ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์โพโดไซท์ในปัสสาวะกับการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

นางสาวนัฏนรี คำเกษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREDICTIVE VALUE OF URINARY PODOCYTE AND PODOCYTE MARKERS ON STEROID RESPONSIVENESS IN NAÏVE NEPHROTIC SYNDROME

Miss Nutnaree Kamgate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์โพโดไซท์ในปัสสาวะกับการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

โดย นางสาวนัฏนรี คำเกษ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ กวิรัช ตันติวงษ์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(พันเอก นายแพทย์ อุปถัมภ์ ศุภสินธุ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นัฏนรี คำเกษ : ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์โพโดไซท์ในปัสสาวะกับการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก. (PREDICTIVE VALUE OF URINARY PODOCYTE AND PODOCYTE MARKERS ON STEROID RESPONSIVENESS IN NAÏVE NEPHROTIC SYNDROME) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, 137 หน้า.

ความเป็นมา แนวทางการรักษาภาวะไตอักเสบเบื้องต้นในผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกกำหนดให้รักษาด้วยยาสเตียรอยด์ขนาดสูงซึ่งก่อให้เกิดผลเสียแก่ผู้ป่วยมากมาย ทั้งนี้มีผู้ป่วยบางรายเท่านั้นที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว แต่ก็พบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ดื้อต่อยาสเตียรอยด์ในปัจจุบันเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นหากสามารถค้นพบวิธีทำนายการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ได้ตั้งแต่ระยะแรกก็จะสามารถลดจำนวนผู้ป่วยที่ไม่จำเป็นต้องรับยาได้

วิธีการศึกษา ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกจำนวน 20 ราย ตัวอย่างควบคุม 14 ราย โดยแบ่งการศึกษาวิจัยทั้งสิ้น 3 การทดสอบ ได้แก่ การตรวจนับเซลล์ด้วยการทำปฏิกิริยากับ anti-podocalyxin, alpha-smooth muscle actin, และ vascular growth factor (VEGF) จากนั้นตรวจนับด้วยวิธีโฟล ไซโตเมทรี การตรวจระดับวาสคูลาร์ เอ็นโดทีเลียล โกรทแฟกเตอร์ในระดับปัสสาวะ และการศึกษาการแสดงออกของ VEGF ในตะกอนปัสสาวะและชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี real time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดจะนำมาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับผลการตรวจทางคลินิก

ผลการศึกษา จำนวนเซลล์โพโดไซท์และการแสดงออกของ VEGF ทั้งที่ตรวจวัดได้ในปัสสาวะ และการแสดงออกของ VEGF ในตะกอนปัสสาวะและชิ้นเนื้อไตสามารถแบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟติกออกจากคนปกติได้อย่างชัดเจน และมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกันแต่ไม่พบว่ามีระดับการแสดงออกดังกล่าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป จำนวนเซลล์โพโดไซท์และการแสดงออกของ VEGF สามารถใช้แบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกได้ และมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้เพื่อทำนายโอกาสของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ออกจากกันได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต นัฏนรี คำเกษ

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ...

5074867430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS : PODOCYTE CELLS / STEROID RESPONSIVENESS / STEROID RESISTANCE / NEPHROTIC SYMDROME

NUTNAREE KAMGATE : PREDICTIVE VALUE OF URINARY PODOCYTE AND PODOCYTE MARKERS ON STEROID RESPONSIVENESS IN NAÏVE NEPHROTIC SYNDROME. ADVISOR: ASSOC PROF TALERNGSAK KANJANABUCH, M.D., 137 pp.

Introduction and Objective: The first drug to choose in treatment of patients with nephrotic syndrome is corticosteroid. However, the treatment causes various side effects and introduces remission of disease in an only half of the patients. We therefore investigated the role of podocyturia as a predictive marker for steroid responsiveness in naïve nephrotic syndrome.

Methods: Fresh first void morning urine from 20 NS and 14 healthy volunteers were collected. The sediments were stained with multiple antibodies to podocalyxin, alpha-smooth muscle actin, and vascular growth factor (VEGF). The stained cells were assessed by flow cytometer. Creatinine clearance, spotted urinary protein, spotted urinary creatinine and urinary cytokines (VEGF) were simultaneously assessed. And urinary sediment were evaluated excretion of VEGF in NS patients.

Results: Urinary podocytes in NS group measured were 0.46, 0.65 (0.00-3.91; Range) cell/ml x mg Cr and significantly higher compared with control group. Positive podocytes with VEGF staining and SMA staining were increase in steroid resistant compared to steroid-responsive NS patients. The podocyte number correlated well with severity of the disease. In healthy control subjects, urinary VEGF excretion was 8.83, 9.60 (3.71-16.22; Range) pg/ml x mg Cr and NS patients excreted 93.58, 173.72 (3.14-1,270.42; Range) pg/ml x mg Cr which was higher VEGF mRNA expression than normal subjects.

Conclusion: Numbers of positive podocytes with VEGF staining and SMA staining and total podocytes might be a reliable marker of steroid responsiveness in NS. Further investigation in clinical practice is required to confirm this ability.

Field of Study : Medical Science .... Student's Signature Nutnaree Kamgate

Academic Year : 2010 .... Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ขอขอบคุณความช่วยเหลือ คำแนะนำและคำปรึกษาอันมีประโยชน์มีคุณค่ายิ่ง

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักประสานงานโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF-Master Research Grants) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรวบรวมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งหมด ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่ แพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน โดยเฉพาะคณาจารย์สังกัดคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัยจนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญามหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณนายปรีชา เรืองเวชวรชัย นางสาวจุฑามาศ วงศ์ภูมิ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์วิจัยโรคไตและความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางจุติพร ไทยยืนวงษ์ นางมารศรี พันธ์ไพศาล นางสาวพรทิพย์สวรรค์ นวลทอง นางสาวสิริกุล กาญจนบุษย์ นางสาวรัชยา สวัสดี นางสาววิไลพร อำพรรณ นายวศิน มนูประเสริฐ นางสาวขวัญตา เพชรเผือก นางสาวมัตติกา เกรียวกระโทก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งข้อมูลความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ อันมีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว “คำเกษ” ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ.. ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง.. ญ

สารบัญภาพ.. ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.. ฒ

บทที่ 1 บทนำ.. 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา.. 1

คำถามงานวิจัย.. 4

วัตถุประสงค์งานวิจัย.. 5

สมมติฐานการวิจัย.. 5

ขอบเขตของงานวิจัย.. 5

ข้อตกลงเบื้องต้น.. 6

ข้อจำกัดของงานวิจัย.. 6

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.. 6

คำสำคัญ.. 7

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 7

วิธีดำเนินการวิจัย.. 7

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 9

แนวคิดและทฤษฎี.. 9

ไต (Kidneys) 9

โกลเมอรูลัส (Glomerulus).. 10

โพโดไซท์ (Podocyte).. 13

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 17

โรคไตอักเสบเนฟโฟรติก (Nephrotic Syndrome).. 26

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวิธีศึกษาวิจัย.. 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย........ 42
รูปแบบการวิจัย........ 42
ประชากร........ 42
การคำนวณขนาดตัวอยาง........ 43
การสังเกตและการวัด........ 44
การรวบรวมข้อมูล........ 47
การวิเคราะห์ข้อมูล........ 47
วิธีการวิจัย........ 48
การตรวจวัดระดับโปรตีน คอเลสเตอรอล Blood Urea Nitrogen และซีรั่ม-ครีอะตินินในเลือดและปัสสาวะ........ 48
การตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry........ 48
การศึกษา Podocyte marker (VEGF) ในปัสสาวะด้วยวิธี ELISA........ 50
การศึกษา Podocyte marker ในปัสสาวะและตัวอย่าง podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี quantitative real-time PCR........ 51
การตรวจนับจำนวน podocyte cells ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต........ 56
บทที่ 4 ผลการวิเคราะหขอมูล........ 59
ผลการวิเคราะหขอมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย........ 59
ผลการวิเคราะหขอมูลการตรวจวัดระดับสารชีวเคมีในเลือดและปัสสาวะ 60
ผลการตรวจนับ podocyte cells ด้วยวิธี Flow cytometry........ 78
ผลการศึกษา podocyte marker ในปัสสาวะด้วยวิธี ELISA........ 97
ผลการศึกษา podocyte marker ในปัสสาวะด้วยวิธี quantitative real-time PCR 101
ผลการศึกษาการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต........ 106
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณผลการวิจัย........ 113
สรุปผลและวิจารณ์ผลการศึกษา........ 113
สรุปผลการวิจัย........ 119
ข้อเสนอแนะ........ 119
รายการอางอิง........ 120

หน้า

ภาคผนวก... 128
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 137

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR สำหรับ Template-Primer mix...........	53
2	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR สำหรับ master mix.........................	54
3	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR..	54
4	แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR......................................	55
5	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา RT-PCR..	55
6	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR................................	56
7	แสดงข้อมูลจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา..	60
8	แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา..	61
9	แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามรูปแบบการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์..	68
10	แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก...	75
11	แสดงผลการตรวจนับ podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกและตัวอย่างควบคุม..	83
12	แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา....	97
13	แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะของผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุม	102
14	แสดงผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VEGF จำนวน podocyte cells และปริมาณ VEGF ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุม......................	105

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงขอบเขตการวิจัย	5
2	แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของไต	10
3	แสดงลักษณะของ renal corpuscle	11
4	แสดงลักษณะของ pococyte และ filtration barrier	12
5	แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของ podocyte บริเวณ filtration barrier	12
6	แสดงการกรองผ่าน filtration barrier	12
7	แสดงองค์ประกอบที่สำคัญของ pococyte cells	15
8	แสดงกลไกการบาดเจ็บของ podocyte cells	17
9	แสดงองค์ประกอบและโครงสร้างของ VEGF	18
10	แสดงโครงสร้างยีนที่ทำหน้าที่สร้าง VEGF แต่ละ isoform	19
11	แสดง growth factor และ receptor ของ VEGF ในกลุ่มเดียวกัน	21
12	แสดงตำแหน่งการจับระหว่าง VEGF และ VEGFR	22
13	แสดงการกระตุ้นสัญญาณของ VEGF ผ่าน VEGFR	24
14	แสดงองค์ประกอบของ flow cytometer	34
15	แสดงหลักการของ flow cytometer	34
16	แสดงการแยกเซลล์ชนิดต่างๆ	35
17	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ SYBR Green I	37
18	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Hybridization probe	38
19	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Taqman probe	38
20	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Molecular Beacons	39
21	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Scorpion probes	40
22	แสดงหลักการของ Laser Capture Microdissection	41
23	แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี WT-1 ใน glomeruli	46
24	แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี VEGF ใน glomeruli	46
25	แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	63

ภาพที่		หน้า
26	แสดงผลการตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	64
27	แสดงผลการตรวจวัดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	65
28	แสดงผลการตรวจวัดระดับ Blood Urea Nitrogen (BUN) ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	66
29	แสดงผลการตรวจวัดระดับซีรั่มครีอะตินินในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	67
30	แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	70
31	แสดงผลการตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	71
32	แสดงผลการตรวจวัดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	72
33	แสดงผลการตรวจวัดระดับ Blood Urea Nitrogen (BUN) ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	73
34	แสดงผลการตรวจวัดระดับซีรั่มครีอะตินินในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	74
35	แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินินในตัวอย่างเลือดเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก ต่างชนิดกัน	77
36	แสดงลักษณะ podocyte cells ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง	79
37	แสดงลักษณะ podocyte cells เมื่อมีเจริญเติบโตมีความหนาแน่น 50-80% ก่อน passage	79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่		หน้า
38	แสดงลักษณะ podocyte cells ก่อน differntated......................................	80
39	แสดงลักษณะ podocyte cells หลัง differentiated...................................	80
40	แสดงผลการประเมินความแม่นยำของวิธีการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry โดยใช้ podocyte cells เพาะเลี้ยง...	81
41	แสดงตำแหน่งและองค์ประกอบของ podocyte cells ที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี..	81
42	แสดงผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม...	84
43	แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม......................	85
44	แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม......................	86
45	แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม..................................	87
46	แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม..	88
47	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะกับระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และโปรตีนในปัสสาวะ....................................	89
48	แสดงผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน..	91
49	แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม......................	92
50	แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม......................	93
51	แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม..................................	94
52	แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม..	95

ภาพที่		หน้า
53	แสดงผลการตรวจนับเซลล์ในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน	96
54	แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี ELISA ในปัสสาวะของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม	99
55	แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี ELISA ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน	100
56	แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน	101
57	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองแตกต่างกัน	103
58	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน	104
59	แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองแตกต่างกัน	106
60	แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี WT-1 ใน glomeruli กำลังขยาย 400 เท่า	107
61	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวน podocyte cells บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุม	108
62	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวน podocyte cells บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน	109
63	แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี VEGF ใน glomeruli กำลังขยาย 400 เท่า	110
64	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวนร้อยละ VEGF บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน	111
65	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลการสร้าง VEGF ใน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน	112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
GBM	Glomerular Basement Membrane
FSGS	Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis
α3-integrin	Alpha 3-integrin
β1-integrin	Beta 1-integrin
UPCR	Urine Protein/Creatinine concentration Ratio
GFR	Glomerular Filtration Rate
IgA	Immunoglobulin A
mg	มิลลิกรัม
BUN	Blood Urea Nitrogen
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ACE inhibitors	Angiotensin-Converting Enzyme inhibitors
ARB	Angiotensin II Receptor Blockers
RNA	Ribonucleic acid
LCM	Laser Capture Microdissection
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
T12	thoracic vertebra-12
L3	Lumbar Bone-3
GBM	Glomerular Basement Membrane
CD2-AP	CD2-Associated Protein
ZO-1	Zona occuldens proteins-1
WT-1	Wilms' tumor-1
LMX1B	LIM homeobox transcription factor 1, beta
Pax-2	Paired box gene 2
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Mf2	Mouse Mesenchyme forkhead 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
ZHX	Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX)
GLEPP1	Glomerular epithelial protein 1
MCN	Minimal Change Nephropathy
DNA	Deoxyribonucleic acid
VPF	Tumor Vascular Permeability Factor
PIGF	Placenta Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
PAF	Platelet-Activating Factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinase
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
FGF-4	Fibroblast Growth Factor 4
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
KGF	Keratinocyte Growth Factor
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleukin
HIF	Hypoxia-inducible factor
CGN	Chronic Glomerulonephritis
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
MN	Membranous Glomerulonephritis
ADH	Antidiuretic hormone
ACEI	Angiotensin-converting enzyme inhibitors
NSAIDs	Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs
CR	Complete remission
PR	Partial remission
SD	Steroid responsive
FR	Frequent relapse

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
SR	Steroid resistance
FSC	Forword Scatter
SSC	Side Scatter
FL	Fluorescence
Tm	Melting Temperature
bp	Base-pairs
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
SNP	Single nucleotide polymorphism
Taq	Thermus aquaticus
SMA	Smooth Muscle Actin
PBS	Phosphate Buffer Solution
FITC	Fluorescein isothiocyanate
RT	Reverse transcriptase
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
BMI	Body mass index
BSA	Body surface aria
MAP	Mean arterial pressure
NS	Nephrotic syndrome
g/dl	Grams per deciliter
g	Grams
µm	Micrometer
ml	Milliliter
CI	Confidence Interval
ºC	degree Centigrade
rpm	Revolutions per minute
µl	Microliter
mM	Millimolar
M	Molar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
mg/dl	Milligrams per deciliter
kg	Kilogram
cm	Centimeter
kg/m^2	kilogram per square meter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

โรคไตอักเสบเนฟโฟรติก (nephrotic syndrome) เป็นโรคไตอักเสบชนิดหนึ่ง เกิดจากความผิดปกติทางโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดฝอยที่ประกอบรวมกันเป็นกระจุก (glomerulus) โดยมีโปรตีนสานต่อกันเป็นร่างแหห่อหุ้มเอาไว้จึงทำให้เกิดลักษณะคล้ายคลึงกับกระดาษหรือแผ่นกรอง เพื่อทำหน้าที่กรองผ่านของเสียและน้ำส่วนเกินออกนอกร่างกาย รวมทั้งป้องกันการสูญเสียพลาสมาโปรตีนออกไปพร้อมกับปัสสาวะอีกด้วย แผ่นกรองนี้ประกอบด้วยเยื่อบุผนังที่มีลักษณะเป็นรูพรุนประกบติดกัน 3 ชั้น ได้แก่

endothelial cell layer เป็นชั้นของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) ซึ่งเป็นผนังชั้นในสุดและเป็นบริเวณที่สัมผัสกับเลือดโดยตรง เซลล์เยื่อบุชนิดนี้จะมีลักษณะพิเศษคือ มีรูพรุน (fenestrae) มากมายบนผิวเซลล์ (membrane) อีกทั้งมีความสามารถในการสร้างและสะสม endothelial glycocalyx ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีประจุลบ (anion charge) เป็นองค์ประกอบสำคัญโดยจะพอกสะสมกันเป็นชั้นเคลือบอยู่เหนือผิวเซลล์ สารประจุลบเหล่านี้มีบทบาทในการป้องกันไม่ให้โปรตีนที่มีประจุลบหลุดลอดผ่าน fenestrae ออกมาในปัสสาวะได้

ผนังชั้นที่สองเรียกว่า glomerular basement membrane (GBM) มีลักษณะเป็นแผ่นเจลที่มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ ประกอบขึ้นจากการสานต่อกันของคอลลาเจนลักษณะคล้ายเชือกซึ่งทำหน้าที่เป็นแกนกลางสำหรับให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด podocyte cells และโปรตีนต่างๆ ยึดเกาะ โดยโปรตีนทั้งหมดยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ก่อเกิดเป็นช่องว่างระหว่างโปรตีนขึ้นซึ่งเป็นช่องทางให้โมเลกุลของสารขนาดเล็กผ่านออกไปยังชั้น podocyte cells ได้

ผนังชั้นนอกสุดเรียกว่า visceral glomerular epithelial cell layer หรือ podocyte cells เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้าง foot processes ยื่นยาวออกมารอบๆ เซลล์ ผนังชั้นนี้เกิดขึ้นจากการเกาะเกี่ยวต่อเนื่องกันของ foot processes หุ้มล้อมรอบ GBM และ mesangial cells ในบริเวณข้างเคียงจึงทำให้เกิดช่องว่างที่ภายในมีโปรตีนอีกหลายชนิดยื่นออกมาจาก foot processes และประสานกับโปรตีนชนิดเดียวกันในฝั่งตรงข้ามของช่องว่างระหว่าง foot processes เกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายซิปวางขวางช่องว่างนั้นๆ เรียกว่า slit diaphragm และมีความเชื่อว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ slit diaphragm มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเทียบกับขนาดรูพรุนบนผนังชั้นอื่นๆ จึงเป็นปราการด่านสำคัญที่ป้องกันไม่ให้โปรตีนหลุดลอดออกมาในปัสสาวะ [1-9]

จากลักษณะโครงสร้างของแผ่นกรองดังกล่าวข้างต้น หากเมื่อใดก็ตามที่เกิดความผิดปกติอันนำไปสู่การอักเสบของไตดังเช่นกรณีของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกขึ้นจะมีผลให้รูของแผ่นกรองมีขนาดขยายใหญ่เพียงพอที่โมเลกุลของโปรตีนจะลอดผ่าน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีแนวความคิดที่เชื่อว่า ขนาดรูพรุนของแผ่นกรองไตที่ขยายใหญ่ขึ้นนั้นเกิดจากการหลุดลอกของ podocyte cells มีผลให้เกิดช่องว่างบนผิวของ glomerular capillary ดังนั้นจึงตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะได้ ซึ่ง Chen CA และคณะ [10] พบว่าผู้ป่วย Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) จะมีจำนวน podocyte cells ลดลงเนื่องมาจากมีระดับของโปรตีนชนิด α3-integrin และ β1-integrin ที่ทำหน้าที่ในการเกาะติดของ podocyte cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีผลให้ podocyte cells ไม่สามารถยึดเกาะบนผิวของ glomerular capillary ได้จึงหลุดลอกออกไป ร่วมกับการพบความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิด effacement ของ foot processes นอกจากนี้แล้วยังพบได้ว่าโปรตีน α3-integrin และ β1-integrin ที่ลดลงนั้นยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการสูญเสียโปรตีนทางปัสสาวะ Macconi D และคณะ [11] พบว่า หนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิด glomerulosclerosis จะมีการลดลงของ podocyte cells ในแต่ละ glomeruli ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะและยังมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนบน slit diaphragm อีกด้วย

จากการรวบรวมข้อมูลในปัจจุบันพบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆ อันนำมาสู่ภาวะไตวายอย่างเรื้อรังทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ [12-17] การรักษาพยาบาลผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายนั้นมีหลากหลายรูปแบบได้แก่ การฟอกไตและการปลูกถ่ายไตทดแทน ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นการรักษาที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และจำเป็นต้องพึ่งพาอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญในการให้ความช่วยเหลือดูแลผู้ป่วย อีกทั้งการรักษาดังกล่าวเป็นเพียงการรักษาเพื่อระงับอาการและพยุงชีวิตของผู้ป่วยไว้ อาจกล่าวได้ว่าเป็นการรักษาแบบประคับประคองอาการเท่านั้นมิได้เป็นการรักษาที่ทำให้หายขาด ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่จึงมีคุณภาพชีวิตที่ย่ำแย่ลง นอกจากนี้ยังปรากฏข้อมูลการสำรวจผู้ป่วยในประเทศไทยโดยสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายและได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะทดแทนมีสาเหตุมาจากโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกสูงถึงร้อยละ 50 ขณะเดียวกันก็พบหลักฐานทางวิชาการที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกนั้นสามารถรักษาให้หายขาดหรือชะลอการเสื่อมของไตได้หากได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างถูกต้องจำเพาะเจาะจง

การวินิจฉัยภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติกในเบื้องต้นอาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิกได้แก่ อาการบวมตามร่างกายร่วมกับตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าวันละ 3.5 กรัมต่อพื้นที่ผิว 1.73 ตารางเมตรหรือ Urine Protein to Creatinine Ratio (UPCR) มากกว่า 3 ในกรณีสุ่ม

ปัสสาวะตรวจ แต่วิธีการวินิจฉัยที่ถือว่าเป็นมาตรฐานในปัจจุบันคือ การเจาะชิ้นเนื้อไตเพื่อวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (kidney biopsy) อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ 2 ประการดังนี้

1) การเจาะชิ้นเนื้อไตเป็นหัตถการที่อาศัยความรู้ความชำนาญร่วมระหว่างอายุรแพทย์โรคไตและพยาธิแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านเพื่อการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องและแม่นยำ ทำให้ปัจจุบันยังไม่สามารถกระทำหัตถการนี้ได้ทุกโรงพยาบาลในต่างจังหวัด

2) ไม่สามารถให้การวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องหากชิ้นเนื้อที่เจาะได้นั้นมีปริมาณ glomeruli ไม่มากพอหรือพบเพียงเนื้อไตชั้นนอก (cortical glomeruli) อีกทั้งอาจส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยจากการมีเลือดออกมากผิดปกติและการติดเชื้อ

ด้วยเหตุนี้สมาคมอายุรแพทย์โรคไตทั้งในและต่างประเทศจึงกำหนดแนวทางการรักษาภาวะไตอักเสบเบื้องต้นด้วยการให้ยาสเตียรอยด์ขนาดสูงแก่ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกทุกรายเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 เดือน โดยไม่จำเป็นต้องทำการเจาะชิ้นเนื้อไตพิสูจน์ก่อนการบริหารจัดการยา [18-20] ซึ่งยาสเตียรอยด์ในขนาดดังกล่าวก่อให้เกิดผลเสียแก่ผู้ป่วยมากมาย อาทิเช่น เกิดภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายบกพร่องจึงทำให้ติดเชื้อได้ง่ายจนอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เกิดต้อหินและต้อกระจก กระดูกผุกร่อน ความดันโลหิตสูง เกิดแผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น ทั้งนี้มีผู้ป่วยบางรายเท่านั้นที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ พบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ดื้อต่อยาสเตียรอยด์ในปัจจุบันเฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 20-40 ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาทั้งหมด [21-22] ดังนั้นหากสามารถค้นพบวิธีทำนายการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ได้ตั้งแต่ระยะแรกก็จะสามารถลดจำนวนผู้ป่วยที่ไม่จำเป็นต้องรับยาได้

มีการศึกษามากมายทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลองที่สนับสนุนความเชื่อที่ว่าจำนวนเซลล์บุผนังด้านนอกของ glomeruli (podocyte cells) ที่ลดลงเป็นต้นเหตุสำคัญนำมาซึ่งการเสื่อมของไต Menini S และคณะ [23] พบว่า หนูทดลองที่มีภาวะเบาหวานจะสูญเสีย podocyte cells จากการเกิด apoptosis สูงถึงร้อยละ 70 ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่กระตุ้นให้เกิด proteinuria และ sclerosis ตามมา Suzuki T และคณะ [24] พบว่าหนูที่ยีน *p21* ขาดหายไปจะเกิดภาวะ hyperplasia ร่วมกับการหลุดลอกของ podocyte cells ขณะเดียวกันก็ตรวจพบการเกิด sclerosis พร้อมทั้งมีระดับโปรตีนในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเกิดภาวะดังกล่าวอย่างต่อเนื่องนั้นนำมาสู่การเกิด FSGS ในที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Lemley KV และคณะ [25] ซึ่งพบผู้ป่วยที่มีอัตราการกรองของไตหรือ Glomerular Filtration Rate (GFR) ลดต่ำลงแต่มีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงขึ้นมากกว่าปกติจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจำนวน podocyte cells ใน glomeruli ที่ลดน้อยลง ซึ่งการลดลงของเซลล์ชนิดนี้จะแปรผันตามการเกิด sclerosis และคุณสมบัติ permselectivity ของ

แผ่นกรองไต ตลอดจนมีผลต่ออัตราการกรองของไต (GFR) ด้วย โดยปกติเซลล์ชนิดนี้มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับคุณลักษณะของเซลล์ประสาท (neuron) กล่าวคือจะไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายหรือหลุดลอกออกไป ดังนั้นเมื่อเกิดการสูญเสีย podocyte cells จึงไม่มีเซลล์งอกใหม่ปกคลุมรอยรั่วบนผนัง glomeruli ร่างกายก็จำเป็นต้องสร้างพังผืดสมานรอยแผลเอาไว้ พังผืดที่เกิดขึ้นนี้จึงเป็นต้นเหตุหลักที่นำมาสู่การเสื่อมของไตดังเช่นกรณีของ FSGS ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุสำคัญลำดับต้นๆ ของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกโดยพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดความผิดปกติกับการบาดเจ็บและการตายของ podocyte cells อีกทั้งยังมีการศึกษาในมนุษย์และสัตว์ทดลองซึ่งพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ podocyte cells ในปัสสาวะกับความรุนแรงของการอักเสบในโรคไตชนิด diabetic nephropathy, IgA nephropathy, lupus nephritis, membranous nephropathy [26-30] เป็นต้น นอกจากนี้ยังปรากฏรายงานประปรายในโรค FSGS และโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกชนิดอื่น แต่ยังไม่มีการใช้ความสัมพันธ์ดังกล่าวเพื่อทำนายผลการรักษา อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการพบตัวแปรที่จะสามารถใช้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ในกลุ่มโรคดังกล่าวได้อย่างเป็นที่น่าพอใจ

คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า การหลุดลอกของ podocyte cells ในปัสสาวะน่าจะสามารถใช้จำแนกผู้ป่วยที่จะตอบสนองออกจากผู้ที่ดื้อต่อยาสเตียรอยด์ และอาจใช้ทำนายความรุนแรงของพยาธิสภาพที่ไตได้ การวัดปริมาณ podocyte cells ในปัสสาวะจะทดแทนการเจาะชิ้นเนื้อไตซึ่งยังเป็นหัตถการที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนสูง ในขณะที่การเก็บปัสสาวะไม่มีอันตรายและสามารถเก็บตรวจได้บ่อยครั้งจึงสะดวกต่อการติดตามผลการรักษา นอกจากนี้อาจจะช่วยลดโอกาสของการได้รับยาเกินขนาดโดยไม่จำเป็นได้

คำถามงานวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก (Primary Research Question)

1. จำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกหรือไม่ อย่างไร

คำถามรอง (Secondary Research Question)

1. การตรวจนับจำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะสามารถพยากรณ์การตอบสนองต่อการต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกได้หรือไม่

2. พบความผิดปกติหรือการกลายพันธุ์ของ podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกหรือไม่ อย่างไร

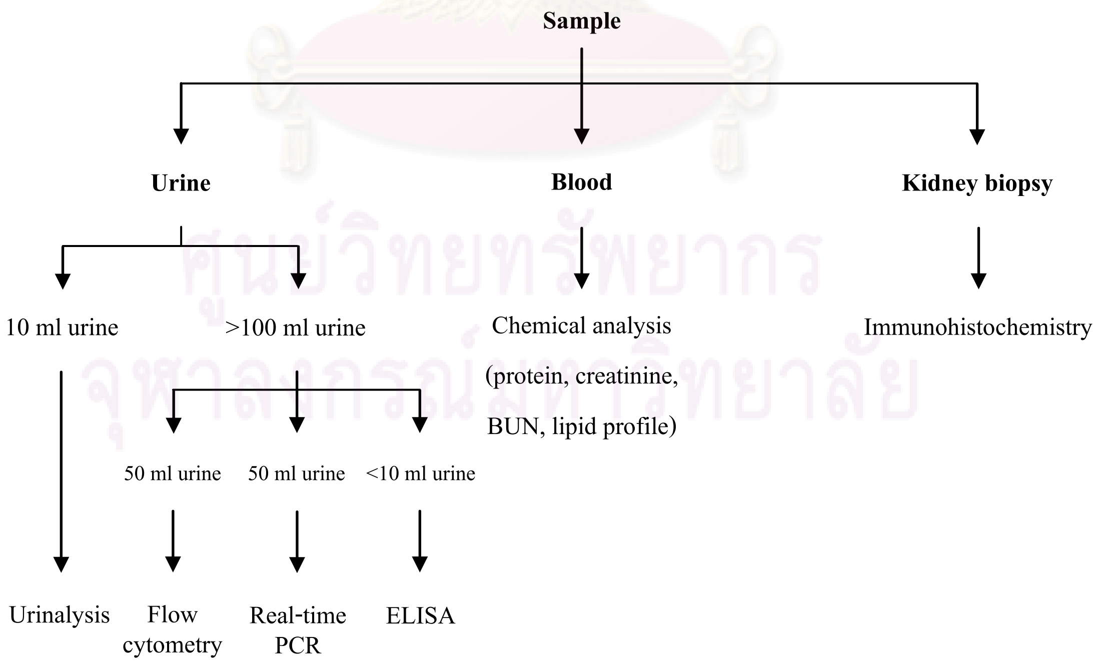
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาจำนวน podocyte cells ในเนื้อไตเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะ
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะ podocyte cells จากชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไตกับ podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะ
3. เพื่อศึกษาปริมาณการกลายพันธุ์ของ podocyte cells และ podocyte markers ในปัสสาวะกับการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesses)

1. จำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์และสามารถใช้พยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก
2. การกลายพันธุ์ของ podocyte cells และ podocytic markers ในปัสสาวะสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อสเตียรอยด์ในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

ขอบเขตของการวิจัย (Scope)



รูปที่ 1 แสดงขอบเขตการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumtion)

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitations)

1. เนื่องจากผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกบางรายนั้นมีความผิดปกติในการขับถ่ายปัสสาวะ ซึ่งพบทั้งปัสสาวะไม่ออกหรือปัสสาวะออกน้อย ดังนั้นตัวอย่างที่สามารถทำการทดสอบได้บางตัวอย่างจึงมีปริมาณไม่เพียงพอเมื่อต้องทดสอบซ้ำมากกว่า 1 ครั้งหรือทำการทดสอบมากกว่า 1 รายการ
2. ปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกเป็นครั้งแรกบางรายไม่ใช่ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
3. เนื่องจากผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นครั้งแรกและยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์นั้นมีจำนวนน้อยพบได้ค่อนข้างยาก ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงเป็นผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยยืนยันด้วยวิธีเจาะตรวจไตอีกทั้งเคยได้รับการรักษายาดังกล่าว ดังนั้นระดับ UPCR อาจมีค่าน้อยกว่า 3 ได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Definition of Terms)

โรคไตอักเสบเนฟโฟรติก (Nephrotic Syndrome) หมายถึง กลุ่มอาการไตอักเสบที่เกิดจากรูพรุนบนแผ่นกรองไตขยายใหญ่ขึ้นและ/หรือมีการลดลงของประจุลบบนผนังของแผ่นกรองไตทำให้มีพลาสมาโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะ โดยในผู้ป่วยไทยมีค่าสูงมากกว่าวันละ 3.5 กรัมต่อพื้นที่ผิว 1.73 ตารางเมตร

โกลเมอรูไล (glomeruli) หมายถึง กลุ่มหลอดเลือดฝอยที่ประกอบรวมกันเป็นกระจุกภายในเนื้อเยื่อไต ซึ่งมีโปรตีนสานต่อกันเป็นร่างแหห่อหุ้มเอาไว้จึงทำให้เกิดลักษณะคล้ายคลึงกับกระดาษหรือแผ่นกรอง ทำหน้าที่กรองผ่านของเสียและน้ำส่วนเกินออกนอกร่างกาย รวมทั้งป้องกันการสูญเสียพลาสมาโปรตีนออกไปพร้อมกับปัสสาวะอีกด้วย

Steroid Sensitiveness หมายถึง ภาวะ remission (ทั้ง complete remission หมายถึงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะหนึ่งวันน้อยกว่า 300 มิลลิกรัม (mg) ภายหลังจากได้รับการรักษา และ partial remission หมายถึงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะหนึ่งวันลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับระดับโปรตีนในปัสสาวะหนึ่งวันก่อนเริ่มทำการรักษาแต่ไม่น้อยกว่า 300 mg ภายใน 4 เดือนนับตั้งแต่เริ่มการรักษาด้วยสเตียรอยด์

Steroid Resistance หมายถึง ภาวะที่ดื้อต่อการรักษา ผู้ป่วยยังคงมีอาการทางคลินิกของภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติกและยังตรวจพบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าวันละ 300 mg หลังจากที่ให้การรักษาด้วยสเตียรอยด์ขนาดมาตรฐานไปแล้วระยะเวลาหนึ่ง

เซลล์โพโดไซท์ (podocyte cells) หมายถึง เซลล์เยื่อบุผนัง glomeruli

คำสำคัญ (Keywords)

podocyte cell

steroid sensitiveness

steroid resistance

nephrotic syndrome

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits)

1. พัฒนาการตรวจนับเซลล์ในปัสสาวะเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก
2. ลดอุบัติการณ์ภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยาสเตียรอยด์โดยไม่จำเป็น
3. สามารถนำสิ่งที่พัฒนาได้มาใช้ให้เกิดเป็นรูปธรรมในโรงพยาบาลในระดับต่างๆ ของประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัย (Research Methodology)

การดำเนินการศึกษาวิจัย ประกอบด้วย

1. การตรวจวัดระดับโปรตีนปัสสาวะ คอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ Blood Urea Nitrogen (BUN) และซีรั่มครีอะตินินในตัวอย่างเลือด
2. การตรวจนับ podocyte cells ด้วยวิธี Flow cytometry
   - 2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี (Efficacy) ด้วย podocyte cells เพาะเลี้ยง
   - 2.2 การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ด้วย podocyte cells เพาะเลี้ยง
   - 2.3 การทดสอบความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ด้วย podocyte cells เพาะเลี้ยง
   - 2.4 การตรวจนับ podocyte cells ในตัวอย่างปัสสาวะ
3. การศึกษา podocyte marker ในปัสสาวะด้วยวิธี Chemiluminescent Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษา podocyte marker ในปัสสาวะและ podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

    4.1 การสกัด RNA (RNA extraction) จากตัวอย่างตะกอนปัสสาวะด้วยวิธี High pure viral RNA kit

    4.2 การสกัด RNA ด้วยวิธี High pure viral RNA kit จากตัวอย่าง podocyte cells ที่ได้จากการตัดแยกด้วยวิธี Laser Capture Microdissection (LCM)

    4.3 การศึกษา podocyte marker ในตัวอย่าง RNA ที่สกัดจากตะกอนปัสสาวะ และ podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี quantitative real-time PCR

5. การตรวจนับ podocyte cells และ podocyte marker (VEGF) ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต

    5.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจนับจำนวน podocyte cells ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา

    5.2 การตรวจนับ podocyte cells ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

1. **ไต** (Kidneys)

1.1 กายวิภาคของไต (Kidney Anatomy)

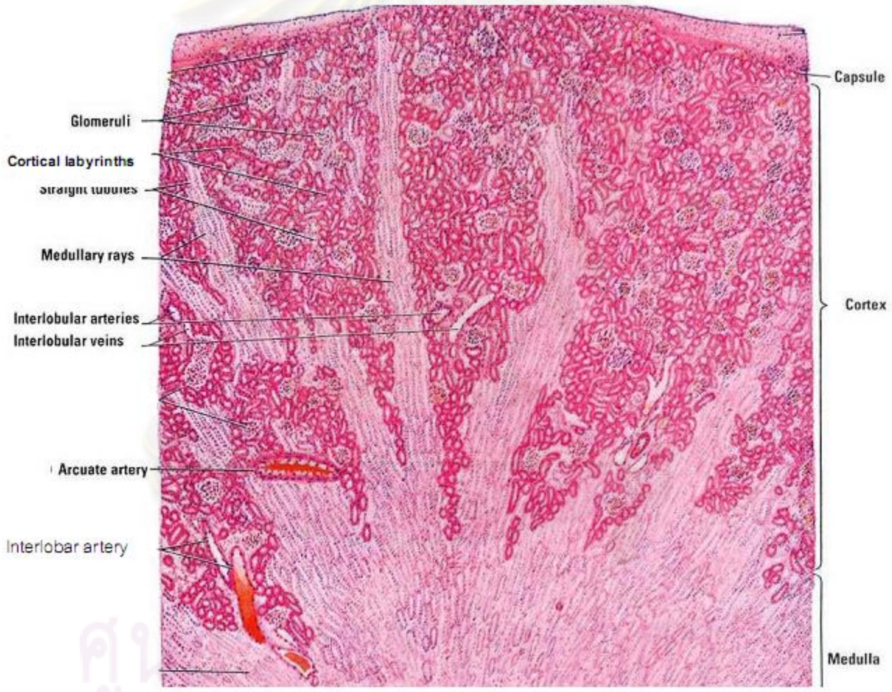
ไตเป็นอวัยวะภายในที่มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว 1 คู่ วางตัวอยู่ภายนอกเยื่อบุช่องท้อง (peritoneal cavity) ทางด้านหลังต่อจากกระดูกสันหลังระดับ T12-L3 โดยที่ไตซ้ายจะอยู่สูงกว่าไตขวาเล็กน้อยเนื่องจากไตขวาถูกตับดันลงมา ไตแต่ละข้างมีเนื้อเยื่อ fibroconnective tissue บางๆ (renal capsule) ห่อหุ้มเอาไว้ ส่วนบริเวณขอบไตด้านในจะมีลักษณะโค้งเว้าและมีขั้วไต (hilum) อยู่ตรงกลางสำหรับเป็นทางผ่านเข้าและออกของหลอดเลือด เส้นประสาท รวมถึงกรวยไต (renal pelvis)

เมื่อผ่าไตตามแนวยาวจะสามารถแบ่งเนื้อไตออกได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้คือ

เนื้อไตชั้นนอก เรียกว่า renal cortex เป็นบริเวณที่มีเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก โดยจะพบกลุ่มของหลอดเลือดฝอยที่ประกอบรวมกันเป็นกระจุกซึ่งเรียกว่า glomerulus (รูปพหูพจน์ glomeruli) กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป เส้นเลือดที่นำเลือดเข้ามาใน glomeruli เหล่านี้จะเรียกว่า afferent arteriole ส่วนเส้นเลือดที่นำเลือดออกจาก glomeruli จะเรียกว่า efferent arteriole นอกจากนี้ glomeruli แต่ละอันจะมีถุง (Bowman's capsule) ที่ต่อเชื่อมอยู่กับหลอดไตส่วนต้น (proximal convoluted tubules) หุ้มอยู่รอบๆ เพื่อทำหน้าที่รองรับน้ำปัสสาวะหรือน้ำที่กรองได้จากเลือด

เนื้อไตชั้นใน เรียกว่า medulla แบ่งออกเป็น outer medulla และ inner medulla เนื้อไตชั้นนี้จะมีสีซีดกว่าเนื้อไตชั้นนอก ภายใน medulla ประกอบไปด้วย renal pyramid ซึ่งมองดูคล้ายสามเหลี่ยมหรือพีรามิดเกิดจาก collecting tubules เรียงตัวขนานกันเป็นกลุ่มๆ อัดกันแน่นจำนวน 8-18 อัน (เท่ากับจำนวน lobe ของ kidney) ด้านฐานของรูปสามเหลี่ยมจะติดอยู่กับเนื้อไตส่วนนอก ส่วนยอดแหลมของสามเหลี่ยมซึ่งเป็นบริเวณที่มีรูเปิดของหลอดไตขนาดเล็กๆ (renal papilla) อันเป็นทางผ่านของปัสสาวะจากแหล่งผลิต (หลอดไต) ปรากฏอยู่มากมายและจะหันยอดแหลมดังกล่าวไปทาง renal sinus โดยมีช่องว่าง (minor calyx) ที่อยู่ตอนปลายของ renal papilla แต่ละอันรองรับไว้ minor calyx จำนวน 2-3 อันจะรวมกันแล้วเปิดเข้าสู่ช่องว่างที่มีขนาดใหญ่กว่าเรียกว่า major calyx ซึ่งจะเป็นบริเวณที่รวมน้ำปัสสาวะก่อนส่งต่อไปยังท่อไต (ureters) เพื่อส่งผ่านน้ำปัสสาวะไปเก็บที่กระเพาะปัสสาวะต่อไป

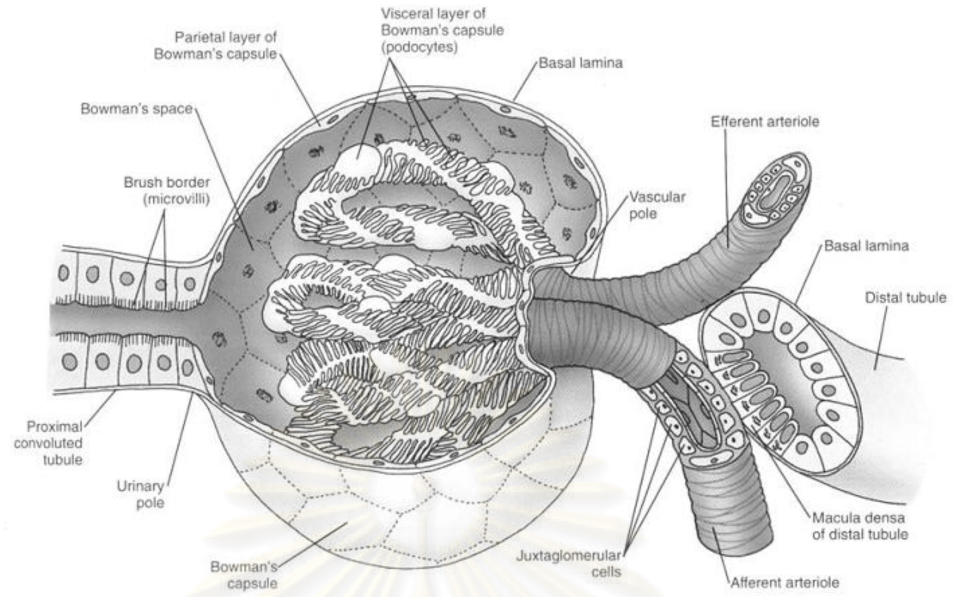
ไตของมนุษย์จัดเป็นชนิด multilobar kidney เนื่องจากประกอบไปด้วยเนื้อไตจำนวนหลาย lobe แต่ละ lobe ประกอบด้วย renal pyramid, renal cortex และ renal column ที่อยู่บริเวณใกล้เคียง นอกจากนี้เนื้อไตแต่ละข้างยังมีหน่วยย่อยที่เรียกว่า nephron ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ผลิตน้ำปัสสาวะและถือเป็น functional unit ของไตอยู่มากมาย สามารถแบ่งองค์ประกอบย่อยได้เป็น 2 ส่วนได้แก่ renal corpuscle จะมีกระจุกเส้นเลือดฝอย glomeruli กระจายอยู่ทั่วไป มีหน้าที่หลักในการกรองของเสียออกจากเลือด ส่วนที่สองได้แก่หลอดไต (renal tubule) ซึ่งเป็นส่วนของท่อยาว มีบทบาทในการรวบรวมน้ำปัสสาวะที่กรองไว้ก่อนจะขับเป็น nitrogenous waste ออกนอกร่างกาย รวมทั้งเป็นบริเวณที่ดูดกลับสารที่จำเป็นจากน้ำที่กรองออกจากเลือดเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ในร่างกายอีกครั้ง



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของไต [31]

1.2 Glomerulus

Glomerulus หรือ glomeruli เป็นกลุ่มหลอดเลือดฝอยที่ต่อเนื่องออกจากหลอดเลือด afferent arteriole และแตกแขนงเป็นเส้นเลือดฝอยเล็กๆ ขดเป็นก้อนกลมรูปไข่โดยมี Bowman's capsule ห่อหุ้มเอาไว้ และจะให้แขนงรวมกันออกมาเป็น efferent arteriole ที่บริเวณ vascular pole ทำหน้าที่เป็นแผ่นกรองสำหรับคัดแยกสารที่ร่างกายไม่ต้องการแล้วออกจากเลือด



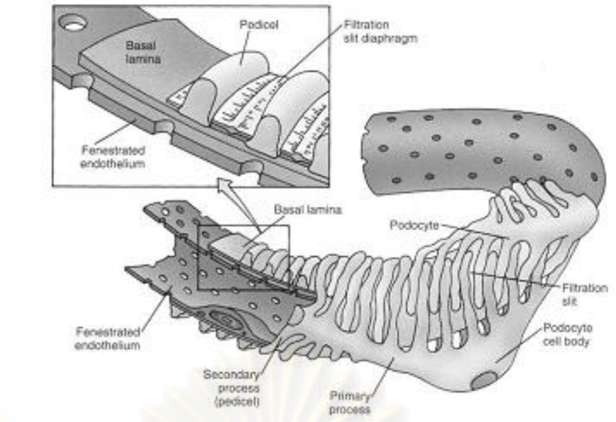
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ renal corpuscle [32]

โครงสร้างของผนัง glomeruli หรือแผ่นกรองไตนี้ประกอบด้วยเยื่อบุที่มีลักษณะเป็นรูพรุนประกบติดกัน 3 ชั้น ได้แก่

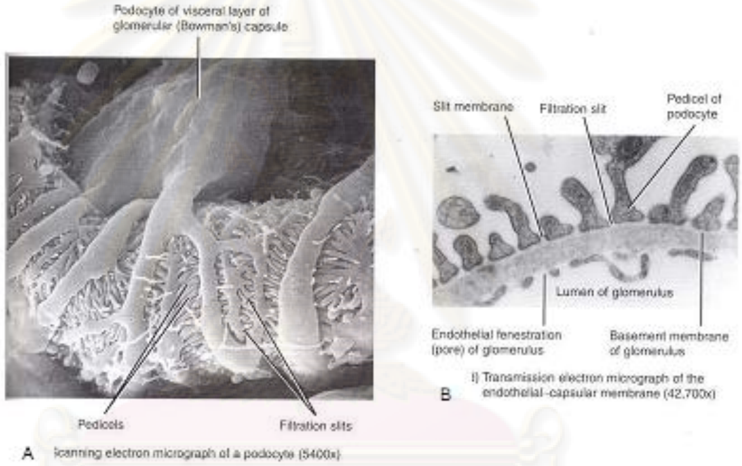
ผนังชั้นในสุดซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสกับเลือดโดยตรงจะเป็นชั้นของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell layer) ซึ่งบนผิวเซลล์จะมีรูพรุน (fenestrae) มากมาย อีกทั้งมีความสามารถในการสร้างและสะสมอนุภาคที่มีประจุลบ (endothelial glycocalyx) เคลือบอยู่เหนือผิวเซลล์เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนที่มีประจุลบหลุดลอดผ่าน fenestrae ออกมาในปัสสาวะได้

ผนังชั้นที่สองเรียกว่า Glomerular Basement Membrane (GBM) มีลักษณะเป็นแผ่นเจลมีรูพรุนคล้ายฟองน้ำอันเป็นช่องทางให้สารโมเลกุลขนาดเล็กผ่านออกไปยังชั้น podocyte cells ได้

ผนังชั้นนอกสุดเรียกว่า visceral glomerular epithelial cell layer หรือ podocyte cells เปลี่ยนแปลงมาจาก epithelial cells ที่บุ visceral layer ของ Bowman's capsule เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้าง foot processes ยื่นยาวออกมารอบๆ เซลล์ เกาะเกี่ยวต่อเนื่องกันทำให้เกิดช่องว่างและโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายซิปขึ้น ทำหน้าที่กรองผ่านของเสียและป้องกันไม่ให้โปรตีนหลุดลอดออกมาในปัสสาวะ [9, 31, 32]



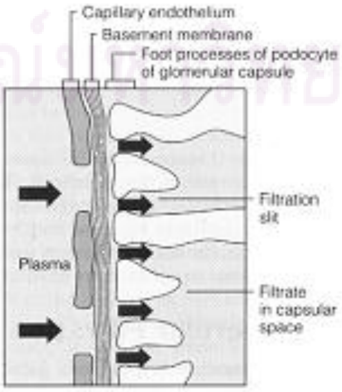
รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ podocyte และ filtration barrier [32]



รูปที่ 5 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของ podocyte บริเวณ filtration barrier

(A) Scanning electron micrograph (B) Transmission electron micrograph [32]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงการกรองผ่าน filtration barrier [32]

1.3 Podocyte cells

Podocyte cells เป็น modified epithelial cells ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์รูปร่างพิเศษคลุมอยู่บนผิวด้านนอกของ glomerular capillary โดยหันด้านที่เป็นนิวเคลียสออกทาง urinary space และเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ให้ยื่นยาวออกเป็น cytoplasmic process (foot processes) จำนวนมาก นอกจากนี้แล้วที่ปลายของ process แต่ละอันยังสามารถแตกแขนงย่อยได้อีกจนเกิดลักษณะคล้ายนิ้วมือจึงเรียกว่า pedicels ซึ่งมีความสามารถในการหดตัวได้ดี pedicels เหล่านี้จะไปพันอยู่รอบๆ glomerular capillary ทำให้เกิดเป็นช่องเล็กๆ เรียกว่า fitration slit โดยที่ fitration slit แต่ละช่องก็จะมีเยื่อหรือแผ่นบางๆ (slit membrane) กั้นเอาไว้ [3, 7, 8, 33, 34] ซึ่งสามารถแบ่งองค์ประกอบที่สำคัญของ pococyte cells ได้ดังนี้

1. *Slit diaphragm* ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญได้แก่ 1.1) nephrin เป็นส่วนประกอบหลักในการประสานกับโปรตีนอื่นๆ บนผิว foot processes ของ podocyte cells จนเกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายซิป 1.2) CD2-Associated Protein (CD2-AP) จัดอยู่ในกลุ่ม adaptor protein ที่ทำหน้าที่ยึดติดกับโปรตีนโครงสร้าง actin ภายในไซโตพลาสซึมของ podocyte cells 1.3) podocin เป็นโปรตีนในตระกูล raft-associated stomatin ซึ่งทำหน้าที่ยึด ion channel บนผนังเม็ดเลือดแดงเข้ากับโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงเชื่อว่าโปรตีน podocin นี้ทำหน้าที่ในทำนองเดียวกันกล่าวคือทำหน้าที่ยึดโปรตีน nephrin เข้าไว้กับ CD2-AP 1.4) ZO-1 เป็นโปรตีนในกลุ่มของ tight junction ทำหน้าที่ในการยึด podocyte cells ที่อยู่บริเวณข้างเคียงกัน [7, 8, 34-37]

2. *Transcription factors* ได้แก่ 2.1) Wilms' tumor-1 (WT-1) จัดเป็น transcription factor ชนิดที่มี zinc finger ทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะระบบทางเดินปัสสาวะและสืบพันธุ์ (genitourinary organs) จะพบสูงขึ้นเป็นลำดับตามการเจริญเติบโตของ podocyte cells 2.2) LIM homeobox transcription factor 1, beta (LMX1B) ทำหน้าที่สร้าง transcription factor ในตระกูล LIM domain ได้แก่ Lin-11, Isl-1 และ Mec-3 ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการทำงานของ podocyte cells 2.3) Pod1 (capsulin, epicardin) มีบทบาทในการสร้าง transcription factor ชนิด basic-helix-loop-helix protein ที่มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของ glomeruli และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของ podocyte cells ในระยะที่จะเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ไปเป็น foot processes 2.4) Kreisler (MafB) เกี่ยวข้องกับการคงสภาพของ podocyte cells เมื่อโตเต็มที่ หากมีการบกพร่องหรือขาดหายไปจะมีผลให้การสร้าง foot processes และการประสานเป็นร่างแหล้มเหลวได้ นอกจากนี้ยัง

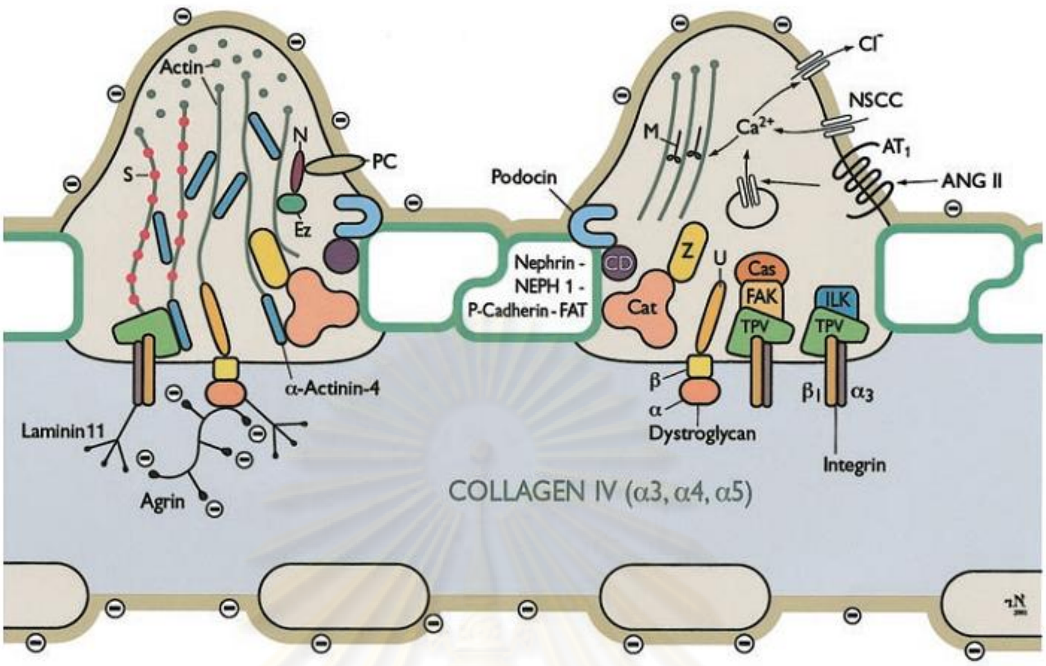
มี transcription factors อื่นๆ ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ podocyte cells เช่น Pax-2, NF-κB, Smad7, Mf2 และ ZHX family [34-36, 38-42]

3. *Podocyte adhesion molecules* ได้แก่ $\alpha 3\beta 1$ integrin และ α,β dystroglycan มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการคงคุณสมบัติในการประสานเป็นร่างแหของ foot processes เป็นหลัก [34, 35, 38]

4. *Cell surface proteins* ประกอบด้วย 4.1) podocalyxin จัดเป็น type I transmembrane ที่สามารถสร้างประจุลบบนผิวเซลล์ได้ เกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้โปรตีนที่มีประจุลบเคลื่อนผ่านออกไป รวมทั้งมีความสำคัญต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนและการรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์อีกด้วย 4.2) Glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) ทำหน้าที่เป็น receptor บนผิวเซลล์และบริเวณ foot processes ทั้งยังเกี่ยวข้องกับการรักษาโครงสร้างของ podocyte cells และ foot processes มีการศึกษาพบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ GLEPP1 จะทำให้มีอัตราการกรองของไตลดลงรวมทั้งมีแนวโน้มที่อาจจะเกิดความดันเลือดสูงร่วมด้วย [34, 35, 38, 43]

5. *Podocyte cytoskeletal proteins* ที่สำคัญได้แก่ synaptopodin และ α-actinin 4 ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนประเภท actin ทำหน้าที่ในการรักษารูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ [34, 35, 38]

6. *Signaling molecules* อื่นๆ ได้แก่ VEGF หรือ VEGF-A เป็น growth factor ชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงสภาพของ glomerular endothelium และควบคุมคุณสมบัติด้าน permeability ของ glomerular filtration barrier พบสะสมมากบริเวณ foot processes ของ podocyte cells และ GBM เชื่อว่า VEGF มีบทบาทสำคัญต่อ glomerular filtration barrier ทั้งในการสร้างและพัฒนาจนเป็น glomeruli ที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่า VEGF คงปรากฏใน podocyte cells ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว (mature podocyte) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า VEGF อาจมีบทบาทสำคัญต่อการคงสภาพของ endothelial cells ใน glomeruli โดยเฉพาะลักษณะของ fenestrate [35, 38, 44, 45]



รูปที่ 7 แสดงองค์ประกอบที่สำคัญของ pococyte cells [35]

(**Cas** หมายถึง p130Cas, **Cat** หมายถึง catenins, **CD** หมายถึง CD2-associated protein, **Ez** หมายถึง ezrin, **FAK** หมายถึง focal adhesion kinase, **ILK** หมายถึง integrin-linked kinase, **M** หมายถึง myosin, **N** หมายถึง NHERF2, **NSCC** หมายถึง non selective cation channel, **PC** หมายถึง podocalyxin, **S** หมายถึง synaptopodin, **TPV** หมายถึง talin, paxillin, vinculin, **U** หมายถึง utrophin, **z** หมายถึง ZO-1)

กลไกการเปลี่ยนแปลงของ podocyte cells อันนำมาสู่การหลุดลอกและการทำลาย ดังเช่นในกรณีของการตรวจพบ podocyte cells ในปัสสาวะนั้นมีหลากหลายรูปแบบแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่ปัจจัยต้นเหตุที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บต่อองค์ประกอบส่วนต่างๆ ของ podocyte cells โดยจะมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อการบาดเจ็บได้ดังนี้คือ

1. Effacement จะพบการหดตัวสั้นและแบนลงของ foot processes จนอาจไม่มีการประสานเชื่อมต่อกับเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง และอาจพบได้ว่าจำนวนของ filtration slits ลดลงร่วมด้วย แต่การเกิด effacement นั้นไม่จำเพาะเจาะจงกับโรคใดโรคหนึ่ง มักตรวจพบการเกิด effacement ร่วมกับการสร้างหรือการกระจายตัวของโปรตีนโครงสร้างของ slit diaphragm ได้บ่อยในผู้ป่วย Minimal Change Nephropathy (MCN) [36, 46, 47]

2. DNA damage/apoptosis เมื่อ podocyte cells เกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์ DNA จนนำเข้าสู่กระบวนการหยุดสังเคราะห์เพื่อให้เกิดการตรวจสอบ (G1/S checkpoint) ในกรณีที่ความผิดปกติดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ก็จะเกิดการซ่อมแซมขึ้น แต่หากความผิดปกตินั้นไม่

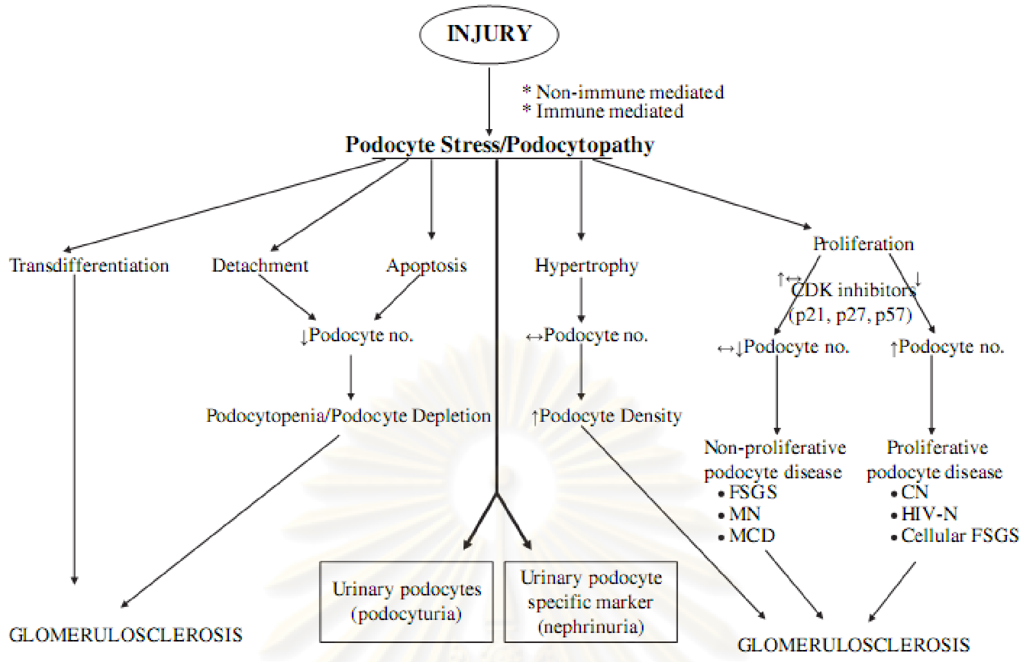
สามารถแก้ไขได้ร่างกายก็จะกระตุ้นให้เกิดขบวนการ apoptosis ต่อไป ด้วยเหตุนี้ไม่ว่าจะเป็นการชะลอการสังเคราะห์ DNA เพื่อการซ่อมแซมแก้ไขหรือการกระตุ้นให้เกิด apoptosis ก็ตาม ผลที่เกิดตามมาคือทำให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ล่าช้าไม่เพียงพอ และในระยะยาวก็อาจมีผลทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนได้อีก [36, 46, 47]

3. Hypertrophy เมื่อ podocyte cells ส่วนหนึ่งเกิดการบาดเจ็บและถูกทำลายในเวลาต่อมาจากสาเหตุต่างๆ podocyte cells ที่เหลือไม่สามารถซ่อมแซมอย่างเหมาะสมและเพียงพอได้ จึงมีการตอบสนองโดยเกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะ hypertrophy กล่าวคือ podocyte cells มีการขยายขนาดใหญ่ มีการบวมโดยเฉพาะบริเวณตัวเซลล์ทำให้ดูคล้าย foot processes สั้นลง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีเป้าหมายเพื่อจะปิดรอยรั่วที่เกิดขึ้น อาจพบได้ว่า podocyte cells แบ่งตัวเพิ่มอย่างมากแต่เซลล์ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติผิดแผกไปจากปกติ เป็นเหตุให้ podocyte cells ใหม่พยายามชดเชยการทำงานที่เสียไปโดยเปลี่ยนแปลงในลักษณะ hypertrophy เช่นกัน [36, 46-49]

4. Arrested development หากมีปัจจัยใดก็ตามที่เป็นสาเหตุให้ podocyte cells ไม่สามารถจะพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่โตเต็มวัยได้ ร่างกายก็จะตอบสนองโดยการคงสภาพ podocyte cells ไว้ในระยะดังกล่าว แต่ขณะเดียวกันก็มีการกระตุ้นให้สร้าง mesangial matrix เพิ่มขึ้นทดแทนด้วย [36, 46, 47]

5. Podocyte proliferation/De-differentiation จะเกิดขึ้นเมื่อมีปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บของ podocyte cells แล้วมีผลให้ podocyte cells ไม่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ที่โตเต็มวัยได้ กล่าวคือ podocyte cells ไม่สามารถสร้างโปรตีนโครงสร้างหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่จะปรากฏและพบได้เมื่อเซลล์โตเต็มที่เท่านั้น อาทิเช่น synaptopodin, Wilms' tumor protein แต่ยังคงความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เรื่อยๆ [36, 46, 47]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



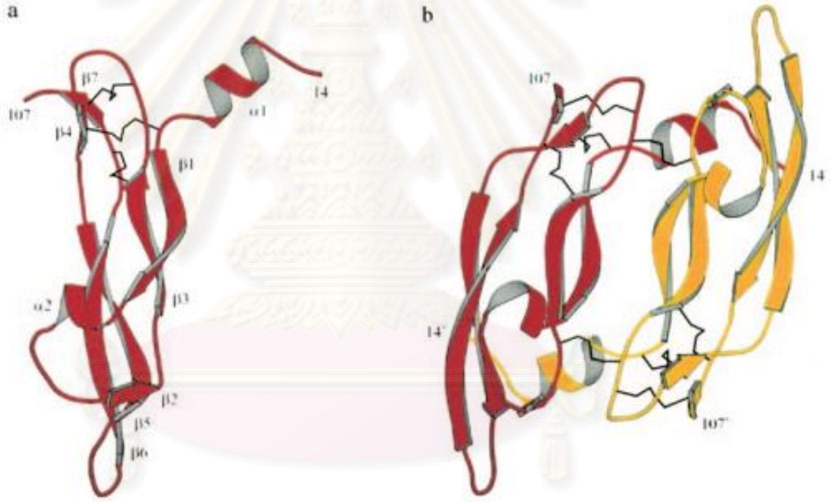
รูปที่ 8 แสดงกลไกการบาดเจ็บของ podocyte cells [50]

2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF ถูกค้นพบขึ้นเมื่อปี ค.ศ.1983 จากการศึกษาวิจัยในเซลล์มะเร็งของหมูโดย Senger DR และคณะ [51] พบว่าสารชนิดดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการรั่วซึมของหลอดเลือดที่ผิวหนังของหมูได้จึงตั้งชื่อว่า Tumor Vascular Permeability Factor (VPF) แต่ด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือตลอดจนวิธีการศึกษาวิจัยในขณะนั้นจึงทำให้ไม่สามารถสกัด VEGF ออกมาศึกษาเพิ่มเติมได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 Ferrara N และคณะ [52] ได้ทำการศึกษาจนพบว่าสารดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของ endothelial cells ได้ ขณะเดียวกันก็มีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มทำการศึกษาเกี่ยวกับ VEGF อย่างกว้างขวางจนพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ matrix remodeling การกระตุ้นการหลั่ง adhesion molecule รวมถึงการเกิด monocyte chemotaxis อีกด้วย แต่บทบาทที่เด่นชัดและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วกันจนทำให้มีการเปลี่ยนชื่อเรียกเป็น Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับพัฒนาการของ endothelial cells อาทิเช่น การกระตุ้นการแบ่งตัวและการพัฒนาต่อจนโตเต็มวัย (proliferation and differentiation) กระตุ้นให้เกิด vasodilatation และ vascular permeability การป้องกันการเกิด apoptosis เพื่อให้ endothelial cells สามารถดำรงอยู่ได้ เป็นต้น [53-57]

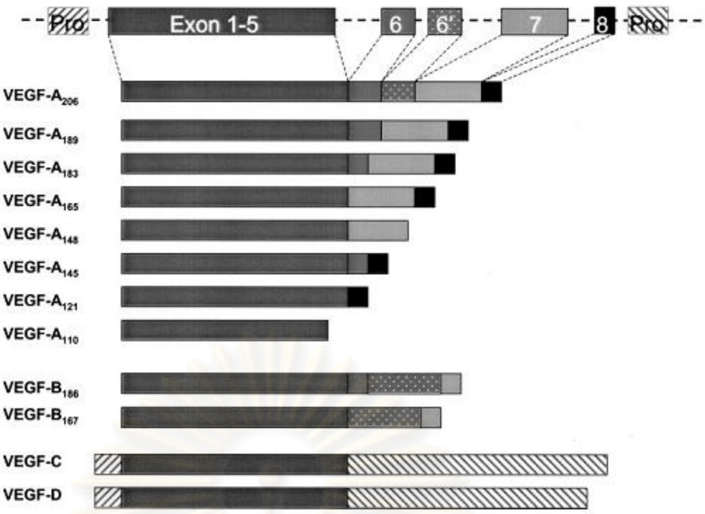
2.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของ VEGF

VEGF จัดเป็น growth factor ชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะทางโครงสร้างของโมเลกุลอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ Placenta Growth Factor (PIGF) สามารถแบ่งชนิดย่อยได้เป็น 7 ชนิด คือ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F และ PIGF ซึ่งแต่ละกลุ่มย่อยจะมีโครงสร้างของแกนกลางเป็น cystine knot motif ที่มี cysteine residues อยู่ตอนปลาย โดยที่ monomer 2 ตัวจับกันภายในโมเลกุลเดียวกันและระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะ disulfide จำนวน 8 ตำแหน่งในลักษณะกลับหัวกลับหางโดยเหลือส่วนปลายของโมเลกุลไว้เกิดเป็นโครงสร้างแบบ β-sheet ซึ่งพบว่า VEGF-A มีความสำคัญต่อกระบวนการ angiogenesis มากที่สุดทั้งการสร้างและการคงสภาพของหลอดเลือด ส่วน VEGF-C และ VEGF-D พบว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิด lymphangiogenesis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเด่นชัดที่สุด [58]



รูปที่ 9 แสดงองค์ประกอบและโครงสร้างของ VEGF [58]

VEGF-A มีขนาดโมเลกุล 34-42 kDa มีโครงสร้างเป็น homodimeric glycoprotein ในเนื้อเยื่อปกติสามารถตรวจพบ VEGF-A mRNA ได้มากที่ปอด หัวใจ ไต และต่อมหมวกไต ยีนที่กำหนดการสร้าง VEGF อยู่ที่โครโมโซม 6p21.3 ประกอบไปด้วย 8 exons โดยที่ exons ลำดับที่ 1 ถึง 5 และลำดับที่ 8 จะเหมือนกันในทุกๆ isoforms ยกเว้น $VEGF_{148}$ แต่ exon ลำดับที่ 6 และ 7 จะเกิด exon splicing ได้จึงทำให้สามารถสร้าง VEGF ที่มีความแตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 7 isoforms ด้วยกัน โดยจะเรียกชื่อ VEGF แต่ละ isoforms ตามจำนวน amino acid ที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{148}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$, $VEGF_{189}$ และ $VEGF_{206}$



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างยีนที่ทำหน้าที่สร้าง VEGF แต่ละ isoform [58]

จากการตรวจพบและไม่พบ heparin-binding domains มีผลให้ VEGF แต่ละ isoform มีความแตกต่างกันออกไปตามความสามารถในการจับกับ heparin และ heparan-sulfate ซึ่งความแตกต่างของคุณสมบัติดังกล่าวนั้นมีผลต่อคุณสมบัติด้านการละลายและความสามารถในการจับกับ receptor อีกด้วย โดยที่ heparin-binding domain จะถูกควบคุมการแสดงออกด้านความสามารถในการจับกับ extracellular matrix จาก exon ลำดับที่ 6 ซึ่ง VEGF ที่มี heparin-binding domain จะสามารถจับกับเซลล์ที่มี heparin-containing proteoglycans บนผิวเซลล์ได้อย่างแน่นหนาจึงทำให้ extracellular matrix ไม่สามารถกระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่น ทั้งนี้พบว่า $VEGF_{189}$ และ $VEGF_{206}$ มีความสามารถในการจับกับ heparin หรือ extracellular matrix ได้ดีที่สุด ในขณะที่ $VEGF_{145}$ และ $VEGF_{165}$ มีความสามารถในการจับรองลงมา ส่วน $VEGF_{121}$ มีความสามารถต่ำสุด

การรวบรวมข้อมูลในปัจจุบันปรากฏหลักฐานที่ทำให้เชื่อได้ว่า การทำงานของ VEGF จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นให้มีการหลั่ง basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) ที่สะสมอยู่ใน heparan-sulfate ของ extracellular matrix โดยอาศัยคุณสมบัติในการจับกับ heparan-sulfate proteoglycan เป็นตัวกระตุ้นการหลั่ง และพบว่าทั้ง VEGF และ bFGF ทำงานเกี่ยวข้องกันในส่วนของการเกิด angiogenesis นอกจากนี้แล้วยังมีความเชื่อว่า heparan-sulfate อาจช่วยส่งเสริมการจับกันระหว่าง VEGF บาง isoform กับ receptor ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของ $VEGF_{165}$ ที่เมื่อใดก็ตามที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น oxidized $VEGF_{165}$ แล้วจะสูญเสียคุณสมบัติในการจับกับ receptor แต่สามารถแก้ไขได้เมื่อมี heparan-sulfate proteoglycan ร่วมด้วย ซึ่งไม่พบ

คุณสมบัติดังกล่าวใน $VEGF_{121}$ ขณะเดียวกันก็สามารถอ้างอิงคุณสมบัติเหล่านี้เพื่ออธิบายถึงกลไกหรือปัจจัยที่ทำให้ $VEGF_{121}$ ออกฤทธิ์ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้น้อยกว่า $VEGF_{165}$ อีกด้วย [58-60]

2.2 Vascular Endothelial Growth Factor Receptors

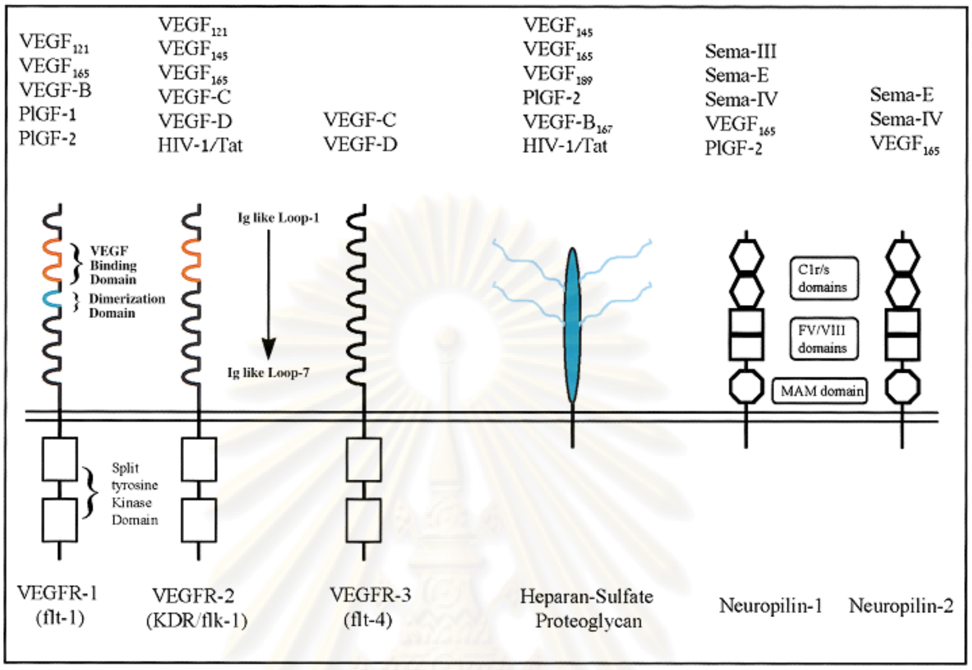
VEGF receptor (VEGFR) ที่มีความจำเพาะและเกี่ยวข้องกับการทำงานของ VEGF ประกอบด้วย VEGF tyrosine kinase receptors 3 ชนิด ได้แก่ fms-like tyrosine kinase Flt-1 (VEGFR-1/Flt-1), fetal liver kinase (VEGFR-2/KDR/Flk-1) และ Flt-4 (VEGFR-3) ซึ่งแต่ละ receptor จะประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วนคือ ส่วนด้านนอก (extracellular domain) มีลักษณะเป็น immunoglobulin-like domains 7 หน่วยต่อกัน ส่วนด้านใน (intracellular domain) จะพบ split tyrosine-kinase domain โดยที่ทั้งสองส่วนจะเชื่อมต่อกันด้วยบริเวณของ transmembrane region เพียงตำแหน่งเดียว

VEGFR-1 พบมากที่ endothelial cells แต่มีบทบาทต่อการทำหน้าที่ของ endothelial cells ค่อนข้างน้อย เนื่องจาก VEGFR-1 มี kinase activity ต่ำจึงไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ endothelial cells เมื่อมีการหลั่ง VEGF ได้ดีเท่าที่ควร จึงมักพบการตอบสนองแบบ migration เพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตาม receptor ชนิดนี้กลับมีความสามารถในการจับกับ VEGF-A ได้ดีกว่า receptor ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน จึงสามารถทำให้เกิดการแบ่งตัวของ endothelial cells ได้ในระยะเริ่มต้นก่อนที่จะมีการเกาะเกี่ยวประสานกันกลายเป็นหลอดเลือด ตัวอ่อนและ differentiated endothelial cells แม้ขาด VEGFR-1 ($VEGFR\text{-}1^{-/-}$) แต่จะยังพบการเพิ่มจำนวนของ endothelial cells และการสร้างหลอดเลือดมากขึ้น แสดงว่าการกระตุ้น endothelial cell cycle โดย VEGFR-1 อาจเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 1 ช่องทาง (pathway) ขึ้นไป นอกจากนี้แล้วยังพบได้ว่า VEGFR-1 ยังมีความสำคัญในการควบคุมแบบ negative modulation ต่อการสร้างหลอดเลือดและลดผลของ angiogenesis จากการจับกับ VEGFR-2 ได้

VEGFR-2 พบมากและมีส่วนสำคัญต่อการทำงานของ endothelial cells มากที่สุด โดยในระหว่างที่มีการเกิด angiogenesis เมื่อมีการกระตุ้น VEGFR-2 ร่วมด้วยจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการหลั่ง Platelet-Activating Factor (PAF) จาก endothelial cells ตามมาซึ่งมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว (mitogenesis) การเคลื่อนที่ (migration) และเพิ่ม permeability ของเซลล์ ทั้งนี้ VEGFR-2 จะมีความจำเพาะต่อ VEGF-C, VEGF-D และ VEGF-E จึงจับกับ VEGF เหล่านี้ได้ดีกว่า VEGF-A นอกจากนี้อาจพบ VEGFR-2 ได้บ้างที่เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือด trophoblast และ renal mesangial cells

ส่วน VEGFR-3 นั้นไม่พบว่ามีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับการทำงานของ endothelial cells แต่กลับพบความสัมพันธ์กับการเกิด lymphangiogenesis เด่นชัดกว่า แม้จะมีความสามารถใน

การจับกับ VEGF-C และ VEGF-D ได้ดีกว่า VEGF ชนิดอื่นๆ ก็ตาม ซึ่งสอดคล้องตรงกันกับการตรวจพบ receptor ชนิดนี้ได้มากที่บริเวณหลอดน้ำเหลืองหรือท่อน้ำเหลืองทั่วร่างกาย [58-62]



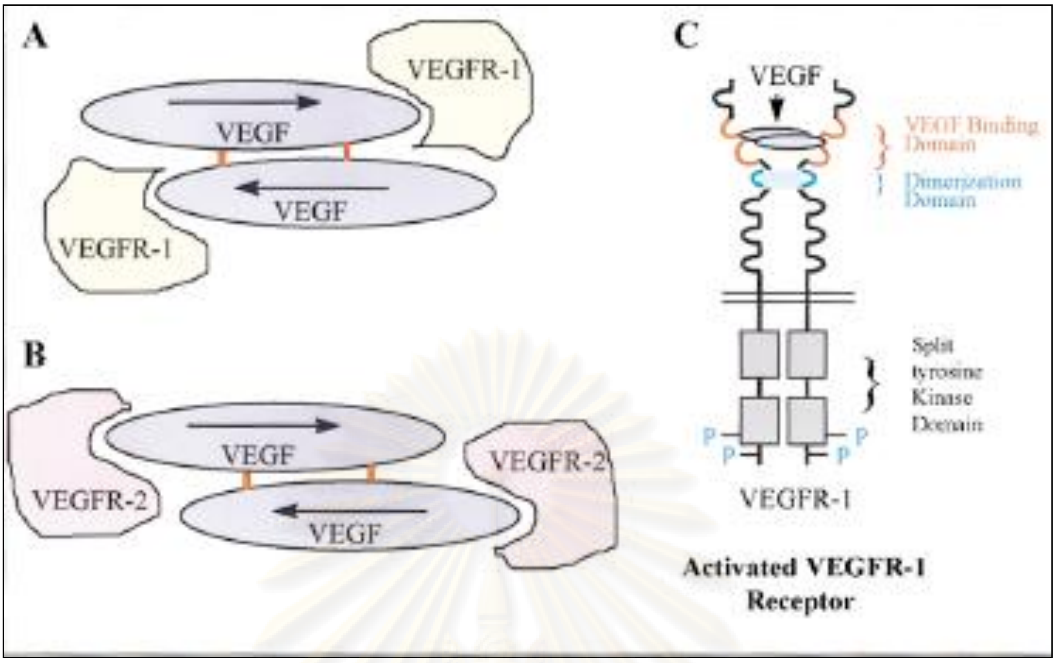
รูปที่ 11 แสดง growth factor และ receptor ของ VEGF ในกลุ่มเดียวกัน [61]

2.3 Signal Transduction

จากโครงสร้างของ VEGF พบว่าการจับกับ VEGFR นั้นจะอาศัยส่วนปลายทั้ง 2 ด้านของโมเลกุล โดยจะมีความแตกต่างกันของบริเวณที่เหมาะสมต่อการจับระหว่าง VEGFR-1 กับ VEGFR-2 เมื่อเกิดความผิดปกติของ VEGF ของตำแหน่งที่ใช้จับกับ VEGFR-1 พบว่าจะส่งผลกระทบมากกว่าเมื่อเกิดความผิดปกติตรงตำแหน่งที่ใช้จับกับ VEGFR-2 เช่นเดียวกันนี้การจับระหว่าง VEGF และ VEGFR-2 แทบจะไม่ถูกรบกวนแม้จะเกิดความผิดปกติของ VEGF ตรงตำแหน่งที่ใช้จับกับ VEGFR-1 ก็ตาม และพบได้ว่าโครงสร้างของ VEGF ยังเอื้อต่อการจับกับ VEGFR-1 และ VEGFR-2 ที่ปลายคนละด้านได้ในเวลาเดียวกัน

VEGFR จะจับกับ VEGF โดยใช้ตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของ immunoglobulin-like domains แต่ระหว่าง VEGFR-1 และ VEGFR-2 จะมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยบริเวณตำแหน่งที่ 4 ของโครงสร้างดังกล่าว โดย VEGFR-1 จะมี dimerization domain สำหรับใช้เป็นตำแหน่งจับระหว่าง VEGFR-1 ด้วยกันและช่วยให้สามารถจับกับ VEGF ได้ดีกว่า VEGFR-2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แสดงตำแหน่งการจับระหว่าง VEGF และ VEGFR [61]

A. VEGF และ VEGFR-1

B. VEGF และ VEGFR-2

C.dimerization domain ของ VEGFR-1

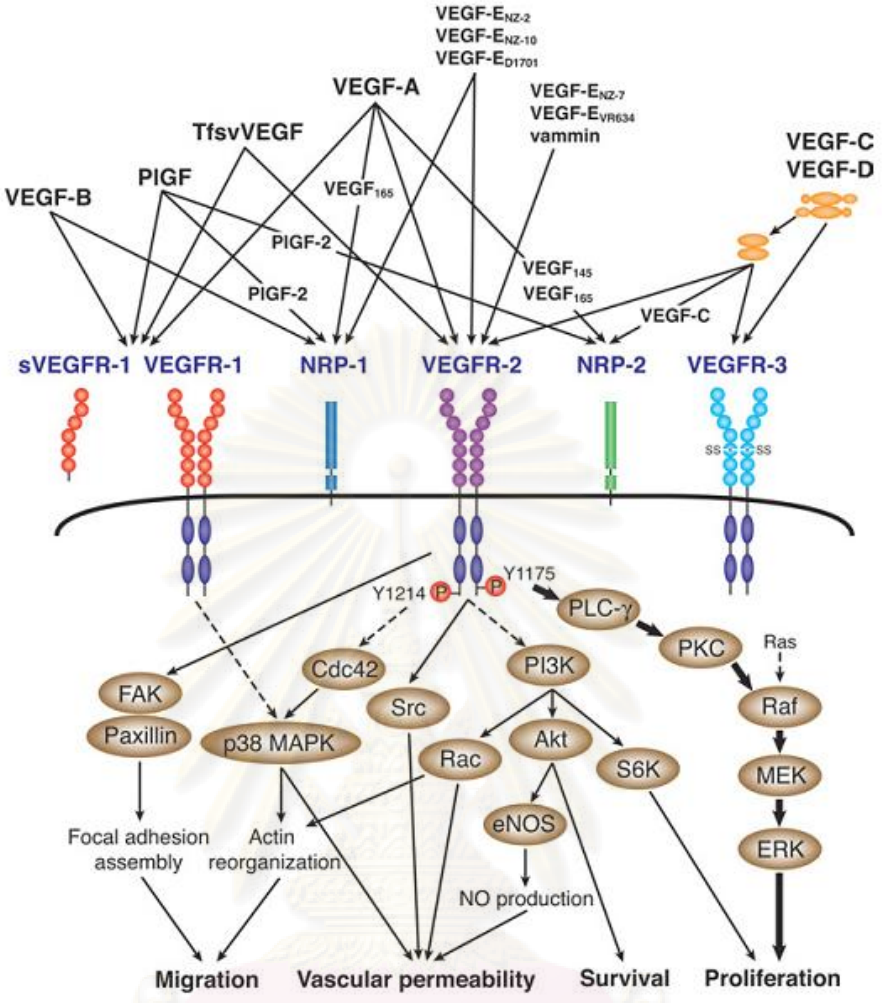
การจับกันระหว่าง VEGF และ VEGFR จะทำให้เกิด tyrosine phosphorylation ที่ tyrosine-kinase domain ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยสัญญาณที่กระตุ้นผ่าน VEGFR-1 จากการตอบสนองต่อ VEGF โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VEGF-A จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่เพิ่ม kinase activity แต่หากมีตัวกระตุ้นไม่เพียงพอหรือเกิดไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดสัญญาณในระดับต่ำๆ จึงเกิดการตอบสนองเฉพาะ cell migration เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า VEGFR-1 มีบริเวณ repressor sequence ที่มีบทบาทในการควบคุมระดับ VEGF ให้เหมาะสมกับ VEGFR-2 ซึ่งมีฤทธิ์ในการตอบสนองแรงกว่า อาจเรียกได้ว่า VEGFR-1 ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมในลักษณะ negative feedback ก็ได้ ส่วนการจับกันระหว่าง VEGF และ VEGFR-2 จะทำให้เกิด auto-phosphorylation ที่ tyrosine-kinase domain ซึ่งจะทำให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณที่แรงกว่ามาก จึงมีการตอบสนองทั้งแบบ cell migration, vascular permeability และ proliferation ตามมา โดยที่การตอบสนองแต่ละแบบนั้นจะได้รับการกระตุ้นผ่านช่องทางหรือกลไกที่แตกต่างกันออกไป เช่น กระตุ้นผ่าน phosphatidylinositol 3’-kinase (PI3K), p38 MAPK เป็นต้น [58-62]

สำหรับ VEGF บาง isoform ยังตรวจพบ isoform-specific receptor ที่สามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของแต่ละ isoform ได้ พบว่า $VEGF_{165}$ มี isoform-specific receptor ที่เรียกว่า neuropilin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม type I transmembrane receptor ประกอบด้วย neuropilin-1 และ neuropilin-2 เนื่องจาก neuropilin มีส่วนของ intracellular domain สั้นและไม่พบโครงสร้างของ tyrosine-kinase domain ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถทำงานเพียงลำพังเดี่ยวๆ ได้ ดังนั้นเมื่อกระตุ้น $VEGF_{165}$ ผ่านทาง neuropilin โดยไม่ผ่าน VEGFR จึงไม่เกิดการตอบสนองใดๆ ด้วยเหตุนี้การกระตุ้นผ่าน neuropilin จำเป็นต้องพึ่งพาการจับกับ VEGFR ร่วมด้วย ในอีกทางหนึ่งก็เชื่อว่า neuropilin ทำหน้าที่เป็น co-receptor โดยพบว่าการจับกันระหว่าง $VEGF_{165}$ กับ VEGFR-2 จะออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นถ้ามี neuropilin-1 ร่วมด้วย [63-64]

ในการสร้าง VEGF มีปัจจัยแวดล้อมที่เกี่ยวข้องต่อการควบคุมกระบวนการสร้างนั้นๆ ได้แก่ cytokine และ growth factor หลายชนิดคือ Fibroblast Growth Factor 4 (FGF-4), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF-β), Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), Angiotensin II, Interleukin 1β (IL-1β) และ Interleukin 6 (IL-6) ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง VEGF ได้แก่ IL-10 และ IL-13

สำหรับสภาวะที่มีผลกระตุ้นให้เกิดการสร้าง VEGF โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VEGF-A มากที่สุดนั้นได้แก่ ภาวะ hypoxia โดยจะกระตุ้นผ่านทาง hypoxia-inducible factor (HIF) ที่จับกับ HIF binding site บน VEGF promoter ในทางเดียวกันสภาวะใดก็ตามซึ่งไม่จำเป็นต้องเกิดภาวะ hypoxia แต่มีการสร้าง HIF หรือ HIF-like factor ขึ้นก็สามารถกระตุ้นการสร้าง VEGF ได้ อาทิเช่นมะเร็งชนิดต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แสดงการกระตุ้นสัญญาณของ VEGF ผ่าน VEGFR [62]

2.4 **บทบาทของ** VEGF **ต่อ** glomeruli

VEGF สามารถตรวจพบได้ในเซลล์หลายชนิดภายในไตของหนูและมนุษย์ ได้แก่ podocyte cells, tubular cells ซึ่ง proximal tubular cells จะพบได้มากกว่า distal tubular cells และ collecting ducts สำหรับไตที่โตเต็มที่แล้วจะตรวจพบ VEGF ได้ใน podocyte cells, tubular epithelium, collecting ducts และ mesenchymal cells

การสร้างไตเริ่มต้นจากในตอนปลายของสัปดาห์ที่สองหลังการปฏิสนธิ โดย excretory units จะพัฒนามาจาก metanephric mesoderm ในขณะที่ collecting ducts จะเจริญมาจาก ureteric bud และบริเวณที่เหลือรอบนอกเจริญมาจากส่วนของ mesonephric duct นอกจากนี้ ureteric bud จะมีการพัฒนาต่อไปจนกลายเป็น podocyte precursor cells ซึ่งจะเป็นแหล่งของการสร้าง VEGF โดยจะพบการสร้างได้ตั้งแต่ระยะ comma-shaped body หรือ S-shape ของ

glomeruli (glomerulogenesis) และจะพบได้ว่า endothelial precursor cells ที่อยู่ภายใน renal mesenchyme ที่มี VEFGR-2 จะเริ่มเคลื่อนตัวเข้าสู่ vascular cleft รวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปพร้อมๆ กับการสร้าง VEGF ของ podocyte cells ได้

มีการศึกษาพบว่า angioblasts ที่มีการแสดงออกของ VEGFR-1 และ VEGFR-2 จะพบการตอบสนองเป็นลำดับต้นๆ ในการพัฒนาหลอดเลือด แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ VEGF ต่อการเจริญเติบโตของไต และการเปลี่ยนแปลงของ angioblasts ไปสู่ endothelial cells นั้นสามารถยับยั้งได้ด้วย antibody ต่อ VEGF นอกจากนี้ยังพบได้ว่าการเกิด podocyte-selective deletion แบบ heterozygous ของ VEGF ในระหว่างที่เกิดการสร้าง endothelial cells (endotheliosis) จะทำให้เกิดไตอักเสบเนฟโฟรติก แต่หากเป็นความผิดปกติแบบ homozygous จะทำให้เสียชีวิตภายหลังการคลอดด้วยอาการไตวายเนื่องจากไม่มี endothelial cells โตเต็มวัยใน glomeruli จึงไม่สามารถทำงานได้ หากพบการหลั่งของ VEGF มากจนเกินไปก็จะทำให้เกิดไตวายระยะสุดท้ายจากอาการ collapsing glomerulopathy [58]

เนื่องจากขบวนการ glomerulogenesis ของหนูจะยังคงดำเนินอยู่ต่อไปหลังคลอดอีกประมาณ 2 สัปดาห์ Kitamoto และคณะ [55] จึงได้ทำการศึกษาโดยการฉีด VEGF-blocking antibodies เข้าสู่ลูกหนูหลังคลอดทันทีเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ VEGF ต่อการเจริญเติบโตของ glomeruli ซึ่งผลการศึกษาพบว่ามีความผิดปกติที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนของ glomeruli ทั้งเรื่องจำนวนและคุณภาพ กล่าวคือ glomerular capillary lumen มีขนาดเล็กและมีการสร้างที่ไม่สมบูรณ์ บาง glomeruli ไม่พบหลอดเลือดเลย รวมทั้งยังพบการลดจำนวนลงของ glomeruli อีกด้วย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาโดย Gerber และคณะ [65] ที่มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความสำคัญของ VEGF ต่อการเจริญเติบโตของไตโดยการฉีด soluble VEGF receptor เข้าไปในลูกหนูหลังคลอดเพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ VEGF ที่ลูกหนูสร้างขึ้นเอง ผลการศึกษาพบว่าลักษณะความผิดปกติของ glomeruli ที่เกิดขึ้นคล้ายคลึงกัน

เมื่อไตเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะตรวจพบระดับของ VEGF ได้น้อยกว่าในระหว่างการพัฒนามาก แต่การทำงานจะมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นเช่นกัน โดยจะพบได้ว่าในการเกิด angiogenesis ภายใน glomeruli มักจะเกิดได้ด้วยการกระตุ้นผ่าน VEGFR1 ได้มากกว่า VEGFR2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ VEGF ต่อการไหลเวียนเลือดภายใน glomeruli ตลอดจนการคงสภาพการทำหน้าที่ของไตอย่างเป็นปกติ

คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของ glomeruli ได้แก่ การเป็นเยื่อเลือกผ่านหรือที่เรียกว่า permeability ซึ่ง VEGF ก็จัดเป็น permeability factor เช่นกัน โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการกรองและมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้าง fenestrae ใน endothelial cells

transcellular gaps, caveolae และ inter-endothelial gaps จึงทำให้เชื่อว่า VEGF มีบทบาทสำคัญต่อ glomerular filtration barrier ทั้งในการสร้างและพัฒนาจนเป็น glomeruli ที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะลักษณะของ fenestrae ของผนังเยื่อบุ glomeruli ในทางตรงข้ามกันหากมีการยับยั้งการหลั่ง VEGF ย่อมจะมีผลให้จำนวน fenestrae ลดลงเช่นกัน ทั้งนี้ VEGF ยังพบเป็นส่วนประกอบสำคัญที่บริเวณ glomerular basement membrane โดยทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำ extracellular proteolysis ในขณะที่ทำหน้าที่เป็น angiogenic factor สำหรับการกระตุ้นปฏิกิริยาภายในเซลล์

การทำลายยีนที่กำหนดการสร้าง VEGF ของ podocyte cells จะมีผลให้ podocyte cells มีพัฒนาการผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดเจน อีกทั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยง immortalized podocyte ของมนุษย์ในหลอดทดลองจะสามารถตรวจพบ VEGFR-1, VEGFR-3 และ neuropilin-1 แต่ไม่พบ VEGFR-2 ทั้งนี้อาจเกิดจาก podocyte cells มีการแสดงออกของ VEGFR-2 เป็นครั้งคราวหรือมีระดับต่ำซึ่งไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีปกติได้ และเมื่อทำการทดลองเลี้ยง podocyte cells ของมนุษย์โดยยับยั้งการส่งสัญญาณของ VEGFR และ tyrosine kinase receptor ชนิดอื่นๆ ด้วย inhibitors ต่อ tyrosine kinase พบว่ามีการลดลงของ VEGF-mediated $[^3H]$-thymidine ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า podocyte cells น่าจะมี tyrosine kinase-mediated receptor สำหรับ VEGF เช่นกัน จึงเชื่อได้ว่า VEGF สามารถออกฤทธิ์แบบ autocrine เพื่อกระตุ้น podocyte cells ด้วยกันได้ [66]

การทำงานของ VEGF ต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของไตอาศัยการทำงานร่วมของ VEGF isoform พบว่าหนูที่สร้างเฉพาะ $VEGF_{120}$ มีปริมาณและความสมบูรณ์ของ glomeruli ลดลง การแตกแขนงของ ureteric bud ผิดแผกไป รวมทั้งเข้าสู่ภาวะ glomerulosclerosis เร็วกว่าปกติ แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่พบในหนูที่ถูกทำลายเฉพาะยีนที่สร้าง VEGF ของ podocyte cells บ่งชี้ได้ว่าการเกิด glomerulogenesis ต้องอาศัยการทำหน้าที่ร่วมกันของ VEGF isoform มากกว่า 1 ชนิดในแต่ละขั้นตอน

3. โรคไตอักเสบเนฟโฟรติก (Nephrotic Syndrome)

3.1 สาเหตุ

สาเหตุของการเกิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกเชื่อกันว่าเกิดจากการหลุดลอกของ podocyte cells และ/หรือมีการลดลงของประจุลบบนแผ่นกรองอันเนื่องจากความผิดปกติใดๆ ก็ตามซึ่งมีผลให้รูพรุนบนแผ่นกรองขยายใหญ่ขึ้นเพียงพอที่พลาสมาโปรตีนจะสามารถหลุดลอดออกมาในปัสสาวะได้ โดยมีค่าสูงมากกว่าวันละ 3.5 กรัมต่อพื้นที่ผิว 1.73 ตารางเมตร

3.2 ชนิดของกลุ่มอาการโรคไต อาศัยหลักเกณฑ์การแบ่งแยกชนิดตามลักษณะทางคลินิกดังนี้

Primary Nephrotic Syndrome เป็นภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะอื่นใดในร่างกายนอกเหนือจากความผิดปกติของไต โดยพบว่ากลุ่มอาการโรคไตชนิดนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกในเด็กสูงถึงร้อยละ 90 ที่เหลือเป็นผลมาจาก systemic disease อื่นๆ ทั้งนี้ในส่วนการวินิจฉัย primary nephrotic syndrome จะอาศัยลักษณะทางคลินิกร่วมกับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มดังนี้คือ

- กลุ่มที่เป็นมาแต่กำเนิด
- กลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์
- กลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ ประกอบด้วยกลุ่มที่มีพยาธิสภาพไตเป็นแบบอื่น เช่น Chronic Glomerulonephritis (CGN), Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN), Focal Segmental Glomeruloscerlosis (FSGS), Membranous Glomerulonephritis (MN)

Secondary Nephrotic Syndrome เป็นภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติกที่มักตรวจพบความผิดปกติของอวัยวะอื่นร่วมด้วย ซึ่งโรคที่พบร่วมกันกับการเกิดโรคไตชนิดนี้ได้บ่อย คือ Systemic Lupus Erythematosus และ Anaphylactoid Purpura นอกจากนี้ยังพบร่วมกับโรคหรือสภาวะต่างๆ ได้อีก เช่น การติดเชื้อ การแพ้ยาหรือสารเคมี มะเร็ง และอื่นๆ [9]

3.3 พยาธิสภาพ

เมื่อมีปัจจัยใดๆ ก็ตามอันก่อให้เกิดความผิดปกติของการกรองที่ glomeruli และทำให้มีโปรตีนหลุดรั่วออกไปในปัสสาวะเป็นจำนวนมากต่อเนื่องเป็นเวลานานจะส่งผลให้ร่างกายเร่งการสังเคราะห์อัลบูมินขึ้นทดแทนส่วนที่สูญเสียไป แต่กระบวนการสังเคราะห์ดังกล่าวไม่อาจเกิดได้เร็วเพียงพอจึงเป็นเหตุนำมาสู่ภาวะอัลบูมินในเลือดต่ำ และทำให้แรงดันที่เกิดจากแรงดึงน้ำไว้ในหลอดเลือดของอัลบูมิน (oncotic pressure) เปลี่ยนแปลงไป ร่วมกับมีน้ำในหลอดเลือดเคลื่อนที่ออกไปอยู่ในเนื้อเยื่อ (interstitial fluid) และสะสมอยู่ซึ่งปรากฏให้เห็นเป็นอาการบวมตามร่างกาย นอกจากนี้แล้วยังส่งผลให้ระบบไหลเวียนของเหลวขาดประสิทธิภาพอีกด้วย เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ร่างกายจึงต้องปรับตัวโดยการกระตุ้นระบบ renin-angiotensin และมีการหลั่งฮอร์โมน ADH ซึ่งจะกระตุ้นให้เพิ่มการดูดกลับเกลือโซเดียมที่บริเวณหลอดเลือดไตฝอยส่วนปลายมากขึ้นจนนำมาสู่การคั่งของโซเดียมซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการบวมตามมา

จากการที่ร่างกายมีการเร่งสร้างโปรตีนขึ้นทดแทนส่วนที่สูญเสียไปร่วมกับผลกระทบจากการลดลงของแรงดันออสโมติกในพลาสมาจะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของตับร่วมด้วยโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไลโปโปรตีนมากขึ้น เป็นเหตุให้ปริมาณของคอเลสเตอรอลและไตรกลี-เซอร์ไรด์เพิ่มสูงตามมา ในกรณีของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงนอกเหนือจากโปรตีนอัลบูมินแล้วอาจมีโปรตีนชนิดอื่นสูญเสียออกไปทางปัสสาวะร่วมด้วย อาทิเช่น cholecal ciferol–binding protein ซึ่งทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินดีตามมา บางรายอาจพบการสูญเสีย thyroid binding protein ซึ่งจะทำให้ค่า T4 ต่ำตามมา รวมทั้งการสูญเสียทรานเฟอริน (tranferin) อาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางได้อีกด้วย เป็นต้น

3.4 อาการและอาการแสดง โดยทั่วไปอาการและอาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเป็นผลสืบเนื่องมาจากการสูญเสียโปรตีนจำนวนมากออกไปทางปัสสาวะ ซึ่งผู้ป่วยจะมาพบแพทย์โดยไม่มีอาการทางคลินิกของ nephritis อาการแสดงที่มักตรวจพบประกอบด้วย

3.4.1 *ปริมาณโปรตีนในเลือดลดต่ำลง (Hypoalbuminaemia)* เนื่องมาจากการสูญเสียโปรตีนส่วนหนึ่งออกไปพร้อมกับปัสสาวะ จนทำให้ร่างกายมีพลาสมาอัลบูมินในเลือดต่ำกว่า 3.5 กรัม/เดซิลิตร (g/dl)

3.4.2 *อาการบวมทั่วร่างกาย (generalized edema)* เมื่อมีการรั่วของโปรตีนออกจากกระแสเลือดจนเกิดเป็นภาวะ hypoalbuminuria ขึ้น ก็จะทำให้ระดับ plasma oncotic pressure ลดต่ำลงตามมา มีผลให้ไตต้องเร่งการดูดกลับน้ำและเกลือแร่เพื่อชดเชยการลดลงของ intravascular volume จนเกิดเป็นการคั่งของน้ำในร่างกาย โรคไตอักเสบเนฟโฟรติกมักจะสังเกตพบได้จากอาการบวมเป็นลำดับแรกโดยเฉพาะที่บริเวณรอบดวงตาในตอนเช้าและที่บริเวณตาตุ่มในตอนเย็น ซึ่งหากปล่อยไว้นานก็อาจจะทำให้เกิดการบวมในบริเวณดังกล่าวได้ตลอดทั้งวัน และมักพบได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปโดยไม่มีการรักษาจะก่อให้เกิดอาการบวมทั้งตัว (anasarca) กดบุ๋มตามหน้าขา หนังตา มีน้ำในช่องท้อง น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หากผู้ป่วยเป็นเด็กอาจตรวจพบได้ว่าน้ำหนักเด็กอาจขึ้นไปถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักตัวปกติ อาการบวมมักจะเป็นมากโดยเฉพาะเวลาตื่นนอนตอนเช้า เมื่อระดับอัลบูมินในเลือดต่ำกว่า 2.5 g/dl ซึ่งเป็นอาการสำคัญที่นำเด็กมาพบแพทย์ ซึ่งลักษณะการบวมมักเป็นแบบกดบุ๋ม (pitting edema) ถ้าบวมมากผิวหนังอาจปริออกจนมีน้ำเหลืองซึมออกมาได้ อาจพบภาวะท้องมาน (ascites) ในเด็กหรือมีอัณฑะบวมได้

3.4.3 *การตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ (Proteinuria)* อาการแสดงทางคลินิกเพียงอย่างเดียวของภาวะ proteinuria ก็คือจะพบได้ว่าปัสสาวะมีฟองมากแต่บางรายอาจไม่พบ

ลักษณะเช่นนี้ การตรวจตะกอนปัสสาวะและพบว่ามีเลือดปะปนออกมาในปัสสาวะขึ้นอยู่กับสาเหตุของภาวะ proteinuria ซึ่งมักจะพบมีเลือดออกได้บ้างในกรณีของ Minimal Changes Diseases แต่จะพบเลือดออกปะปนได้มากจนอาจมองเห็นเลือดปนในปัสสาวะได้ด้วยตาเปล่าร่วมกับการพบ granular casts ในผู้ป่วย Mesangiocapillary หรือ Crescentic Nephritis ที่มีอาการรุนแรง

3.4.4 *ปริมาณไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (hyperlipidaemia)* การเปลี่ยนแปลงของระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกนั้นเป็นผลสืบเนื่องมาจากการสูญเสียโปรตีนอัลบูมินออกไปในปัสสาวะจนทำให้ตับมีการเร่งสร้างโปรตีนชนิดดังกล่าวขึ้นมาทดแทน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวกระตุ้นให้มีการสร้างไขมันเพิ่มสูงตามมา ทั้งนี้อาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของไขมันได้ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ

3.5 อาการแทรกซ้อน

3.5.1 *การติดเชื้อ* พบได้บ่อยโดยเฉพาะในเด็ก ตำแหน่งที่มีการติดเชื้อบ่อยได้แก่ ปอด ช่องท้อง และผิวหนัง เชื้อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญ ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus*, *E.coli*, *Klebseilla* เป็นต้น

3.5.2 *ภาวะลิ่มเลือดในหลอดเลือด (thromboembolism)* ผู้ป่วยกลุ่มอาการโรคไตมีแนวโน้มในการเกิด thrombosis ได้บ่อยโดยเฉพาะที่บริเวณ renal vein ความผิดปกติในระบบแข็งตัวของเลือดที่เกิดขึ้นเกิดจากมีการสูญเสีย factor XII ออกทางปัสสาวะ นอกจากนี้ยังอาจพบการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดดำของไตและปอดได้ (renal vein thrombosis and pulmonary embolism)

3.5.3 *ภาวะขาดโปรตีน (protein malnutrition)* อาจเกิดจากการที่ร่างกายสูญเสียโปรตีนไปอย่างมากและเป็นเวลานานทางปัสสาวะจนทำให้สูญเสียสมดุลของโปรตีนขึ้น

3.5.4 *การเจริญเติบโตช้า (impaired growth)* เป็นผลสืบเนื่องมาจากการขาดโปรตีน (protein malnutrition) อาจเกิดได้ในเด็กกรณีที่ไม่ได้รับการรักษา สำหรับเด็กที่หายแล้วหรือโรคสงบเป็นเวลานานการเจริญเติบโตอาจกลับมาเท่าเด็กปกติได้

3.5.5 *อาการหายใจลำบาก* เป็นผลมาจากการมีน้ำในช่องท้องโดยอาจจะมีหรือไม่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดร่วมด้วยก็ได้

3.6 การตรวจวินิจฉัย

3.6.1 *ตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ* โดยจะพบอัลบูมินในปัสสาวะมีค่าสูง 3+ ถึง 4+ หรือมากกว่า 3.5 กรัม/วัน และสังเกตพบว่าปัสสาวะเป็นฟองมากกว่าปกติ

3.6.2 *มีอัลบูมินในกระแสเลือดต่ำ* โดยมีระดับอัลบูมินในกระแสเลือดน้อยกว่า 2.5 กรัม/เดซิลิตร ผู้ป่วยที่มีอัลบูมินต่ำมากๆ จะมีปริมาตรของเหลวในหลอดเลือดดำลดลงและเกิด prerenal azotemia จนอาจมีภาวะไตวายเฉียบพลันร่วมด้วย ซึ่งเป็นผลจากการอุดกั้นของ distal tubule จากโปรตีนที่จับตัวกันเป็นคาสต์ หรือส่วนของท่อไต (renal tubule) ถูกกดจากที่มีภาวะน้ำคั่งระหว่างเซลล์ (interstitial edema)

3.6.3 *มีระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมาสูงกว่าปกติ* ซึ่งตรวจพบมีค่ามากกว่า 220 mg/dl [9, 67]

3.7 การรักษา หัวใจของการรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ 1) การหยุดยั้งภาวะ heavy proteinuria อาจกระทำได้โดยรักษาสาเหตุการก่อโรคหากทราบ และให้การรักษาโดยใช้ยากดภูมิคุ้มกันในกรณีที่ไม่ทราบสาเหตุ 2) ทำการรักษาเพื่อชะลอการเสื่อมของโรคและป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากภาวะ heavy proteinuria ในรายที่แพทย์ไม่สามารถยับยั้งภาวะ proteinuria ได้ หลักสำคัญในการให้การรักษา มีดังนี้

3.7.1 *การประเมินผลขั้นต้น* (initial evalution) ก่อนที่จะเริ่มการรักษาควรประเมินผลและวินิจฉัยให้ถูกต้องก่อน พร้อมทั้งขจัดปัญหาการติดเชื้อให้เรียบร้อยก่อนการรักษาโดยซักประวัติและตรวจร่างกาย รวมถึงการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ

3.7.2 การ*หยุดยั้งภาวะโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะ* โดยรักษาจากสาเหตุก่อโรค แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะไม่ทราบสาเหตุก่อโรคแน่ชัด การรักษาจึงใช้ยากดภูมิคุ้มกันอันได้แก่ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ และอาจมีการพิจารณาให้ cytotoxic agent เมื่อพิสูจน์ได้ว่าผู้ป่วยมีพยาธิสภาพที่ตอบสนองต่อ steroid และมีหลักฐานว่า steroid สามารถป้องกันหรือชะลอการเสื่อมของไตได้ ตลอดจนการใช้ยาเพื่อลดปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะกลุ่มอื่นๆ กล่าวคือ ยาในกลุ่ม ACEI, ARB, NSAIDs, non-dipyridamole

3.7.3 *การรักษาอาการบวม* ส่วนมากไม่จำเป็นต้องให้ยาขับปัสสาวะ นอกจากรายที่มีอาการบวมมาก หายใจลำบาก อึดอัด นอนราบไม่ได้ และอวัยวะเพศบวมจนถ่ายปัสสาวะลำบาก หรือมีการติดเชื้อที่บริเวณผิวหนัง การให้ยาขับปัสสาวะได้แต่ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเพราะอาจจะทำให้ปริมาตรของของเหลวในหลอดเลือดลดลงจนเป็นสาเหตุของภาวะไขมันในเลือดสูงขึ้น เลือดแข็งตัวง่ายขึ้นและเกิดภาวะช็อกจากปริมาตรพลาสมาที่ลดลงได้

3.7.4 *การรักษาความดันโลหิตสูง* ภาวะความดันโลหิตสูงมักเกิดขึ้นชั่วคราวและสูงไม่มาก สามารถรักษาด้วยการจำกัดเกลือและน้ำ อาจให้ยาขับปัสสาวะร่วมด้วย หากความดันโลหิตไม่ลดลงจึงให้ยาลดความดันโลหิตต่อไป

3.7.5 *การรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง* รักษาได้โดยการรับประทานอาหารที่มีไขมันต่ำซึ่งอาจจะไม่ได้ช่วยลดไขมันในเลือดสูงโดยตรง ก่อนจะพิจารณาให้การรักษาด้วยยาลดไขมันอันได้แก่ ยากลุ่ม statins เช่น lovastatin, pravstatin, simvastatin และ fluvastatin ซึ่งนอกจากฤทธิ์ลดไขมันแล้วยาในกลุ่ม statins นี้จะช่วยป้องกันการเสื่อมของไตได้อีกด้วย จากการศึกษาพบว่าจะช่วยลดโปรตีนรั่วในปัสสาวะและชะลอการเสื่อมของไต การใช้ statins ร่วมกับยากลุ่ม ACEI จะมีประโยชน์ในการควบคุมไขมันในเลือดสูงในผู้ป่วยที่เป็น nephrotic syndrome

3.7.6 *การรักษาประคับประคองตามอาการ* (symptomatic and supportive treatments)

3.7.7 *การรักษาภาวะแทรกซ้อน* ได้แก่ การติดเชื้อ หรือภาวะเลือดจับกันเป็นลิ่ม จะให้การรักษาตามสาเหตุของการเกิดโรค [9, 67]

สำหรับแนวทางปฏิบัติในการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันนั้นต้องตรวจสอบให้แน่ใจเสียก่อนว่าผู้ป่วยไม่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อซ่อนเร้นในร่างกายที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อลุกลามภายหลังได้รับยากดภูมิคุ้มกันแล้ว แต่หากมีการติดเชื้อจะต้องทำการรักษาควบคุมได้ จากนั้นจะเริ่มต้นการรักษาด้วยการให้ยาสเตียรอยด์วันละครั้งและวันเว้นสำหรับผู้ป่วยที่เป็นเด็ก เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 8-12 สัปดาห์ หากผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาจะมีอาการของโรคหายไป (complete remission) ร่วมกับตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะน้อยกว่าวันละ 300 mg ให้พิจารณาลดขนาดยาลงอย่างช้าๆ จนสามารถงดยาได้ภายในเวลา 6-8 เดือน ในกรณีที่ให้ยาสเตียรอยด์ขนาดมาตรฐานเบื้องต้นนาน 8-12 สัปดาห์แล้วพบว่าผู้ป่วยเริ่มมีการตอบสนองต่อยาไม่ดีและไม่เกิด complete remission ให้พิจารณารักษาต่อด้วยด้วยยาสเตียรอยด์ขนาดเดิมต่อไปอีกจนครบ 4-6 เดือน แต่หากยังคงพบว่าผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาดังกล่าวหรือตอบสนองได้ไม่ดี จึงค่อยเริ่มต้นการรักษาด้วย cytotoxic agent ต่อไป

การรักษาด้วยยาสเตียรอยด์และยากดภูมิคุ้มกันนิยมแบ่งการตอบสนองได้ดังนี้

1. Complete remission (CR) เป็นการตอบสนองอย่างดีต่อการรักษา ผู้ป่วยหายจากอาการทางคลินิกของภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติก ระดับซีรั่มครีอะตินินกลับเข้าสู่ระดับปกติ ร่วมกับตรวจพบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะน้อยกว่าวันละ 300 mg หรือ 500 mg สำหรับผู้ป่วยบางราย

2. Partial remission (PR) เป็นการตอบสนองต่อการรักษาเพียงบางส่วน ผู้ป่วยหายจากอาการทางคลินิกของภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติก ระดับซีรั่มครีอะตินินกลับเข้าสู่ระดับปกติ แต่ยังตรวจพบปริมาณโปรตีนในปัสสาวะปริมาณไม่เกินวันละ 2 g

3. Steroid responsive (SD) เป็นภาวะที่จำต้องพึ่งสเตียรอยด์เพื่อให้คงสภาวะ complete remission ในระยะแรกผู้ป่วยตอบสนองดีต่อการรักษา แต่เมื่อทำการลดขนาดยาสเตียรอยด์ลง ผู้ป่วยจะมีอาการของโรคกลับเป็นซ้ำขึ้นมาใหม่ (relapse)

4. Frequent relapse (FR) เป็นภาวะที่จำเป็นต้องพึ่งยาสเตียรอยด์เพื่อควบคุมให้เกิด complete remission อย่างต่อเนื่องและถาวร ผู้ป่วยจะตอบสนองต่อการรักษาได้ดีในระยะแรก แต่เมื่อทำการหยุดยาอาการของโรคจะกลับมาเป็นซ้ำใหม่ และการกลับเป็นซ้ำนี้จะเกิดขึ้นบ่อยกว่า 2 ครั้งในรอบ 6 เดือน หรือบ่อยกว่า 3 ครั้งภายในระยะเวลา 1 ปี บางครั้งอาจจัดการตอบสนองแบบนี้ไว้ในกลุ่มเดียวกับการตอบสนองแบบ steroid responsive

5. Steroid resistance (SR) เป็นภาวะที่ดื้อต่อการรักษา ผู้ป่วยยังคงมีอาการทางคลินิกของภาวะไตอักเสบเนฟโฟรติกและยังมีปริมาณโปรตีนมากกว่าวันละ 3 g หลังจากที่ให้การรักษาด้วยสเตียรอยด์ขนาดมาตรฐานไปแล้วระยะเวลาหนึ่ง นิยมกำหนดให้เวลานี้คือ 8 สัปดาห์ในเด็ก และ 16 สัปดาห์ในผู้ใหญ่ [9]

การรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันนั้นเป็นการรักษาเพื่อป้องกันไม่ให้การเสื่อมของไตลุกลาม ซึ่งแนวทางการรักษาดังกล่าวนั้นไม่สามารถที่จะทำนายโอกาสหรือบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยรายใดบ้างที่จะตอบสนองต่อการรักษาและผู้ป่วยรายใดบ้างที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงยังคงพบอุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยาสเตียรอยด์เกินขนาดโดยไม่จำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ตลอดจนส่งผลเสียต่อทั้งสุขภาพของผู้ป่วยและระบบเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย

4. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวิธีศึกษาวิจัย

4.1 Flow cytometry

4.1.1 **หลักการของ** Flow cytometry

Flow cytometry เป็นวิธีการซึ่งสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งคุณลักษณะภายนอกและภายในเซลล์ โดยจะทำการวิเคราะห์เซลล์ขณะที่เซลล์เคลื่อนที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ผ่านลำแสงเลเซอร์ตามลำดับ สามารถตรวจวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์พร้อมกันหลายๆ ลักษณะได้ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของ flow cyteometer มีดังนี้

a. **ระบบของเหลวและการไหลของเซลล์** (Fluidics and flow cell) การเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ต้องการศึกษาจะอาศัยตัวกลางของเหลวที่มีคุณสมบัติเป็น isotonic solution ซึ่งเรียกว่า sheath fluid และมีการให้แรงดันอากาศเข้าไปพร้อมกับตัวกลางดังกล่าว ซึ่งเซลล์ที่ต้องการศึกษาจะถูกบังคับให้มีทิศทางการเคลื่อนที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เรียงเป็นเส้นตรงไปพร้อมกับ

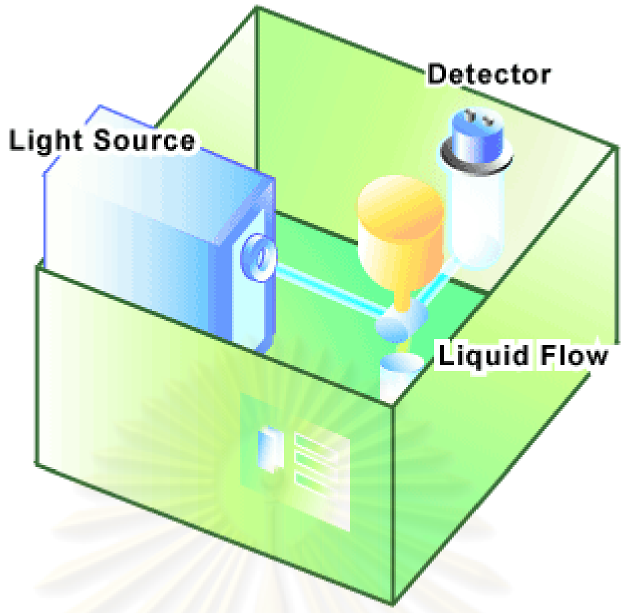
sheath fluid และจะต้องเคลื่อนที่อย่างเป็นระเบียบตรงส่วนกลางของท่อหรือหลอดนำเซลล์ตลอดแนวโดยมี sheath fluid ล้อมรอบเอาไว้ เพื่อป้องกันการผิดรูปของเซลล์ในระหว่างที่เคลื่อนที่ผ่านแสงเลเซอร์

b. **ระบบของแสง** (Light sensing or optics) ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดของพลังงานแสง เลนส์ กระจก และอุปกรณ์รับแสงที่เกิดจากสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้น การเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านแสงเลเซอร์จะทำให้เกิด 2 ส่วนที่สำคัญคือ ส่วนที่กระทบแสงและเงาของเซลล์ โดยเงาที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสัดส่วนแปรผันกับขนาดของเซลล์จึงเรียกลักษณะของการวิเคราะห์แบบนี้ว่า Forword Scatter (FSC) ในกรณีของการวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์หรือแกรนูล จะอาศัยการหักเหของแสงเมื่อกระทบกับองค์ประกอบดังกล่าวและหักเหทำมุมออกจากแสงเลเซอร์เริ่มต้นเป็นมุมต่างๆ เรียกการหักเหแบบนี้ว่า Side Scatter (SSC) ทั้งนี้จำนวนหรือปริมาณของการหักเหของแสงจะแปรผันกับจำนวนของแกรนูลภายในเซลล์

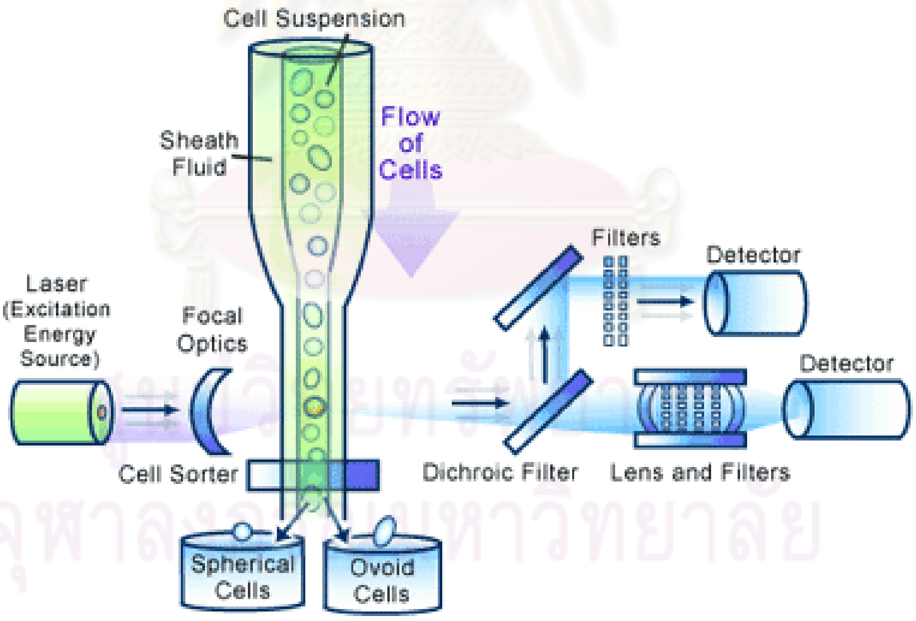
สำหรับเซลล์ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงนั้น เมื่อเซลล์เคลื่อนที่เข้ากระทบกับแสงเลเซอร์ก็จะเกิดการกระตุ้น (excitation) และทำให้อิเล็กตรอนของสารเรืองแสงมีพลังงานสูงขึ้น แต่เพื่อรักษาสภาพสมดุลของเซลล์อิเล็กตรอนดังกล่าวจะพยายามกลับสู่สถานะปกติโดยปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมา (emission) ในรูปของการเรืองแสง ทั้งนี้สามารถใช้อุปกรณ์วัดแสงเพื่อตรวจวัดค่าการเรืองแสงที่ช่วงคลื่นต่างๆ โดยแสดงผลออกมาเป็นสีเรียกแสงสีที่เกิดขึ้นว่า Fluorescence (FL)

c. **ระบบอิเล็กทรอนิกส์** (Electronics) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณคลื่นแสงเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า โดยที่จำนวนสัญญาณคลื่นไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ของไฟฟ้า อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเป็นการวัดแบบ FSC, SSC หรือการเรืองแสงของ fluorescence ภายหลังการแปลงสัญญาณคลื่นแสงเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์แล้วจะถูกเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป [68]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



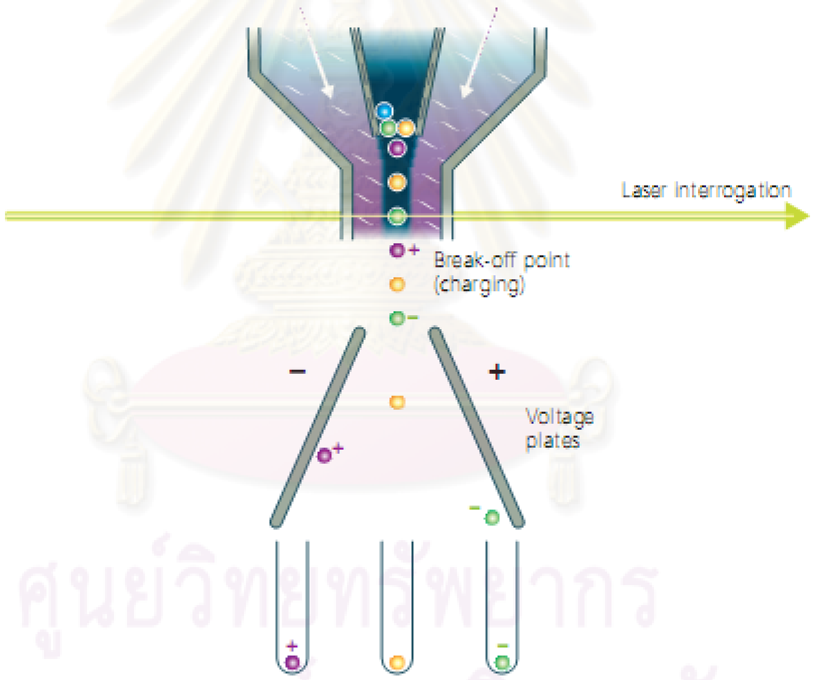
รูปที่ 14 แสดงองค์ประกอบของ flow cytometer [68]



รูปที่ 15 แสดงหลักการของ flow cytometer [68]

4.1.2 **การแยกประเภทของเซลล์เพื่อนำไปศึกษาต่อ** (Cell sorting)

การแยกชนิดของเซลล์ต่างๆ ออกจากกันด้วย flow cytometer เพื่อนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์อื่นนั้นสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน แต่วิธีที่เป็นที่นิยมได้แก่ การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเข้าจับกับแอนติเจนบนผิวของเซลล์ที่ต้องการโดยที่เซลล์ดังกล่าวถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเอาไว้แล้วและมีการกำหนดประจุให้กับเซลล์แตกต่างกันออกไปตามลักษณะการเรืองแสงเมื่อเซลล์ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometer เช่น กำหนดให้เซลล์ที่เรืองแสงสีน้ำเงินมีประจุลบ และกำหนดให้เซลล์ที่เรืองแสงสีแดงมีประจุบวก จากนั้นจะปล่อยให้เซลล์เคลื่อนที่ผ่านไปกระทบกับแสงเลเซอร์และไหลผ่านสนามแม่เหล็ก ซึ่งเซลล์ที่มีประจุบวกจะถูกเหนี่ยวนำให้วิ่งเข้าหาขั้วลบ ในขณะที่เซลล์ที่มีประจุลบจะถูกเหนี่ยวนำให้วิ่งเข้าหาขั้วบวก ด้วยเหตุนี้เซลล์ที่มีประจุแตกต่างกันจึงถูกแยกออกจากกันได้โดยง่าย [69]



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 แสดงการแยกเซลล์ชนิดต่างๆ [69]

4.2 Real-time PCR

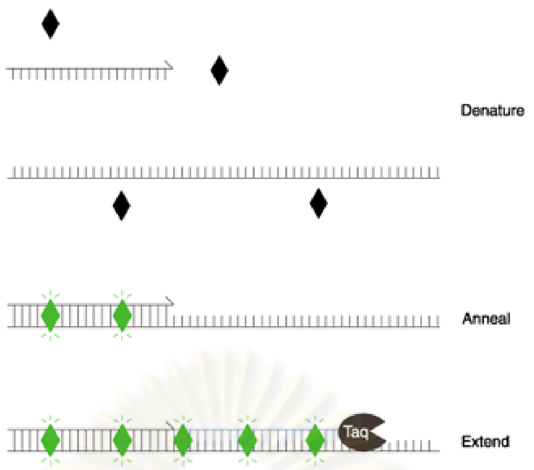
Real-time PCR หรือ quantitative PCR (QPCR) เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาเทคโนโลยี 2 สวนใหญ่ๆ มาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) ประกอบด้วย การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ด้วยการใช้วิธีติดฉลากสารเรืองแสงประเภท fluorochrome กับการพัฒนาเครื่อง thermocycler โดยมีการเพิ่มเติมแหล่ง

กำเนิดแสงเพื่อใช้ในการกระตุ้นสารเรืองแสงที่ติดฉลากไว้บน PCR products ให้เกิดการเรืองแสงขึ้น รวมทั้งเพิ่มเติมส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดในหลอดปฏิกิริยาร่วมด้วย ด้วยเหตุนี้การพัฒนาดังกล่าวจึงช่วยให้สามารถตรวจวัดปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (DNA/RNA) เป้าหมายตั้งต้นจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดได้โดยตรงในทันทีที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ที่จะสามารถตรวจวัด PCR products ได้ก็ต่อเมื่อปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแลว [70-73]

การตรวจสอบสัญญาณทางเคมีของ real-time PCR ประกอบด้วย

1. **การใช้สีที่สามารถแทรกจับกับโครงสร้างของสารพันธุกรรม** อาทิเช่น SYBR Green I ซึ่งเปนสารเรืองแสง (fluorochrome) ประเภทหนึ่ง มีความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ตรงตำแหน่ง minor groove และเมื่อถูกกระตุ้น (excite) ดวยแสงอัลตราไวโอเลต จะเกิดการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงชวงคลื่น (λ) ที่ยาวขึ้น ขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR Green I จะแทรกตัวเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเส้นคู่และถูกกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง แต่ในระหว่างช่วง denature ซึ่งเกิดการคลายเส้นดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยว SYBR Green I ก็จะหลุดออกและมีผลให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง ทั้งนี้จะเกิดการเรืองแสงในลักษณะดังกล่าวจนกว่าการทำ real-time PCR จะเสร็จสิ้น อย่างไรก็ตามโมเลกุลของสีจะจับได้มากน้อยเพียงไรขึ้นอยู่กับความยาวของ PCR product นั้นๆ ร่วมด้วย

เนื่องจากการจับกันระหว่าง SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่เกิดขึ้นแบบไมจำเพาะ ดังนั้นการเปรียบเทียบค่า Tm อันเป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคูแต่ละสายจะช่วยในการแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจาก primer-dimer และ/หรือ non-specific products อื่นๆ ออกจาก specific amplified product ได้ พบว่าค่า Tm จะแปรผันตรงกับ %GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคูนั้นๆ การหาค่า Tm จากเครื่อง real time thermocycler อาศัยการวิเคราะห์จากค่า melting curve โดยมีหลักว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจะทำให้สัญญาณการเรืองแสงลดลงและมีผลให้ค่า Tm ระหว่าง specific amplified product กับ non-specific products หรือ primer-dimer แตกต่างกัน อาทิเช่น ค่า Tm ของ amplified DNA จะมีค่าสูงกว่าค่า Tm ของ primer-dimer เนื่องจาก amplified DNA มีขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอ (>100 bp) ยาวกว่า primer-dimer (15-30 bp)ที่เกิดขึ้น [70-73]

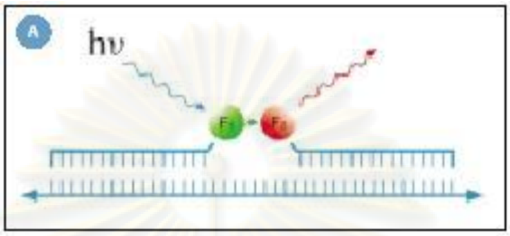


รูปที่ 17 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ SYBR Green I [72]

2. **การใช้ probes ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)** เป็นวิธีการตรวจวัดที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งจะใช้เมื่อการทดสอบนั้นๆ ไม่สามารถกระทำได้ด้วยการใช้ SYBR Green I Dye โดยอาศัยการทำงานของสาร fluorchrome หรือสีฟลูออเรสเซนต์ ในที่นี้จะทำการเชื่อม fluorchrome 2 ชนิดเข้ากับสาย specific probe เมื่อกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูงจะทำให้ fluorochrome ตัวแรกหรือที่เรียกว่า Quencher มีการดูดซับพลังงานเอาไว้ จากนั้นจะถ่ายทอดพลังงานดังกล่าวให้กับ reporter dye ซึ่งเป็น fluorochrome ตัวที่สอง โดยการถ่ายทอดนั้นไม่เกิดการสูญเสียพลังงานในรูปของแสงออกมาสู่ระบบภายนอก และพบได้ว่าการติดฉลาก fluorochrome เขากับ probe สามารถกระทำไดหลายลักษณะ เชน

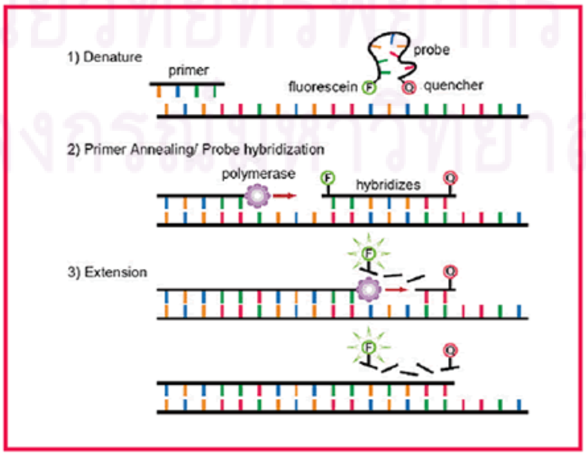
2.1 **Hybridization probe** อาศัยการติดฉลาก oligonucleotide probe สายสั้นสองสายที่มีลำดับเบสตอเนื่องกัน แต่มีการเวนชวงระหวางปลาย 3’ ของ oligonucleotide probe เส้นแรกกับปลาย 5’ ของ probe อีกเสนหนึ่งประมาณ 1-5 bp ปลายด้าน 3’ ของ oligonucleotide probe สายแรกด้วยจะถูกติดฉลากไว้ด้วย donor fluorophore ส่วนสายที่สองจะปิดปลายสายด้าน 3’ ด้วย phosphate group เพื่อป้องกันไมใหสามารถทำหนาที่เปน PCR primer ได้ ขณะที่ปลายสายด้าน 5’ ติดฉลากดวย acceptor fluorophore ซึ่งเมื่อเกิด hybridization ระหว่าง probe ทั้งสองเส้นกับดีเอ็นเอเปาหมาย (PCR products) จะเกิดการถ่ายทอดพลังงานในรูปแบบของ FRET ที่มีข้อดีในแง่ของการตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงที่กระทำไดในทุกชวงของขั้นตอน annealing และในช่วงแรกของขั้นตอน extension นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้ hybridization probe ทดแทน SYBR Green I Dye เพื่อการตรวจสอบ amplified products ในกรณีของการเกิด single point mutation หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ไดเปนอยางดี ทั้งนี้กลไก

ของการตรวจวัดสัญญาณจะอาศัยการเพิ่มความรอนขึ้นอยางตอเนื่องอันจะมีผลให้เกิดการหลุดออกมาก่อนของ probe ที่จับกับดีเอ็นเอเปาหมายซึ่งมีเบสบางตําแหนงไมเป็นคูสม (mismatch) ในชวงอุณหภูมิที่ต่ำกวา ในทางเดียวกันนี้หาก probe จับกับดีเอ็นเอเปาหมายที่มีเบสคูสมกันทั้งหมด (perfect match) การหลุดออกของ probe จะเกิดขึ้นในชวงอุณหภูมิที่สูงกวาในตอนท้ายของกระบวนการ



รูปที่ 18 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Hybridization probe [72]

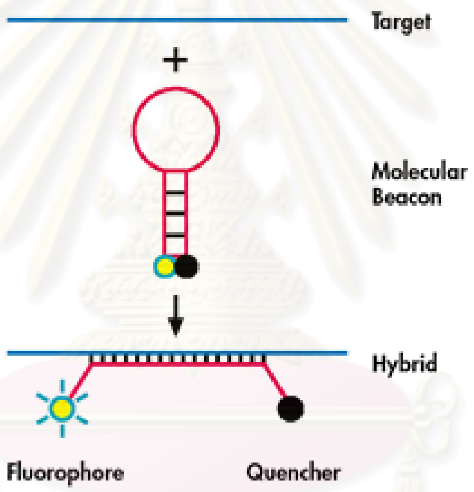
2.2 **Hydrolysis probe (Taqman)** probe ในลักษณะนี้เป็นแบบ dual-labeled probe โดยอาศัยการติดฉลาก reporter dye ที่ปลาย 5' ของ oligonucleotide probe เสนเดียว ส่วน quencher dye จะทําการติดฉลากที่ปลาย 3' โดยให้ห่างจากภายในสาย probe ไมเกิน 5 bp เมื่อกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูงในขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (intact) quencher จะดูดแสง fluorescence ของ reporter fluorophore เอาไว้ แต่หากเกิดการ amplify target sequence แล้ว เอนไซม์ Taq (Thermus aquaticus) DNA polymerase ที่มี 5' nuclease activity อยู่จะตัดส่วนของ reporter dye ให้หลุดเปนอิสระและหางจาก quencher dye ทําใหสามารถคายพลังงานในรูปของแสงไดเมื่อถูกกระตุ้นการทํางาน



รูปที่ 19 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Taqman probe [72]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

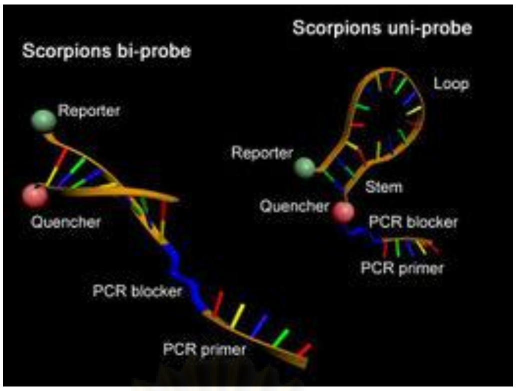
2.3 **Molecular Beacons** ลักษณะโครงสร้างของสาย oligonucleotide probe มีลักษณะโคงงอคลายกิ๊บหนีบผม หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า hair pin loop จากการที่โครงสร้างของ oligonucleotide probe โดยเฉพาะอย่างยิ่งสวนที่มีลำดับเบสเปน G-C rich มีตำแหน่งที่ยึดติดกันดวย hydrogen bond เป็นจำนวน 5-7 nucleotides จึงทำให้เกิดลักษณะพิเศษกล่าวคือปลาย 5’ ซึ่งติดฉลากดวย reporter dye และปลาย 3’ ซึ่งติดฉลาก quencher dye ถูกดึงเขามาอยูใกลกัน มากจน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก reporter dye ได้ นอกจากนี้แล้วจะมีการสร้างลำดับเบสคูสมกับดีเอ็นเอเปาหมายที่บริเวณ loop ประมาณ 5 -30 nucleotides เมื่อเกิดการจับกันระหว่าง Molecular Beacon กับดีเอ็นเอเปาหมาย ตำแหน่งของ hairpin structure จะถูกกระตุ้นให้สลายไป มีผลทำให reporter dye อยู่ห่างจาก quencher dye มากขึ้นจนสามารถเปล่งสัญญาณแสงออกมาไดเมื่อถูกกระตุ้นดวยแสงพลังงานสูง



รูปที่ 20 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Molecular Beacons [72]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 **Scorpion probes** มีโครงสร้างเป็น hairpin loop เช่นเดียวกันแต่มีการเชื่อมเข้ากับปลาย 5’ ของ primer ซึ่ง probe สามารถเข้าจับกับเบสคู่สมบนโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายได้ภายหลังปฏิกิริยาใน extension แล้ว ซึ่งการจับกันระหว่าง probe กับดีเอ็นเอเป้าหมายจะทำให้โมเลกุล hairpin loop ของ probe ถูกเปิดออก ซึ่งจะทำให้มีการปลดปล่อยพลังงานในรูปของฟลูออเรสเซนต์ได้



รูปที่ 21 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ Scorpion probes [72]

2.5 **Simple plobe** อาศัยการทำงานของ probe เพียงเส้นเดียวและมีการติดฉลากไว้ด้วย reporter fluorophore กับ linker ในช่วง annealing ขณะที่ probe จับกับ target sequence จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของทั้ง reporter fluorophore กับ linker มีผลทำให้ reporter เปล่งสัญญาณ fluorescence ในช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร (nm) [70-73]

อย่างไรก็ตามในการทำ real-time PCR ยังต้องอาศัยหลักการพื้นฐานของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสายของนิวคลิอิกที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายหรือที่เรียกว่า PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งการทำปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนที่เกิดขึ้นหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ได้แก่

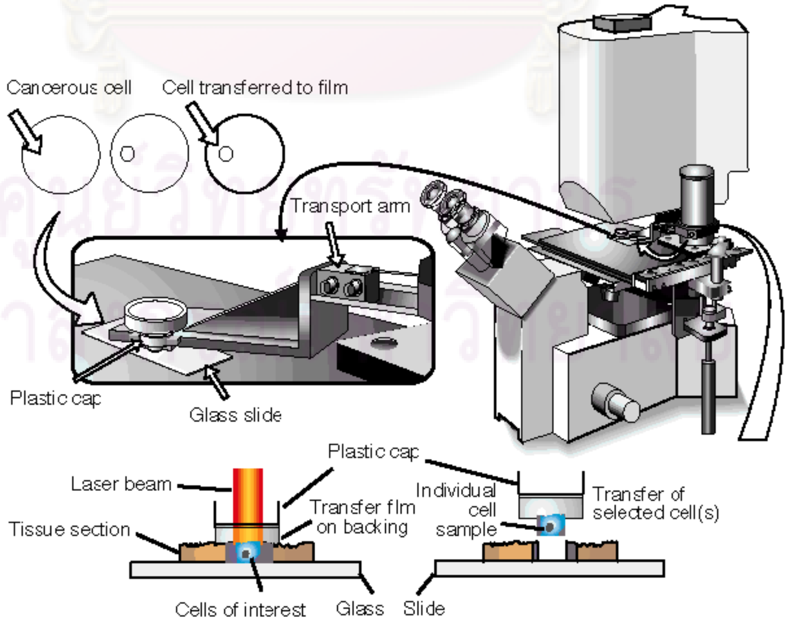
1. denaturing เป็นขั้นตอนของการทำลายพันธะระหว่าง nucleotides เพื่อแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งทำหน้าที่เป็นต้นแบบให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 95° C
2. annealing เป็นขั้นตอนที่กระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่าง primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ กับ DNA ต้นแบบที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน โดยมีการลดอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 50-60° C ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับแต่ละ primer
3. extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 3’ ของ primer ตามลำดับเบสบน DNA ที่เป็นต้นแบบ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72° C

4.3 Laser Capture Microdissection

หลักการของ laser capture microdissection อาศัยการปล่อยแสง laser (UV หรือ infrared) ที่ต่อเชื่อมกับกล้องจุลทรรศน์ผ่าน objective lenses ซึ่งจะทำให้เกิดการบีบลำแสงให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก (µm) ออกมา ด้วยการบังคับแสงให้มีลักษณะเป็นลำแสงแคบๆ นี้จะทำให้เกิดพลังงานมากเพียงพอที่จะสามารถตัดหรือละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้ (laser

microdissection) ณ จุดรวมแสงนี้ (รอยตัด) จะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า photofragmented ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตั้งต้นของตัวอย่างไปเป็นโมเลกุลหรืออะตอมแทน โดยที่เนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียงไม่ถูกทำลายไปด้วย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมสีตามขั้นตอนของพยาธิวิทยาแล้ว (frozen sections หรือ fixed wax-embedded sections) หรือเซลล์ที่ได้จากการเตรียมตามวิธีอื่นๆ และตัดชิ้นเนื้อดังกล่าวให้มีขนาดความหนา 3-5 μm โดยจะถูกนำไปวางไว้บนแผ่น slide ที่เคลือบด้วย thermoplastic membrane ซึ่ง plastic membrane ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเกาะติดกับ cap (tube ขนาดเล็กสำหรับรองรับเซลล์หรือกลุ่มเซลล์หลังการคัดแยก) และจะละลายได้เมื่อสัมผัสลำแสง laser โดยตรงหลังจากผ่านการเลือกบริเวณที่สนใจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพลาสติกดังกล่าวเย็นตัวลงและแข็งตัวอีกครั้งเซลล์ที่ต้องการก็จะถูกฝังตัวอยู่ในแผ่นพลาสติกดังกล่าวและจะถูกนำออกจากชิ้นเนื้อโดยการผลักให้ติดกับฝาของ cap เซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก็จะผ่านกระบวนการเช่นเดียวกันนี้ แสงเลเซอร์ที่ใช้ในระบบของ laser capture microdissection จะมีลำแสงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่แคบเพียงพอสำหรับการตัดแยกเซลล์เดี่ยวๆ หรือกลุ่มก้อนเซลล์ ทั้งนี้การคัดแยกเซลล์ด้วยวิธีนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยไม่มีการถ่ายเทความร้อนจึงยังคงคุณสมบัติอันได้แก่ DNA, RNA และ protein ไว้อย่างสมบูรณ์เหมาะสมต่อการนำไปสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาด้วยวิธี PCR การศึกษา gene expression รวมทั้งการศึกษาด้าน proteomics [74-77]



รูปที่ 22 แสดงหลักการของ Laser Capture Microdissection (77)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบไปข้างหน้า (Prospective study) โดยตรวจติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 4 เดือน ซึ่งการศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้วก่อนที่จะเริ่มการศึกษาวิจัย

2. ประชากร (Population)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาจากตัวอย่างปัสสาวะ เลือดและชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไตของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 17 จนถึง 64 ปี ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร โดยมีข้อกำหนดดังนี้

2.1 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

- ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก โดยการตรวจปัสสาวะ 24 ชั่วโมงพบว่ามีโปรตีนมากกว่า 3.5 กรัมต่อพื้นที่ผิว 1.73 ตารางเมตร หรือตรวจพบ Urine Protein to Creatinine Ratio (UPCR) มากกว่า 3 และผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาที่คลินิกผู้ป่วยอายุรกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2.2 กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (cyclophosphamide, azathioprine, cyclosporine, mycophenolate mofetil, chlorambucil) หรือยาสเตียรอยด์ภายในระยะเวลา 6 เดือนก่อนเข้าร่วมการวิจัย
- มีข้อห้ามในการเจาะชิ้นเนื้อพิสูจน์ได้แก่ ภาวะเลือดออกผิดปกติหรือความดันโลหิตสูงที่ไม่สามารถควบคุมได้
- ได้รับยาในกลุ่ม ACE inhibitors หรือ angiotension II receptor blockers
- ผู้ป่วยปฏิเสธเข้าร่วมวิจัย

ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บจากผู้ป่วยจะต้องเก็บเมื่อปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้าของวัน และมีคุณลักษณะเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางคลินิกเป็นไปตามกฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา โดยตัวอย่างดังกล่าวจะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) จะนำไป

ตรวจวัดระดับครีอะตินินและโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) ส่วนที่สองปริมาตร 50 ml จะนำไปตรวจนับ podocyte cells ส่วนที่สามปริมาตร 50 ml จะนำไปปั่นแยกตะกอนเพื่อใช้ตรวจวัด podocyte marker และส่วนสุดท้ายปริมาตรอย่างน้อย 1 ml จะนำไปตรวจวัดระดับโปรตีนชนิด VEGF ต่อไป

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการเจาะเก็บจากเส้นเลือดดำของผู้ป่วยก่อนจะนำไปปั่นตกตะกอนและเก็บเอาเฉพาะส่วนของซีรั่มไปทำการตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินิน

ส่วนตัวอย่างชิ้นเนื้อไตนั้นได้จากผู้ป่วยที่จำเป็นต้องทำการตรวจยืนยันพยาธิสภาพตลอดจนการลุกลามของรอยโรคที่เกิดขึ้นบนเนื้อไตโดยวิธีเจาะชิ้นเนื้อไต ตัวอย่างที่ได้จะนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจ ร่วมกับการตรวจนับจำนวนเซลล์และการแสดงออกของ podocyte marker โดยอาศัยหลักการทาง immunohistochemistry

2.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้อัตราการตรวจพบผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่มาเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการบวมทั่วร่างกาย ดังแสดงในสูตรการคำนวณนี้

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size Determination)

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

Z_α = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% มีค่าเท่ากับ 1.96 (two-tailed)

Z_β = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดให้ type II error = 10% มีค่าเท่ากับ 1.28

r = ขนาดความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรที่คาดว่าจะพบได้ กำหนดให้เท่ากับ 0.6

$$C(r) = (1/2) \log_e[(1+r) / (1-r)]$$
$$= (1/2)(1.386294)$$
$$= 0.693147$$

$$n = [(1.96+1.28) / 0.693147]^2 + 3$$
$$= 24.84939 \sim 25$$

ดังนั้นประชากรตัวอย่างที่ต้องนำมาศึกษา มีจำนวนเท่ากับ 30 คน

3. **การสังเกตและการวัด** (Observations and Measurements)

3.1 ตัวแปรในการวิจัย (Research Variables)

1) ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ
2) ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด
3) ปริมาณ BUN ในเลือด
4) ปริมาณครีอะตินินในเลือด
5) จำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้ในปัสสาวะโดยประกอบด้วย podocyte cells, SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells, SMA-VEGF cells และ VEGF cells
6) ระดับโปรตีน VEGF ในปัสสาวะ
7) ระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะ
8) ระดับการแสดงออกของยีน VEGF ใน glomeruli บนชิ้นเนื้อไต
9) การติดสี WT-1 ใน glomeruli
10) การติดสี VEGF ใน glomeruli
11) ลักษณะการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์โดยแบ่งเป็น steroid sensitiveness และ steroid resistance

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดและคำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Research Equipments and Operational Definitions)

ก. ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

สามารถทำได้โดย

1) คำนวณจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
2) คำนวณจากสัดส่วนระหว่างระดับโปรตีนในปัสสาวะเทียบกับระดับครีอะตินินในปัสสาวะ (UPCR)
3) ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

ข. ปริมาณคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ BUN และครีอะตินินในเลือด

สามารถทำได้โดย

1) คำนวณจากการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำ
2) ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. **จำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้ในปัสสาวะโดยประกอบด้วย** podocyte cells, SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells, SMA-VEGF cells **และ** VEGF cells

สามารถทำได้โดย

1) ย้อมเซลล์โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับ anti-human podocalyxin, anti-human VEGF และ anti-human alpha-Smooth Muscle Actin
2) ตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer

ง. **ระดับโปรตีน VEGF ในปัสสาวะ**

สามารถทำได้โดย

1) คำนวณจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
2) ตรวจวัดด้วยเครื่อง Luminometer

จ. **ระดับการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะ**

สามารถทำได้โดย

1) อาศัยการทำปฏิกิริยาโดย Hydrolysis probe (Taqman)
2) ตรวจวัดด้วย Real-Time PCR Systems

ฉ. **ระดับการแสดงออกของยีน VEGF ใน glomeruli บนชิ้นเนื้อไต**

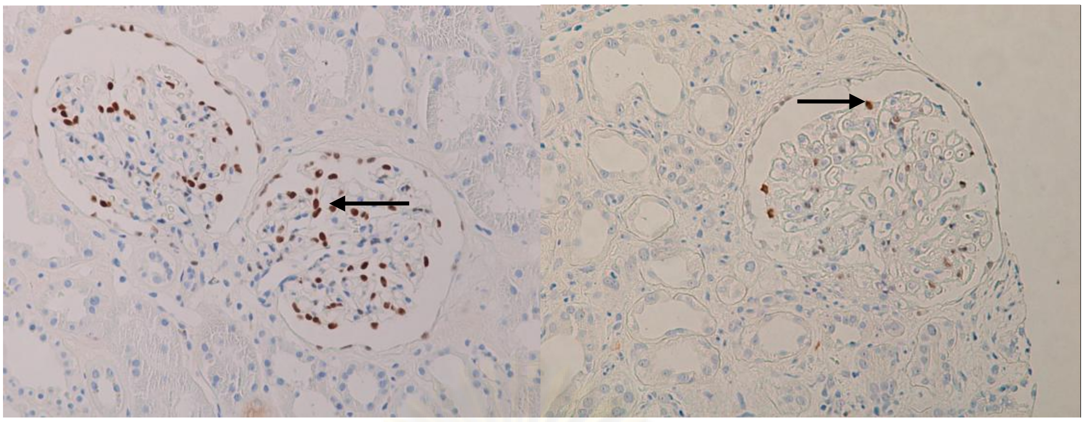
สามารถทำได้โดย

1) อาศัยการทำปฏิกิริยาโดย Hydrolysis probe (Taqman)
2) ตรวจวัดด้วย Real-Time PCR Systems

ช. **การติดสี WT-1 ใน glomeruli**

1) ย้อมชิ้นเนื้อไตโดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับ anti-human WT-1
2) อ่านการติดสี WT-1 ใน glomeruli โดยเปรียบเทียบกับไตปกติซึ่งได้จากผู้บริจาคไต จำนวน 2 ราย (ดังแสดงในรูปที่ 23)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 ภาพ light microscopy ของการติดสี WT-1 ใน glomeruli ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า (ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งการติดสี WT-1 ในนิวเคลียสของ podocyte cells)

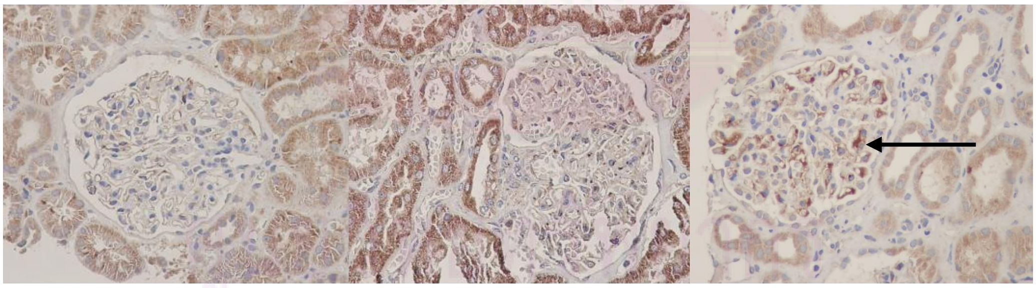
ภาพซ้าย คือ การติดสี WT-1 ใน glomerulus ของไตปกติ

ภาพขวา คือ การติดสี WT-1 ใน glomerulus ของไตผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

ซ. การติดสี VEGF ใน glomeruli

1) ย้อมชิ้นเนื้อไตโดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับ anti-human VEGF

2) อ่านการติดสี VEGF ใน glomeruli โดยเปรียบเทียบกับไตปกติซึ่งได้จากผู้บริจาคไต จำนวน 2 ราย (ดังแสดงในรูปที่ 24)



รูปที่ 24 ภาพ light microscopy ของการติดสี VEGF ใน glomeruli ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า (ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งการติดสี VEGF ในไซโตพลาสซึมของ podocyte cells)

ภาพกลาง คือ การติดสี VEGF ใน glomerulus ของไตปกติ

ภาพซ้าย คือ การติดสี VEGF ใน glomerulus ที่**<u>ลดลง</u>**เมื่อเทียบกับไตปกติ

ภาพขวา คือ การติดสี VEGF ใน glomerulus ที่**<u>เพิ่มขึ้น</u>**เมื่อเทียบกับไตปกติ

ฌ. **ลักษณะการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์โดยแบ่งเป็น** steroid sensitiveness **และ** steroid resistance

แบ่งการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์เป็น 2 กลุ่มคือ

- Steroid sensitiveness หมายถึง ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะภายหลังจากได้รับการรักษาลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับระดับโปรตีนในปัสสาวะก่อนเริ่มทำการรักษาแต่ไม่น้อยกว่าวันละ 300 mg จนถึงเหลือน้อยกว่าวันละ 300 mg
- Steroid resistance หมายถึง ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะภายหลังจากได้รับการรักษาไม่ลดลง หรือลดลงน้อยกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับระดับโปรตีนในปัสสาวะก่อนเริ่มทำการรักษา

4. **การรวบรวมข้อมูล** (Data Collection)

ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึก (Record form) และคอมพิวเตอร์ รวมถึงตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูลทั้งหมดเพื่อให้ได้ครบถ้วนตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ ก่อนจะนำมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติต่อไป

5. **การวิเคราะห์ข้อมูล** (Data Analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 โดย

ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative variables) อาทิเช่น เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง เป็นต้น จะวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ย (mean) พิสัย (Range) และช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% Confidence Interval)

ทดสอบความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณ อาทิเช่น ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินิน ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมด้วยสถิติ Independent T test

ทดสอบความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณ อาทิเช่น ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินิน ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกันด้วยสถิติ One-Way ANOVA

ทดสอบความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณ อาทิเช่น ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินิน ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ต่างกันด้วยสถิติ Man Whitney U test

ทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ อาทิเช่น ร้อยละของการติดสี VEGF ใน glomeruli จำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้ในปัสสาวะ โดยใช้ Pearson Correlation

6. วิธีการวิจัย

6.1 การตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ BUN และซีรั่มครีอะตินินในตัวอย่างเลือด

ตรวจวัดระดับสารชีวเคมีในเลือดและปัสสาวะด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติโดยห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 การตรวจนับ podocyte cells ด้วยวิธี flow cytometry

ก. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี (Efficacy) ด้วย podocyte cells เพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยง podocyte cells แล้วแบ่ง podocyte cells ที่ได้เป็น 6 ส่วนเท่าๆ กัน จากนั้นนำไปให้ผู้วิจัยเพียงรายเดียวทำการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษา โดยเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละตัวอย่างจะใช้ความเร็วรอบในการปั่นตกตะกอนที่แตกต่างกันดังนี้คือ 1,500; 2,000; 3,000; 3,500; 5,000 และ 10,000 rpm ซึ่งวิธีการย้อมเซลล์ก่อนนำไปตรวจนับด้วยวิธี Flow Cytometry มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ปรับปริมาตรด้วย Phosphate Buffer Solution (PBS) ให้มีปริมาตร 50 ml จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส (°C)

↓

ทิ้งของเหลวส่วนบนแล้วผสมส่วนที่เป็นตะกอนปัสสาวะที่ติดอยู่ก้นหลอดให้เข้ากันดีก่อนจะวัดปริมาตรของตะกอนปัสสาวะที่ได้

↓

ดูดแบ่งตะกอนปัสสาวะ 1 ใน 3 ส่วนของตะกอนปัสสาวะทั้งหมดใส่ในหลอดสำหรับตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry เติม 4% paraformaldehyde ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (µl) ลงไปและผสมให้เข้ากันดี นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4° C ให้พ้นแสง เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control)

↓

ตะกอนปัสสาวะส่วนที่เหลือเติม anti-podocalyxin 10 µl ผสมให้เข้ากันดีและนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 4°C ให้พ้นแสง นาน 30 นาที

↓

เติม PBS 3 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

เติม 4% paraformaldehyde 3 ml ผสมให้เข้ากันดี และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ให้พ้นแสง นาน 15 นาที

↓

นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

เติม 0.1% saponin 3 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ให้พ้นแสง นาน 15 นาที

↓

นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

เติม anti- vascular endothelial growth factor (VEGF) และ anti-alpha, smooth muscle actin (SMA) อย่างละ 10 µl ผสมให้เข้ากันดี นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ให้พ้นแสงนาน 30 นาที

↓

เติม PBS 3 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C

↓

เติม IgG-FITC 10 µl ผสมให้เข้ากันดี นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ให้พ้นแสง นาน 30 นาที

↓

เติม PBS 3 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนทิ้ง

↓

เขย่าตะกอนปัสสาวะที่ได้ให้เข้ากันจากนั้นเติม 4% paraformaldehyde 400 µl ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงดูดวัดปริมาตรที่ได้ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow Cytometer

ข. การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ด้วย podocyte cells เพาะเลี้ยง

<u>*Intra-observation assay*</u>: ทำการเพาะเลี้ยง podocyte cells แล้วแบ่ง podocyte

cells ที่ได้ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน จากนั้นนำไปให้ผู้วิจัยเพียงรายเดียวทำการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษาดังวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1 และนำไปตรวจนับด้วยวิธี Flow Cytometry

<u>*Inter-observation assay*</u>: ทำการเพาะเลี้ยง podocyte cells และตรวจนับจำนวนแล้วจึงแบ่ง podocyte cells ที่ได้ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน จากนั้นนำไปให้ผู้วิจัย 3 คน ทำการศึกษาดังวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1 และนำไปตรวจนับด้วยวิธี Flow Cytometry

ค. การทดสอบความไว (Sensitvity) **และความจำเพาะ** (Specificity) **ด้วย** podocyte cells **เพาะเลี้ยง**

ทำการเพาะเลี้ยง podocyte cells แล้วแบ่ง podocyte cells ที่ได้ออกเป็น 6 ส่วนเท่าๆ กันสำหรับใช้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก และใช้ PBS เป็นตัวอย่างที่ให้ผลลบ จากนั้นนำไปให้ผู้วิจัยเพียงรายเดียวทำการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษาดังวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1

ง. การตรวจนับ podocyte cells **ในตัวอย่างปัสสาวะ**

ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้าของผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุมปริมาตร 50 ml นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm และทำการศึกษาด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2.1

7. **การศึกษา** podocyte marker (VEGF) **ในปัสสาวะด้วยวิธี** Chemiluminescent ELISA

เตรียมน้ำยา, working standard ตัวอย่างตรวจวิเคราะห์และ microplate stripes

↓

เติม Assay diluent 150 μl ลงใน microplate stripes ให้ครบทุกหลุม

↓

เติม standard, control หรือตัวอย่างตรวจ 50 μl ลงใน microplate stripes จากนั้น incubate ไว้ 2 ชั่วโมง บน horizontal orbital microplate shaker ความเร็ว 500±50 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

↓

ผสมสารละลายโดยการดูดปล่อยให้เข้ากันดีและดูดล้างด้วย wash buffer 400 μl 4 ครั้ง

↓

เติม VEGF conjugate 200 μl ลงใน microplate stripes แล้ว incubate ไว้ 3 ชั่วโมง โดยวางไว้บน horizontal orbital microplate shaker ความเร็ว 500±50 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

<u>*หมายเหตุ*</u>: ในระหว่างนี้ต้องเตรียม working Glu reagent ไว้ล่วงหน้าเพื่อใช้สำหรับขั้นตอนต่อไป

↓

ผสมสารละลายโดยการดูดปล่อยให้เข้ากันดีและดูดล้างด้วย wash buffer 400 μl 4 ครั้ง

↓

เติม working Glu reagent 100 µl ลงในทุกหลุมของ microplate stripes แล้วจึง incubate ไว้นาน 5-20 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

↓

นำไปตรวจวัดระดับ VEGF

8. **การศึกษา** podocyte marker **ในปัสสาวะและตัวอย่าง** podocyte cells **ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี** quantitative real-time PCR

8.1 **การสกัด** RNA (RNA extraction) **จากตัวอย่างตะกอนปัสสาวะด้วยวิธี** High pure viral RNA kit

ตะกอนปัสสาวะที่ได้จากการปั่นตกปัสสาวะปริมาตรเริ่มต้น 50 ml ด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm จะถูกเติม RNA Stabilization Reagent (Qiagen RNAlater) เพื่อคงสภาพของ RNA ไว้และเก็บที่อุณหภูมิ -80 ^{o}C จากจะนำมาสกัด RNA ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

ปั่นตกตะกอนตัวอย่างด้วยความเร็ว 300-500 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C

↓

ดูดส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (RNA Stabilization Reagent) ทิ้งไปเติม Binding buffer supplemented with Poly A 400 ml ผสมให้เข้ากัน

↓

ดูดส่วนผสมที่ได้ปริมาตร 200 µl ไปใส่ใน pure filter tube ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C

↓

ถอด collection tube ทิ้ง (พร้อมทั้งของเหลวที่เหลือ) และเปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่ จากนั้นเติม inhibitor removal buffer 500 µl นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C

↓

เปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่ จากนั้นเติม wash buffer 450 µl นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C

↓

เปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่ จากนั้นเติม Wash Buffer 450 µl นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

↓

นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 g นาน 10 วินาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

เปลี่ยน microtube อันใหม่สำหรับเก็บ RNA จากนั้นเติม Elution Buffer 50 µl นำไปปั่น
ตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

จะได้ RNA และนำไปตรวจวัดความเข้มข้นก่อนจะนำไปศึกษาขั้นตอนต่อไป

8.2 การสกัด RNA (RNA extraction) ด้วยวิธี High pure viral RNA kit จากตัวอย่าง podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตที่ได้จากการตัดแยกด้วยวิธี Laser Capture Microdissection

ทำการสกัด RNA เช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 4.1 แต่เปลี่ยนตัวอย่างจากตะกอนปัสสาวะเป็น podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตที่ได้จากการตัดแยกด้วยวิธี Laser Capture Microdissection (LCM)

8.3 การตัดแยก glomeruli ด้วยวิธี Laser Capture Microdissection

<u>ก. ขั้นตอนการเตรียมสไลด์ (slide) ชิ้นเนื้อ</u>

1. ตัด tissue section จาก paraffin block ด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 3-4 µm จากนั้นนำไปลอยในอ่างน้ำแล้วใช้ membrane slide ช้อนติดขึ้นมาบนผิว slide โดยให้ slide แต่ละแผ่นมี 1-2 sections

2. อบหรือตาก slide ให้แห้งสนิทโดยการนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 37°C

3. ขจัดเอา paraffin ออกจาก tissue section (deparaffinization) ด้วยการแช่ slide ลงใน xylene 3 อาง นานอ่างละ 30 นาทีหรือจนชิ้นเนื้อมีลักษณะใส

4. นำไปผ่าน absolute ethanol 2 อาง, 95% ethanol 2 อาง และน้ำกลั่น 2 นาที ตามลำดับ เพื่อล้าง xylene ออกและเป็นการคืนน้ำให้เข้าไปในเซลล์ อีกทั้งยังเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อก่อนจะนำไปศึกษาต่อไป

<u>ข. ขั้นตอนการตัดแยก glomeruli ด้วยวิธี Laser Capture Microdissection</u>

1. เปิดคอมพิวเตอร์และเครื่อง Laser Capture Microdissection พร้อมปรับระดับรูปแบบการทำงานให้เรียบร้อย

2. นำ membrane slide ที่มีชิ้นเนื้อไตวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์ที่ต่อเชื่อมกับ

Laser Capture Microdissection และนำ microtube สำหรับเก็บตัวอย่างที่ตัดแยกได้ต่อเชื่อมไว้บนแขนเหล็กเหนือ membrane slide ที่มีชิ้นเนื้อไตดังกล่าว

3. ใช้เครื่องมือวาดรูปแบบอิสระเพื่อกำหนดขอบเขตของการตัดแยกผ่านหน้าจอของ Laser Capture Microdissection และปล่อยให้ Laser Capture Microdissection ทำการตัดแยกชิ้นเนื้อไตไปเก็บไว้ใน microtube ในข้อ 2 ทำเช่นนี้จนครบทุกชิ้นเนื้อไต

4. ใช้คำสั่งตรวจสอบ microtube เพื่อประเมินผลการตัดแยก

5. ถอด microtube ออกจากแขนเหล็กและนำไปทำการสกัด RNA ทันทีหรือเก็บไว้ที่ –70 ºC ได้ไม่เกิน 1 วัน

8.4 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ podocyte marker ในปัสสาวะและ podocyte cells ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี quantitative real-time PCR

ก. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ VEGF ด้วยวิธี Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA ที่ได้หลังการสกัดตามวิธีในข้อ 4.1 จะนำไปแปลงเป็น cDNA โดยใช้ transcriptor first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche, cat.no. 04379012001) โดยใช้ส่วนผสมและควบคุมอุณหภูมิอ้างอิงตามคู่มือของชุดทดสอบดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR สำหรับ Template-Primer mix เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA ของ VEGF gene และ 18s rRNA gene

สารเคมี	**ปริมาตร** (µl/tube)
Distilled water	10
600 µM random hexamer	2
RNA template	1
Total volume	13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR สำหรับ master mix เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA ของ VEGF gene และ 18s rRNA gene

สารเคมี	**ปริมาตร** (μl/tube)
5X transcriptor RT reaction buffer	4
20U Transcriptor reverse transcriptase	0.5
40U Protector RNase inhibitor	0.5
1 mM dNTP	2
Total volume	7

เมื่อเตรียมส่วนผสมสำหรับ Template-Primer mix เรียบร้อยแล้วจึงนำไปอุ่นด้วยเครื่อง thermal cycler ตามขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงเติมส่วนผสม master mix ใส่ลงไป โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอน cDNA Synthesis ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA ของ VEGF gene และ 18s rRNA gene

cDNA Synthesis	**อุณหภูมิ** (°C)	**เวลา (นาที)**
Preparation		
- Denaturation	65	10
cDNA Synthesis	25	10
	50	60
	85	5
	4	α

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR

Gene	Primers	Type	Sequence (5'---> 3')
VEGF-β	VEGF_F	Forward	CCTACAGCACAACAAATGTGAATG
	VEGF_R	Reverse	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA
	VEGF_P	Probe	[6-FAM]-CAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCT-[TAMRA-6-FAM]
18s rRNA	18s rRNA _F	Forward	GCCCGAAGCGTTTACTTTGA
	18s rRNA _R	Reverse	TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC
	18s rRNA _P	Probe	[6-FAM]-AAAGCAGGCCCGAGCCGCC [TAMRA-6-FAM]

ในขั้นตอนของการวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี real-time quantitative PCR โดยใช้ Taqman PCR kit (Roche, cat.no. 04379012001) ซึ่งใช้คุณสมบัติ 5' nuclease activity ของ taq polymerase เป็นตัวบ่งชี้การแสดงออกของยีนที่สนใจ ทั้งนี้ใช้ส่วนผสมและควบคุมอุณหภูมิอ้างอิงตามคู่มือของชุดทดสอบดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา RT-PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออกของ VEGF gene และ 18s rRNA gene

สารเคมี	**ปริมาตร** (µl/tube)
Master mix	4
20 µM Forward primer	0.5
20 µM Reverse primer	0.5
5 µM Probe	0.4
Water (PCR grade)	9.6
DNA template	5
Total volume	20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ VEGF gene และ 18s rRNA gene

Analysis mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition mode
Pre-incubation					
None	1	-	95°C	10 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 s	none
		Annealing	60°C	30 s	none
		Extension	72°C	1 s	single
Cooling					
None	1	-	40°C	30 s	none

9. **การตรวจนับจำนวน** podocyte cells **ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต**

9.1 **การตรวจนับจำนวน** podocyte cells **ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต**

ทำการศึกษาโดยอ้างอิงหลักการทางอิมมูโนพยาธิวิทยาหรือ Immunohistochemistry ด้วยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อส่วนของ Wilms tumor-1 protein (WT-1) ในนิวเคลียสของ podocyte cells ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

ก. <u>ขั้นตอนการเตรียม slide ชิ้นเนื้อ</u>

1. ตัด tissue section จาก paraffin block ด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 3-4 μm จากนั้นนำไปลอยในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 43°C แล้วใช้ slide ช้อนติดขึ้นมาบนผิว slide โดยให้ slide แต่ละแผ่นมี 1-2 sections

2. อบหรือตาก slide ให้แห้งสนิทโดยการนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 37°C

ข. <u>ขั้นตอนการย้อมสี</u>

1. ขจัดเอา paraffin ออกจาก tissue section (deparaffinization) ด้วยการแช่ slide ลงใน xylene 3 อาง นานอ่างละ 30 นาทีหรือจนชิ้นเนื้อมีลักษณะใส

2. นำไปผ่าน absolute ethanol 2 อาง, 95% ethanol 2 อาง และน้ำกลั่น 2 นาที ตามลำดับ เพื่อล้าง xylene ออกและเป็นการคืนน้ำให้เข้าไปในเซลล์ อีกทั้งยังเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อก่อนจะย้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. นำ slide ไปต้มใน urea solution ความเข้มข้น 0.8 M และ pH 6.4 ด้วยไมโครเวฟ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาไหลผ่าน

4. จากนั้นนำ slide ไปต้มใน TE ที่มี pH 9.0 เพื่อให้แอนติเจนเผยออก (retrieve antigen) โดยใช้ hi-power ตั้งเวลาให้น้ำยาเดือด 3 นาที เมื่อน้ำยาเดือดแล้วให้ลดเหลือประมาณ 30% hi power แล้วตั้งเวลาอีก 10 นาที

5. เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องหรือเป่าด้วยพัดลมให้เย็นตัว

6. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านแล้วตามด้วยน้ำกลั่น

7. เช็ดบริเวณโดยรอบ section แล้ววงด้วยปากกาสำหรับงาน immunohistochemistry

8. ทำการยับยั้ง endogenous peroxidase activity ดวย 3% H_2O_2 ในน้ำกลั่น ซึ่งเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

9. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที และจุ่มล้างใน wash buffer อางละ 5 นาที จำนวน 2 อาง

10. หยด 3% Normal horse serum ให้ท่วม slide แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงเททิ้ง

11. หยด Primary Antibody (anti-WT1) ความเข้มข้น 1:1,000 โดย incubate ที่อุณหภูมิห้องใน humidity chamber เป็นเวลา 60 นาที

12. จุ่มล้างใน wash buffer อางละ 3 นาที 2 อาง

13. จากนั้นหยด Secondary Antibody และ incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-40 นาที

14. จุ่มล้างใน wash buffer อางละ 3 นาที 2 อาง

15. หยด Substrate – Chromogen Detection (DAB) แล้ว incubate นาน 10 นาที

16. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3-5 นาที แล้วตามด้วยน้ำกลั่น (เพื่อหยุดปฏิกิริยา DAB)

17. จุ่ม slide ใน Hematoxylin 2 นาที ก่อนจะ mounting โดยใช้ permount สำหรับ permanent mounting medium

9.2 การตรวจนับจำนวน podocyte marker ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต

ทำการศึกษาโดยอ้างอิงหลักการเช่นเดียวกับการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในหัวข้อ 9.1

ก. <u>ขั้นตอนการเตรียมslide (slide) ชิ้นเนื้อ</u>

ทำการเตรียมชิ้นเนื้อเช่นเดียวกับหัวข้อ 9.1

ข. **ขั้นตอนการย้อมสี**

1. ขจัดเอา paraffin ออกจาก tissue section (deparaffinization) ด้วยการแช่ slide ลงใน xylene 3 อาง นานอ่างละ 30 นาทีหรือจนชิ้นเนื้อมีลักษณะใส

2. นำไปผ่าน absolute ethanol 2 อาง 95% ethanol 2 อาง และน้ำกลั่น 2 นาที ตามลำดับ เพื่อล้าง xylene ออกและเป็นการคืนน้ำให้เข้าไปในเซลล์

3. นำ slide ไปต้มใน urea solution ความเข้มข้น 0.8 M และ pH 6.4 ด้วยไมโครเวฟ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาไหลผ่าน

4. จากนั้นนำ slide ไปต้มใน TE ที่มี pH 9.0 เพื่อให้แอนติเจนเผยออก (retrieve antigen) โดยใช้ hi-power ตั้งเวลาให้น้ำยาเดือด 3 นาที เมื่อน้ำยาเดือดแล้วให้ลดเหลือประมาณ 30% hi power แล้วตั้งเวลาอีก 10 นาที

5. เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องหรือเป่าด้วยพัดลมให้เย็นตัว

6. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านแล้วตามด้วยน้ำกลั่น

7. เช็ดบริเวณโดยรอบ section แล้ววงด้วยปากกาสำหรับงาน immunohistochemistry

8. ทำการยับยั้ง endogenous peroxidase activity ดวย 3% H_2O_2 ในน้ำกลั่น ซึ่งเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

9. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านนาน 5 นาที และจุ่มล้างใน wash buffer อางละ 5 นาที จำนวน 2 อาง

10. หยด 3% Normal horse serum ให้ท่วม slide แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงเททิ้ง

11. หยด Primary Antibody (anti-VEGF) ความเข้มข้น 1:50 โดย incubate ที่อุณหภูมิห้องใน humidity chamber เป็นเวลา 60 นาที

12. จุ่มล้างใน wash buffer อางละ 3 นาที 2 อาง

13. หยด Label Polymer ใน EnVision Kit และ incubate ใน humidity chamber ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

14. หยด H_2O_2 ใน methanol ให้ท่วม slide แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงเททิ้ง

15. จุ่มล้างใน wash buffer อางละ 20 นาที

16. หยด Substrate – Chromogen Detection (DAB) แล้ว incubate นาน 10 นาที

17. ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3-5 นาที แล้วตามด้วยน้ำกลั่น

18. จุ่ม slide ใน Hematoxylin 2 นาที ก่อนจะ mounting

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไตอักเสบแบบเนฟโฟรติกที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร และอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (ตัวอย่างควบคุม) จำนวน 34 ราย มีอายุตั้งแต่ 17 ปีจนถึง 64 ปี ซึ่งค่าเฉลี่ยอายุของตัวอย่างที่ศึกษามีค่าเท่ากับ 33.88 (29.66, 38.10; 95%CI) ปี เป็นเพศชายจำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.1 และเป็นเพศหญิงจำนวน 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.9 ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งข้อมูลเกี่ยวข้องกับตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมดแสดงในตารางที่ 7

ตัวอย่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ศึกษาในครั้งนี้มีอายุตั้งแต่ 17-64 ปี โดยมีค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วยที่ศึกษาเท่ากับ 33.90 (27.83, 39.97; 95%CI) ปี จำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.8 ของตัวอย่างทั้งหมด เป็นผู้ป่วยเพศชายจำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.0 และเป็นเพศหญิงจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.0 ของตัวอย่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกทั้งหมด

ตัวอย่างควบคุมที่เข้าร่วมในการศึกษามีอายุตั้งแต่ 23-55 ปี โดยมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 33.86 (27.39, 40.33; 95%CI) ปี จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.2 ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด เป็นเพศชายจำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.7 และเป็นเพศหญิงจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 64.3 ของตัวอย่างควบคุมทั้งหมด

ผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ทำการศึกษาทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ และมีรูปแบบการตอบสนองที่แตกต่างกันซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่ตอบสนองโดยเกิด complete remission หรือเรียกผู้ป่วยกลุ่มนี้ว่า steroid sensitiveness จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.0 และผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาหรือเรียกผู้ป่วยกลุ่มนี้ว่า steroid resistance จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.0 ของจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ทำการศึกษาทั้งหมด

นอกจากนี้ยังสามารถแยกย่อยผู้ป่วยตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยชนิด Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.3 ผู้ป่วยชนิด Minimal change disease (MCD) จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.8 ผู้ป่วยชนิด Membranous nephropathy (MN) จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.8 และผู้ป่วย Membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.9 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง		จำนวน (ร้อยละ)	จำนวนรวม (ร้อยละ)
ตัวอย่างควบคุม			14 (42.2)
ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก	Steroid responsive	9 (26.5)	20 (58.8)
	Steroid resistance	6 (17.6)	
	others	5 (14.7)	
- FSGS	Steroid responsive	5 (14.7)	12 (35.3)
	Steroid resistance	5 (14.7)	
	others	2 (5.9)	
- MCD	Steroid responsive	3 (8.8)	4 (11.8)
	Steroid resistance	0 (0.0)	
	others	1 (2.9)	
- MN	Steroid responsive	1 (2.9)	3 (8.8)
	Steroid resistance	1 (2.9)	
	others	1 (2.9)	
- MPGN	Steroid responsive	0 (0.0)	1 (2.9)
	Steroid resistance	0 (0.0)	
	others	1 (2.9)	
รวม			34 (100.0)

2. การตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ ระดับคอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินินในตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะทั้งหมดจะนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เพื่อตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ ระดับคอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินินในเลือด ดังปรากฏผลในตารางที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

		ตัวอย่างควบคุม	**ตัวอย่างผู้ป่วย**
		มัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (95%CI)	มัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (95%CI)
อายุเฉลี่ย (ปี)		33.00, 33.86 (23.00-55.00)	35.00, 33.90 (17.00-64.00)
เพศ	ชาย	5 (35.7)	11 (55.0)
	หญิง	9 (64.3)	9 (45.0)
น้ำหนัก (kg)		58.20, 56.52 (42.00-72.00)	60.15, 65.03 (44.00-130.00)
ส่วนสูง (c)		161.00, 161.69 (153.00-178.00)	162.50, 163.00 (145.00-183.00)
ดัชนีมวลกาย (BMI; kg/m^2)		21.80, 21.50 (16.80-27.20)	22.95, 24.20 (17.30-39.70)
พื้นที่ผิว (BSA; m^2)		1.57, 1.59 (1.36-1.88)	1.64, 1.69 (1.34-2.46)
ความดันซิสโทลิก** (mmHg)		109.00, 110.31 (85.00-142.00)	127.50, 131.06 (109.00-174.00)
ความดันไดแอสโทลิก** mmHg)		66.00, 66.54 (50.00-88.00)	80.05, 81.69 (57.00-108.00)
Mean arterial pressure** (MAP; mmHg)		78.33, 81.13 (61.67-106.00)	97.33, 98.15 (74.33-128.00)
โปรตีนในปัสสาวะ** (mg/dl)		6.70, 8.10 (3.00-14.00)	515.95, 1,009.02 (56.00-4,893.00)
Urine Protein/Creatinine concentration Ratio** (UPCR)		0.06, 0.07 (0.05-0.09)	7.38, 7.91 (3.44-17.17)
Creatinine clearance (CK-GFR; ml/min)		112.11, 110.95 (83.01-148.21)	82.81, 99.70 (28.00-226.01)
คอเลสเตอรอล** (mg/dl)		188.50, 199.58 (139.00-288.00)	291.00, 336.93 (170.00-564.00)
ไตรกลีเซอไรด์** (mg/dl)		73.50, 76.92 (41.00-135.00)	249.50, 285.57 (111.00-630.00)
เอชดีแอล (mg/dl)		60.00, 59.25 (45.00-80.00)	57.50, 62.71 (29.00-120.00)
BUN** (mg/dl)		10.00, 10.77 (9.00-15.50)	17.50, 19.10 (5.00-55.00)
ซีรั่มครีอะตินิน** (mg/dl)		0.63, 0.66 (0.46-1.00)	1.03, 1.07 (0.28-1.80)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

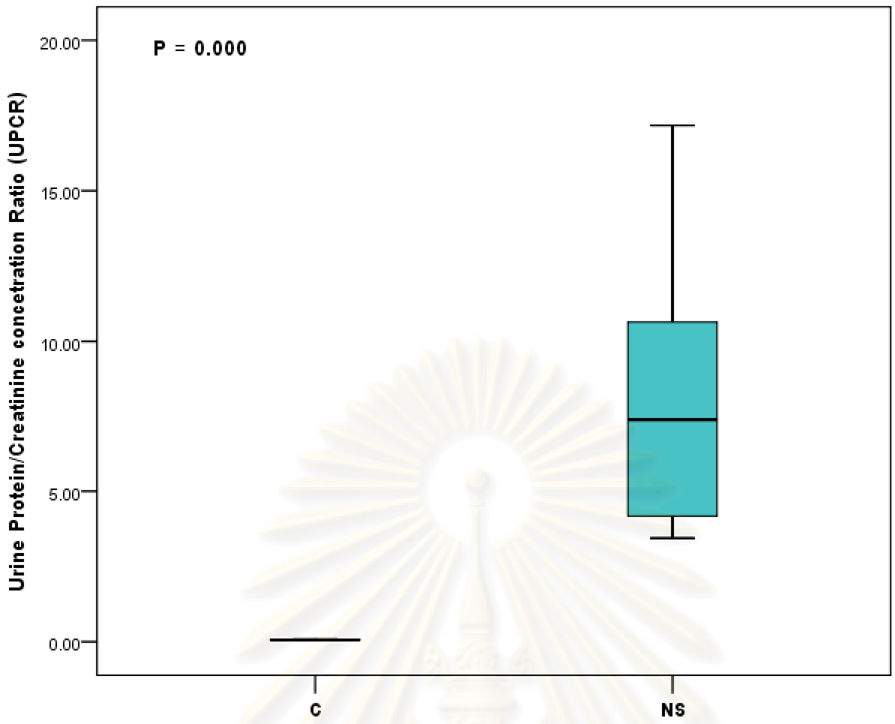
** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์การตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะตินิน รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยอาการแสดงเบื้องต้นอื่นๆ ประกอบด้วย เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ค่าดัชนีมวลกาย พื้นที่ผิว และความดันโลหิต พบว่า ระดับความดันโลหิตทั้งความดันซิสโทลิกและไดแอสโทลิก ค่าความดัน MAP โปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ BUN และซีรั่มครีอะตินินของผู้ป่วยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับสารดังกล่าวที่ตรวจพบในตัวอย่างควบคุม

จากการตรวจวัดพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีระดับ UPCR อยู่ในช่วง 3.44-17.17 โดยมีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.38, 7.91 (5.89, .93; 95%CI) ตามลำดับ คอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 170-564 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 291.00, 336.93 (270.42, 403.45; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ไตรกลีเซอไรด์อยู่ในช่วง 111-630 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 249.50, 285.57 (196.38, 374.76; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ระดับ BUN อยู่ในช่วง 5.00-55.00 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.50, 19.10 (13.39, 24.81; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ และซีรั่มครีอะตินินอยู่ในช่วง 0.28-1.80 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ย 1.03, 1.07 (0.88, 1.26); 95%CI) mg/dl ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

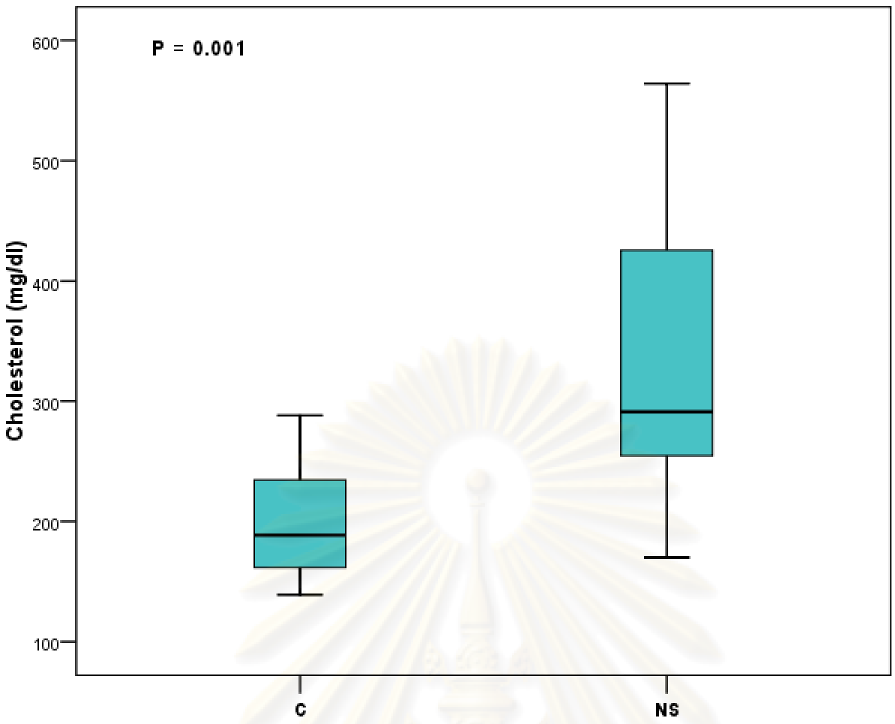
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06, 0.07 (0.05-0.09; Range)]

NS หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.38, 7.91 (3.44-17.17; Range)]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แสดงผลการตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

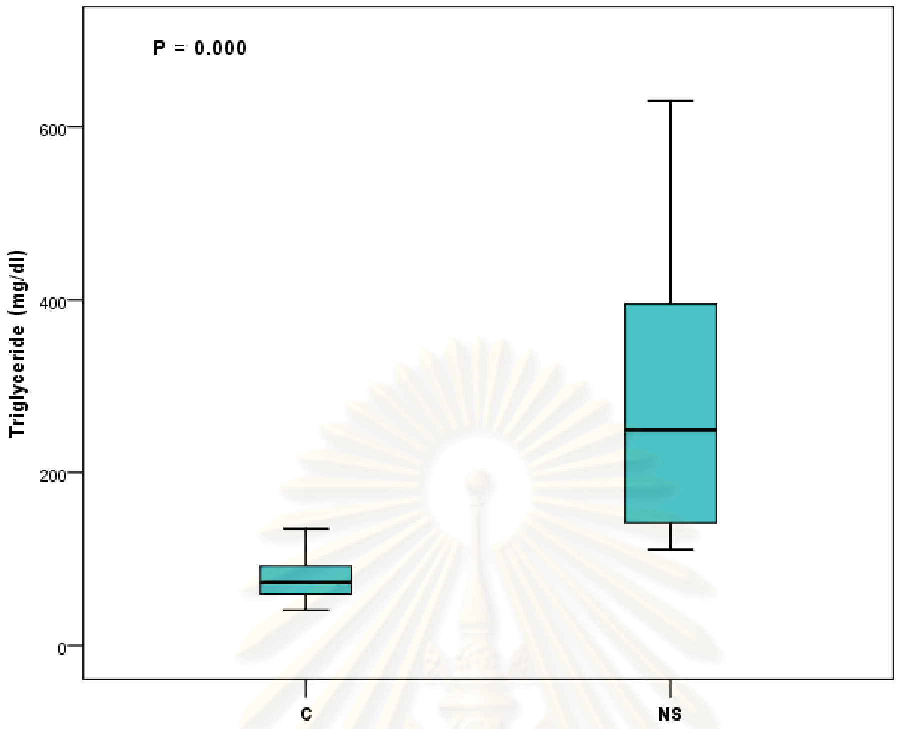
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 188.50, 199.58 (139.00-288.00; Range) mg/dl]

NS หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 291.00, 336.93 (170.00-564.00; Range) mg/dl]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 แสดงผลการตรวจวัดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

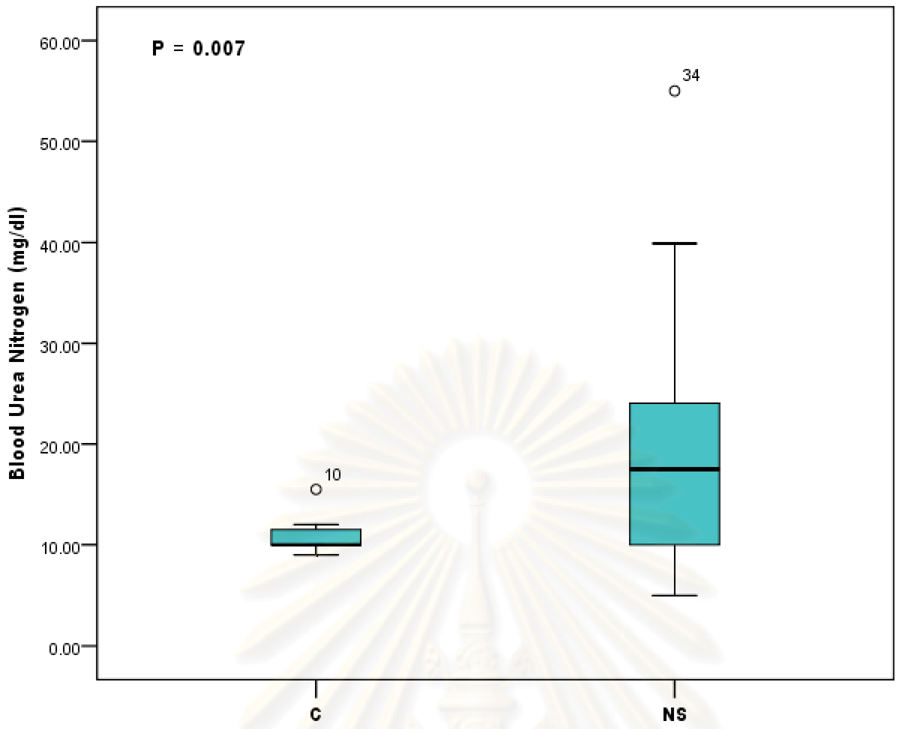
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 73.50, 76.92 (41.00-135.00; Range) mg/dl]

NS หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 249.50, 285.57 (111.00-630.00; Range) mg/dl]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 แสดงผลการตรวจวัดระดับ Blood Urea Nitrogen (BUN) ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

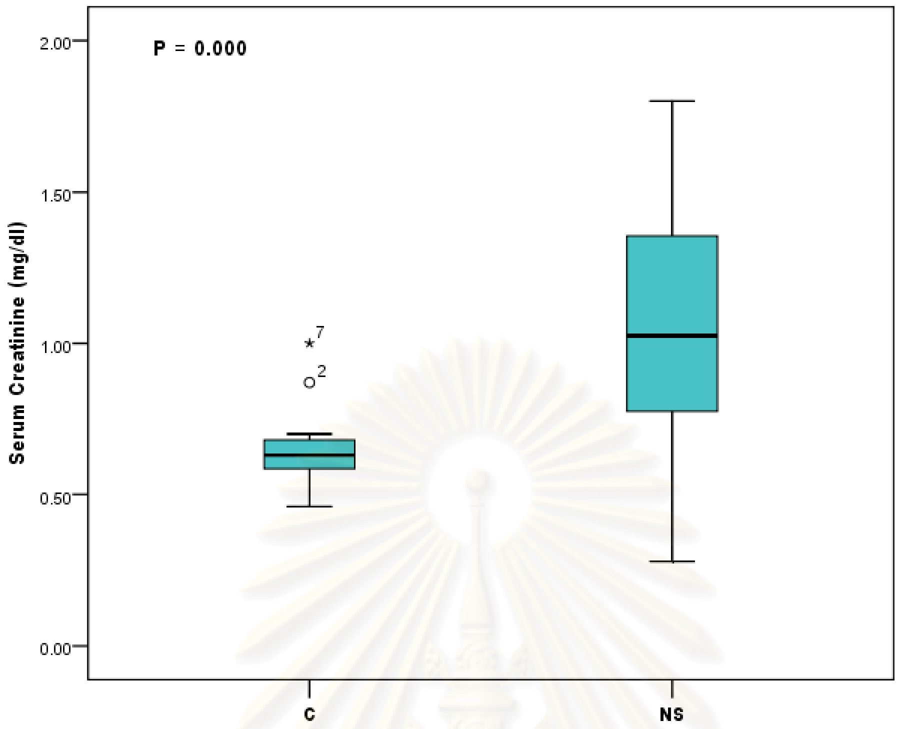
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.00, 10.77 (9.00-15.50; Range) mg/dl]

NS หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.50, 17.24 (5.00-55.00; Range) mg/dl]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 แสดงผลการตรวจวัดระดับซีรั่มครีอะตินินในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ย 0.63, 0.66 (0.46-1.00; Range) mg/dl]

NS หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ย 1.03, 1.07 (0.28-1.80; Range) mg/dl]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามรูปแบบการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

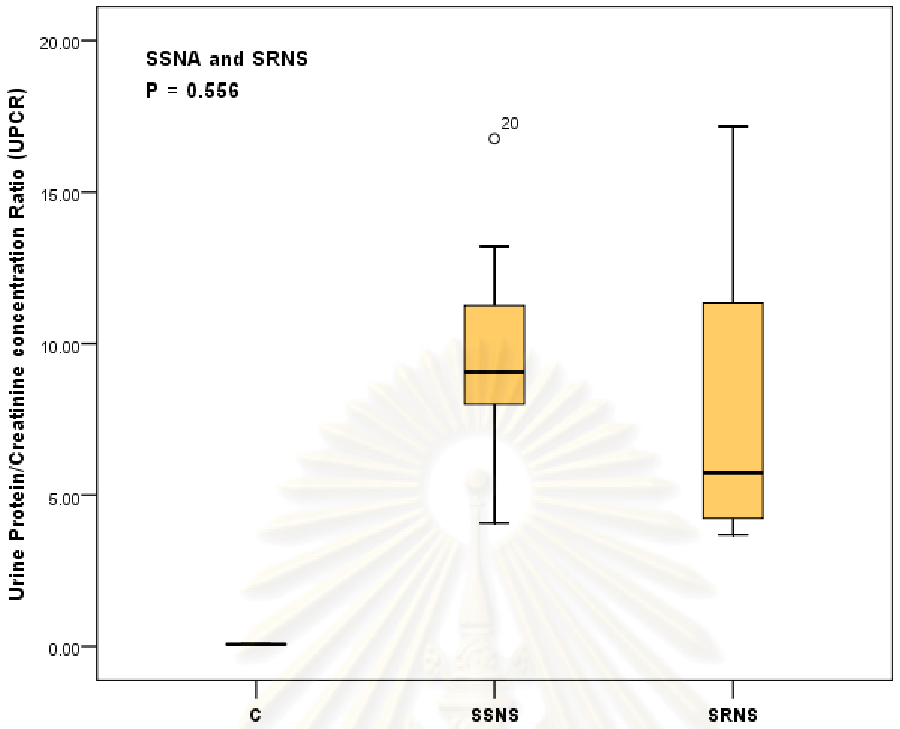
		Steroid Sensitiveness (9) มัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	Steroid Resistance (6) มัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)
อายุเฉลี่ย (ปี)		26.00, 29.33 (19.00-45.00)	35.00, 40.00 (17.00-47.00)
เพศ	ชาย	5 (55.6)	2 (33.3)
	หญิง	4 (44.4)	3 (66.7)
น้ำหนัก (kg)		60.30, 59.40 (44.00-78.00)	56.65, 66.50 (49.00-80.00)
ส่วนสูง (cm)		162.00, 162.56 (145.00-183.00)	160.00, 159.67 (150.00-165.00)
ดัชนีมวลกาย (BMI; Kg/m^2)		22.90, 22.29 (18.30-27.60)	28.75, 26.27 (17.90-31.30)
พื้นที่ผิว (BSA; m^2)		1.64, 1.63 (1.34-1.89)	1.68, 1.68 (1.52-1.83)
ความดันซิสโทลิก (mmHg)		115.50, 123.57 (109.00-146.00)	128.00, 136.40 (112.00-174.00)
ความดันไดแอสโทลิก (mmHg)		78.00, 77.86 (57.00-94.00)	81.00, 81.20 (71.00-92.00)
Mean arterial pressure (MAP; mmHg)		90.00, 93.10 (74.33-108.67)	104.00, 99.60 (84.67-112.00)
โปรตีนในปัสสาวะ (mg/dl)		850.70, 1,494.80 (168.30-4,893.00)	314.10, 391.20 (197.50-733.80)
Urine Protein/Creatinine concentration Ratio (UPCR)		9.06, 9.31 (4.08-16.76)	5.74, 7.99 (3.69-17.17)
Creatinine clearance (CK-GFR; ml/min)		82.52, 109.38 (50.62-226.01)	84.95, 87.45 (37.86-121.08)
คอเลสเตอรอล (mg/dl)		364.00, 376.89 (193.00-564.00)	254.50, 300.75 (230.00-462.00)
ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)		217.00, 285.00 (111.00-630.00)	319.00, 306.75 (134.00-455.00)
เอชดีแอล (mg/dl)		61.50, 71.25 (29.00-120.00)	49.00, 53.25 (40.00-75.00)
Blood Urea Nitrogen (mg/dl)		13.00, 15.44 (5.00-29.00)	15.00, 18.67 (8.00-39.90)
ซีรั่มครีอะตินิน (mg/dl)		1.02, 1.00 (0.28-1.59)	1.03, 1.08 (0.78-1.74)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกันปรากฏผลดังตารางที่ 9 พบว่า ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แบบ steroid resistance มีระดับโปรตีนในปัสสาวะและคอเลสเตอรอลต่ำกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness โดยมีระดับค่า UPCR อยู่ในช่วง 3.69-17.17 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.74, 7.99 (2.43, 13.54; 95%CI) ตามลำดับ ระดับคอเลสเตอรอลมีค่าอยู่ในช่วง 230-462 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 270.50, 299.17 (208.08, 390.25; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ขณะที่ระดับไตรกลีเซอไรด์ BUN และซีรั่มครีอะติ-นินในกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid resistance มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองแบบ steroid sensitivenessโดยระดับไตรกลีเซอไรด์มีค่าอยู่ในช่วง 134-455 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 319.00, 306.75 (74.93, 538.57; 95%CI) mg/dl ตามลำดับระดับ BUN มีค่าอยู่ในช่วง 8.0-39.9 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.00, 18.67 (6.21, 31.12; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ และระดับซีรั่มครีอะตินินมีค่าอยู่ในช่วง 0.78-1.74 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.03, 1.08 (0.71, 1.44; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่างกลับไม่ปรากฏว่ามีค่าใดที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06, 0.07 (0.05-0.09; Range)]

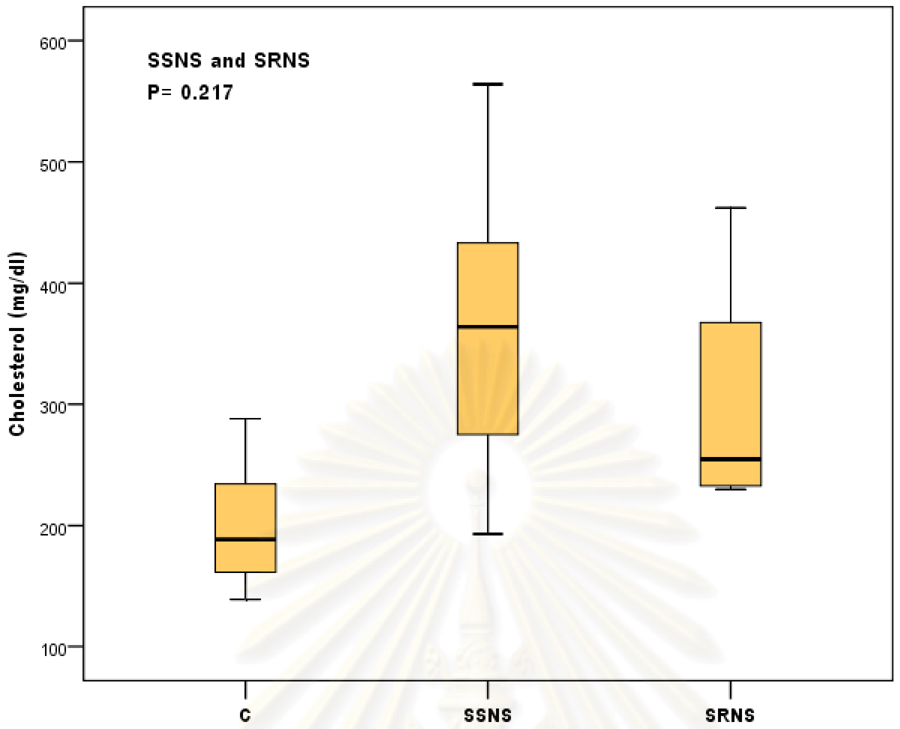
SSNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.06, 9.31 (4.08-16.76; Range)]

SRNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.74, 7.99 (3.69-17.17; Range)]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 แสดงผลการตรวจวัดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 188.50, 199.58 (139.00-288.00; Range) mg/dl]

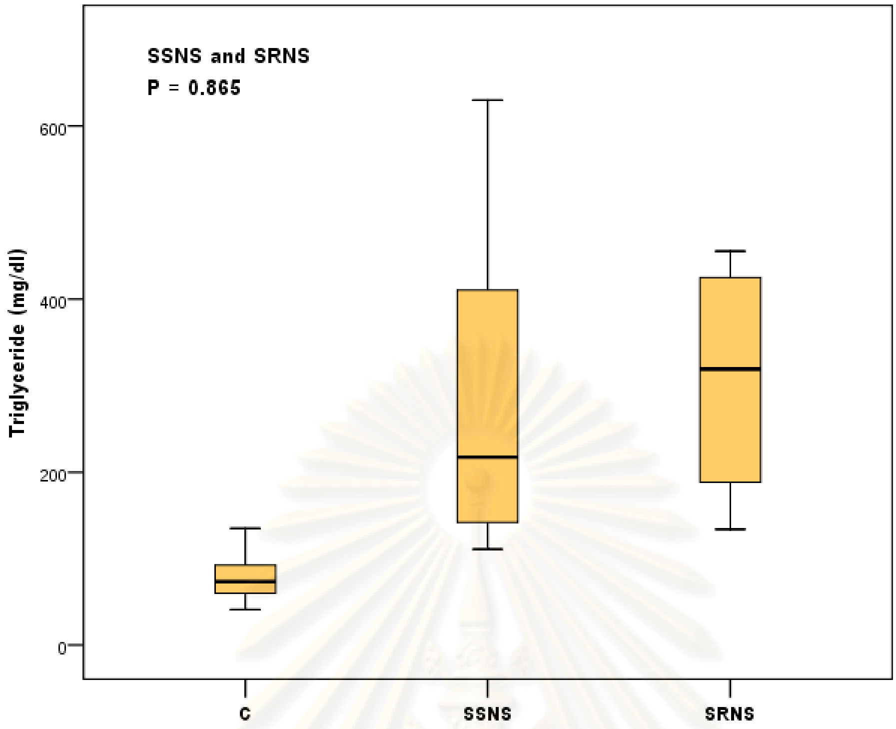
SSNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 364.00, 376.89 (193.00-564.00; Range) mg/dl]

SRNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 254.50, 300.75 (230.00-462.00; Range) mg/dl]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 แสดงผลการตรวจวัดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 73.50, 76.92 (41.00-135.00; Range) mg/dl]

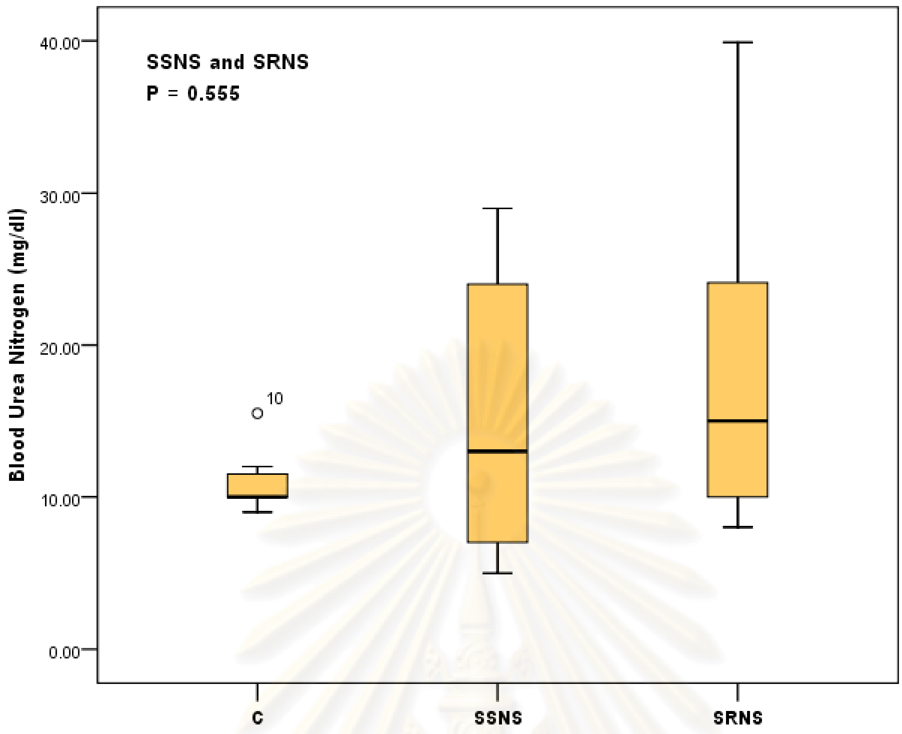
SSNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 217.00, 285.00 (111.00-630.00; Range) mg/dl]

SRNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 319.00, 306.75 (134.00-455.00; Range) mg/dl]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 แสดงผลการตรวจวัดระดับ Blood Urea Nitrogen (BUN) ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.00, 10.77 (9.00-15.50; Range) mg/dl]

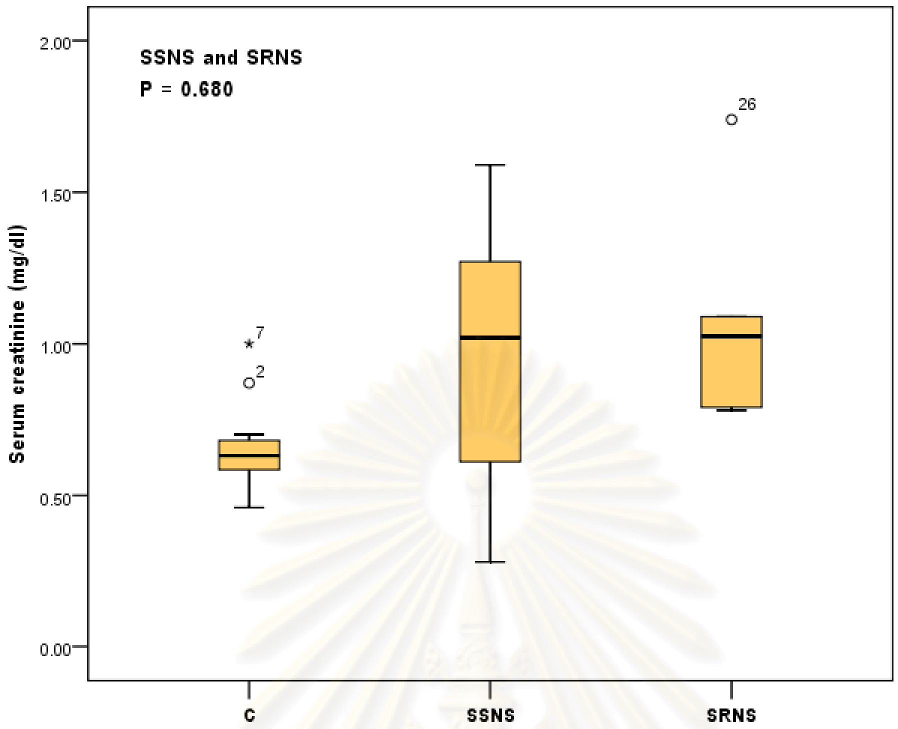
SSNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.00, 15.44 (5.00-29.00; Range) mg/dl]

SRNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.00, 18.67 (8.00-39.90; Range) mg/dl]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34 แสดงผลการตรวจวัดระดับซีรั่มครีอะตินินในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจวัดในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ย 0.63, 0.66 (0.46-1.00; Range) mg/dl]

SSNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.02, 1.00 (0.28-1.59; Range) mg/dl]

SRNS หมายถึง ผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.03, 1.08 (0.78-1.74; Range) mg/dl]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

		ตัวอย่างควบคุม (14) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	FSGS (12) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MCD (4) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MN (3) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MPGN (1) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)
อายุเฉลี่ย (ปี)		33.86, 33.00 (23.00-55.00)	32.83, 29.50 (17.00-64.00)	31.25, 33.50 (19.00-39.00)	40.67, 48.50 (25.00-50.00)	37.00
เพศ	ชาย	5 (35.7)	8 (19.1)	5 (11.9)	5 (11.9)	1 (2.9)
	หญิง	9 (64.3)	10 (23.8)	7 (16.7)	1 (2.4)	-
น้ำหนัก (kg)		56.52, 58.20 (42.00-72.00)	64.02, 56.65 (44.00-130.00)	64.18, 60.15 (58.00-78.00)	76.57, 74.38 (64.00-89.00)	46.00
ส่วนสูง (cm)		161.69, 161.00 (153.00-178.00)	161.92, 160.00 (145.00-183.00)	164.25, 163.50 (162.00-168.00)	165.67, 163.00 (158.00-176.00)	163.00
ดัชนีมวลกาย (BMI; kg/m^2)		21.50, 21.80 (16.80-27.20)	24.00, 20.90 (17.90-39.70)	23.75, 22.95 (21.50-27.60)	27.83, 26.97 (24.10-30.80)	17.30
พื้นที่ผิว (BSA; m^2)		1.59, 1.57 (1.36-1.88)	1.67, 1.56 (1.34-2.46)	1.70, 1.64 (1.64-1.88)	1.84, 1.82 (1.69-2.10)	1.47
ความดันซิสโทลิก (mmHg)		110.31, 109.00 (85.00-142.00)	131.50, 124.00 (109.00-174.00)	127.67, 131.00 (115.00-137.00)	136.00, 124.20 (124.00-148.00)	127.00
ความดันไดแอสโทลิก (mmHg)		66.54, 66.00 (50.00-88.00)	81.80, 80.50 (57.00-108.00)	84.00, 84.00 (74.00-94.00)	79.00, 74.20 (76.00-82.00)	79.00
Mean arterial pressure (MAP; mmHg)		81.13, 78.33 (61.67-106.00)	98.37, 98.67 (74.33-128.00)	98.56, 99.67 (87.67-108.33)	98.00, (92.00-104.00)	95.00

$^{\Delta}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

$^{\Delta\Delta}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

75

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก

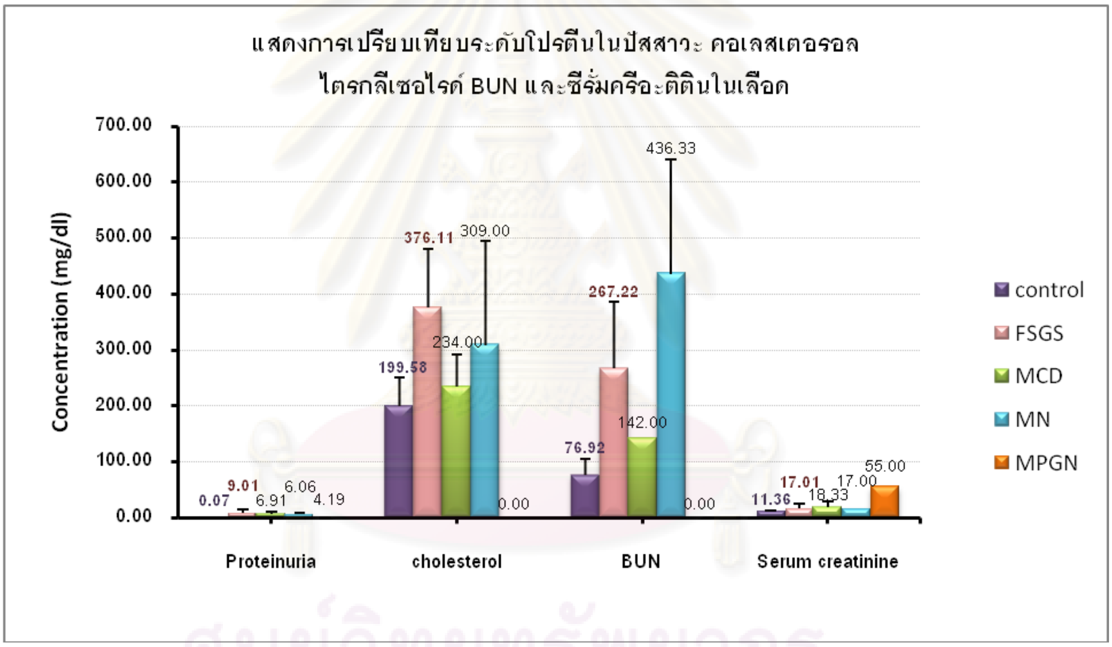
	ตัวอย่างควบคุม (14) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	FSGS (12) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MCD (4) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MN (3) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	MPGN (1) ค่าเฉลี่ย, ค่ามัธยฐาน (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)
โปรตีนในปัสสาวะ (mg/dl)	8.10 , 6.70 (3.00-14.40)	1,029.19, 515.95 (56.00-4,893.00)	1,404.70, 1,409.25 (168.30-2,632.00)	674.27, 445.50 (352.80-850.70)	188.60
Urine Protein/Creatinine Ratio (UPCR)$^{\Delta\Delta}$	0.07, 0.06 (0.05-0.09)	9.01, 8.60 (3.69-17.17)	6.92, 6.79 (4.08-10.01)	6.07, 3.61 (3.44-8.00)	4.19
Creatinine clearance (CK-GFR; ml/min)	110.95, 110.95 (83.01-148.21)	96.83, 86.30 (28.00-224.47)	122.15, 91.40 (79.80-226.01)	102.33, 112.79 (64.39-160.51)	36.56
คอเลสเตอรอล$^{\Delta\Delta}$ (mg/dl)	199.58, 188.50 (139.00-288.00)	376.11, 364.00 (230.00-564.00)	247.33, 274.00 (193.00-275.00)	309.00, 262.80 (170.00-521.00)	-
ไตรกลีเซอไรด์$^{\Delta\Delta}$ (mg/dl)	76.92, 73.50 (41.00-135.00)	267.22, 256.00 (111.00-468.00)	142.00, 142.00 (142.00-142.00)	436.33, 394.00 (224.00-630.00)	-
เอชดีแอล$^{\Delta\Delta}$ (mg/dl)	59.25, 60.00 (45.00-80.00)	58.44, 59.00 (40.00-75.00)	120.00, 120.00 (120.00-120.00)	37.33, 37.00 (29.00-42.00)	-
BUN$^{\Delta\Delta}$ (mg/dl)	10.77, 10.00 (9.00-15.50)	17.50, 17.50 (5.00-39.90)	19.75, 21.50 (7.00-29.00)	12.67, 12.80 (8.00-17.00)	55.00
ซีรั่มครีอะตินิน$^{\Delta\Delta}$ (mg/dl)	0.66, 0.63 (0.46-1.00)	1.07, 1.06 (0.28-1.74)	0.85, 0.90 (0.58-1.06)	1.10, 0.96 (0.69-1.59)	1.80

$^{\Delta}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

$^{\Delta\Delta}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยแบ่งแยกตามชนิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกซึ่งปรากฏผลดังตารางที่ 10 พบว่า ผู้ป่วยแบบ FSGS มีระดับ UPCR และคอเลสเตอรอลสูงที่สุด โดยมีระดับ UPCR อยู่ในช่วง 3.69-17.17 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.60, 9.01 (5.87, 12.16; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ระดับคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 230-564 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 364.00, 376.11 (295.62, 456.60; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ ขณะที่ผู้ป่วย MN เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงที่สุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 224-630 mg/dl มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 394.00, 436.33 (0, 942.21; 95%CI) mg/dl ตามลำดับ และพบว่าผู้ป่วย MPGN มีระดับ BUN และซีรั่มครีอะติตินสูงที่สุด โดยมีระดับ BUN และซีรั่มครีอะตินินมีค่า 55.00 และ 1.80 mg/dl ตามลำดับ



รูปที่ 35 แสดงผลการตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ BUN และซีรั่มครีอะตินินในตัวอย่างเลือดเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

FSGS	แทน	Focal segmental glomerulosclerosis
MCD	แทน	Minimal change disease
MN	แทน	Membranous nephropathy
MPGN	แทน	Membranoproliferative glomerulonephritis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **ผลการตรวจนับ podocyte cells ด้วยวิธี Flow cytometry**

3.1 ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจนับเซลล์

ในการตรวจนับ podocyte cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษาอันได้แก่ anti-human podocalyxin, anti-human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) และ anti-human alpha Smooth Muscle Actin (α-SMA) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ความไวและความจำเพาะ ตลอดจนความแม่นยำของการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry ปรากฏผลดังนี้

ผลการประเมินประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เลือกใช้ด้วยการปั่นตกตะกอนปัสสาวะที่ความเร็วรอบแตกต่างกันพบว่า ที่ความเร็วในการปั่นตกตะกอน 3,000 rpm เป็นความเร็วที่ให้ผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ได้จำนวนมากที่สุดโดยไม่พบการติดสีของแอนติบอดีที่เลือกใช้กับเศษเซลล์ ในขณะที่การปั่นตกตะกอน 10,000 rpm เป็นความเร็วที่ให้ผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ได้จำนวนน้อยที่สุดโดยไม่พบการติดสีของแอนติบอดีที่เลือกใช้กับเศษเซลล์เช่นกัน

ผลการทดสอบความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจนับเซลล์พบว่าให้ผลการประเมินตามหลักเกณฑ์มาตรฐานเท่ากับ 83.33% และ 91.67% ตามลำดับ

การประเมินความแม่นยำของวิธีการตรวจนับ podocyte cells โดยให้ผู้วิจัยเพียงรายเดียวทำการทดสอบด้วยวิธีดังข้อ 2.1 (intra-observation assay)โดยใช้ตัวอย่าง podocyte cells ที่เลี้ยงได้ในรุ่นเดียวกัน จำนวนทั้งหมด 3 ตัวอย่างซึ่งแต่ละตัวอย่างมีจำนวนเซลล์เท่าๆ กัน อีกทั้งมีสภาวะแวดล้อมแบบเดียวกันพบว่า สามารถตรวจนับเซลล์ได้ใกล้เคียงกันโดยมีความแตกต่างของผลการตรวจนับในตัวอย่างทั้งหมดน้อยกว่า 5%CV ส่วนการตรวจนับ podocyte cells ตามแนวทางการประเมินค่า inter-observation assay โดยให้ผู้วิจัย 5 รายทำการทดสอบตามวิธีการเช่นเดียวกันนั้น พบว่า ผู้วิจัยทั้ง 3 รายทำการตรวจนับเซลล์โดยมีความแตกต่างของผลการตรวจนับในตัวอย่างทั้งหมดน้อยกว่า 10%CV

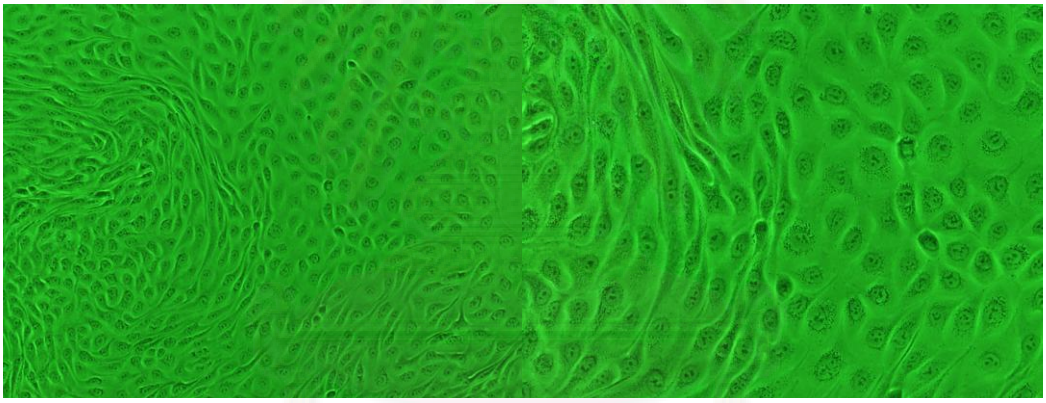
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 แสดงลักษณะ podocyte cells ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง

(รูปทางซ้ายถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า รูปทางขวาถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า)

G หมายถึง Glomerulus

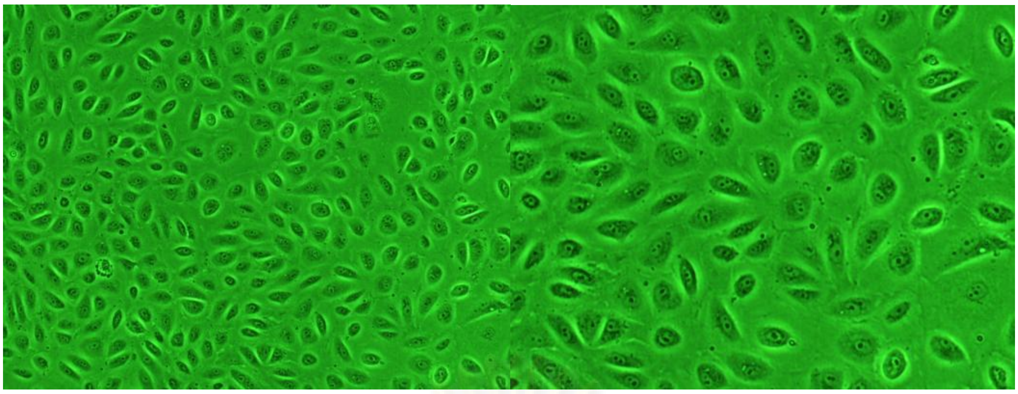
P หมายถึง Podocyte cells



รูปที่ 37 แสดงลักษณะ podocyte cells เมื่อมีเจริญเติบโตมีความหนาแน่น 50-80% ก่อน passage

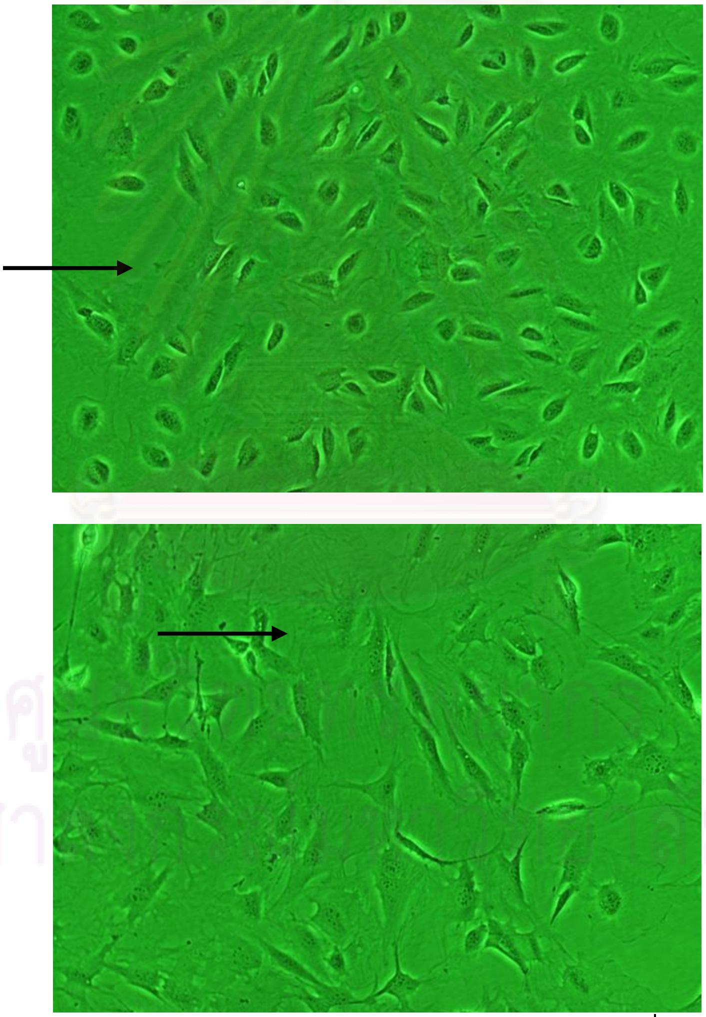
(รูปทางซ้ายถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า รูปทางขวาถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 38 แสดงลักษณะ podocyte cells ก่อน differentiated

(รูปทางซ้ายถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า รูปทางขวาถ่ายรูปที่กำลังขยาย 200 เท่า)

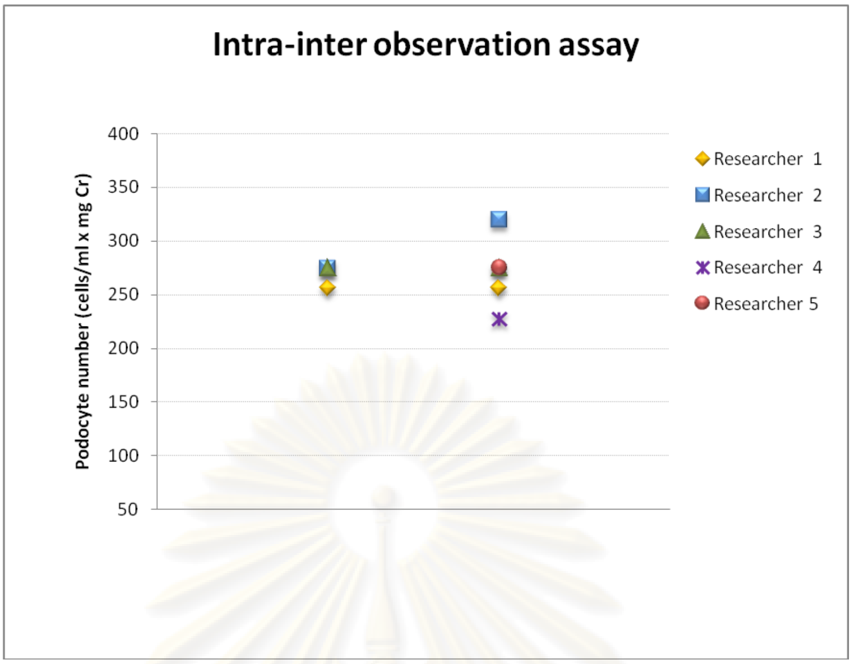


รูปที่ 39 แสดงลักษณะ podocyte cells หลัง differentiated (ถ่ายรูปที่กำลังขยาย 100 เท่า)

รูปด้านบน แสดงลักษณะ podocyte cells หลัง differentiated 3-5 วัน

รูปด้านล่าง แสดงลักษณะ podocyte cells หลัง differentiated 1 สัปดาห์

(ลูกศรชี้ แสดงลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยืดยาวออกเป็น foot processes)



รูปที่ 40 แสดงผลการประเมินความแม่นยำของวิธีการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry โดยใช้ podocyte cells เพาะเลี้ยง

รูปที่ 41 แสดงตำแหน่งและองค์ประกอบของ podocyte cells ที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี

รูปซ้าย แสดงลักษณะ epithelial cells เมื่อถ่ายด้วยกล้อง phase contrast

รูปกลาง แสดงเซลล์ที่ย้อมติดสีของ anti-human podocalyxin

รูปขวา แสดงเซลล์ที่ย้อมติดสีของ anti-human alpha Smooth Muscle Actin (α-SMA)

2.2 **การตรวจนับ** podocyte cells **ในตัวอย่างปัสสาวะ**

การตรวจนับ podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกและตัวอย่างควบคุมที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยภายหลังการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการศึกษาและใช้ความเร็วรอบในการปั่นตกตะกอนปัสสาวะที่ 3,000 rpm แสดงผลในตาราง 11

ผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีจำนวน podocyte cells หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมากกว่าตัวอย่างควบคุมในทุกตัวบ่งชี้ซึ่งในที่นี้หมายถึง แอนติบอดีที่ใช้ทำการศึกษา โดยมีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 0-3.91 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.46, 0.65 (0.23, 1.07; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA – positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0-1.82 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06, 0.27 (0.24, 1.07; 95% CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน VEGF- positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0-10.30 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02, 0.21 (0.02, 0.40; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA-VEGF cells อยู่ในช่วง 0-4.69 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.04, 0.61 (0.05, 1.16; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน VEGF cells อยู่ในช่วง 0-25.52 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.17, 2.39 (0.00, 5.15; 95%CI) cell/ml x mg Cr และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างควบคุมและผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกด้วยสถิติ independent T test พบว่า จำนวน podocyte cells, SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells แตกต่างกันที่ $p < 0.05$ ส่วน podocyte cells แตกต่างกันที่ $p < 0.01$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจนับ podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกและตัวอย่างควบคุม

	Control (14) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)	Nephrotic syndrome type (20) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)					Steroid responsiveness (15) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	
		Total NS (20)	FSGS (12)	MCD (4)	MN (3)	MPGN (1)	Steroid sensitiveness (9)	Steroid Resistance (6)
Podocyte** (cell/mlxmg.Cr)	0.01, 0.04 (0.00-0.28)	0.46, 0.65 (0.00-3.91)	0.57, 0.85 (0.00-3.91)	0.12, 0.33 (0.07-1.03)	0.07, 0.43 (0.05-1.16)	0.24	0.08, 0.46 (0.00-1.18)	0.76, 1.20 (0.05-3.91)
SMA–positive Podocyte* (cell/mlxmg.Cr)	0.01, 0.01 (0.00-0.05)	0.06, 0.27 (0.00-1.82)	0.08, 0.37 (0.00-1.82)	0.07, 0.19 (0.01-0.62)	0.03, 0.05 (0.00-0.11)	0.08	0.03, 0.12 (0.00-0.62)	0.38, 0.66 (0.00-1.82)
VEGF- positive Podocyte* (cell/mlxmg.Cr)	0.00, 0.00 (0.00-0.03)	0.02, 0.21 (0.00-1.30)	0.02, 0.31 (0.00-1.30)	0.02, 0.03 (0.00-0.10)	0.02, 0.09 (0.01-0.24)	0.00	0.01, 0.04 (0.00-0.24)	0.19, 0.49 (0.00-1.30)
SMA-VEGF cells* (cell/mlxmg.Cr)	0.00, 0.01 (0.00-0.08)	0.04, 0.61 (0.00-4.69)	0.10, 0.99 (0.01-4.69)	0.00, 0.02 (0.00-0.09)	0.01, 0.04 (0.01-0.11)	0.00	0.04, 0.22 (0.00-1.57)	0.76, 1.40 (0.01-4.69)
VEGF (cell/mlxmg.Cr)	0.03, 0.13 (0.00-0.92)	0.17, 2.39 (0.00-25.52)	0.53, 3.88 (0.29-25.52)	0.11, 0.11 (0.01-0.21)	0.02, 0.22 (0.01-0.61)	0.17	0.17, 0.85 (0.01-6.14)	1.40, 5.21 (0.01-25.52)

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกกับตัวอย่างควบคุม

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกกับตัวอย่างควบคุม

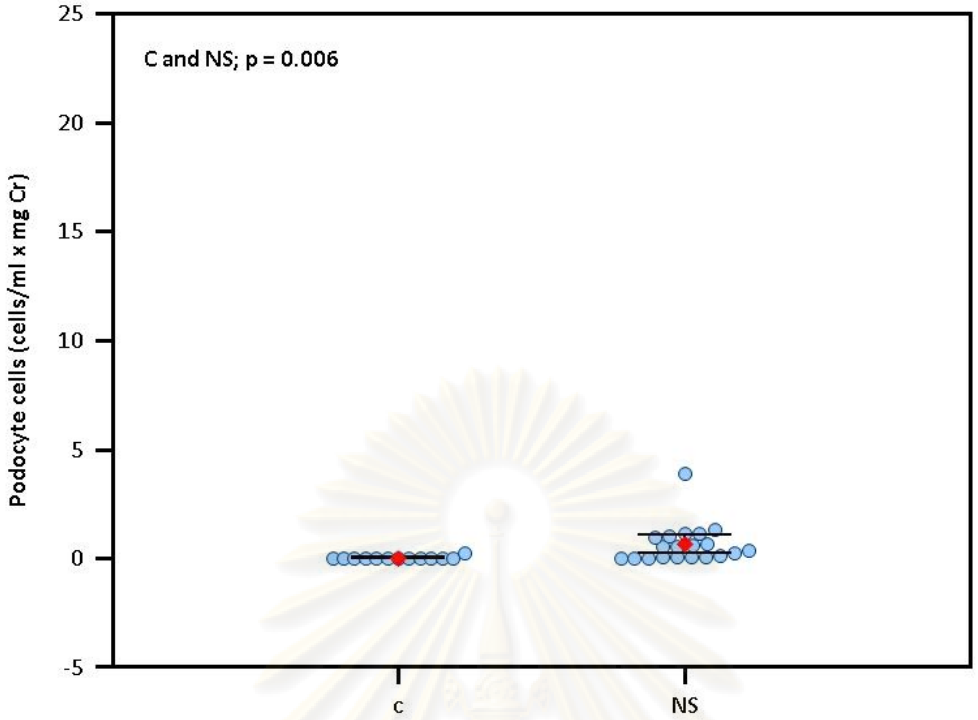
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

Δ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

ΔΔ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

83



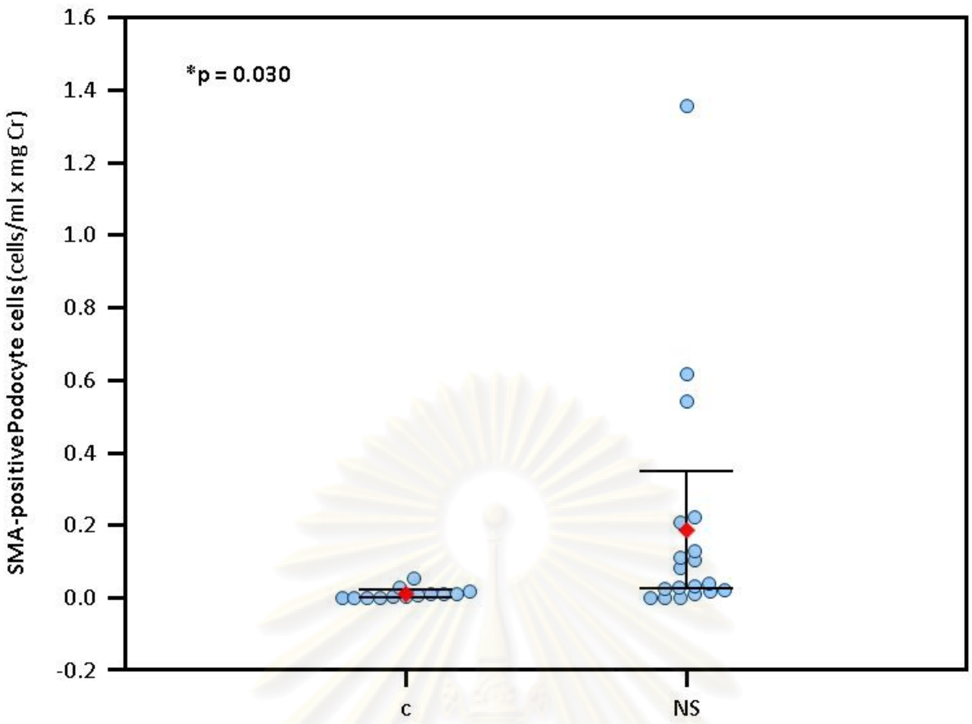
รูปที่ 42 แสดงผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.04 (0.00-0.28; Range) cell/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.46, 0.65 (0.00-3.91; Range) cell/ml x mg Cr]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



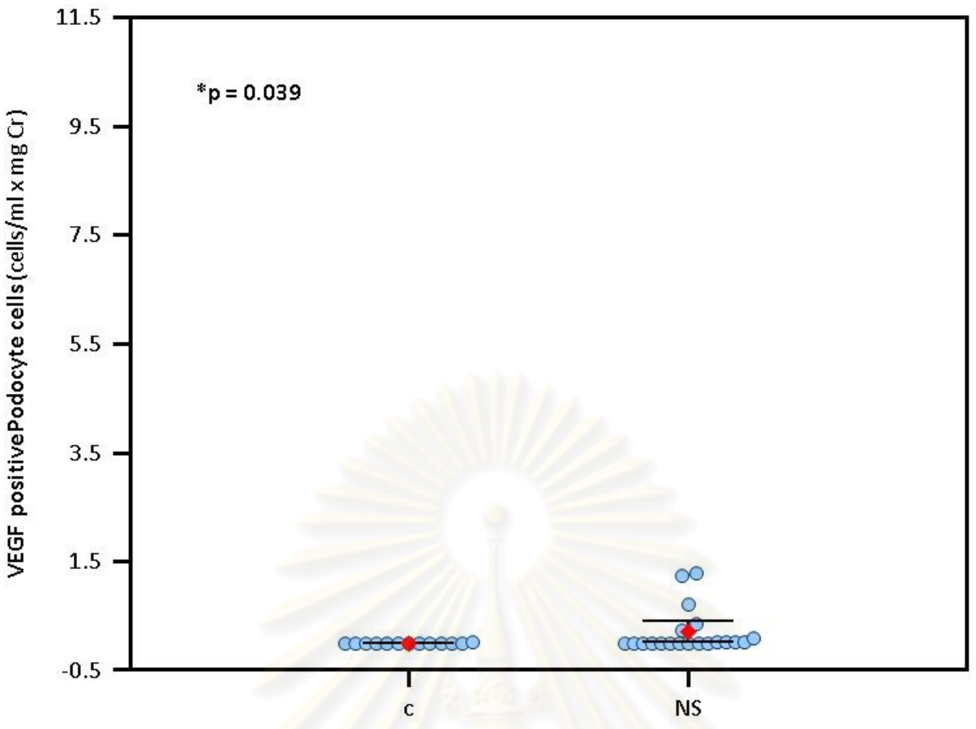
รูปที่ 43 แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.01 (0.00-0.05; Range) cell/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06, 0.27 (0.00-1.82; Range) cell/ml x mg Cr]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 44 แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

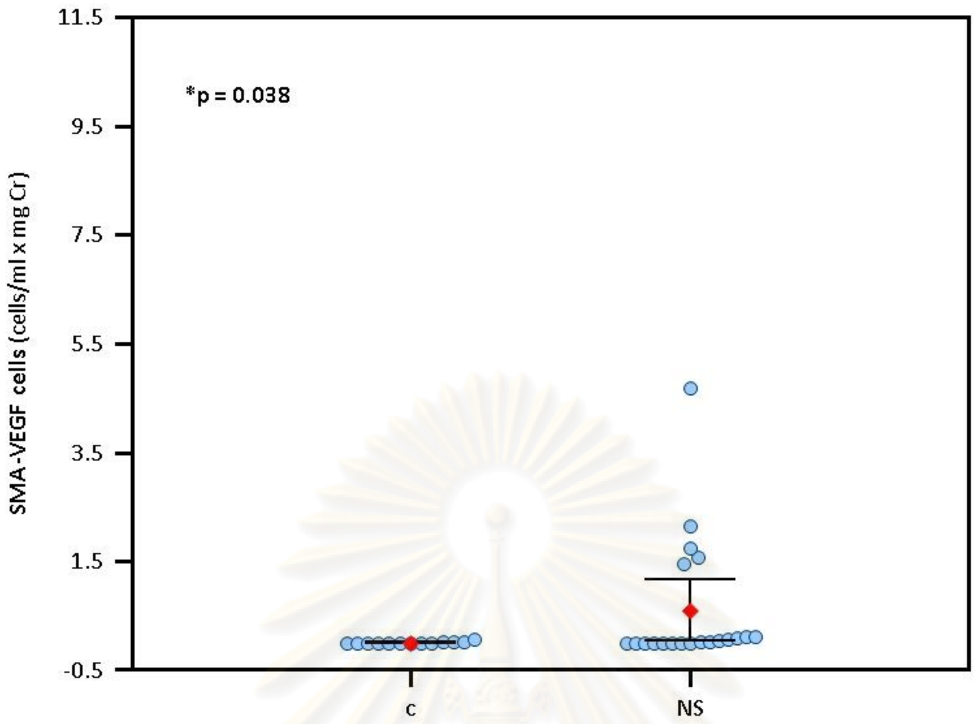
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00, 0.00 (0.00-0.03; Range) cell/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02, 0.21 (0.00-1.30; Range) cell/ml x mg Cr]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

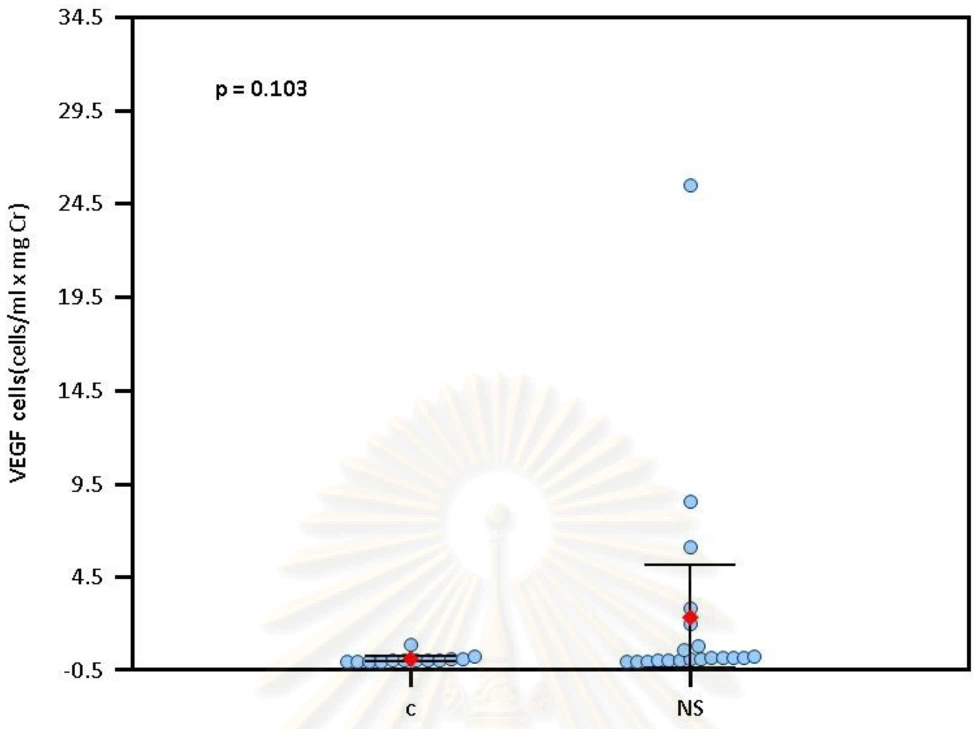
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00, 0.01 (0.00-0.08; Range) cell/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.04, 0.61 (0.00-4.69; Range) cell/ml x mg Cr]

หมายเหตุ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

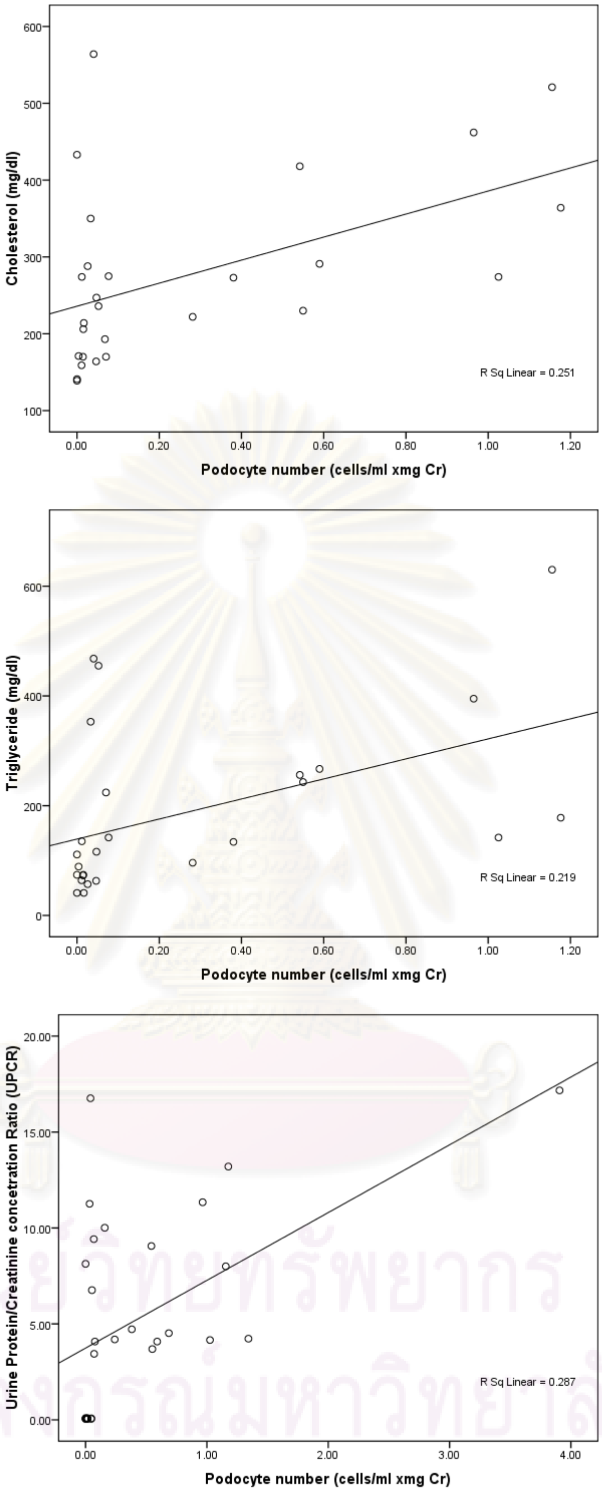


รูปที่ 46 แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03, 0.13 (0.00-0.92; Range) cell/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.17, 2.39 (0.00-25.52; Range) cell/ml x mg Cr]

ทั้งนี้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของผลการตรวจนับจำนวน urinary podocyte cells กับระดับโปรตีนที่หลุดรั่วในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอรไรด์ BUN และซีรั่มครีอะตินินพบว่า จำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอรไรด์ และโปรตีนในปัสสาวะ ที่ p = 0.008, 0.016 และ 0.002 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 47 แต่ไม่พบว่าระดับเซลล์ดังกล่าวนั้นสัมพันธ์กับระดับโปรตีนในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

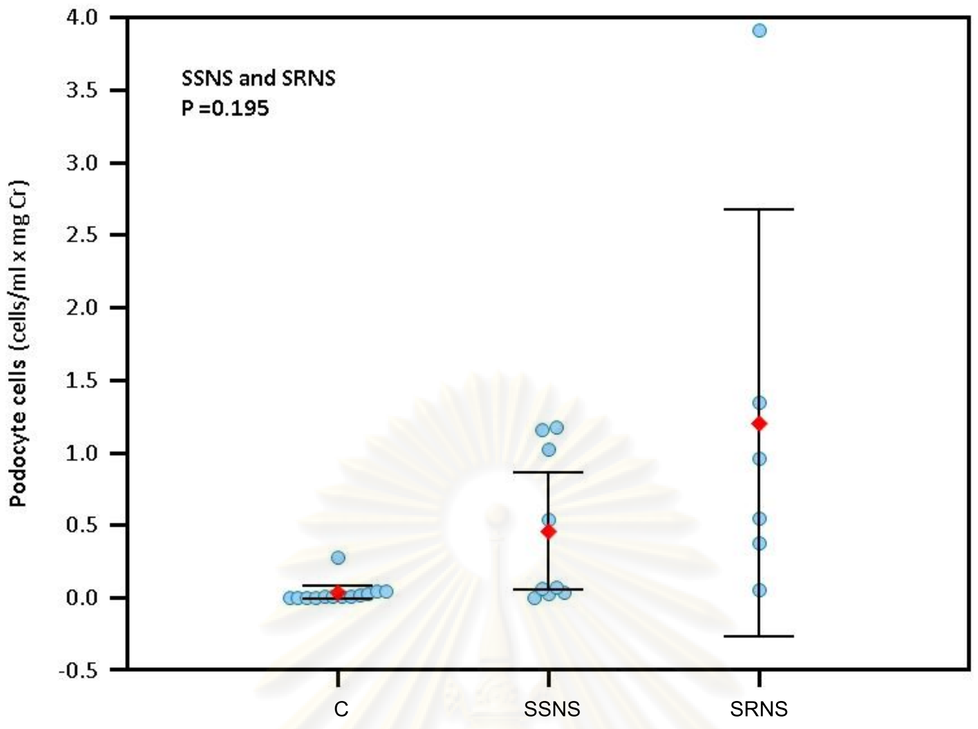


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะกับระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และโปรตีนในปัสสาวะ

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness กับ steroid resistance พบว่า ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมากกว่าผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness ดังนี้คือมีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 0.05-3.91 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76, 1.20 (0.00, 2.67; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA – positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0-1.82 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38, 0.66 (0.00, 1.46; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน VEGF-positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0-1.30 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.19, 0.49 (0.00, 1.15; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA-VEGF cells อยู่ในช่วง 0.01-4.69 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76, 1.40 (0, 3.33; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ และมีจำนวน VEGF cells อยู่ในช่วง 0.01-25.52 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.40, 5.21 (0, 15.71; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่างด้วยสถิติ Man Whitney U test ปรากฏว่า ไม่มีตัวบ่งชี้ใดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 48 แสดงผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.04 (0.00-0.28; Range) cell/ml x mg Cr]

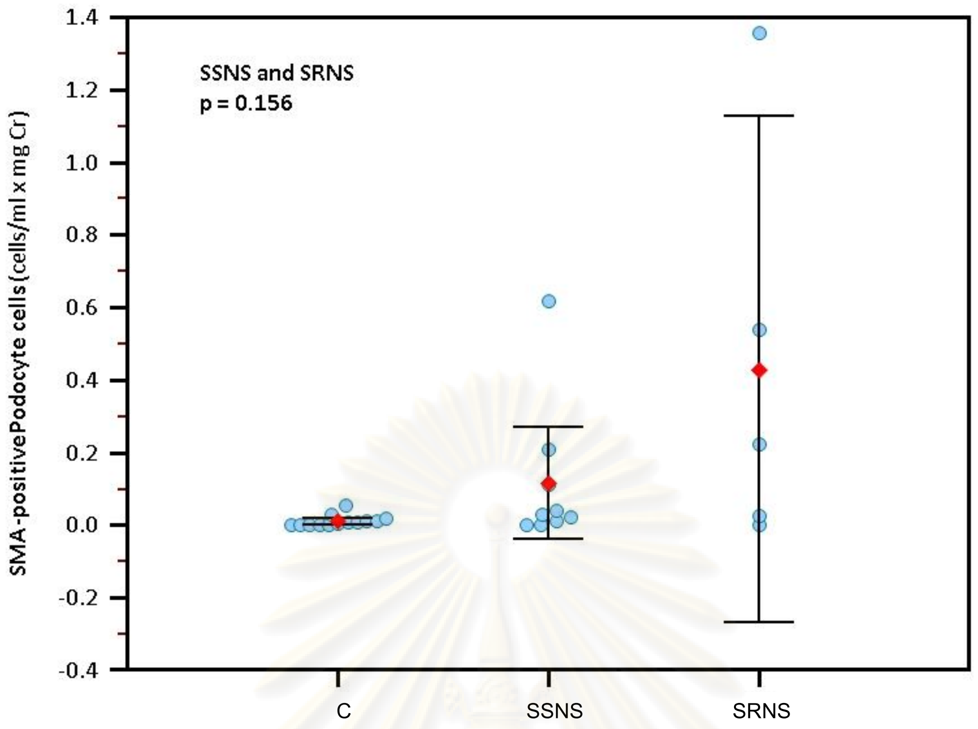
SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.08, 0.46 (0.00-1.18; Range) cell/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76, 1.20 (0.05-3.91; Range) cell/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



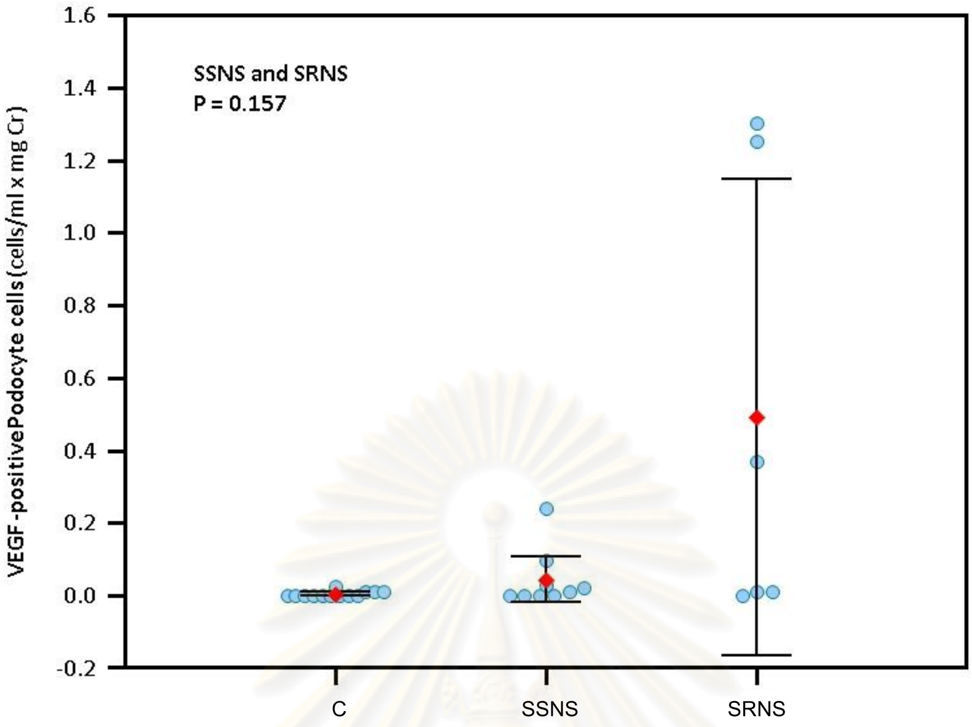
รูปที่ 49 แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.01 (0.00-0.05; Range) cell/ml x mg Cr]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03, 0.12 (0.00-0.62; Range) cell/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38, 0.66 (0.00-1.82; Range) cell/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



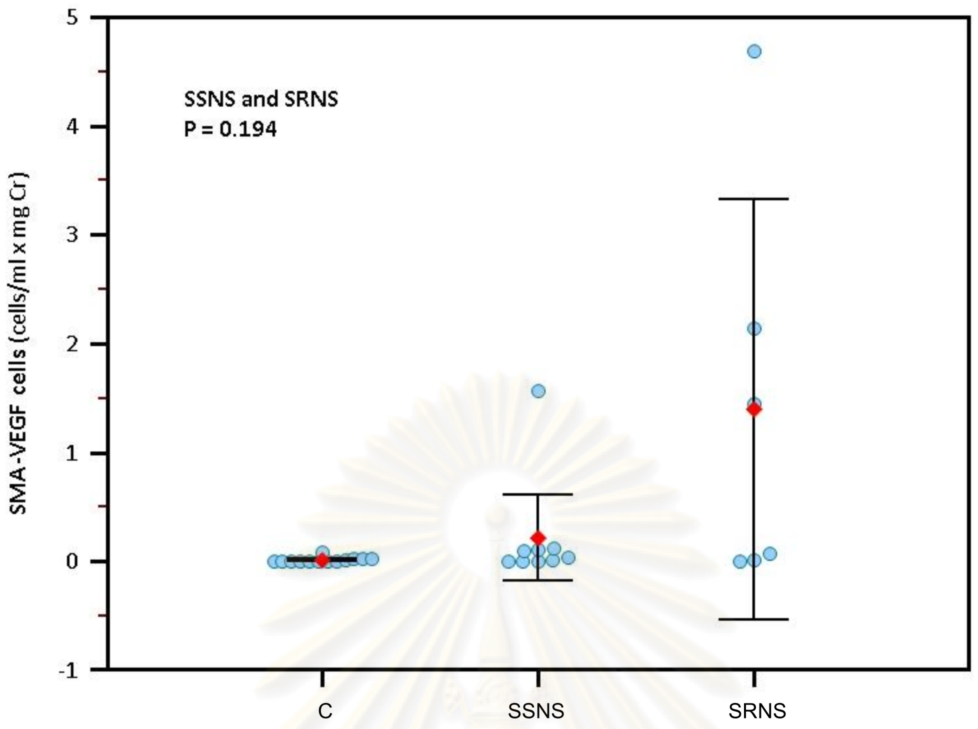
รูปที่ 50 แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF-positive podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00, 0.00 (0.00-0.03; Range) cell/ml x mg Cr]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.04 (0.00-0.24; Range) cell/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.19, 0.49 (0.00-1.30; Range) cell/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



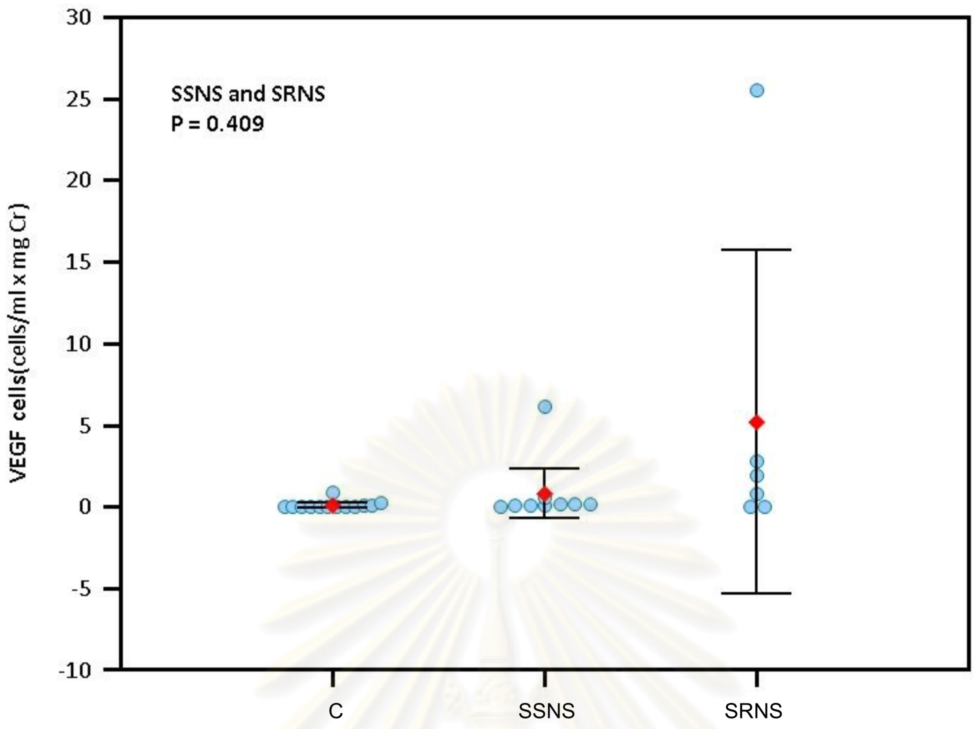
รูปที่ 51 แสดงผลการตรวจนับจำนวน SMA-VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01, 0.01 (0.00-0.05; range) cell/ml x mg Cr]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)
[ค่าเฉลี่ยผลการตรวจวัดเท่ากับ 0.04, 0.22 (0.00-1.57; range) cell/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76, 1.40 (0.01-4.69; range) cell/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 52 แสดงผลการตรวจนับจำนวน VEGF cells ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน

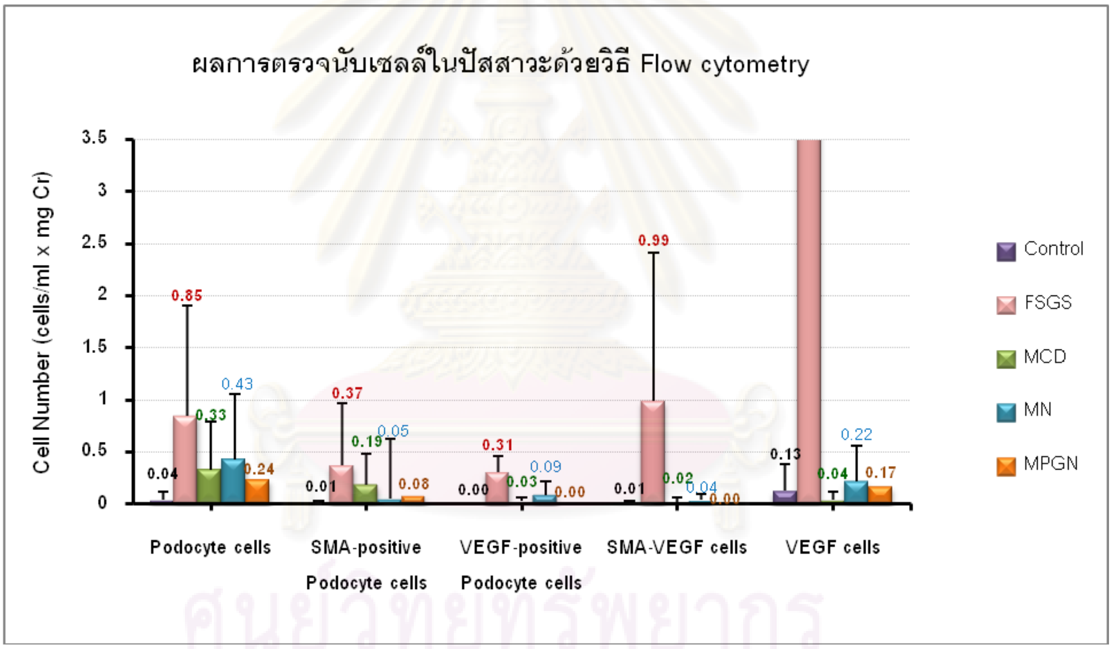
C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03, 0.13 (0.00-0.92; range) cell/ml x mg Cr]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.17, 0.85 (0.01-6.14; range) cell/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.40, 5.21 (0.01-25.52; range) cell/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบข้อมูลแบ่งแยกตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก ปรากฏว่าผู้ป่วยแบบ FSGS มีจำนวน podocyte cells, SMA–positive podocyte cells, VEGF–positive podocyte cells, SMA-VEGF cells และ VEGF cells หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมากที่สุด โดยมีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 0.00-3.91 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.57, 0.85 (0.18, 1.52; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA–positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0.00-1.82 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.08, 0.37 (0.00, 0.75; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน VEGF-positive podocyte cells อยู่ในช่วง 0.00-1.30 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02, 0.31 (0.00, 0.63; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ จำนวน SMA-VEGF cellsอยู่ในช่วง 0.00-4.69 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.10, 0.99 (0.09, 1.90; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ และ VEGF cells อยู่ในช่วง 0.00-25.52 cell/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.53, 3.88 (0.00, 8.55; 95%CI) cell/ml x mg Cr ตามลำดับ



รูปที่ 53 แสดงผลการตรวจนับเซลล์ในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **การศึกษา** podocyte marker (VEGF) **ในปัสสาวะด้วยวิธี** ELISA

เมื่อนำตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ทำการตรวจนับ podocyte cells ด้วยวิธี flow cytometry จำนวน 23 ราย ประกอบด้วยตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วย 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 69.6 และตัวอย่างปัสสาวะของตัวอย่างควบคุมจำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.4 เป็นผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์แบบ steroid sensitiveness จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.8 ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์แบบ steroid resistance จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 37.5 ของจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ทำการศึกษาการตรวจวัดระดับโปรตีน VEGF ในปัสสาวะทั้งหมด จากนั้นจึงนำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการตรวจวัดระดับของโปรตีน VEGF ด้วยวิธี Chemiluminescent ELISA ปรากฏผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

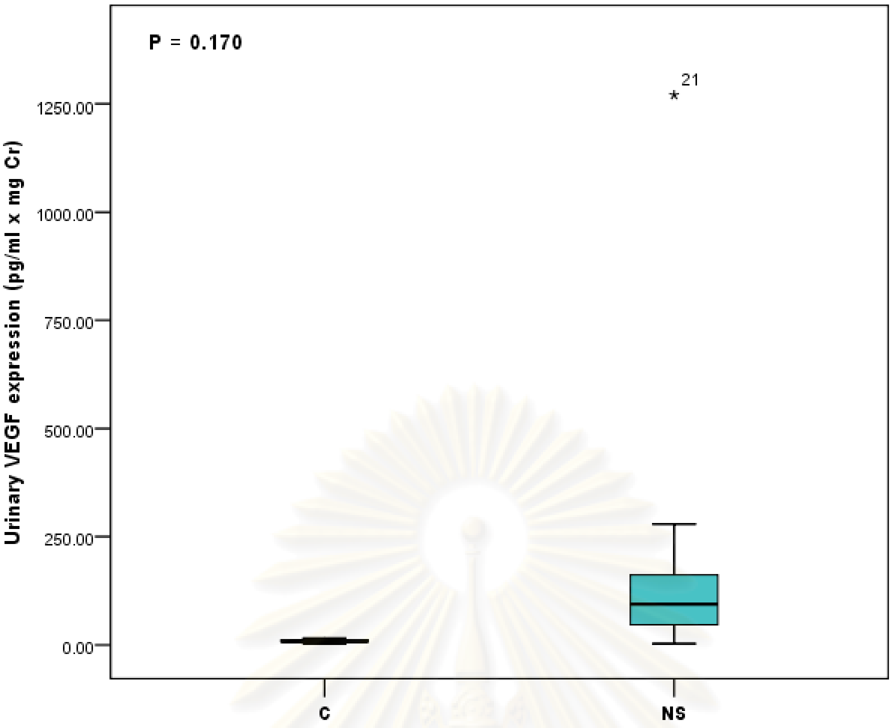
ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา		Urinary VEGF (pg/ml x mg Cr) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)
Control		8.83, 9.60 (3.71-16.22)
Nephrotic syndrome type	Total NS (16)	93.58, 173.72 (3.14-1,270.42)
	FSGS (11)	95.36, 199.26 (3.14-1,270.42)
	MCD (2)	107.23, 107.23 (90.55-123.91)
	MN (3)	53.09, 124.42 (41.21-278.97)
	MPGN	-
Steroid responsiveness	Steroid sensitiveness (7)	75.61, 239.95 (11.26-1,270.42)
	Steroid Resistance (6)	113.32, 115.64 (53.09-170.87)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจวัดระดับโปรตีน VEGF ในปัสสาวะพบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีปริมาณโปรตีน VEGF ในปัสสาวะสูงกว่าตัวอย่างควบคุม โดยมีค่าอยู่ในช่วง 3.14-1,270.42 pg/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.58, 173.72 (13.22, 334.23; 95% CI) pg/ml x mg Cr ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวัดตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีระดับ VEGF ที่ตรวจพบในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid sensitiveness โดยมีค่าอยู่ในช่วง 53.09, 170.87 pg/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 113.32, 115.64 (69.97, 161.31; 95% CI) pg/ml x mg Cr ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness มีค่าอยู่ในช่วง 11.26-1,270.42 pg/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.61, 239.95 (0.00, 663.42; 95% CI) pg/ml x mg Cr

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีน VEGF ในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกกับตัวอย่างควบคุมด้วยสถิติ independent T test ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ต่างกันด้วยสถิติ Man Whitney U test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 54 แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี ELISA ในปัสสาวะของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

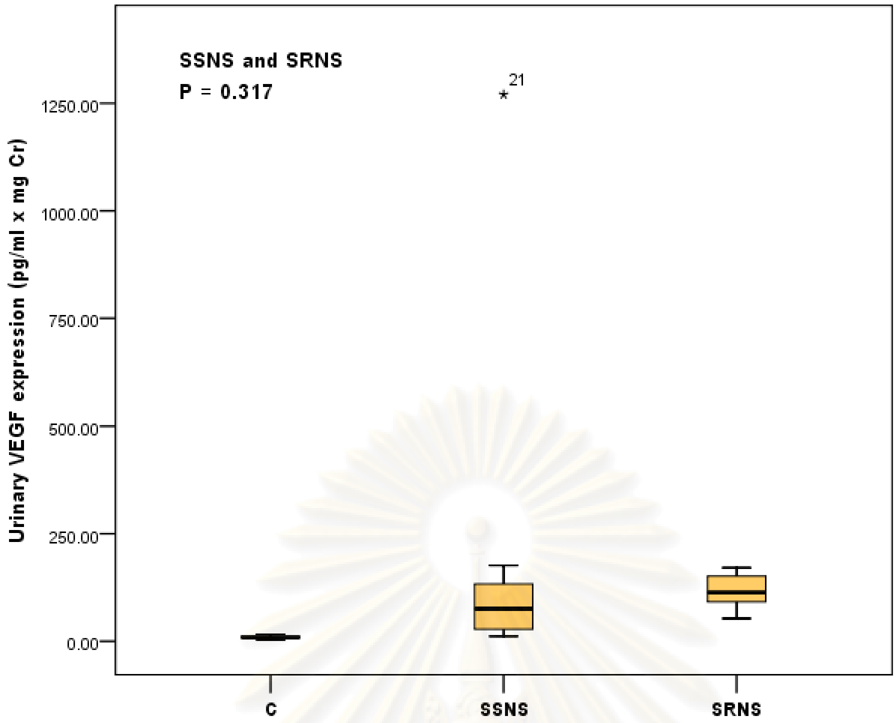
C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.83, 9.60 (3.71-16.22; Range) pg/ml x mg Cr]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.58, 173.72 (3.14-1,270.42; Range) pg/ml x mg Cr]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 55 แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี ELISA ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.83, 9.60 (3.71-16.22; Range) pg/ml x mg Cr]

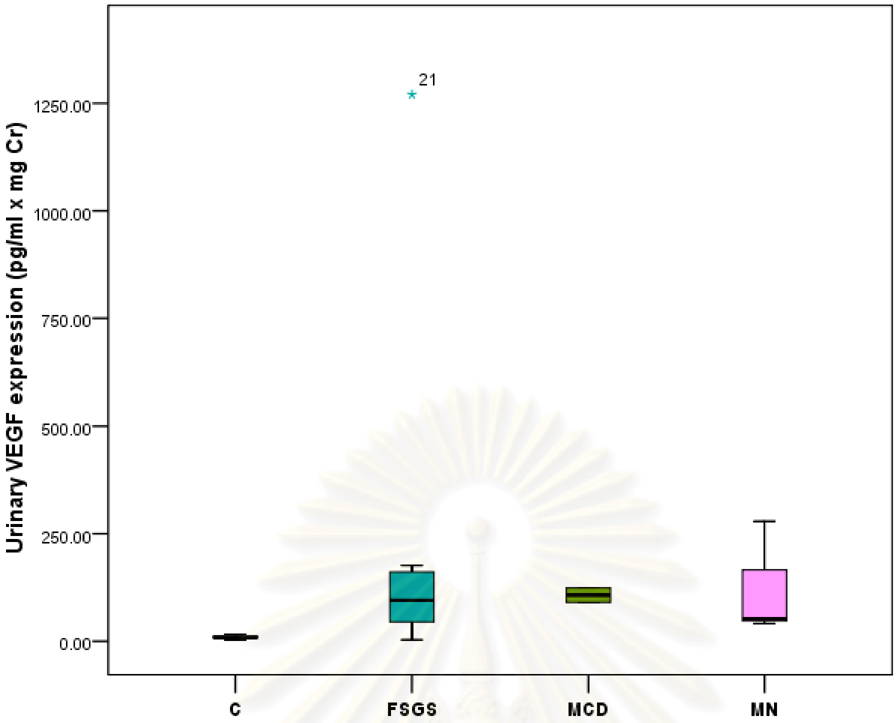
SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.61, 239.95 (11.26-1,270.42; Range) pg/ml x mg Cr]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 113.32, 115.64 (53.09-170.87; Range) pg/ml x mg Cr]

นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบระดับโปรตีนชนิด VEGF ในปัสสาวะแบ่งแยกตามชนิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกพบว่า ผู้ป่วยแบบ FSGS มีปริมาณ VEGF ในปัสสาวะสูงที่สุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 3.14-1,270.42 pg/ml x mg Cr มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 95.36, 199.26 (0.00, 441.59; 95% CI) pg/ml x mg Cr



รูปที่ 56 แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

FSGS แทน Focal segmental glomerulosclerosis

MCD แทน Minimal change disease

MN แทน Membranous nephropathy

MPGN แทน Membranoproliferative glomerulonephritis

5. **การศึกษา** podocyte marker **ในปัสสาวะและตัวอย่าง** podocyte cells **ในชิ้นเนื้อไตด้วยวิธี** quantitative real-time PCR

5.1 **การศึกษา** podocyte marker **ชนิด** VEGF **ในปัสสาวะ**

ตะกอนปัสสาวะตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ทำการตรวจนับ podocyte cells และการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี Chemiluminescent ELISA นั้นในที่นี้จะนำไปทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน VEGF ในปัสสาวะด้วยวิธี quantitative real-time PCR โดยใช้ตัวอย่างตะกอนปัสสาวะทั้งหมด 12 ราย ประกอบด้วยตะกอนปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกจำนวน 11 ราย ตัวอย่างอ้างอิงซึ่งได้จากการรวมตัวอย่างควบคุมจำนวน 7 ตัวอย่างเข้าด้วยกันนับรวมเป็น 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างตะกอนปัสสาวะทั้งหมดได้จากผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์แบบ steroid sensitiveness จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.5 และผู้ป่วยที่มีการ

ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์แบบ steroid resistance จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.5 ของตัวอย่างตะกอนปัสสาวะทั้งหมด และผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะของผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุม

		Urinary mRNA VEGF (log) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด, ค่าสูงสุด)
Nephrotic syndrome type	Total NS (15)	3.58, 2.91 (-0.89, 6.44)
	FSGS (11)	3.58, 2.82 (-0.89, 6.44)
	MCD (1)	4.65
	MN (2)	3.83, 3.83 (3.33, 4.33)
	MPGN (1)	0.31
Steroid responsiveness	Steroid sensitiveness	4.07, 3.34 (-0.89, 4.65)
	Steroid Resistance	3.33, 3.91 (1.91, 6.64)

[#] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

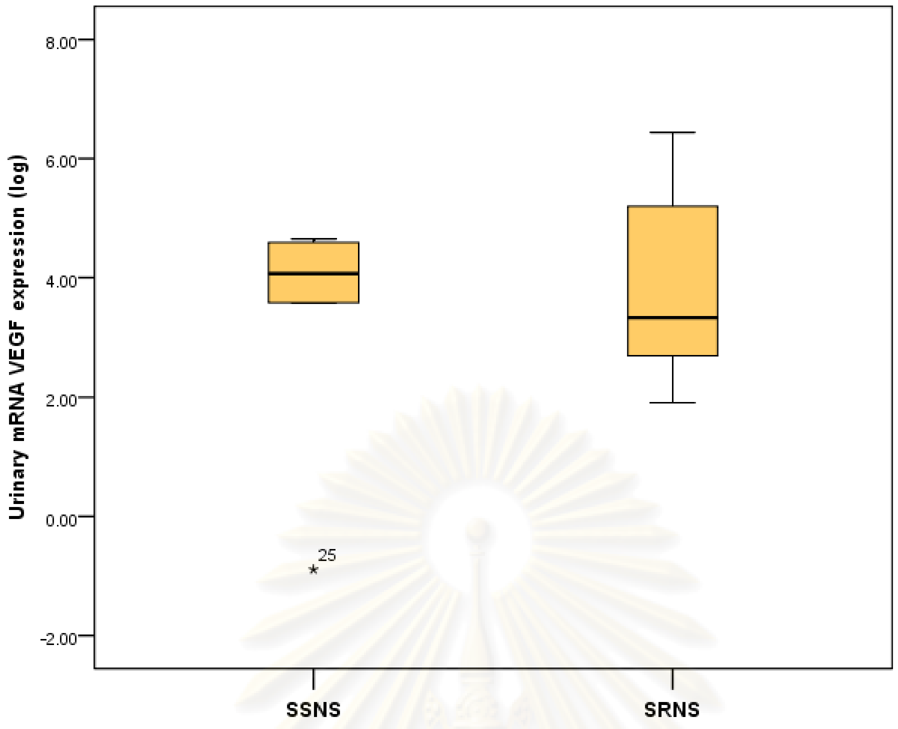
[##] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.01) เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

[Δ] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

[ΔΔ] มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.01) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

ผลการตรวจวัดระดับ VEGF ในปัสสาวะพบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีการแสดงออกของยีน VEGF เพิ่มสูงกว่าตัวอย่างอ้างอิงคิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 3.58 และ 2.91 เท่าของตัวอย่างควบคุมตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนดังกล่าวตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีการแสดงออกของยีน VEGF เพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 3.33 และ 3.91 เท่า ขณะที่ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีการแสดงออกของยีน VEGF เพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 4.07 และ 3.34 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



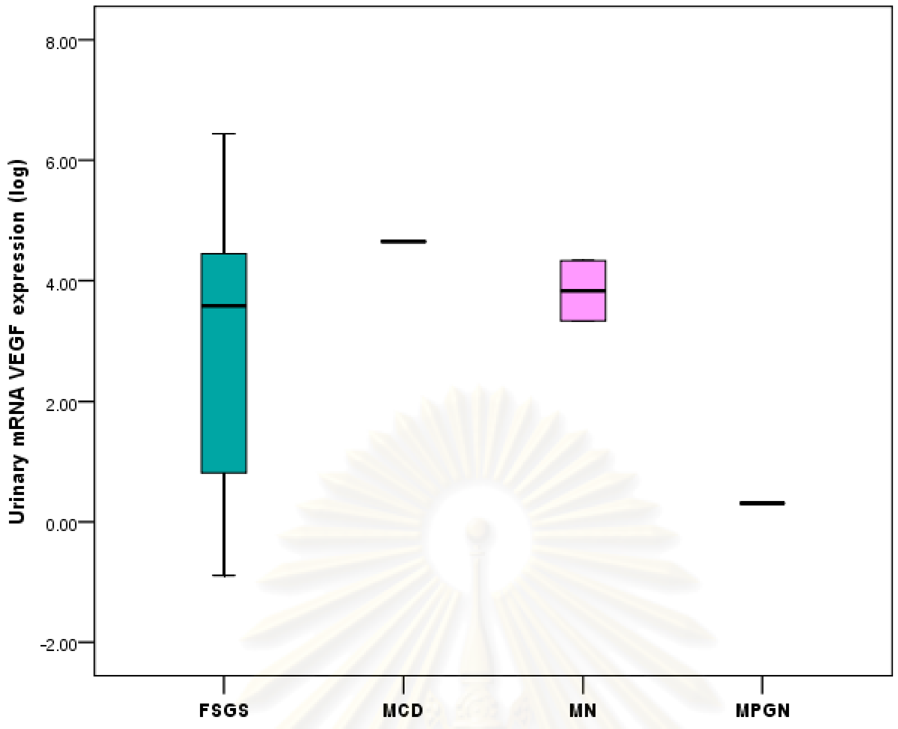
รูปที่ 57 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองแตกต่างกัน

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome) [มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.07, 3.34 (-0.89-4.65; Range) **เท่า**]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome) [มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.33, 3.91 (1.91-6.64; Range) เท่า]

นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบผลการศึกษาโดยแบ่งแยกตามชนิดโรคไตอักเสบพบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกแบบ MN มีการแสดงออกของยีน VEGF เพิ่มขึ้นในระดับสูงสุด คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.83 เท่า

ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ต่างกันด้วยสถิติ Man Whitney U test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกันด้วยสถิติ One Way ANOVA



รูปที่ 58 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลการแสดงออกของยีน VEGF ในตะกอนปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน

FSGS แทน Focal segmental glomerulosclerosis

MCD แทน Minimal change disease

MN แทน Membranous nephropathy

MPGN แทน Membranoproliferative glomerulonephritis

5.2 การศึกษา podocyte marker ชนิด VEGF ในชิ้นเนื้อไตที่ได้จากการตัดแยกด้วยวิธี microdissection

ชิ้นเนื้อไตที่ได้จากการตัดแยกเอาเฉพาะส่วนของ glomeruli ด้วยการใช้ Laser Capture Microdissection จะนำไปทำการศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ในที่นี้ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตจำนวนทั้งหมด 10 ราย ประกอบด้วยชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก 8 ราย ตัวอย่างอ้างอิงซึ่งในการศึกษานี้ใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้บริจาคไตจำนวน 2 ราย

ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 14 พบว่า การแสดงออกของยีน VEGF ใน glomeruli ของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกในตัวอย่างอ้างอิง คิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 0.78 และ 1.06 เท่า ตามลำดับ เมื่อทำการ

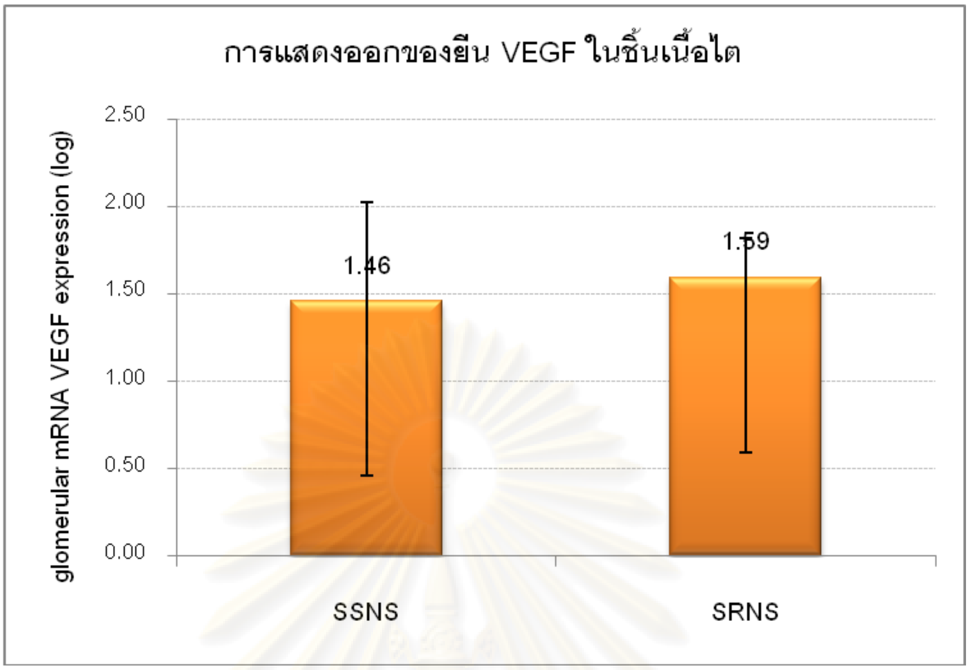
เปรียบเทียบผลการตรวจวัดตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีระดับการแสดงออกของ VEGF เพิ่มสูงกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid sensitiveness โดยผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีระดับการแสดงออกของ VEGFเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงคิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 1.59 และ 1.59 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid sensitiveness มีระดับการแสดงออกของยีน VEGF คิดเป็นค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 1.48 และ 1.46 เท่า ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน VEGF ใน glomeruli ของผู้ป่วยเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองแตกต่างกันไม่พบนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว

ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VEGF จำนวน podocyte cells และปริมาณ VEGF ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุม

	Glomerular VEGF expression (log) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด, ค่าสูงสุด)	WT-1 number (cells/glomerulus) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด, ค่าสูงสุด)	VEGF expression (%cells) ค่ามัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด, ค่าสูงสุด)
Control (2)	-	20.70, 20.70 (15.00-26.40)	7.93, 7.93 (7.21-8.65)
Total Nephrotic Syndrome (8)	0.78, 1.50 (0.22-2.09)	14.37, 14.03 (7.00-21.00)	12.30, 11.63 (6.81-15.93)
Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome (4)	1.48, 1.46 (0.78-2.09)	18.50, 17.83 (14.00-21.00)	15.79, 14.93 (13.07-15.93)
Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome (2)	1.59, 1.59 (1.43-1.75)	11.00, 11.00 (7.00-15.00)	12.31, 12.31 (11.61-13.00)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 59 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน VEGF ในชิ้นเนื้อไตระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองแตกต่างกัน

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome) [มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.48, 1.46 (0.78-2.09; Range) เท่า]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome) [มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.59, 1.59 (1.43-1.75; Range) เท่า]

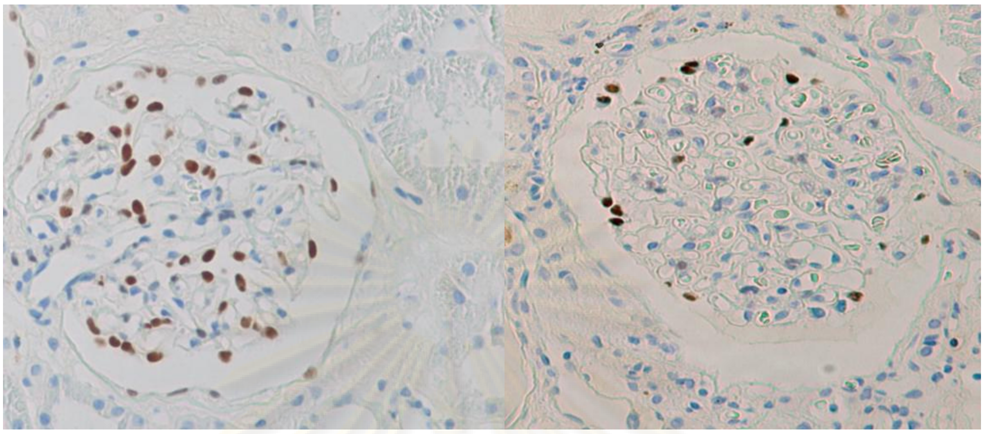
6. การตรวจนับจำนวน podocyte cells ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต

6.1 การตรวจนับจำนวน podocyte cells ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวน podocyte cells บน glomeruli ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก ในที่นี้ทำการศึกษาโดยอ้างอิงหลักการทางอิมมูโนพยาธิวิทยาหรือ immunohistochemistry ด้วยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อส่วนของ Wilm's tumor-1 protein (WT-1) ในนิวเคลียสของ podocyte cells เพื่อตรวจนับจำนวน podocyte cells โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตรายเดียวกันกับที่ทำการศึกษาในข้อ 4.2 ทั้งนี้ลักษณะของการติดสีของ WT-1 แสดงดังรูปที่ 60

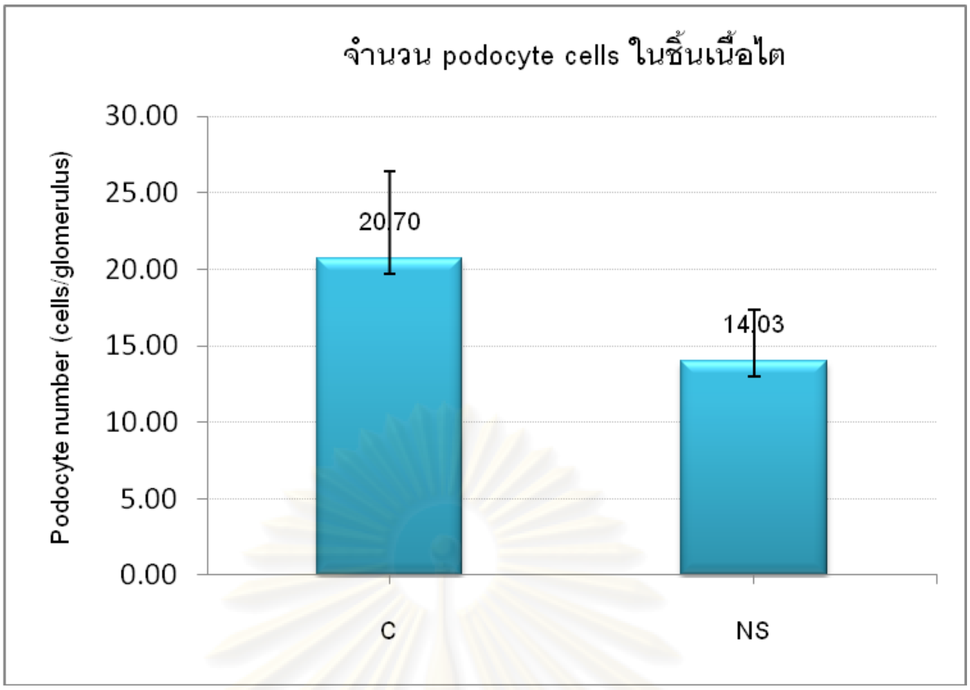
จากการตรวจนับจำนวน podocyte cells พบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีจำนวน podocyte cells ในแต่ละ glomeruli ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยมีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 7.00-21.00 cells/glomerulus มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.37, 14.03

cells/glomerulus ตามลำดับ ขณะที่จำนวน podocyte cells ของตัวอย่างอ้างอิงอยู่ในช่วง 15.00-26.40 cells/glomerulus มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.70, 20.70 ตามลำดับ โดยที่จำนวน podocyte cells ระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยกับตัวอย่างอ้างอิงนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ independent T test



รูปที่ 60 แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี WT-1 ใน glomeruli กำลังขยาย 400 เท่า
ภาพซ้าย คือ การติดสี WT-1 ใน glomerulus ของไตปกติ
ภาพขวา คือ การติดสี WT-1 ใน glomerulus ที่**ลดลง**เมื่อเทียบกับไตปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 61แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวน podocyte cells บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

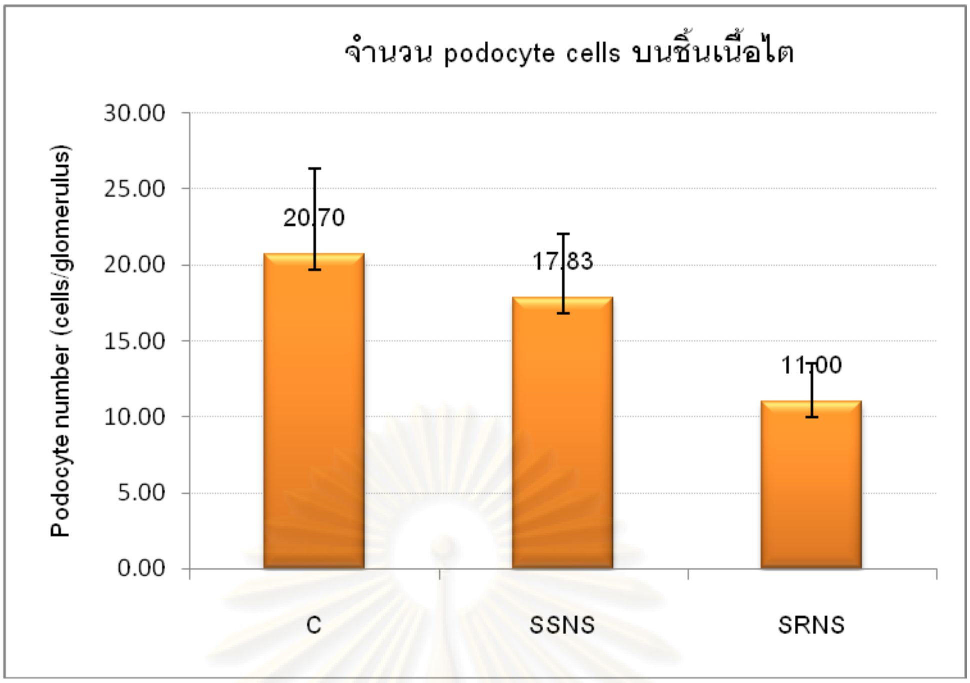
C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.70, 20.70 (15.00-26.40; Range) cells/glomerulus]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.37, 14.03 (7.00-21.00; Range) cells/glomerulus]

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน podocyte cells ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกันพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกแบบ steroid sensitiveness มีจำนวน podocyte cells ใน 1 glomerulus มากกว่าจำนวน podocyte cells บน glomerulus ของผู้ป่วยแบบ steroid resistance โดยผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกแบบ steroid sensitiveness มีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 14.00-21.00 cells/glomerulus มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.50, 17.83 cells/glomerulus ตามลำดับ ขณะที่ผู้ป่วยแบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells อยู่ในช่วง 7.00-15.00 cells/glomerulus มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.00, 11.00 cells/glomerulus ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีการตอบสนองแตกต่างกันด้วยสถิติ Man Whitney U test พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 62 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวน podocyte cells บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.70, 20.70 (15.00-26.40; Range) cells/glomerulus]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)

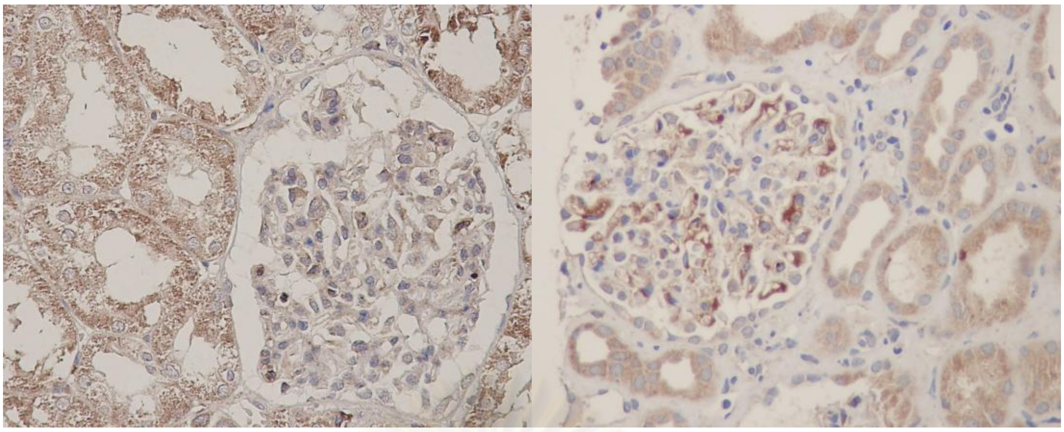
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.50, 17.83 (14.00-21.00; Range) cells/glomerulus]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.00, 11.00 (7.00-15.00; Range) cells/glomerulus]

6.2 **การตรวจนับจำนวน** podocyte marker **ชนิด** VEGF **ในชิ้นเนื้อที่ได้จากการเจาะตรวจไต**

การศึกษาการหลั่ง VEGF ภายใน glomeruli ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก ซึ่งทำการศึกษาโดยอ้างอิงหลักการ immunohistochemistry เช่นเดียวกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวน podocyte cells ในข้อ 5.1 แต่ใช้การย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VEGF และใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตรายเดียวกันกับที่ทำการศึกษาในข้อ 4.2 และ 5.1 ทั้งนี้ลักษณะของการติดสีของ VEGF แสดงในรูปที่ 63



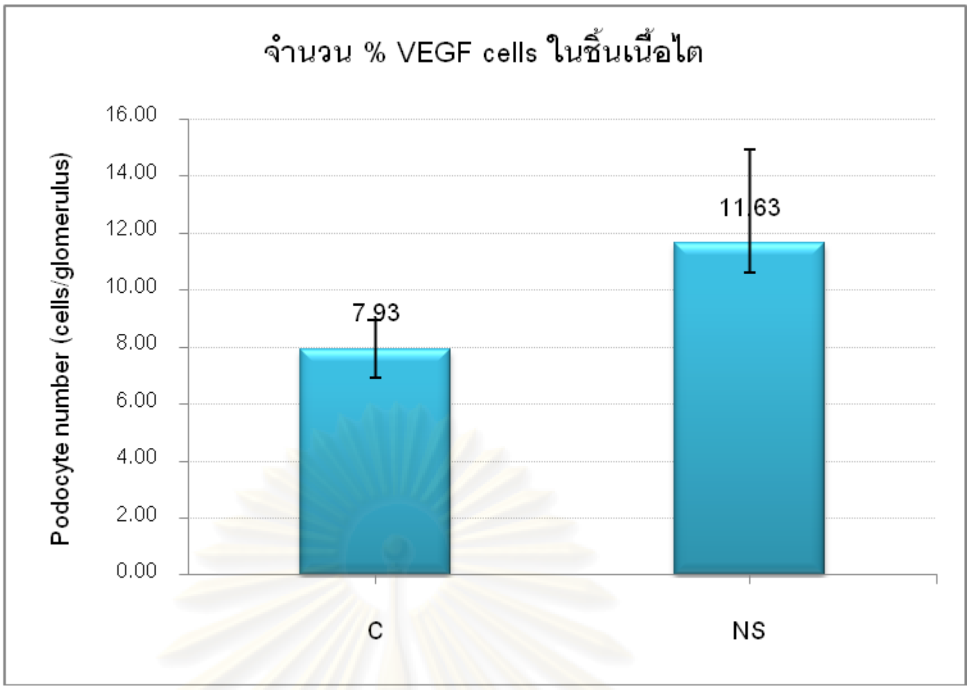
รูปที่ 63 แสดงภาพ light microscopy ของการติดสี VEGF ใน glomeruli กำลังขยาย 400 เท่า

ภาพซ้าย คือ การติดสี VEGF ใน glomerulus ของไตปกติ

ภาพขวา คือ การติดสี VEGF ใน glomerulus ที่**เพิ่มขึ้น**เมื่อเทียบกับไตปกติ

จากการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีการสร้าง VEGF จาก epithelial cells ในแต่ละ glomeruli เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยมีร้อยละของการแสดงออกของ VEGF อยู่ในช่วง 6.81-15.93 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยร้อยละของการแสดงออกเท่ากับ **9.83, 10.77** ตามลำดับ ส่วนร้อยละของการแสดงออกของ VEGF บนชิ้นเนื้อไตของตัวอย่างอ้างอิงอยู่ในช่วง 7.21-8.65 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยร้อยละของการแสดงออกเท่ากับ 7.93, 7.93 ตามลำดับ ดังรูปที่ 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 64 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลจำนวนร้อยละ VEGF บน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

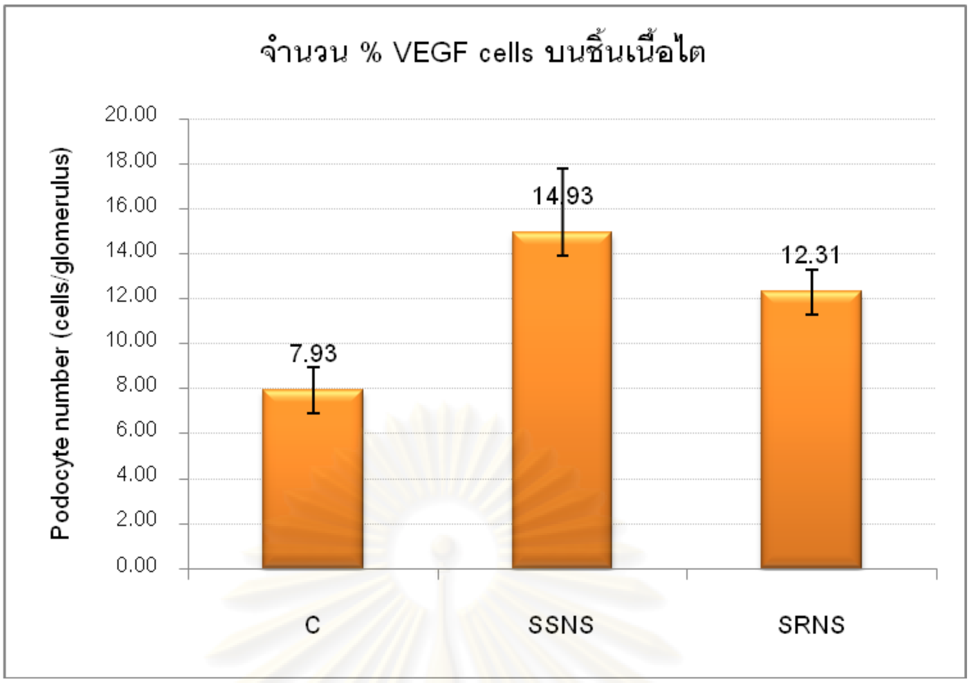
[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.93, 7.93 (7.21-8.65; Range)%]

NS หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.30, 11.63 (6.81-15.93; Range)%]

เมื่อเปรียบเทียบการสร้าง VEGF ระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ต่างกันพบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีระดับการสร้าง VEGF เพิ่มสูงกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid resistance โดยผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีร้อยละการสร้าง VEGF อยู่ในช่วง 9.83-15.93 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยร้อยละการสร้าง VEGF เท่ากับ 15.79, 14.93 ในขณะที่ผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid resistance มีร้อยละการสร้าง VEGF อยู่ในช่วง 11.61-13.00 มีค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยร้อยละการสร้าง VEGF เท่ากับ 12.31, 12.31 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์ผลการสร้าง VEGF ใน glomeruli ของผู้ป่วยเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองแตกต่างกันไม่พบนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว



รูปที่ 65 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลการสร้าง VEGF ใน glomerulus ระหว่างผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน

C หมายถึง ระดับการตรวจนับในกลุ่มควบคุม

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.93, 7.93 (7.21-8.65; Range)%]

SSNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.79, 14.93 (13.07-15.93;Range)%]

SRNS หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์ (Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome)

[ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ย เท่ากับ 12.31, 12.31 (11.61-13.00); Range)%]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 สรุปผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาวิจัยนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลระหว่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกและอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีในที่นี้เรียกแทนว่า ตัวอย่างควบคุม ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยทำการศึกษาในตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 56 ราย เป็นผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติก 20 ราย (ร้อยละ 58.8) และตัวอย่างควบคุม 14 ราย (ร้อยละ 41.2) ซึ่งตัวอย่างผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกยังประกอบด้วยผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แบบ steroid sensitiveness จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 26.5) และผู้ป่วยที่ดื้อต่อสเตียรอยด์หรือเรียกผู้ป่วยกลุ่มนี้ว่า steroid resistance จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 17.6) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งแยกตัวอย่างผู้ป่วยตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกได้ดังนี้ ผู้ป่วย FSGS จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 35.3) MCD จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 11.8) MN จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 8.8) และ MPGN จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 2.9)

จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมดเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียวจึงไม่ใช่ค่าที่ใช้อ้างอิงได้โดยทั่วไป ผลการศึกษาอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้เมื่อกระทำการศึกษาโดยครอบคลุมผู้ป่วยในแต่ละภูมิภาค อีกทั้งจำนวนของตัวอย่างที่เหลื่อมล้ำระหว่างกลุ่มผู้ป่วยแต่ละแบบเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การวิเคราะห์ผลทางสถิติไม่ตรงตามความเป็นจริงได้

ผลการศึกษาวิจัยนี้พบว่าระดับโปรตีนในปัสสาวะ คอเลสเตอรอล BUN และซีรั่มครีอะติ-นินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกและตัวอย่างควบคุมซึ่งเป็นไปตามหลักเกณฑ์สากลของการวินิจฉัยโรคไตอักเสบแบบเนฟโฟรติกแต่ไม่พบว่าระดับสารดังกล่าวนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์แตกต่างกัน และระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกต่างชนิดกัน อันแสดงให้เห็นถึงปัญหาและข้อจำกัดที่สำคัญของการประเมินอาการทางคลินิกสำหรับนำไปใช้เพื่อประโยชน์ในการทำนายโอกาสของการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ รวมถึงการวินิจฉัยเพื่อแบ่งแยกกลุ่มหรือชนิดของผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยนี้เพื่อค้นหาสารบ่งชี้การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์รวมถึงเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยอันจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness 2 รายมีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงถึง 4,893.0 และ 2,833.0 mg/dl ตามลำดับและได้รับยาในกลุ่ม furosemide หรือยาขับปัสสาวะภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนเข้าร่วมการ

วิจัย อันมีหลักฐานการศึกษาปฏิกิริยาข้างเคียงในชิ้นเนื้อไตพบว่า การใช้ยาดังกล่าวมีผลให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (mononuclear cell infiltration) หรือเกิด epitheloid granuloma ขณะเดียวกันก็มีผลทำให้เกิดการรบกวนกลไกการดูดกลับบริเวณท่อไตซึ่งเป็นการเพิ่มคุณสมบัติ permeability และอัตราการกรองของไต จึงทำให้ตรวจพบโปรตีนรั่วในปัสสาวะเพิ่มมากขึ้นตามมา

ผลทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธี flow cytometry ในการตรวจนับ podocyte cells โดยใช้เซลล์จากการเพาะเลี้ยงแล้วนำไปศึกษาใน 3 หัวข้อ ได้แก่

การประเมินความไวและความจำเพาะ โดยการให้ผู้วิจัย 1 รายทำการย้อมเซลล์โดยใช้ podocyte cells ที่เพาะเลี้ยงในรุ่นเดียวกัน จำนวนเซลล์เท่ากัน และสภาวะแวดล้อมอื่นๆ เป็นเช่นเดียวกันเป็นตัวอย่างผลบวกและใช้ PBS เป็นตัวอย่างผลลบ ซึ่งผลการทดสอบให้ความไวเท่ากับร้อยละ 87.33 และความจำเพาะร้อยละ 91.67 แสดงว่าวิธีการดังกล่าวมีความน่าเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การประเมินความแม่นยำ ทำการย้อมเซลล์โดยใช้ podocyte cells ที่เพาะเลี้ยงในรุ่นเดียวกันจำนวนทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง โดยที่แต่ละตัวอย่างมีจำนวนเซลล์และสภาวะแวดล้อมอื่นๆ เป็นเช่นเดียวกัน ซึ่งผลการทดสอบพบว่า %CV มีค่าน้อยกว่า 5 สำหรับการทดสอบ intra-observation assays และน้อยกว่า 10 สำหรับการทดสอบ inter-observation assays แสดงให้เห็นว่าวิธีการย้อมดังกล่าวนั้นสามารถให้ผลการทดสอบตรงกันในตัวอย่างเดียวกัน

ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เลือกใช้ด้วยการปั่นตกตะกอนปัสสาวะที่ความเร็วรอบแตกต่างกันพบว่า แอนติบอดีที่เลือกใช้มีความจำเพาะต่อเซลล์ที่มีองค์ประกอบของเซลล์สมบูรณ์และการพบสัญญาณของแอนติบอดีกับเศษของเซลล์ที่เกิดจากการตายหรือการแตกของเซลล์อยู่ในเกณฑ์น้อยจนถึงไม่พบเลย ดังนั้นค่าของเซลล์ที่ตรวจนับได้จากวิธีการดังกล่าวจึงหมายถึงเซลล์ที่มีความสมบูรณ์ขององค์ประกอบเท่านั้น นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบระดับความเหมาะสมของการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วแตกต่างกันพบว่า ระดับความเร็วในการปั่นตกตะกอนที่ 3,000 rpm เป็นความเร็วที่ให้ผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ได้จำนวนเซลล์มากที่สุดโดยพบการติดสีของแอนติบอดีที่เลือกใช้กับเศษเซลล์น้อยมาก ในขณะที่ความเร็วรอบ 1,500-2,000 rpm แม้จะเป็นความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการคงสภาพความมีชีวิตและความสมบูรณ์ของเซลล์ที่ดีแต่ก็ทำให้สูญเสียเซลล์บางส่วนที่มีขนาดเล็กออกไปในขั้นตอนของการล้าง ส่วนที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm ขึ้นไปให้ผลการตรวจนับจำนวน podocyte cells ที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ได้จำนวนน้อยลงตามลำดับ ซึ่งนอกจากจะสูญเสียออกไปในขั้นตอนการล้างแล้วยังมีสาเหตุจากการแตกของเซลล์เนื่องจากการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วสูงเกินไปอีกด้วย

วิธีการดังกล่าวได้นำมาใช้ในการตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะโดยอาศัยปฏิกิริยาต่อ podocalyxin ควบคู่กับการตรวจนับระดับของ VEGF cells เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การ

ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์ตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยและ α-SMA cells เพื่อศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของ epithelail cell ไปเป็น mesenchymal cell อันบ่งชี้ได้ถึงความรุนแรงหรือการลุกลามของโรค [78] อีกทั้งใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อบ่งชี้การตรวจพบ epithelial cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะ ซึ่งผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกตรวจนับจำนวน podocyte cells, VEGF cells, SMA-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมากกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับของจำนวน podocyte cells มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับจำนวน VEGF cells, SMA-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells แต่ไม่พบว่าจำนวนเซลล์เหล่านี้สัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนที่ตรวจพบในปัสสาวะ แสดงให้เห็นได้ว่า podocalyxin, VEGF และ/หรือ α-SMA สามารถใช้เป็นปัจจัยบ่งชี้เพื่อแบ่งแยกกลุ่มผู้ป่วยโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกออกจากคนปกติด้วยการตรวจนับเซลล์โดยอาศัยหลักการของ flow cytometry ได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการศึกษาโดย Yu D และคณะ [79] ที่พบว่าการหลุดลอกของ podocyte cells เป็นตัวบ่งชี้ถึงการลุกลามของการบาดเจ็บบน glomeruli ได้ดีกว่าระดับโปรตีนในปัสสาวะ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลตรวจนับจำนวน podocyte cells ในปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness กับ steroid resistance พบว่า ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells, VEGF cells, SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมีจำนวนมากกว่าผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness และตัวอย่างควบคุม แสดงให้เห็นถึงการลุกลามของการอักเสบบน glomeruli ในผู้ป่วยกลุ่ม steroid resistance ที่มากกว่าผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness ซึ่งเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ดังกล่าวระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่างกันไม่ปรากฏว่ามีค่าตัวบ่งชี้ใดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของจำนวนตัวอย่างระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม อีกทั้งในการศึกษานี้ไม่ได้แบ่งแยกศึกษาเฉพาะกลุ่มตัวอย่างที่มีกลไกของการเกิดโรคเช่นเดียวกัน ซึ่งกลไกของการเกิดโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกแต่ละแบบมีผลต่อ podocyte cells แตกต่างกัน เชื่อกันว่าการบาดเจ็บของ podocyte cells มักจะเป็นสาเหตุนำมาสู่ FSGS เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ MCD, MN และ MPGN นั้นมักพบว่าเกิดจากปัจจัยอื่นร่วมด้วยนอกเหนือจากการบาดเจ็บของเซลล์ดังกล่าว อีกทั้งในการศึกษาโดย Hara M และคณะ [80] ที่ศึกษาการบาดเจ็บของ podocyte cells ในปัสสาวะโดยอาศัยการแสดงออกของ podocalyxin และพบว่า ปริมาณ podocalyxin ที่เพิ่มสูงอย่างผิดปกตินั้นบ่งชี้ได้ถึงภาวะที่มีการบาดเจ็บของ podocyte cells แบบเฉียบพลันมากกว่าแบบเรื้อรัง แต่ในกรณีของภาวะไตอักเสบแบบเนฟโฟรติกไม่ได้จัดเป็นการบาดเจ็บในลักษณะเฉียบพลัน นอกจากนี้จากการรวบรวมข้อมูลโดย Machuca E และคณะ [81] ยังมีความเชื่อว่า

ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสเตียรอยด์แบบ steroid sensitiveness กับผู้ป่วยที่มีการตอบสนองแบบ steroid resistance บางรายโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยแบบ idiopathic NS มักจะมีการเปลี่ยนแปลงของ podocyte foot processes เกิดเป็น effacement ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อ circulating factor ที่ได้รับการกระตุ้นโดย T cells สารดังกล่าวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้าน permeability ของ filtration barrier ได้เช่นเดียวกัน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ตรวจพบ podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อยาสเตียรอยด์ต่างกัน แม้ว่าผู้ป่วย steroid resistance บางรายอาจมีการเปลี่ยนแปลงของ filtration barrier แบบถาวรและ/หรือมีความผิดปกติในระดับยีนร่วมด้วยก็ตาม

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ข้อมูลแบ่งแยกตามชนิดของโรคไตอักเสบเนฟโฟรติกปรากฏว่าผู้ป่วยแบบ FSGS มีจำนวน podocyte cells, SMA–positive podocyte cells และ VEGF cells หลุดลอกออกมาในปัสสาวะมากที่สุด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นได้ถึงการบาดเจ็บของ glomeruli ที่เลวร้ายกว่าของผู้ป่วย FSGS ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Hara M และคณะ [80] ที่ทำการศึกษาจำนวนของ podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วย FSGS เพื่อประเมินถึงการบาดเจ็บของ podocyte cells โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อ podocalyxin บนผิว podocyte cells และนำไปศึกษาด้วยวิธี immunofluorescence พบว่าผู้ป่วย primary FSGS มีจำนวน podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วย MCD และ MN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจกล่าวได้ว่าการบาดเจ็บและหลุดลอกของ podocyte cells มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพของผู้ป่วย primary FSGS อีกทั้งยังสามารถแยกกลุ่มผู้ป่วย primary FSGS ออกจากผู้ป่วยแบบอื่นได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Nakamura T และคณะ [82] ซึ่งทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของ podocyte cells ที่หลุดลอกออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วย FSGS และ MCD ก่อนและหลังการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อส่วน podocalyxin บนผิว podocyte cells และนำไปศึกษาด้วยวิธี immunofluorescence ซึ่งพบว่า ผู้ป่วย FSGS มีจำนวน podocyte cells หลุดลอกออกมาในปัสสาวะในขณะที่ตรวจไม่พบเซลล์ดังกล่าวในปัสสาวะของผู้ป่วย MCD ทั้งนี้ podocyte cells ในปัสสาวะของผู้ป่วย FSGS จะตรวจพบได้น้อยลงภายหลังการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน podocyte cell กับโปรตีนในปัสสาวะ ระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของตัวอย่างที่ทำการศึกษาอีกด้วย

ตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ทำการตรวจนับ podocyte cells ยังได้ทำการตรวจวัดระดับโปรตีนชนิด VEGF เพื่อประเมินการหลั่งโปรตีนดังกล่าวจากส่วนของ epithelial cells สมบูรณ์และโปรตีนส่วนของ VEGF ที่เกิดจากการแตกของเซลล์และล่องลอยอยู่ในตัวอย่าง

อย่างอิสระพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีค่า VEGF สูงกว่าตัวอย่างควบคุมแต่ไม่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีระดับ VEGF ที่ตรวจพบในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid sensitiveness ซึ่งในการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วย 3 รายที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีระดับโปรตีน VEGF ในปัสสาวะมีค่าสูงถึง 7,000 5,750.66 และ 6647.81 pg/ml โดยผู้ป่วยรายดังกล่าวได้รับยาในกลุ่ม furosemide หรือยาขับปัสสาวะก่อนเข้าร่วมการวิจัย ร่วมกับได้รับยายากดภูมิคุ้มกันอันมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้แก่ การกระตุ้นคุณสมบัติ ด้าน permeability ของ filtration barrier ซึ่งมีผลให้มีระดับความดันเลือดเปลี่ยนแปลงไปจึงมีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง VEGF เพิ่มสูงมากตามมา จึงอาจทำให้ตรวจพบโปรตีนชนิด VEGF รั่วในปัสสาวะออกมาเพิ่มมากขึ้นพร้อมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ

การเปรียบเทียบความแตกต่างของการตรวจวัดระดับสารดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกแบบ MN ตรวจวัดได้ค่าสูงสุด ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Matsumoto K และคณะ [83] ที่พบว่าระดับ VEGF มีระดับสูงขึ้นในผู้ป่วย MCD และมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับระดับพยาธิสภาพ รวมทั้งระดับโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะด้วย

ตะกอนปัสสาวะที่ได้จากการปั่นตกปัสสาวะตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ทำการตรวจนับ podocyte cells และการตรวจวัดระดับ VEGF ด้วยวิธี ELISA ส่วนหนึ่งได้ถูกนำมาศึกษาการแสดงออกของ VEGF ด้วยวิธี quantitative real-time PCR พบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีการแสดงออกของ VEGF เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีระดับ VEGF ที่ตรวจพบในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid sensitiveness ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry และสอดคล้องกับการศึกษาโดย Saime P และคณะ [84] ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง VEGF ที่ตรวจพบในปัสสาวะ เลือด และการแสดงออกของยีน VEGF ในเม็ดเลือดขาว ซึ่งพบว่า โปรตีน VEGF และการแสดงออกของยีน VEGF ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน VEGF ใน glomeruli โดยการตัดแยกเอาเฉพาะส่วนของ glomeruli ในชิ้นเนื้อไตด้วยการใช้ laser capture microdissection และนำไปทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน VEGF ด้วยวิธี quantitative real-time PCR พบว่าผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีการแสดงออกของยีน VEGF เพิ่มสูงกว่าตัวอย่างควบคุมเช่นเดียวกับ

การแสดงออกที่พบในตะกอนปัสสาวะ และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนดังกล่าวตามรูปแบบของการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีระดับ VEGF ที่ตรวจพบในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองแบบ steroid resistance อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่สามารถเชื่อถือได้ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อยเกินไป แต่ก็พบว่าในการศึกษาโดย Boner G และคณะ [85] พบว่า การแสดงออกของยีน VEGF ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยกลุ่ม MCD

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบจำนวน podocyte cells และการหลั่ง VEGF ใน glomeruli ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งในที่นี้ใช้ชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่บริจาคไตเป็นตัวอย่างควบคุม โดยการประเมินจำนวน podocyte cells อาศัยการทำปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อส่วนของ Wilms tumor-1 protein (WT-1) ในนิวเคลียสซึ่งเป็นตัวบ่งชี้และพบใน podocyte cells ที่โตเต็มวัยและไม่พบใน parietal cells หรือ mesangial cells ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีจำนวน podocyte cells ในแต่ละ glomeruli ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุที่นำมาสู่การตรวจพบโปรตีนหลุดรั่วออกมาในปัสสาวะ ขณะเดียวกันจำนวน podocyte cells ที่ลดลงนี้ยังพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่นำมาสู่การเกิด sclerosis ในไตอีกด้วย และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness กับ steroid resistance พบว่า ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells น้อยกว่า แต่เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีการตอบสนองแตกต่างกันด้วยสถิติ Man Whitnet U test พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในส่วนของการศึกษา VEGF ในชิ้นเนื้อไตด้วยตัวอย่างในเดียวกันกับที่ใช้ศึกษา WT-1 พบว่า ผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกมีจำนวน VEGF cells เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละ glomeruli เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ทั้งนี้พบได้ว่า VEGF มีบทบาทสำคัญในภาวะที่มีการอักเสบเกิดขึ้นโดยเฉพาะการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) รวมถึงการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (chemotaxis) และยังมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรค โดยพบว่าในภาวะของ FSGS อาจจะพบได้ว่าระดับของ podocyte cells ที่ลดต่ำลงเกิดเนื่องมาจากการหลุดลอกของ podocyte cells ออกไปพร้อมปัสสาวะได้ ขณะที่ MPGN อาจจะพบได้ทั้งมากขึ้นและลดลงแต่จะไม่พบ VEGF ในบริเวณที่เป็น glomerulosclerosis เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness กับ steroid resistance พบว่า ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ steroid sensitiveness มีการสร้าง VEGF จาก epithelial cells มากกว่าการแสดงออก

ในผู้ป่วยแบบ steroid resistance แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีการตอบสนองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาวิจัยนี้พบการเปลี่ยนแปลงในการตรวจวัดในปัสสาวะโดยผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อสเตียรอยด์แบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells, VEGF cells, SMA-positive podocyte cells, SMA-VEGF cells และระดับโปรตีน VEGF รวมถึง urinary mRNA VEGF expression สูงกว่าผู้ป่วย steroid sensitiveness แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยกลุ่ม steroid resistance มีการหลุดลอกของ epithelial cells ที่ยังคงสมบูรณ์ด้วยองค์ประกอบและคงความมีชีวิตในจำนวนที่มากกว่าผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness จึงหมายรวมได้ถึงพยาธิสภาพที่รุนแรงกว่าบน glomeruli ของผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว แม้ว่าจะผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness จะมีระดับโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าก็ตาม ทั้งนี้โปรตีนดังกล่าวนั้นสามารถพบได้ในสภาวะอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของไตได้เช่นกัน อาทิ ภาวะไข้สูง ภาวะอ้วน ภาวะความดันเลือดสูง เป็นต้น

ส่วนการศึกษาในชิ้นเนื้อไตพบว่าผู้ป่วยแบบ steroid resistance มีจำนวน podocyte cells ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ร่วมกับพบการแสดงออกของ VEGF บนชิ้นเนื้อไตและ glomerular mRNA VEGF expression ลดน้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่ม steroid sensitiveness จึงเป็นไปได้ว่าการลดลงของ VEGF เมื่อมีการลดน้อยลงของจำนวน podocyte cells ใน glomeruli บ่งชี้ได้ว่า VEGF ไม่ใช่ตัวบ่งชี้หลักของการสะท้อนการบาดเจ็บของ podocyte cells แต่มีบทบาทร่วมในการซ่อมแซมการบาดเจ็บของ glomeruli ดังเช่นในกรณีที่เกิด glomerulosclerosis

5.2 สรุปผลการวิจัย

1. จำนวน podocyte cells, VEGF cells, SMA-positive podocyte cells, VEGF-positive podocyte cells และ SMA-VEGF cells รวมถึง urinary mRNA VEGF expression สามารถใช้บ่งชี้การบาดเจ็บของ glomeruli และคัดแยกผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกออกจากคนปกติได้
2. VEGF ยังไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ในผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติก แต่สามารถใช้แบ่งแยกผู้ป่วยไตอักเสบเนฟโฟรติกออกจากคนปกติได้อย่างชัดเจน

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยนี้เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจนสามารถนำไปใช้อ้างอิงได้โดยทั่วไป ควรทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยให้ครอบคลุมในแต่ละภูมิภาค โดยมีการเพิ่มขนาดของตัวอย่างและจำเพาะเจาะจงกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะหรือกลไกของโรค เป็นต้น

รายการอ้างอิง

[1] Jarad, G. Miner, J.H. Update on the glomerular filtration barrier. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 18 (2009): 226-32.

[2] Haraldsson, B. Jeansson, M. Glomerular filtration barrier. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 18 (2009): 331-5.

[3] Satchell, S.C. Braet, F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. **Am J Physiol Renal Physiol** 296 (2009): F947-56.

[4] Haraldsson, B. Nyström, J. Deen, W.M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. **Physiol Rev** 88 (2008): 451-87.

[5] Tryggvason, K. Pettersson, E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. **J Intern Med** 254 (2003): 216-24.

[6] Tryggvason, K. Patrakka, J. Wartiovaara, J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. **N Engl J Med** 354 (2006): 1387-401.

[7] Johnstone, D.B. Holzman, L.B. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. **Nat Clin Pract Nephrol** 2 (2006): 271-82.

[8] Patrakka, J. Tryggvason, K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. **Nat Rev Nephrol** 5 (2009): 463-8.

[9] Kanjanabuch, T. Eiam-Ong, S. Introduction to glomerular diseases.In: Eiam-Ong S. (eds.), **Nephrology. Bangkok: Text and Journal Publication Company** 2004: 359-95.

[10] Chen, C.A. *et al*. Reduced podocyte expression of $\alpha 3\beta 1$ integrins and podocyte depletion in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis and chronic PAN-treated rats. **J Lab Clin Med**. 147 (2006):74-82.

[11] Macconi, D. *et al*. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. **Am J Pathol** 168 (2006): 42-54.

[12] Kanjanabuch, T. *et al*. Etiologies of glomerular diseases in Thailand: a renal biopsy study of 506 cases. **J Med Assoc Thai** 88 (2005): S305-11.

[13] Naini, A.E. Harandi, A.A. Ossareh, S. Ghods, A. Bastani, B. Prevalence and clinical findings of biopsy-proven glomerulonephritidis in Iran. **Saudi J Kidney Dis Transpl** 18 (2007): 556-64.

[14] Wong, W. Idiopathic nephrotic syndrome in New Zealand children, demographic, clinical features, initial management and outcome after twelve-month follow-up: results of a three-year national surveillance study. **J Paediatr Child Health** 43 (2007): 337-41.

[15] Yuen, L.K. Lai, W.M. Lau, S.C. Tong, P.C. Tse, K.C. Chiu, M.C. Ten-year review of disease pattern from percutaneous renal biopsy: an experience from a paediatric tertiary renal centre in Hong Kong. **Hong Kong Med J** 14 (2008): 348-55.

[16] Reshi, A.R. *et al*. Etiological profile of nephrotic syndrome in Kashmir. **Indian J Nephrol** 18 (2008): 9-12.

[17] Mitwalli, A.H. *et al*. Prevalence of glomerular diseases: King Khalid University Hospital, Saudi Arabia. **Saudi J Kidney Dis Transpl** 11 (2000): 442-8.

[18] Department of Paediatric Nephrology. 2008. **Nephrotic Syndrome Guidelines**. England. Newcastle upon Tyne Hospitals.

[19] Bagga, A. *et al*. Management of steroid sensitive nephrotic syndrome: revised guidelines. Indian Pediatr 45 (2008): 203-14.

[20] British Association for paediatric nephrology and research unit, Royal College of Physicians. Consensus statement on management and audit potential for steroid responsive nephrotic syndrome. **Arch Dis Child** 70 (1994): 151-7.

[21] McBryde, K.D. Kershaw, D.B. and Smoyer, W.E. Pediatric Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. **Curr Probl Pediatr** 31 (2001):280-307.

[22] Kim, J.S. Bellew, C.A. Silverstein, D.M. Aviles, D.H. Boineau, F.G. Vehaskari, V.M. High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. **Kidney Int** 68 (2005): 1275-81.

[23] Menini, S. *et al*. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. **Diabetologia** 50 (2007): 2591-9.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[24] Suzuki, T. et al. Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of cellular/collapsing focal segmental glomerulosclerosis. **Am J Pathol** 174 (2009): 1675-82.

[25] Lemley, K.V. *et al*. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. **Kidney Int** 61 (2002): 1475-85.

[26] Gruden, G. Perin, P.C. Camussi, G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. **Curr Diabetes Rev** 1 (2005): 27-40.

[27] Nakamura, T. *et al*. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. **Nephrol Dial Transplant** 15 (2000): 1379-83.

[28] Nakamura, T. *et al*. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. **Am J Med Sci** 320 (2000): 112-6.

[29] Shirato, I. Hishiki, T. Tomino, Y. Podocyte loss and progression of diabetic nephropathy. **Contrib Nephrol** 134 (2001): 69-73.

[30] Petermann, A.T. *et al*. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. **Kidney Int** 64 (2003): 1222-31.

[31] Eroschenko, V.P. Di Fiore's Atlas of histology with functional correlations. 8th ed. Canada: Williams & Wilkins, 199 6.

[32] ขนิษฐา ศรีเมืองวงศ์. (2548). **ระบบขับถ่ายปัสสาวะ** (Urinary System) (เอกสารประกอบการสอน). พิษณุโลก: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[33] Mathieson, P.W. Update on the podocyte. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 18 (2009): 206-11.

[34] Barisoni, L. Mundel, P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. **Am J Nephrol** 23 (2003): 353-60.

[35] Pavenstädt, H. Kriz, W. Kretzler, M. Cell biology of the glomerular podocyte. **Physiol Rev** 83 (2003): 253-307.

[36] Barisoni, L. Schnaper, H.W, Kopp, J.B. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. **Arch Pathol Lab Med** 133 (2009): 201-16.

[37] Kawachi, H. *et al*. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. **Clin Exp Nephrol** 13 (2009): 275-80.

[38] Kreidberg, J.A. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. **J Am Soc Nephrol** 14 (2003): 806-14.

[39] Oh, J. Reiser, J. Mundel, P. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol** 19 (2004): 130-7.

[40] Rascle, A. Suleiman, H. Neumann, T. Witzgall, R. Role of transcription factors in podocytes. **Nephron Exp Nephrol** 106 (2007): e60-6.

[41] Asanuma, K. Mundel, P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. **Clin Exp Nephrol** 7 (2003): 255-9.

[42] Chugh, S.S. Transcriptional regulation of podocyte disease. **Transl Res** 149 (2007): 237-42.

[43] Smoyer, W.E. Mundel, P. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. **J Mol Med** 76 (1998): 172-83.

[44] Eremina, V. Baelde, H.J. Quaggin, S.E. Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. **Nephron Physiol** 106 (2007): p32-7.

[45] Foster, R.R. *et al*. Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol** 284 (2003): F1263-73.

[46] Marshall, C.B. Shankland, S.J. Cell cycle regulatory proteins in podocyte health and disease. **Nephron Exp Nephrol** 106 (2007): e51-9.

[47] Chuang, P.Y. He, J.C. Signaling in regulation of podocyte phenotypes. **Nephron Physiol** 111 (2009): p9-15.

[48] Petermann, A. Floege, J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. **Nephron Clin Pract** 106 (2007): c61-6.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[49] Wiggins, J.E. *et al*. Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. **J Am Soc Nephrol** 16 (2005): 2953-66.

[50] Camici, M. Urinary detection of podocyte injury. Biomed Pharmacother 61 (2007): 245-9

[51] Senger, D.R. *et al*. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science** 219 (1983):983–985

[52] Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney Int** 56 (1999): 794-814.

[53] Senger, D.R. *et al*. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res** 50 (1990): 1774–8.

[54] Dvorak, H.F. Brown, L.F. Detmar, M. Dvorak, A.M.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol** 146 (1995):1029-39.

[55] Kitamoto, Y. Tokunaga, H. Tomita, K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. **J Clin Invest** 99 (1997): 2351-7.

[56] Zhao, Q. *et al*. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. **Circulation** 105 (2002): 1110–1115.

[57] Senger, D.R. Vascular Endothelial Growth Factor: Much More than an Angiogenesis Factor. **Mol Biol Cell** 21 (2010): 377-379.

[58] Hoeben, A. *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev** 56 (2004): 549-80.

[59] Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev** 25 (2004): 581-611.

[60] Bates, .DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. **Cardiovasc Res** 87 (2010): 262-71.

[61] Neufeld, G. Cohen, T. Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J** 13 (1999): 9–22.

[62] Takahashi, H. Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)** 109 (2005): 227-41.

[63] Gluzman-Poltorak, Z. Cohen, T. Shibuya, M. Neufeld, G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. **J Biol Chem** 276 (2001): 18688-94.

[64] Kärpänen, T. *et al*. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. **FASEB J** 20 (2006): 1462-72.

[65] Garber, H.P. Hillan, K.J. Ryan, A.M. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. **Development** 126 (1999): 1149-59.

[66] Foster, R.R Hole, R. Anderson, K. Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol** 284 (2003): F1263-73.

[67] Donckerwolcke, R.A.M.G. Cameron, J.S. The nephrotic syndrome: management, complications, and pathophysiology In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG, and Ypersele Cv (eds.), Oxford Textbook of Clinical Nephrology, 3rd Edition . **England:** Oxford University Press 2005: 415-436.

[68] Simmer, M. (2009). Flow cytometry: a technology to count and sort cells(ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.scq.ubc.ca/flow-cytometry-a-technology-to-count-and-sort-cells/ [2553, พฤษภาคม, 2]

[69] Rahman, M, (2006). Introduction to Flow Cytometry (คู่มือการใช้) Oxford: Serotec Ltd., Kidlington, Oxford , UK

[70] อโณทัย โภคาธิกรณ์. **(2549). Basic Real-time PCR** (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://gotoknow.org/file/panothai/Basic+RealTimePCR.pdf [2553, พฤษภาคม, 2]

[71] วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. (2551). **พื้นฐาน Real-time PCR** (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://microbio.md.kku.ac.th/mdbtemplate/mytemplate/template.php?component=view_article&qid=203 [2553, พฤษภาคม, 2]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[72] Gibthai Co., Ltd. (2008). **Real-time PCR technology** (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12&page=4 [2553, พฤษภาคม, 2]

[73] Giulietti, A. Overbergh, L. Valckx, D. Decallonne, B. Bouillon, R. Mathieu, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods.** (25) 2001: 386-401.

[74] Curran, S. McKay, J.A. McLeod, H.L. Murray, G.I. Laser capture microscopy. **J Clin Pathol:Mol Pathol** 53 (2000): 64–68

[75] Fend, F. Kremer, M. Quintanilla-Martinez, L. Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. **Pathobiology** 68 (2000): 209-14.

[76] Espina, V. Heiby, M. Pierobon, M. Liotta, L.A. Laser capture microdissection technology. **Expert Rev Mol Diagn**. 7 (2007): 647-57.

[77] Bonner, R.F. *et al*. Laser captures microdissection: molecular analysis of tissue. **Science**. 278(1997):1481-3.

[78] Geleilete, T.J. Costa, R.S. Dantas, M. Coimbram T.M. Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. **Braz J Med Biol Res.** 34 (2001): 985-91.

[79] Yu, D. *et al*. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. **J Am Soc Nephrol**. 16 (2005): 1733-41.

[80] Hara, M. Yanagihara, T. and Kihara, I. Urinary Podocytes in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Nephron** 89 (2001):342–47.

[81] Machuca, E. Benoit, G. Antignac, C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. **Hum Mol Genet.** 15 (2009): R185-94.

[82] Nakamura, T. *et al*. The Urinary Podocyte as a Marker for the Differential Diagnosis of Idiopathic Focal Glomerulosclerosis and Minimal-Change Nephrotic Syndrome. **Am J Nephrol** 20 (2000):175–9.

[83] Matsumoto, K. Kanmatsuse, K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephritic syndrome. **Clin Nephrol** 55 (2001): 269–74.

[84] Paydas, S. Balal, M. Tanriverdi, K,.Sertdemir, Y. Baslamisli, F. The Relationship between the VEGF Levels and VEGF mRNA Expression and Clinical Course in Different Glomerulonephritis. **Ren Fail** 29 (2007):779-84.

[85] Boner, G. *et al*. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) play a role in the pathogenesis of minimal change disease? **Nephrol Dial Transplant** 18(2003):2293-9.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. **เครื่องมือ**

    1.1 Air Jacket CO_2 Incubator (NuAire: model NU-8700)

    1.2 Analytical balance (Precia: model XB2200C)

    1.3 Analytical balance (Ohaus: model AR2140)

    1.4 Autoclave (Hiclave: model HVA-85)

    1.5 Centrifuge (Beckman Coulter: model Allegra X-15R)

    1.6 Flow cytometry (BD Biosciences: model FACS calibur)

    1.7 Fluorescent /Phase contrast microscope (Olympus: model DP-72)

    1.8 Freezer-20°C (Sanyo)

    1.9 Freezer–80°C (Sanyo: model MDF-U5086W)

    1.10 Hot air oven (Binder: model B28)

    1.11 Hot plate stirrer (LabTech®: model LMS-100)

    1.12 Inverted microscope (Nikon: model TS100)

    1.13 Laminar flow (Thermo electron corporation: model SAFE 2010)

    1.14 Laser capture microdissection (Carl Zeiss)

    1.15 Microfluid Spectrophotometer (Thermo Scientific: model NanoDrop 1000)

    1.16 microtome (Shadon Finesse)

    1.17 Oven (Binder: model B28)

    1.18 pH meter (Fisher scientific: model AB15)

    1.19 Real-Time PCR Systems (Roche Applied Science: model LightCycler 2.0)

    1.20 Refrigerator 4ºC (Sharp: model SJD56N)

    1.21 Refrigerated Centrifuge (Boeco: model U32R)

    1.22 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf: model 5415R)

    1.23 Spectophotometer (Thermo Fisher Scientific: model Multiskan EX)

    1.24 Thermal Cycler (Applied Biosystems: model 2720)

    1.25 Tissue embedding (LEICA: model EG1150H)

    1.26 Tissue processor

    1.27 Vaccuum pump

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.28 Vortex mixer (Labnet: model VX100)

1.29 Water bath (Memmert: model M22)

2. อุปกรณ์

2.1 Adhesive cap 500 opaque (Carl Zeiss)

2.2 Adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P1000 (100-1,000 µl) (Gilson)

2.3 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex)

2.4 Coplin jar

2.5 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex)

2.6 Filter paper No.2 (Whatman)

2.7 Flask: 250 ml, 500 ml, 1000ml (Pyrex)

2.8 Glass vaccuum filtration unit (Gibco)

2.9 Lris scissors

2.10 Membrane slide 1.0 PEN (Carl Zeiss)

2.11 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Axygen)

2.12 Parafilm (American Nation Can)

2.13 Petri dish (Corning)

2.14 Pipette (Corning)

2.15 Pipeting aid (Gilson)

2.16 Pipette tip: 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1,000 µl (Axygen)

2.17 Polypropylene conical tube:15 ml และ 50 ml (Corning)

2.18 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex)

2.19 Staining jar

2.20 Stirring-magnetic bar

2.21 Syringe: 5 ml, 10 ml, 20 ml (Thermo)

2.22 Syringe filter: 0.2 µm (pore size) diameter 40 mm (Minisart)

2.23 Tissue culture flask: 25 cm^2 (NUNC)

2.24 Tissue forcep

2.25 Tissue cassette

2.26 Well plate: 6 well plate, 12 well plate (Corning)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

1) Fetal bovine serum (Gibco: cat.no.10270)
2) Insulin (Sigma-Aldrich: cat.no.I1882)
3) Penicillin-streptomycin 10,000 U/ml (Gibco: cat.no. 15140-122)
4) RPMI medium 1640 (Gibco: cat.no. 31800-022)
5) Sodium Bicarbonate (Sigma-Aldrich: cat.no. S4772)
6) Trasferrin (Sigma-Aldrich: cat.no. T0665)
7) Trypsin (Sigma-Aldrich: cat.no. T7409)
8) Water bath treatment (Andwino Scientific: cat.no. 190009)

3.2 สารเคมีสำหรับการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry

1) Anti-human VEGF-Allophycocyanin monoclonal antibody (R&D: cat.no. IC2931A)
2) Goat F(ab^{1})$_{2}$ Anti-mouse IgG-FITC (R&D: cat.no. F0103B)
3) Monoclonal Anti-human podocalyxin (PODXL)-Phycoerythrin (R&D: cat.no. FAB1658P)
4) Monoclonal Anti-human alpha-Smooth Muscle Actin Antibody (R&D: cat.no. MAB1420)
5) Collagen I (Gibco: cat.no. IC2931A)
6) Paraformaldehyde
7) Saponin (Sigma-Aldrich: cat.no. S7900)

3.3 สารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA extraction)

1) RNAlater™ RNA Stabilization Reagent (Qiagen: cat.no.76104)
2) High pure viral RNA kit (Roche: cat.no. 11 858 882 001)

3.4 สารเคมีสำหรับการทำ real time PCR

1) 18s rRNA primer & probe
2) LC Taqman Master (Roche: cat.no. 04535286001)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) Transcriptor First Stand cDNA Synthesis kit (Roche: cat.no. 04379012001)

4) Vascular endothelial growth factor (VEGF) primer & probe

3.5 สารเคมีสำหรับการทำ ELISA

1) Human VEGF QuantiGlo® Chemiluminescent ELISA kit (R&D System: cat.no. QVE00B)

3.6 สารเคมีสำหรับการตรวจนับเซลล์ด้วยวิธีทางพยาธิคลินิกและ Laser Capture Microdissection

1) PARAPLAST* tissue embedding medium (Mccormick™ scientific)

2) Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Dako: cat.no. M7273)

3) Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor 1 (WT-1) Protein (Dako: cat.no. M3561)

4) Xylene

5) Ethanol 99.9% (Merck)

6) Deionized water (dH_2O)

7) Tween-20

8) Tris Buffered Saline (TBS)

9) Citrate

10) EDTA

11) Trizma® base

12) Pepsin

13) Hydrogen Peroxide

14) ABC Reagent

15) normal serum

16) DAB (Sigma: cat.no. D5637)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 สารเคมีทั่วไป

1) Hydrochloric acid solution (HCl)

2) Phosphate buffer saline (PBS)

3) Sodium hydroxide (NaOH)

4) Sterile water (ready for use)

การเพาะเลี้ยงเซลล์

1. **การเลี้ยง** podocyte cells

1.1 ขั้นตอนการเลี้ยง

A. นำชิ้นเนื้อที่ได้ใส่ลงในบิกเกอร์

B. ใช้ forcep ยึดชิ้นเนื้อไว้แล้วใช้ forcep หรือกรรไกรอีกอันหนึ่งลอกแคปซูลหรือเปลือกของไตออก

C. ตัดแบ่งชิ้นเนื้อให้ได้ชิ้นที่มีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้

D. เติม PBS ลงไปเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ เทชิ้นเนื้อลงบนตะแกรงกรองที่มีรูกรองขนาด 200 mesh ทีละน้อย

E. ใช้ส่วนท่อกดภายในของหลอดฉีดยาค่อยๆ บดชิ้นเนื้อดังกล่าวกับรูของตะแกรงโดยใช้ PBS หล่อเอาไว้แล้วใช้บิกเกอร์อีกอันรองรับไว้ด้วย ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะหมดชิ้นเนื้อ

F. นำน้ำที่กรองได้ไปผ่านตะแกรงกรองที่มีขนาด 250 mesh อีกครั้ง แล้วตามวิธีการในข้อ E อีกครั้ง

G. ระหว่างที่ผ่านส่วนน้ำกรองดังกล่าว ให้ใช้ syringe หรือ autopipette ดูด PBS เพื่อล้างเศษเนื้อหรือโปรตีนอื่นๆ ที่อยู่บนตะแกรงให้เหลือเพียงโกลเมอรูลัสแล้วใช้ syringe หรือ autopipette ที่มี tip อันใหม่ ดูดส่วนของ glomerulus ที่อยู่บนตะแกรงขึ้นมาใส่ไว้ใน centrifuge tube ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้

H. ทำขั้นตอน G ไปจนกว่าน้ำที่กรองได้จะหมด

I. จากนั้นนำโกลเมอรูลัลในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 rpm ที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 5 นาที

J. ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 6 มิลลิลิตร

K. ผสมให้เข้ากันดี ดูดแบ่งลงไปใน culture flask ขนาด 25 ลูกบาศก์ตารางเซนติเมตรอันละ 3 มิลลิลิตร

L. เลี้ยงเซลล์ใน 5% CO_2 37°C ใน incubator

M. ปล่อยทิ้งไว้โดยไม่ขยับ flask เป็นเวลานาน 5-8 วัน

N. เมื่อพบการเจริญเติบโตของเซลล์ออกมาโดยรอบของโกลเมอรูลัสประมาณ 10-30% ให้ใช้ autopipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกโดยประมาณครึ่งหนึ่ง จากนั้นให้เปลี่ยนทิปอันใหม่ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้และปล่อยโดยแรงลงยังตำแหน่งที่เป็นโกลเมอรูลัสบน flask ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นเม็ดเล็กเมื่อเอียง culture flask ไปมา

O. เมื่อเห็นว่าเม็ดโกลเมอรูลัสหลุดออกไปแล้ว ให้ทำตามขั้นตอนข้อ N ไปจนกว่าจะครบทุกโกลเมอรูลัส

P. จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อไป

Q. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน

R. เมื่อเซลล์โตประมาณ 80-90% ให้เตรียมการ passage cell ในอัตรา 1:3 โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดจาก culture flask ที่มีเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่น 80-90%
- ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปใน culture flask เล็กน้อยแล้วดูดออกให้หมด
- ใส่ trypsin-EDTA solution 1 มิลลิลิตร ลงใน culture flask ประมาณ 2 มิลลิลิตร
- แกว่ง culture flask ไปมาให้ trypsin-EDTA solution ไหลไปทั่วพื้นที่ของ culture flask ประมาณ 1 นาที
- ดูด trypsin-EDTA solution ออกให้เหลือติดก้นเล็กน้อย แล้วเอาไป incubate 5% CO_2 37°C ใน incubator นาน 8-10 นาที
- สังเกตเซลล์จะหลุดลอยขึ้นเป็นแพ แต่ถ้าหลุดไม่หมดให้เคาะที่ด้านข้างเบาๆ
- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใน culture flask ประมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยของ trypsin-EDTA solution
- ดูดทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube
- เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm ที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 5 นาที
- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีและแบ่งใส่ใน culture flask อันใหม่ (culture flask ละ 3 มิลลิลิตร) แล้วเลี้ยงต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเตรียมน้ำยา

a. **อาหารเลี้ยงเซลล์**

Fetal bovine serum	10	%
Penicillin	50	µg/ml
Streptomycin	50	µg/ml
Insulin	0.1	µg/ml
Transferrin	5	µg/ml
Selenium	50	µg/ml

ใน RPMI 1640

b. **Phosphate Buffer Saline (PBS)**

Sodium chloride (NaCl)	0.137	M
Potassium (KCl)	2.7	mM
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.4	mM
disodium hydrogen phosphate ($NaHPO_4$)	0.01	M

c. **Trypsin-EDTA solution**

Trypsin	0.125	% (w/v)
EDTA	0.53	mM

ใน PBS

2. **เทคนิคการ differentiated Podocyte**

2.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์

a. จาก podocyte cells ที่เลี้ยงได้ เมื่อมีเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่น 80-90%

b. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดจาก culture flask ที่มีเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่น 80-90%

c. ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนเกิน โดยการใส่ PBS ลงไปใน culture flask เล็กน้อยแล้วดูดออกให้หมด

d. ใส่ trypsin-EDTA solution 1 มิลลิลิตร ลงใน culture flask ประมาณ 2 มิลลิลิตร

e. แกว่ง culture flask ไปมาให้ trypsin-EDTA solution ไหลไปทั่วพื้นที่ของ culture flask ประมาณ 1 นาที

f. ดูด trypsin-EDTA solution ออกให้เหลือติดก้นเล็กน้อย แล้วเอาไป incubate 5% CO_2 37°C ใน incubator นาน 8-10 นาที

g. สังเกตเซลล์จะหลุดลอยขึ้นเป็นแพ แต่ถ้าหลุดไม่หมดให้เคาะที่ด้านข้างเบาๆ

h. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใน culture flask ประมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยของ trypsin-EDTA solution

i. ดูดทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube

j. เอาไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm ที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 5 นาที

k. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีและแบ่งใส่ใน culture flask อันใหม่ (culture flask ละ 3 มิลลิลิตร) แล้วเลี้ยงต่อไป

2.2 การเตรียมน้ำยา

a. **อาหารเลี้ยงเซลล์**

Penicillin	50	µg/ml
Streptomycin	50	µg/ml
Insulin	0.1	µg/ml
Transferrin	5	µg/ml
Selenium	50	µg/ml

ใน RPMI 1640

b. Phosphate Buffer Saline (PBS)

Sodium chloride (NaCl)	0.137	M
Potassium (KCl)	2.7	mM
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.4	mM
disodium hydrogen phosphate ($NaHPO_4$)	0.01	M

c. Trypsin-EDTA solution

Trypsin	0.125	% (w/v)
EDTA	0.53	mM

ใน PBS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนัฏนรี คำเกษ

(ภาษาองกฤษ) Miss Nutnaree Kamgate

อายุ 27 ปี เกิด 16 กุมภาพันธ์ 2526

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

สถานที่เกิด จังหวัดนครพนม

ที่อยู่ปัจจุบัน 53 หมู่ที่ 12 ตำบล บ้านข่า อำเภอ ศรีสงคราม จังหวัด นครพนม 48150

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคนิคการแพทย์ จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2549

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2550

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย