การวิเคราะห์หาตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด เปรียบเทียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ

น.ส.กวิตา จินตนาปราโมทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Identification of complement inhibitors and complement regulatory proteins in ABO-incompatible compare with HLA-incompatible kidney transplantation

Miss Kavita Jintanapramote

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์หาตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดเปรียบเทียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ
โดย	น.ส.กวิตา จินตนาปราโมทย์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิตร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย)

..... กรรมการ
(นายแพทย์พงศ์ภัทร์ วรสายัณห์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โอภาส ไตรตานนท์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กวิตา จินตนาปราโมทย์ : การวิเคราะห์หาตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด เปรียบเทียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ. (Identification of complement inhibitors and complement regulatory proteins in ABO-incompatible compare with HLA-incompatible kidney transplantation) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.ณัฐวุฒิ โตวนำชัย

ที่มาและวัตถุประสงค์งานวิจัย: การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการปลูกถ่ายไตแบบมีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ โดยเฉพาะอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะปฏิเสธไตจากแอนติบอดี ในผู้ป่วยที่เกิดภาวะปฏิเสธไตจากแอนติบอดีจะตรวจพบการอักเสบของไต และย้อมชิ้นเนื้อไตพบ C4d แต่ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดมักจะย้อมชิ้นเนื้อไตพบ C4d แต่กลับไม่พบหลักฐานของการอักเสบของไต ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคอมพลีเมนต์ช่วยในการปกป้องเนื้อเยื่อไต โดยมีสมมติฐานว่าอาจมีโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ที่มีบทบาทในกลไกนี้

วิธีการศึกษา: รูปแบบการศึกษาเป็นงานวิจัยเชิงสังเกตแบบย้อนหลังในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่ยังมีชีวิตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด การปลูกถ่ายไตแบบมีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารต้านทานเอชแอลเอ และการปลูกถ่ายไตแบบไม่มีสารภูมิต้านทาน โดยทำการตรวจการแสดงออกของยีนของตัวควบคุมคอมพลีเมนต์บนเนื้อเยื่อไตที่ได้รับการปลูกถ่ายมาไม่เกิน 1 ปี โดยตรวจสาร ได้แก่ CD35, CD46, CD55 และ CD59 โดยวิธีการตรวจ RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction)

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่ยังมีชีวิตจำนวน 87 คน โดยเป็นกลุ่มการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด 12 คน การปลูกถ่ายไตแบบมีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ 22 คน การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารต้านทานเอชแอลเอ 6 คน และการปลูกถ่ายไตแบบไม่มีสารภูมิต้านทาน 47 คน โดยที่ตรวจไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนของตัวควบคุมคอมพลีเมนต์ทั้ง CD35. CD46. CD55 และ CD59 ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม โดยการแสดงออกของยีน

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

6370069730 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: ABO-incompatible, HLA-incompatible, complement regulatory proteins

Kavita Jintanapramote : Identification of complement inhibitors and complement regulatory proteins in ABO-incompatible compare with HLA-incompatible kidney transplantation. Advisor: Assoc. Prof. Natavudh Townamchai

Background and objectives:ABO incompatible kidney transplantation (ABOi KT) provides better allograft outcomes compared to HLA incompatible KT (HLAi KT), especially a lower incidence of antibody-mediated rejection (ABMR). The findings in ABMR generally consist of the presence of serum anti-donor antibody, C4d staining, and inflammation in the allograft. Despite the positivity of C4d, there is no evidence of inflammation found in ABOi KT, indicating that there must be some mechanisms preventing the allograft from complement mediated injury. We hypothesize that the complement regulatory proteins may play roles in this process.

Methods: This observational, retrospective study was conducted at King Chulalongkorn Memorial Hospital. All living donor KT patients were divided into 4 groups according to pre-transplant antibody: 1) ABOi, 2) HLAi, 3) combined ABOi and HLAi, which considered as high-immunologic risk groups and 4) compatible KT, which served as the control group. The expression of complement regulatory proteins including CD59, CD55, CD46, and CD35 was measured from allograft tissue within 1 year after KT using RNA isolation and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Medicine Student's Signature .....

Academic Year: 2021 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความเมตตาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการดำเนินโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิต อาจารย์นายแพทย์พงศ์ภัทร์ วรสายัณห์ กรรมการ และรองศาสตราจารย์นายแพทย์โอภาส ไตรตานนท์ กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่สละเวลาให้คำปรึกษาตลอดจนข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการณ์หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ พยาบาลประจำหอผู้ป่วยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทยที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย รวมถึงผู้ป่วยทุกท่านที่เข้าร่วมในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวและเพื่อนของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

กวิตา จินตนาปราโมทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale) 1

2. คำถามของการวิจัย (Research questions) 5

2.1 คำถามหลัก 5

2.2 คำถามรอง 5

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives) 6

3.1 วัตถุประสงค์หลัก 6

3.2 วัตถุประสงค์รอง 6

4. สมมติฐาน (Hypothesis) 6

5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework) 7

6. รูปแบบการวิจัย (Research Design) 7

7. วิธีการวิจัยโดยย่อ 7

8. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration) 9

8.1 หลักเคารพในตัวบุคคล (Respect for person) 9

8.2 หลักการให้ประโยชน์และไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) 9

8.3 หลักความยุติธรรม (Justice) 9

9. ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation) 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

10. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems) 10

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or Anticipated Benefit Gain) 10

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Review Literature) 11

1. การควบคุมคอมพลีเมนต์ (Complement regulation) 11

2. กลไกการควบคุมคอมพลีเมนต์ (Complement regulation) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation)[12] 14

3. การควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulation) กับภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection). 15

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (Methods) 18

1. รูปแบบการวิจัย (Research Design) 18

2. ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology) 18

2.1) ประชากร 18

2.2) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria) 19

2.3) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria) 19

2.4) ขนาดตัวอย่าง และการคำนวณ (Sample size determination) 19

2.5) การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement) 20

3. คำนิยามเชิงปฏิบัติ (Operational definition) 22

1.) การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) 22

2.) การปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible kidney transplantation) 22

3.) การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด และสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (ABO- and HLA-incompatible kidney transplantation) 22

4.) การปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible kidney transplantation) 22

5.) Accommodation 23

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6.) No-accommodation 23
7.) ภาวการณ์ปฏิเสธไต (Rejection) 24
8.) การปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) 24
9.) กลุ่มที่มีความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตน้อย (low immunological risk) 25
10.) ความแตกต่างของระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) 26
4. ขั้นตอนการตรวจตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)] 26
4.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) 26
4.2 การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ (RNA) 27
4.3 ขั้นตอนเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ 28
4.4 ขั้นตอนการสร้าง complementary DNA (cDNA) 28
4.5 ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (qRT-PCR) 29
4.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล qRT-PCR 31
4.7 ขั้นตอนการแปลผล qRT-PCR 32
5. วิธีการวิจัย 32
6. การรวบรวมข้อมูล (Data Collection) 33
7. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data Analysis and Statistics) 34
บทที่ 4 ผลการวิจัย 36
1. ข้อมูลประชากรของการศึกษา 36
2. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) และการปลูกถ่ายไตชนิดอื่น ๆ 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างผู้ป่วยที่เกิดภาวะ accommodation และไม่เกิดภาวะ accommodation. 45

4. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไตที่เกิดภาวะ accommodation แต่มีความแตกต่างกันของระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต..... 47

5. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างกลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) และ กลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตต่ำ (low immunological risk KT)..... 49

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 51

1. อภิปรายผลการวิจัย 51

2. สรุปผลการวิจัย..... 53

3. ข้อจำกัด แนวทางแก้ไข และข้อเสนอแนะ 54

บรรณานุกรม..... 57

ประวัติผู้เขียน..... 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

โรคไตวายเรื้อรัง (end stage renal disease) ถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ซึ่งแนวโน้มมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในทุกประเทศรวมทั้งในประเทศไทย[1] โดยการรักษาคือการได้รับการบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy) ซึ่งการบำบัดทนแทนไตในปัจจุบัน มีได้หลายวิธี ได้แก่ การฟอกเลือด (hemodialysis) การล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis) และการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) ซึ่งในปัจจุบันการปลูกถ่ายไตถือเป็นวิธีการบำบัดทดแทนไตที่ดีที่สุด โดยสามารถลดอัตราการตาย และทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับการทำการฟอกเลือด หรือการล้างไตทางช่องท้อง[2]

การปลูกถ่ายไตในปัจจุบัน มีอยู่ 2 วิธี ได้แก่ การได้รับจากผู้บริจาคที่สมองตาย (deceased donor) ซึ่งในทางกฎหมายและทางการแพทย์ถือว่าเป็นผู้เสียชีวิตแล้ว แต่ไตยังทำงานได้ดี โดยผ่านการบริจาคให้กับศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทยเป็นผู้จัดสรรให้กับผู้รอรับไต และการได้รับจากผู้บริจาคจากผู้บริจาคที่ยังมีชีวิต (living donor) โดยผู้บริจาคไตต้องเป็นญาติที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด หรือสามีภรรยาที่อยู่ด้วยกันมามากกว่า 3 ปี หรือมีบุตรด้วยกันเท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบแล้วการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตได้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่สมองตาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แต่อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายไตในประเทศไทย ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากมีปัญหาสำคัญคือการขาดแคลนอวัยวะ โดยเมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตทั้งหมดในปี พ.ศ. 2562 ทั้งหมด 901 คน จากผู้ที่ได้ลงทะเบียนรอรับบริจาคอวัยวะ ที่มีจำนวน 6,417 คน (คิดเป็นร้อยละ 14.04) (ข้อมูล ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2562) ซึ่งในปัจจุบันระยะเวลาเฉลี่ยในการรอเพื่อได้รับการปลูกถ่ายไตเท่ากับ 5.05 และ 2.33 ปี ในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย และผู้บริจาคที่มีชีวิตตามลำดับ[3]

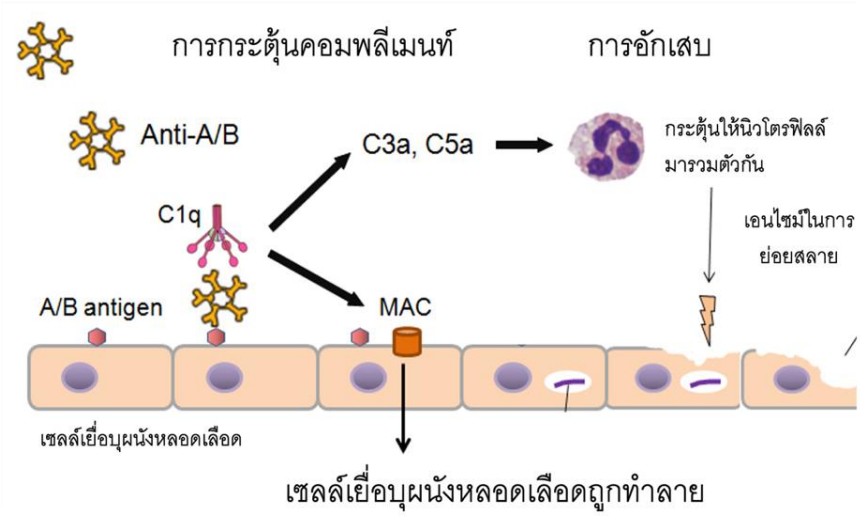
อย่างที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตได้ผลลัพธ์ที่ดีกว่า และมีระยะเวลาเฉลี่ยในการรอเข้ารับการปลูกถ่ายไตน้อยกว่า จึงมีความพยายามที่จะเลือกทำการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตก่อน แต่อย่างไรก็ตามในอดีตการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตจำกัดอยู่เพียงแค่ผู้ที่มีหมู่เลือดตรงกันเท่านั้น (ABO compatibility) เนื่องจากการอยู่รอดของอวัยวะในผู้ที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO incompatibility) ยังมีผลลัพธ์ที่ไม่ค่อยดีมากนัก แต่ในช่วงระยะหลัง

ก็ได้มีการพยายามศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้จนทำให้การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดได้ผลลัพธ์ที่ดียิ่งขึ้นใกล้เคียงกับการปลูกถ่ายไตที่มีหมู่เลือดตรงกัน จนทำให้การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดได้รับการยอมรับอย่างทั่วถึงในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามควรเป็นทางเลือกสุดท้ายก่อนที่ผู้ป่วยจะเข้าสู่รายชื่อของคนที่รอคิว (waiting list) สำหรับการรอรับบริจาคไตจากผู้บริจาคที่สมองตาย[4]

ในภาวะปกติ ถ้าผู้บริจาคไต (donor) มีหมู่เลือดใดไตที่บริจาคก็จะมี สารก่อภูมิต้านทาน (antigen) ของหมู่เลือดชนิดนั้นอยู่บนผิวของไต และเมื่อนำไปปลูกถ่ายให้กับผู้รับบริจาค (recipient) ที่มีหมู่เลือดไม่ตรงกัน ซึ่งจะมีสารภูมิต้านทาน (antibody) ในซีรั่ม ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้น คือ สารภูมิต้านทานจะไปจับกับสารก่อภูมิต้านทานบนผิวไต แล้วเกิดเป็นแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ (antigen-antibody complex) ซึ่งทำปฏิกิริยากับสาร C1q โดย C1q จะกระตุ้นให้ C4 เปลี่ยนเป็น C4b และ C4d หลังจากนั้น C4b จะไปทำให้ C3 เปลี่ยนเป็น C3b แล้ว C3b จึงไปกระตุ้น C5 ทำให้เกิดการสร้าง C5b-C9 หรือที่เราเรียกว่า membrane attack complex (MAC) และเกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์(complement) จากนั้นจะกระตุ้นการสร้าง membrane attack complex (MAC) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายหลอดเจาะผ่านผนังของเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ตามมา นอกจากนี้สาร C1q ยังเป็นตัวกระตุ้นให้มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นอีกด้วย โดยสาร C1q จะทำการกระตุ้นสาร C3a และ C5a ที่จะไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวจำนวนมากเข้ามารวมตัวกันในเนื้อเยื่อ และทำอันตรายต่อเซลล์[5, 6]

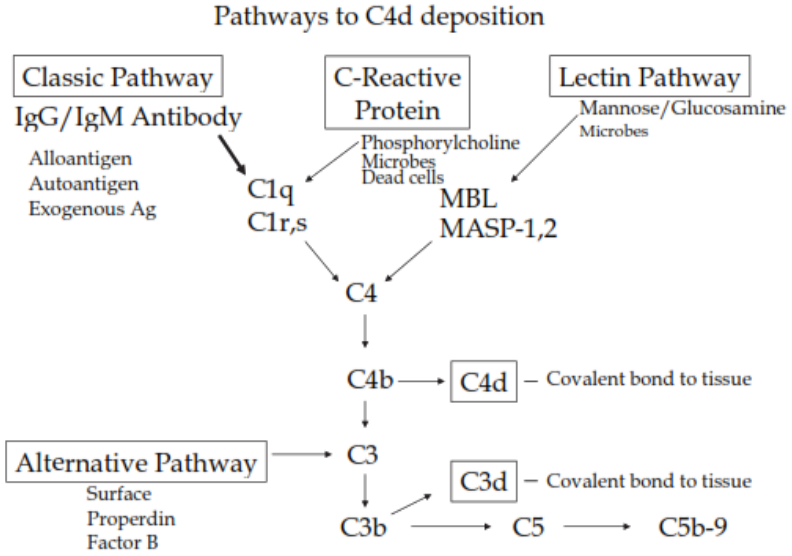
โดย C4d จะเป็นตัวหลักที่ไปจับแน่นกับเนื้อเยื่อ ซึ่งในปัจจุบันเราใช้การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) เพื่อตรวจหา C4d บนเนื้อเยื่อ (allograft tissue) โดยถ้าตรวจพบ C4d เป็นบวก จะเป็นตัวช่วยบ่งบอกว่าบนเนื้อเยื่อนั้นมีสารภูมิต้านทาน (antibody) มาทำปฏิกิริยากับสารก่อภูมิต้านทาน (antigen) แล้วเกิดแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ (antigen-antibody complex) และมีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (complement activation) เกิดขึ้น[7] (รูปที่ 2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 1 การทำงานของสารภูมิต้านทาน (antibody) ต่อสารก่อภูมิต้านทาน

ดัดแปลงมาจาก Ortiz J. Understanding the Complexities of Kidney Transplantation. 2011:333-48[5]



รูปที่ 2 ภาพรวมการกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเพนต์

ดัดแปลงมาจาก Dehoux JP, Gianello P. Accommodation and antibodies. Transpl Immunol. 2009;21(2):106-10[6]

จากกลไกเบื้องต้นที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าในภาวะที่มีการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดร่างกายควรจะมีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารภูมิต้านทาน และสารก่อภูมิต้านทาน แล้วเกิดเป็นแอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพลกซ์ขึ้น หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ แล้วไปทำลายไตที่ได้รับการปลูกถ่าย (allograft) ทำให้เกิดภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) ตามมา แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษามากมายในปัจจุบันที่ค้นพบว่า ถ้าเรากำจัดสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือดออกไปก่อนการปลูกถ่ายไต เพื่อไม่ให้สารภูมิต้านทานนี้ไปจับกับสารก่อภูมิต้านทานในช่วงแรกหลังจากปลูกถ่ายไต แล้วต่อมาถึงแม้ว่าในร่างกายจะมีสารภูมิต้านทานที่สูงขึ้น ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายก็ยังสามารถทำงานได้ดี ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไตเกิดขึ้น ซึ่งเราเรียกภาวะนี้ว่าเกิดการมี accommodation ซึ่งเป็นปรากฏการณ์หลักที่เกิดขึ้นเฉพาะในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด[8]

โดยนิยามคำว่า accommodation คือภาวะที่ร่างกายมีสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือดบนไตที่ได้รับการปลูกถ่าย โดยที่ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) เกิดขึ้น ซึ่งในปัจจุบันการเกิด accommodation ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน โดยเชื่อว่าอาจเกิดได้จากหลายกลไก ได้แก่ การเปลี่ยนของสารภูมิต้านทาน หรือสารก่อภูมิต้านทาน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ตัวสารภูมิต้านทานและสารก่อภูมิต้านทานไม่สามารถจับกันได้ จึงไม่ก่อให้เกิดแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ หรืออาจเกิดจากมีการสร้างสารบางอย่างขึ้นมามากขึ้นเพื่อยับยั้งไม่ให้เกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการเกิด membrane attack complex เซลล์จึงไม่ถูกทำลายในที่สุด[9] ซึ่งแตกต่างจากการปลูกถ่ายในผู้ป่วยที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ [anti-HLA (anti-human leukocyte antigen)] ที่ไม่มีกลไกการเกิด accommodation เกิดขึ้น ถึงแม้จะมีการลดระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอลงก่อนปลูกถ่ายเหมือนกันก็ตาม โดยภายหลังการปลูกถ่ายไตเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของระดับสารภูมิต้านทานเอชแอลเอในผู้ป่วยเหล่านี้ มักตามมาด้วยการเกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดี (Antibody mediated rejection, ABMR)[10]

เมื่อเปรียบเทียบการปลูกถ่ายไตในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มจะพบว่า ในกลุ่มที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดจะให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าในผู้ป่วยที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ ซึ่งเชื่อว่าที่ผลลัพธ์ดีกว่าเกิดจากการที่การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดมีภาวะ accommodation เกิดขึ้น ทำให้ไม่เกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดี[10]

ได้มีการศึกษาที่ทำการตรวจชิ้นเนื้อของไต (kidney biopsy) ของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดที่มีการทำงานของไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ พบว่ามีการตรวจพบสาร C4d บนชิ้นเนื้อไตแต่ไม่พบภาวการณ์ปฏิเสธไตเกิดขึ้น ซึ่งจากการค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าในอวัยวะที่ได้รับการปลูกถ่ายข้ามหมู่เลือดนั้นมีการจับกันของแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์เกิดขึ้น แล้วจึงเกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ แต่กลับไม่มีการทำลายเนื้อเยื่อไตเกิดขึ้น ซึ่งผลแตกต่างจากผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายไตที่มีสาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภูมิต้านทานเอชแอลเอ ที่เมื่อตรวจพบสาร C4d มักจะมาพร้อมกันการที่เห็นภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดีพร้อมมาด้วยเสมอ[9]

จากงานวิจัยที่กล่าวมา ชี้ให้เห็นว่าในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดอาจมีกลไกบางอย่างที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการหลังการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ C4 แล้ว แต่ก่อนเกิดการสร้าง membrane attack complex เกิดขึ้น ซึ่งมีสมมติฐานเกิดขึ้นว่าอาจมีสารบางอย่างที่เป็นตัวควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulation) เช่น ตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitor) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) เป็นตัวควบคุมไม่ให้เกิดการสร้าง membrane attack complex และทำลายเซลล์เกิดขึ้น

การเข้าใจกลไกของการเกิดปรากฏการณ์นี้อาจเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการพัฒนาการรักษาในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตต่อไปในอนาคต

2. คำถามของการวิจัย (Research questions)

2.1 คำถามหลัก

ในการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) ที่มีภาวะ accommodation มีการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) แตกต่างจากการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible kidney transplantation) อย่างไร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 คำถามรอง

1.) ในการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) ที่มีภาวะ accommodation มีการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) แตกต่างจากการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible kidney transplantation) อย่างไร

2.) ในการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) มีการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) แตกต่างกันอย่างไรในกลุ่มที่มีและไม่มีภาวะ accommodation

3.) ในการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk) ซึ่งคือกลุ่มที่ร่างกายมีสารภูมิต้านทานในเลือดอยู่เดิม (preformed antibodies) ได้แก่ การปลูกถ่ายไตข้าม

หมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) การปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible kidney transplantation) และการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน HLA (ABO/HLA-incompatible kidney transplantation) มีการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) แตกต่างกันอย่างไรในกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตน้อย (low immunological risk) ได้แก่ การปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible kidney transplantation) อย่างไร

4.) ในการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ที่แตกต่างกันมีผลต่อการการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) หรือไม่ และมีความแตกต่างกันอย่างไร

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

3.1 วัตถุประสงค์หลัก

1) เพื่อศึกษาความแตกต่างในการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ระหว่างการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด และการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานจำเพาะเอชแอลเอ โดยศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเฉพาะเอชแอลเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 วัตถุประสงค์รอง

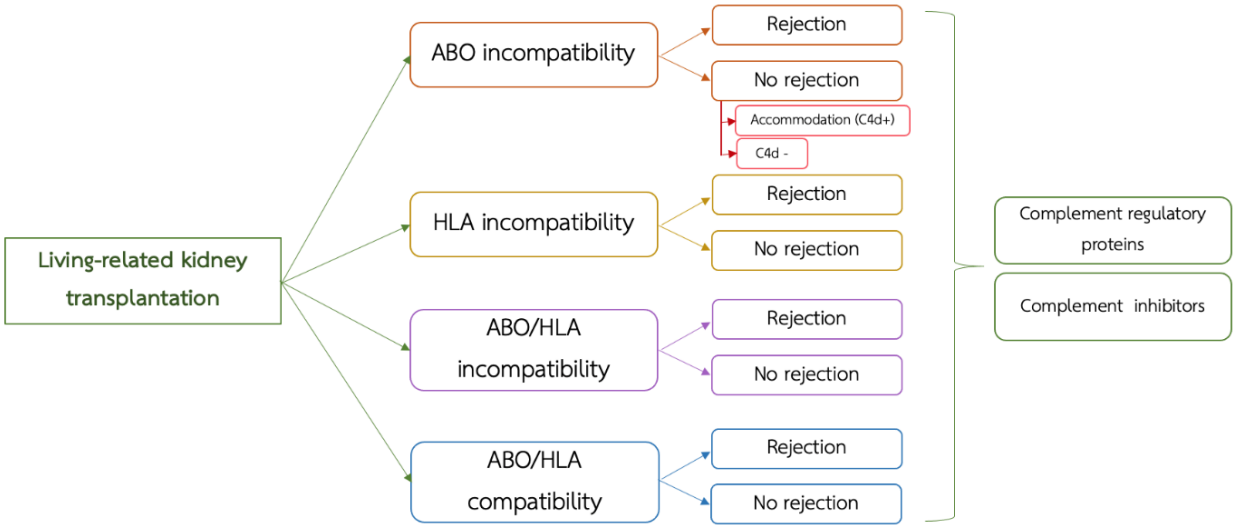
1) เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดที่มีภาวะ accommodation เกิดขึ้น โดยศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการอธิบายกลไกของการเกิด accommodation หลังการปลูกถ่ายไต

4. สมมติฐาน (Hypothesis)

การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดที่มีการเกิด accommodation เกิดขึ้นควรมีตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์(complement inhibitor) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory

proteins) ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ หรือ ไม่มีสารภูมิต้านทาน

5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



รูปที่ 3 กรอบแนวความคิดในการวิจัย แสดงการจำแนกผู้ป่วยออกเป็นกลุ่ม โดยจะเปรียบเทียบการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitor) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) เปรียบเทียบกันในผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6. รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาย้อนหลังเชิงพรรณนา (Retrospective descriptive study design)

7. วิธีการวิจัยโดยย่อ

1. ผู้ทำวิจัยตรวจสอบรายชื่อผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตที่ยังมีชีวิต (living related kidney transplantation) ซึ่งจะแบ่งผู้ป่วยออกเป็นผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน HLA และกลุ่มผู้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสาร

ภูมิต้านทาน โดยเลือกผู้ป่วยตามเกณฑ์คัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (inclusion criteria) และเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (exclusion criteria)

2. ตรวจสอบผลและคัดแยกผู้ป่วยเข้าในแต่ละกลุ่มงานวิจัยได้แก่
    a. กลุ่มที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility)
        i. ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (no rejection)
            1. มีภาวะ accommodation
            2. ไม่มีภาวะ accommodation
        ii. มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)
    b. กลุ่มที่ปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility)
        i. ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (no rejection)
        ii. มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)
    c. กลุ่มที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility)
        i. ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (no rejection)
        ii. มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)
    d. กลุ่มที่ปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility)
        i. ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (no rejection)
        ii. มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)
3. นำชิ้นเนื้อไตที่เก็บไว้จากการตรวจชิ้นเนื้อไต ซึ่งทำการตรวจตามรอบครั้งแรกหลังปลูกถ่ายไต โดยผู้ป่วยต้องไม่ถูกสงสัยว่ามีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) หรือมีโรคไตอักเสบเกิดขึ้นใหม่ (recurrent glomerular disease) มาทำการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน ด้วยการใช้วิธีการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)
4. ใช้การตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่กำหนดไว้ ได้แก่ CD35, CD46, CD55, CD59 โดยมีการทำการเปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) เพื่อให้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ในการแปลผล โดยแสดงผลออกมาเป็นค่า cycle threshold (Ct)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5. ทำการรายงานผลการตรวจการ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) และทำการคำนวณทางสถิติเพื่อรายงานผล

8. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

8.1 หลักเคารพในตัวบุคคล (Respect for person)

ในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นลักษณะเก็บข้อมูลแบบย้อนหลัง (Retrospective data collection) จะเก็บข้อมูลจากฐานข้อมูลของผู้ป่วย และนำชิ้นเนื้อไตที่เคยมีการเก็บไว้นำมาใช้ตรวจเพิ่มเติม ซึ่งการค้นหาข้อมูลทางเวชระเบียนนั้น จำเป็นต้องเก็บข้อมูลที่ระบุตัวตนของผู้ป่วยได้ ได้แก่ Hospital number และชื่อของผู้ป่วย เพื่อให้เก็บข้อมูลได้อย่างครบถ้วนและไม่ซ้ำซ้อนกัน โดยข้อมูลส่วนที่ระบุตัวตนของผู้ป่วยได้นั้นจะไม่ถูกเปิดเผย ในงานวิจัยจะบันทึกเป็นลักษณะรหัสลับ (code number) ส่วนเอกสารทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาไว้ในตู้เอกสารที่สามารถล็อกกุญแจได้ และข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์จะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์ที่มีการป้องกันการใช้โดยใช้รหัสผ่านและโปรแกรมป้องกันไวรัสคอมพิวเตอร์โดยมีเพียงคณะผู้วิจัยเท่านั้นที่สามารถเข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ ซึ่งข้อมูลที่สามารถใช้ระบุตัวตนผู้ป่วยจะถูกทำลายทิ้งทันทีหลังงานวิจัย จึงไม่มีความเสี่ยงต่อผู้ป่วยในแง่ของการเปิดเผยความลับผู้ป่วย และเนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาจากชิ้นเนื้อไตที่เคยได้รับการตัดชิ้นเนื้อไตตรวจไว้ ไม่ได้มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย

8.2 หลักการให้ประโยชน์และไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence)

ในงานวิจัยนี้เพียงแต่เก็บข้อมูลย้อนหลังจากชิ้นเนื้อที่ผู้ป่วยเคยได้รับการตัดชิ้นเนื้อไตตรวจตามรอบปกติเท่านั้น ไม่ได้มีผลหรือการเปลี่ยนแปลงในการรักษาของผู้ป่วย ทำให้ไม่เกิดผลเสียต่อผู้ป่วย และผู้ป่วยไม่ได้ประโยชน์ขณะที่ทำงานวิจัยนี้ แต่ผลที่ได้จากงานวิจัยอาจจะมีประโยชน์ในการติดตามและการรักษาผู้ป่วยปลูกถ่ายไตต่อไปในอนาคต

8.3 หลักความยุติธรรม (Justice)

ในงานวิจัยมีเกณฑ์การคัดประชากรเข้าและออกชัดเจน มีการกระจายประโยชน์และความเสี่ยงอย่างเท่าเทียมกัน ข้อมูลในการวิจัยได้รับการเก็บรักษาไว้เป็นเป็นความลับเหมือนกันทุกคน เมื่อพิจารณาถึงความเสียงและประโยชน์ที่จะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย

9. ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation)

เนื่องจากเป็นการเก็บข้อมูลย้อนหลัง อาจทำให้ข้อมูลหรือผลชิ้นเนื้อในผู้ป่วยบางรายไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ ทำให้อาจไม่สามารถวิเคราะห์ระยะเวลาในการผลิตตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่แน่นอนได้ รวมถึงการตัดชิ้นเนื้อไตและนำชิ้นเนื้อมาใช้ จำเป็นต้องได้ชิ้นเนื้อไตที่ได้ชิ้นเนื้อที่ครบถ้วนเพียงพอสำหรับการแปลผล

10. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

ชิ้นเนื้อที่นำมาใช้มีปริมาณสารพันธุกรรมไม่เพียงพอในการนำมาแปลผลการแสดงออกของโปรตีนตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) หรือชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ไม่สมบูรณ์เพียงพอ รวมถึงการทำงานอาจมีปัญหาในขั้นตอนการทำการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)] ซึ่งอาจเกิดปัญหาติดขัดทำให้ไม่สามารถแปลผลข้อมูลการแสดงออกองโปรตีนตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or Anticipated Benefit Gain)

ปัจจุบันเรามีการทำการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดเพิ่มมากขึ้น การเข้าใจกลไกที่ทำให้ร่างกายไม่เกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตอาจมีประโยชน์ในการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อนำไปใช้ ในการกระตุ้นให้เกิด accommodation เพิ่มมากขึ้น หรือนำไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกถ่ายไตมีสารภูมิต้านทานจำเพาะเอชแอลเอ เพื่อให้ผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายไตดียิ่งขึ้นไป

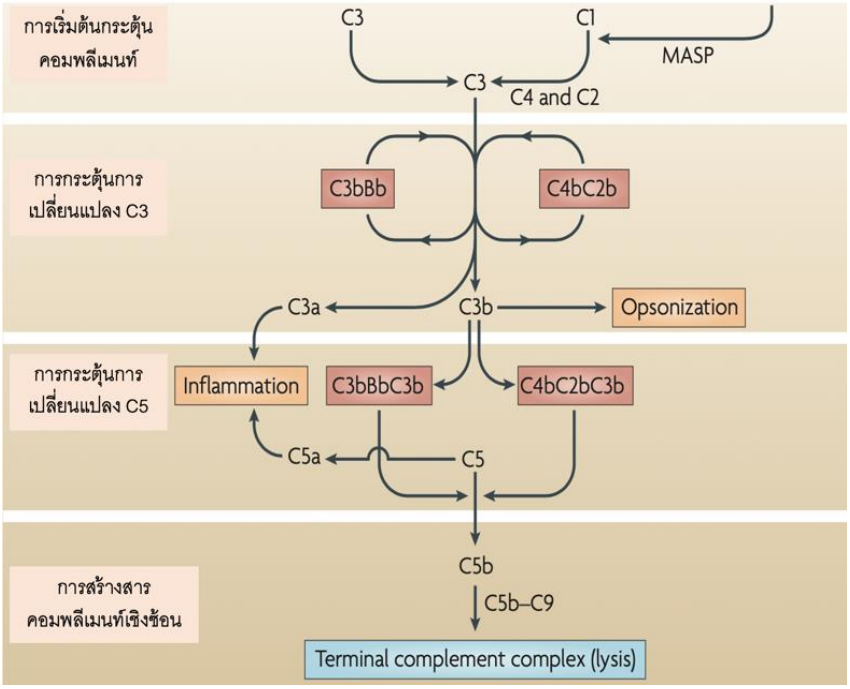
นอกจากนี้ยังอาจสามารถหาดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดที่เกิดภาวะ accommodation เกิดขึ้น เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเลือกยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดต่อไปในอนาคต

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Review Literature)

1. การควบคุมคอมพลีเมนต์ (Complement regulation)

โดยปกติการกระตุ้นคอมพลีเมนต์จะประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนด้วยกัน คือ การเริ่มต้นกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (initiation of complement activation) การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง C3 (C3 convertase activation) การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง C5 (C5 convertase activation) และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน (terminal pathway activity)[11]

ซึ่งการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ มีอยู่ 3 ทาง คือ classical pathway, alternative pathway และ lectin pathway[11] (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 กลไกการควบคุมคอมพลีเมนต์

ดัดแปลงมาจาก Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol. 2009;9(10):729-40[11]

โดยในแต่ละขั้นตอนก็จะมีสารที่มาควบคุมการเปลี่ยนแปลงคอมพลีเมนต์ เพื่อไม่ให้เกิดการสร้างคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน ที่จะเป็นตัวทำลายเซลล์ในที่สุด โดยสารต่างๆเหล่านี้ แบ่งออกเป็น[11]

1. สารละลายที่เป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Soluble regulators and effectors)
2. สารที่จับอยู่กับผิวเซลล์เพื่อเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Surface bound regulators and effectors)
3. ตัวรับที่ทำหน้าที่จับเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Receptors for complement effector proteins)

โดยจะมีสารต่างๆดังนี้ (ตารางที่ 1)[11]

ตารางที่ 1 สารที่มีหน้าที่เป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์

ตัวควบคุม	ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์	คอมพลีเมนต์ที่จับ
สารละลายที่เป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์		
Factor H	Alternative pathway	C3b และ C3d
Factor H like protein 1 (FHL1)	Alternative pathway	C3b
Properdin	Alternative pathway	C3
Carboxy-peptidase N	Classical and lectin pathway	C3a, C4a and C5a
C4b-binding protein (C4BP)	Classical and lectin pathway	C4
C1q	Classical pathway	IgG and IgM immune complexes
C1 inhibitor (C1INH)	Classical and lectin pathway	C1r, C1s และ MASP2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Complement factor H related protein 1 (CFHR1)	Terminal pathway	C5 convertase และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน
Clusterin	Terminal pathway	C7, C8B, C9 และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน
Vitronectin	Terminal pathway	C5b-C7 และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน
สารที่จับอยู่กับผิวเซลล์เพื่อเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์		
Complement receptor 1 (CR1)	C3	C3b, iC3b, C4b และ C1q
Complement receptor 2 (CR2)	C3	C3dg, C3d และ iC3b
Complement receptor 3 (CR3)	C3	iC3b และ factor H
Complement receptor 4 (CR4)	C3	iC3b
Complement receptor of immunoglobulin (CRIg)	C3	C3b, iC3b และ C3c
Membrane cofactor protein (MCP) หรือ CD46	C3	C3b และ C4b
Decay accelerating factor (DAF) หรือ CD55	C3	C4b2b และ C3bBb
CD59	C3	C5 convertase และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Clusterin	การสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน	C8 และการสร้างสารคอมพลีเมนต์เชิงซ้อน
ตัวรับที่ทำหน้าที่จับเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์		
C3a receptor (C3aR)	C3	C3a
C5a receptor (C5aR)	C5	C5a
C5L2	C5	C5a
C1qR	Classical pathway	C1q
SIGNR1	Classical pathway	C1q

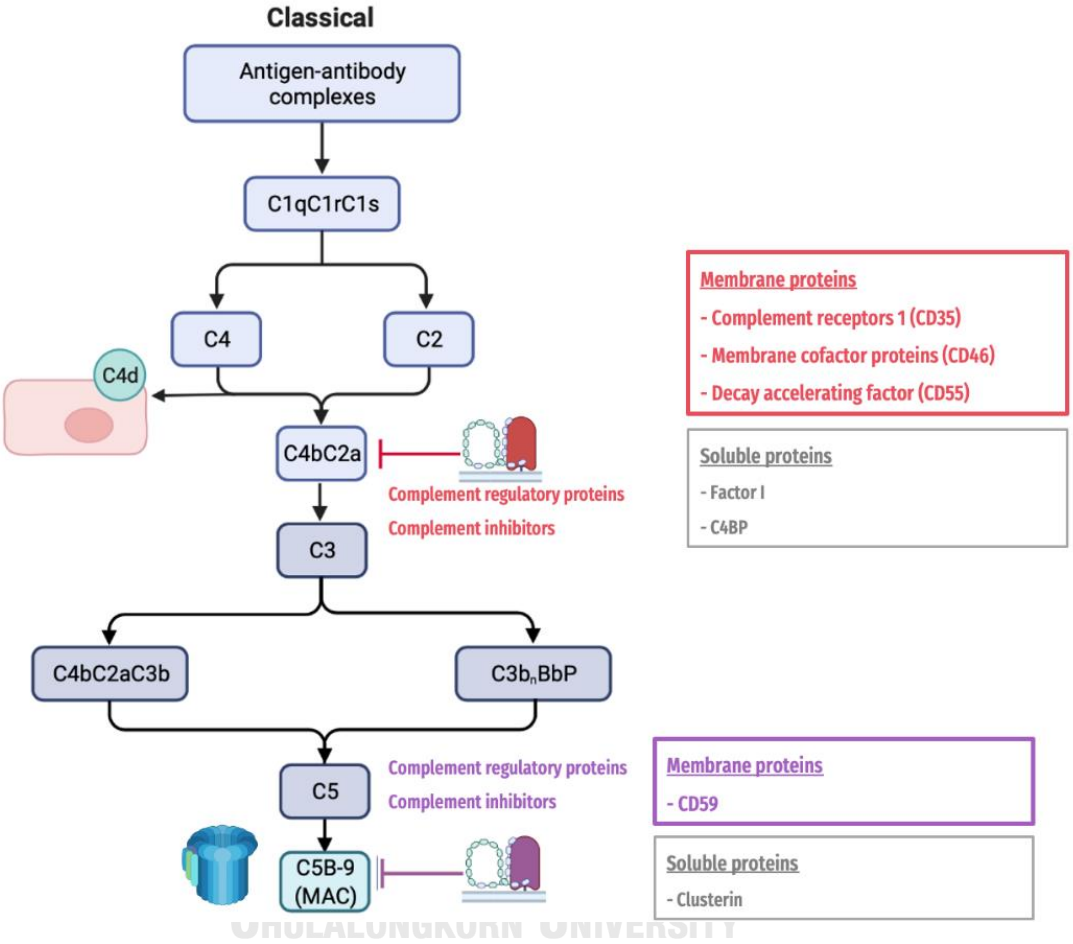
2. กลไกการควบคุมคอมพลีเมนต์ (Complement regulation) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation)[12]

จากข้อมูลที่กล่าวถึงกลไกที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ จะมีตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitor) หรือ โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่มามีส่วนสำคัญในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ยับยั้งการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่บริเวณ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ (รูปที่ 5)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. การยับยั้งการทำงานของ C4bC2a หรือ C3 convertase ที่มีหน้าที่กระตุ้น C3 ได้แก่
    a. สารที่จับอยู่กับผิวเซลล์เพื่อเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ โดยตัวที่สำคัญ ได้แก่ Complement receptor 1 (CR1), Membrane cofactor protein (MCP) หรือ CD46, Decay accelerating factor (DAF) หรือ CD55
    b. สารละลายที่เป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ ได้แก่ factor I, C4b-binding protein (C4BP)
2. การยับยั้งการทำงานของการสร้าง membrane attack complex (C5b-C9) ได้แก่
    a. สารที่จับอยู่กับผิวเซลล์เพื่อเป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ โดยตัวที่สำคัญ ได้แก่ CD59

b. สารละลายที่เป็นตัวควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ ได้แก่ clusterin



รูปที่ 5 การควบคุมการทำงานของคอมพลีเมนต์ ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต

ดัดแปลงมาจาก Biglarnia AR. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. 2018;14(12):767-781. [12]

3. การควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulation) กับภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่ามีสมมติฐานเกิดขึ้นว่าอาจมีสารบางอย่างที่เป็นตัวควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulation) เช่น ตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) หรือ

โปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) เป็นตัวยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้าง membrane attack complex เกิดขึ้น

จึงมีการศึกษาที่พยายามจะพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว เช่น งานวิจัยของ Hansen et al. ได้ทำการทดลองโดยให้ยาเพื่อกดสารภูมิต้านทานในหนูที่ทำการปลูกถ่ายหัวใจ พบว่าแม้จะได้ยากดการสร้างสารภูมิต้านทานแล้ว แต่หนูเหล่านั้นก็ยังมีการปฏิเสธอวัยวะเกิดขึ้น แต่เมื่อทำการใส่เซรุ่มของงูเห่าลงไปคู่กับยากดการสร้างสารภูมิต้านทานด้วย ซึ่งในเซรุ่มของงูเห่านั้นมีสารที่เป็นตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitor) พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาปฏิเสธอวัยวะเกิดขึ้นในหนูเหล่านั้น ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวทำให้เริ่มมีการเชื่อกันมากขึ้นว่ากลไกหลักของการเกิด accommodation น่าจะมาจากการมีตัวควบคุมการทำงานของคอมพลีเมนต์[13]

การศึกษาของ S.Chen et al. ได้ทำการศึกษา โดยการนำลิงมาทำการปลูกถ่ายผิวหนัง โดยไม่ให้ยากดภูมิคุ้มกัน เพื่อต้องการให้เกิดการสร้างสารต้านภูมิต้านทานที่จำเพาะกับเอชแอลเอเกิดขึ้น (donor specific antibody, DSA) หลังจากนั้นจึงทำการปลูกถ่ายไตของลิงตัวเดิมที่ใช้ปลูกถ่ายผิวหนัง ลงไปในลิงผู้รับ โดยหลังจากนั้นแบ่งลิงเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ให้ยากดภูมิคุ้มกันเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ให้ยากดภูมิคุ้มกันร่วมกับการให้เซรุ่มงูเห่า พบว่าหลังจากทำการปลูกถ่ายไต มีภาวการณ์ปฏิเสธไตเกิดขึ้นในลิงที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเพียงอย่างเดียว แต่อัตราการเกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตกลับลดลงในกลุ่มที่ได้ยากดภูมิร่วมกับเซรุ่มงูเห่า ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการกระตุ้นให้มีภาวะ accommodation เกิดขึ้น ทำให้ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายอยู่ได้นานยิ่งขึ้น[14]

หลังจากนั้นผู้วิจัยได้นำชิ้นเนื้อไตที่มีภาวะ accommodation มาทำการตรวจสารโปรตีนเฉพาะส่วน (western blot analysis) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นสารยับยั้งคอมพลีเมนต์ได้แก่ CD46, CD55, CD59 และ clusterin ในลิงที่เกิดภาวะ accommodation เมื่อเทียบกับลิงที่ไม่มีภาวะนี้เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่ช่วยในการป้องกันเซลล์ ได้แก่ heme-oxygenase-1 ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วยในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และหายไปในที่สุด[15]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Hao wang et al. ทำการศึกษาคล้ายที่กล่าวไปข้างต้นคือลองทำการปลูกถ่ายผิวหนังของหนู เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารภูมิต้านทานที่จำเพาะกับเอชแอลเอ (ant—HLA) เกิดขึ้น หลังจากนั้นทำการปลูกถ่ายหัวใจลงไปในหนูตัวเดียวกัน พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารยับยั้งคอมพลีเมนต์ C5 ร่วมกับได้รับยากดภูมิคุ้มกัน มีการเกิด accommodation เกิดขึ้น และมีการอยู่รอดของอวัยวะได้นานกว่า เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้สารยับยั้งคอมพลีเมนต์[15]

หลังจากนั้นก็ได้มีการศึกษาของ Iwasaki K, et al. ที่ได้มีการทำการปลูกถ่ายยีนหมู่เลือดลงไปในเซลล์บุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ เพื่อให้มีการแสดงออกของสารก่อภูมิต้านทาน A และ B บน

ผิวเซลล์ หลังจากนั้นทำการใส่สารภูมิต้านทาน A หรือ B (anti-A/B) ลงไป แล้วทำการตรวจเพื่อหาการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์บุผนังหลอดเลือด พบว่ามีการแสดงออกของสารยับยั้งคอมพลีเมนต์ ได้แก่ CD55, CD59 ที่เพิ่มมากขึ้น[16]

โดยที่กล่าวมานั้นเป็นเพียงการศึกษาในสัตว์และเซลล์ทดลอง ล่าสุดจึงได้มีการศึกษาของ Petra Hruba, et al.[17] ที่ได้นำชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตมาทำการตรวจหายีน และการแสดงออกของโปรตีน โดยศึกษาในผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด เปรียบเทียบกับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานจำเพาะเอชแอลเอ และในผู้ป่วยที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน ในกลุ่มที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CD59 ที่เพิ่มมากขึ้น ร่วมกับมี C5 ที่ลดลง แต่ในส่วนของโปรตีน CD49 ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด และกลุ่มที่ปลูกถ่ายไตที่มีสารต้านภูมิต้านทานจำเพาะเอชแอลเอ[17]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

1. รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาย้อนหลังเชิงพรรณนา (Retrospective descriptive study design) โดยการนำชิ้นเนื้อไต (kidney allograft tissue) ของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living related kidney transplantation) ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ.2559 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 มาแบ่งกลุ่มออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible KT) ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (ABO- and HLA-incompatible KT) และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO- and HLA-compatible KT) โดยนำชิ้นเนื้อไตของแต่ละกลุ่มมาทำการตรวจหาการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) โดยวิธีการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)] โดยจะแสดงผลเป็นค่า cycle threshold แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่สร้างตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ต่อไป

2. ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

2.1) ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population)

ผู้ป่วยในกลุ่มเป้าหมาย ที่เข้ารับการปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556-2563 โดยเลือกใช้ประชากรในกลุ่มนี้ เนื่องจาก เป็นช่วงปีที่เริ่มมีการเก็บชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่ได้รับการตัดชิ้นเนื้อไตตามมาตรการการตรวจชิ้นเนื้อไตเพื่อเฝ้าระวังภาวการณ์ปฏิเสธไตหลังการปลูกถ่ายไต (protocol kidney biopsy)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (**Inclusion criteria**)

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อของไต (kidney biopsy) ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย อย่างน้อย 1 ครั้งภายใน 1 ปีหลังทำการปลูกถ่ายไต

2.3) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (**Exclusion criteria**)

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีข้อห้ามในการตรวจชิ้นเนื้อของไต (kidney biopsy)

2. ผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคไตอักเสบ (recurrent glomerular disease) โดยถ้าผู้ป่วยมีอาการของโรคไตอักเสบ (glomerular disease) หรือ ผลชิ้นเนื้อเข้าได้กับการมีการกลับเป็นซ้ำของโรคไตอักเสบ หรือมีโรคไตอักเสบที่เกิดขึ้นใหม่ (denovo glomerular disease) จะถูกคัดเลือกออกจากงานวิจัย

3. ผู้ป่วยที่มีอาการของภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) และได้รับการตรวจชิ้นเนื้อยืนยันว่ามีภาวการณ์ปฏิเสธไต โดยถ้าผู้ป่วยถูกนำมาตัดชิ้นเนื้อของไต (kidney biopsy) ด้วยขอบ่งชี้ว่าสงสัยมีภาวการณ์ปฏิเสธไต ร่วมกับผลชิ้นเนื้อไตเข้าได้กับภาวการณ์ปฏิเสธไต จะถือเป็นเกณฑ์ในการคัดผู้ป่วยออกจากงานวิจัย

4. ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีการติดเชื้ออยู่

5. ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะส่วนบน

2.4) ขนาดตัวอย่าง และการคำนวณ (**Sample size determination)**

นำมาหา sample size การวิจัยแบบทดลองเปรียบเทียบข้อมูลที่เป็น 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยต้องใช้สูตรดังนี้

$$N = Z^2 1\text{-}a/2\ [P_1(1- P_1) + P_2(1- P_2)]/d^2$$

N = ขนาดตัวอย่าง (sample size)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

$Z^2$1-a/2 = ช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval)

P_1 = ค่าสัดส่วนของกลุ่มที่ 1 (estimated proportion, กลุ่มที่มากกว่า)

P_2 = ค่าสัดส่วนของกลุ่มที่ 2 (estimated proportion, กลุ่มที่น้อยกว่า)

d = ขนาดของความแม่นยำที่ต้องการ (desired precision)

แต่เนื่องจากการยังไม่เคยมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาเรื่องความแตกต่างของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด ผู้ป่วยที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ หรือผู้ป่วยที่ไม่มีสารภูมิต้านทานมาก่อน ดังนั้นจึงไม่สามารถคำนวณปริมาณขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมได้ เนื่องจากไม่มีค่าสัดส่วนของทั้ง 2 กลุ่ม

ทางทีมวิจัยจึงใช้การเลือกขนาดตัวอย่างโดยใช้ผู้ป่วยทั้งหมดที่ได้รับการทำการปลูกถ่ายไตที่เข้ากับเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษาและไม่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา

2.5) การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

- เก็บข้อมูลพื้นฐานจากข้อมูลทางคลินิกและข้อมูลจากเวชระเบียน โดยใช้แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล ได้แก่

  - เพศของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient gender)
  - อายุของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient age)
  - เพศของผู้บริจาคไต (recipient gender)
  - อายุของผู้บริจาคไต (donor age)
  - ระยะเวลาที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต (dialysis vintage)
  - การได้รับการปลูกถ่ายไตซ้ำ (re-transplantation)
  - การเข้ากันได้ของแอนติเจน human leukocyte antigen (HLA-mismatch)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- ระยะเวลาตั้งแต่หนีบหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงไต (clamp renal artery) จนกระทั่งตัดไตออก (warm ischemic time)

- ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มแช่ไตจนกระทั่งเริ่มนำมาวางในตัวผู้ได้รับบริจาคไต (cold ischemic time)

- ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับบริจาคขาดเลือดทั้งหมด (total ischemic time)

- ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ก่อนและหลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization)

- ระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor specific antibodies) ก่อนและหลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization)

- ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต

- ระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต

- ค่าครีเอตินิน (creatinine) ณ เวลาที่ได้การตรวจชิ้นเนื้อไตหลังการปลูกถ่ายไต

- นำชิ้นเนื้อไต (kidney allograft tissue) ไปตรวจเพื่อหาตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่จับอยู่บนผิวของเซลล์ ได้แก่ CD35, CD46, CD55, CD59 ด้วยการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)]
    - **ตัวอย่างตรวจ :** ชิ้นเนื้อไต (kidney allograft tissue) ของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living related kidney transplantation) ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ.2559 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2563 ที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส ณ หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
    - **วิธีการตรวจและการรายงานผลการตรวจ :** ทำการรายงานผลด้วยการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)] (รายละเอียดดังหัวข้อที่ 4 วิธีการวิจัย)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. คำนิยามเชิงปฏิบัติ (Operational definition)

1.) การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible kidney transplantation) คือ การปลูกถ่ายไตที่ผู้รับบริจาคไต (recipient) มีหมู่เลือดที่เข้ากันไม่ได้กับไตที่จะปลูกถ่าย โดยหมู่เลือดที่เข้ากันไม่ได้ มีดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้ากันได้ของหมู่เลือดในการปลูกถ่ายไต

หมู่เลือด		ผู้บริจาคไต			
		A	B	AB	O
ผู้รับบริจาคไต	A	เข้ากันได้	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันได้
	B	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันได้	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันได้
	AB	เข้ากันได้	เข้ากันได้	เข้ากันได้	เข้ากันได้
	O	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันไม่ได้	เข้ากันได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.) **การปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible kidney transplantation)** คือ การปลูกถ่ายไตที่ผู้รับบริจาคไต (recipient) มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (anti-HLA) ที่จำเพาะต่อไตที่จะปลูกถ่าย หรือต่อผู้บริจาคไต (donor specific antibody)

3**.) การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด และสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (ABO- and HLA-incompatible kidney transplantation)** คือ การปลูกถ่ายไตที่ผู้รับบริจาคไต (recipient) ที่ทำการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด รวมถึงมีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (anti-HLA) ที่จำเพาะต่อไตที่จะปลูกถ่าย หรือต่อผู้บริจาคไต (donor specific antibody)

4.) **การปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible kidney transplantation)** คือการปลูกถ่ายไตที่ผู้รับบริจาคไต (recipient) มีหมู่เลือดที่เข้ากันได้ และไม่มี

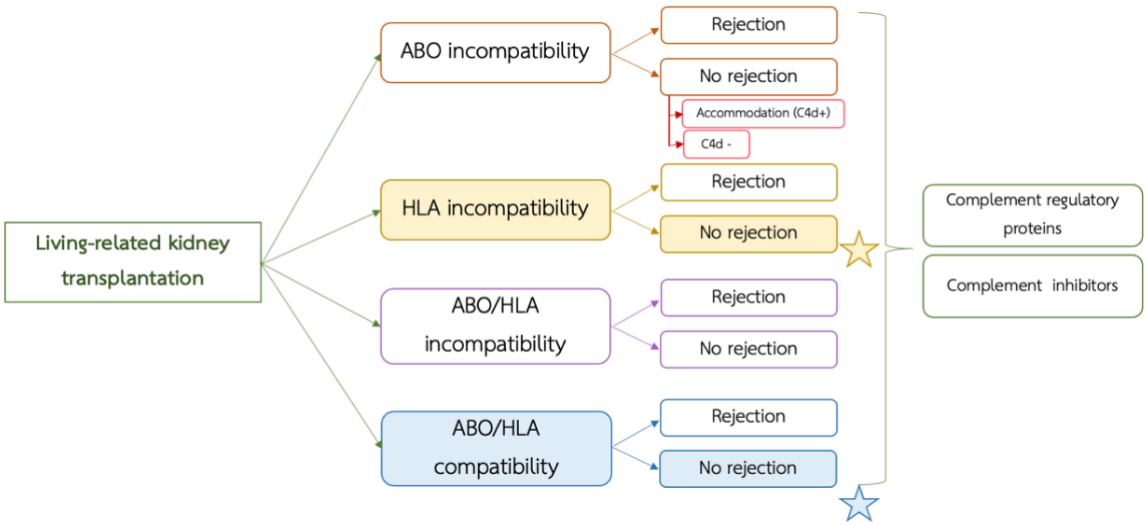
สารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (anti-HLA) ที่จำเพาะต่อไตที่จะปลูกถ่าย หรือต่อผู้บริจาคไต (donor specific antibody)

5.) Accommodation คือภาวะที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายไม่ถูกทำลายและยังคงทำงานอยู่ได้ในขณะที่ร่างกายของผู้รับบริจาคไตมีสารภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตัวเอง (alloantibody) และมีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ โดยแสดงลักษณะของภาวะ accommodation ดังนี้

- ตรวจพบสารภูมิต้านทานชนิดหมู่เลือดที่จำเพาะ (anti-ABO)
- ตรวจพบหลักฐานของการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ c4d บนเยื่อบุผนังหลอดเลือด
- ตรวจพบการทำงานของไตที่ได้รับการปลูกถ่ายอยู่ในเกณฑ์ปกติ
- มีพยาธิสภาพจากการตรวจชิ้นเนื้อไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ (normal graft histology)

รูปที่ 6 กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะ accommodation

6.) No-accommodation คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ accommodation เกิดขึ้น โดยให้คำนิยามคือกลุ่มผู้ป่วยทุกคนที่ไม่ใช่ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด และไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (no rejection)



รูปที่ 7 กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะ accommodation (no-accommodation)

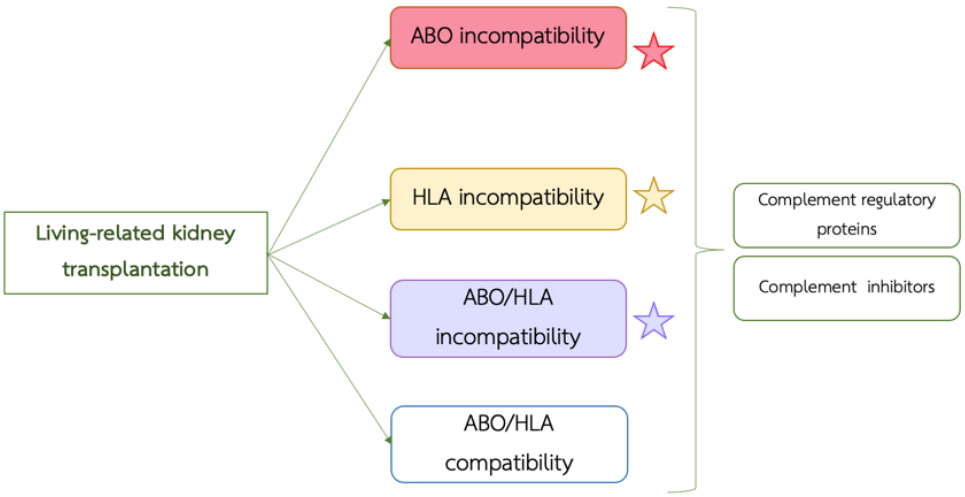
7.) ภาวการณ์ปฏิเสธไต (Rejection) คือกระบวนการที่เกิดจากภูมิคุ้มกันในร่างกายของผู้รับบริจาคไต (recipient) รับรู้ว่าไตที่ได้รับการปลูกถ่าย (kidney allograft) นั้นเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ต้องกำจัดออก โดยสามารถแบ่งภาวการณ์ปฏิเสธไตได้หลายรูปแบบ ได้แก่

7.1) การเกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตจากเม็ดเลือดขาวชนิด T cell (T-cell mediated rejection) เป็นกระบวนการปฏิเสธไตที่เกิดจากการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) ชนิด T cells โดยลักษณะทางพยาธิวิทยาจะพบเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์อยู่ที่บริเวณ interstitium ของเนื้อเยื่อไตที่ปลูกถ่าย และมีการอักเสบเกิดขึ้นที่บริเวณ interstitium และท่อไต (renal tubules) โดยอาจมีการอักเสบของเส้นเลือด (arteritis) ร่วมด้วย โดยใช้การวินิจฉัยจากผลชิ้นเนื้อที่ได้จากการตรวจชิ้นเนื้อไตที่เข้าได้ตาม Banff score

7.2.) การเกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดี (Antibody mediated rejection) เป็นกระบวนการปฏิเสธไตที่เกิดจากสารภูมิต้านทานจับกับสารก่อภูมิต้านทาน และเกิดการทำลายไตที่ได้รับการปลูกถ่าย โดยใช้การวินิจฉัยจากผลชิ้นเนื้อที่ได้จากการตรวจชิ้นเนื้อไตที่เข้าได้ตาม Banff score

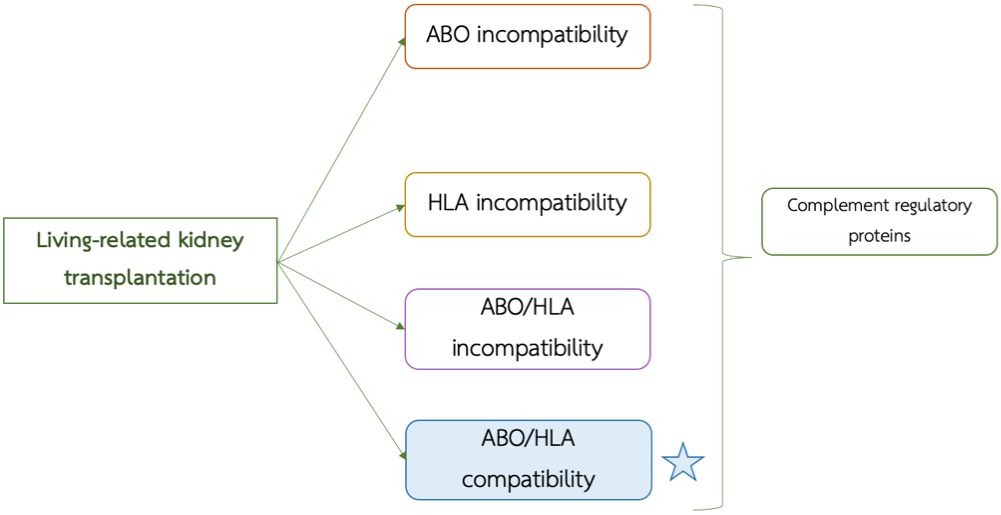
8.) **การปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT)** คือกลุ่มที่ร่างกายมีสารภูมิต้านทานในเลือดอยู่เดิม ได้แก่ การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-

incompatible kidney transplantation) การปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible kidney transplantation) และการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน HLA (ABO/HLA-incompatible kidney transplantation)



รูปที่ 8 กลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT)

9.) กลุ่มที่มีความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตน้อย (low immunological risk) คือกลุ่มที่การปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible kidney transplantation)



รูปที่ 9 กลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตน้อย (low immunological risk KT)

10.) ความแตกต่างของระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) โดยแบ่งความแตกต่างของระดับสารภูมิต้านทานสูง หรือต่ำ โดยใช้ระดับของสารภูมิต้านทานหมู่เลือดที่มากกว่าเท่ากับ 1 ต่อ32 (≥ 1:32) และ น้อยกว่า 1 ต่อ 32 (< 1:32) โดยแบ่งที่ระดับ 1 ต่อ 32 เนื่องจากระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือดที่น้อยกว่า 1:32 เป็นระดับที่ยินยอมในการให้ทำการปลูกถ่ายไตได้ในผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด

4. ขั้นตอนการตรวจตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Polymerase chain reaction (PCR)]

4.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) นำชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย (kidney allograft tissue) ที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส มาทำการสกัดนำ โดยมีขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ ดังนี้

4.1.1 ทำการนำชิ้นเนื้อไตใส่หลอด

4.1.2 ใส่สาร trizol 500 ไมโครลิตร (ul) ลงไปในหลอดที่มีชิ้นเนื้อไต

4.1.3 ทำการบดชิ้นเนื้อไตที่แช่ในสาร trizol จนละเอียด

4.1.3 ใส่สารคลอโรฟอร์ม (chloroform) 100 ไมโครลิตร (ul) ลงไปในหลอดทดลอง

4.1.4 นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบนปริมาณ 200 ไมโครลิตร (ul) ถ่ายใส่หลอดใหม่

4.1.5 ใส่สาร isopropanol 200 ไมโครลิตร (ul) ลงในหลอด ทำการผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4.1.6 นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอไว้

4.1.7 ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 500 ไมโครลิตร (ul)

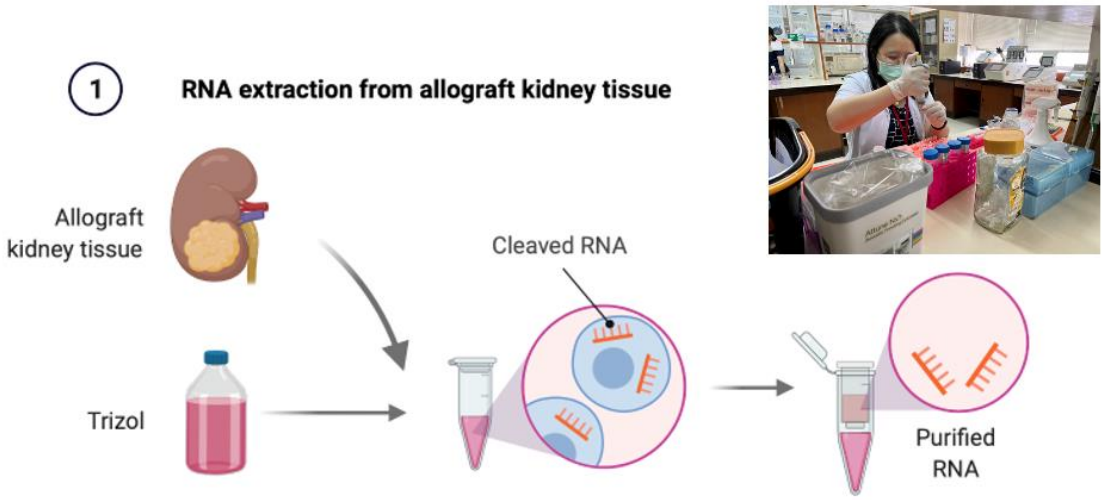
4.1.8 นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอไว้

4.1.9 ทำการล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 500 ไมโครลิตร (ul) อีกครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1.10 นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอไว้

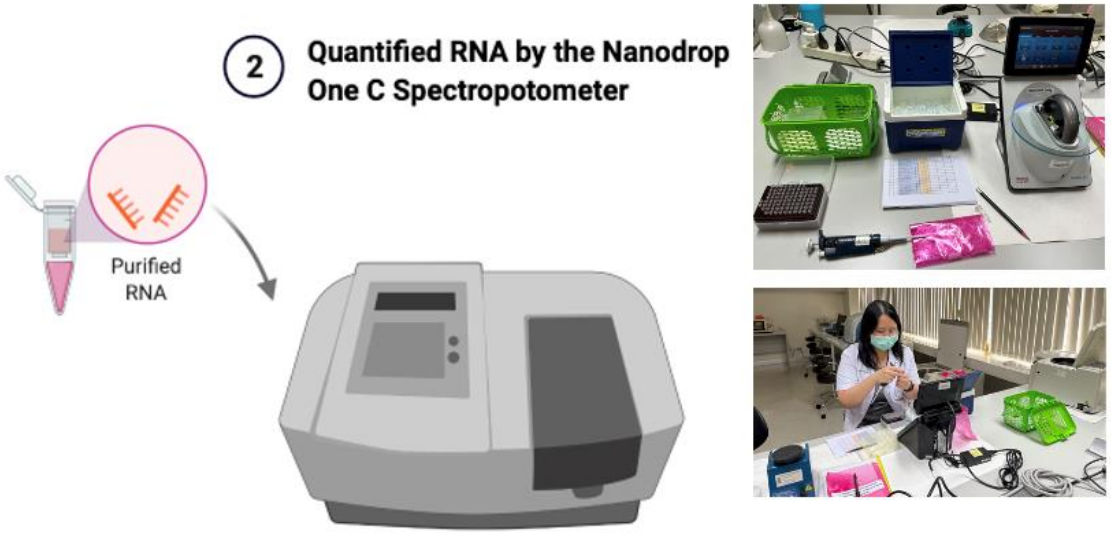
4.1.11 ทำการตากทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ diethyl pyrocarbonate (DECP) หรือน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ul)



รูปที่ 10 ขั้นตอนและการทำงานในขั้นตอนการสกัดนำอาร์เอ็นเอ (RNA)

4.2 การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

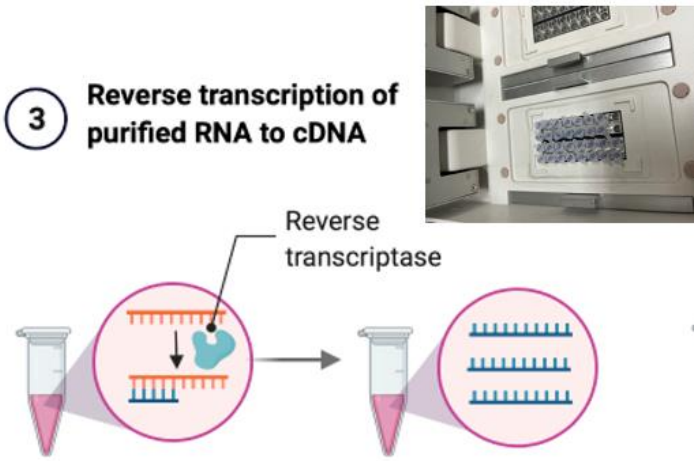


รูปที่ 11 ขั้นตอนการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ (RNA)

4.3 ขั้นตอนเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ โดยนำอาร์เอ็นเอเก็บที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส พร้อมสำหรับการนำไปสังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA คือ ดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ

4.4 ขั้นตอนการสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ โดยการทำปฏิกิริยาในหลอดที่มีอาร์เอ็นเอ 500 นาโนกรัม โดยใช้ reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA) หลังจากบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้ cDNA ที่พร้อมสำหรับการทำ quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (qRT-PCR)

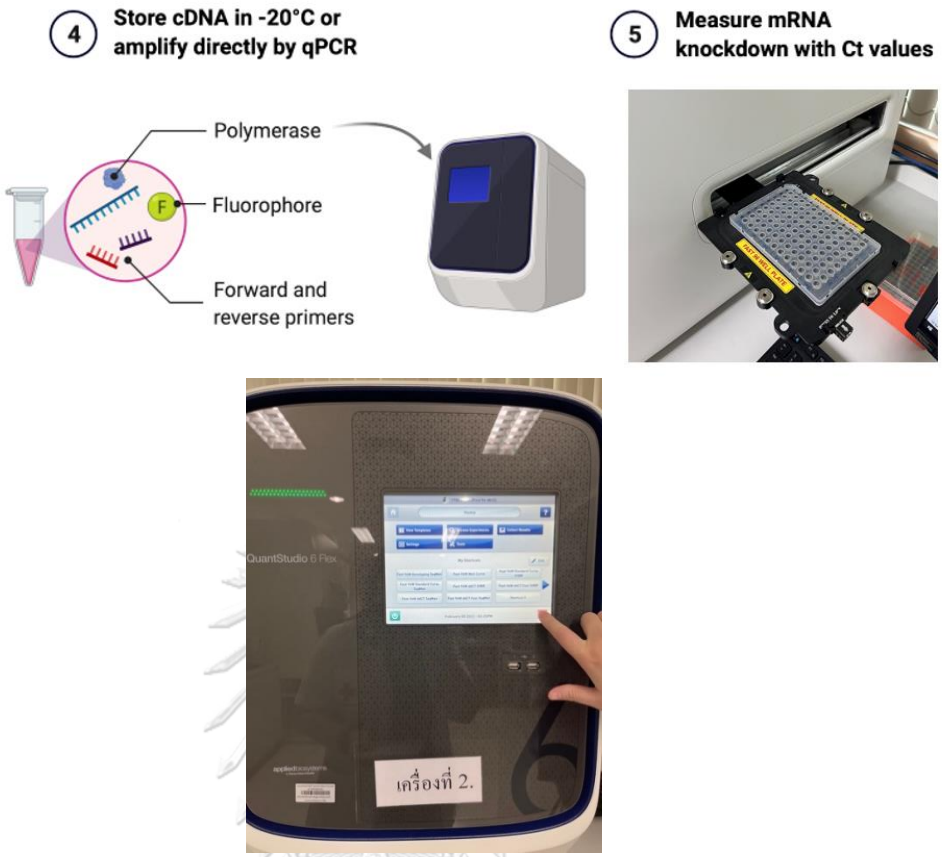
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 12 ขั้นตอนการสร้าง complementary DNA (cDNA)

4.5 ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (qRT-PCR) โดยการ โดยใช้ cDNA เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาด้วย ชุด PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix (Applied Biosystems) และไพรเมอร์ที่จำเพาะโดย 1 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มปริมาณ 5 ยีน คือ ยีน Actin ใช้ เป็นยีนควบคุม และยีนสำหรับการตรวจ CD35, CD46, CD55 และ CD59 ซึ่งเป็นยีนที่ต้องการศึกษา การแสดงออกโดยในหลอดที่เพิ่มปริมาณยีนควบคุมจะ ใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3 หลังจากผสม ปฏิกิริยาเสร็จจะนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยโปรแกรม Pre-PCR ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียศ เป็นเวลา 3 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียศ 10 วินาที annealing/chain elongation step อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียศ 30 วินาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 13 ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR

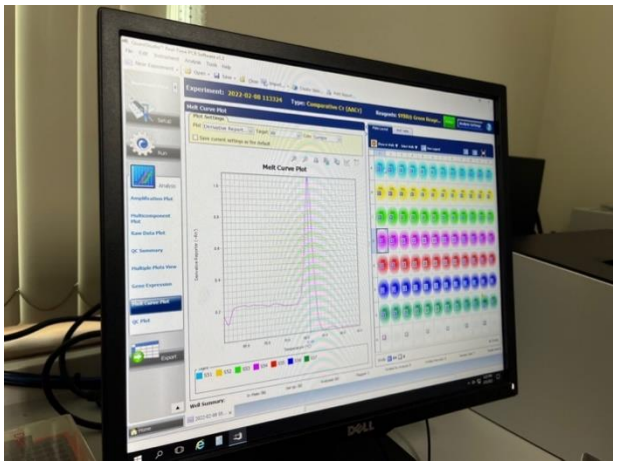
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ qRT-PCR[18, 19]

Primers	Forward	Reverse
β-Actin	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

Protectin (CD59)	5’-GAGCCCAGGGAGGGAAAGGTTC-3’	5’-CGAGGTTAAGGCAAAACCCTACGG-3’
Decay-accelerating factor (CD55)	5’-AGGCATTTTCATCTTTCCTTCGGG-3’	5’-CCTTATCACCATCAACACCCCTGG-3’
Membrane cofactor protein (CD46)	5’-CCAAAGTGTCTTAAAGTGCTGCCTC-3’	5’-CTAGGACCTGAGGCACTGGACG-3’
Complement receptor 1 (CR1 or CD35)	5’-TAGATGTGCTTGGGGAGAATGGGG-3’	5’-AGACGAGGAACCAATGAGTCGG-3’

4.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล qRT-PCR หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม QuantStudio™ Real-Time PCR software version 1.3 การแสดงออกของยีนรายงานเป็นค่า cycle threshold (Ct value) ของยีน CD35, CD46, CD55 และ CD59 และยีนควบคุม Actin



รูปที่ 14 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล qRT-PCR

4.7 ขั้นตอนการแปลผล qRT-PCR โดยนำค่า cycle threshold (Ct) ที่ได้มาหาความแตกต่างระหว่างยีนที่สนใจและยีนควบคุม actin

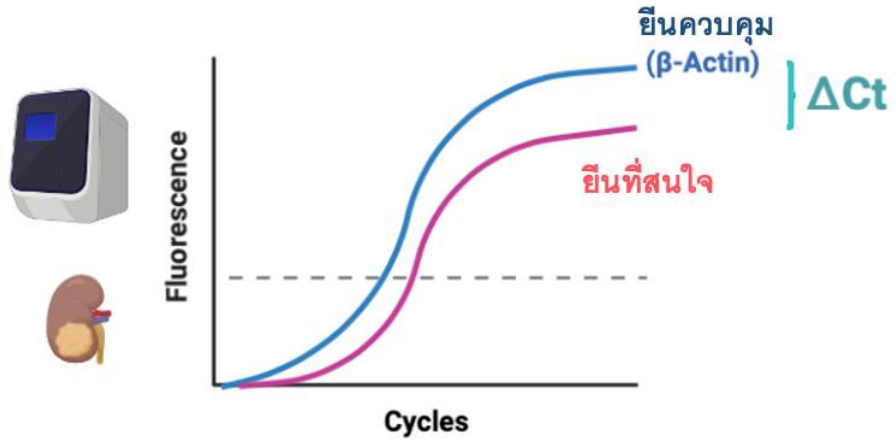
$$\Delta Ct = Ct \text{ (ของยีนที่สนใจ)} - Ct \text{ (ยีนควบคุม หรือยีน actin)}$$

แล้วจึงนำมาคำนวณค่า $\Delta\Delta Ct$ คือค่า

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (เคสที่สนใจ)} - \Delta Ct \text{ (เคสควบคุม)}$$

โดยเคสควบคุมที่ใช้คือผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living related KT) **ที่**ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO- and HLA-compatible KT) และไม่มีความแตกต่างกันของ human leukocyte antigen (no HLA-mismatch)

หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ผล Relative expression ratio โดยใช้สูตร $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ตามวิธีการของ Livax and Schmittgen (2001)[20]



รูปที่ 15 ขั้นตอนการแปลผล qRT-PCR

5. วิธีการวิจัย

- คัดเลือกประชากรทั้งหมดที่เข้ากับกลุ่มประชากรเป้าหมายในช่วงเวลาที่กำหนดไว้ กล่าวคือ เป็นผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living related kidney transplantation) ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ.2559 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2563 หลังจากนั้นคัดเลือกผู้ป่วย

เข้าการศึกษาตามเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria) และคัดเลือกผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria) ออก

- ทำการเก็บข้อมู**ล**พื้นฐานจากข้อมูลทางคลินิกและข้อมูลจากเวชระเบียน โดยใช้แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล ของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย โดยข้อมูลที่เก็บดังรายละเอียดในข้อ 2.5
- นำชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย ที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส ณ หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มาทำการตรวจวัดปริมาณตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่จับอยู่บนผิวของเซลล์ ได้แก่ CD35, CD46, CD55, CD59 ด้วยการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (qRT-PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่กำหนดไว้ ได้แก่ CD35, CD46, CD55, CD59 โดยมีการทำการเปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) เพื่อให้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ในการแปลผล โดยแสดงผลออกมาเป็นค่า cycle threshold (Ct)
- วิเคราะห์ข้อมูล qRT-PCR โดยแสดงออกเป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ (relative normalized expression; $2^{-\Delta\Delta ct}$) ระหว่างยีน CD35, CD46, CD55 และ CD59 และยีนควบคุม Actin
- นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบ และคำนวณทางสถิติเพื่อรายงานผลความแตกต่างของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มดังที่กล่าวมาข้างต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6. การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

- ผู้ดำเนินการวิจัยบันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยตามแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลการวิจัย
- ผู้ดำเนินการวิจัยบันทึกผลการศึกษา ได้แก่ ข้อมู**ล**พื้นฐานจากข้อมูลทางคลินิกและข้อมูลจากเวชระเบียน รวมถึงผลการ
- ผู้เก็บข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย และผู้บันทึกข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย

7. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data Analysis and Statistics)

- การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา ซึ่งสามารถแบ่งตามประเภทของข้อมูล ดังนี้:

<u>ข้อมูลเชิงปริมาณ</u>

ได้แก่

- อายุของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient age)
- อายุของผู้บริจาคไต (donor age)
- ระยะเวลาที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต (dialysis vintage)
- การเข้ากันได้ของแอนติเจน human leukocyte antigen (HLA-mismatch)
- ระยะเวลาตั้งแต่หนีบหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงไต (clamp renal artery) จนกระทั่งตัดไตออก (warm ischemic time)
- ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มแช่ไตจนกระทั่งเริ่มนำมาวางในตัวผู้ได้รับบริจาคไต (cold ischemic time)
- ระยะเวลาที่ไตที่ได้รับบริจาคขาดเลือดทั้งหมด (total ischemic time)
- ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ก่อนและหลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization)
- ระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor specific antibodies) ก่อนและหลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization)
- ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต
- ระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต
- ค่าครีเอตินิน (creatinine) ณ เวลาที่ได้การตรวจชิ้นเนื้อไตหลังการปลูกถ่ายไต

แสดงผลในรูปค่ามัธยฐานและค่าพิสัยระหว่างควอร์ไทล์ [Median, Interquartile range (IQR)] กรณีที่มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ (non-normal distribution) หรือ แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน [Mean, Standard deviation (SD)] กรณีที่มีการกระจายตัวของข้อมูลปกติ (Normal distribution)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข้อมูลเชิงคุณภาพ

ได้แก่

- เพศของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient gender)
- เพศของผู้บริจาคไต (recipient gender)
- การได้รับการปลูกถ่ายไตซ้ำ (re-transplantation)

แสดงผลในรูปของค่าความถี่ (frequencies) และ ความถี่สัมพัทธ์ (Relative Frequency)

- การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิง แบ่งตามประเภทของข้อมูล ดังนี้:

ข้อมูลเชิงปริมาณ

สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณที่มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ (Non-normal distribution) จะทำการแปลงข้อมูล (data transformation) โดยใช้วิธีการแปลงเป็นค่า logarithm ก่อนนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ด้วย unpaired T-test ในกรณีที่ข้อมูลมี 2 กลุ่ม และใช้วิธี one-way analysis of variance (one way-ANOVA) with Bonferroni correction ในกรณีที่ข้อมูลมีมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป โดย One sided p-value (p-value for non-inferiority) ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อมูลเชิงคุณภาพ

วิเคราะห์ด้วย Chi square (χ^2) เพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

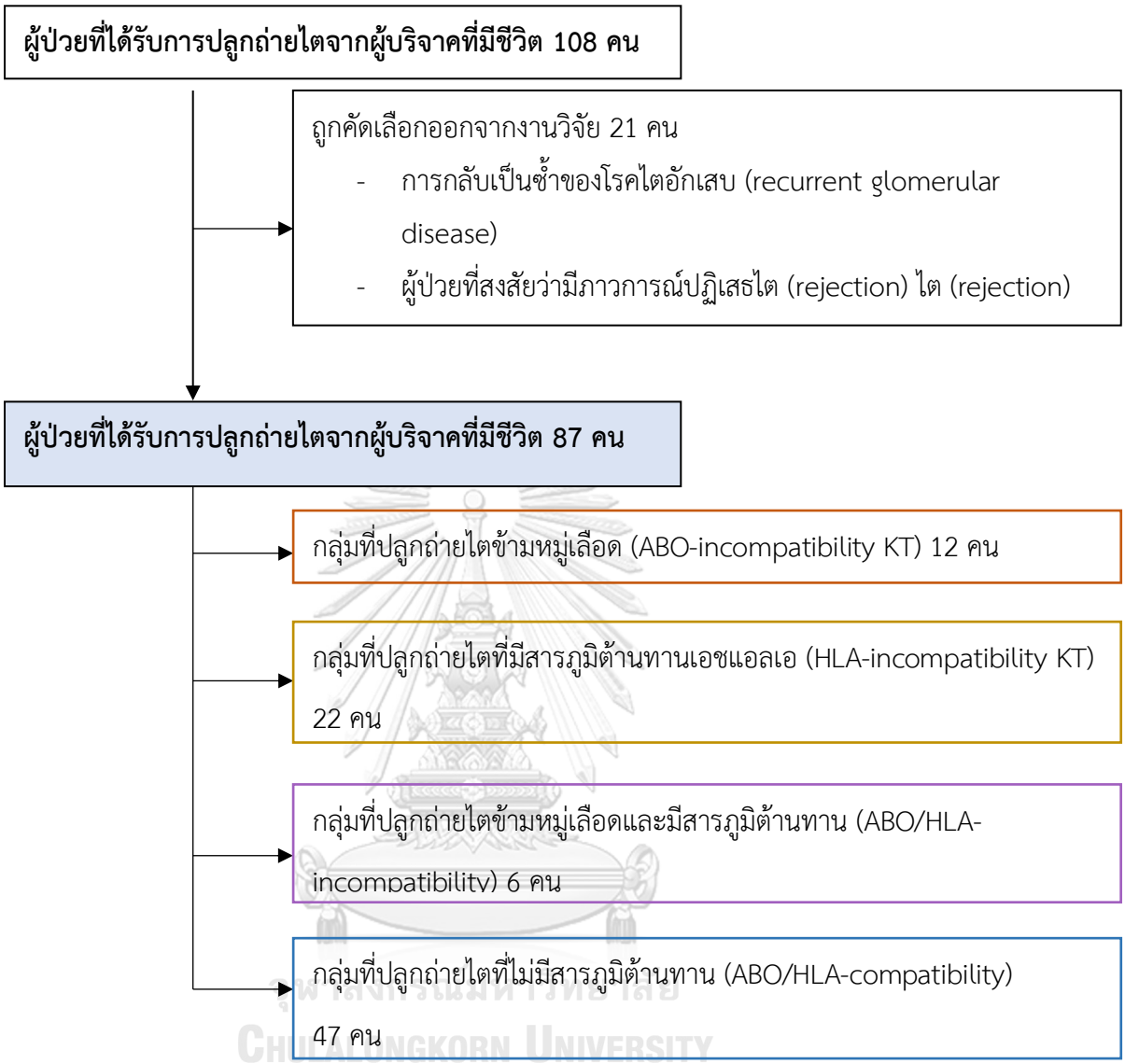
- ใช้โปรแกรมสถิติ SPSS® 28 สำหรับ IOS software (SPSS, Inc., Chicago, IL) and GraphPad Prism 9.0.1.

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ข้อมูลประชากรของการศึกษา

ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 จนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 มีผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living related kidney transplantation) ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และได้รับการทำการตรวจชิ้นเนื้อไตอย่างน้อย 1 ครั้งภายใน 1 ปีหลังทำการปลูกถ่ายไตทั้งหมด 108 คน โดยเมื่อพิจารณาตามเกณฑ์อื่น ๆ ของการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria) รวมถึงเกณฑ์การคัดเลือกผู้ออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria) พบว่ามีผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 87 รายที่ได้เข้าร่วมการศึกษา สาเหตุในการคัดออกจากการศึกษาคือ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีการกลับเป็นซ้ำของโรคไตอักเสบ (recurrent glomerular disease) และ ผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) โดยหลังจากนั้นได้ทำการแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility KT) กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) กลุ่มที่ได้รับปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) และ กลุ่มที่ได้รับปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) ดังแสดงในรูปที่ 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 16 แผนภูมิแสดงจำนวนของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

โดยประชากรในกลุ่มปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility KT) ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไตเลย ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ และผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน มีภาวการณ์ปฏิเสธไตถึงร้อยละ 45.5 และ 50 ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่เป็นภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดี (Antibody mediated rejection, ABMR) ดังแสดงในตารางที่ 4 ในขณะที่กลุ่มผู้ที่ได้รับปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทานพบภาวการณ์ปฏิเสธไตเพียงร้อยละ 10.6 เท่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยที่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection) ในแต่ละกลุ่ม

ภาวการณ์ปฏิเสธไต (rejection)	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility KT) 12 คน	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) 22 คน	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) 6 คน	ผู้ที่ได้รับปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) 47 คน	P value
ไม่มีภาวการณ์ปฏิเสธไต	12 (100%)	12 (54.5%)	3 (50%)	42 (89.4%)	0.010
ภาวการณ์ปฏิเสธไตจากแอนติบอดี (Antibody mediated rejection, ABMR)	0 (0%)	8 (36.4%)	2 (33.3%)	3 (6.4%)	
ภาวการณ์ปฏิเสธไตแบบเซลล์ (Acute cellular rejection, ACR)	0 (0%)	2 (9.1%)	1 (16.7%)	2 (4.3%)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประชากรในการศึกษานี้มีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอายุ 43.4 ± 12.7 ปี เป็นเพศชาย 60.0% มีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานการเข้ากันได้ของแอนติเจน human leukocyte antigen (HLA-mismatch) 3.57 ± 1.63 โดยเมื่อแบ่งประชากรในการศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility KT) 12 คน ผู้ที่ได้รับการ

ปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) 22 คน ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) 6 คน และ ผู้ที่ได้รับปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) 47 คน โดยเมื่อพิจารณาข้อมูลพื้นฐานของประชากร (Baseline characteristics) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญทางสถิติ ในแง่ของปัจจัยสำคัญต่าง ๆ ที่มีผลต่อภาวการณ์ปฏิเสธไต ทั้งในเรื่องของการได้รับการปลูกถ่ายไตซ้ำ (re-transplantation) ค่าการเข้ากันได้ของแอนติเจน human leukocyte antigen (HLA-mismatch) ระยะเวลาไตที่ได้รับบริจาคขาดเลือดทั้งหมด (total ischemic time) รวมถึงปริมาณระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) และระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor specific antibodies) ก่อนและหลังการทำการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีความแตกต่างกันของข้อมูลพื้นฐานของประชากรในเรื่องของเพศของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient sex) และค่าครีเอตินิน (creatinine) ณ เวลาที่ได้การตรวจชิ้นเนื้อไตหลังการปลูกถ่ายไต ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานของประชากร (Baseline characteristics)

ข้อมูลพื้นฐานประชากร	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatibility KT) **12 คน**	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) 22 คน	ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) 6 คน	ผู้ที่ได้รับปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) 47 คน	**P value**
การได้รับการปลูกถ่ายไตซ้ำ (retransplantation) (ไม่ได้รับ/ได้รับการปลูกถ่ายไตซ้ำ)	12/0	20/2	5/1	46/1	0.23

อายุของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient age), ค่ามัธยฐาน,ปี	38.5 (36.3-52.0)	42.5 (33.0-55.5)	40.5 (33.0-54.3)	43.0 (33.0-51.0)	0.74
เพศของผู้ได้รับบริจาคไต (recipient gender), (ชาย/หญิง), จำนวน	9/3	5/17	3/3	35/12	0.001
อายุของผู้บริจาคไต (donor age), ค่ามัธยฐาน,ปี	40.5 (34.5-48.8)	42.0 (28.8-47.8)	44.5 (33.0-49.0)	41.0 (33.8-45.0)	0.75
เพศของผู้บริจาคไต (recipient gender), (ชาย/หญิง), จำนวน	4/8	12/10	3/3	13/34	0.24
การเข้ากันได้ของแอนติเจน human leukocyte antigen (HLA-mismatch), ค่ามัธยฐาน	5.0 (3.0-5.8)	3.0 (3.0-5.0)	4.0 (3.0-6.0)	3.0 (3.0-5.0)	0.13
ระยะเวลาที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต (dialysis vintage), ค่ามัธยฐาน, เดือน	20.0 (12.0-90.0)	26.0 (17.0-38.0)	21.0 (9.5-51.0)	24.0 (15.0-27.5)	0.63
Cold ischemic time, ค่ามัธยฐาน, นาที	26.0 (20.0-33.0)	27.0 (18.5-33.5)	27.5 (18.8-46.0)	24.0 (17.0-32.0)	0.61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Warm ischemic time, ค่ามัธยฐาน, นาที	25.0 (20.0-37.5)	30.5 (24.8-34.0)	28.0 (20.3-31.5)	31.0 (28.0-36.0)	0.76
Total ischemia, ค่ามัธยฐาน, นาที	51.5 (43.0-63.5)	55.0 (43.0-65.5)	53.0 (46.3-70.0)	55.0 (46.0-67.0)	0.99
ระดับของสารภูมิต้านทานก่อนและหลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization)					
ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ก่อนการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization), ค่ามัธยฐาน	1:96 (1:64-1:256)	-	1:128 (1:12.5-1:896)	-	1.00
ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) หลังการกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization), ค่ามัธยฐาน	1:8 (1:4-1:16)	-	1:3 (1:1–1:11)	-	0.15
ระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor	-	1177.0 (1078.2-10,057)	8725.9 (8051.9-9,400)	-	0.17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

specific antibodies) ก่อน การกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization) , ค่ามัธยฐาน					
ระดับของสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor specific antibodies) หลัง การกำจัดสารภูมิต้านทานออกจากร่างกาย (desensitization) , ค่ามัธยฐาน	-	1610.9 (836.3-5718.7)	1137.4 (829.3-2535.9)	-	1.00
ระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต, ค่ามัธยฐาน, เดือน	2.0 (1.0-3.5)	2.0 (1.0-3.0)	6.5 (3.3-11.3)	2.0 (1.0-4.0)	0.052
ระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้น	1:4 (1:4-1:20)	-	1:4 (1:2.5-1:4)	-	0.60

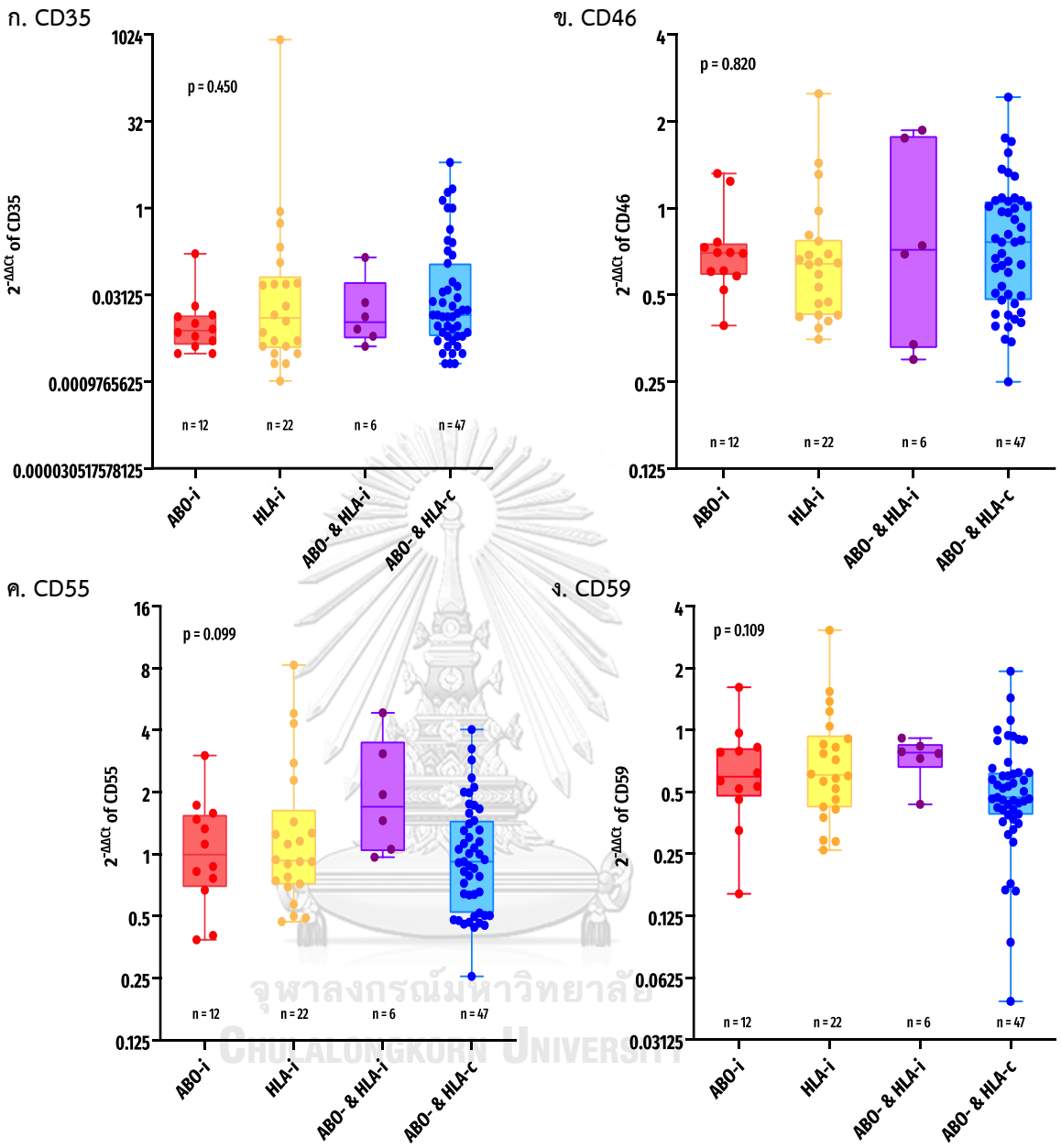
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เนื้อไต, ค่ามัธยฐาน					
ค่าครีเอตินิน (creatinine) ณ เวลาที่ได้การตรวจชิ้นเนื้อไตหลังการปลูกถ่ายไต, ค่ามัธยฐาน	1.48 (1.33-1.60)	1.06 (0.88-1.33)	1.29 (1.08-1.53)	1.24 (1.07-1.42)	0.04

2. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) และ การปลูกถ่ายไตชนิดอื่น ๆ

เมื่อนำชิ้นเนื้อไตที่ได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในแต่ละกลุ่มไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35, CD46, CD55 และ CD59 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออก CD35, CD46, CD55 และ CD59 ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) และ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) ดังแสดงใน รูปที่ 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) และ การปลูกถ่ายไตชนิดอื่น ๆ ก. CD 35 ข. CD46 ค. CD55 และ ง. CD59

หมายเหตุ:

- ABO-I คือ ABO-incompatible KT คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด

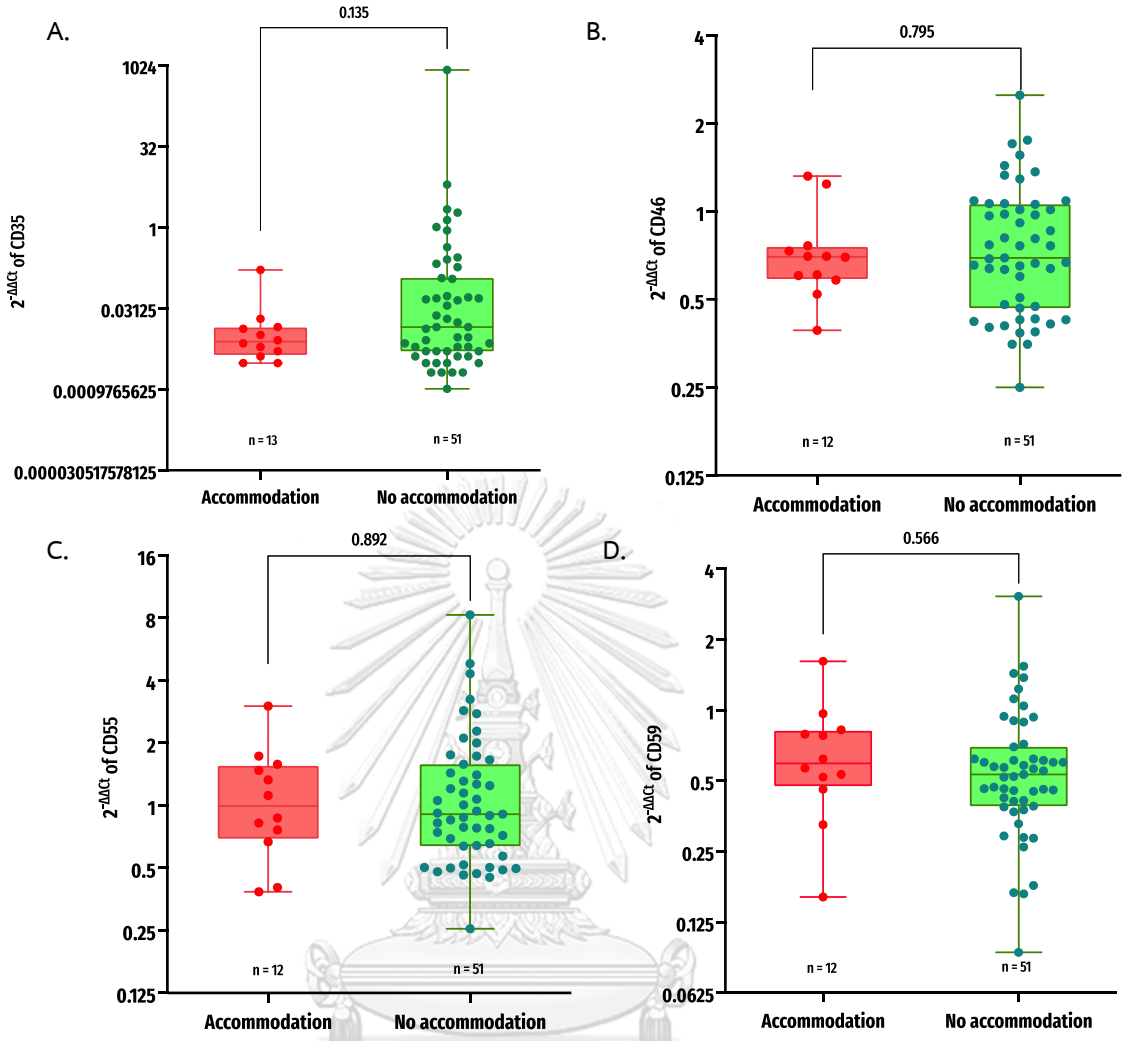
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- HLA-I คือ HLA-incompatible KT คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ
- ABO- & HLA-I KT คือ ABO and HLA-incompatible KT คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน
- ABO- & HLA-C KT คือ ABO and HLA-compatible KT คือผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน

3. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างผู้ป่วยที่เกิดภาวะ accommodation และไม่เกิดภาวะ accommodation

ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดทั้งหมด 12 คน เกิดภาวะ accommodation ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ accommodation มีทั้งหมด 51 คน โดยเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatibility KT) 11 คน และ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatibility) 40 คน

เมื่อนำชิ้นเนื้อไตที่ได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในแต่ละกลุ่มไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35, CD46, CD55 และ CD59 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออก CD35, CD46, CD55 และ CD59 ระหว่างผู้ป่วยที่เกิดและไม่เกิดภาวะ accommodation ดังแสดงใน รูปที่ 18



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 18 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่เกิดภาวะ accommodation และไม่เกิดภาวะ accommodation

ก. CD 35 ข. CD46 ค. CD55 และ ง. CD59

หมายเหตุ:

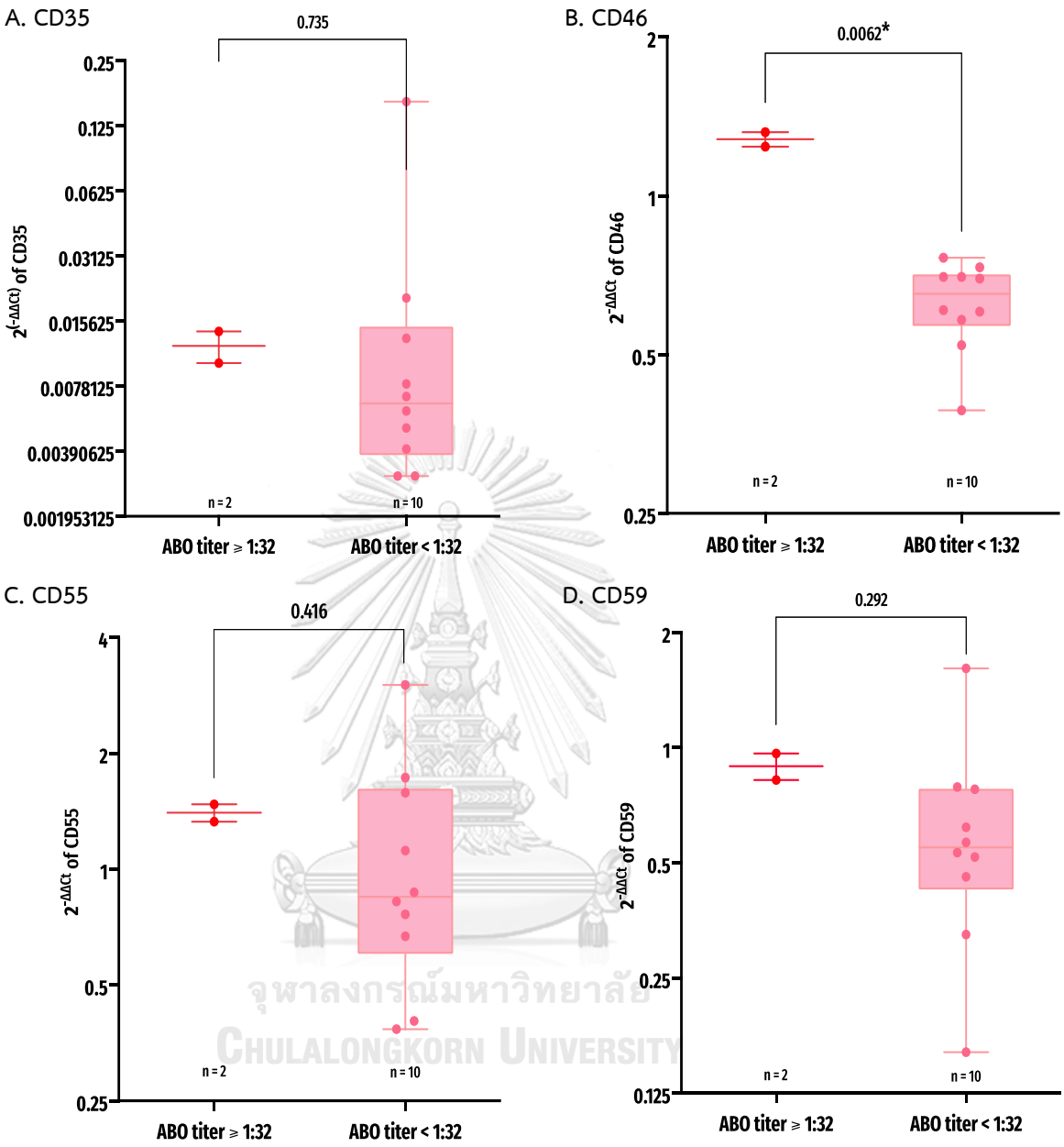
- Accommodation คือ ผู้ป่วยที่เกิดภาวะ accommodation
- No accommodation คือ ผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ accommodation

4. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไตที่เกิดภาวะ accommodation แต่มีความแตกต่างกันของระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต

เมื่อนำชิ้นเนื้อไตที่ได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่เกิดภาวะ accommodation มาดูระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) พบว่า ผู้ป่วย 2 คน มีระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตมากกว่าหรือเท่ากับ 1:32 (≥1:32) และ 10 คน มีระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตน้อยกว่า 1:32 (<1:32)

โดยเมื่อดูการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35, CD46, CD55 และ CD59 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตมากกว่าหรือเท่ากับ 1:32 (≥1:32) มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออก CD 46 สูงกว่ากลุ่มที่ระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตน้อยกว่า 1:32 (<1:32) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0062$) ดังแสดงใน รูปที่ 19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

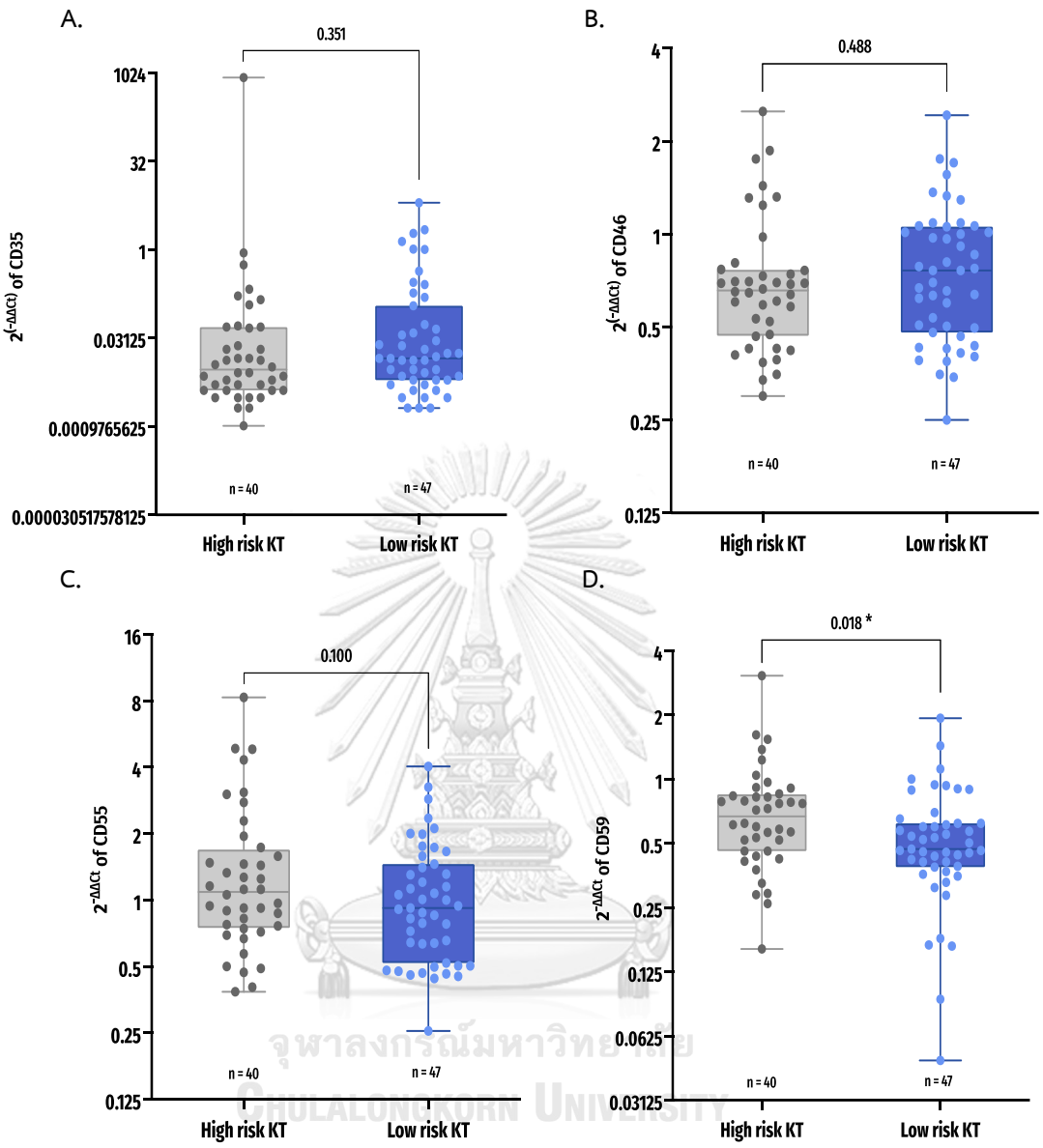
รูปที่ 19 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มี ABO titer ≥1:32 และมี ABO titer < 1:32

ก. CD 35 ข. CD46 ค. CD55 และ ง. CD59

5. ข้อมูลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ในชิ้นเนื้อไต ระหว่างกลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) และกลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตต่ำ (low immunological risk KT)

เมื่อนำชิ้นเนื้อไตที่ได้ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) และ กลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตต่ำ (low immunological risk KT) มาดูการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35, CD46, CD55 และ CD59 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออก CD 59 สูงกว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตต่ำ (low immunological risk KT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.018$) ดังแสดงใน รูปที่ 20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 20 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk KT) และ กลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตต่ำ (low immunological risk KT)

ก. CD 35 ข. CD46 ค. CD55 และ ง. CD59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

1. อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35 CD46 CD55 และ CD59 ระหว่างผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible KT) ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-incompatibility KT) รวมถึงผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible KT)

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้เพิ่มเติมในผู้ป่วยที่เกิดและไม่เกิดภาวะ accommodation ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD35 CD46 CD55 และ CD59 เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยที่มีระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1:32 พบว่าสัมพันธ์กับการมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CD46 ที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตที่น้อยกว่า 1:32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยการที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจมีความเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาที่นำชิ้นเนื้อไตมาตรวจอาจเป็นช่วงที่ไตที่ได้รับการปลูกถ่ายอยู่ในภาวะที่การทำงานเป็นปกติ (stable graft function) ซึ่งในช่วงนี้ร่างกายมีการสร้างสารภูมิต้านทาน (antibody) ที่ลดลง ทำให้เกิดการสร้างแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ (antigen-antibody complex) น้อยลง และเกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ที่ลดลงตามมา ซึ่งเมื่อมีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ที่ลดลง ทำให้ร่างกายไม่จำเป็นต้องมีการสร้างตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) หรือโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ที่มากขึ้นในช่วงนี้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะที่มีสารภูมิต้านทานสูงขึ้น คือมีระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตที่มากขึ้น หรือมากกว่าหรือเท่ากับ 1:32 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่ยินยอมให้ทำการปลูกถ่ายไตในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่

เลือด พบว่ากลับมีการทำงานของ CD46 ที่สูงขึ้นกว่าผู้ที่มีระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ณ เวลาที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตที่น้อยกว่า 1:32 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งบอกว่าเมื่อร่างกายมีสารภูมิต้านทานมากขึ้น อาจมีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ที่มากขึ้น และร่างกายอาจทำการสร้าง CD46 เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้เป็นกลไกในการป้องกันไตที่ได้รับการปลูกถ่าย (allograft) ไม่ให้เกิดการบาดเจ็บจากระดับสารภูมิต้านทานที่สูงขึ้น ทำให้ไม่เกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตตามมา

นอกจากนั้นระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อผลการศึกษา เนื่องจากระยะเวลาของกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน HLA (ABO/HLA-incompatible KT) มีระยะเวลาที่แตกต่างกับกลุ่มอื่น โดยค่ามัธยฐานของระยะเวลาดังกล่าวอยู่ที่ 6 เดือน เมื่อเทียบกับผู้ป่วยกลุ่มอื่น ๆ ที่มีค่ามัธยฐานของระยะเวลาที่ 2 เดือน ซึ่งจากที่ได้กล่าวไปข้างต้นว่าการทำงานของระบบควบคุมคอมพลีเมนต์อาจมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไต โดยเมื่อระยะเวลาที่นานขึ้นก็จะมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ลดลงตามมา

ซึ่งจากข้อมูลในงานวิจัยก่อนหน้าของ Petra Hruba et al[17] ที่ทำการตรวจชิ้นเนื้อไตในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible KT) พบว่ามีการแสดงออกของ CD46 มากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงผลของระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ร่วมด้วย รวมถึงเมื่อทำการย้อม immunohistochemistry เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ CD46 นี้ในชิ้นเนื้อไตกลับไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) ซึ่งจากผลของงานวิจัยฉบับนี้อาจเป็นตัวช่วยยืนยันผลของงานวิจัยก่อนหน้า ว่า CD46 น่าจะมีบทบาทสำคัญในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด แต่ระดับของสารภูมิต้านทานก็อาจเป็นตัวสำคัญตัวหนึ่งที่ส่งผลต่อการทำงานที่มากขึ้นหรือลดลงของ CD46

เมื่อทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk) มีการแสดงออกของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ CD59 สูงกว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตน้อย (low immunological risk) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในผู้ป่วยกลุ่มที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง ได้แก่ การปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) การปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible KT) และการปลูกถ่ายไตที่ข้ามหมู่เลือดและมีสารภูมิต้านทาน HLA (ABO/HLA-incompatible KT) หรือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กล่าวคือกลุ่มที่ร่างกายเคยมีสารภูมิต้านทานที่ตรงกับไตที่ได้รับการปลูกถ่าย (preformed antibodies)

ซึ่งจากข้อมูลนี้ช่วยตอบข้อขัดแย้งของข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Petra Hruba et al[17] ที่พบว่าเมื่อทำการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ CD59 ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) และการปลูกถ่ายไตที่มีสารภูมิต้านทานเอชแอลเอ (HLA-incompatible KT) แต่ในขณะเดียวกันเมื่อนำชิ้นเนื้อของคนไข้สองกลุ่มนี้มาทำการตรวจหาการแสดงออกของ CD59 ด้วยวิธี microarray กลับไม่พบการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับการปลูกถ่ายไตที่ไม่มีสารภูมิต้านทาน (ABO/HLA-compatible KT) ซึ่งการศึกษาฉบับนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการตรวจด้วยวิธีการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ซึ่งมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่สูงกว่าการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี microarray ทำให้สนับสนุนผลว่า CD59 น่าจะมีการสูงขึ้นในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง

โดยจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า CD46 อาจมีบทบาทสำคัญในการช่วยปกป้องไตที่ได้รับการปลูกถ่ายเมื่อร่างกายมีระดับสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ที่สูงขึ้น ซึ่งอาจต้องการการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพิสูจน์ข้อสรุปนี้ ซึ่งจากข้อมูลนี้อาจมีผลในการนำไปใช้ในอนาคต เช่น ใช้ในการช่วยตัดสินใจในการรักษาในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดที่มีระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ที่สูงขึ้น การตรวจชิ้นเนื้อพบว่ามี CD46 ในชิ้นเนื้อไต อาจเป็นตัวช่วยบ่งบอกว่าร่างกายมีการสร้างสารขึ้นมาเพื่อช่วยป้องกันชิ้นเนื้อไตจากการบาดเจ็บหรือภาวการณ์สลัดไตอยู่แล้ว ซึ่งอาจส่งผลทำให้ไม่จำเป็นต้องเลือกใช้ยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agents) ที่กดภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรง เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นอกจากนั้นการตรวจพบว่า CD59 ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูงนั้นมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยป้องกันการบาดเจ็บหรือภาวการณ์ปฏิเสธไตจากสารภูมิต้านทานที่มีอยู่ก่อน (preformed antibodies) ซึ่งยาที่ออกฤทธิ์ช่วยเพิ่มการทำงานของ CD59 หรือยับยั้งสารที่ทำการยับยั้งการทำงานของ CD59 อาจมีผลในการช่วยปกป้องไตที่ได้รับการปลูกถ่ายจากการบาดเจ็บ หรือป้องกันการเกิดภาวการณ์ปฏิเสธไตจากสารภูมิต้านทานได้

2. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ไม่พบว่าการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำงานของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory

proteins) แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด (ABO-incompatible KT) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายมีระดับของสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1:32 จะพบว่ามีการแสดงออกของ CD46 ที่สูงขึ้นตาม นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการปลูกถ่ายไตสูง (high immunological risk) จะมีการแสดงออกของ CD59 ที่สูงกว่าอีกด้วย ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลไกการควบคุมการทำงานของคอมพลีเมนต์อาจมีบทบาทสำคัญในการช่วยปกป้องไตที่ได้รับการปลูกถ่าย (kidney allograft) เมื่อร่างกายมีระดับของสารภูมิต้านทานที่สูงขึ้น หรือต่อสารภูมิต้านทานที่ตรงกับไตที่ได้รับการปลูกถ่ายที่มีอยู่เดิม (preformed antibodies)

3. ข้อจำกัด แนวทางแก้ไข และข้อเสนอแนะ

ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือการออกแบบงานวิจัยเป็นแบบ cross-sectional ซึ่งทำการตรวจหาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำงานของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) เพียงแค่เวลาเดียวหลังทำการปลูกถ่ายไต แต่การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์เป็นกระบวนการทำงานที่มีกระบวนการแบบไดนามิก (dynamic process) ซึ่งอาจทำให้การตรวจพบการแสดงออกของคอมพลีเมนต์ไม่ได้บ่งบอกถึงการแสดงออกของคอมพลีเมนต์ทั้งหมด ซึ่งในการทำงานวิจัยต่อ ๆ ไปอาจต้องมีการนำชิ้นเนื้อ หรือตรวจการทำงานของตัวควบคุมคอมพลีเมนต์เหล่านี้ตามช่วงเวลาด้วย เช่นช่วงที่เริ่มทำการปลูกถ่ายไตช่วงแรก หรือช่วงที่มีสารภูมิต้านทานต่อหมู่เลือด (ABO titer) หรือสารภูมิต้านทานเอชแอลเอที่จำเพาะต่อไตของผู้บริจาค (donor specific antibodies) สูงขึ้นในเลือด ซึ่งอาจบ่งบอกถึงการทำงานของตัวยับยั้งคอมพลีเมนต์ (complement inhibitors) และโปรตีนที่ควบคุมคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนผู้ป่วยในการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีความเสี่ยงสูงที่มีจำนวนค่อนข้างจำกัด ซึ่งอาจทำให้ตรวจไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของตัวที่ควบคุมการทำงานคอมพลีเมนต์ในแต่ละกลุ่มอีกด้วย อย่างไรก็ตามโครงการวิจัยนี้ถือเป็นการวิจัยนำร่อง ซึ่งยังเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยต่อยอดอื่นๆ ได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Luyckx VA, Tonelli M, Stanifer JW. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. Bull World Health Organ. 2018;96(6):414-22D.

2. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. Am J Transplant. 2011;11(10):2093-109.

3. สมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย. รายงานข้อมูลการปลูกถ่ายอวัยวะ ประจำปี พ.ศ. 2562. 2562.

4. Okumi M, Toki D, Nozaki T, Shimizu T, Shirakawa H, Omoto K, et al. ABO-Incompatible Living Kidney Transplants: Evolution of Outcomes and Immunosuppressive Management. Am J Transplant. 2016;16(3):886-96.

5. อดิศว์ ทัศณรงค์ สคขนแโ. ตำราการปลูกถ่ายอวัยวะ2562. 471-90 p.

6. J O. Understanding the Complexities of Kidney Transplantation2011.

7. Dehoux JP, Gianello P. Accommodation and antibodies. Transpl Immunol. 2009;21(2):106-10.

8. Lynch RJ, Platt JL. Accommodation in organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2008;13(2):165-70.

9. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. J Am Soc Nephrol. 2007;18(4):1046-56.

10. Ko EJ, Yu JH, Yang CW, Chung BH, Korean Organ Transplantation Registry Study G. Clinical outcomes of ABO- and HLA-incompatible kidney transplantation: a nationwide cohort study. Transpl Int. 2017;30(12):1215-25.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol. 2009;9(10):729-40.

12. Biglarnia AR, Huber-Lang M, Mohlin C, Ekdahl KN, Nilsson B. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. Nat Rev Nephrol. 2018;14(12):767-81.

13. Dorling A. Transplant accommodation--are the lessons learned from xenotransplantation pertinent for clinical allotransplantation? Am J Transplant. 2012;12(3):545-53.

14. Chen Song S, Zhong S, Xiang Y, Li JH, Guo H, Wang WY, et al. Complement inhibition enables renal allograft accommodation and long-term engraftment in presensitized nonhuman primates. Am J Transplant. 2011;11(10):2057-66.

15. Wang H, Arp J, Liu W, Faas SJ, Jiang J, Gies DR, et al. Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. J Immunol. 2007;179(7):4451-63.

16. Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Yazaki S, Iwamoto M, Furusawa T, et al. Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-a/b and human leukocyte antigen antibody reaction: implication of accommodation. Transplantation. 2012;93(4):390-7.

17. Hruba P, Krejcik Z, Stranecky V, Maluskova J, Slatinska J, Gueler F, et al. Molecular Patterns Discriminate Accommodation and Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. Transplantation. 2019;103(5):909-17.

18. Lee MJ, Na K, Jeong SK, Lim JS, Kim SA, Lee MJ, et al. Identification of human complement factor B as a novel biomarker candidate for pancreatic ductal adenocarcinoma. J Proteome Res. 2014;13(11):4878-88.

19. Lu Z, Zhang C, Cui J, Song Q, Wang L, Kang J, et al. Bioinformatic analysis of the membrane cofactor protein CD46 and microRNA expression in hepatocellular carcinoma. Oncol Rep. 2014;31(2):557-64.

20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Kavita Jintanapramote
วัน เดือน ปี เกิด	2 December 1989
สถานที่เกิด	Bangkok, Thailand
วุฒิการศึกษา	Division on Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
ที่อยู่ปัจจุบัน	115 Ladprao 71 Road, Ladprao, Bangkok, 10230

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY