาน สามารถเคลื่อนย้ายไปยังตำแหน่งที่เกิดการอักเสบและตอบสนองต่อแอนติเจนร่างกายได้

ในการยื่นเสนอแอนติเจนที่เป็นสาร peptide ให้กับ T cells จะต้องผ่านกระบวนการที่สมบูรณ์ 2 ขั้นตอนคือ

(1) ต้องมีกระบวนการจัดการกับแอนติเจน (antigen processing) เพื่อให้เข้าประกบกับโมเลกุล MHC และ TCR ได้อย่างเหนียวแน่น

(2) ในการกระตุ้น T cells ต้องการโมเลกุลเสริม (costimulatory molecule) ที่สมบูรณ์ [15]

ถ้าขาดอย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่สามารถกระตุ้น T cells ได้ T cells ที่ถูกกระตุ้นอย่างไม่สมบูรณ์จะไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันตัวอื่นต่อไปได้ (anergy) หรือบางตัวก็ย่อยสลายตัวเองให้ตายไป (apoptosis) อย่างไรก็ดี แม้ว่าการกระตุ้น T cells ต้องอาศัยโมเลกุลเสริมก็จริงอยู่ แต่โมเลกุลเสริมบางชนิดอาจทำหน้าที่ขัดขวางไม่ให้ T cells ได้รับแรงกระตุ้นได้ (อาจเรียกว่าเป็น tolerogenic signal) ถ้าขาดโมเลกุลเหล่านี้อาจเป็นเหตุให้ autoreactive T cells ก่อโรคขึ้นมาได้อีก วิธีการหนึ่งที่ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโรคทางภูมิคุ้มกัน คือการควบคุมและกำกับ autoreactive T cells ด้วย regulatory T cells [16,17]

การยับยั้งการทำงานของทีเซลล์ที่จดจำเซลล์เนื้อเยื่อของตนเองที่หลุดรอดออกมาจากต่อมไทมัสได้โดยกลุ่มทีเซลล์ CD4+ CD25+ ที่เรียกว่า regulatory T cells (T reg) ซึ่งสร้างจากต่อมไทมัส การลดลงของ T reg ทำให้เกิดโรคด้านภูมิคุ้มกันต่างๆ โดยเกิดจากภาวะสูญเสีย self tolerance เป็นคำอธิบายหนึ่งที่อธิบายพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอี โดยปกติ Treg มีปริมาณประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 ของ CD4+ T cells ในกระแสเลือด ในปี 1985 Sakaguchi และคณะพบว่าการยับยั้งของการทำงานของ CD4+ เกิดจากการควบคุมของทีเซลล์ชนิด CD4+CD25+ ซึ่งเป็นบทบาทของ regulatory T cells

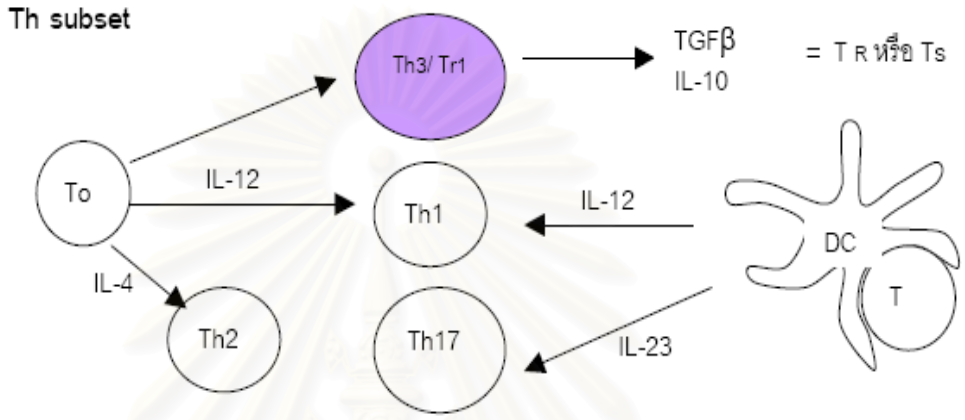
Regulatory T cells ได้รับการกล่าวถึงครั้งแรกช่วงต้นปี 1970 [18] ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในภาวะที่สมดุล บทบาทในโรคภูมิคุ้มกันต่อตนเองเชื่อว่า T reg ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า self tolerance โดยทำให้ไม่เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของตนเอง ต้นกำเนิดของ T reg มาจากต่อมไทมัส ซึ่งเป็น T reg ที่เกิดโดยธรรมชาติ โดยเป็นเซลล์ชนิด CD4+CD25+

Regulatory T cells ที่กล่าวถึงในปัจจุบันมี 2 ประเภทคือ

1. Natural regulatory T cells ได้แก่ ชนิดที่มีการแสดงออกแบบ CD4+/CD25+/GITR
2. Inducible regulatory T cells เป็นชนิดที่เกิดภายนอกต่อมไทมัสซึ่งเกิดจากการกระตุ้นภายหลัง เช่น T regulatory type 1 (Tr1) และ Th3 [19-22] โดยสร้าง cytokines TGFβ, IL-10 หรือที่มาจาก thymic derived TR ที่มีการแสดงออกแบบCD4+/CD25+/CD62Lhi

ซึ่งถูกกระตุ้นโดย dendritic cells

Regulatory T cells ทั้งสองประเภทมี transcription factor เป็น FOXP3 เช่นเดียวกัน โดยทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการทางภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง



รูปที่ 2.3 Inducible regulatory T cells

Regulatory T cells มีบทบาทสำคัญในโรคของภูมิคุ้มกันโดยควบคุมยับยั้งการทำงานของ effector T cells ให้ทำงานอยู่ในระบบสมดุล ยับยั้งการทำงานของ CMIR โดยหลั่ง IL-10 ออกมา (มีผลยับยั้งการทำงานของ Th1) นอกจากนี้ T cells ทั้งชนิด CD4+CD25+ และ CD8+ สามารถหลั่ง TGF-β ออกมาได้และมีผลยับยั้งการทำงานของ Th ทั้งสองชนิดคือ Th1 และ Th2 โดยพบว่าการผลิต TGF-β ขึ้นมาในเนื้อเยื่อร่างกายน่าจะลดความรุนแรงของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ตำแหน่งนั้นได้ (local immunosuppression) จึงน่าจะเป็นผลดีต่อร่างกาย สามารถป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อร่างกายได้นอกจากนี้ยังพบว่ามีการยับยั้งเซลล์อื่นเช่น NK cells, dendritic cells, B cells ได้โดยพบว่า regulatory T cells ดังกล่าวเป็น T cells ชนิด CD4+CD25+ โดยเซลล์เหล่านี้ต้องมีการแสดงออกของ FOXP3 จึงทำหน้าที่เป็น regulatory T cells ที่มีความจำเพาะและทำงานได้อย่างสมบูรณ์

หลังจาก Gershon ค้นพบ regulatory suppressor cells ต่อมา Sakaguchi ได้ค้นพบ FOXP3 ใน CD4+CD25+ regulatory T cells ในปี 2003 โดยกระบวนการ flow cytometry

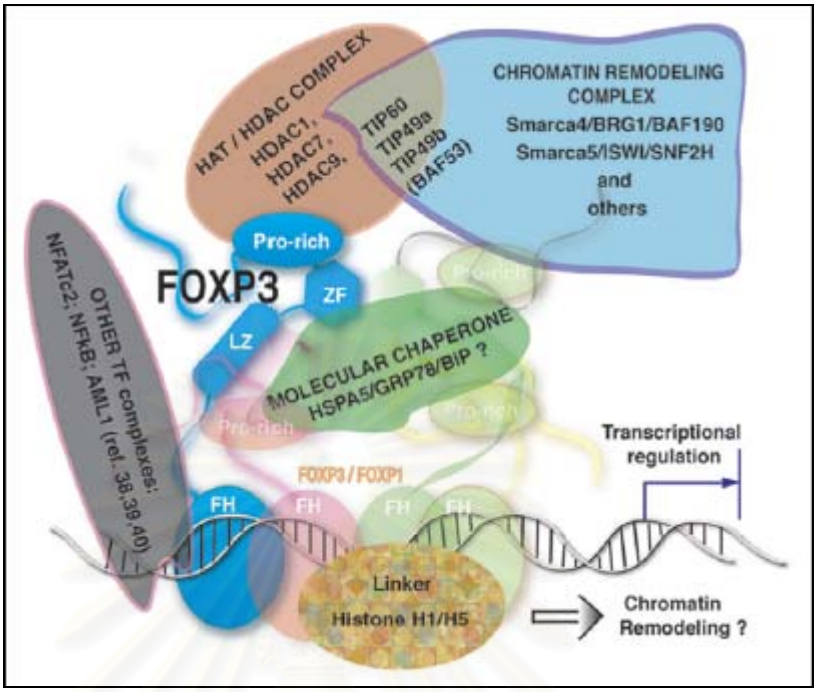
FOXP3 เป็น transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมยับยั้งการทำงาน โดยพบว่าลักษณะของการทำงานที่ทำให้เซลล์มีคุณสมบัติของ T reg นั้นจะต้องมีระดับที่สูงพอและมีการแสดงออกที่นานพอ [23] โดยขึ้นต่อการทำงานของ IL-2 ผ่านทาง STAT-5 signal [24,25]

โครงสร้างของ FOXP3 โปรตีนประกอบด้วย 11 exons , Forkhead DNA binding domain บริเวณ C – terminus ซึ่งสามารถจับกับ NFAT (Nuclear factor of activated T cells) ส่วนประกอบอื่นได้แก่ Zn finger, Leucine zipper ซึ่งส่วนนี้อาจพบได้คล้ายคลึงกันใน forkhead family อื่น และปลาย N – terminus มีหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการทำงาน

รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของ FOXP3 โปรตีน

ปัจจุบันพบลักษณะของ FOXP3 ในมนุษย์ทั้งในแบบปกติและ splice variant ซึ่งขาดกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 71-105 ซึ่ง splice variant นี้พบได้ใน CD8+ และทั้งสองแบบพบใน CD4+CD25+ regulatory T cells นอกจากนี้ข้อมูลจากกระบวนการ western blot แสดงให้เห็นว่า FOXP3 ในมนุษย์แตกต่างจากในหนูคือมีบาง isoform ที่ไม่มี exon 2 แต่ยังสามารถทำงานได้เหมือนกัน

FOXP3 ทำหน้าที่เป็น transcriptional repressor โดยสัมพันธ์กับ NFAT และ NF- kB ผ่านทาง Forkhead domain [26] โดยการยับยั้งการหลั่งไซโตคายน์จากทีเซลล์ นอกจากนี้ FOXP3 สามารถกระตุ้นให้เกิดยีนที่มีการแสดงออกของ CTLA-4, CD25 และ GITR ให้เพิ่มขึ้น ในขณะที่มีการลดลงของ CD127 ซึ่งเป็นคุณลักษณะของ T reg



รูปที่ 2.5 แสดงแบบจำลองส่วนประกอบโมเลกุลของ FOXP3 ที่ทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย

โมเลกุล FOXP3 มีส่วนสำคัญในการ develop regulatory T cells ถ้ามีการกลายพันธุ์ไปจะทำให้คนและสัตว์ทดลอง (scurfy mouse) เกิดเป็นโรคที่เรียกว่า IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome [27] เกิดมีภาวะผิดปกติทางภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองอย่างรุนแรง แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดว่าไปทำอย่างไร

ระบบภูมิคุ้มกันนอกต่อมไทมัส CD4+CD25+ T cells พบประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 ของทีเซลล์ชนิด CD4+ ทั้งหมด นอกจาก FOXP3 แล้ว CD4+CD25+ T cells ยังมีการแสดงออกของ CTLA4, GITR และ CD103 อย่างไรก็ตามมีเพียง FOXP3 เท่านั้นที่แสดงออกถึงความจำเพาะของทีเซลล์ชนิดนั้นให้ทำหน้าที่เป็น T reg (แยกจาก non T reg CD4+25+ T cells) นอกจากนี้การ transduction FOXP3 ให้กับ naïve T cells ยังผลให้เกิดการกระตุ้นตัวรับสัญญาณทีเซลล์น้อยลง เกิดการลดลงของการสร้างไซโตคายน์ ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของ T reg แสดงให้เห็นว่า FOXP3 สามารถกระตุ้นให้ naïve T cells เปลี่ยนเป็น T reg ได้ T reg สามารถสร้างไซโตคายน์ชนิดที่กดภูมิคุ้มกัน ได้แก่ IL-4, IL-10 และ TGF-β

FOXP3 เป็น transcription factor ที่แสดงออกเฉพาะที่ของ CD4+CD25+ T reg มีข้อมูลในสัตว์ทดลองพบการแสดงออกของ FOXP3 mRNA โดยวิธี RT-PCR ในต่อมไทมัสและต่อม

น้ำเหลืองในหนูโดย thymocyte ชนิด CD4+CD25+ พบได้ประมาณร้อยละ 5 ของ thymocyte ชนิด CD4+CD8- ในต่อมไทมัสโดย thymocyte ชนิด CD4+CD25+ เท่านั้นที่มีการแสดงออกของ FOXP3

จากบทบาทของการสูญเสียภาวะ self tolerance ต่อพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอี ความผิดปกติของ regulatory T cells ชนิด CD4+ และ CD25+ ทำให้เกิดภาวะสูญเสีย self tolerance และการแสดงออกของ FOXP3 ซึ่งเป็น transcription factor ที่จำเพาะของ regulatory T cells และควบคุมการทำงานของ regulatory T cells ให้เป็นไปตามปกติ จึงมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวในแง่ของโรคเอสแอลอีทั้งข้อมูลในสัตว์ทดลองและมนุษย์ แต่ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนในปัจจุบันเนื่องจากข้อมูลยังมีความขัดแย้งกัน Hsu และคณะ [28] ทำการศึกษาในหนูทดลองพบว่าหนูที่เป็นโรคเอสแอลอีมี regulatory T cells ดังกล่าวน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อทำให้หนูกลุ่มควบคุมขาด regulatory T cells จะเกิดการสูญเสียภาวะ self tolerance มีการสร้างภูมิต่อ double strand DNA ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในโรคเอสแอลอี Bagavant และคณะ [29] พบว่าหนูทดลองที่เกิดความผิดปกติของ regulatory T cells จะเกิดไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี

ส่วนการศึกษาในคน Lee และคณะ [30] ได้รายงานว่ามีการลดจำนวนลงของ CD4+ CD25+ regulatory T cells ในผู้ป่วยเด็กที่มีการกำเริบของโรคเอสแอลอี และพบว่าสัมพันธ์กับการลดลงของ FOXP3 การศึกษาของ Miyara และคณะ [31] พบว่า CD4+CD25+ regulatory T cells ในผู้ป่วยเอสแอลอีที่มีการกำเริบของโรคมีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่โรคสงบ ในทางกลับกันการศึกษาของ Alvarado และคณะ [32] ศึกษาในผู้ป่วยเอสแอลอีเทียบกับคนปกติพบว่าจำนวน regulatory T cells ไม่แตกต่างกันแต่เกิดจากหน้าที่การทำงานที่ผิดปกติในผู้ป่วยเอสแอลอี ซึ่งการศึกษาดังกล่าวใช้การตรวจวัดจำนวนและการทำงานของ regulatory T cells ในเลือด

การศึกษาของ Crispin และคณะในผู้ป่วยเอสแอลอี 30 ราย พบว่ามีเพียงผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระยะกำเริบเท่านั้นที่มีการลดลงของ Treg [33] การศึกษาของ Mellor-Pita และคณะ พบการลดลงของระดับ CD4+CD25+ T cells ในผู้ป่วยที่มีการกำเริบของโรคเมื่อเทียบกับคนปกติ โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากโดยใช้ระดับ SLEDAI มาประเมินจะมีปริมาณ T reg ลดลง
(R = -0.611, P value <0.001)

การศึกษาของ Liu และคณะ ในผู้ป่วย 94 ราย พบการลดลงของ CD4+ $CD25^{high}$ T cells ไม่ว่าจะอยู่ในระยะกำเริบหรือระยะสงบแล้วก็ตาม [34] Miyara และคณะแสดงให้เห็นว่าการลดลงของ T reg มีความสัมพันธ์กับความกำเริบของโรค ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากการการทำให้เกิดภาวะฝ่อ apoptosis ที่เกิดภายหลังการได้รับสิ่งกระตุ้นซึ่งเป็นแอนติเจนของผู้ป่วยเอง การศึกษาของ Bonelli และคณะใช้เทคนิค flow cytometry วัดจำนวน FOXP3 + T cells ในเลือดของผู้ป่วยเอ

สแอลอีที่มีอาการกำเริบ พบว่ามีปริมาณ natural CD4+CD25+^{high} ลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆอีกมากมายที่แสดงให้เห็นว่า มีการลดลงของทีเซลล์ชนิด CD4+CD25 bright ในผู้ป่วยเอสแอลอีที่โรคอยู่ในระยะกำเริบ [30,33 -34]

มีการศึกษาพบว่า T reg ที่มีการแสดงออกของ FOXP3 มาจากต่อมไทมัส ถึงแม้ว่าจะมีการฝ่อลงของต่อมไทมัสเมื่อถึงช่วงวัยรุ่น แต่ต่อมไทมัสบางส่วนยังคงทำงานได้จนกระทั่งถึงช่วงวัยกลางคนซึ่งแสดงให้เห็นว่าอายุมีความสัมพันธ์กับระดับ FOXP3 โดยพบระดับที่สูงในผู้ป่วยอายุน้อย และพบระดับที่ลดลงในผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม FOXP3 ก็อาจถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้โดยมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ FOXP3 ในทีเซลล์ชนิด CD4+CD25− ที่ได้รับการกระตุ้นในหลอดทดลอง

บางการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยเอสแอลอีที่มีการกำเริบของโรคพบว่ามีการกระตุ้นทำให้ T reg มีปริมาณมากขึ้น ในขณะที่พบการลดลงของระดับ FOXP3 และมีการเปลี่ยนแปลงในทางตรงกันข้ามเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาซึ่งอาจอธิบายได้จาก

ประการแรกคือมีปัจจัยอื่น เช่น ไซโตคายน์ ชนิด TGF- β ซึ่งมีผลต่อการเกิดเพิ่มและการอยู่รอดของ T reg [35-38] นอกจากนี้เกิดจากการเหนี่ยวนำให้ทีเซลล์ชนิด CD4+CD25- เปลี่ยนแปลงไปเป็น T reg โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ FOXP3 นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าหลังการรักษาด้วย rituximab พบทีเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TGF- β เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย Vigna-Perez และคณะ [39] พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของทีเซลล์ที่มีการฝ่อตายที่วันที่ 30 หลังการรักษาด้วย rituximab และไม่พบที่ 90 วันหลังการรักษา

ประการที่สองเกิดจากการลดลงของบีเซลล์หลังการรักษาด้วย rituximab ทำให้เกิดการลดลงของทีเซลล์ชนิดที่ได้รับการกระตุ้นในที่สุดทำให้เกิดการเพิ่มของทีเซลล์ชนิด CD4+CD25+ FOXP3+ [40]

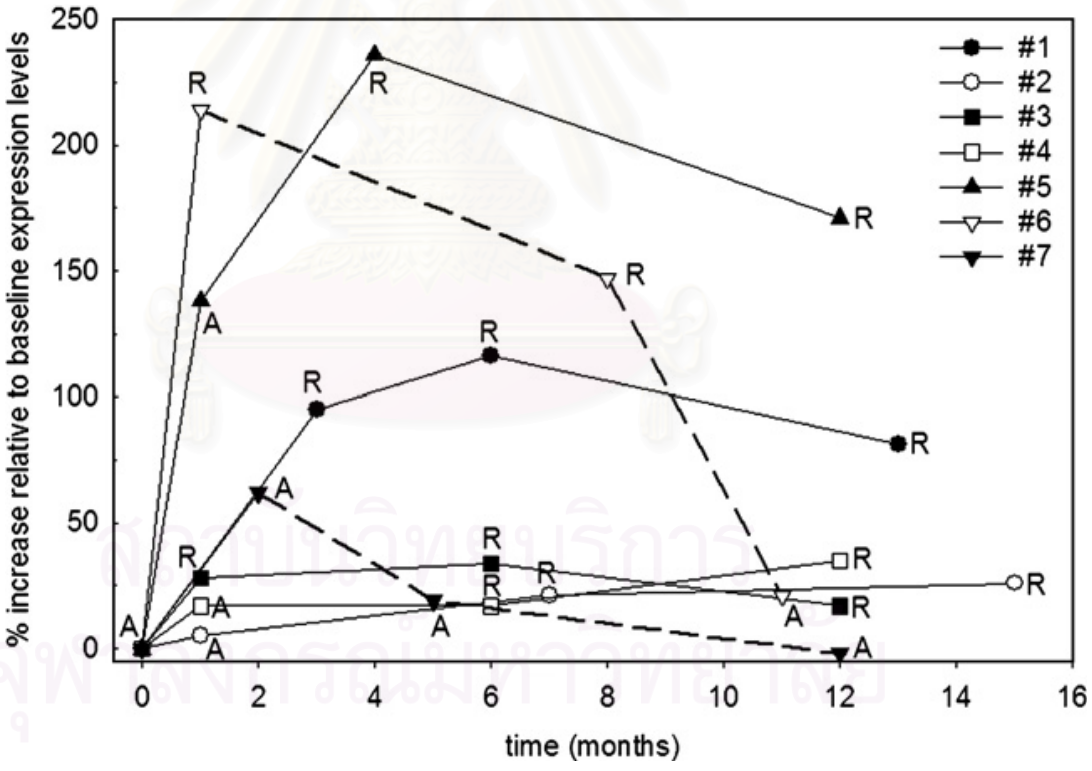
ประการที่สามเมื่อการลดลงของบีเซลล์หลังการรักษาด้วย rituximab จะลดการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์และลดทีเซลล์ชนิดทำลายและกระบวนการทำลายเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FOXP3+

Fields และคณะ [41] พบว่า CD4+CD25^{high} T cells สามารถยับยั้งการสร้าง anti ds-DNA ในเม็ดเลือดขาวชนิดบีเซลล์ แต่บางการศึกษากลับไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว

การศึกษาผลของยาต่อระดับ FOXP3 มีรายงานการศึกษาผลของการได้คอร์ติโคสเตียรอยด์พบว่าสามารถเพิ่มระดับ FOXP3 ได้ด้วยเหตุผลที่ยาไปกดการทำงานของไซโตคายน์ ทำให้ CD4+ CD25+ T cells มีอายุยาวนานขึ้น [42] ซึ่ง Karagiannidis และคณะ [43] ได้รายงานในผู้ป่วยโรค

หอบหืดที่ได้รับการรักษาด้วยสเตียรอยด์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ FOXP3 และจำนวนของ natural T reg นอกจากนี้ Suarez และคณะ [44] รายงานในผู้ป่วยเอสแอลอี 110 รายพบว่าจำนวนของ CD4+ CD25^{high} T cells ไม่สัมพันธ์กับการกำเริบของโรค โดยพบว่าผู้ป่วยที่โรคกำเริบแต่ได้รับการรักษาด้วยสเตียรอยด์ขนาดที่สูงกลับพบจำนวน CD4+ CD25^{high} T cells ที่เพิ่มขึ้น

ข้อมูลการศึกษาในภาวะไตอักเสบยังมีน้อย Sfikakis และคณะ [45] ศึกษาผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีที่ได้รับการรักษาด้วย rituximab จำนวน 7 รายโดยวัดระดับ FOXP3 mRNA ในเลือดของผู้ป่วยที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี real time PCR พบว่าระดับ FOXP3 mRNA ในเลือดของผู้ป่วยมีระดับเพิ่มขึ้นหลังการรักษาในกลุ่มที่ตอบสนองซึ่งเกิดก่อนการตอบสนองทางคลินิกดังแสดงตามกราฟด้านล่าง ซึ่งมีผู้ป่วยบางรายที่มีอาการกำเริบ (A = active) ระหว่างการรักษาและโรคสงบ (R = remission)



รูปที่ 2.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับ FOXP3 messenger RNA ในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี 7 ราย ในระยะเวลาต่างๆ (A = active, R= remission)

โมเลกุลและหน้าที่ของ FOXP3 ค่อนข้างซับซ้อน สัญญาณกระตุ้นจากภายนอกไม่ว่าจะเป็นด้านกายภาพหรือพยาธิสภาพ เช่น ไซโตคายน์ เชื้อแบคทีเรีย หรือยาบางชนิดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ FOXP3 ในอนาคตอาจมีการพัฒนายาใหม่ที่ออกฤทธิ์หรือมีผลต่อ FOXP3 เพื่อนำมารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ regulatory T cells เช่น โรคทางด้านภูมิคุ้มกันหรือโรคมะเร็ง ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นในปัจจุบันพบว่ามีผลต่อการกดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

การจัดแบ่งโรคตามลักษณะทางพยาธิวิทยาและการดำเนินโรคของโรคไตอักเสบลูปุส (pathological classification and natural history)

ปี 2003 ทาง International Society of Nephrology / Renal Pathology Society [46] ได้มีการทบทวนแก้ไขการจัดกลุ่ม (classification) โดยทดแทนเกณฑ์ของ WHO เดิมซึ่งใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 โดยมีแพทย์หลายสาขาเข้าร่วม เช่น แพทย์ด้านโรคข้อและรูมาติซั่ม แพทย์โรคไตและพยาธิแพทย์ ที่ประชุมมีการเปลี่ยนแปลงในรายละเอียด เช่น ความผิดปกติของชิ้นเนื้อในไตของผู้ป่วย ซึ่งนอกจากจะพบการเปลี่ยนแปลงของ glomerulus แล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงทั้งใน tubular interstitium และ vascular ร่วมด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีความแตกต่างทางชิ้นเนื้อค่อนข้างมากและหลายรูปแบบ แม้กระทั่งผู้ป่วยรายเดียวกันแต่ต่าง glomerulus หรือใน glomerulus เดียวกันแต่ต่าง segment กันก็จะมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน จุดมุ่งหมายในการสร้างเกณฑ์การจำแนกประเภทใหม่ก็เพื่อให้มีการจำแนกประเภทที่ชัดเจนและนำไปใช้ได้สะดวก ผู้เข้าร่วมประชุมได้แก้ไขในส่วนของคำจำกัดความและการวินิจฉัยให้เป็นมาตรฐานมากขึ้น นอกจากนี้ที่ประชุมยังสนับสนุนให้มีการใช้ chronicity parameter แบบใหม่และสนับสนุนการวินิจฉัยโดยใช้ light microscope ร่วมกับการย้อม immunofluorescence และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในกรณีที่วินิจฉัยยาก รายละเอียดของการจัดกลุ่มแสดงดังตารางที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 การจัดกลุ่มของ lupus nephritis โดย International Society of Nephrology / Renal Pathology Society [46]

Class I	**Minimal mesangial lupus nephritis** Normal glomeruli by light microscopy, but mesangial immune deposits by immunofluorescence
Class II	**Mesangial proliferative lupus nephritis** Purely mesangial hypercellularity of any degree or mesangial matrix expansion by light microscopy, with mesangial immune deposits May be a few isolated subepithelial or subendothelial deposits visible by immunofluorescence or electron microscopy, but not by light microscopy
Class III	**Focal lupus nephritis**[a] Active or inactive focal, segmental or global endo- or extracapillary glomerulonephritis involving <50% of all glomeruli, typically with focal subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations
Class III (A)	Active lesions: focal proliferative lupus nephritis
Class III (A/C)	Active and chronic lesions: focal proliferative and sclerosing lupus nephritis
Class III (C)	Chronic inactive lesions with glomerular scars: focal sclerosing lupus nephritis
Class IV	**Diffuse lupus nephritis**[b] Active or inactive diffuse, segmental or global endo or extracapillary glomerulonephritis involving $\geq$ 50% of all glomeruli, typically with diffuse subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations. This class is divided into diffuse segmental (IV-S) lupus nephritis when $\geq$ 50% of the involved glomeruli have segmental lesions, and diffuse global (IV-G) lupus nephritis when $\geq$ 50% of the involved glomeruli have global lesions. Segmental is defined as a glomerular lesion that involves less than half of the glomerular tuft.This class includes cases with diffuse wire loop deposits but with little or no glomerular proliferation
Class IV-S (A)	Active lesions: diffuse segmental proliferative lupus nephritis
Class IV-G (A)	Active lesions: diffuse global proliferative lupus nephritis
ClassIV-S(A/C)	Active and chronic lesions: diffuse segmental proliferative and sclerosing lupus nephritis
ClassIV-G(A/C)	Active and chronic lesions: diffuse global proliferative and sclerosing lupus nephritis
Class IV-S (C)	Chronic inactive lesions with scars: diffuse segmental sclerosing lupus nephritis
Class IV-G (C)	Chronic inactive lesions with scars: diffuse global sclerosing lupus nephritis
Class VI	**Advanced sclerosis lupus nephritis** $\geq$ 90% of glomeruli globally sclerosed without residual activity

[a] Indicate the proportion of glomeruli with active and with sclerotic lesions.

[b] Indicate the proportion of glomeruli with fibrinoid necrosis and/or cellular crescents. Indicate and grade (mild, moderate, severe) tubular atrophy, interstitial inflammation and fibrosis, severity of arteriosclerosis or other vascular lesions.

2.2 การประเมินความรุนแรงของโรคในทางคลินิก

โรคไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีเป็นโรคที่มีอาการทางคลินิกหลากหลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพที่ไตเป็นหลัก โดยทั่วไปผู้ป่วยมีพยาธิสภาพของไตที่ไม่รุนแรง (class I, II) อาจพบมีแค่การรั่วของโปรตีนและเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะเพียงเล็กน้อยโดยไม่พบความผิดปกติอื่น มีการพยากรณ์โรคในระยะยาวดีที่สุด แต่ในบางรายพบว่าอาจมี transformation คือ เปลี่ยนจาก class I, II ไปเป็น class III หรือ IV ได้ ในกลุ่มที่มีการอักเสบของไตที่รุนแรงขึ้น ได้แก่ class III, IV จะมีการรั่วของโปรตีนและเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะมากขึ้น มักพบมีการบวม (edema) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และมีการเสื่อมของการทำงานของไตได้ (renal failure) การพยากรณ์โรคในระยะยาวจะแย่กว่า โดยเฉพาะใน class IV ซึ่งจะมีการเสื่อมการทำงานของไตได้รวดเร็วจนเกิดไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายได้ ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ส่วนในกลุ่มที่มีพยาธิสภาพของไตเป็นแบบ class V นั้น จะมาพบแพทย์ด้วยอาการบวม และ proteinuria เป็นหลัก (มักจะเป็น nephrotic range proteinuria) การเสื่อมการทำงานของไตจะเกิดช้ากว่าใน class IV ทำให้มีการพยากรณ์โรคโดยรวมดีกว่า แต่โรคมักไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษา

การกำเริบของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี ในปัจจุบันอาจแบ่งได้เป็นชนิด nephritic flare โดยมีลักษณะที่พบได้แก่ มีปริมาณเซลล์ในปัสสาวะเพิ่มผิดปกติ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เม็ดเลือดขาว มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนในปัสสาวะ การเพิ่มขึ้นของระดับครีอะตินินในเลือด มีการลดลงของระดับคอมพลีเมนต์ หรือมีการเพิ่มขึ้นของระดับของ anti ds-DNA และชนิด nephrotic flare โดยมีลักษณะโปรตีนรั่วในปัสสาวะเด่น [47]

2.2.1 **การประเมินจาก** clinical activity score [48-50]

ปัจจุบันได้มีการคิดเครื่องมือในการวัดระดับความรุนแรงของโรคเอสแอลอีในทางคลินิก ซึ่งกลุ่มผู้ใช้จะพิจารณาแต่ละวิธีขึ้นกับความไว ความจำเพาะ ความถูกต้องเชื่อถือได้ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายด้วย activity score ที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ SLEDAI-2K ซึ่งได้ปรับปรุงขึ้นในปี 2002 โดยดัดแปลงจาก SLEDAI score เดิม โดยจะประเมินอาการที่เกิดขึ้นภายใน 10 วันก่อนการการประเมิน โดยมีอาการทางคลินิก 24 หัวข้อและให้น้ำหนักของแต่ละอาการ ตั้งแต่ 1 ถึง 8 คะแนนแล้วแต่ชนิดของอาการ โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 105 คะแนน แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2.2 SLEDAI-2K แตกต่างจาก SLEDAI score เดิม โดยกรณีที่มีผื่น ผมร่วง แผลในเยื่อบุผิวหรือการมีโปรตีนรั่วในปัสสาวะ ถ้ากรณีที่ยังคงมีรอยโรคอยู่ให้ถือว่ายังมีอาการผิดปกติอยู่ ซึ่งหากเป็น SLEDAI score เดิมจะถือเฉพาะกรณีเกิดใหม่ไม่นับรวมกรณีที่ยังคงมีรอยโรคอยู่ ซึ่งพบว่า SLEDAI-2K ทำให้ประเมินผู้ป่วยได้ละเอียดและแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่ามีประโยชน์ในการพยากรณ์อัตราการเสียชีวิตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 แสดงการให้คะแนนตาม SLEDAI-2K

(Enter weight in SLEDAI Score column if descriptor is present at the time of the visit or in the preceding 10 days.)

Weight	SLEDAI SCORE	Descriptor	Definition
8	_____	Seizure	Recent onset, exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	_____	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	_____	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features, inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	_____	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	_____	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	_____	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	_____	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	_____	Arthritis	≥ 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	_____	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	_____	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	_____	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	_____	Proteinuria	>0.5 gram/24 hours
4	_____	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	_____	Rash	Inflammatory type rash.
2	_____	Alopecia	Abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	_____	Mucosal ulcers	Oral or nasal ulcerations.
2	_____	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	_____	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	_____	Low complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory
2	_____	Increased DNA binding	Increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory.
1	_____	Fever	>38°C. Exclude infectious cause.
1	_____	Thrombocytopenia	<100,000 platelets / x10^9/L, exclude drug causes.
1	_____	Leukopenia	< 3,000 white blood cells / x10^9/L, exclude drug causes.
TOTAL SLEDAI SCORE	_____		

นอกจากนี้ยังมีการประเมินจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น เช่น anti ds-DNA โดยมีการศึกษาที่บ่งว่าสามารถพยากรณ์การกำเริบของโรคได้ [51,52] โดยเฉพาะเป็นตัวชี้วัดการกำเริบของไตอักเสบ อย่างไรก็ตามก็มีการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วยที่มีอาการทางไตกำเริบก็สามารถพบว่าระดับลดลงหรือปกติได้ [53] หรือการใช้ระดับ complement โดยพบว่ามีบทบาทในการกำเนิดโรค ในทางเวชปฏิบัตินิยมใช้ในการวัดติดตามควบคู่กับอาการทางคลินิก อย่างไรก็ตามพบว่ามีความไวและความจำเพาะต่ำ เนื่องจากระดับในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยอื่น เช่น อัตราในการสร้างเทียบกับอัตราของการใช้ ซึ่งพบว่าในภาวะที่เกิดการอักเสบจะมีทั้งการเพิ่มการสร้างและการใช้ complement นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะพบความสัมพันธ์ของระดับ complement กับอาการกำเริบทางคลินิก เช่น SLEDAI score แต่พบว่าไม่มีปัจจัยใดที่สามารถพยากรณ์การเกิดการกำเริบซ้ำได้

2.2.2 ปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ

ปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะเป็นดัชนีชี้วัดการเสื่อมของไตโดยพบว่าการเสื่อมของการทำงานของไตสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นในปัสสาวะ [54] การมีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่มากขึ้นก็จะมีการเสื่อมของการทำงานของไตมากขึ้นโดยแสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ GFR มากขึ้นและยังพบว่าถ้าสามารถลดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะลงก็จะสามารถชะลอการเสื่อมของไตได้ การใช้ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะเพื่อบอกการกำเริบของไตในผู้ป่วยเอสแอลอีเป็นที่นิยมโดยเฉพาะในกลุ่มที่มี nephrotic flare การวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะทำได้โดย

ก. ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ จากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สามารถหาได้โดยการวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะ และปริมาณของปัสสาวะที่เก็บได้ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

24-hr urine protein (g/day) = [Upro (mg/dl) /1000] x [V (ml/day) /100]

โดย 24-hr urine protein = ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นกรัมต่อวัน (g/day)
Upro = ระดับโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)
V = ปริมาณปัสสาวะใน 24 ชั่วโมงหรือ 1 วัน หน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อวัน (ml/day)

การหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธีนี้ สามารถบอกปริมาณจริง (absolute value) ของโปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้และเป็นวิธีที่เคยได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุด (gold standard) ในการวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ แต่ต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ป่วยเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากความผิดพลาดในการเก็บปัสสาวะ บางครั้งอาจเก็บปัสสาวะได้ไม่ครบและบางครั้งเก็บปัสสาวะมามากเกินจริง ทำให้ปริมาณปัสสาวะที่ในการคำนวณปริมาณโปรตีนในปัสสาวะผิดไปจากความเป็นจริง

ข. สัดส่วนของโปรตีนเทียบกับ creatinine ในปัสสาวะ (UPCR) [55]

การใช้ระดับโปรตีนในปัสสาวะเพียงอย่างเดียวอาจใช้ประเมินปริมาณโปรตีนในปัสสาวะได้อย่างคร่าว ๆ แต่จะมีความผิดพลาดได้มากจากความเปลี่ยนแปลงของปริมาณปัสสาวะซึ่งเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาขึ้นกับปริมาณน้ำในร่างกาย

เนื่องจากในภาวะปกติร่างกายจะขับครีอะตินินออกมาในปัสสาวะในอัตราที่ค่อนข้างจะคงที่ และระดับของครีอะตินินในปัสสาวะก็จะเปลี่ยนแปลงตามปริมาณของปัสสาวะเช่นเดียวกับระดับโปรตีนในปัสสาวะ การนำระดับของโปรตีนในปัสสาวะมาเทียบกับระดับครีอะตินินในปัสสาวะจึงสามารถลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความเปลี่ยนแปลงของปริมาณปัสสาวะได้และสามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณโปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้ดี

สัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนในปัสสาวะเทียบกับระดับของครีอะตินินในปัสสาวะ (UPCR) สามารถหาได้โดยการวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะและระดับของครีอะตินินในปัสสาวะแล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

UPCR = Upro (mg/dL) / Ucr (mg/dL)

โดย UPCR = สัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนเทียบกับระดับของcreatinineใน ปัสสาวะ
Upro = ความเข้มข้นของโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)
Ucr = ความเข้มข้นของcreatinineในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

การประเมินปริมาณโปรตีนในปัสสาวะโดยใช้ UPCR มีความสัมพันธ์ดี (good correlation) กับการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง [56-58] และมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าเนื่องจากไม่ขึ้นกับปริมาณปัสสาวะทำให้ไม่มีปัญหาจากความผิดพลาดในการเก็บปัสสาวะ นอกจากนี้ UPCR ยังสามารถคำนวณได้จากการเก็บปัสสาวะเพียงครั้งเดียว (spot urine) อย่างไรก็ตาม

วิธีนี้ไม่สามารถบอกปริมาณจริง (absolute value) ของโปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้ และล่าสุดมีข้อมูลการศึกษาของ Birmingham และคณะ [59] พบว่าการวัดปริมาณโปรตีนจาก spot urine (spot urine protein/creatinine ratio) มีความเชื่อถือได้ลดลงในการวินิจฉัยภาวะกำเริบซ้ำในผู้ป่วยไตอักเสบจากเอสแอลอีโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับโปรตีนในปัสสาวะอยู่ที่ระหว่าง 0.5 กรัมถึง 3 กรัม

2.2.3 การวัดปริมาณการทำงานของไต

ก. ระดับครีอะตินินในเลือด และสมการทำนาย GFR จากระดับครีอะตินินในเลือด

Pcr = [Gcr – Ecr – TScr] / GFR

โดย Pcr = ระดับครีอะตินินในเลือด
Gcr = ปริมาณการสร้างครีอะตินิน
Ecr = ปริมาณการขับและทำลายครีอะตินินทางอื่นนอกเหนือจากไต
TScr = ปริมาณการขับครีอะตินินทางท่อไต

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ระดับครีอะตินินในเลือดมีความคลาดเคลื่อน คือปริมาณการสร้างครีอะตินิน ผู้ป่วยบางรายโดยเฉพาะผู้ป่วยสูงอายุหรือน้ำหนักตัวน้อย มีปริมาณกล้ามเนื้อ (muscle mass) น้อย ทำให้มีการสร้างครีอะตินินน้อย และระดับครีอะตินินในเลือดจะต่ำกว่าที่ควรจะเป็น นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มี GFR ลดลงมาก ๆ ร่างกายจะปรับตัวโดยการเพิ่มการขับครีอะตินินทางท่อไต และเพิ่มการขับและทำลายครีอะตินินทางอื่นนอกเหนือจากไต ผู้ป่วยบางรายจึงอาจจะมีระดับครีอะตินินในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติทั้ง ๆ ที่ GFR ต่ำกว่าปกติ [60]

จากข้อจำกัดของการใช้ระดับครีอะตินินในเลือดโดยตรงในการประเมินการทำงานของไต ทำให้มีการศึกษาเพื่อพยายามสร้างสมการที่สามารถใช้ทำนาย creatinine clearance หรือ GFR จากระดับ creatinine ในเลือดได้อย่างถูกต้อง โดยคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างครีอะตินิน เช่น น้ำหนักตัว อายุ เพศ และเชื้อชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีสมการที่ใช้ในการทำนาย creatinine clearance หรือ GFR หลายสมการแต่สมการทำนาย creatinine clearance ที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด คือสมการของ Cockcroft-Gault [61] เนื่องจากสามารถจดจำได้ไม่ยากและสามารถคำนวณได้ค่อนข้างง่าย มีการศึกษาที่ทดสอบความถูกต้องของการใช้สมการนี้หลาย

การศึกษา พบว่าสมการนี้สามารถใช้ทำนาย GFR ได้อย่างถูกต้อง (โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 30) ได้ประมาณร้อยละ 50 ถึง 96 ของผู้ป่วย [62]

ส่วนสมการของ MDRDstudy ซึ่งอาศัยข้อมูลจากผู้ป่วยทั้งผิวขาวและผิวดำที่มี GFR หลากหลาย ตั้งแต่น้อยกว่า 10 จนถึงมากกว่า 90 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร (ml/min/1.73m^2) รวมกว่าหนึ่งพันคน [62] ถือเป็นสมการที่น่าเชื่อถือมากที่สุดในปัจจุบัน มีการศึกษาที่ทดสอบความถูกต้องของการใช้สมการนี้หลายการศึกษา พบว่าสมการนี้สามารถใช้ทำนาย GFR ได้อย่างถูกต้อง (โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 30) ได้ประมาณร้อยละ 84 ถึง 92 ของผู้ป่วย [61]

$$\text{MDRD GFR (ml/min/1.73m}^2\text{)} = 186.3 \times SCr^{-1.154} \times age^{-0.203} \times 0.742 \text{ (if F)} \times 1.210 \text{ (if AA)}$$

โดย F = Female

AA = African-American

แต่สมการนี้มีข้อเสียที่สำคัญคือจดจำได้ยากและไม่สามารถคำนวณด้วยเครื่องคิดเลขธรรมดาได้ ทำให้การนำสมการนี้มาใช้ในทางคลินิกจึงยังไม่แพร่หลายนัก

ข. ค่า creatinine clearance จากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

ค่า creatinine clearance สามารถหาได้จากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาระดับ creatinineในปัสสาวะพร้อมกับเจาะเลือดหาระดับครีอะตินิน แล้วนำมาคำนวนหา creatinine clearance โดยใช้สูตร

$$CrCl \text{ (ml/min)} = [\text{ Ucr (mg/dl) x V (ml/day) }] / [\text{ Pcr (mg/dl) x 1440}]$$

โดย CrCl = ค่า clearance ของครีอะตินิน หน่วยเป็น มิลลิลิตรต่อนาที (ml/min)

Ucr = ระดับครีอะตินินในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

V = ปริมาณปัสสาวะใน 24 ชั่วโมงหรือ 1 วัน หน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อวัน (ml/day)

Pcr = ระดับครีอะตินินในเลือด หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

การใช้ค่า creatinine clearance จากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ในการทำนาย GFR มีความคลาดเคลื่อนมากกว่าการใช้สมการทำนาย GFR จากระดับครีอะตินินในเลือด เนื่องจากปริมาณครีอะตินินที่ขับออกทางปัสสาวะในแต่ละวันจะมีความผันแปร (day-to-day variation) และมีความผิดพลาดในการเก็บปัสสาวะ บางครั้งอาจเก็บปัสสาวะได้ไม่ครบและบางครั้งเก็บปัสสาวะมามากเกินจริง ทำให้ปริมาณปัสสาวะที่ในการคำนวณ creatinine clearance ผิดไปจากความเป็นจริง

2.2.4 การตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยา

ปัจจุบันยังเป็น gold standard ในการบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากเอสแอลอี เนื่องจากพบว่าผู้ป่วยเพียงร้อยละ 25-50 เท่านั้นที่มีความผิดปกติของปัสสาวะหรือการทำงานของไตที่ผิดปกติในระยะแรกๆ [63] ซึ่งไม่มีความจำเพาะหรือไวพอในการวินิจฉัย นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยที่มีไตอักเสบรุนแรงบางรายที่จำเป็นต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันแบบเข้มงวดอาจไม่พบความผิดปกติของการทำงานของไต ทำให้การรักษาต่ำกว่าความรุนแรงที่เป็นจริง

มีการศึกษาพบว่าภาวะไตอักเสบ class II และ pure class V มีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า class III หรือ class IV ลักษณะทางพยาธิวิทยา เช่น การเพิ่มขึ้นหรือคงอยู่ของ subendothelial deposit พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่เพิ่มขึ้นและค่าการทำงานของไตที่แย่ลง ส่วน mesangial หรือ subepithelial deposit มีความเสี่ยงน้อยที่ทำให้ไตมีความผิดปกติ การศึกษาของ Austin และคณะ [64] พบว่า activity index (AI) และ chronicity index (CI) สามารถบอกการพยากรณ์ของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีได้ดีโดยพบว่า cellular crescents, fibrinoid necrosis และ tubular atrophy เป็นปัจจัยทางพยาธิวิทยาที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคมากที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า activity index ที่พยากรณ์โรคได้ดีที่สุดคือ cellular crescents และ chronicity index ที่พยากรณ์โรคได้ดีที่สุดคือ interstitial fibrosis นอกจากนี้การลดลงของ glomerular scarring และ interstitial fibrosis หลังการรักษายังบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ดี [65]

ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งชี้ถึงความรุนแรง (activity) และความเรื้อรัง (chronicity) ในปัจจุบันที่ได้รับความนิยมเป็นการกำหนดโดยกลุ่มของ Austin และคณะ โดยมีการให้คะแนนเพื่อประเมินความรุนแรงตามลักษณะทางพยาธิวิทยาโดยให้คะแนนสูงสุดที่ 24 คะแนนโดยให้ความสำคัญกับลักษณะพยาธิวิทยาแบบ cellular crescents, fibrinoid necrosis หรือ karyorrhexis ซึ่งมีการให้น้ำหนักคะแนนเพิ่มเป็นสองเท่า ส่วนลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บอกถึงความเรื้อรังมีการพิจารณาทั้งรอยโรคที่อยู่บริเวณ glomerulus, tubulointerstitium ซึ่งให้คะแนนสูงสุดที่ 12 คะแนน

ข้อมูลโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.3 ด้านล่าง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มี activity index สูงมีโอกาสเกิดการทำงานของไตผิดปกติและมีอัตราเสียชีวิตที่สูงกว่า [66,67]

Esdaile และคณะ [68] พบว่า ลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ class IV, activity index, vasculitis และ tubulointerstitial index มีผลต่อการพยากรณ์โรค และเช่นเดียวกับหลายการศึกษาพบว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ได้แก่ subendothelial deposit, cellular crescents

Nossent และคณะ [69] พบว่า chronicity index ที่มากกว่า 3 มีความสัมพันธ์กับการทำงานของไตและการรอดชีวิตของผู้ป่วยและยังช่วยบอกพยากรณ์โรค แต่อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อการรักษาทำให้พยาธิสภาพเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น

ตารางที่ 2.3 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงความรุนแรง (activity index) และความเรื้อรัง (chronicity index) ของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี

Activity index (lesions are scored 0–3+ with maximum score 24 points)

- Hypercullularity: endocapillary proliferation compromising glomerular capillary loops
- Leukocyte exudation: polymorphonuclear leukocytes in glomeruli
- Karyorrhexis/fibrinoid necrosis (weighted ×2): necrotizing changes in glomeruli
- Cellular crescents (weighted ×2): layers of proliferating epithelial cells and monocytes lining Bowman's capsule
- Hyaline deposits: eosinophilic and PAS-positive materials lining (wire loops) or filling (hyaline thrombi) capillary loops
- Interstitial inflammation: infiltration of leukocytes (predominantly mononuclear cells) among tubules

Chronicity index (lesions are scored 0–3+ with maximum score 12 points)

- Glomerular sclerosis: collapse and fibrosis of capillary tufts
- Fibrous crescents: layers of fibrous tissue lining Bowman's capsule
- Tubular atrophy: thickening of tubular basement membranes, tubular epithelial degeneration, with separation of residual tubules
- Interstitial fibrosis: deposition of collagenous connective tissue among tubules

ข้อมูลทางพยาธิสภาพวิทยา บ่งชี้ถึงความรุนแรงของโรค และความเรื้อรังของโรค อย่างไรก็ตามนอกจากความรุนแรงทางพยาธิวิทยาแล้ว วิธีการรักษา การตอบสนองต่อการรักษาต่างก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผู้ป่วยและต่อการทำงานของไตในระยะยาวด้วย

2.3 ความรู้เกี่ยวกับการวัด messenger RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR [70]

เป็นที่ยอมรับกันว่าเทคนิคของ RT-PCR และการวัดปริมาณยีน เป็นวิธีที่มีความไวสูง มีความถูกต้องแม่นยำสูง การวัดปริมาณ messenger RNA (mRNA) มีการยอมรับและนำมาใช้ในทางคลินิก โดยสามารถวัดจากตัวอย่าง เช่น เนื้อเยื่อไต เซลล์เม็ดเลือดขาว หรือเซลล์ในปัสสาวะ วิธีดังกล่าวได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะข้อดีในด้านที่สามารถวัดในลักษณะ non-invasive ซึ่งมีประโยชน์ทั้งด้านการวินิจฉัยโรค การบ่งถึงแนวโน้มในการตอบสนองต่อการรักษา

การวัดระดับ mRNA มีการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคไต เช่น การวัดระดับ mRNA ของไซโคคายน์ของทีเซลล์ชนิดทำลายเซลล์ (cytotoxic T cells) เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีการปฏิเสธไตในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตซึ่งมีความแม่นยำสูง การนำมาใช้ในการบ่งถึงพยากรณ์โรค เช่น การวัดระดับ mRNA ของ growth factor ต่าง ๆ ในการบอกความเสื่อมของไต ด้วยข้อจำกัดของการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาซึ่งเป็นการสุ่มตรวจในความเป็นจริงอาจไม่สามารถอนุมานลักษณะของเนื้อเยื่อทั้งหมดได้ มีการนำ mRNA มาใช้ในการประเมินการตอบสนองต่อการรักษา เช่น Muthukumar และคณะ ได้วัดปริมาณ mRNA ในปัสสาวะของผู้ป่วยเปลี่ยนไต โดยพบว่าระดับ mRNA ของ cytotoxic T cell, granzyme B, perforin และ FOXP3 มีปริมาณมากขึ้นในผู้ป่วยที่เกิดภาวะปฏิเสธไตฉับพลัน และที่น่าสนใจคือ ระดับของ mRNA ที่สูงขึ้นเกิดก่อนการตรวจพบทางคลินิก นอกจากนี้ยังสามารถบอกพยากรณ์การตอบสนองต่อยาที่ใช้รักษาการปฏิเสธไตอีกด้วยโดยการวัดระดับ mRNA ชนิด FOXP3 ในผู้ป่วยเปลี่ยนไตที่มีภาวะการปฏิเสธไตฉับพลัน พบว่าสามารถใช้ประเมินการตอบสนองต่อการได้สเตียรอยด์ได้ นอกจากนี้ยังมีการนำมาติดตามผลข้างเคียงจากการรักษาได้ เช่น การวัดปริมาณ mRNA ของ TGF- β, collagen I, III เพื่อติดตามผลข้างเคียงในการเกิดการพังผืดจากการใช้ยา calcineurin inhibitor แต่ละชนิดในผู้ป่วยเปลี่ยนไต และประโยชน์อย่างสูงสุดอาจสามารถนำมาศึกษาเพื่อบอกพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคไตบางชนิดได้

เทคนิคการวัด RNA มีหลายวิธี ได้แก่ Northern blotting, RNase protection assay, In-situ hybridization, Polymerase Chain Reaction และ gene microarray

Polymerase Chain Reaction เป็นวิธีการที่เหมาะนำมาใช้ได้ในทางคลินิก ด้วยข้อดีที่มีความไวสูง real time Polymerase Chain Reaction หรือ quantitative Polymerase Chain

Reaction ใช้ในการวัดปริมาณ DNA หรือ messenger RNA โดยใช้ลำดับของ primer ที่จำเพาะไปจับ โดยปริมาณที่เพิ่มสามารถแสดงออกได้โดยอาจใช้สารเรืองแสง (fluorescent probes) ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงให้เห็นและสามารถวัดได้ด้วยเครื่องมือ ขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาโดยหากมีปริมาณ DNA หรือ messenger RNA ที่มากจะเกิดได้เร็ว เป็นการวัดโดยใช้เวลามาคอยควบคุม แล้วนำปริมาณ DNA หรือ messenger RNA ที่วัดได้ไปเทียบกับ housekeeping gene ที่ทราบปริมาณแน่นอน วิธีการดังกล่าวสามารถวัดได้แม้ปริมาณที่ได้มาน้อยมากเช่น เพียงเซลล์เดียว ข้อแตกต่างจาก conventional Polymerase Chain Reaction คือใช้สายสั้นๆของ probes จำเพาะซึ่งเป็นข้อดีที่จะได้ความจำเพาะสูง แต่อย่างไรก็ตามการเลือก probes ต้องเลือกด้วยความระมัดระวังและต้องให้มีความจำเพาะมากที่สุดเพื่อป้องกันการวัดเจอขณะที่เกิดการปนเปื้อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 ประชากร

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยเอสแอลอีที่สงสัยว่ามีภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี

3.1.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion Criteria)

ผู้ป่วยเอสแอลอีซึ่งได้รับการวินิจฉัยเข้าได้ตามเกณฑ์ของ American College of Rheumatology ในร.พ.จุฬาลงกรณ์ ที่มีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไปโดย

1. ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางปฏิบัติการที่อาจมีการกำเริบของไตซึ่งอาจเป็นครั้งแรกหรือกำเริบซ้ำโดยต้องมีเกณฑ์สองในสามข้อคือ
   - ระดับโปรตีนในปัสสาวะมากกว่า 0.5 กรัม ต่อวัน
   - จำนวนเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะมากกว่า 5 cells / High Power Field
   - การเพิ่มขึ้นของระดับครีอะตินินในเลือดเปรียบเทียบจากระดับครีอะตินินเดิมมากกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรหรือระดับครีอะตินินในเลือดมากกว่า 1.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
2. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยภาวะการกำเริบของไตและได้รับการตรวจชิ้นเนื้อที่ไต โดยชิ้นเนื้อไตต้องมีความเพียงพอในการให้การวินิจฉัย กำหนดให้มีจำนวน glomeruli อย่างน้อย 5 glomeruli โดยได้รับการอ่านผลทางพยาธิวิทยาและประเมินระดับความกำเริบของไต (activity index) ตามกฎเกณฑ์ด้านล่างโดยพยาธิแพทย์โรคไต

ความรุนแรงทางพยาธิวิทยาประเมินจาก activity index ตาม National Institute of Health version

Glomerular abnormalities

- Cellular proliferation
- Fibrinoid necrosis/karyorrhexis
- Cellular crescents

- Hyaline thrombi , wire loops
- Leukocyte infiltration

Tubulointerstitial abnormalities

- Mononuclear cell infiltration

แต่ละข้อมีความรุนแรงระดับ 0 – 3 คะแนน โดย fibrinoid necrosis/karyorrhexis และ cellular crescents ให้ระดับความรุนแรงเพิ่มอีก 2 เท่า (0 – 6 คะแนน) ซึ่งพบว่าระดับความรุนแรงมากสุดมีค่าเท่ากับ 24 คะแนน

3.1.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

- ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ เช่นการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ รวมถึงนิ่วและอุบัติเหตุที่เกี่ยวกับระบบทางเดินปัสสาวะ
- ผู้ป่วยตั้งครรภ์

3.1.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$N = [(Z\alpha + Z\beta) / C(r)]^2 + 3$$

$$= [(1.96 + 1.28) / 0.54]^2 + 3$$

$$= 37.8$$

ดังนั้นประชากรที่นำมาศึกษาเป็น 38 คน

$Z\alpha$ = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % มีค่าเท่ากับ 1.96 (two-tailed)

$Z\beta$ = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดให้ type II error = 10% มีค่าเท่ากับ 1.28

$C(r) = 0.5 \ln \{ (1+r) / (1-r) \}$

r = 0.5 เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 mRNA กับความรุนแรงทางพยาธิวิทยาใน ภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี

3.2 การสังเกตและการวัด

3.2.1 ตัวแปรในการวิจัย

- ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ lupus nephritis แบ่งตาม International Society of Nephrology / Renal Pathology Society ปี 2003
- ระดับความรุนแรงของพยาธิวิทยาแบ่งตาม activity index ของ National Institute of Health
- ระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction
- ระดับโปรตีนในปัสสาวะ โดยวิธี 24 hour urine protein หน่วยเป็นกรัมต่อวัน หรือเก็บโดยวิธี UPCR ซึ่งเก็บspot urine เพื่อนำมาคำนวณตามสมการ [urine protein (มก./ ดล.) / urine creatinine (มก./ ดล.)]
- การวัดครีอะตินินในเลือด หน่วยเป็น มก./ ดล.

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

- การตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (record form)

3.2.3 การคำนวณ

1. การวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

ขั้นตอนการทำ

1) การสกัดแยก total RNA (RNA blood Mini kit, Qiagen, Canada)

หลักการ : สกัด total RNA โดยใช้อาศัยหลักการของ silica-gel-based membrane และขั้นตอนตามชุดสกัด RNA Blood mini kit ดังนี้

ขั้นตอน

1.เก็บเลือดตัวอย่างจากผู้ป่วยแล้วนำมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) ด้วยน้ำยา EL buffer

2.ย่อยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ด้วยสารละลาย RLT buffer และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัด genomic DNA และโปรตีน

3.นำสารละลายด้านล่างที่มี RNA ปนอยู่มาผสมด้วย 70 % เอทานอลแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงใน silica-gel-based membrane column เพื่อให้โมเลกุลของ RNA จับกับ membrane

4.ล้าง Membrane ด้วย washing buffer (RW1 และ RPE)

5.RNA ที่สกัดได้จะจับอยู่ที่ membrane แล้วจึงชะ (Elute) สารละลายของ RNA ออกจาก membrane ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNase (RNase-free water)

2) วัดปริมาณ RNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง spectrophotometer

<u>หลักการ</u> : อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดย A_{260} = 1= 40 ug/ul RNA

<u>ขั้นตอน</u>

แบ่ง RNA ตัวอย่างมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำที่ปราศจาก การปนเปื้อนของ RNase แล้ววัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณ total RNA และคุณภาพของ RNA ได้โดยใช้ค่า A260/A280 ซึ่ง RNA ที่มีคุณภาพจะต้องมีค่าสัดส่วนนี้ในช่วง 1.9-2.3

3) สร้าง complementary DNA (cDNA) โดยปฏิกิริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

<u>หลักการ</u> :ปฏิกิริยาการสร้าง cDNA จะอาศัยความสามารถของเอนไซม์reverse transcriptase (TaqMan® RT-PCR, Applied Biosystem, CA., USA.)

<u>ขั้นตอน</u>

1.คำนวณปริมาณตัวอย่าง RNA ให้ได้ 0.5 ug โดยที่ปริมาตรต้อง ไม่เกิน 11.5 ul หากปริมาตรน้อยกว่านั้นให้ปรับปริมาตรให้เป็น 11.5 ul โดยใช้น้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNase

2.เตรียม master mix ซึ่งใช้ random primer และเอนไซม์ Multiscribe® reverse transcriptase เพื่อสร้างสาย cDNA โดยใช้สาย RNA เป็นแม่แบบ เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนในขั้นต่อไป (Condition: 25°c 10 min, 48°c 30 min, 95°c 5 min)

4) วัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

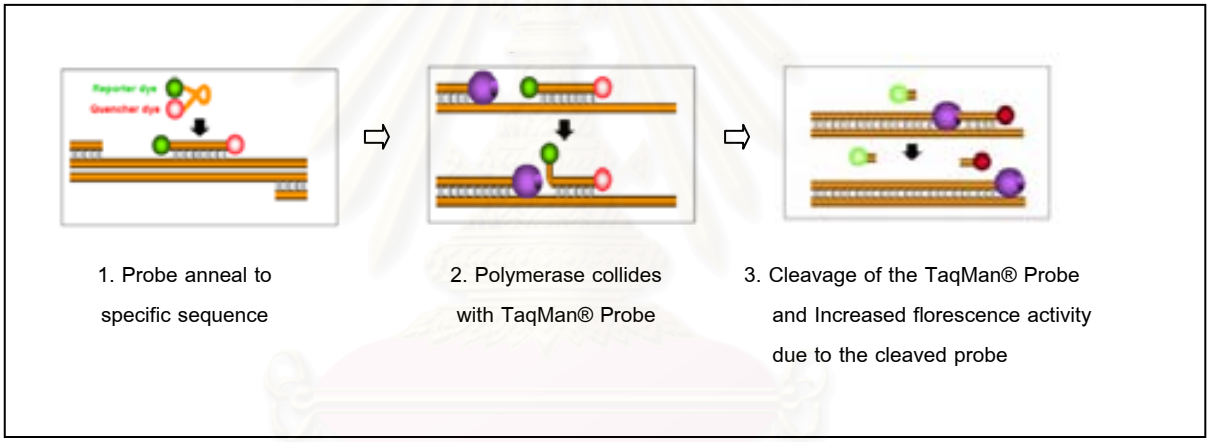
<u>หลักการ</u> : เทคนิค real-time PCR อาศัยการตรวจหาสัญญาณแสง Fluorescence จาก probe ซึ่งปริมาณสัญญาณ Fluorescence แปรผันตรงกับปริมาณ cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกริยา PCR ดังรูปที่ 3.1

ขั้นตอน

1.เตรียม PCR master mix (QuantiTech Probe PCR, Qiagen, Canada) ปริมาตรรวม 18 ul ซึ่งประกอบไปด้วย QuantiTech probe PCR 10 ul , 0.5 uM primer forward, 0.5 uM primer reverse, 0.2 uM probe และ RNase free water

2.เติม cDNA template ของแต่ละตัวอย่างลงใน PCR master mix ตัวอย่างละ 2 ul นำไปวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเครื่อง LightCycler® machine (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA) Condition: denature 95°c 0 sec, annealing/extension 60°c 1 min, 55 cycles (18s rRNA 40 cycles)

3.วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี Relative Quantification (2^{-ddCt} Method)



รูปที่ 3.1 หลักการเบื้องต้นในการทำ real-time PCR โดยใช้ TaqMan® Probe

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของ probe และ primer ที่ใช้

Gene	Sequence (location)
18srRNA	Sense: **5'**-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA-**3'** (929-948) Antisense: **5'**-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-**3'** (1009-985) Probe: **5'-FAM**-AAAGCAGGCCCGAGCCGCC-**TAMRA-3'** (965-983)
FOXP3	Sense: **5'**-GAGAAGCTGAGTGCCATGCA-**3'** (939-959) Antisense: **5'**-GGAGCCCTTGTCGGATGAT-**3'** (1025-1007) Probe: **5'-FAM**-TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG-**TAMRA 3'** (962-984)

2.ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

a. คำนวณจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยใช้สูตร

24-hr urine protein (g/day) = [Upro (mg/dl) /1000] x [V (ml/day) /100]

b. คำนวณสัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนในปัสสาวะเทียบกับระดับของcreatinine ในปัสสาวะ (UPCR) โดยใช้สูตร

UPCR = Upro (mg/dl) / Ucr (mg/dl)

3.3 สิ่งแทรกแซง

ไม่มี เนื่องจากการศึกษานี้เป็น cross-sectional descriptive study ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการวินิจฉัยพิจารณาการเจาะไตเพื่อตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและได้รับการรักษาตามเกณฑ์มาตรฐานอยู่แล้ว

3.4 การรวบรวมข้อมูล

1. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

เพศ, อายุ และขนาดยากดภูมิต้านทานที่ได้รับ

2. ข้อมูลที่ศึกษา

CBC, Cr, Urinalysis, 24 hr urine protein, UPCR, creatinine clearance, SLEDAI score, C3, C4, CH50, Anti ds-DNA, FOXP3 messenger RNA levels (log scale) และ renal biopsy indices ได้แก่

- classification IRS/RPS 2003
- activity index (NIH classification)

: endocapillary proliferation

: fibrinoid necrosis

: karyorrhexis

: cellular crescents

: hyaline thrombi

: wire loops

: tubulointerstitial leukocyte infiltration

: mononuclear cell infiltration

- chronicity index

: glomerular sclerosis

: fibrous crescents

: interstitial fibrosis

: tubular atrophy

- thrombotic microangiopathy

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์และนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยเลขคณิต ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบสมมติฐานที่ได้โดยใช้ Pearson's correlation (continuous scale), Spearman's rank correlation (ordinal scale) และ Independent T-test (normal distribution data), Mann - Whitney U test (non - normal distribution data)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษา

จากการศึกษา มีผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 39 ราย เป็นผู้ป่วยเพศหญิง 36 ราย ผู้ป่วยเพศชาย 3 ราย อายุเฉลี่ย 30.92 $\pm$ 7.29 ปี มีค่าครีอะตินินในเลือดอยู่ระหว่าง 0.43 ถึง 4.78 มก.ต่อดล. โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.15 $\pm$ 0.89 มก.ต่อดล. ประเมินการทำงานของไตด้วยวิธี MDRD GFR มีค่าเฉลี่ย 86.54 $\pm$ 43.73 มล.ต่อนาที ค่าเฉลี่ยโปรตีนในปัสสาวะ 4.03 $\pm$ 2.82 กรัมต่อวัน ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซด์ เท่ากับ 1,482.69 $\pm$ 745.37 เซลล์ต่อไมโครลิตร ประเมินความรุนแรงของโรคทางคลินิกโดย SLEDAI-2K score มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.82 $\pm$ 5.07 คะแนน และประเมินความรุนแรงของโรคด้วยผลตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ คือ anti ds-DNA พบว่าในผู้ป่วย 35 ราย มีค่าผิดปกติ 29 ราย ระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในผู้ป่วย 36 ราย มีค่าเฉลี่ย 65.66 $\pm$ 30.49 มก.ต่อดล. ระดับ C4 ในผู้ป่วย 35 ราย มีค่าเฉลี่ย 12.54 $\pm$ 6.71 มก.ต่อดล. ระดับ CH50 ในผู้ป่วย 36 ราย มีค่าเฉลี่ย 12.96 $\pm$ 9.48 unit ต่อมล. ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันก่อนการเจาะตรวจเลือดและเจาะไต โดยได้รับ prednisolone ชนิดรับประทาน จำนวน 36 ราย โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณที่ได้รับ คือ 37.22 $\pm$ 24.35 มก.ต่อวัน ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับ pulse methylprednisolone จำนวน 6 ราย ยากดภูมิอื่นที่ได้รับได้แก่ intravenous cyclophosphamide จำนวน 9 ราย mycophenolate mofetil จำนวน 6 ราย azathioprine จำนวน 1 ราย ยาอื่นที่ได้คือ ACEI (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor) หรือ ARB (Angiotensin II Receptor Blocker) จำนวน 11 ราย ข้อมูลพื้นฐานโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ตัวแปร	จำนวนผู้ป่วย	Mean ± SD
เพศ (หญิง : ชาย)	36 : 3	-
อายุ (ปี)	39	30.92 ± 7.29
ISN/RPS classification		
- Class III (A), (A/C)	13	-
-Class IV (A), (A/C)	20	-
- Class III (C) or IV (C)	3	-
- Pure Class V	3	-
ยาที่ได้รับ		
- Prednisolone (mg)	36	37.22 ± 24.35
- Cyclophosphamide (mg)	9	1,020.22 ± 524.47
- Mycophenolate mofetil (mg)	4	1,375.00 ± 250.00
- Myfortic (mg)	2	1,080.00 ± 509.12
- Azathioprine (mg)	1	50 mg
- ACEI (mg)	11	14.77 ± 13.80
- ARB (Telmisartan) (mg)	1	40 mg
Acivity score	39	6.85 ± 5.09
Chronicity score	39	2.97 ± 2.60
SLEDAI - 2K score	34	15.82 ± 5.07
SCr (mg/dl)	39	1.15 ± 0.89
MDRD GFR (ml/min)	39	86.54 ± 43.73
Proteinuria (g/d)	39	4.03 ± 2.82
C3 (mg/dl)	36	65.66 ± 30.49
C4 (mg/dl)	35	12.54 ± 6.71
CH50 (U/ml)	36	12.96 ± 9.48
Anti-ds DNA	35	262.76 ± 411.29
(positive : negative)	(29:6)	
Hb (g/dl)	39	10.99 ± 1.96
WBC (cells/ul)	39	9,888.46± 4,982.39
Absolute lymphocyte count (cells/ul)	39	1,482.69 ± 745.37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการศึกษา

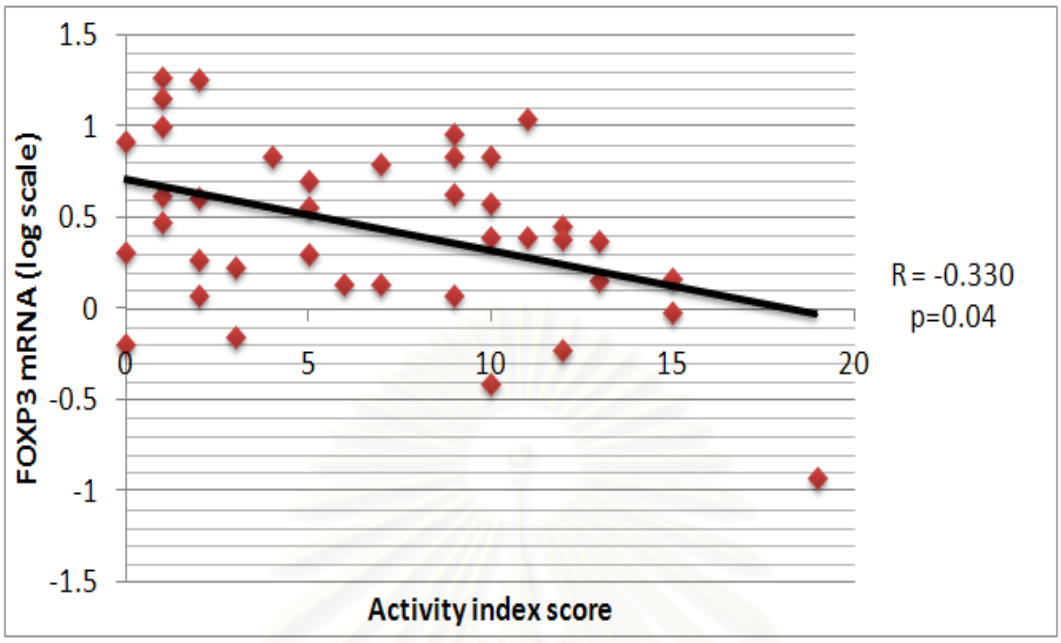
ผลทางพยาธิสภาพไตของผู้ป่วยทั้ง 39 ราย แบ่งตาม ISN/RPS classification ปี 2003 ปรากฏว่า เป็นผู้ป่วยที่มีผลเป็น proliferative nephritis ได้แก่ class III (A), (A/C) จำนวน 13 ราย, class IV (A), (A/C) จำนวน 20 ราย และ กลุ่ม non proliferative nephritis ได้แก่ pure class V จำนวน 3 ราย, sclerosing nephritis จำนวน 3 ราย

ความรุนแรงของลักษณะทางพยาธิสภาพไตประเมินโดย activity score โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 24 คะแนน ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยที่ศึกษาเท่ากับ 6.85 $\pm$ 5.09 คะแนน นอกจากนี้ยังมีลักษณะทางพยาธิสภาพเฉพาะซึ่งบ่งบอกว่าโรครุนแรงมาก ได้แก่ cellular crescents และ fibrinoid necrosis โดยจากการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่มี cellular crescents ร้อยละ 33 และ fibrinoid necrosis ร้อยละ 36

ลักษณะพยาธิสภาพที่บ่งบอกถึงความเรื้อรังประเมินโดย chronicity score โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 12 คะแนน ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยที่ศึกษาเท่ากับ 2.97 $\pm$ 2.60 คะแนน

การศึกษานี้ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดคือ ระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วย กับความรุนแรงของพยาธิสภาพไต โดยดูจาก activity index score พบว่ามีความสัมพันธ์กัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ -0.330 (P value = 0.04) แสดงดังรูปที่ 4.1

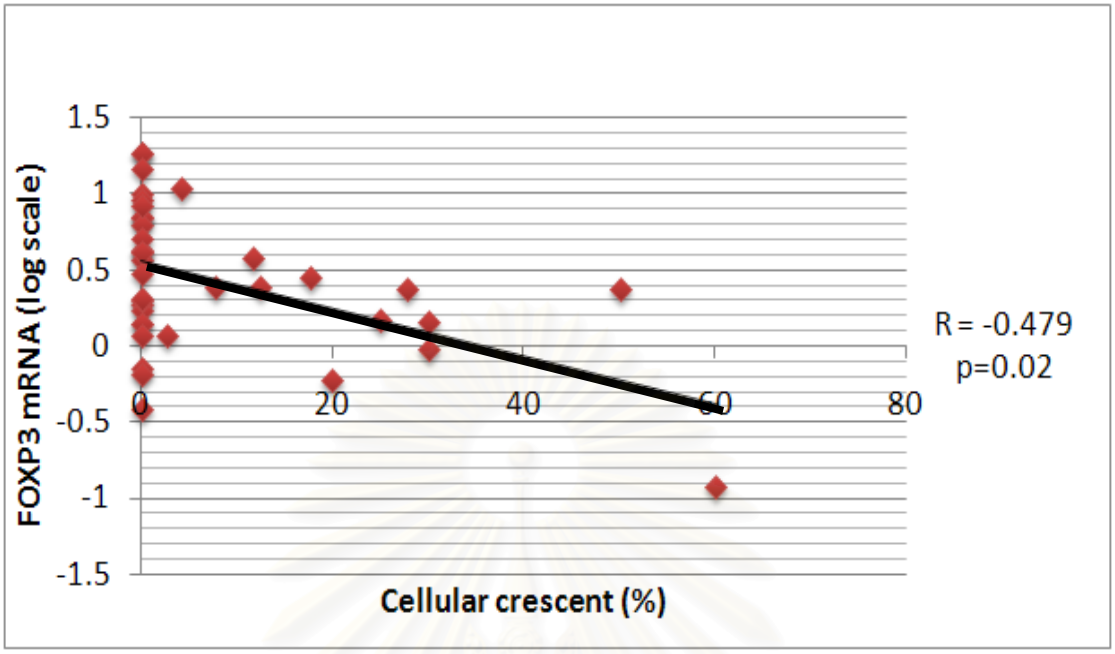
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



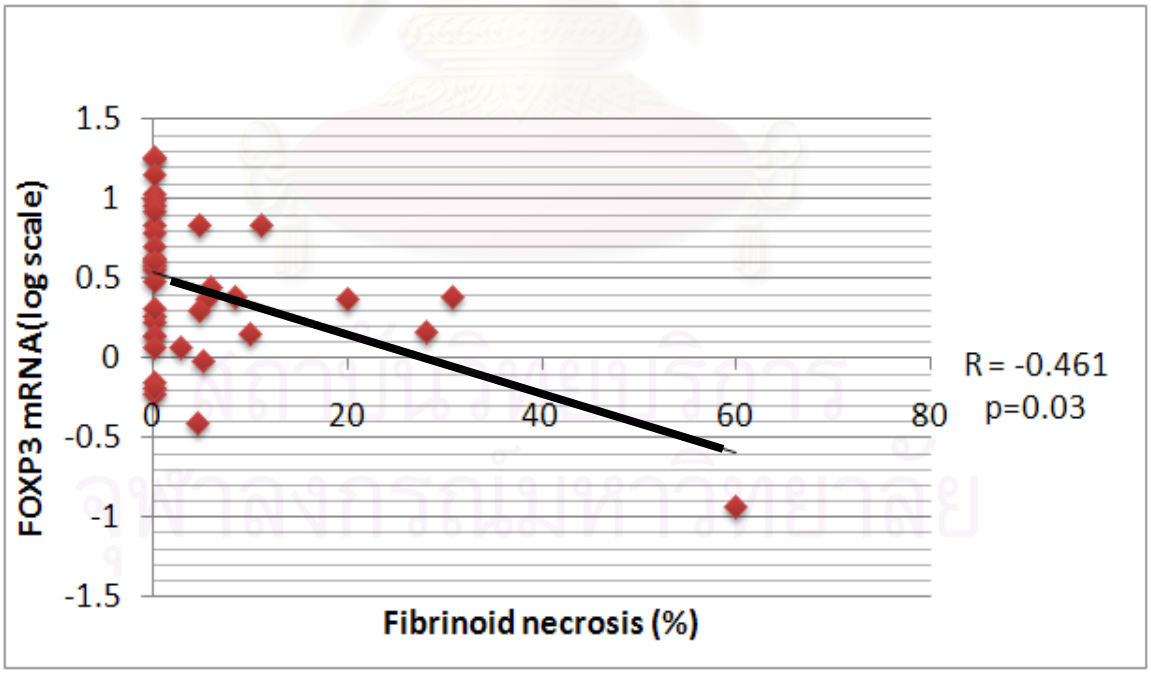
รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ activity index (Spearman's correlation : R = -0.330, P value = 0.04)

ในแง่ความรุนแรงของโรค ลักษณะทางพยาธิวิทยาเฉพาะที่บ่งบอกว่าโรคมีความรุนแรงมาก เช่น cellular crescent หรือ fibrinoid necrosis พบว่าสัมพันธ์กับระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วย โดยพบความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพชนิด cellular crescents มีค่า R เท่ากับ – 0.479 แสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.2 และมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพชนิด fibrinoid necrosis โดยมีค่า R เท่ากับ - 0.461 แสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

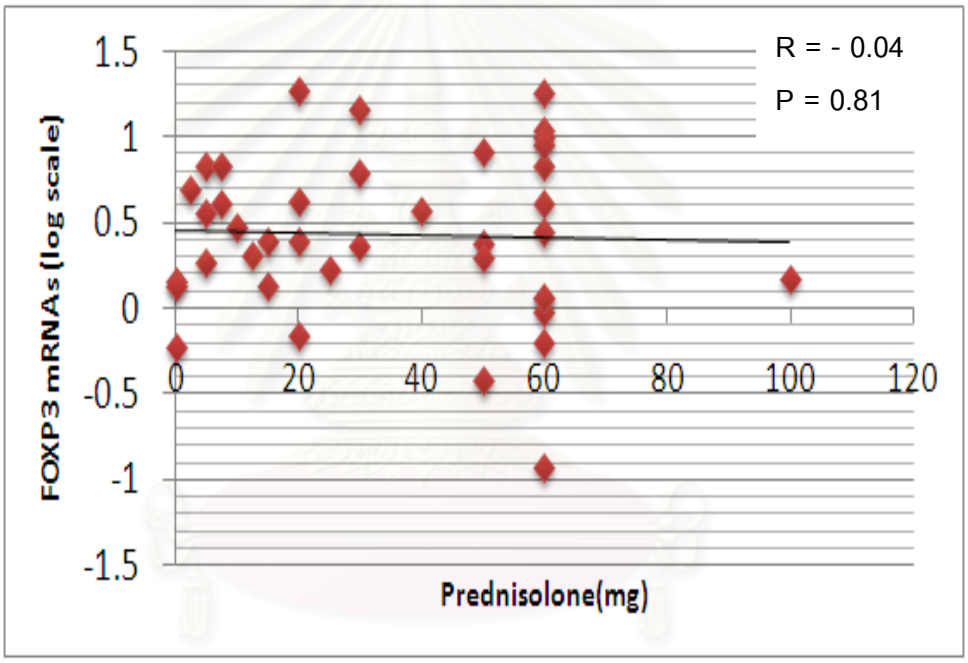


รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ cellular crescents (%)
(Pearson's correlation : R = - 0.479, P value = 0.02)



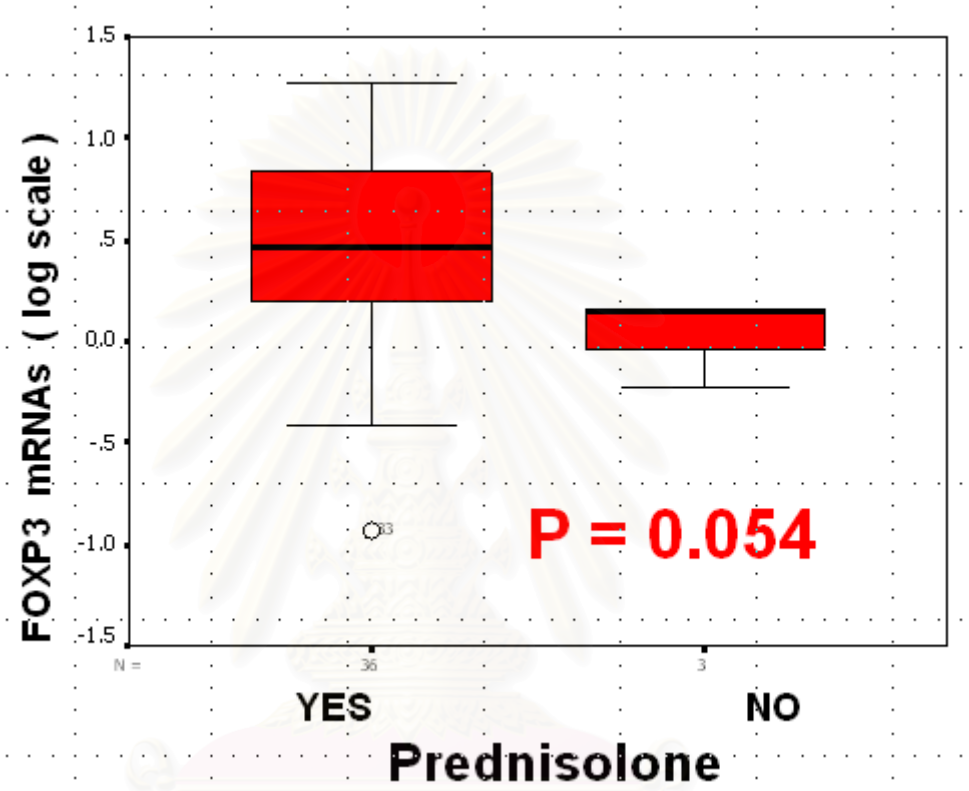
รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ fibrinoid necrosis (%)
(Pearson 's correlation : R = - 0.461, P value = 0.03)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยกับพารามิเตอร์อื่นพบว่าไม่พบความสัมพันธ์กับลักษณะทางพยาธิสภาพไตอื่นๆ เช่น chronicity index, hyaline thrombi, wire loops เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่พบความสัมพันธ์กับ prednisolone ไม่ว่าจะพิจารณาจากปริมาณที่ได้รับหรือการได้รับหรือไม่ได้รับ prednisolone แสดงดังรูปที่ 4.4, 4.5 และไม่พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันในการได้ยากดภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เช่น cyclophosphamide, mycophenolate mofetil หรือ azathioprine



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง FOXP3 mRNA (log scale) กับ prednisolone (mg) (Pearson 's correlation : R = - 0.04, P value = 0.81)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ในผู้ป่วยที่ได้รับและไม่ได้รับยา prednisolone (P value = 0.054)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

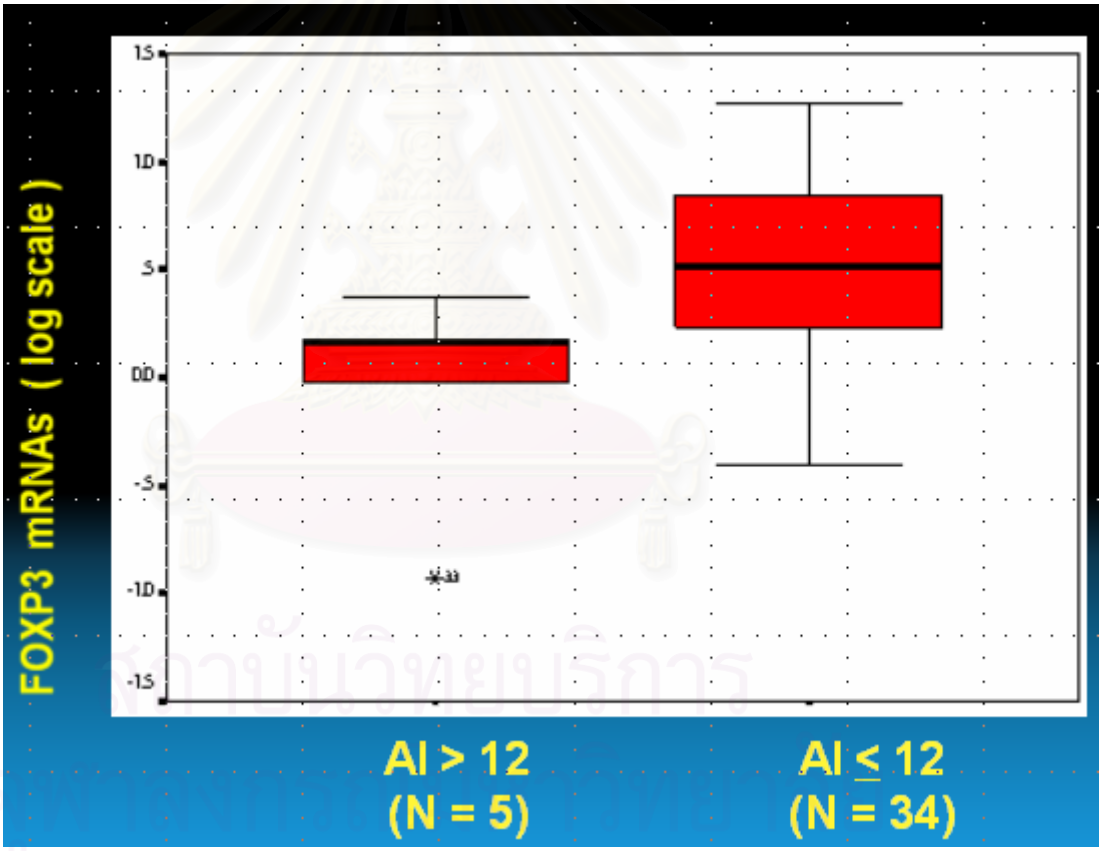
การประเมินความรุนแรงของภาวะไตอักเสบในปัจจุบันมักอาศัยตัวชี้วัดทางคลินิกต่างๆ ซึ่งการศึกษานี้ activity index มีความสัมพันธ์กับ FOXP3 mRNA ระดับ anti ds-DNA ระดับครีอะตินินในเลือด ระดับคอมพลีเมนต์ C3 และ C4 การทำงานของไตด้วยวิธี MDRD GFR ระดับโปรตีนในปัสสาวะ ระดับฮีโมโกลบิน แต่กลับไม่พบความสัมพันธ์กับ SLEDAI-2K score และตัวแปรอื่น แสดงค่าความสัมพันธ์ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆทางคลินิกกับ activity index

ตัวแปร	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	Correlation (r)	P value
Anti ds-DNA	35	0.392	0.02
SLEDAI-2K score	34	-0.143	0.42
Serum Cr	39	0.332	0.04
C3	36	-0.349	0.04
C4	35	-0.339	0.046
MDRD GFR	39	-0.323	0.045
Proteinuria	39	0.554	0.000
Hb	39	-0.446	0.004

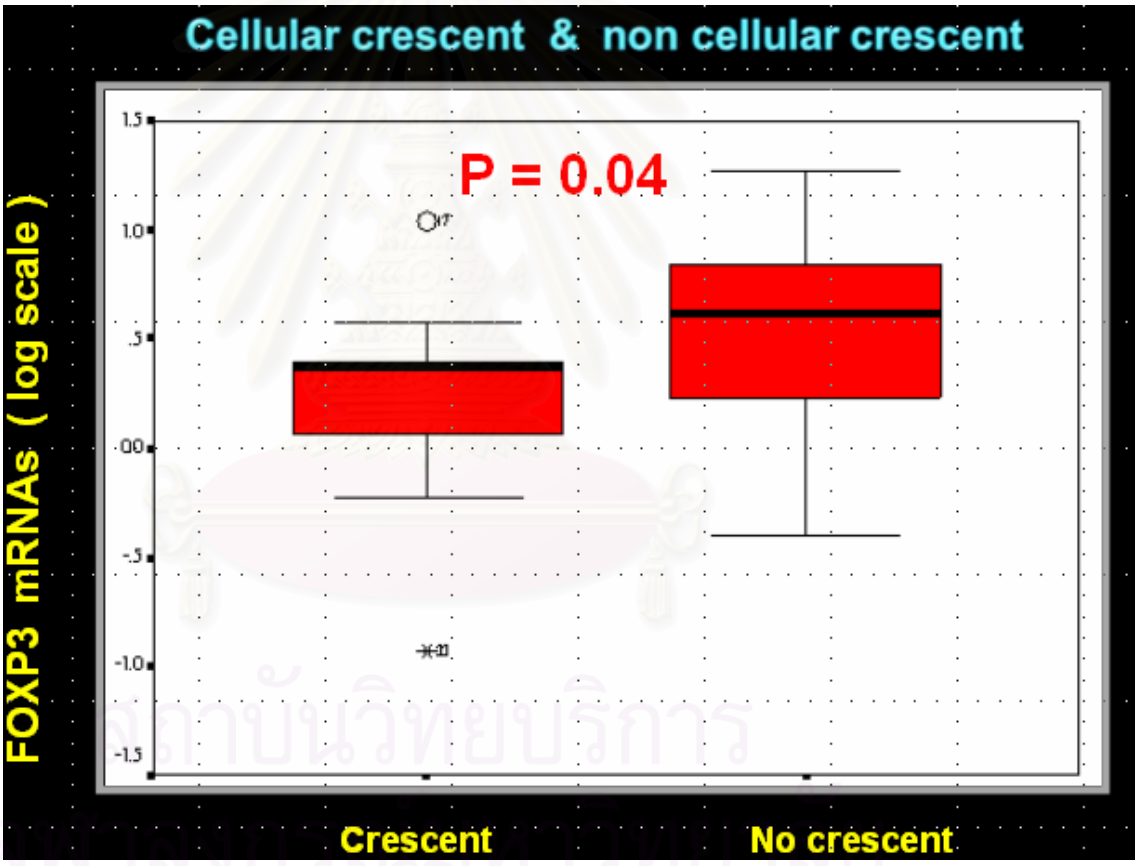
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อศึกษาเพิ่มเติมเชิงเปรียบเทียบในกลุ่มย่อย (subgroup analysis) โดยพิจารณาด้าน activity score ซึ่งก่อนหน้านี้มีการศึกษา [66] พบว่าพยาธิสภาพที่มีความรุนแรงมากจะกำหนดเมื่อมีค่า activity score มากกว่า 12 คะแนน ซึ่งการศึกษานี้พบว่าระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยที่มี activity score มากกว่า 12 ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 5 ราย มีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ -0.05 $\pm$ 0.51 และกลุ่มที่มี activity score น้อยกว่าหรือเท่ากับ 12 ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 34 ราย มีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ 0.51 $\pm$ 0.43 เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่ากลุ่มที่มีความรุนแรงมากมีระดับ FOXP3 mRNA (log scale) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.01) แสดงดังรูปที่ 4.6 ด้านล่าง



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพรุนแรงมาก (activity index >12) และกลุ่มที่มีพยาธิสภาพรุนแรงน้อยกว่า (activity index $\leq$ 12) ; (P value = 0.01)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยระหว่างผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพไตแบบ cellular crescents ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 13 รายโดยมีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ 0.22 $\pm$ 0.46 กับกลุ่มที่ไม่มี cellular crescents ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 26 ราย โดยมีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ 0.55 $\pm$ 0.45 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.04) แสดงดังรูปที่ 4.7 ด้านล่าง ในขณะที่ตัวชี้วัดอื่นๆทางคลินิกไม่พบความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกันในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ยกเว้นระดับ anti ds-DNA แสดงตารางที่ 4.3



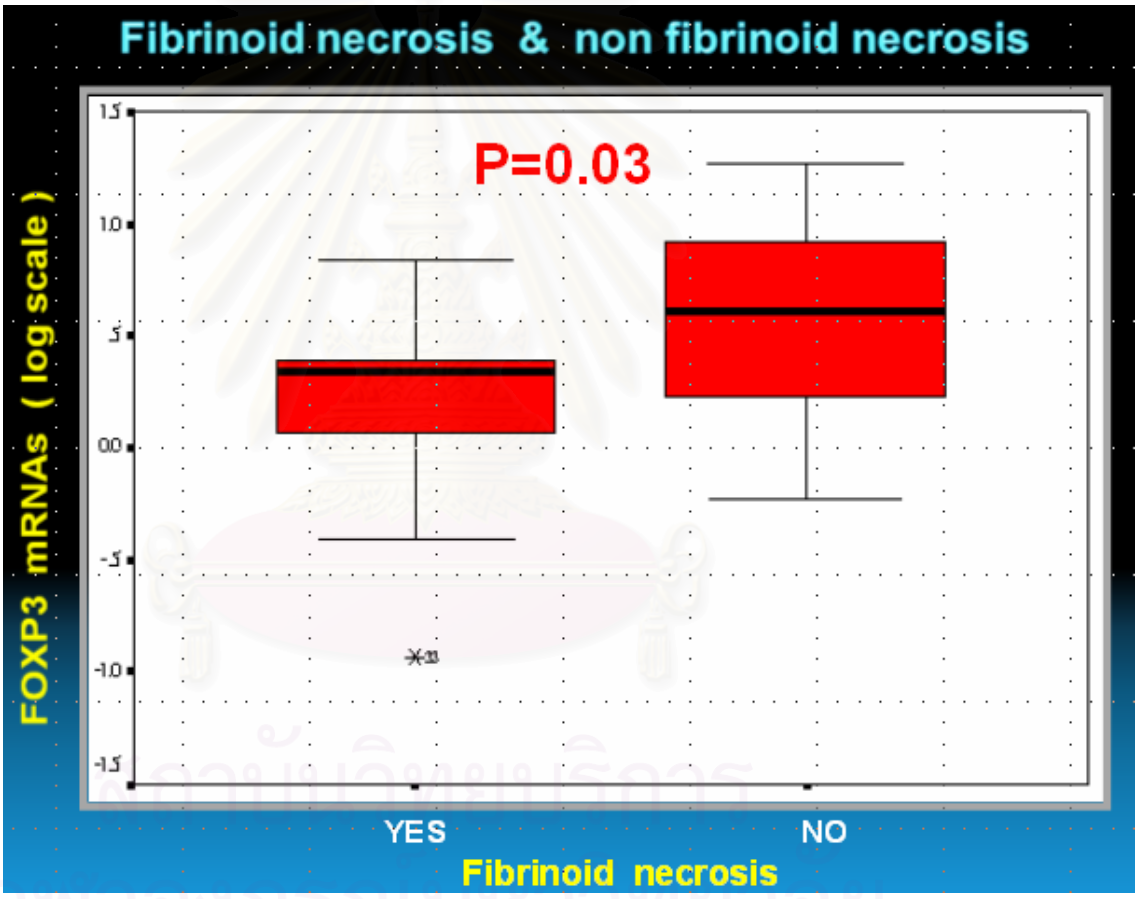
รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพ cellular crescent และกลุ่มที่ไม่มี cellular crescent (P value = 0.04)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า Mean ± SD ของตัวชี้วัดต่างๆในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรง (Cellular crescents) และ ไม่รุนแรง (No cellular crescents)

Parameters	Crescents +ve (N=13)	Crescents –ve (N=26)	P value
FOXP3 mRNA	0.2 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.04
SLEDAI-2K	15.4 ± 3.9	16.0 ± 5.7	0.99
Urine protein	4.9 ± 3.3	3.5 ± 2.5	0.06
SCr	1.1 ± 0.5	1.2 ± 1.0	0.31
MDRD GFR	78.8 ± 35.5	90.4 ± 47.5	0.44
C3	61.1 ± 29.3	68.2 ± 31.5	0.51
C4	10.5 ± 6.3	13.6 ± 6.8	0.31
CH50	12.7 ±10.1	13.1± 9.3	0.89
Anti ds-DNA	323.3 ± 398.9	192.2 ± 386.9	0.045
Absolute lymphocytes	1,340.2 ± 614.7	1,553.9 ± 804.5	0.41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเปรียบเทียบระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยระหว่างผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพไตแบบ fibrinoid necrosis ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 14 รายโดยมีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ 0.21 $\pm$ 0.46 กับกลุ่มที่ไม่มี fibrinoid necrosis ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 25 รายโดยมีค่าเฉลี่ยของ FOXP3 mRNA (log scale) เท่ากับ 0.56 $\pm$ 0.45 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.03) แสดงดังรูปที่ 4.8 ด้านล่าง ในขณะที่ตัวชี้วัดอื่นๆทางคลินิกไม่พบความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกันในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพ fibrinoid necrosis และกลุ่มที่ไม่มี fibrinoid necrosis (P value = 0.03)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า Mean ± SD ของตัวชี้วัดต่างๆในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรง (Fibrinoid necrosis) และ ไม่รุนแรง (No fibrinoid necrosis)

Parameters	Fibrinoid +ve (N=14)	Fibrinoid –ve (N=25)	P value
FOXP3 mRNA	0.2 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.03
SLEDAI-2K	14.8 ± 3.9	16.4 ± 5.7	0.37
Urine protein	4.9 ± 3.2	3.5 ± 2.5	0.06
SCr	1.0 ± 0.5	1.2 ± 1.0	0.91
MDRD GFR	87.9 ± 42.7	85.8 ± 45.1	0.89
C3	60.2 ± 28.9	69.1 ± 31.6	0.40
C4	9.4 ± 5.5	14.4 ± 6.7	0.05
CH50	11.9 ± 10.5	13.6 ± 9.0	0.61
Anti ds-DNA	290.8 ± 391.0	205.4 ± 395.6	0.051
Absolute lymphocytes	1,479.8 ± 711.9	1,553.9 ± 804.5	0.99

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยที่กำเริบ (active) ผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระยะสงบ (inactive) และคนปกติ (healthy) โดยนิยามกลุ่ม active หมายถึงกลุ่มที่มีพยาธิสภาพไตอักเสบแบบ proliferative class III (A), (A/C) หรือ IV (A), (A/C) ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 33 ราย และมีพยาธิสภาพแบบ pure class V จำนวน 3 ราย รวมจำนวนผู้ป่วยกลุ่ม active จำนวน 36 ราย กลุ่ม inactive หมายถึงผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพไตแบบ sclerosing nephritis ได้แก่ class III (C) หรือ IV (C) จำนวน 3 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาจนระดับโปรตีนในปัสสาวะลดเหลือน้อยกว่า 500 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกันอย่างน้อยสองครั้งและสามารถลดยากดภูมิได้ โดยมีการทำงานของไตอยู่ในเกณฑ์คงที่ จำนวน 5 ราย รวมจำนวนผู้ป่วยกลุ่ม inactive จำนวน 8 ราย และกลุ่มควบคุมคือคนปกติจำนวน 6 ราย เมื่อเปรียบเทียบตัวชี้วัดที่ใช้ในทางคลินิกของผู้ป่วยในกลุ่ม active และกลุ่ม inactive แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า ระดับครีอะตินินใน

เลือด การวัดการทำงานของไตด้วยวิธี MDRD GFR ระดับคอมพลีเมนต์ C3 C4 หรือ CH50 ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาระดับ FOXP3 พบว่าผู้ป่วยในกลุ่ม active มีระดับต่ำกว่าในกลุ่ม inactive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่า P value ถึง 0.001 แสดงดังรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบตัวชี้วัดทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active และ inactive

Parameter	Active (N=36)	Inactive (N)	P value
FOXP3 mRNA (log scale)	0.42 ± 0.46 *	1.09 ± 0.65 ** (8)	0.001
SCr (mg/dl)	1.17 ± 0.91	0.87 ± 0.4 (8)	0.40
MDRD GFR(ml /min)	85.02 ± 42.92	98.02 ± 32.66 (8)	0.43
Proteinuria (g/d)	4.19 ± 2.85	0.9 ± 1.21 (8)	0.000
C3 (mg/dl)	63.66 ± 30.09	89.97 ± 19.92 (3)	0.15
C4 (mg/dl)	11.88 ± 6.17	20.6 ± 7.6 (3)	0.10
CH50 (U/ml)	12.49 ± 9.55	21.0 ± 0.17 (3)	0.07
Anti ds-DNA	255.93 ± 403.45	47.48 ± 37.78 (4)	0.67

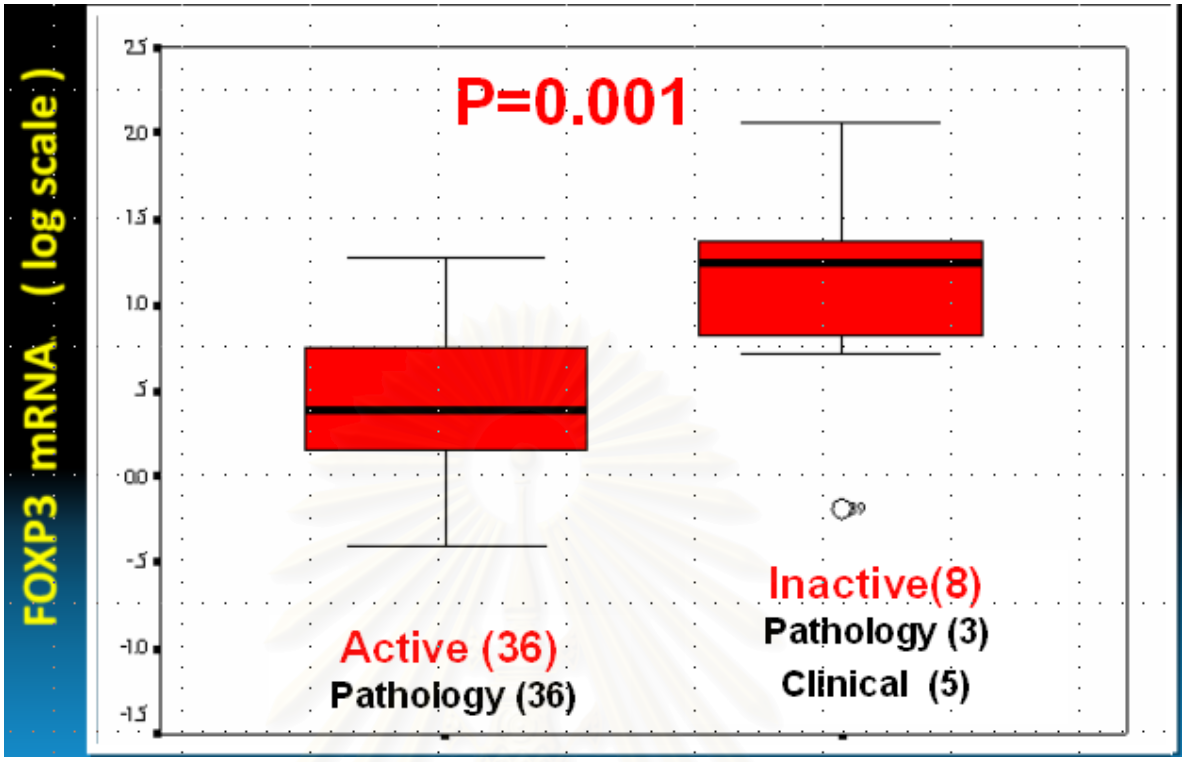
P value (Active vs Inactive)

Healthy control ; FOXP3 (log scale) = 0.00± 0.32 (N=6)

* P value เทียบกับ healthy control = 0.004

** P value เทียบกับ healthy control = 0.003

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

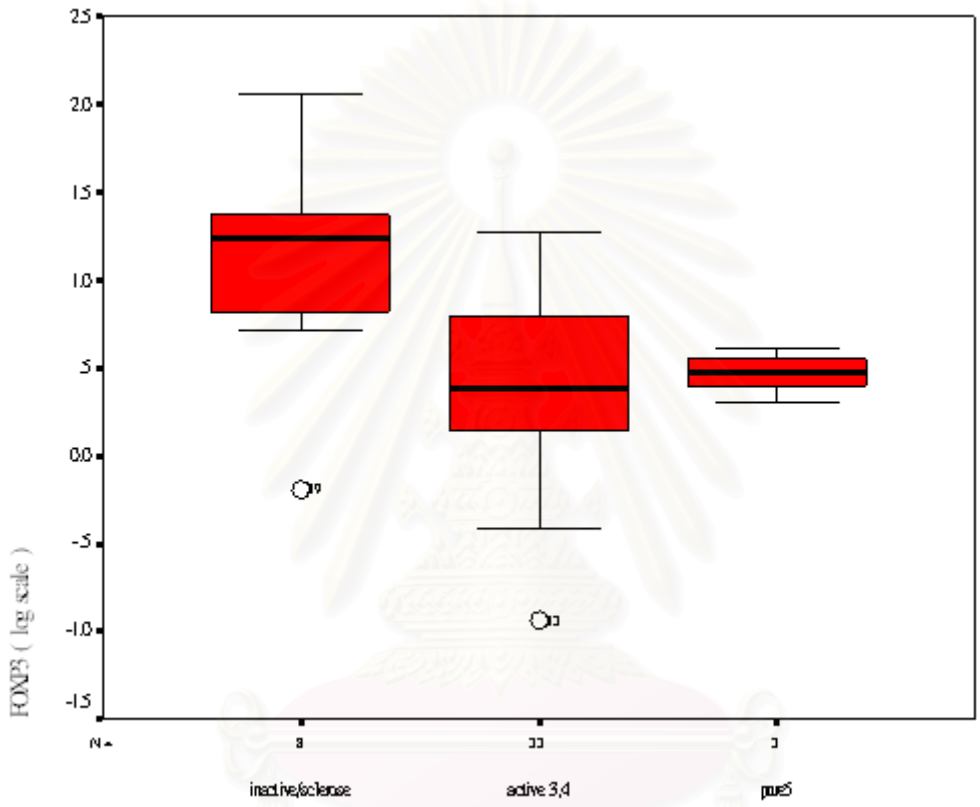


รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active (N=36) และ inactive (N=8) ; P value = 0.001

จากการศึกษานี้พบว่ากลุ่มควบคุม คือคนปกติ จำนวน 6 ราย มีระดับ FOXP3 mRNA ที่ต่ำกว่ากลุ่มที่เป็นโรคทั้งกลุ่ม active และ inactive แสดงในตารางที่ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

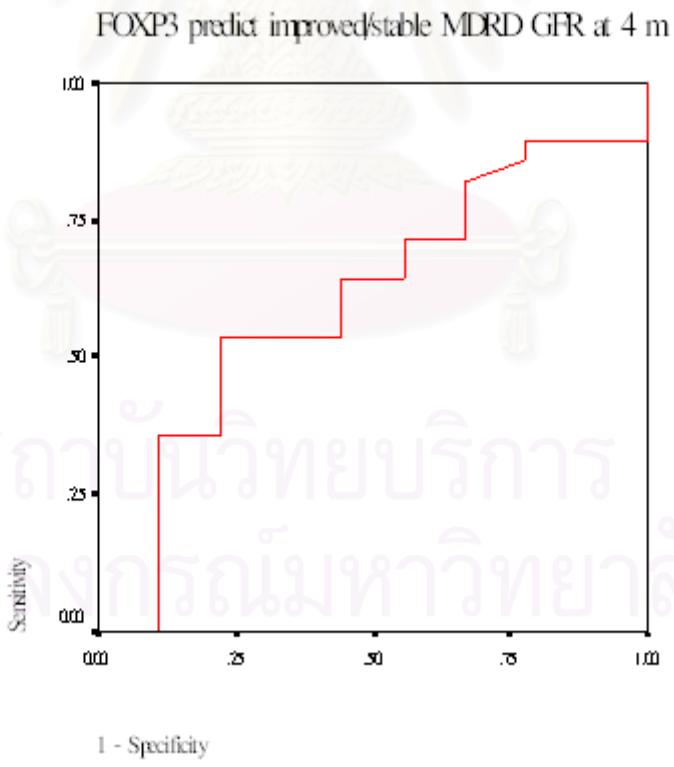
ในผู้ป่วยกลุ่ม active ทั้งหมด 36 ราย เมื่อพิจารณาระดับ FOXP3 mRNA แบ่งตามลักษณะพยาธิวิทยาของไตในกลุ่ม proliferative nephritis ชนิด class III (A), (A/C) หรือ IV (A), (A/C) และในกลุ่ม non proliferative nephritis ชนิด pure class V ไม่พบความแตกต่างของระดับ FOXP3 ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม แสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบระดับ FOXP3 (log scale) ในผู้ป่วยกลุ่ม inactive (N=8) และกลุ่ม active ชนิด class III (A) หรือ IV (A); (N=33) และ pure class V; (N=3)

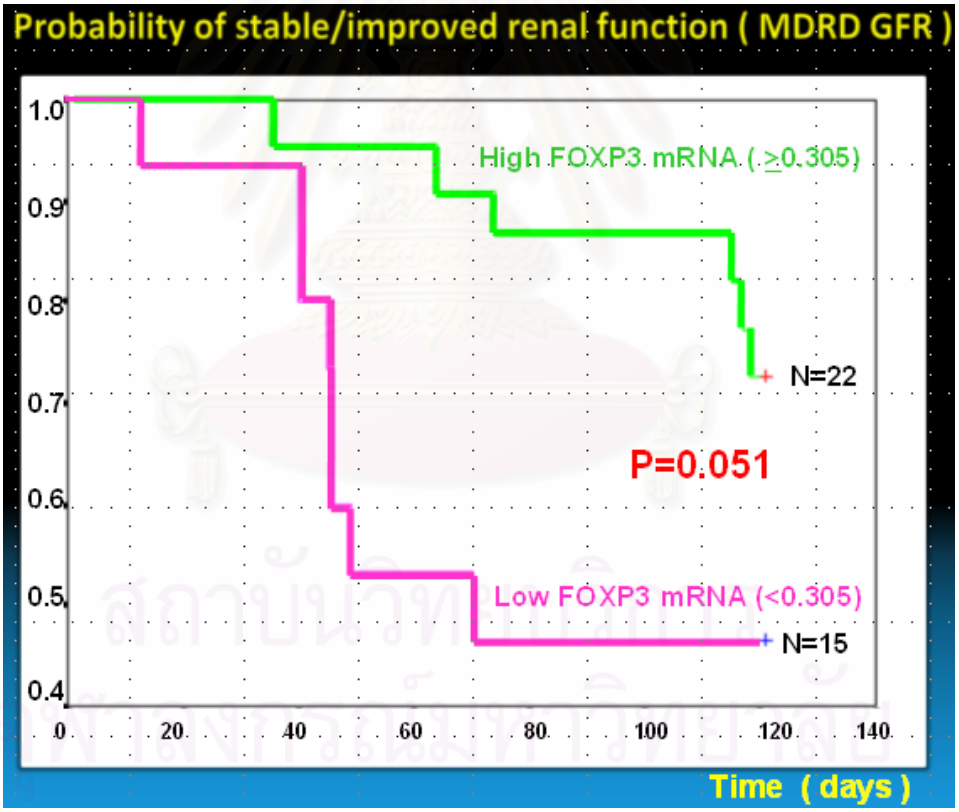
- inactive vs active class III (A) หรือ IV (A) ; P value = 0.002
- inactive vs active pure class V ; P value = 0.145
- active class III (A) หรือ IV (A) vs pure class V ; P value 0.858

ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่ได้รับการติดตามการรักษาเป็นระยะเวลานาน 4 เดือนหลังจากระยะเวลาเริ่มวิจัย และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า MDRD GFR ที่ 4 เดือนเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MDRD GFR ช่วงต้น (Δ MDRD GFR) มีความสัมพันธ์กับระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วย ณ ช่วงเวลาที่เจาะไต ดังนั้นเมื่อนำระดับ FOXP3 mRNA ช่วงเวลาที่เจาะไตมาพยากรณ์ผลการทำงานของไต (MDRD GFR) ที่ 4 เดือน โดยแบ่งผลการทำงานของไตที่ 4 เดือน เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการทำงานของไตคงที่หรือดีขึ้น หมายถึง กลุ่มที่มีค่า MDRD GFR ที่ 4 เดือนคงที่หรือมากขึ้นเมื่อเทียบกับ MDRD GFR ที่ช่วงเวลาเจาะไต และกลุ่มที่มีการทำงานของไตแย่ลงหมายถึงกลุ่มที่มีค่า MDRD GFR ที่ 4 เดือนน้อยลงเมื่อเทียบกับ MDRD GFR ที่ช่วงเวลาเจาะไต โดยมีผู้ป่วยที่ติดตามการรักษาจำนวน 37 ราย เป็นกลุ่มที่มีการทำงานของไตดีขึ้นหรือคงที่จำนวน 28 ราย โดยส่วนใหญ่มีค่าการทำงานที่ดีขึ้นเฉลี่ยที่ 26 มล.ต่อนาที และกลุ่มที่มีการทำงานของไตแย่ลงจำนวน 9 ราย โดยส่วนใหญ่มีค่าการทำงานที่แย่ลงโดยเฉลี่ยที่ 22 มล.ต่อนาที ได้ ROC curve แสดงดังรูปที่ 4.11 ด้านล่าง



รูปที่ 4.11 ROC curve ของระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่เจาะไตในการพยากรณ์การทำงานของไต MDRD GFR ที่ 4 เดือน

จาก ROC curve ข้างต้น นำมากำหนดค่า cut off ของระดับ messenger RNA ชนิด FOXP3 ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่เจาะไต โดยผู้ป่วยที่มีระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.305 เป็นกลุ่มที่มีระดับ FOXP3 ที่สูงมีจำนวน 22 ราย และผู้ป่วยที่มีระดับ FOXP3 mRNA (log scale) ที่น้อยกว่า 0.305 เป็นกลุ่มที่มีระดับ FOXP3 ที่ต่ำมีจำนวน 15 ราย ค่า cut off ดังกล่าวจะมีความไวประมาณร้อยละ 64 และความจำเพาะประมาณร้อยละ 56 ซึ่งเมื่อนำมาพยากรณ์การคงที่หรือดีขึ้นของการทำงานของไตที่ 4 เดือนพบว่ามีค่า positive predictive value ร้อยละ 82 และมีค่า negative predictive value ร้อยละ 33 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ survival analysis พบว่ากลุ่มที่ระดับ FOXP3 สูง ณ ช่วงเจาะไตมีแนวโน้มที่จะมีการคงที่หรือดีขึ้นของ MDRD GFR ที่ 4 เดือน มากกว่ากลุ่มที่ FOXP3 ต่ำ (P value = 0.051) แสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 survival analysis ในการพยากรณ์โอกาสการเกิด stable/improved MDRD GFR ที่ 4 เดือน จำแนกตาม FOXP3 (log scale) สูง (≥0.305) และ FOXP3 (log scale) ต่ำ (< 0.305); P value = 0.051

ข้อมูลจากรูปที่ 4.12 เมื่อพิจารณาตัวแปรพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มก่อนทำการรักษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันตามนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น anti ds-DNA ซึ่งกลับพบว่ามีระดับที่ต่ำกว่าในกลุ่ม low FOXP3 mRNA แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยกลุ่ม high FOXP3 mRNA และ low FOXP3 mRNA

Parameters	High FOXP3 (mean ± SD)	Low FOXP3 (mean ± SD)	P value
FOXP3 mRNA (log scale)	0.69 ± 0.27	-0.03 ± 0.32	**0.000**
Activity index	6.14 ± 4.66	8.07 ± 5.76	0.27
Chronicity index	2.41 ± 2.02	3.80 ± 3.32	0.30
Cellular crescents (%)	5.98 ± 12.28	11.18 ± 18.04	0.44
Fibrinoid necrosis (%)	3.93 ± 7.83	7.68 ± 16.22	0.51
SLEDAI-2K	15.57 ± 5.37	16.42 ± 4.89	0.52
SCr (mg/dl)	1.16 ± 0.93	1.07 ± 0.79	0.80
Proteinuria (g/d)	3.65 ± 3.14	4.31 ± 2.31	0.24
C3 (mg/dl)	71.69 ± 34.07	55.47 ± 22.95	0.13
C4 (mg/dl)	12.46 ± 6.61	12.26 ± 7.18	0.88
CH50 (U/ml)	12.97 ± 10.91	12.37 ± 7.35	0.86
Anti ds-DNA	316.66 ± 410.54	126.13 ± 349.43	**0.02**
MDRD GFR (ml/min)	87.28 ± 43.39	88.50 ± 45.02	0.93
Prednisolone (mg)	29.77 ± 21.44	37.67 ± 30.46	0.61
Cyclophosphamide (mg)	272.72 ± 550.70	146.67 ± 403.32	0.35
Absolute lymphocytes (cells/ul)	1,590.10 ± 825.27	1,404.53 ± 636.59	0.47

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่า ระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี โดยเทคนิค real-time polymerase chain reaction มีความสัมพันธ์แปรผกผันกับความรุนแรงทางพยาธิวิทยาของไตวัดโดย activity index score และยังพบความสัมพันธ์แปรผกผันกับลักษณะทางพยาธิสภาพชนิด fibrinoid necrosis และ cellular crescents ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกว่าโรคมีความรุนแรงมาก โดยในผู้ป่วยที่มี activity index score สูงกว่า มีปริมาณ fibrinoid necrosis มากกว่า หรือมีปริมาณ cellular crescents มากกว่าจะมีระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดต่ำ ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีความรุนแรงน้อยกว่าจะมีค่า FOXP3 messenger RNA ในเลือดสูงกว่า

การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการได้รับยาสเตียรอยด์กับระดับ FOXP3 messenger RNA ไม่ว่าจะเป็นการได้รับหรือไม่ได้รับยา หรือปริมาณยาที่ผู้ป่วยได้รับ

5.2 อภิปรายผล

ภาวะไตอักเสบจากเอสแอลอีมีความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกัน การดูแลรักษาจึงต้องปรับให้เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย การวินิจฉัยภาวะไตอักเสบและประเมินความรุนแรงโดยอาศัยอาการแสดงออกทางคลินิก และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น การประเมินด้วย clinical activity score ได้แก่ SLEDAI-2K score ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ระดับครีอะตินินในเลือด ระดับคอมพลีเมนต์ เป็นต้น ยังไม่มีความไวหรือมีความจำเพาะพอ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการเจาะชิ้นเนื้อไตเพื่อตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นเครื่องมือมาตรฐานหลักในการวินิจฉัยหรือการประเมินความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากเอสแอลอีได้แม่นยำที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังถือว่าเป็นเทคนิคที่ invasive และมีข้อจำกัดในผู้ป่วยบางราย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะหาตัวชี้วัดเพื่อบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบด้วยเทคนิคที่ไม่เจ็บตัวและปลอดภัย (non-invasive)

การศึกษานี้ได้อาศัยบทบาทของ regulatory T cells ในการควบคุมภาวะ self tolerance โดยมีสมมติฐานว่าการเกิดโรคเอสแอลอี เกิดจากการสูญเสียการควบคุมดังกล่าวเป็นเหตุให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันผิดปกติที่มีผลทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของตนเอง และมีข้อมูลว่า FOXP3 เป็น transcription factor ที่จำเพาะที่สุดของ regulatory T cells และมีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของ regulatory T cells ให้เป็นไปโดยปกติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาดูความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดของผู้ป่วยกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยไตอักเสบลูปุส

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วย และแสดงการเปรียบเทียบให้เห็นว่ากลุ่มที่มีความรุนแรงมากและกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยมีระดับ FOXP3 messenger RNA ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีความรุนแรงมาก ได้แก่ ผู้ป่วยที่มี activity index score สูง ผู้ป่วยที่มี cellular crescents และ fibrinoid necrosis มีระดับ FOXP3 messenger RNA ต่ำ ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีความรุนแรงน้อยมีระดับ FOXP3 messenger RNA สูง ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานว่าความผิดปกติของ regulatory T cells ซึ่งเกิดจากการลดลงของ FOXP3 transcription factor ทำให้ร่างกายสูญเสียภาวะ self tolerance จึงเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันผิดปกติมาทำลายเนื้อเยื่อไตของตนเองจึงทำให้เกิดภาวะไตอักเสบในที่สุด โดยในกลุ่มที่รุนแรงไม่มากหรือกลุ่มที่ไม่มีภาวะไตอักเสบอาจยังมีปริมาณของ FOXP3 transcription factor ที่พอเพียงอยู่

ข้อเด่นชัดของ FOXP3 messenger RNA ในการศึกษานี้คือมีการเปรียบเทียบกับความรุนแรงทางพยาธิสภาพไตซึ่งเป็นเกณฑ์การวินิจฉัยมาตรฐานในการบอกความรุนแรงของผู้ป่วยไตอักเสบจากเอสแอลอีโดยต่างจากการศึกษาอื่นที่มักใช้อาการทางคลินิก เช่น clinical activity score มาประเมินซึ่งอาจไม่มีความไวหรือความจำเพาะเท่าที่ควรและเมื่อเปรียบเทียบ FOXP3 messenger RNA กับตัวชี้วัดในทางคลินิกอื่นๆ พบว่านอกจากจะมีความสัมพันธ์กับ activity index score แล้วยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพยาธิสภาพเฉพาะที่บ่งว่าโรคมีความรุนแรงมากคือ cellular crescents และ fibrinoid necrosis ซึ่งแพทย์อาจพิจารณาให้การรักษาที่หนักหน่วงขึ้น โดยพบว่า FOXP3 messenger RNA ในผู้ป่วยที่รุนแรงมากมีระดับที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ตัวชี้วัดอื่นๆ ที่มักใช้ในทางคลินิกกลับไม่พบความแตกต่างกัน

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยติดตามการทำงานของไตที่ระยะเวลา 4 เดือนในผู้ป่วยจำนวน 37 ราย ที่ได้รับการรักษาตามวิธีมาตรฐาน พบว่า FOXP3 messenger RNA ในเลือดของผู้ป่วย ณ ช่วงเวลาตั้งต้นมีแนวโน้มที่พยากรณ์ผลการทำงานของไตหลังการรักษาได้ โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ FOXP3 messenger RNA ที่ต่ำมีแนวโน้มเกิดการเสื่อมลงของการทำงานของไตวัด

โดยวิธี MDRD GFR มากกว่ากลุ่มที่มี FOXP3 messenger RNA สูง ซึ่งหากพิจารณาจากข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มตามตารางที่ 4.6 พบว่าแม้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีแนวโน้มว่ากลุ่มที่มีระดับ FOXP3 messenger RNA ต่ำจะมีความรุนแรงมากกว่า นอกจากนี้ถึงแม้ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยยามาตรฐานหลักเดียวกัน แต่ผู้ป่วยอาจได้รับการปรับขนาดยากดภูมิที่ไม่เท่าเทียมกัน ซึ่งอาจมีผลต่อการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นจากข้อมูลที่ศึกษาอาจเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ความเป็นไปได้ในการใช้ FOXP3 messenger RNA เพื่อการพยากรณ์โรคหรือการทำงานของไต โดยการติดตามตรวจในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้น หรือติดตามในผู้ป่วยคนเดียวกันเป็นระยะๆ และอาจต้องมีการกำหนดแนวทางการศึกษาในผู้ป่วยที่มีปัจจัยพื้นฐานและได้รับการรักษาปรับยากดภูมิที่ใกล้เคียงกัน

การศึกษาวัดระดับ FOXP3 messenger RNA โดยเทคนิค real-time PCR ในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีมีรายงานไว้เพียงการศึกษาเดียวคือการศึกษาของ Sfikakisและคณะ [45] โดยศึกษาในผู้ป่วยไตอักเสบที่ได้รับการรักษาด้วยยา rituximab เจ็ดราย ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่มีไตอักเสบมีระดับ FOXP3 messenger RNA ที่ต่ำ เมื่อติดตามหลังการรักษาด้วยยาrituximab พบว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา โรคอยู่ในระยะสงบมีระดับ FOXP3 messenger RNA ที่สูงขึ้น แต่การศึกษาดังกล่าวมีจำนวนผู้ป่วยน้อยและไม่ได้เปรียบเทียบความรุนแรงของภาวะไตอักเสบด้วยผลทางพยาธิวิทยา ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในจำนวนผู้ป่วยที่มากขึ้นโดยแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของระดับ FOXP3 messenger RNA ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงแตกต่างกันและมีการเปรียบเทียบกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตซึ่งเป็นการวินิจฉัยมาตรฐานและพบว่ามีความจำเพาะมากกว่าตัวชี้วัดอื่น เช่น anti ds-DNA หรือระดับโปรตีนในปัสสาวะซึ่งผิดปกติได้ในผู้ป่วยที่มีลักษณะพยาธิสภาพไตแบบ sclerosing nephritis ซึ่งแพทย์ควรให้การรักษาแบบประคับประคอง

เป็นที่น่าสังเกตจากการศึกษานี้ว่าระดับ FOXP3 messenger RNA ในกลุ่มควบคุมคือคนปกติกลับพบระดับที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่เป็นโรค ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาอื่น ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากในผู้ป่วยที่เป็นโรค ร่างกายอาจมีกลไกบางอย่างที่กระตุ้นให้เกิดการ up regulate ของ FOXP3 messenger RNA เพื่อคอยควบคุมโรค โดยในกลุ่มรอยโรคที่ไตอยู่ในระยะสงบแล้วเป็นกลุ่มที่สามารถ up regulate ได้ดี ส่วนในกลุ่มที่ไตอักเสบอยู่ไม่สามารถ up regulate ได้เพียงพอ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อระดับ FOXP3 messenger RNA ได้แก่ ยาสเตียรอยด์ โดยก่อนหน้านี้มีการศึกษาว่ายาสเตียรอยด์มีผลทำให้ระดับ FOXP3 ในเลือดสูงขึ้น แต่การศึกษานี้พบว่าการได้ยาสเตียรอยด์ไม่มีผลต่อระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดไม่ว่า

จะเป็นปริมาณยาที่ได้รับหรือการได้หรือไม่ได้ยา ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นเพื่อสรุปผลของปัจจัยดังกล่าว

การศึกษานี้เป็นการวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือด ซึ่ง FOXP3 เป็น transcription factor ของ regulatory T cells ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ชนิดหนึ่งซึ่งปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์อาจมีผลต่อปริมาณของระดับ FOXP3 messenger RNA แต่จากการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับ FOXP3 messenger RNA กับปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาไม่ได้มีผู้ป่วยที่มีปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่ต่ำมาก และไม่พบความแตกต่างกันของระดับเม็ดเลือดขาวดังกล่าวเมื่อศึกษาวิเคราะห์แยกกลุ่ม (subgroup analysis)

ผู้ป่วยเอสแอลอีเป็นผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน มีความเสี่ยงในการติดเชื้อง่าย ซึ่งบางครั้งอาการทางคลินิกอาจแยกออกจากผู้ป่วยที่มีอาการอักเสบจากโรคได้ยาก มีรายงานการศึกษาพบว่าภาวะติดเชื้อต่างๆ เช่น ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซี มาลาเรีย เชื้อไวรัส เชื้อปาราสิต อาจส่งผลให้ระดับ FOXP3 messenger RNA เพิ่มขึ้น ดังนั้นอาจต้องเพิ่มความระมัดระวังในการแปลผล แต่อย่างไรก็ตามหากระดับ FOXP3 messenger RNA ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำอาจอนุมานได้ว่าโรคมีความรุนแรงจริง

จากผลการวิจัยสรุปให้เห็นความน่าสนใจของ FOXP3 messenger RNA ที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพไต และสนับสนุนสมมติฐานของ FOXP3 messenger RNA ซึ่งเป็น transcription factor ที่จำเพาะมากของ regulatory T cells ในการควบคุมความรุนแรงของโรค มีการศึกษาการวัด regulatory T cells ด้วยเทคนิค flow cytometry โดยตรง แต่ในแง่การนำไปใช้ทางคลินิกพบว่าเทคนิค flow cytometry มีข้อด้อยกว่าคือต้องใช้ปริมาณเลือดที่มากกว่า ขั้นตอนการทำต้องอาศัยความชำนาญสูงในการคัดแยกชนิดเซลล์ที่แสดงออก CD4+CD25 high ในขณะที่การวัด FOXP3 messenger RNA ด้วยเทคนิค real-time PCR เป็นการบ่งบอกถึงการทำงานของ regulatory T cells ที่มีความจำเพาะ ใช้ระยะเวลาในการวัดและใช้ต้นทุนน้อยกว่าหากมีแนวโน้มในการนำไปใช้ทางคลินิกในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะ

การนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (Implication for practice)

ถึงแม้การศึกษานี้ทำในกลุ่มประชากรไม่มากนัก แต่ผลการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ของ ระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดที่สามารถนำมาเป็นตัวชี้วัดเพื่อบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่เจ็บตัวและมีความปลอดภัย (non- invasive) เมื่อเทียบกับการเจาะไตตรวจทางพยาธิวิทยา สามารถตรวจได้บ่อยในช่วงติดตามการรักษา ดังนั้นในอนาคตอาจนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกเพื่อประเมินความรุนแรงของโรค โดยนำมาประกอบการพิจารณาการรักษาในผู้ป่วยแต่ละราย ใช้ติดตามการเกิดภาวะไตอักเสบก่อนที่จะมีอาการแสดงทางคลินิกหรือแม้กระทั่งเพื่อพยากรณ์ผลการรักษาในอนาคตได้

การนำไปใช้ในเชิงงานวิจัยในอนาคต (Implication for further research)

Biomarker ในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบันเพื่อลดข้อจำกัดในการตัดชิ้นเนื้อไตมาตรวจ มีผู้ศึกษาถึง biomarker ต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็นจากในเลือดในปัสสาวะหรือในชิ้นเนื้อไต เช่นเดียวกับผู้วิจัยที่ได้ศึกษาโดยวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในเลือดของผู้ป่วยเพื่อบอกความรุนแรงของพยาธิสภาพไต ถึงแม้ข้อมูลการศึกษานี้เป็นแบบ cross-sectional study แต่ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า FOXP3 messenger RNA ในเลือดอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในอนาคตในการประเมินภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีได้และเป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติมโดยตรวจวัดติดตามดูความสัมพันธ์ของตัวชี้วัดดังกล่าวกับอาการทางคลินิก การตอบสนองต่อการรักษา หรือการวินิจฉัยภาวะการกำเริบซ้ำในผู้ป่วยที่ติดตามการรักษาในทางเวชปฏิบัติ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองสุ่มวัดระดับ FOXP3 messenger RNA ในปัสสาวะของผู้ป่วยด้วย ผลเบื้องต้นพบว่าระดับ FOXP3 messenger RNA ในปัสสาวะของผู้ป่วยมีระดับต่ำมากไม่ว่าผู้ป่วยจะมีลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบใดก็ตาม ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษา [31] พบว่าการลดลงของปริมาณ regulatory T cells และ FOXP3 messenger RNA เป็นการลดลงจริงโดยไม่ได้เกิดจากสะสมอยู่ที่อวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง เช่น ต่อมน้ำเหลือง หรือไตและพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการอักเสบของอวัยวะอื่นโดยที่ไม่มีการอักเสบที่ไตก็พบระดับของ regulatory T cells ต่ำเช่นเดียวกัน แต่ในผู้ป่วยบางกลุ่มเช่น ผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายไตแล้วเกิดภาวะปฏิเสธไตสามารถพบระดับ FOXP3 messenger RNA ในปัสสาวะได้ ดังนั้นเพื่อความเป็นไปได้ในการนำ FOXP3 messenger RNA มาเป็น biomarker ในผู้ป่วยไตอักเสบจากเอสแอลอีได้อย่างมีประสิทธิผลอาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยกลุ่มใหญ่ขึ้น และติดตามวัดระดับในผู้ป่วยแต่ละรายเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

รายการอ้างอิง

[1] Oelke K, Richardson B. Pathogenesis of lupus. Arthritis Rheum 2002;47:343–5.

[2] Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2004 ;30(3):529-5.

[3] Herrmann M, Winkler T, Gaipl U, Lorenz H, Geiler T, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Int Arch Allergy Immunol 2000;123(1):28-35.

[4] Berden JH, Grootscholten C, Jurgen WC, van der Vlag J. Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect ? J Nephrol 2002;15 Suppl 6:S1-10.

[5] Van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CG, van den Born J, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. Nephrol Dial Transplant 1997;12(1):57-66.

[6] Su W, Madaio MP. Recent advances in the pathogenesis of lupus nephritis: autoantibodies and B cells. Semin Nephrol 2003;23(6):564-8.

[7] Waters ST, McDuffie M, Bagavant H, Deshmukh US, Gaskin F, Jiang C, et al. Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosome, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. J Exp Med 2004;19;199(2).

[8] Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. Immunology 1971;21(6): 903-14.

[9] Sercarz E, Krzych U. The distinctive specificity of antigen-specific suppressor T cells. Immunol Today 1991;12(4):111-8.

[10] Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+. Int Immunol 1998;10(6):775 – 83.

[11] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995;155(3):1151-64.

[12] Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. Nature Immunol 2003;4(4):350-4.

[13] Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. J Exp Med 1999;190(6):815-26.

[14] Backlund J, Carlsen S, Hoger T, Holm B, Fugger L, Kihlberg J, et al. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263- 270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(15):9960-5.

[15] Goodnow CC. Pathways for self-tolerance and the treatment of autoimmune diseases. Lancet 2001;357(9274):2115-21.

[16] Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor cells. Immunol Rev 2001;182:58 - 67.

[17] Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nature Immunol 2001;2(9):816-22.

[18] Ha TY, Waksman BH, Treffers HP. The thymic suppressor cell: I. Separation of subpopulations with suppressor activity. J Exp Med 1974;139(1):13-23.

[19] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 2005;6(4):345-52.

[20] Shevach EM. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. Arthritis Rheum 2004;50(9):2721-4.

[21] Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. Immunol Rev 2001;182:68-79.

[22] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001;182:207-14.

[23] Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. Nat Rev Immunol 2007;7(4):305-10.

[24] Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. Eur J Immunol 2007;37(1):129-38.

[25] Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. Blood 2006; 108(5):1571-9.

[26] Li B, Saouaf SJ, Samanta A, Shen Y, Hancock WW, Greene MI. Biochemistry and therapeutic implications of mechanisms involved in FOXP3 activity in immune suppression.Curr Opin Immunol 2007;19(5):583-8.

[27] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001;27(1):20-1.

[28] Hsu WT, Suen JL, Chiang BL. The role of CD4CD25 T cells in autoantibody production in murine lupus. Clin Exp Immunol 2006;145(3):513-9.

[29] Bagavant H, Tung KS. Failure of CD25+ T cells from lupus-prone mice to suppress lupus glomerulonephritis and sialoadenitis. J Immunol 2005;175(2) :944-50.

[30] Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT, Chiang BL. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. Immunology 2006;117 (2):280-6.

[31] Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. J Immunol 2005;175(12):8392-400.

[32] Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca- Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun 2006;27(2):110-8.

[33] Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun 2003;21:273–6.

[34] Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased $CD4^-$ $CD25^-$ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol 2004;59: 198–202.

[35] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25− naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003;198(12):1875-86.

[36] Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(13):4572-7.

[37] Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. J Immunol 2004;172(2):834-42.

[38] Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. J Exp Med 2005;201(7):1061-7.

[39] Vigna-Perez M, Hernández-Castro B, Paredes-Saharopulos O, Portales-Pérez D, Baranda L, Abud-Mendoza, et al. Clinical and immunological effects of rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. Arthritis Res Ther 2006;8(3):R83.

[40] Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+CD4+ T cell receptors. Immunity 2004 ;21(2):267-77.

[41] Fields ML, Hindowicz BD, Wharton GN, Adair BS, Metzgar MH, Alexander ST, et al. The regulation and activation of lupus associated B cells. ImmunolRev 2005 ;204:165–83.

[42] Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. Eur J Immunol 2004;34(3):859-69.

[43] Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Rückert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. J Allergy Clin Immunol 2004;114(6):1425-33.

[44] Suárez A, López P, Gómez J, Gutiérrez C. Enrichment of CD4+ CD25 high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. Ann Rheum Dis 2006;65(11):1512-7.

[45] Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. Clin Immunol 2007;123(1):66-73.

[46] Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. Kidney Int 2004; 65(2):521-30.

[47] Moroni G, Quaglini S, Maccario M, Banfi G, Ponticelli C. "Nephritic flares" are predictors of bad long-term renal outcome in lupus nephritis. Kidney Int 1996;50 (6):2047-53.

[48] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum 1992;35(6):630-40.

[49] Uribe AG, Vilá LM, McGwin G Jr, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2004;31(10):1934-40.

[50] Ibañez D, Gladman D, Urowitz M. Summarizing disease features over time: II. Variability measures of SLEDAI-2K. J Rheumatol 2007;34(2):336-40.

[51] Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. Best Pract Res Clin Rheumatol 2005;19(5):685-708.

[52] Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2001;44(10):2342-9.

[53] Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2001;44(10):2350-7.

[54] Remuzzi G, Chiurchiu C, Ruggenenti P. Proteinuria predicting outcome in renal disease: nondiabetic nephropathies (REIN). Kidney Int Suppl 2004;(92):S90-6.

[55] Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. N Engl J Med 1983;309(25):1543-6.

[56] Schwab SJ, Christensen RL, Dougherty K, Klahr S. Quantitation of proteinuria by the use of protein-to-creatinine ratios in single urine samples. Arch Intern Med 1987;147(5) :943-4.

[57] Rodby RA, Rohde RD, Sharon Z, Pohl MA, Bain RP, Lewis EJ. The urine protein to creatinine ratio as a predictor of 24-hour urine protein excretion in type 1 diabetic patients with nephropathy. The Collaborative Study Group. Am J Kidney Dis 1995;26(6):904-9.

[58] Perrone RD, Steinman TI, Beck GJ, Skibinski CI, Royal HD, Lawlor M, et al. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency:simultaneous comparison of 125I-iothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTc-DTPA, and inulin.The Modification of Diet in Renal Disease Study. Am J Kidney Dis 1990;16(3):224-35.

[59] Birmingham DJ, Rovin BH, Shidham G, Nagaraja HN, Zou X, Bissell M, et al. Spot urine protein/creatinine ratios are unreliable estimates of 24 h proteinuria in most systemic lupus erythematosus nephritis flares. Kidney Int 2007;72(7):865-70.

[60] Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16(1):31-41.

[61] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis 2002;39 (2 Suppl 1):S1-266.

[62] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999;130(6):461-70.

[63] Contreras G, Pardo V, Cely C, Borja E, Hurtado A, De La Cuesta C, et al. Factors associated with poor outcomes in patients with lupus nephritis. Lupus 2005;14 (11):890-5.

[64] Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis:identification of specific pathologic features affecting renal outcome. Kidney Int 1984;25:689-95.

[65] Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Thervet E, Vrtovsnik F, Rémy P, et al. Outcome of relapse in lupus nephritis: roles of reversal of renal fibrosis and response of inflammation to therapy. Kidney Int 2002; 61:2176-86.

[66] Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. Am J Med 1983;75(3):382-91.

[67] Austin HA 3rd, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: contributions of clinical and histologic data. Kidney Int 1994;45(2):544-50.

[68] Esdaile JM, Levinton C, Federgreen W, Hayslett JP, Kashgarian M. The clinical and renal biopsy predictors of long-term outcome in lupus nephritis: a study of 87 patients and review of the literature. Q J Med 1989;72(269):779.

[69] Nossent HC, Henzen-Logmans SC, Vroom TM, Berden JH, Swaak TJ.Contribution of renal biopsy data in predicting outcome in lupus nephritis. Analysis of 116 patients. Arthritis Rheum 1990;33(7):970-7.

[70] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 2000;25(2):169 -93.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูล คำชี้แจง และหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟ็อกพีทรีในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยเอสแอลอี

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟ็อกพีทรีในเลือดกับความรุนแรงของพยาธิสภาพไตในผู้ป่วยเอสแอลอี

1. คำชี้แจงเกี่ยวกับโครงการวิจัย

โรคเอสแอลอีเป็นโรคทางภูมิคุ้มกันที่พบบ่อยในทางคลินิก ภาวะไตอักเสบจากโรคดังกล่าวมีความรุนแรงในระดับที่แตกต่างกัน บางครั้งพบว่าลักษณะทางคลินิกไม่ไปด้วยกันกับพยาธิสภาพความรุนแรงที่ไต จึงจำเป็นต้องมีการตรวจด้วยวิธีจำเพาะคือการเจาะไตมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยความรุนแรง ประเมินการรักษา การเจาะไตเป็นหัตถการที่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยบางราย เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกง่าย ภาวะความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้ และมีความเป็นไปได้ยากในการใช้การเจาะไตเพื่อติดตามการรักษา ปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางอณูชีวโมเลกุล คณะผู้วิจัยมีความต้องการจะพัฒนาการตรวจเซลล์ในเลือด โดยใช้การแสดงออกของ RNA เพื่อบอกการกำเริบของภาวะไตอักเสบจากโรคเอสแอลอี ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย ติดตามผลการรักษา บอกพยากรณ์โรคในผู้ป่วยเอสแอลอี ทดแทนการตรวจชิ้นเนื้อไตในอนาคตได้

2. คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน วิธีการ ผลข้างเคียง และการปฏิบัติตัวก่อนและหลังเข้าร่วมโครงการวิจัย

ผู้ป่วยทุกรายที่สามารถเข้าร่วมโครงการเป็นผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับการเจาะไตและเจาะเลือดตรวจเพื่อการวินิจฉัยอยู่แล้ว โดยการขอตัวอย่างเลือดเพิ่ม ณ ช่วงเวลาก่อนการเจาะไตเพื่อประเมินความสัมพันธ์กับการกำเริบของภาวะไตอักเสบ

อนึ่งการวิจัยนี้ไม่มีผลกระทบต่อการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาและไม่มีผลเสียต่อตัวผู้ป่วย

3. ประโยชน์ที่ท่านจะได้รับจากการเข้าร่วมโครงการวิจัย

ผู้ป่วยจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากผลการวิจัย การรักษาผู้ป่วยเป็นไปตามผลการตรวจทางพยาธิวิทยาและตามมาตรฐานการการดูแลผู้ป่วย อย่างไรก็ตามผลการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีในอนาคต

4. คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของผู้ป่วย

ข้อมูลอาการของผู้ป่วยจะได้รับการรวบรวมเพื่อใช้ในการวิจัย ข้อมูลทุกอย่างจะถูกเก็บเป็นความลับ และผู้ป่วยจะไม่เสียค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการวิจัยแต่อย่างใด นอกจากนี้ผู้ป่วยมีสิทธิที่จะปฏิเสธการเข้าร่วมการวิจัย โดยยังมีสิทธิที่จะได้รับการดูแลจากแพทย์ได้ตามปกติ หากท่านมีปัญหาหรือข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัย พ.ญ.อภิรดี ทองบุญ หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-2564251 ต่อ 202 หรือ 086-7229722 ซึ่งยินดีจะให้คำตอบแก่ท่านทุกเมื่อ ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำยินยอมเข้าร่วมโครงการของผู้ป่วย

ข้าพเจ้าได้อ่านและทำความเข้าใจในข้อความทั้งหมดของคำชี้แจงการเข้าร่วมโครงการการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ ชนิดฟ็อกพีทรีในเลือดกับการกำเริบของไตในผู้ป่วยเอสแอลอี โดยครบถ้วนดีแล้ว ทั้งนี้ ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมการวิจัยด้วยความสมัครใจ โดยไม่มีการบังคับหรือให้อามิสสินจ้างใดๆ

วันที่ .....

ชื่อผู้ป่วย .....

(……..)

ชื่อพยาน .....

(……..)

แพทย์ผู้ทำการวิจัย .....

(……..)

ในกรณีที่ผู้ป่วยยังไม่บรรลุนิติภาวะ

ข้าพเจ้าเป็นบิดา/มารดาของผู้ป่วยยินยอมให้บุตรของข้าพเจ้าเข้าร่วมการวิจัยดังกล่าวด้วยความสมัครใจ โดยไม่มีการบังคับหรือให้อามิสสินจ้างใดๆ

วันที่ .....

.....

(……..)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อภิรดี ทองบุญ จบการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีพุทธศักราช 2543

เข้าทำงานในตำแหน่งนายแพทย์ที่โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี และโรงพยาบาลบ้านนาเดิม จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างปีพุทธศักราช 2543-2546

เข้าฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างปีพุทธศักราช 2546-2549 และได้รับวุฒิบัตรสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป

ปัจจุบันเป็นแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2549 จนถึงปัจจุบัน

ผลงานทางวิชาการ

1. Thongboon A, Rojnuckarin P, Akkawat B, Intragumtornchai T. Thrombophilia profile in Thai patients with arterial thrombotic disorders. J Med Assoc Thai 2006;89(suppl3):S150-4.

2. Thongboon A, Katavetin P, Eiam-Ong S. Renal Replacement Therapy in Diabetic End Stage Renal Disease In: Clinical Dialysis. Eiam-Ong, editor. Text and Journal Publication Co., Bangkok 2007: 1199-1224.

รางวัลที่ได้รับ

รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยดีเด่นลำดับที่ 1 ประเภท Basic science จากการประกวดผลงานวิจัยแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไตปี 2551 จัดโดยสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย