ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพีสามเอห้าของผู้บริจาคไตและการเกิดผลข้างเคียงต่อไตบริจาคจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวริน

นายสุวศิน อุดมกาญจนนันท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Association of Donor CYP3A5 Genotypes and Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Kidney Transplantation

Mr. Suwasin Udomkarnjananun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพีสามเอห้าของผู้บริจาคไตและการเกิดผลข้างเคียงต่อไตบริจาคจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวริน
โดย	นายสุวศิน อุดมกาญจนนันท์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ณัฐวุฒิ โตวนำชัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุ่งโรจน์ พิทยศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ณัฐวุฒิ โตวนำชัย)

.....กรรมการ

(นายแพทย์ไพโรจน์ ฉัตรานุกูลชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อดิศว์ ทัศณรงค์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สุวศิน อุดมกาญจนนันท์ : ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพีสามเอห้าของผู้บริจาคไตและการเกิดผลข้างเคียงต่อไตบริจาคจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวริน (Association of Donor CYP3A5 Genotypes and Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Kidney Transplantation) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ. ณัฐวุฒิ โตวนำชัย, 58 หน้า.

Background

ทาโครลิมุส (tacrolimus) เป็นยากดภูมิในกลุ่มยับยั้งแคลซินิวริน (calcineurin inhibitor) ที่ใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไต การใช้ทาโครลิมุสเป็นระยะเวลานานและการที่มีระดับยาในปริมาณสูงในเลือดจะส่งผลให้เกิดพิษต่อไตได้ (calcineurin inhibitor nephrotoxicity) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้การทำงานของไตปลูกถ่ายลดลง ในขณะที่หากระดับยาต่ำเกินไป (subtherapeutic drug level) ก็จะส่งผลให้เกิดการปฏิเสธไตเกิดขึ้น (acute rejection) ในปัจจุบันจึงใช้การเจาะวัดระดับยาเพื่อปรับขนาดยาทาโครลิมุสให้อยู่ในระดับปกติ อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการวัดระดับยาแล้วก็ยังมีผู้ป่วยบางส่วนที่เกิดไตเป็นพิษจากยาในกลุ่มนี้ได้ ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการตรวจหาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดพิษต่อเนื้อไตจากยาทาโครลิมุส คือการตรวจหายีนของเอนไซม์ที่ใช้ในการเมตาบอลิซึมของทาโครลิมุสคือ Cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) เนื่องจากในไตที่ปลูกถ่ายจะมีจีโนไทป์ของ CYP3A5 ของผู้บริจาค ซึ่งอาจจะมีผลโดยตรงต่อการเมตาบอลิซึมของยาในเนื้อไต และส่งผลให้เกิดภาวะเป็นพิษต่อเนื้อไตจากยาแกลุ่มแคลซินิวรินได้ โดยสมมติฐานในการศึกษานี้คือในผู้รับบริจาคไตจากผู้บริจาคที่มีการแสดงของ CYP3A5 น้อย (*3/*3 allele) จะมีการเมตาบอลิซึมของยาที่เนื้อไตน้อย ทำให้ตรวจพบภาวะพิษต่อไต (calcineurin inhibitor nephrotoxicity) ได้มากกว่าไตที่มีการแสดงของ CYP3A5 มากกว่า (*1/*1 และ *1/*3 allele)

Methods

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ retrospective cohort เก็บข้อมูลผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มี donor CYP3A5 expression (*1/*1 และ *1/*3 allele) และกลุ่มที่ไม่มี CYP3A5 expression (*3/*3 allele) วิธีการตรวจ genotype ในผู้ป่วยที่รับอวัยวะจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living donor) จะใช้วิธีการตรวจ real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) จากเลือดของผู้บริจาค และตรวจโดยการสกัด DNA จากชิ้นเนื้อไตที่เจาะตรวจ (allograft biopsy) ในผู้ป่วยที่รับอวัยวะจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต (deceased donor) และมาทำ RT-PCR ต่อไปเช่นเดียวกัน ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจะต้องได้รับทาโครลิมุสเป็นยากดภูมิหลักเท่านั้น การวินิจฉัยภาวะความเป็นพิษต่อไตปลูกถ่าย (calcineurin inhibitor nephrotoxicity) จะวินิจฉัยจากชิ้นเนื้อที่ไตได้รับการเจาะตรวจตาม surveillance biopsy ผลการศึกษาหลักที่ต้องการพิสูจน์คือการเกิดพิษของยายับยั้งแคลซินิวรินต่อไตปลูกถ่ายในกลุ่มที่มี CYP3A5 expression และกลุ่มที่ไม่มี CYP3A5 expression

Results

ผู้ป่วยทั้งหมด 50 คน แบ่งเป็นกลุ่ม CYP3A5 expression (*1/*1 และ *1/*3) 21 คนและ non-expression (*3/*3 allele) 29 คน ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มในเรื่องของปริมาณทาโครลิมุสที่ใช้ ระดับยาที่วัดได้ระว่างการตรวจติดตามและอัตราการปฏิเสธไต พบว่าในกลุ่ม CYP3A5 non-expression มีอุบัติการณ์ของการเกิดพิษจากยาต้านแคลซินิวรินมากกว่ากลุ่ม CYP3A5 expression อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ (72.% และ 33.3%, p-value <0.05) ค่ามัธยฐานของเวลาตั้งแต่ปลูกถ่ายไตจนถึงเวลาที่ตรวจพบพยาธิสภาพความเป็นพิษจากยาต้านแคลซินิวรินคือ 9 เดือนในกลุ่ม non-expression และ 105 เดือนในกลุ่ม expression การวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) โดยวิธี cox regression พบว่าการมี CYP3A5 non-expression ในเนื้อไตรับบริจาคจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อเนื้อไตจากยาต้านแคลซินิวริน 3.91 เท่า (p-value <0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CYP3A5 expression

Conclusions

ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่ได้รับไตจากผู้บริจาคที่เป็น CYP3A5 non-expression มีความเสี่ยงต่อการเกิดพยาธิสภาพการเป็นพิษจากยาต้านแคลซินิวรินในเนื้อไตปลูกถ่ายมากกว่ากลุ่มที่เป็น CYP3A5 expression การลดระดับยาทาโครลิมุสหรือการเปลี่ยนไปใช้ยาในกลุ่มอื่นอาจจะลดความเสี่ยงในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ----------

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ----------

ปีการศึกษา 2559

5874085730 : MAJOR MEDICINE
KEYWORDS: KIDNEY TRANSPLANTATION / CYTOCHROME P450 3A5 / CYP3A5 / TACROLIMUS / CALCINEURIN INHIBITOR NEPHROTOXICITY / DONOR GENOTYPE

SUWASIN UDOMKARNJANANUN: Association of Donor CYP3A5 Genotypes and Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Kidney Transplantation. ADVISOR: ASST. PROF. NATAVUDH TOWNAMCHAI, M.D., 58 pp.

Background

Tacrolimus is the major calcineurin inhibitor (CNI) used for immunosuppression in kidney transplantation. Long-term use and high level of CNI can lead to CNI nephrotoxicity, one of the major causes of long-term renal allograft deterioration, while subtherapeutic tacrolimus exposure can cause allograft rejection. Since the therapeutic window is narrow, blood tacrolimus level has to be regularly monitored in clinical practice. Despite achieving the therapeutic level of tacrolimus, some kidney transplant recipients develop chronic CNI nephrotoxicity. Tacrolimus is mainly systemically metabolized by *CYP3A5* which is expressed in the liver. *CYPA5* also has been found in the kidney and may involve in local tacrolimus clearance, preventing allograft from CNI toxicity. We aimed to evaluate the association between kidney allograft *CYP3A5* (donor genotype) and CNI nephrotoxicity in Asian population which have high *CYP3A5* variation.

Methods

We conducted a prospective cohort study comparing two groups of donor *CYP3A5* genotypes, the expressor (**1/*1* and **1/*3*; rapid metabolizer) and the non-expressor (**3/*3*). Blood samples from living donors and tissue extraction from allograft biopsy paraffin block in cadaveric donor have been used for *CYP3A5* genotyping by real-time PCR. Only recipients receiving tacrolimus as a main immunosuppressive drug were included. CNI nephrotoxicity was diagnosed blindly to the *CYP3A5* genotype by renal pathologist from surveillance biopsy. The primary outcome is time-to-CNI nephrotoxicity in the expressor genotype compared to the non-expressor genotype.

Results

The total of 50 patients were enrolled, 21 donors were the expressor and 29 donors were the non-expressor. There were no differences in both tacrolimus dosages and tacrolimus exposure/levels between the two groups. The incidence of CNI nephrotoxicity was significantly higher in recipients with non-expressor allograft (72.4% vs 33.3%, $p<0.05$). The median time to event was 9 months in the non-expressor group and 105 months in the expressor groups ($p<0.05$). Cox regression analysis showed hazard ratio of 3.91 ($p<0.05$) for CNI nephrotoxicity in the recipients with non-expressor allograft. The rate of rejection were comparable between the two groups.

Conclusions

Donor CYP3A5 non-expressor genotype (*3/*3) is an independent risk for CNI nephrotoxicity. The recipients with non-expressor allograft could have benefit from lowering tacrolimus level or switching to non-CNI regimens.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department: Medicine
Field of Study: Medicine
Academic Year: 2016

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความเมตตากรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และศาสตราจารย์นายแพทย์ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมของงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ที่เสียสละให้คำแนะนำเป็นอย่างดีเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยกราบขอพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หน่วย Clinical Pharmacokinetics Research Unit in Renal and Cardiovascular Diseases ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูปภาพ ..... ญ
สารบัญแผนภูมิ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 คำถามของการวิจัย 7
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective) 7
1.4 สมมติฐาน (Hypothesis) 7
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย 8
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น 8
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย 9
1.8 รูปแบบการวิจัย 10
1.9 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ 10
1.10 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations) 10
1.11 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation) 14
1.12 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected benefit and application) 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem) 14
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 20
3.1 ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology) 20
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย 22
3.3 การรวบรวมข้อมูล 31
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 31
3.5 การลงผลข้อมูล 32
บทที่ 4 ผลการวิจัย 34
4.1 ประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา 34
4.2 ผลการศึกษา 36
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 43
5.1 อภิปรายผลการวิจัย 43
5.2 ข้อดีของการศึกษา 49
5.3 ข้อจำกัดของการศึกษา 50
5.4 ข้อเสนอแนะ 51
5.5 สรุปผล 51
รายการอ้างอิง 52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ความชุกของ CYPA5 genotypes ในประชากรกลุ่มต่างๆ 5

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยในการศึกษา 35

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เป็น donor expressor และ non-expressor genotypes 37

ตารางที่ 4 Cox-regression analysis : univariate analysis..... 40

ตารางที่ 5 Cox-regression analysis : multivariate analysis..... 41

ตารางที่ 6 แสดงการกระจายตัวของ CYP3A5 genotypes ในการศึกษาปัจจุบันเปรียบเทียบกับการศึกษาใน Asians population ในอดีต..... 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1แสดงการออกฤทธิ์ของ calcineurin inhibitor ในการยับยั้ง T cell proliferation และ differentiation 1

รูปที่ 2 Acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity : isometric tubular vacuolization 3

รูปที่ 3 Acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity : thrombotic microangiopathy 4

รูปที่ 4Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity : medial hyalinosis ใน afferent arteriole 4

รูปที่ 5 Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity : interstitial fibrosis และ tubular atrophy ในลักษณะ stripe-pattern 5

รูปที่ 6 แสดงพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดพิษต่อเนื้อเยื่อไตจากยากดภูมิกลุ่มแคลซินิวริน 15

รูปที่ 7 แสดงการเมตาบิลิซึมของยาทาโครลิมุสที่ตับของผู้รับการปลูกถ่ายไตโดยอาศัยเอนไซม์ CYP3A5 และความสำคัญของการเกิด local tacrolimus clearance ของไตที่ได้รับการปลูกถ่าย..... 17

รูปที่ 8 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*1/*1 27

รูปที่ 9 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*1/*3 28

รูปที่ 10 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*3/*3 29

รูปที่ 11 ตัวอย่าง Allelic discrimination plot ของการทำ RT-PCR 30

รูปที่ 12 Kaplan-Meier Curve Survival Analysis 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 การวิเคราะห์เพื่อหา donor CYP3A5 genotypes 26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

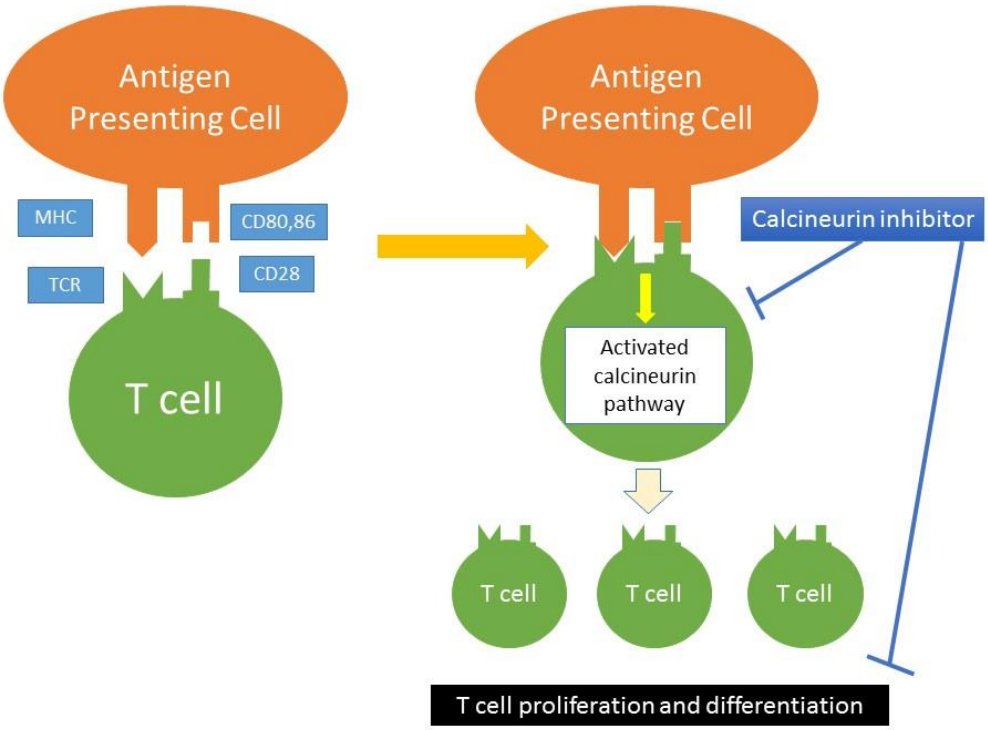
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การปลูกถ่ายไตในปัจจุบันมีความก้าวหน้าไปมากโดยเฉพาะองค์ความรู้เกี่ยวกับยากดภูมิที่ให้แก่ผู้รับไตหลังการปลูกถ่าย โดยมีจุดประสงค์เพื่อลดการเกิดภาวะสลัดไต (rejection) ให้น้อยที่สุด โดยยากดภูมิหลักที่ใช้ในปัจจุบันคือทาโครลิมุส (tacrolimus) ซึ่งเป็นยากลุ่มยับยั้งแคลซินิวริน (calcineurin inhibitor) หลังจากเริ่มมีการใช้ยาทาโครลิมุสนี้ก็ทำให้ภาวะสลัดไตน้อยลงมาก แต่อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงที่สำคัญของยานี้คือการเป็นพิษต่อเนื้อไตปลูกถ่าย (calcineurin inhibitor nephrotoxicity) มีผลให้การทำงานของไตปลูกถ่ายเสื่อมลงในระยะยาว

Calcineurin inhibitor เป็นยากดภูมิที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผ่าตัดปลูกถ่ายไตในปัจจุบัน การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าการนำ calcineurin inhibitor มาใช้ในการผ่าตัดปลูกถ่ายไตสามารถเพิ่ม graft survival และ patient survival ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยากดภูมิตัวเก่ากว่า[1] และการศึกษาเปรียบเทียบยาในกลุ่ม CNI เอง พบว่า tacrolimus มีประสิทธิภาพดีกว่า cyclosporine ทั้งในแง่ของ graft survival และ graft function[2] ดังนั้นในปัจจุบันการใช้ tacrolimus จึงเป็นการใช้ยากดภูมิมาตรฐานหลักในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไต

การออกฤทธิ์ของยา calcineurin inhibitor คือการไปยับยั้งสัญญาณที่เกิดขึ้นหลังจากมีการจับกันของ T cell receptor (TCR) และ Major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการที่ antigen presenting cell (APC) นำเสนอ antigen ให้กับ T cell และส่งผลให้เกิด T cell proliferation และ differentiation ตามมา

รูปที่ 1 แสดงการออกฤทธิ์ของ calcineurin inhibitor ในการยับยั้ง T cell proliferation และ differentiation (TCR = T cell receptor, MHC = major histocompatibility complex)



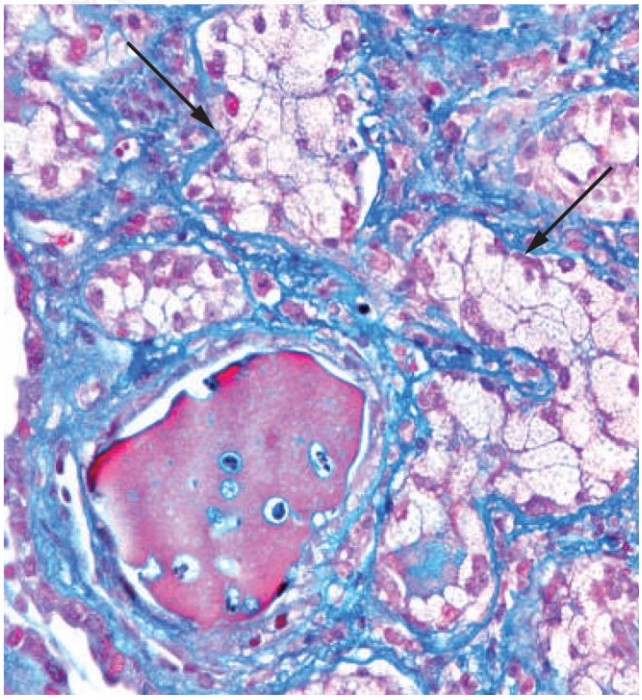
ถึงแม้ว่าผลการศึกษาจะพบว่า tacrolimus มีประสิทธิภาพที่ดีและลดการเกิด rejection ได้ แต่ก็มีผลข้างเคียงที่สำคัญคือ nephrotoxicity ซึ่งทำให้ graft function แย่ลงและมีผลต่อ long-term graft survival[3] ซึ่งปัจจัยที่เป็นความเสี่ยงทำให้เกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity มีหลายประการเช่น donor age, concurrent nephrotoxic drugs และการปรับระดับยา calcineurin inhibitors ในกระแสเลือด[4] แต่ปัจจัยที่มีผลและกำลังเป็นที่สนใจศึกษาในปัจจุบันคือ genetic polymorphism ของ cytochrome P450 ซึ่งเป็น enzyme ที่ใช้ในการ metabolism ของยาในกลุ่ม calcineurin inhibitors โดยเฉพาะ CYP3A5 ซึ่งสามารถตรวจพบได้ที่ liver และ small intestine[5]

CYP3A5 เป็น enzyme หลักที่ใช้ในการ metabolism ยา tacrolimus ซึ่งอวัยวะหลักในการทำงานจะอยู่ที่ liver และ intestine โดยมี genetic polymorphism ที่หลากหลาย ในปัจจุบันมีการค้นพบ single nucleotide polymorphism (SNPs) อย่างน้อย 11 รูปแบบ ตำแหน่งที่มีการศึกษากันมากและเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญใน tacrolimus metabolism คือตำแหน่งที่ 6986 A to G transition (CYP3A5 6986A>G) โดยมี wild type allele คือ CYP3A5*1 ซึ่งเป็น functional allele (CYP3A5 expressers) และ variant allele คือ CYP3A5*3 (non-expressers allele)[5] ประชากรที่มี CYP3A5*1 allele ไม่ว่าจะเป็น heterozygous หรือ homozygous จะมีการ

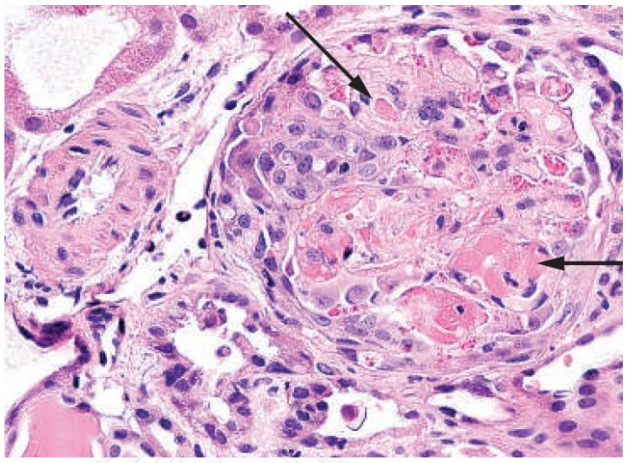
clearance ของยาที่มากกว่า ทำให้ระดับยาในกระแสเลือดจะลดลงมากกว่า therapeutic level ในขณะที่ประชากรซึ่งมี homozygous CYP3A5*3 จะมีระดับยาที่สูงกว่าเมื่อใช้ขนาดยาเท่ากัน ซึ่งอาจจะเกิดความเสี่ยงต่อการเกิด nephrotoxicity มากกว่า

CNI nephrotoxicity สามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ[4]คือ acute CNI nephrotoxicity ซึ่งมักจะเป็น vascular หรือ hemodynamic mediated ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ vasoconstrictor factors หรือเป็นจาก tubular toxicity (isometric tubular vacuolization) และอีกรูปแบบคือ chronic CNI nephrotoxicity ซึ่ง pathology มักจะมีลักษณะ fibrosis, hyalinosis และ sclerosis เป็นหลัก จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับ calcineurin inhibitor จะมีพยาธิสภาพในไตปลูกถ่ายคือ grading ของ arteriolar hyalinosis (ah), fibrointimal thickening (cv), และ interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) มากกว่าผู้ที่ไม่ได้รับยา calcineurin inhibitor อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ[6] โดยที่ chronic CNI nephrotoxicity นี้เองที่เป็นปัญหาหลักในปัจจุบัน เป็น irreversible process และทำให้ graft survival สั้นลง

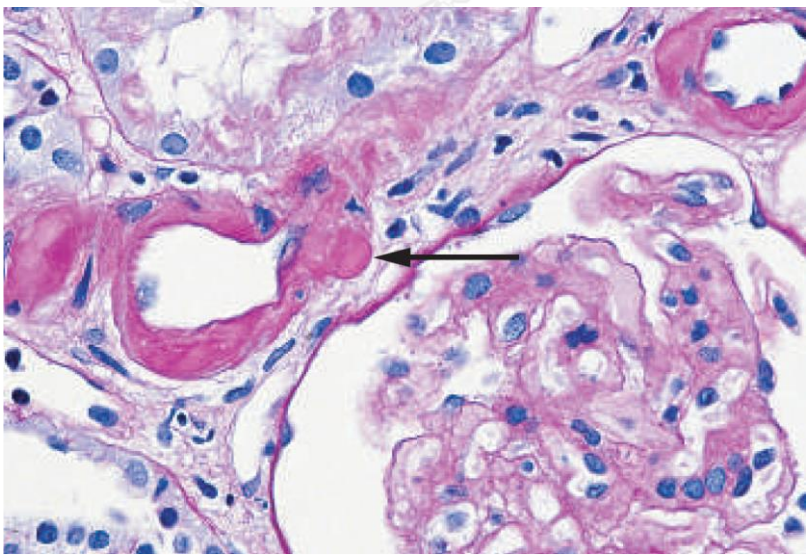
รูปที่ 2 Acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity : แสดงให้เห็นพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อไตปลูกถ่ายในผู้ป่วยที่มีลักษณะเข้าได้กับ acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่พบคือ isometric tubular vacuolization[7]



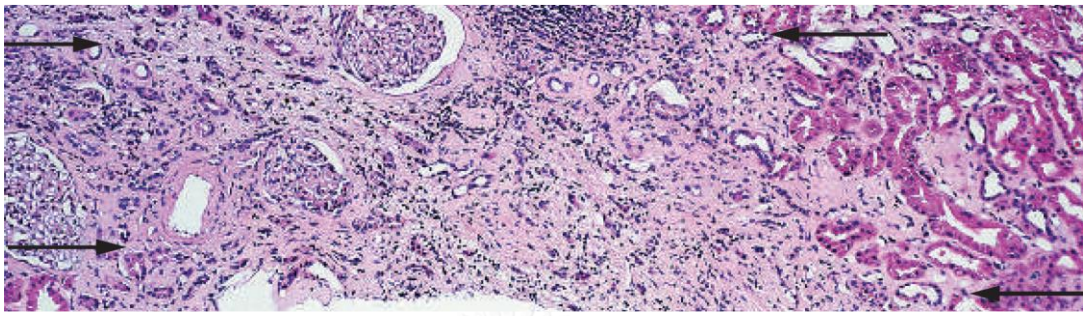
รูปที่ 3 Acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity แสดงให้เห็นถึง thrombotic microangiopathy[7]



รูปที่ 4Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity แสดงให้เห็นถึง medial hyalinosis ใน afferent arteriole[7]



รูปที่ 5 Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity แสดงให้เห็นถึง interstitial fibrosis และ tubular atrophy ในลักษณะ stripe-pattern[7]



การศึกษาในอดีตที่ผ่านมาจะเป็นการศึกษา CYP3A5 ใน recipient เป็นหลักซึ่งยืนยันทฤษฎีข้างต้นว่าในผู้ป่วยที่มี CYP3A5*1/*1 จะมีโอกาสเกิด acute rejection มากกว่าในช่วง 3 เดือนแรกหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต เนื่องจากระดับยามักจะต่ำกว่า therapeutic level ในขณะที่ผู้ป่วยที่มี CYP3A5*3/*3 ก็จะมีลักษณะ allograft histopathology ที่เข้าได้กับ calcineurin inhibitor nephrotoxicity มากกว่า[8] และมี meta-analysis ที่ยืนยันว่า recipient CYP3A5 expressers population มีโอกาสเกิด acute rejection มากกว่าจริง แต่ภาวะ acute และ chronic tacrolimus-related nephrotoxicity ไม่แตกต่างกัน[9]

อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาจะเน้นการวิเคราะห์ข้อมูลของ CYP3A5 ของ recipient เท่านั้น แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาที่มากขึ้นและพบว่าที่ kidney tissue ก็มี CYP3A5 expressers (donor CYP3A5) ได้เช่นกันโดยจะพบมากที่บริเวณ proximal tubule[10] และมีผลต่อ tacrolimus accumulation กล่าวคือในกลุ่มที่เป็น CYP3A5 expressers ก็จะมี local metabolism ของ tacrolimus ที่สูงกว่าและมีระดับยาใน proximal tubule ที่ต่ำกว่ากลุ่ม non-expressers[11] แต่การศึกษายังมีน้อยและข้อมูลเกี่ยวผลทาง clinic ของ local CYP3A5 expression ยังค่อนข้างหลากหลาย ทั้งการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการมี CYP3A5 expression ที่น้อยลงมีความสัมพันธ์กับการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity[12] และการศึกษาที่แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็น CYP3A5 expressers และ non-expressers[13] หรือแม้กระทั่งข้อมูลว่ากลุ่มที่เป็น CYP3A5 expressers จะมี nephrotoxicity มากกว่า non-expressers[14]

การศึกษาในประเทศไทยเกี่ยวกับ prevalence ของ CYP3A5 allele ต่างๆ[15]พบว่า CYP3A5*1/*1 (expressers) มีความชุก 11%, CYP3A5*1/*3 มีความชุก 40% และ

CYP3A5*3/*3 มีความชุก 49% ซึ่งมีความชุกใกล้เคียงกับการศึกษาในประเทศจีน[8,16] ซึ่งแตกต่างในกลุ่ม Caucasians ที่มีความชุกของ CYP3A5*3/*3 สูงกว่าคือประมาณ 80%[13,14] ดังนั้นในประชากรไทยอาจจะมีความเสี่ยงต่อ subtherapeutic level ของ tacrolimus มากกว่า เนื่องจากมี CYP3A5 expressers มากกว่าในประชากร Caucasians ความถี่ของ CYP3A5 genotypes แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความชุกของ CYPA5 genotypes ในประชากรกลุ่มต่างๆ[17]

เชื้อชาติ	**จำนวนประชากรในการศึกษา**	CYP3A5*1/*1 และ *1/*3	CYP3A5*3/*3
Blacks	331	280 (85%)	51 (15%)
East Asians	1214	571 (47%)	643 (53%)
Hispanics	381	232 (61%)	149 (39%)
South Asians	188	128 (68%)	60 (32%)
Caucasian-Americans	1262	224 (18%)	1038 (82%)
Caucasian-Europeans	1903	253 (13%)	1650 (87%)

ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตทุกคนจะได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตปลูกถ่ายตามระยะเวลาที่กำหนด (protocol biopsy) ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์, 1 เดือน, 6 เดือน และ 1 ปีหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต เนื่องจากมีหลักฐานสนับสนุนการเจาะไตตามระยะเวลา surveillance ดังกล่าว[18,19] จะสามารถ early detect ความผิดปกติของไตปลูกถ่ายได้อย่างรวดเร็ว

เช่น subclinical rejection ทำให้สามารถให้การรักษาได้ทันก่อนที่จะมีอาการแสดงให้เห็นทางคลินิกและอาจจะส่งผลต่อ allograft survival

งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษา local metabolism ของ tacrolimus บริเวณ tissue ของ kidney allograft ซึ่งถูก regulate โดย tissue (donor) CYP3A5 ว่าน่าจะมีผลต่อ kidney allograft เช่นเดียวกับการศึกษาโดยการวิเคราะห์ recipient CYP3A5

1.2 **คำถามของการวิจัย**

คำถามหลัก (primary research question)

CYP3A5 genotype ของ kidney transplant donor มีผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตหรือไม่

คำถามรอง (secondary research question)

CYP3A5 genotype ของ kidney transplant donor มีผลต่อการทำงานของไตที่ 6 เดือน หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตหรือไม่

CYP3A5 genotype ของ kidney transplant donor มีผลต่อการเกิด acute rejection หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตหรือไม่

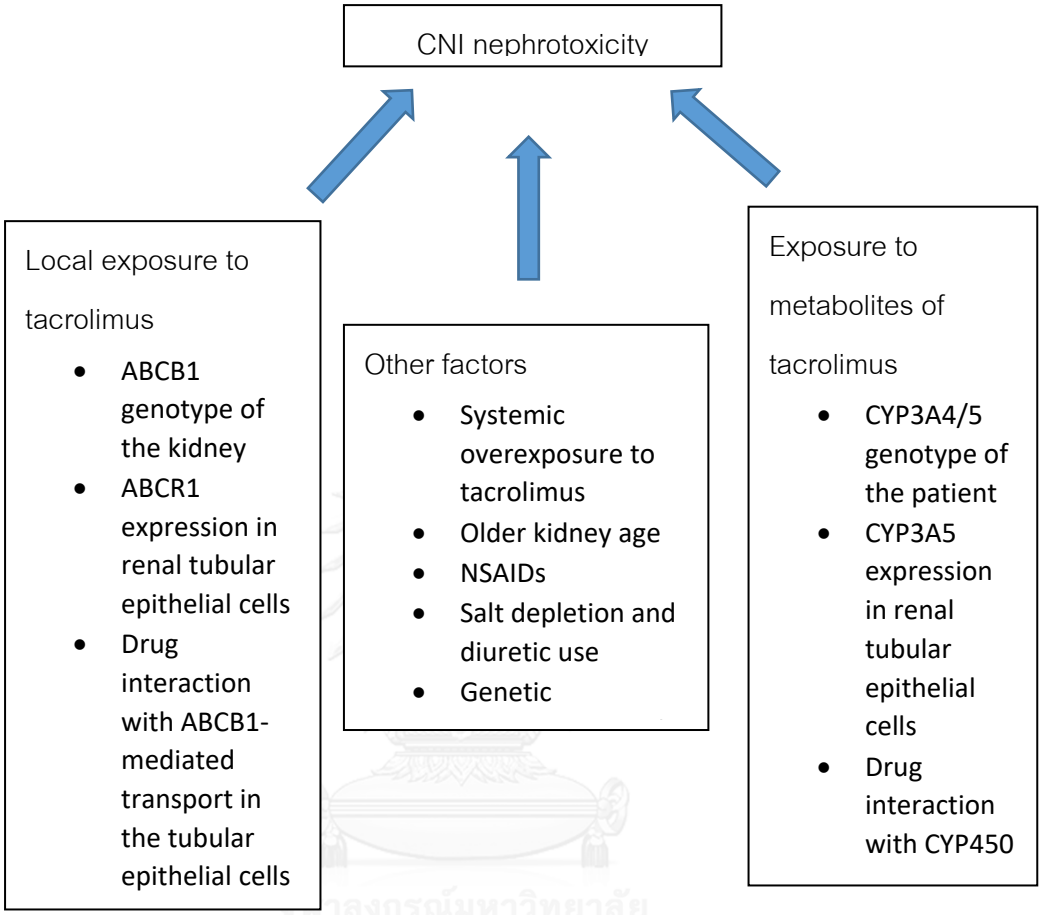
1.3 **วัตถุประสงค์ของการวิจัย** (Objective)

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง genotype ของ donor (allograft) CYP3A5 expression และผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity ในเนื้อไตปลูกถ่าย
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง genotype ของ donor (allograft) CYP3A5 expression และผลต่อ graft function โดยประเมินจาก estimated GFR และ rejection rate

1.4 **สมมติฐาน** (Hypothesis)

ผู้ป่วยที่มี allograft CYP3A5 expression (CYP3A5*1/*1 และ CYP3A5*1/*3) จะมี local clearance ของยา tacrolimus ที่บริเวณ kidney allograft ได้มากกว่ากลุ่มที่เป็น CYP3A5 non-expressor (CYP3A5*3/*3) ทำให้มีโอกาสเกิด nephrotoxicity น้อยกว่าและมี graft function ที่ดีกว่า

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

ในผู้รับบริจาคจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต ชิ้นเนื้อที่จะมาทำการวิเคราะห์ DNA เพื่อหา genetic polymorphism ของ CYP3A5 จะเป็นชิ้นเนื้อจากการทำ renal allograft biopsy ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และชิ้นเนื้อที่นำมิเคราะห์ต้องมีเนื้อเยื่อของ renal tubular cells อยู่ด้วย เพื่อให้สามารถสกัด DNA ออกมาจาก renal tubular epithelium cell ออกมาได้

ในผู้ที่รับบริจาคจากผู้บริจาคไตที่ยังมีชีวิต (living donor) จะเจาะเลือดผู้บริจาคเพื่อนำไปวิเคราะห์ CYP3A5 genotype ต่อไป

ยากดภูมิที่ใช้ในผู้ที่เข้ารับการวิจัยต้องมีทาโครลิมุสเป็นยากดภูมิหลัก และรับประทานคู่กับ mycophenolate เท่านั้น โดยต้องไม่มียาอื่นๆที่มารบกวนการทำงานของ CYP3A5

ผู้ป่วยทุกคนต้องเคยได้รับการทำการเจาะชิ้นเนื้อไตอย่างน้อย 1 ครั้งตาม protocol surveillance biopsy ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย

- CYP3A5 polymorphism หมายถึงความหลากหลายของการแสดงออกของ gene ที่ควบคุมการทำงานของ enzyme CYP3A5 โดยแบ่งได้เป็น 2 phenotype คือ expressors (CYP3A5*1/*1 และ CYP3A5*1/*3) และ non-expressors (CYP3A5*3/*3)
- Calcineurin inhibitor คือยาที่ใช้ในการกดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยออกฤทธิ์หลักคือการยับยั้งการทำงานของ T lymphocyte และมีผลข้างเคียงที่สำคัญคือ nephrotoxicity
- Tacrolimus เป็นยากดภูมิในกลุ่ม calcineurin inhibitor ที่เป็นเป้าหมายในการศึกษานี้
- Kidney allograft function เป็นการประเมินการทำงานของไตปลูกถ่ายโดยวัดจาก estimated glomerular filtration rate (Thai eGFR equation)
- Kidney allograft rejection คือการเกิดการสลัดไตปลูกถ่าย เกิดจากการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้รับไตบริจาคที่มากเกินไปหรือเป็นจากระดับยากดภูมิไม่เพียงพอส่งผลให้มีการสร้าง antibody และ mediator ต่างๆทำลายเนื้อไตปลูกถ่าย
- การเจาะชิ้นเนื้อไตปลูกถ่าย (surveillance protocol biopsy) ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะทำในเดือนที่ 1, 6, 12, 24, 48 และ 36 หลังการปลูกถ่าย โดยหากมีอาการเปลี่ยนแปลงหรือมีค่าการทำงานของไตที่ผิดปกติอาจจะได้รับการเจาะชิ้นเนื้อตรวจเพิ่มเติม

1.8 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงสังเกตแบบมีกลุ่มเปรียบเทียบ โดยสืบค้นข้อมูลชิ้นเนื้อที่เคยทำไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และนำเลือดของผู้บริจาคที่ยังมีชีวิต (living donor) ไปศึกษา CYP3A5 genotype แล้วเปรียบเทียบกับ outcome ต่างๆ (retrospective cohort study)

1.9 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ผู้ป่วยที่มารับการตรวจติดตามหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุกนำเข้าการศึกษาโดยคัดเลือกเฉพาะผู้ที่รับประทานยาทาโครลิมุสคู่กับไมโคฟีโนเลตเป็นยากดภูมิหลักเท่านั้น โดยจะมีการตรวจหาจีโนไทป์ของผู้บริจาคไตโดยการทำ DNA extraction จากในเลือดหรือในชิ้นเนื้อที่รับการเจาะตรวจตามมาตรฐานการดูแลผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ หลังจากนั้นจะทำการหา CYP3A5 genotype โดยการทำ real-time polymerase chain reaction เมื่อได้ชนิดของ CYP3A5 แล้วก็จะตรวจตามผลที่ต้องการศึกษาคือการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity (CNI nephrotoxicity) ระหว่างกลุ่ม expressor และ non-expressor genotypes ซึ่งการวินิจฉัย CNI nephrotoxicity นี้จะยึดตามการวินิจฉัยของพยาธิแพทย์เป็นหลัก นอกจากนั้นจะพิจารณาเป้าหมายรองอื่นๆคือ การทำงานของไตที่ 6 เดือน และการเกิดภาวะสลัดไตในผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด

1.10 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

หลักการเคารพบุคคล มีการขออนุญาตผู้ป่วยในการนำข้อมูลไปใช้ในการวิจัย โดยไม่มีผลต่อการรักษา ผู้เข้าร่วมวิจัยทุกคนจะได้รับข้อมูลอย่างละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ สามารถซักถามรายละเอียดได้ทั้งหมด และข้อมูลที่นำไปใช้จะถูกเก็บเป็นความลับและใส่รหัสความปลอดภัยซึ่งมีเฉพาะผู้วิจัยที่เข้าถึงได้ ผู้เข้าร่วมวิจัยทุกคนสามารถบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้โดยไม่มีเงื่อนไข

หลักผลประโยชน์ ยึดถือผลประโยชน์ผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นสำคัญ ความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นน้อยมาก เนื่องจากเป็นการเก็บข้อมูลย้อนหลังจากผลชิ้นเนื้อโดยไม่มีผลต่อการดูแลรักษาตามมาตรฐานการดูแลผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

หลักยุติธรรม ปฏิบัติต่อผู้เข้าร่วมวิจัยทุกคนอย่างเท่าเทียมและเสมอภาคกัน การคัดผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยมีเกณฑ์คัดเข้าและออกอย่างชัดเจนไม่มีการแบ่งชนชั้นหรือปัจจัยอื่นใด ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยจะถูกนำไปเผยแพร่อย่างสาธารณะและทุกคนเข้าถึงได้ต่อไป

งานวิจัยนี้ต้องได้รับการอนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) ตามหลักของ International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) โดยผู้เข้าร่วมการวิจัยทุกคนจะได้รับข้อมูลตามเอกสารตัวอย่างดังแสดงและหากพร้อมเข้าร่วมการศึกษานี้ก็ลงชื่อกำกับไว้ที่ส่วนท้ายของใบแสดงข้อมูล

ตัวอย่างข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพีสามเอห้าของผู้บริจาคไตและการเกิดผลข้างเคียงต่อไตบริจาคจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวริน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

แพทย์ผู้ทำวิจัย นายแพทย์สุวศิน อุดมกาญจนนันท์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย

หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วัตุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดผลข้างเคียงจากยากดภูมิแคลซินิวรินและลักษณะทางพันธุกรรมของผู้บริจาคไตในการเมตาบอลิซึมของยา

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

สำหรับผู้รับบริจาคไต จะได้รับการซักประวัติและตรวจร่างกายอย่างละเอียด โดยจะได้รับการรักษาทุกอย่างเป็นไปตามขั้นตอนมาตรฐาน ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตตามระยะเวลาที่กำหนดตามมาตรฐานการรักษาในปัจจุบัน โดยหลังจากอ่านผลแล้วทางผู้วิจัยจะขออนุญาตนำชิ้นเนื้อจากการเจาะไตไปตรวจเพิ่มเติมเพื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

CYP3A5 ในชิ้นเนื้อไตบริจาค จะไม่มีการเจาะชิ้นเนื้อไตหรือเจาะเลือดเพิ่มใดๆนอกเหนือจากการเจาะตามมาตรฐานข้างต้น

สำหรับผู้บริจาคไตที่มีชีวิต (living-donor) ที่บริจาคในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะได้รับการนัดหมายมาเพื่อซักประวัติและตรวจร่างกายตามมาตรฐานปกติ และเจาะเลือดเป็นระยะเพื่อติดตามค่าการทำงานของไตและผลเลือดต่างๆที่เกี่ยวข้องทุก 3-6 เดือนตามปกติ โดยทางผู้วิจัยจะขออนุญาตแบ่งเลือดที่เจาะใส่ EDTA tube เพื่อทำการวิเคราะห์ complete blood count ปริมาณ 3 ซีซี ไปทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อตรวจการแสดงออกของยีน CYP3A5 จะไม่มีการเจาะเลือดใดๆเพิ่มเติมมากไปกว่าการเจาะตามมาตรฐานข้างต้น

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ และเพื่อให้ผลของผ่าตัดปลูกถ่ายไตมีประสิทธิภาพสูงสุดแก่ท่าน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะได้รับความร่วมมือจากท่านโดยปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมแพทย์และพยาบาลหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตอย่างเคร่งครัด และหากมีข้อสงสัยหรือมีอาการผิดปกติใดๆขอให้รีบแจ้งทางทีมแพทย์และพยาบาลทันที

ความเสี่ยงที่อาจจะได้รับ

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพิ่มจากชิ้นเนื้อหรือเลือดที่ได้รับการเจาะโดยมาตรฐานการรักษาปกติอยู่แล้ว จึงไม่มีความเสี่ยงใดๆเพิ่มเติมที่จะเกิดขึ้นกับผู้เข้าร่วมการวิจัย

ประโยชน์ที่พึงได้รับ

ท่านจะได้รับการดูแลจากทีมแพทย์และพยาบาลหลังการผ่าตัดตามมาตรฐาน มีการนัดตรวจติดตามอย่างใกล้ชิด ได้รับการวิเคราะห์ข้อมูลผลเลือดและชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วตามมาตรฐานการรักษาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาแต่อย่างใด

ขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ตัวอย่างหนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพีสามเอห้าของผู้บริจาคไตและการเกิดผลข้างเคียงต่อไตบริจาคจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวริน (Association of Donor CYP3A5 Genotype and Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Kidney Transplanted Recipient)

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว..... ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมา และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการทำวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัยโดยการเจาะเลือดเพิ่ม 3 ซีซี อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นได้จากการวิจัย รวมถึงประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยโดยละเอียด โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆจากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ข้าพเจ้าตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกใสคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตเท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่.....

.....ลงนามผู้วิจัย

(.....) ชื่อผู้วิจัยตัวบรรจง

วันที่.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยานตัวบรรจง

วันที่.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.11 **ข้อจำกัดทางการวิจัย** (Limitation)

เนื่องจากการวิจัยนี้ส่วนหนึ่งจะเป็นการศึกษาชิ้นเนื้อไตจากการทำ allograft biopsy และเก็บไว้ในรูปของ paraffin block ดังนั้นอาจจะมีข้อจำกัดทางด้านปริมาณของชิ้นเนื้อที่จะสามารถนำมาศึกษาได้ซึ่งอาจจะมีค่อนข้างน้อย หรือหากชิ้นเนื้อนั้นไม่มี renal tubular epithelial cell อยู่ก็ไม่สามารถทำการสกัด DNA ได้

1.12 **ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย** (Expected benefit and application)

เพื่อให้มีข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยด้าน pharmacogenomics ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการใช้ยา tacrolimus ซึ่งเป็นยากดภูมิหลักที่ใช้ในการปลูกถ่ายไตในปัจจุบัน ในอนาคตหาก CYP3A5 polymorphism ของ donor kidney tissue มีผลจริงต่อการเกิด CNI nephrotoxicity จะสามารถ identify ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด CNI nephrotoxicity ได้ และสามารถระมัดระวังในการปรับระดับยาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมแตกต่างกันตาม donor CYP3A5 expression ของแต่ละคนต่อไปโดยที่ยังสามารถคงระดับยาที่มีฤทธิ์ต่อต้านการสลัดไต (acute rejection) ไว้ได้อยู่

1.13 **อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข** (Obstacles and strategies to solve the problem)

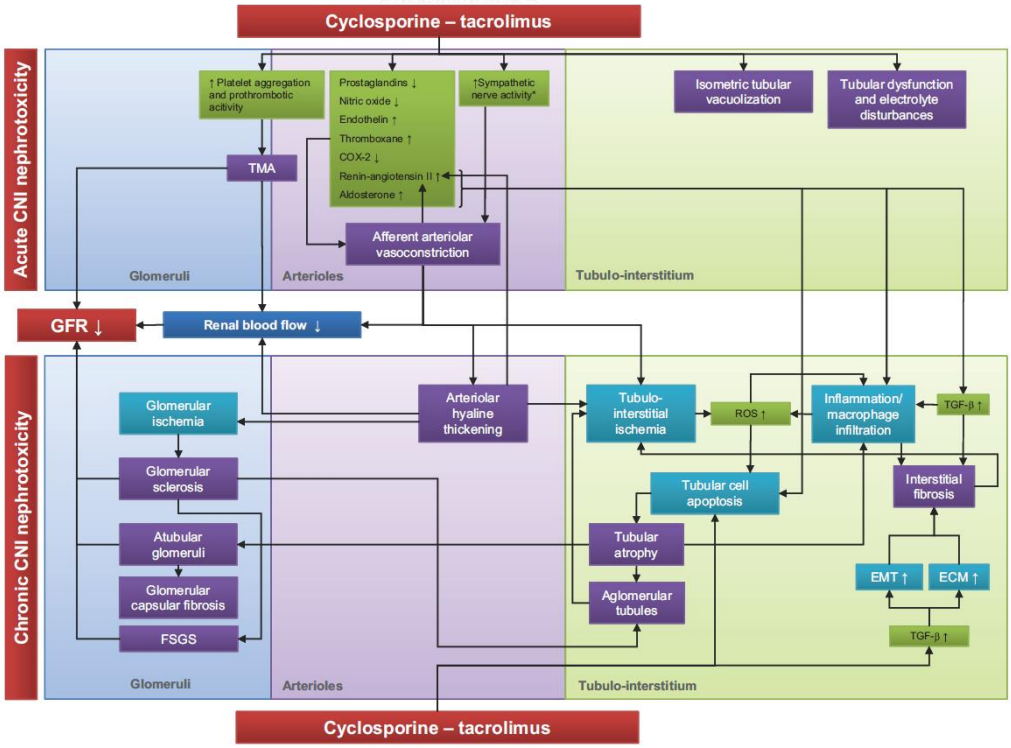
เนื่องจากผลชิ้นเนื้อในผู้ป่วยบางรายอาจจะได้หลายส่วนและบางบริเวณอาจจะไม่ได้ตำแหน่งที่มี renal tubular cell ซึ่งเป็นบริเวณที่ต้องการศึกษา CYP3A5 expression วิธีแก้ไขคือพยายามระบุตำแหน่งที่มี renal tubular cell คือ cortex ของ kidney tissue ก่อนจากการดูกล้องจุลทรรศน์เพื่อนำบริเวณนั้นมาใช้ในการศึกษา นอกจากนั้นในชิ้นเนื้อไตที่เจาะมาต้องการศึกษา CYP3A5 expression ของ donor (allograft) แต่บางครั้งอาจจะมีเซลที่ปนเปื้อนจาก recipient มาด้วยเช่น หรือเม็ดเลือดขาวและอาจจะทำให้การแปลผลการวิเคราะห์ genotype ผิดพลาดได้ ซึ่งแนวทางแก้ไขที่สามารถทำได้คือหาบริเวณที่ contaminated จาก recipient cell (leukocytes) ให้น้อยที่สุดและตัดเฉพาะบริเวณนั้นๆไปทำการศึกษา

การวินิจฉัยภาวะ CNI nephrotoxicity ในปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์ที่ใช้กันอย่างเป็นมาตรฐาน โดยอาศัยลักษณะต่างๆที่เห็นในชิ้นเนื้อมาประกอบกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จะอ้างอิงการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1 ท่าน เพื่อลด interobserver variability ให้น้อยที่สุด

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ยากลุ่มยับยั้งแคลซินิวริน (calcineurin inhibitor) ถูกนำเข้ามาใช้เป็นยากดภูมิครั้งแรกในการปลูกถ่ายอวัยวะเมื่อปีพ.ศ. 2526[3] หลังจากที่มีการนำยากลุ่มนี้เข้ามาเป็นยากดภูมิหลักก็สามารถลดอัตราการเกิดภาวะไตปลูกถ่ายล้มเหลวในช่วง 1 ปีแรกหลังการปลูกถ่ายได้เป็นอย่างดี ซึ่งเป็นผลหลักๆมากจากการที่สามารถลดอัตราการสลัดไต (rejection) ได้มาก อย่างไรก็ตามอัตราการสูญเสียการทำงานของไตปลูกถ่ายในระยะยาวยังคงมีอยู่มาก เมื่อติดตามไปเป็นระยะเวลานานมากขึ้นจะพบลักษณะพยาธิสภาพในเนื้อไตปลูกถ่ายที่มีความเสื่อมอย่างเรื้อรังเพิ่มมากขึ้นตามเวลาหลังการปลูกถ่ายไตที่ยาวนานขึ้น[20] ซึ่งส่วนหนึ่งสามารถอธิบายได้จากภาวะความเป็นพิษเรื้อรังต่อเนื้อไตของยากดภูมิกลุ่มยับยั้งแคลซินิวริน (calcineurin inhibitor nephrotoxicity) ที่ใช้เป็นยากดภูมิหลักในปัจจุบัน โดยมีพยาธิวิทยาของการเกิดภาวะพิษต่อไตของยากลุ่มแคลซินิวรินตามรูปที่ 6

รูปที่ 6 แสดงพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดพิษต่อเนื้อเยื่อไตจากยากดภูมิกลุ่มแคลซินิวริน[4]

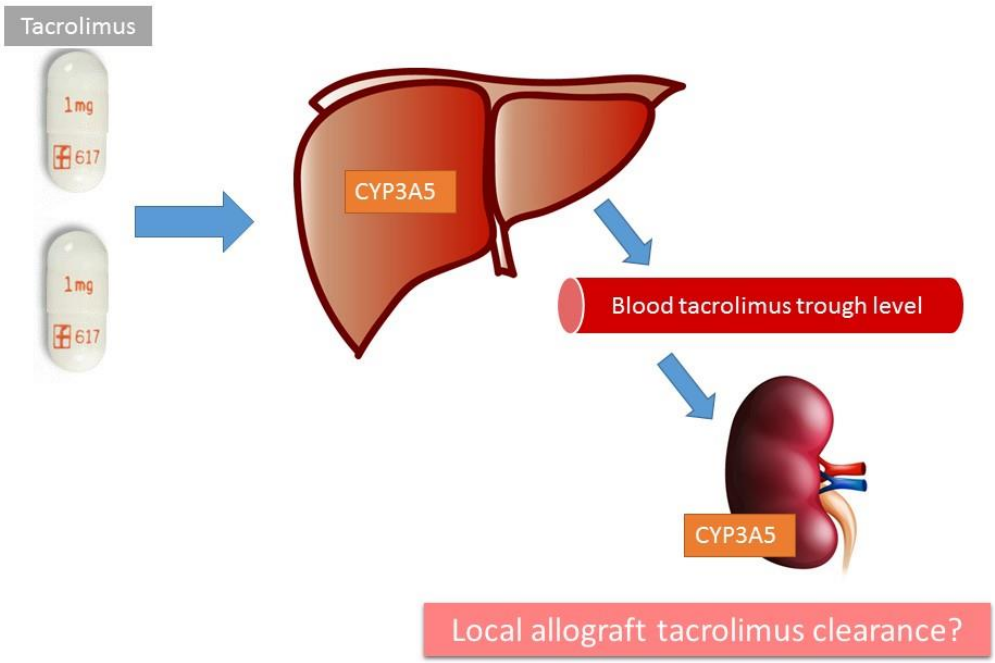


เมื่อรับประทานยาทาโครลิมุส (tacrolimus) ซึ่งเป็นยากลุ่มยับยั้งแคลซินิวรินที่ใช้มากที่สุดในปัจจุบัน เข้าไปในร่างกายก็จะถูกดูดซึมที่ลำไส้ผ่าน first pass metabolism ที่ตับ (ลำไส้ที่ดูดซึมยาทาโครลิมัสเองก็มี first pass metabolism เช่นเดียวกัน) โดยที่ตับนั้นมี enzyme สำคัญที่ใช้ในการเมตาบอลิซึมยาคือ cytochrome P40 subfamily 3A5 (CYP3A5) ซึ่งหลังจากการเมตาบอลิซึมยาที่ liver CYP3A5 แล้วก็จะผ่านเข้ามาสู่ในกระแสเลือด[21]ซึ่งแพทย์จะตรวจวัดระดับยาทาโครลิมุสในกระแสเลือดนี้ต่อไปเพื่อปรับขนาดยาให้เหมาะสมโดยหวังผมให้ลดภาวะการเกิด lymphocyte sensitization และลดการเกิดภาวะการสลัดไตให้น้อยที่สุด โดยตามการศึกษาที่มีหลักฐานชัดเจนที่สุดในปัจจุบันนั้นระดับของยาทาโครลิมุสที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดภาวะสลัดไต (โดยที่ไม่มากเกินไปจนทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย) คือ trough concentration 3-7 ng/mL[22]

ปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระดับของยาทาโครลิมุสในเลือดของผู้รับบริจาคไตคือ enzyme CYP3A5 ที่อยู่บริเวณตับของผู้รับบริจาค โดยจะมี genotype ของ CYP3A5 ที่พบในปัจจุบันคือ CYP3A5*1/*1, CYP3A5*1/*3 และ CYP3A5*3/*3 และสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ CYP3A5*1/*3) และ non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) โดยที่มีการกระจายของ genotypes ที่แตกต่างกันในกลุ่มประชากรที่ต่างกัน กล่าวคือในกลุ่ม Caucasian จะมี non-expressor genotype ประมาณ 80 เปอร์เซนต์แต่ใน Asian จะมี non-expressor 50 เปอร์เซนต์[17,23]

การศึกษาในอดีตที่ผ่านมาแสดงถึงความสัมพันธ์ของ CYP3A5 genotype ของ recipient ว่ามีผลโดยตรงต่อระดับยาทาโครลิมุสในกระแสเลือดคือผู้ที่มี non-expressor genotype จะมีการเมตาบอลิซึมและการสลายยาช้ากว่าผู้ที่เป็น expressor genotype ทำให้ผู้ที่เป็น non-expressor genotype นั้นมีระดับยาในกระแสเลือดที่สูงกว่าเมื่อได้ทาโครลิมุสขนาดเท่ากัน[24]
ปัจจุบันนี้มีการตรวจพบว่านอกจาก CYP3A5 จะมีการแสดงออกที่ตับแล้วยังมีการแสดงออกของเอนไซม์นี้ที่ไตอีกด้วย[14] ซึ่งก็สามารถเมตาบอลิซึมยาทาโครลิมุสให้กลายเป็น inactive metabolites (13-O-desmethyl tacrolimus) ได้ ซึ่งในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตนี้ก็จะมีโอกาสที่จะได้รับ allograft ที่มี CYP3A5 expression ที่แตกต่างจาก CYP3A5 genotype ที่แสดงออกอยู่ในตับของตนเอง แต่อย่างไรก็ตามผลของ donor CYP3A5 genotype หรือ allograft genotype ต่อการปลูกถ่ายไตนั้นยังมีการศึกษาน้อยและยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน การเมตาบอลิซึมของยาทาโครลิมุสโดยการอาศัยเอนไซม์ CYP3A5 ที่ตับของผู้รับบริจาคและคำถามที่สนใจในการวิจัยนี้เกี่ยวกับการเกิด local tacrolimus metabolism ที่เนื้อไตปลูกถ่ายดังรูปที่ 7

รูปที่ 7 แสดงการเมตาบิลิซึมของยาทาโครลิมุสที่ตับของผู้รับการปลูกถ่ายไตโดยอาศัยเอนไซม์ CYP3A5 ซึ่งสามารถวัดระดับยาทาโครลิมุสออกมาเพื่อปรับให้อยู่ใน therapeutic window และความสำคัญของการเกิด local tacrolimus clearance ของไตที่ได้รับการปลูกถ่าย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาที่เกี่ยวกับ donor CYP3A5 นี้จากการทบทวนบทความในวารสารต่างๆพบว่ามีอยู่ 3 การศึกษาดังจะกล่าวต่อไป

Joy และคณะได้ศึกษาผลของการมี CYP3A5 expression ใน kidney allograft [12] ในปี พ.ศ. 2550 โดยวิธี immunohistochemistry พบว่า

- ในผู้ป่วยที่มี CNI nephrotoxic 29 คน ตรวจพบว่า allograft CYP3A5 expression ที่ proximal tubule 62% ซึ่งมีน้อยกว่ากลุ่ม control (100%) อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.0012)
- ที่บริเวณ distal tubule ในผู้ป่วยที่มี CNI nephrotoxicity พบ CYP3A5 expression 58% น้อยกว่ากลุ่ม control คือ 83% อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.0470)

- จากการศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานความสัมพันธ์ระหว่าง CYP3A5 expression ที่ลดลงใน donor kidney และการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity

ในปี 2554 Glowacki และคณะ ได้ตีพิมพ์การศึกษาผลของ CYP3A5 polymorphisms จากการทำ genotyping จาก peripheral blood lymphocyte ใน donor และ recipient ต่อขนาดของยา tacrolimus ที่ต้องใช้และ clinical outcome[13]

- ศึกษาในผู้ป่วยชาวฝรั่งเศสที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไต 209 คน
- พบว่า recipient CYP3A5*3/*3 สัมพันธ์กับระดับยา tacrolimus ในเลือดที่สูงกว่าเมื่อใช้ขนาดยาเท่ากัน (C0/daily dose) เปรียบเทียบกับ recipient ที่มี CYP3A5*1/*1 หรือ CYP3A5*1/*3 อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ
- ในขณะที่ donor CY3A5 ไม่มีความสัมพันธ์ใดๆกับระดับ tacrolimus ที่วัดได้ในกระแสเลือด
- เมื่อพิจารณาจาก allograft outcome พบว่า donor CYP3A5 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด delayed graft function, acute rejection, CNI nephrotoxicity และ eGFR ที่ 2 ปี แต่ recipient CYP3A5*3/*3 มีโอกาสหยุดยา tacrolimus จากการเกิด nephrotoxicity ต่ำกว่า
- ทั้ง donor และ recipient CYP3A5 ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทาง histopathology ทั้ง acute และ chronic CNI nephrotoxicity ของ allograft biopsy
- โดยสรุปจากการศึกษานี้เป็น negative study ของ CYP3A5 expression ทั้งจาก donor และ recipient tissue ไม่มีผลต่อลักษณะทางพยาธิของไตปลูกถ่าย และไม่มีผลต่อ clinical outcome

ในปี 2554 Metalidis และคณะได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง CYP3A5 expression ใน renal allograft โดยการใช้ immunohistochemistry และการเกิด histological sins of CNI nephrotoxicity[14] พบว่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- สามารถย้อมติด CYP3A5 expression ได้จาก apical membrane ของ proximal และ distal tubule
- ในกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity จะย้อมติด CYP3A5 ที่บริเวณ apical membrane ของ proximal tubule มากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยะสำคัญทางสถิติ
- ในทางตรงกันข้ามที่บริเวณ apical membrane ของ distal tubule จะย้อมติด CYP3A5 ได้มากกว่าอย่างมีนัยะสำคัญในกลุ่ม control เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity
- การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าการมี CYP3A5 expression ที่บริเวณ renal tubules อาจจะไม่ได้เป็น protective factor ต่อการเกิด CNI nephrotoxicity เนื่องจาก metabolites ที่เกิดจากการ metabolism ของ tacrolimus โดย CYP3A5 อาจจะเป็นสิ่งที่มี toxic ต่อ renal tubules

กล่าวโดยสรุปจากการทบทวนงานวิจัยในอดีตนั้นยังมีความแตกต่างของผลการศึกษาและวิธีที่ใช้ในการตรวจ allograft CYP3A5 อยู่มาก โดยมีทั้งวิธีการย้อม immunohistochemistry หรือการทำ DNA analysis โครงการวิจัยนี้จึงต้องการจะนำสนอความสัมพันธ์ของ allograft CYP3A5 genotype (โดยการทำ DNA analysis) กับผลที่เกิดขึ้นโดยตรงต่อเนื้อไตปลูกถ่ายคือการเป็นพิษจากยากดภูมิกลุ่มแคลซินิวริน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. อายุของผู้เข้าร่วมการศึกษา 15 – 70 ปีขณะที่ทำการปลูกถ่ายไต
3. ได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตปลูกถ่ายอย่างน้อย 1 ครั้งที่ระยะเวลา 6 เดือนถึง 1 ปีแรกหลังจากการปลูกถ่าย
4. ได้รับยากดภูมิกลุ่ม calcineurin inhibitor เป็น twice-daily tacrolimus คู่กับยา mycophenolate เป็นยากดภูมิหลักหลังการปลูกถ่ายไต
5. ผู้เข้าร่วมการศึกษาต้องยินยอมให้เจาะชิ้นเนื้อไตและข้อมูลทางคลินิก

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ชิ้นเนื้อไตปลูกถ่ายที่เจาะมาไม่มี renal tubular cell (inadequate specimen)
2. ผู้ที่ได้รับยาอื่นที่เป็น CYP3A5 inducer หรือ inhibitor เป็นระยะเวลานานเกิน 1 เดือนติดต่อกัน
3. ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายหลายอวัยวะในครั้งเดียวกัน
4. ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตมากกว่า 1 ครั้ง

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sample techniques)

สืบค้นและเก็บข้อมูลผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตและมาตรวจที่คลินิกปลูกถ่ายไตระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2555 ถึง 1 มกราคม 2560

ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ใช้วิธีการคำนวณขนาดตัวอย่างโดยสูตรหาความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยมีประชากร 2 กลุ่ม อ้างอิงจากการศึกษาของ Joy และคณะ[12] คือกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity และกลุ่ม control (ไม่มี histopathology ที่เข้าได้กับ CNI nephrotoxicity) เพื่อดูความสัมพันธ์กับการมี CYP3A5 expression หรือไม่

$$\text{N (per group)} = \frac{[Z\alpha_{/2}\sqrt{2P(1-P)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1)+ p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1-p_2)^2}$$

เมื่อ α = 0.05

β = 0.10

$Z\alpha_{/2} = Z_{0.05/2}$ = 1.96 (two tail)

$Z_{\beta} = Z_{0.10}$ = 1.28

และจากการศึกษาของ Joy และคณะ[12] พบว่า

p_1 = อัตราการตรวจพบ CNI nephrotoxicity ในผู้ที่มี donor CYP3A5 expression = 0.62

p_2 = อัตราการตรวจพบ CNI nephrotoxicity ในผู้ที่ไม่มี donor CYP3A5 expression = 1.00

$$P = \frac{p_1+ p_2}{2} = 0.81$$

ดังนั้น N (per group) =

$$\frac{[1.96\sqrt{2(0.81)(1-0.81)} + 1.28\sqrt{0.62(1-0.62)+ 1(1-1)}]^2}{(0.62-1)^2}$$

= 20.9 คน = ประมาณ 21 คนต่อกลุ่ม

การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

ตัวแปรอิสระคือ การมี donor CYP3A5 expressor (*1/*1 และ *1/*3) หรือ donor CYP3A5 non-expressor (*3/*3)

ตัวแปรตามคือ การเกิด CNI nephrotoxicity ใน kidney allograft

ตัวแปรควบคุมคือ ยากดภูมิที่ใช้ต้องเป็นยากลุ่มยับยั้งแคลซินิวรินคือทาโครลิมุสควบคู่กับยากลุ่ม mycophenolate, การปรับระดับยาในกระแสเลือดต้องอยู่ใน therapeutic window ของทาโครลิมุสคือ trough concentration 3-7 ng/mL, การได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตตาม protocol surveillance biopsy หรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางคลินิก, ยาอื่นๆที่จะมีผลต่อ CYP3A5, ต้องเป็นผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตเป็นครั้งแรกเท่านั้น, ต้องไม่ใช่ผู้ที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายหลายอวัยวะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

1. ผู้ที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จะได้รับการตรวจติดตามที่คลินิกปลูกถ่ายไตเป็นผู้ป่วยนอก
2. คัดเลือกผู้ป่วยที่มาตรวจที่คลินิกผู้ป่วยนอกข้างต้นทุกคนเข้าสู่โครงการวิจัย อาศัยเกณฑ์คัดเลือกผู้ป่วยเข้าหรือออกจากการศึกษาตามที่แสดงไว้ก่อนหน้านี้ โดยการเข้าร่วมนั้นต้องเป็นไปตามความสมัครใจและผู้ป่วยทุกคนต้องได้รับข้อมูลเกี่ยวกับโครงการวิจัยโดยละเอียดก่อนที่จะลงชื่อยินยอมเข้าร่วมการวิจัย
3. ทำการสกัด DNA โดยใช้ Invitrogen™ kits เพื่อนำไปวิเคราะห์ CYP3A5 genotype ของ donor ในผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย โดยมีขั้นตอนการสกัด DNA คือ
   3.1. หากเป็นผู้รับบริจาคจากผู้เสียชีวิตจะทำการวิเคราะห์ CYP3A5 genotype โดย DNA extraction จากชิ้นเนื้อที่ได้รับจากการเจาะไตตาม protocol surveillance biopsy และคัดเลือกชิ้นเนื้อที่ต้องการจากหน่วยพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
      3.1.1. นำชิ้นเนื้อ paraffin block ที่ได้จากการเจาะไตมาทำการสกัด DNA
      3.1.2. ตั้ง water bath ที่ 37°c และ 50°c ตามลำดับ
      3.1.3. ตัดชิ้นเนื้อ (น้ำหนักไม่เกิน 20 mg) ใส่ใน 1.5 ml sterile tube
      3.1.4. เติม xylene 1ml และ vortex
      3.1.5. Centrifuge 16,000 g นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
      3.1.6. ดูดส่วนใส (supernatant) ออก
      3.1.7. เติม 100% ethanol 1 ml แล้ว vortex หลังจากนั้น centrifuge เพื่อนำ supernatant ออก
      3.1.8. ล้างด้วย xylene และ 100% ethanol อีก 2 ครั้ง ตามลำดับ
      3.1.9. Incubate 37°c นาน 5-10 นาที จนกว่า ethanol จะระเหยหมด
      3.1.10. เติม Digestion buffer 180 μL และ proteinase K 20 μL แล้ว vortex

3.1.11. Incubate 50°c overnight หลังจากนั้น centrifuge 16,000 g นาน 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3.1.12. เติม RNAase 20 μL mix แล้ว vortex ทิ้งไว้ 2 นาที

3.1.13. เติม genomic lysis/binding buffer 200 μL mix แล้ว vortex

3.1.14. เติม 100% ethanol 200 μL mix แล้ว vortex

3.1.15. ดูดน้ำส่วนที่เป็นสีเขียวทั้งหมด (640 μL)ใส่ spin column ส่วนบนแล้ว label

3.1.16. นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g (RCF) นาน 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3.1.17. ทิ้งส่วนล่าง (collection tube) นำ spin column ส่วนบนใส่ tube เปล่าอันใหม่

3.1.18. เติม wash buffer 1 ที่ผสมกับ ethanol แล้วจำนวน 500 μL ใน spin column

3.1.19. Centrifuge column ที่อุณหภูมิห้อง 10,000 g นาน 1 นาที

3.1.20. ทิ้ง tube ส่วนล่าง และนำ tube เปล่าอันใหม่มาใส่ส่วนบน

3.1.21. เติม wash buffer 2 ที่ผสมกับ ethanol แล้วจำนวน 500 μL ใน spin column

3.1.22. Centrifuge ที่ maximum speed (13,000 g) นาน 3 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วทิ้งส่วนล่างไป

3.1.23. นำ sterile microcentrifuge tube 1.5 ml มารองใต้ spin column แล้ว label

3.1.24. เติม genomic elution buffer ลงในส่วนสีขาวของ column 50 μL ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.1.25. Centrifuge ที่ maximum speed (13,000 g) 1 นาทีจะได้ DNA บริสุทธิ์ไปแช่ที่ -20°c

3.2. ในกรณีที่นำเลือดจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living-donor) มาตรวจ CYP3A5 genotype

3.2.1. นำเลือด whole blood ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20°c มาละลายที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2. นำเลือดมา 200 μL ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้ว label

3.2.3. เติม Proteinase K 20 μL และ RNAase 20 μL

3.2.4. นำไป mix ด้วย vortex หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.2.5. เติม Genomic Lysis/Binding Buffer 200 μL แล้ว vortex

3.2.6. Incubate ที่อุณหภูมิ 55°c นาน 10 นาที

3.2.7. เติม 100% ethanol 200 μL แล้ว vortex

3.2.8. ดูดน้ำส่วนที่เป็นสีเขียวทั้งหมด (640 μL)ใส่ spin column ส่วนบนแล้ว label

3.2.9. นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g (RCF) นาน 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3.2.10. ทิ้งส่วนล่าง (collection tube) นำ spin column ส่วนบนใส่ tube เปล่าอันใหม่

3.2.11. เติม wash buffer 1 ที่ผสมกับ ethanol แล้วจำนวน 500 μL ใน spin column

3.2.12. Centrifuge column ที่อุณหภูมิห้อง 10,000 g นาน 1 นาที

3.2.13. ทิ้ง tube ส่วนล่าง และนำ tube เปล่าอันใหม่มาใส่ส่วนบน

3.2.14. เติม wash buffer 2 ที่ผสมกับ ethanol แล้วจำนวน 500 μL ใน spin column

3.2.15. Centrifuge ที่ maximum speed (13,000 g) นาน 3 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วทิ้งส่วนล่างไป

3.2.16. นำ sterile microcentrifuge tube 1.5 ml มารองใต้ spin column แล้ว label

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

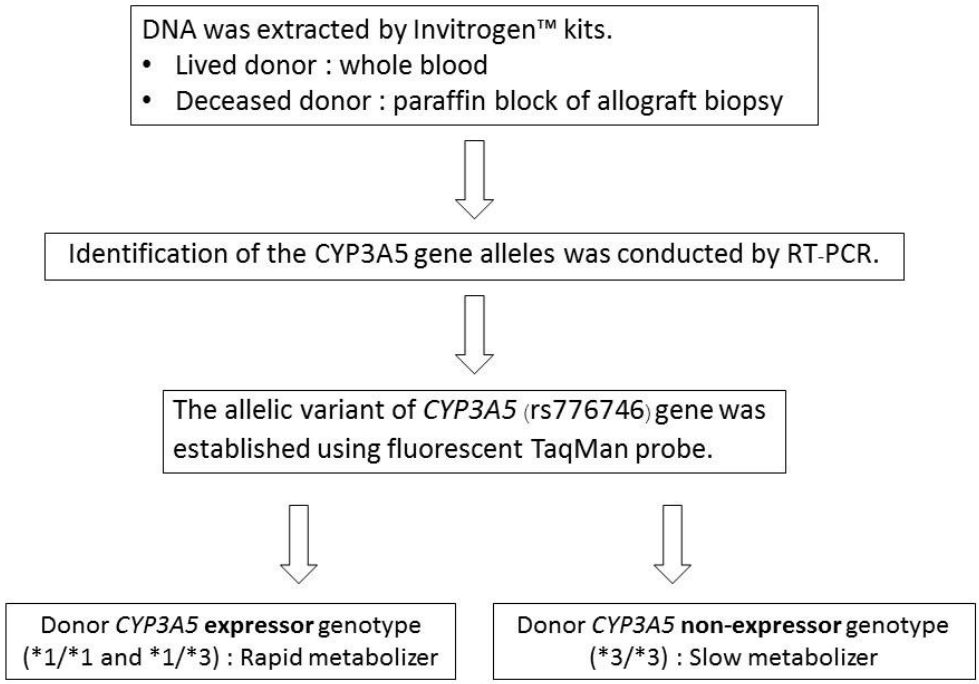
3.2.17. เติม genomic elution buffer ลงในส่วนสีขาวของ column 50 μL ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.2.18. Centrifuge ที่ maximum speed (13,000 g) 1 นาทีจะได้ DNA บริสุทธิ์ไปแช่ที่ -20°c

4. นำ DNA บริสุทธิ์ที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ CYP3A5 genotype โดยการใช้ real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) และแปลผลได้ว่า donor นั้นมี CYP3A5 genotype แบบ expressor (*1/*1 และ *1/*3) หรือ non-expressor (*3/*3)
   4.1. การทำ RT-PCR ใช้ forward primer สำหรับ CYP3A5 gene alleles คือ F 5'-CAT GAC TTA GTA GAC AGA TGA-3' และ reverse primer คือ R 5'-GGT CCA AAC AGG GAA GAA ATA-3'
   4.2. CYP3A5 allelic variant คือ rs776746 จะถูกระบุได้โดยการใช้ TaqMan probe
5. นำข้อมูลของผู้ป่วยไปบันทึกไว้ร่วมกับข้อมูลอื่นเช่นการเกิด CNI nephrotoxicity หรือระดับค่าการทำงานของไต (estimated glomerular filtration rate, eGFR) รวมทั้งบันทึกอัตราการเกิดภาวะสลัดไต (rejection) ตามที่กล่าวไว้ในหัวข้อ primary และ secondary outcome
6. ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิด CNI nephrotoxicity ในผู้ป่วย 2 กลุ่มที่มี CYP3A5 ของ donor แตกต่างกัน

โดยสรุปขั้นตอนของการวิเคราะห์หา donor CYP3A5 genotypes เป็นไปตามแผนภูมิที่ 1

แผนภูมิที่ 1 การวิเคราะห์เพื่อหา donor CYP3A5 genotypes

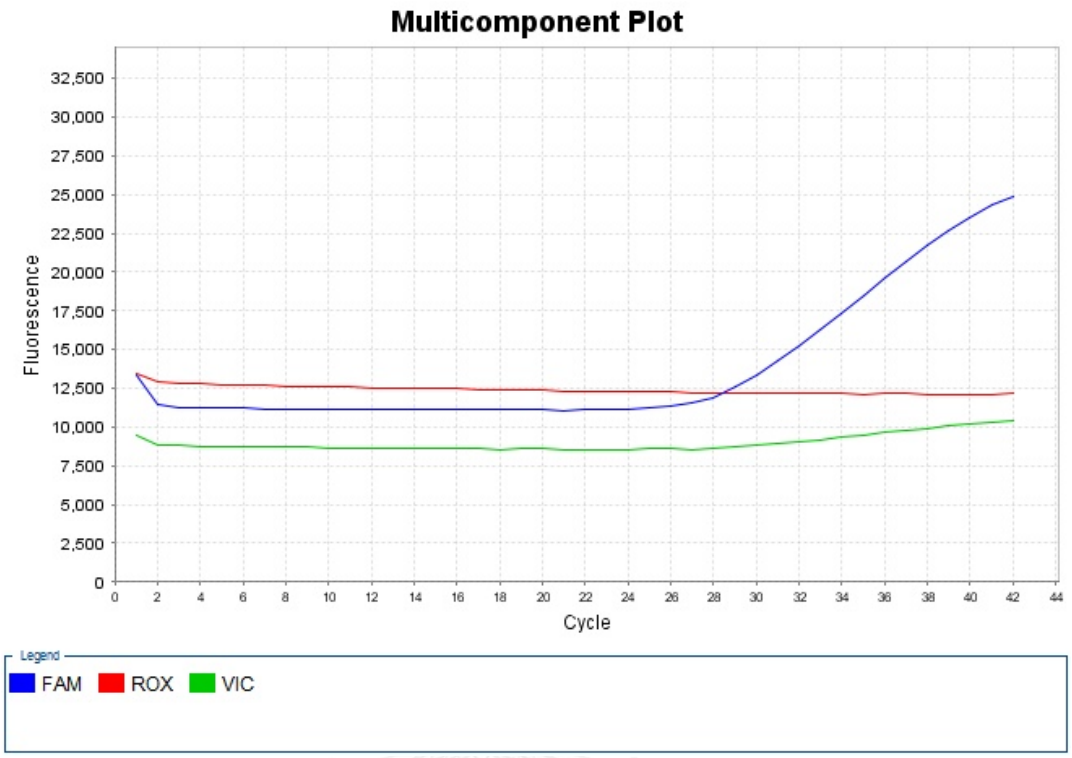


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

*รูปที่ 8 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*1/*1*

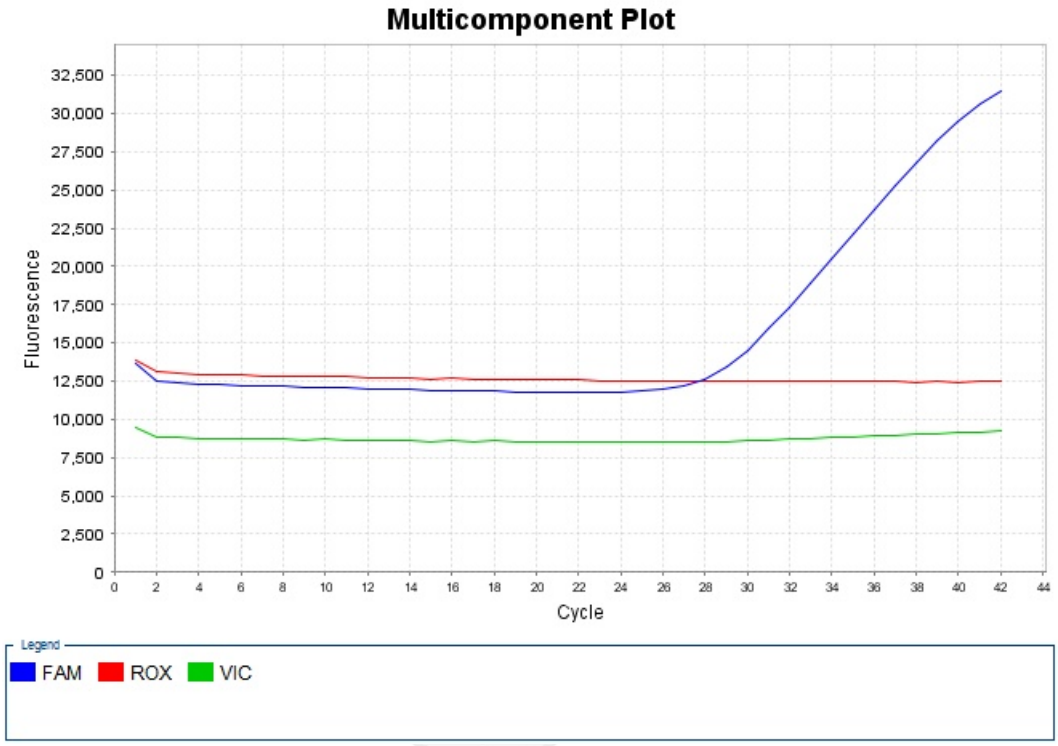
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

*รูปที่ 9 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*1/*3*



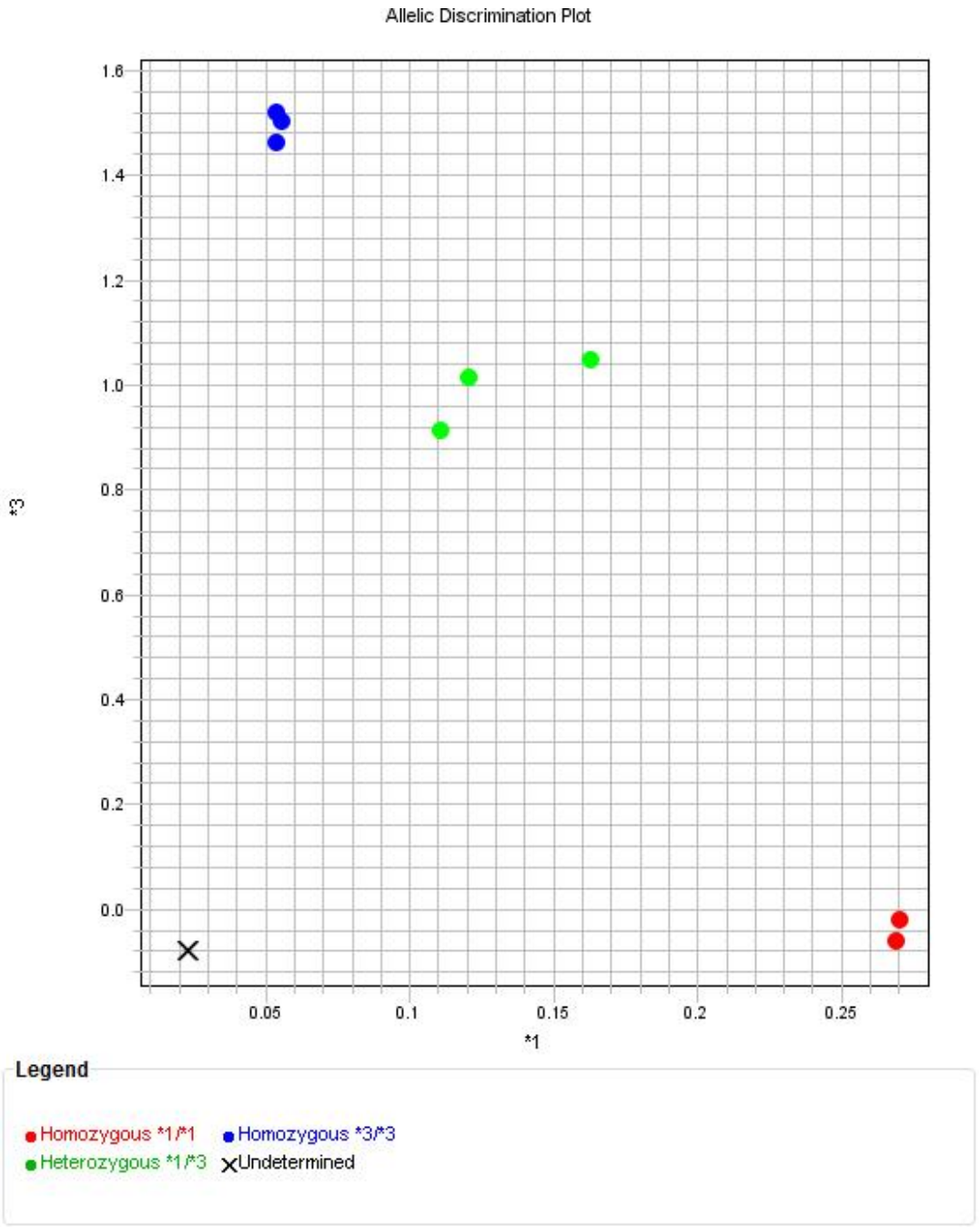
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

*รูปที่ 10 ตัวอย่างผลการทำ RT-PCR CYP3A5*3/*3*



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 11 ตัวอย่าง Allelic discrimination plot ของการทำ RT-PCR



3.3 การรวบรวมข้อมูล

- ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยจะถูกเก็บจากเวชระเบียน (OPD card) และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของระบบโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ผู้ป่วยที่จะได้รับการเก็บข้อมูลคือผู้ที่มาตรวจติดตามที่คลินิกปลูกถ่ายไตทุกวันพุธ 13.00-16.00 น. อาคารภปร ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ชิ้นเนื้อที่จะนำมาวิเคราะห์หา donor CYP3A5 genotype นำมาจากหน่วยพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- การเก็บเลือดจากผู้บริจาคที่ยังมีชีวิตจะเก็บจากคลินิกตรวจติดตามหลังการบริจาคไต (donor clinic) ทุกวันอังคาร 10.00-12.00 น. ห้องปลูกถ่ายไต อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 10 โซนซี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกไว้โดยการเข้ารหัส ไม่มีการบันทึกเป็นชื่อผู้ป่วยโดยตรง และจะเก็บข้อมูลไว้ที่หน่วยโรคไต อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 10 โซนซี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ผู้ที่เก็บข้อมูลและผู้บันทึกข้อมูลคือผู้ดำเนินการวิจัย

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่เป็น continuous data เช่น อายุ ระดับยาทาโครลิมุส จะถูกนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของ donor CYP3A5 expression โดยใช้ unpaired t-test ในขณะที่ข้อมูลซึ่งเป็น categorical data จะถูกนำมาเปรียบเทียบโดยใช้ chi-square test

ผลการศึกษาหลักที่ต้องการคือ CNI nephrotoxicity incidence จะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้ chi-square test และนำมาหา time-to-event analysis โดยใช้ Kaplan-Meier survival analysis และคำนวนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ log rank test

ตัวแปรทั้งหมดที่คาดว่าจะมีผลต่อ CNI nephrotoxicity จะถูกนำมาคำนวนหา hazard ratio โดยการใช้ Cox regression และตัวแปรที่มีค่า p-value น้อยกว่า 0.25 จาก univariate analysis จะถูกนำเข้าสู่ multivariable model ต่อไป

กำหนดให้ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% และค่า p-value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และ power ของการศึกษานี้ขั้นต่ำอยู่ที่ 80% (type 2 error =0.2)

การคำนวนทางสถิติในการวิจัยนี้ใช้โปรแกรม SPSS version 17 for Microsoft Window

3.5 การลงผลข้อมูล

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยแต่ละรายจะถูกลงข้อมูลในการใช้ data collection sheet ดังแสดงในหน้าต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Data Collection Sheet ID .....

Donor information

- KDPI
- Type of donor
- Age Sex
- Blood group
- Cause of death
- Comorbid diseases
- Initial Cr
- Terminal Cr
- Expanded criteria donor

Recipient information

- Age Sex
- BMI
- ESRD/Comorbid diseases
- Mode of RRT Duration
- Previous KT
- Blood group
- HLA MM
- Peak PRA MFI
- Cross match
- Cold ischemic time
- Warm ischemic time
- Total ischemic time
- CYP3A5 genotype
- Drug interaction with CYP3A5

Transplantation date
Donor CYP3A5 genotype
Tacrolimus C0/daily dose ratio at 6 month
eGFR at 6 month Urine 24 hour protein
Serum creatinine at 6 month
Documented CNI nephrotoxicity Time
Documented antibody-mediated rejection Time
Documented cellular rejection Time
Documented BKVAN Time
Thrombotic microangiopathy
Isometric tubular vacuolization
Medial arteriolar hyalinosis
Striped interstitial fibrosis and tubular atrophy
Tubular microcalcification
Glomerular capsular fibrosis or global glomerulosclerosis

Bx at 0-3 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx
Bx at 3-6 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx
Bx at 6-12 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx
Bx at 12-24 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx
Bx at 24-36 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx
Bx after 36 month	i	ci	t	ct	g	cg	v	cv	ptc	mm	ah	c4d	Dx

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา

สามารถรวบรวมกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 50 คนที่เข้าได้กับเกณฑ์การนำเข้าสู่โครงการวิจัย และไม่ตรงกับเกณฑ์การนำออกจากโครงการวิจัย ลักษณะส่วนใหญ่ของกลุ่มตัวอย่างพบว่าส่วนใหญ่เป็นผู้รับไตที่อยู่ในระดับความเสี่ยงทางภูมิคุ้มกันวิทยาในระดับปานกลาง (ความเสี่ยงต่อการสลัดไต) กล่าวคือมี HLA MM 2.7±1.6และมีค่า panel reactive antibody (PRA) อยู่ที่ 13.1±26.8 เปอร์เซนต์ เข้าร่วมการศึกษาส่วนใหญ่เป็นผู้ชาย (60%) อายุเฉลี่ยขณะเข้าร่วมการศึกษาคือ 40.7 ปี

ปัจจัยด้านผู้บริจาคไตคือ อายุขัยเฉลี่ยของผู้บริจาคไตคือ 41.7 ปี และมีค่า serum creatinine ก่อนที่จะตัดไตออกจากร่างกายเฉลี่ยที่ 1.72 mg/dL โดยเป็นผู้บริจาคที่เสียชีวิต 38 เปอร์เซนต์ เวลาที่ไตไม่ได้รับเลือดไปเลี้ยง (total ischemic time) เฉลี่ย 7.9 ชั่วโมง โดยหากแบ่งเป็นการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตจะมี total ischemic time อยู่ที่เฉลี่ย 18.5 ชั่วโมง แต่มีค่าเพียง 0.9 ชั่วโมงในการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากู้บริจาคที่มีชีวิต หลังการผ่าตัดพบอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะไตไม่ทำงานในช่วงสัปดาห์แรกและต้องได้รับการฟอกไตอย่างน้อย 1 ครั้งในช่วงสัปดาห์แรก (delayed graft function) 34 เปอร์เซนต์

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผลการศึกษาที่เป็นเป้าหมายหลักของงานวิจัยคือ donor CYP3A5 genotype พบว่ามี CYP3A5*1/*1 6 รายคิดเป็น 12 เปอร์เซนต์ มี CYP3A5*1/*3 15 รายคิดเป็น 30 เปอร์เซนต์ และมี CYP3A5*3/*3 29 รายคิดเป็น 58 เปอร์เซนต์ ซึ่งผลการตรวจพบ CYP3A5 ดังกล่าวเป็นไปตามการกระจายตัวปกติสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในประชากรที่เป็นกลุ่ม Asian ข้อมูลโดยสรุปแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยในการศึกษา

ข้อมูลผู้ป่วยทั้งหมด 50 คน	**ค่าตัวแปร**[a]
อายุของผู้รับบริจาคไต (ปี)	40.7±11.6
จำนวนผู้รับบริจาคไตที่เป็นเพศชาย	30 (60%)
HLA mismatch (จากทั้งหมดหกตำแหน่ง)	2.7±1.6
Panel reactive antibody (PRA) (เปอร์เซนต์)	13.1±26.8
อายุของผู้บริจาไต (ปี)	41.7±10.3
Terminal creatinine ของผู้บริจาคไต (mg/dL)	1.72±2.10
จำนวนการปลูกถ่ายไตที่มาจากผู้บริจาคเสียชีวิต	19 (38%)
Total ischemic time (ชั่วโมง) การบริจาคไตจากผู้เสียชีวิต การบริจาคไตจากผู้ที่ยังมีชีวิต	7.9±9.4 18.5±5.6 0.9±0.2
Delayed graft function[b]	17 (34%)
Donor *CYP3A5* *1/*1	6 (12%)
Donor *CYP3A5* *1/*3	15 (30%)
Donor *CYP3A5* *3/*3	29 (58%)

[a] ข้อมูลของตัวแปรจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับข้อมูล continuous data และแสดงเป็นจำนวนและเปอร์เซนต์สำหรับตัวแปรที่เป็น categorical data

[b] Delayed graft function หมายถึงภาวะที่ไตปลูกถ่ายยังไม่สามารถทำงานได้อย่างพอเพียงในสัปดาห์แรกหลังการปลูกถ่ายและจำนวนต้องได้รับการฟอกเลือดอย่างน้อย 1 ครั้งในสัปดาห์แรกหลังการปลูกถ่ายไต

4.2 ผลการศึกษา

จากข้อมูลผู้ป่วยข้างต้นสามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยได้เป็นสองกลุ่มตาม donor CYP3A5 genotype คือกลุ่มที่เป็น expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ *1/*3) มีทั้งหมด 21 คน และกลุ่มที่เป็น non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) มีทั้งหมด 29 คน ผลการศึกษาหลักในการศึกษานี้คือการเกิด CNI nephrotoxicity ในกลุ่มที่มี donor CYP3A5 ที่แตกต่างกัน พบว่ากลุ่มที่เป็น non-expressor genotype มีอุบัติการณ์ของการเกิด CNI nephrotoxicity 72.% (21 ราย) มากกว่ากลุ่มที่เป็น expressor genotype คือ 33.3% (7 ราย) (p-value for chi-square test = 0.006)

ผลการศึกษาที่เป็นเป้าหมายรองคืออัตราการเกิดการสลัดไต พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็น donor expressor และ non-expressor genotype คือมี acute cellular rejection 5 รายในกลุ่ม expressor genotype และ 5 รายในกลุ่ม expressor genotype (23.8% และ 17.2% ตามลำดับ, p value=0.567) และมี antibody-mediated rejection 4 รายในกลุ่ม expressor genotype และ 6 รายในกลุ่ม non-expressor genotype (19% และ 20.7%% ตามลำดับ, p-value=0.886)

สำหรับผลในเรื่องการทำงานของไตปลูกถ่ายนั้นพบว่าค่าการทำงานของไตปลูกถ่ายก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย eGFR ที่ 1 ปีหลังการปลูกถ่ายคือ 67.8 ml/min/1.73 m^2 ในกลุ่ม expressor genotype และ 67.4 ml/min/1.73 m^2 ในกลุ่ม non-expressor genotype (p-value=0.916) และ eGFR ที่ 2 ปีหลังการปลูกถ่ายคือ 66 ml/min/1.73 m^2 ในกลุ่ม expressor genotype และ 74.2 ml/min/1.73 m^2 ในกลุ่ม non-expressor genotype (p-value=0.141)

ในขณะที่ระดับยาและปริมาณยาในกระแสเลือดต่อยาทาโครลิมุสระหว่างกลุ่มที่เป็น donor expressor และ no-expressor genotypes ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ trough concentration ที่ 12 เดือน 6.813 ng/ml ในกลุ่ม expressor genotype และ 6.572 ng/ml ในกลุ่ม non-expressor genotype และปริมาณยาที่ได้ในกระแสเลือดเมื่อเทียบกับหนึ่งหน่วยของยาทาโครลิมุสที่เท่ากันคือ 0.024 (ng/ml)/mg/kg ในกลุ่ม expressor genotype และ 0.034 (ng/ml)/mg/kg ในกลุ่ม non-expressor genotype

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เป็น donor expressor และ non-expressor genotypes

ค่าตัวแปร	*1/*1 and *1/*3 (n=21)	*3/*3 (n=29)	p-value [a]
C0 Tacrolimus at 6th month (ng/mL) [b]	7.283±3.253	7.682±2.767	0.678
C0/mg/kg Tacrolimus at 6th month ((ng/mL)/mg/kg)	0.025±0.023	0.031±0.016	0.357
C0 Tacrolimus at 12th month (ng/mL) [b]	6.813±2.458	6.572±1.737	0.744
C0/mg/kg Tacrolimus at 12th month ((ng/mL)/mg/kg)	0.024±0.014	0.034±0.018	0.083
eGFR ที่ 1 ปีหลังการปลูกถ่ายไต (mL/min/1.73 m^2) [c]	67.8±11.0	67.4±15.6	0.916
eGFR at 2 ปีหลังการปลูกถ่ายไต (mL/min/1.73 m^2) [c]	66.0±14.7	74.2±3.3	0.141
เวลาในการ Follow-up (เดือน)	23.0±23.3	23.1±31.8	0.993
การเกิด CNI nephrotoxicity [d]	7 (33.3%)	21 (72.4%)	**0.006**
การเกิด Acute cellular rejection [e]	5 (23.8%)	5 (17.2%)	0.567
การเกิด Antibody-mediated rejection [e]	4 (19%)	6 (20.7%)	0.886

[a] P-value คำนวนโดยการใช้ unpaired t-test สำหรับ continuous data และ chi-square test สำหรับcategorical data

[b] Tacrolimus trough level

[c] estimated GFR คำนวนโดยการใช้สูตร CKD-EPI derived Thai equation

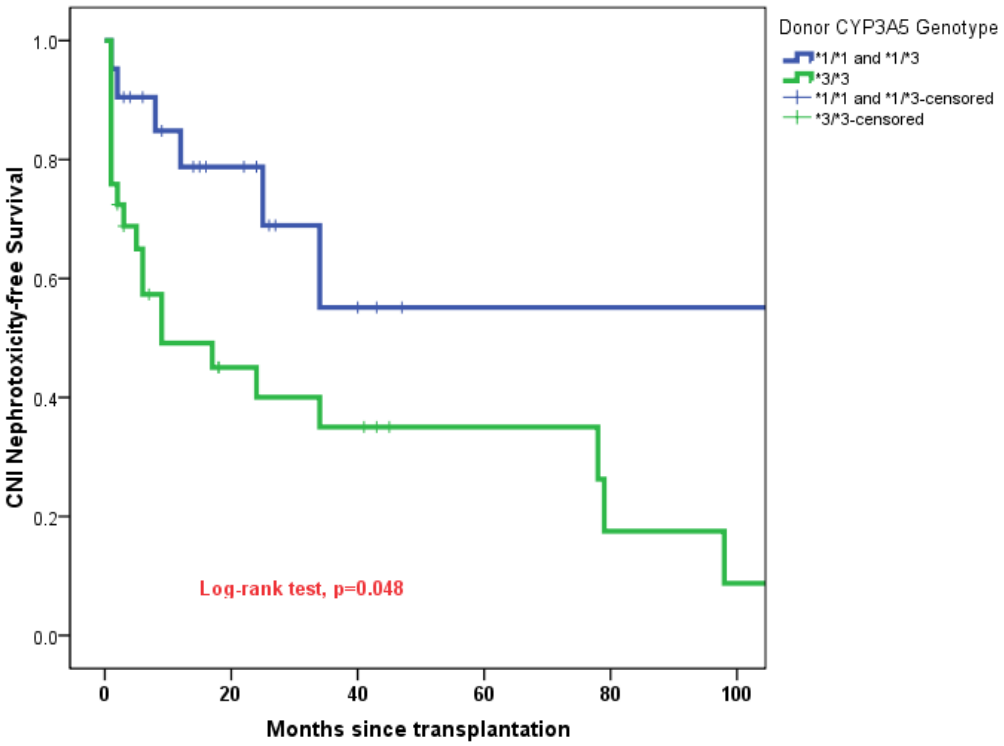
[d] การวินิจฉัย CNI nephrotoxicity จากผลชิ้นเนื้อ จะอ้างอิงการวินิจฉัยโดยพยาธิแพทย์ซึ่งประกอบไปด้วย isometric tubular vacuolization, thrombotic microangiopathy (ลักษณะชิ้น

เนื้อที่อาจจะมีสาเหตุอื่นของ thrombotic microangiopathy จะถูกคัดออกจากการศึกษา), striped fibrosis, medial arteriolar hyalinosis, และ tubular microcalcification.[4]

[e] การวินิจฉัย rejection อ้างอิงตามเกณฑ์ Banff 2007 classification และมีเกณฑ์การวินิจฉัย antibody-mediated rejection ในปี 2013 [25,26].

เมื่อนำการเกิด CNI nephrotoxicity มาคำนวน survival analysis โดยการใช้ Kaplan-Meier method ก็พบว่าผู้ที่มี donor expressor genotype (CYP3A5*3/*3) จะมีการเกิด CNI nephrotoxicity มากกว่าและเร็วกว่าผู้ที่มี donor expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ *1/*3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่ามัธยฐานของการเกิด CNI nephrotoxicity ในกลุ่ม non-expressor genotype อยู่ที่ 9 เดือน และค่ามัธยฐานของการเกิด CNI nephrotoxicity ในกลุ่ม expressor genotype อยู่ที่ 105 เดือน (log-rank test, p-value=0.048)

รูปที่ 12 Kaplan-Meier Curve Survival Analysis



เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาคำนวนโดยการใช้ cox-regression analysis เพื่อคำนวนค่าความเสี่ยงของการเกิด CNI nephrotoxicity ในแต่ละตัวแปรที่คาดว่ามีผลพบว่า donor non-expressor genotype มีความเสี่ยง 2.29 เท่าในการเกิด CNI nephrotoxicity (p-value=0.061) ในขณะที่ระดับยาทาโครลิมุสที่ 6 เดือน (tacrolimus trough concentration) มีลักษณะเป็น protective factor ในการเกิด CNI nephrotoxicity (hazard ratio 0.78, p=value=0.017) แต่หลังจากที่ใช้ multivariable model ในการคำนวน hazard ratio สำหรับการเกิด CNI nephrotoxicity แล้วพบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity มีเพียงแค่ donor non-expressor genotype เท่านั้นโดยมีความเสี่ยงในการเกิด CNI nephrotoxicity อยู่ที่ 3.91 เท่าเมื่อเทียบกับผู้ที่มี donor expressor genotype (p-value=0.049) ในขณะที่ตัวแปรอื่นๆเมื่อนำเข้าสู่ multivariate analysis แล้วพบว่าไม่มีค่าความเสี่ยง (hazard ratio) ที่ให้ผลที่เพิ่มหรือลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าระดับยาทาโครลิมุสที่ 6 เดือน หลังจากเข้าสู่ multivariate analysis มีค่า hazard ratio 0.74 โดยที่ p-value=0.070) ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 Cox-regression analysis : univariate analysis

Variables	Univariate analysis	
	Unadjusted hazard ratio (95% CI)[c]	p-value
HLA MM >3 (yes vs no)	0.99 (0.62-1.58)	0.966
PRA >50% (yes vs no)	1.20 (0.70-2.06)	0.506
Donor age (per 1 year increase)	1.04 (0.99-1.09)	0.063[+]
Donor terminal creatinine (per 1 mg/dL increase)	0.98 (0.81-1.19)	0.852
Delayed graft function [a] (yes vs no)	1.67 (0.74-3.79)	0.219[+]
C0 tacrolimus at 6th month [b] (per 1 ng/mL increase)	0.78 (0.63-0.96)	0.017[+]
C0 tacrolimus at 12th month [b] (per 1 ng/mL increase)	0.78 (0.56-1.09)	0.143[+]
Donor CYP3A5 genotype (non-expressor vs expressor)	2.29 (0.96-5.46)	0.061[+]

[a] Delayed graft function หมายถึงภาวะการทำงานช้าของไตปลูกถ่ายโดยมีนิยามคือ จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไตวิธีอื่นหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตในสัปดาห์แรกของการปลูกถ่าย

[b] Tacrolimus trough levels (ng/mL)

[c] Unadjusted hazard ratio สำหรับการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity

[d] Adjusted hazard ratio สำหรับการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity

[+] ค่าตัวแปรที่มี p-value น้อยกว่า 0.25 จากการทำ univariate analysis จะถูกนำเข้าสู่ multivariable model ต่อไป

Chulalongkorn University

ตารางที่ 5 Cox-regression analysis : multivariate analysis

Variables	Multivariate analysis	
	Adjusted hazard ratio (95% CI)[d]	p-value
HLA MM >3 (yes vs no)	-	-
PRA >50% (yes vs no)	-	-
Donor age (per 1 year increase)	1.04 (0.98-1.11)	0.212
Donor terminal creatinine (per 1 mg/dL increase)	-	-
Delayed graft function [a] (yes vs no)	0.82 (0.44-1.56)	0.553
C0 tacrolimus at 6th month [b] (per 1 ng/mL increase)	0.74 (0.54-1.03)	0.070
C0 tacrolimus at 12th month [b] (per 1 ng/mL increase)	0.73 (0.49-1.10)	0.128
Donor CYP3A5 genotype (non-expressor vs expressor)	3.91 (1.01-15.21)	**0.049**

[a] Delayed graft function หมายถึงภาวะการทำงานช้าของไตปลูกถ่ายโดยมีนิยามคือ จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไตวิธีอื่นหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตในสัปดาห์แรกของการปลูกถ่าย

[b] Tacrolimus trough levels (ng/mL)

[c] Unadjusted hazard ratio สำหรับการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity

[d] Adjusted hazard ratio สำหรับการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity

[+] ค่าตัวแปรที่มี p-value น้อยกว่า 0.25 จากการทำ univariate analysis จะถูกนำเข้าสู่ multivariable model ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการวิจัยนี้เป็นลักษณะ retrospective cohort study ในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 50 คน และศึกษาผลของ donor CYP3A5 genotypes ที่แตกต่างกัน และผลที่มีต่อการทำงานของไตและภาวะการเกิดความเป็นพิษต่อไตจากยากดภูมิทาโครลิมุสพบว่า มีผู้ป่วยที่ได้รับไตปลูกถ่ายที่มี donor expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ CYP3A5*1/*3) ทั้งหมด 21 คน และมีผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มี donor genotype เป็น non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) ทั้งหมด 29 คน เมื่อติดตามไปที่ระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 23 เดือนในทั้ง 2 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มี donor expressor และ donor non-expressor genotypes ทั้งในเรื่องของการทำงานของไตโดยวัดเป็น estimated GFR ที่ 6 และ 12 เดือน อุบัติการณ์ของการเกิดภาวะสลัดไตทั้งที่เป็น acute cellular rejection และ antibody-mediated rejection รวมถึงระดับยาทาโครลิมุสในกระแสเลือดของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มก็ไม่แตกต่างกันอีกด้วย แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือพบว่า ในกลุ่มที่เป็น non-expressor genotype พบอุบัติการณ์ของการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity มากกว่าในกลุ่ม donor expressor genotype อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 72.4% ในกลุ่มที่เป็น donor non-expressor genotype และ 33.3% ในกลุ่มที่เป็น donor expressor genotype (p-value=0.006) ซึ่งเป็นผลการศึกษาที่ช่วยสนับสนุนสมมติฐานของการศึกษานี้ตั้งแต่ต้นได้ว่า ในผู้ที่มี allograft non-expressor genotype ของ CYP3A5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสลายยาทาโครลิมุสนั้น เนื่องจากใน non-expressor genotype จะมีปริมาณเอนไซม์นี้น้อยดังนั้นอัตรากรขจัดยาทาโครลิมุสออกจากตัวเนื้อไตปลูกถ่าย (local allograft drug clearance) ก็ย่อมจะน้อยตามไปด้วย ทำให้มี active drug สะสมอยู่ในบริเวณเนื้อไตปลูกถ่ายได้มากกว่าและนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในเนื้อไตที่เป็น expressor genotype ของ CYP3A5 ซึ่งผลที่ตามมาหลังจากที่มียาทาโครลิมุสสะสมในเนื้อไตปริมาณมากก็ย่อมจะนำมาสู่การเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity ได้มากกว่ากลุ่ม donor expressor genotype ที่สามารถกำจัดยาออกจากเนื้อไตได้เร็วกว่าและปริมาณยาสะสมก็น้อยกว่านั้นเอง

เมื่อนำผลการศึกษาดังกล่าวมาใช้วิธีการคำนวนทางสถิติมากขึ้นคือการวิเคราะห์ survival analysis โดยการใช้ Kaplan-Meier method ก็สามารถยืนยันผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกัน

คือ ในกลุ่มที่รับไตจาก donor ที่เป็น non-expressor genotype ของ CYP3A5 จะมีอัตราการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไตได้เร็วกว่าและสะสมมากกว่าในกลุ่มที่เป็น donor expressor ของ CYP3A5 genotype โดยมีค่ามัธยฐานของการเกิด CNI nephrotoxicity ในกลุ่ม donor non-expressor genotype ที่ 9 เดือนหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต และค่ามัธยฐานในการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity ในกลุ่ม donor expressor genotype อยู่ที่ 105 เดือนหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต ซึ่งก็ช่วยยืนยันสมมตติฐานตามที่กล่าวไปข้างต้น

เนื่องจากลักษณะของการศึกษานี้เป็นแบบ retrospective cohort ดังนั้นจึงมีโอกาสที่ผลการศึกษานี้จะมี confounder จากปัจจัยอื่นๆได้ง่าย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำตัวแปรต่างๆทั้งหมดที่น่าจะมีผลต่อการเกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity มาหาค่า hazard ratio โดยการวิเคราะห์ Cox-regression analysis ทั้งใน univariate และ multivariate analysis พบว่าเมื่อตัดปัจจัยต่างๆที่คาดว่าจะเป็นสิ่งรบกวนผลการศึกษานี้คือ calcineurin inhibitor nephrotoxicity จะได้ค่า adjusted hazard ratio ของ donor non-expressor genotype เมื่อเปรียบเทียบกับ donor expressor genotype อยู่ที่ 3.91 เท่าที่จะทำให้เกิด calcineurin inhibitor nephrotoxicity ซึ่งก็ช่วยยืนยันความสำคัญของ donor CYP3A5 genotype ต่อผลของไตปลูกถ่ายในแง่ของ calcineurin inhibitor nephrotoxicity

CYP3A5 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเมตาบอลิซึมยาทาโครลิมุสซึ่งเป็นยากดภูมิหลักที่ใช้ในการปลูกถ่ายไตในปัจจุบัน การแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A5 ในมนุษย์มีความหลากหลายและมี interindividual functional variability มากกว่าเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันที่มีลักษณะคล้ายกันคือ CYP3A4 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการสลายยาไซโคสปอริน (cyclosporin) ซึ่งเป็นยากลุ่ม calcineurin inhibitor อีกตัวหนึ่งที่ใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะ โดย wild type sequence ของ CYP3A5 คือ CYP3A5*1 ซึ่งในผู้ที่มี CYP3A5*1 อย่างน้อย 1 allele ก็จะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่สามารถทำลายยาทาโครลิมุสนี้ได้อย่างรวดเร็ว common variant ของ CYP3A5 นี้เกิดจาก RNA splicing ซึ่งทำให้เกิด premature termination codons (*CYP3A5* 6986 A>G, *CYP3A5**3) และยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ CYP3A5 ทำให้ไม่สามารถเมตาบอลิซึมยาทาโครลิมุสได้[27,28] โดยที่มีการกระจายตัวของ allele ที่แตกต่างกันไปในประชากรที่เชื้อชาติแตกต่างกันกล่าวคือในเชื้อชาติ Asian จะพบ CYP3A5*3/*3 ได้ประมาณ 50 เปอร์เซนต์ แต่จะสามารถพบได้สูงขึ้นถึง 82-87% ในเชื้อชาติที่เป็น Caucasian[17] ดังนั้นจึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าในการปลูกถ่ายไตส่วนใหญ่ของกลุ่มประชากรที่เป็น Caucasian นั้นจะพบว่าเป็นการปลูกถ่ายที่มี CYP3A5

ตรงกันระหว่าง CYP3A5 ของ donor และ CYP3A5 ของ recipient ซึ่งก็จะเป็น non-expressor genotype ทั้งคู่ แต่ในประชากรที่เป็นกลุ่ม Asian นั้นจะพบว่าการปลูกถ่ายไตที่เกิดขึ้นมีโอกาสที่ CYP3A5 ของ donor จะตรงกับ recipient อยู่ที่ 50 เปอร์เซนต์เท่านั้น ซึ่งจะเป็น non-expressor genotype 25 เปอร์เซนต์และ expressor genotype อีก 25 เปอร์เซนต์

ความสำคัญของ CYP3A5 genotype ต่อระดับของยาทาโครลิมุสนั้นได้มีการศึกษาหลายการศึกษาทในอดีตที่สามารถแสดงให้เห็นว่าในผู้ที่มี CYP3A5 genotype เป็น expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ *1/*3) เมื่อได้รับยาทาโครลิมุสในขนาดเท่ากันจะมีระดับของทาโครลิมุสในกระแสเลือดที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มี CYP3A5 non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3)[24] เนื่องจากในกลุ่มที่เป็น CYP3A5 expressor genotype นั้นเอนไซม์ CYP3A5 ที่ตับจะมีการทำงานที่มากกว่ากลุ่ม non-expressor genotype และทำให้เกิดการสลายยาทาโครลิมุสได้เร็วกว่าซึ่งการขจัดยาลักษณะนี้จะเป็นการขจัดยาในลักษณะ systemic clearance และมีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิด rejection ของ allograft และมีความสำคัญต่อการยับยั้งการ sensitized ของ lymphocyte ในร่างกาย แต่การศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปผลของ recipient CYP3A5 genotypes ต่อการเกิด calcineurin nephrotoxicity ได้อย่างชัดเจน[8,9,16,27,29-31] โดยการศึกษาส่วนใหญ่มักแสดงให้เห็นว่า recipient CYP3A5 genotypes นั้นไม่มีผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity แตกต่างจากการศึกษาที่เป็นเป้าหมายในงานวิจัยนี้คือ CYP3A5 genotype ของ donor ซึ่งจะมีการแสดงออกที่เนื้อของไตปลูกถ่ายและอาจจะมีผลต่อการขจัดยาในระดับ local clearance ของ kidney allograft และมีผลโดยตรงต่อการเกิด CNI nephrotoxicity มากกว่า recipient CYP3A5 genotypes โดยมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของไตในการเปลี่ยนยาทาโครลิมุสให้อยู่ในรูปของ inactive metabolite คือเมื่อนำ human kidney microsomes มาเพาะเลี้ยงแล้วใส่ยาทาโครลิมุสเข้าไป จะสามารถตรวจพบ 13-*O*-desmethyl tacrolimus ซึ่งเป็น inactive metabolite ของยาทาโครลิมุสได้มากกว่าในเนื้อไตที่มี CYP3A5 expressor genotype (CYP3A5*1/*3) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อไตที่เป็น CYP3A5 non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3)[32]

มีการศึกษาเพียง 3 การศึกษาเท่านั้นในอดีตที่พยายามศึกษาผลของ donor CYP3A5 genotype ต่อการทำงานและผลลัพธ์อื่นๆของไตปลูกถ่ายเช่นการเกิด acute rejection หรือการเกิด CNI nephrotoxicity การศึกษาแรกในปีพ.ศ. 2550 โดย Joy และคณะ[12] ซึ่งใช้วิธีการย้อม immunohistochemistry บนเนื้อไตปลูกถ่ายที่ทำการตัดชิ้นเนื้อออกมาเพื่อที่จะบ่งบอกว่าเนื้อไตปลูกถ่ายนั้นมี CYP3A5 expression อยู่บน renal tubular epithelium cell หรือไม่ โดยรวบรวม

ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตทั้งหมด 59 คนและรายงานผลในลักษณะของ case-control study ผลของการศึกษานี้พบว่าในกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity จากชิ้นเนื้อของไตปลูกถ่ายนั้นจะตรวจพบ CYP3A5 expression จากการย้อม immunohistochemistry ได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีลักษณะของ CNI nephrotoxicity หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต การศึกษาที่สองของ donor CYP3A5 genotypes ในการผ่าตัดปลูกถ่ายไตทำโดย Metalidis และคณะในปี พ.ศ. 2554[14] ซึ่งใช้กระบวนการย้อม immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อไตปลูกถ่ายที่ถูกตัดออกมาในการแบ่งกลุ่มว่าเป็นเนื้อเยื่อไตที่มี CYP3A5 expression หรือไม่เช่นเดียวกับการศึกษาของ Joy และคณะ การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตทั้งหมด 103 คนและใช้การรายงานผลและการคำนวนทางสถิติแบบ case-control study ผลการศึกษานี้พบว่าในกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity นั้นจะตรวจพบ CYP3A5 expression ได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีลักษณะของ CNI nephrotoxicity เมื่อตรวจโดยการย้อม immunohistochemistry บริเวณ distal renal tubular epithelium cells (10 เปอร์เซนต์และ 39 เปอร์เซนต์ตามลำดับ, p-value<0.001) ซึ่งผลการศึกษานี้ตรงกับการศึกษาของ Joy ในปีพ.ศ. 2554 และสนับสนุนสมมติฐานของการเกิด CNI nephrotoxicity จากการที่มี local clearance ที่ลดลงจากการที่เนื้อไตไม่มี CYP3A5 expression (non-expressor group) แต่ในการศึกษาของ Metalidis นี้ก็มีข้อแย้งคือเมื่อนำชิ้นเนื้อไตบริเวณ proximal renal tubular epithelium cells มาทำการย้อม immunohistochemistry สำหรับ CYP3A5 กลับพบว่าในกลุ่มที่มี CNI nephrotoxicity มีการย้อมติด CYP3A5 มากกว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่มี CNI nephrotoxicity จากการตรวจทางพยาธิวิทยา ทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าการมีหรือไม่มี CYP3A5 expression นั้นส่งผลให้เกิด CNI nephrotoxicity หรือไม่ และในการศึกษาสุดท้ายในอดีตเกี่ยวกับ donor CYP3A5 genotypes ในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตโดย Glowacki และคณะในปีพ.ศ. 2554[13] ซึ่งเป็นการศึกษาเดียวที่ใช้วิธีการตรวจ CYP3A5 genotype โดยการทำ DNA analysis และทำทั้งใน recipient และ donor โดยการใช้เลือดเป็นตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ DNA พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ donor หรือ recipient CYP3A5 genotypes กับการเกิด CNI nephrotoxicity, การทำงานของไตโดยการวัด estimated GFR, อุบัติการณ์ของการเกิด acute rejection ซึ่งเป็นการศึกษาที่ให้ผลขัดแย้งกับสองการศึกษาแรกที่กล่าวมา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่ดูผลการศึกษาหลักเป็นการเกิด CNI nephrotoxicity เมื่อมีปัจจัยที่สนใจคือ donor CYP3A5 genotypes และสามารถแสดงให้เห็นจากการใช้ Kaplan-Meier survival analysis ได้ว่า CYP3A5 non-expressor genotype เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด CNI

nephrotoxicity ในผู้ที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตและเป็นการศึกษาแรกที่ได้ศึกษาตัวแปรต่างๆในรูปแบบของ multivariate analysis โดยวิธีการ Cox-regression และยืนยันผลของ donor CYP3A5 non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) ต่อการเกิด CNI nephrotoxicity ได้ การศึกษาในอดีตข้างต้นมี 2 การศึกษาที่ใช้กระบวนการย้อม immunohistochemistry จากชิ้นเนื้อไตปลูกถ่ายที่ได้ตัดตัวอย่างออกมาซึ่งการแปลผลจากการย้อม immunohistochemistry นี้จำเป็นต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมากเนื่องจากเป็นลักษณะของ semi-quantitative measurement (ใช้การให้คะแนนของการติดสีเป็น 3 ระดับเช่น 1+, 2+หรือ 3+ เป็นต้น) ซึ่งเป็นการวัดที่ขึ้นอยู่กับผู้ประเมินเป็นส่วนสำคัญและการจะมี intraobserver variability และ interobserver variability ได้มากในระดับหนึ่ง นอกจากนั้นการที่สามารถตรวจการแสดงออกของ CYP3A5 บนผิวของ renal tubular epithelium cell ได้นั้นไม่ได้แสดงว่าการที่มี CYP3A5 expression นั้นจะมีการทำงานเสมอไป ในบางครั้งอาจจะเป็น non-functioning protein ก็เป็นไปได้ ดังนั้นการศึกษาที่ใช้ immunohistochemistry staining ในการวินิจฉัยว่ามีหรือไม่มี CYP3A5 expression นั้นผู้ศึกษาจำเป็นจะต้องใช้ความระมัดระวังตามที่กล่าวไป แตกต่างจากในการศึกษานี้ซึ่งได้ทำการตรวจ DNA analysis โดยตรงและสามารถระบุ CYP3A5 genotype ของชิ้นเนื้อไตที่บริจาคได้ชัดเจนกว่าการตรวจจาก immunohistochemistry staining

นอกจากนั้นการศึกษาที่ผ่านมาทั้งหมดข้างต้นยังเป็นการศึกษาใน Caucasians population ทั้งหมด ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของ donor CYP3A5 genotypes ในกลุ่มประชากรที่เป็น Asians ดังเช่นในการศึกษานี้มาก่อน ซึ่งการกระจายตัวของ CYP3A5 genotypes ในการศึกษานี้ก็เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาการกระจายตัวของ CYP3A5 genotypes ของประชากรที่เป็น Asians จากการศึกษาในอดีตดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการกระจายตัวของ CYP3A5 genotypes ในการศึกษาปัจจุบันเปรียบเทียบกับการศึกษาใน Asians population ในอดีต

Study	CYP3A5*1/*1	CYP3A5*1/*3	CYP3A5*3/*3
Xie et al[17]	7%	40%	53%
Yaowakulpatana et al[33]	9%	42%	49%
This study	12%	30%	58%

ดังที่กล่าวไปข้างต้นคือเนื่องจากการกระจายตัวของ CYP3A5 genotypes ใน Asians population จะมี CYP3A5 non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) อยู่ประมาณ 50% แต่ใน Caucasians population จะมี CYP3A5 non-expressor genotype อยู่ถึง 80% ดังนั้นการปลูกถ่ายไตในประชากรที่เป็นคนเชื้อชาติเอเชียจะมีโอกาสเกิดเป็น CYP3A5 mismatch หรือคือการที่ recipient ได้รับไตปลูกถ่ายจาก donor ที่มี CYP3A5 ไม่ตรงกับ CYP3A5 genotype ของตนเอง ซึ่งการเกิด CYP3A5 mismatch นี้ก็เป็นที่น่าสนใจว่าจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อเนื้อไตปลูกถ่ายมากขึ้นหรือไม่ ยกตัวอย่างคือ หากผู้รับไตมี CYP3A5 genotype ที่แสดงออกบริเวณเนื้อตับเป็น expressor genotype (CYP3A5*1/*1) ก็จะทำให้ปริมาณยาทาโครลิมุสที่จะต้องได้รับเพื่อที่จะได้ระดับ trough concentration ของทาโครลิมุสได้เท่าเกณฑ์ปกติ (C0 3-7 ng/mL) มากกว่า recipient ที่มี CYP3A5 expression เป็น non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) แต่หากเนื้อไตที่รับมาเป็น non expressor genotype (CYP3A5*3/*3) ก็อาจจะมีความเสี่ยงในการเกิด CNI nephrotoxicity ได้มากกว่าในกรณีที่รับเนื้อไตที่เป็น expressor genotype เช่นเดียวกัน เนื่องจากระดับยาที่ได้รับต้องเป็นปริมาณสูงถึงแม้ใน systemic clearance ซึ่งตรวจจากการวัดระดับ trough concentration จะอยู่ในเกณฑ์ปกติแต่ในระดับของ local allograft นั้นหากเป็น non-

expressor genotype ก็อาจจะมีการ clearance ของยาทาโครลิมุสได้ช้ากว่าใน systemic clearance ทำให้เกิด CNI nephrotoxicity ได้

จากการศึกษานี้ได้พิจารณาเรื่องของ recipient CYP3A5 genotype ร่วมด้วยบางส่วน (ข้อมูลเท่าที่สามารถเก็บรวบรวมได้ถึงปัจจุบัน 40 คน) พบว่าอัตราการเกิดภาวะความเป็นพิษต่อไตจากยากดภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแคลซินิวรินสูงที่สุดคือกลุ่มผู้ป่วยที่ recipient CYP3A5 genotype เป็น expressor genotype (CYP3A5*1/*1 และ *1/*3) ซึ่งได้รับไตจากผู้บริจาคที่มี non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) เมื่อเปรียบเทียบกับการจับคู่ของ CYP3A5 genotype ของ donor และ recipient ในรูปแบบอื่นๆ (p-value ของ log rank test 0.024) อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลการศึกษานี้ไม่ได้เป็นผลการศึกษาที่ตั้งวัตถุประสงค์ในขณะที่เริ่มทำการศึกษา จึงจำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันเพิ่มเติมกับ recipient ที่ยังไม่ได้รับการตรวจ CYP3A genotype ที่เหลืออยู่และนำมาคำนวนทางสถิติอีกครั้งต่อไป

องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้คือการทราบถึงปัจจัยเสี่ยงหนึ่งในการเกิด CNI nephrotoxicity หากมีข้อมูลของ donor CYP3A5 genotypes ก่อนการปลูกถ่ายก็จะสามารถปรับระดับยาทาโครลิมุสให้เหมาะสมกับ donor CYP3A5 genotypes ได้ กล่าวคือหากอ้างอิงจากการศึกษาที่ผ่านมาคือแนะนำให้รักษาระดับ trough concentration ของทาโครลิมุสให้อยู่ในช่วง 3-7 ng/mL[22] อาจจะแบ่งระดับยานี้เป็นสองช่วงคือหากผู้ป่วยได้รับไตที่เป็น expressor genotype ที่สามารถเมตาบอลิซึมทาโครลิมุสได้เร็วอาจจะรักษาระดับ trough concentration ของทาโครลิมุสได้ที่ 6-7 ng/mL แต่หารไตที่ได้รับมาเป็น non-expressor genotype ที่มีการขจัดยาจาก allograft ได้ค่อนข้างช้าอาจจะรักษาระดับ trough concentration ที่ระดับต่ำกว่าคือ 3-5 ng/mL ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

5.2 ข้อดีของการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงความสัมพันธ์ของ donor CYP3A5 genotypes ต่อการเกิด CNI nephrotoxicity ในกลุ่มประชากรที่เป็นชาวเอเชีย โดยใช้วิธีการที่เชื่อถือได้คือการตรวจ CYP3A5 genotypes โดยการใช้วิธี RT-PCR และ DNA analysis ซ่งลการกระจายตัวของ donor CYP3A5 genotypes ก็เป็นเช่นเดียวกันกับการศึกษาในประชากรเอเชียในอดีตที่ผ่านมาคือมี CYP3A5*3/*3 มากที่สุด รองลงมาคือ CYP3A5*1/*3 และ CYP3A5*1/*1 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการศึกษานี้มีการกระจายตัวของประชากรที่สามารถเชื่อถือได้และสามารถเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรที่สนใจได้

การศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาแรกที่แสดงอุบัติการณ์ของการเกิด CNI nephrotoxicity แบ่งตามชนิดของ donor CYP3A5 genotypes (expressor และ non-expressor genotypes) โดยการใช้ Kaplan-Meier survival analysis และยังใช้วิธีการทางสถิติเพื่อหาค่าความเสี่ยง (hazard ratio) ของการเกิด CNI nephrotoxicity โดยการใช้ Cox-regression analysis ทั้ง univariate analysis และ multivariate analysis เพื่อหา adjusted hazard ratio หลังจากกำจัดตัวแปรที่อาจจะเป็น confounder ออกไป

5.3 ข้อจำกัดของการศึกษา

1. เนื่องจากการศึกษานี้เป็นลักษณะ retrospective cohort study จึงมีโอกาสที่จะเกิด bias ในการเลือกกลุ่มประชากรตัวอย่างรวมถึงผลการศึกษาได้
2. นิยามที่ใช้ในการวินิจฉัย CNI nephrotoxicity ก็ยังไม่มีเกณฑ์การวินิจฉัยที่ชัดเจนและเป็นสากล แต่ในการศึกษานี้ก็ได้พยายามลดข้อจำกัดนี้ให้น้อยที่สุดโดยการให้พยาธิแพทย์เพียงท่านเดียวในการอ่านผลทางพยาธิวิทยาเพื่อที่จะวินิจฉัย CNI nephrotoxicity เพื่อจะลดการเกิด interobserver variability ให้น้อยที่สุด
3. จำนวนตัวอย่างในการศึกษานี้มีทั้งหมด 50 คนซึ่งถือว่าค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตอื่นๆ อย่างไรก็ตามจากการคำนวนค่าความเชื่อมั่นหลังจากได้ผลการศึกษาพบว่าได้ค่า power 0.8 ซึ่งจัดว่าเป็นผลการศึกษาที่สามารถเชื่อถือได้จากจำนวนตัวอย่างที่รายงานในการศึกษานี้
4. การศึกษานี้ยังไม่ได้รายงานผลของ CYP3A5 genotypes ของ recipient ร่วมด้วย ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity อย่างไรก็ตามได้มีการวัดระดับยาในกระแสเลือดซึ่งเป็นตัวแทนของการเมตาบอลิซึมของยาทาโครลิมุสโดยผ่าน recipient CYP3A5 ที่บริเวณเนื้อตับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับยาทาโครลิมุสที่ 6 เดือนและ 12 เดือนหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต
5. การศึกษานี้ไม่ได้มีการวัด metabolites ของยาทาโครลิมุสในบริเวณเนื้อไตโดยตรงเพื่อยืนยันสมมติฐานของการที่มี local drug clearance

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาต่อไปในอนาคตหากมีข้อมูลของ recipient CYP3A5 genotypes อาจจะนำมาเข้าสู่ multivariable model เพื่อคำนวนหา adjusted hazard ratio ว่า donor CYP3A55 genotypes ยังมีผลต่อการเกิด CNI nephrotoxicity เหมือนผลการศึกษานี้หรือไม่
2. หากทราบถึง CYP3A5 genotypes ของ recipient แล้วก็สามารถที่จะนำมาเข้าสู่การทดสอบความเข้ากันได้ของ CYP3A5 genotypes ได้ (CYP3A5 matching) เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการที่มี CYP3A5 mismatch นั้นจะเพิ่มอุบัติการณ์ของการเกิด CNI nephrotoxicity ได้จริงหรือไม่
3. จำนวนประชากรในการศึกษาควรจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการศึกษาและเป็นตัวแทนของประชากรที่สนใจได้ดีขึ้น
4. จำเป็นต้องมีการศึกษาที่เป็น randomized controlled trial ในการให้ยาทาโครลิมุสตาม donor CYP3A5 genotypes ดังที่อยู่ในการอภิปรายผล เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการปรับระดับ trough concentration ของยาทาโครลิมุสจะสามารถลดอุบัติการณ์เกิด CNI nephrotoxicity ได้หรือไม่
5. การวัด inactive metabolite ของยาทาโครลิมุสเช่น 13-*O*-desmethyl tacrolimus ที่บริเวณเนื้อไตปลูกถ่ายหรือในปัสสาวะอาจจะเป็นการช่วยยืนยันสมมติฐานของการที่มี local tacrolimus allograft clearance ที่มากน้อยแตกต่างกันตาม allograft CYPA5 genotypes

5.5 สรุปผล

จากการศึกษานี้มีองค์ความรู้ใหม่ที่ได้รับคือในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตและได้รับยาทาโครลิมุสเป็นยากดภูมิหลักหลังการปลูกถ่ายนั้น การมี donor CYP3A5 genotype (allograft CYP3A5 genotype) ที่เป็น non-expressor genotype (CYP3A5*3/*3) จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อไตปลูกถ่ายที่เข้าได้กับ CNI nephrotoxicity ถึง 3.91 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ได้รับไตปลูกถ่ายที่มี CYP3A5 expression (CYP3A5*1/*1 และ CYP3A5*1/*3) การปรับระดับยาโดยอ้างอิงกับ donor CYP3A5 genotypes อาจจะมีประโยชน์และสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิด CNI nephrotoxicity ได้

รายการอ้างอิง

1. Mehrabi A, Wiesel M, Zeier M, et al. Results of renal transplantation using kidneys harvested from living donors at the University of Heidelberg. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* Jul 2004;19 Suppl 4:iv48-54.
2. Kramer BK, Montagnino G, Del Castillo D, et al. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin A microemulsion in renal transplantation: 2 year follow-up results. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* May 2005;20(5):968-973.
3. Casey MJ, Meier-Kriesche HU. Calcineurin inhibitors in kidney transplantation: friend or foe? *Current opinion in nephrology and hypertension.* Nov 2011;20(6):610-615.
4. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* Feb 2009;4(2):481-508.
5. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clinical pharmacokinetics.* Mar 2010;49(3):141-175.
6. Snanoudj R, Royal V, Elie C, et al. Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* Dec 2011;11(12):2635-2646.
7. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nature clinical practice. Nephrology.* Jul 2006;2(7):398-404; quiz following 404.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

8. Chen JS, Li LS, Cheng DR, et al. Effect of CYP3A5 genotype on renal allograft recipients treated with tacrolimus. *Transplantation proceedings.* Jun 2009;41(5):1557-1561.

9. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *The pharmacogenomics journal.* Feb 2015;15(1):38-48.

10. Bolbrinker J, Seeberg S, Schostak M, et al. CYP3A5 genotype-phenotype analysis in the human kidney reveals a strong site-specific expression of CYP3A5 in the proximal tubule in carriers of the CYP3A5*1 allele. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* Apr 2012;40(4):639-641.

11. Knops N, van den Heuvel LP, Masereeuw R, et al. The functional implications of common genetic variation in CYP3A5 and ABCB1 in human proximal tubule cells. *Molecular pharmaceutics.* Mar 2 2015;12(3):758-768.

12. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickeleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* Jul 2007;22(7):1963-1968.

13. Glowacki F, Lionet A, Buob D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* Sep 2011;26(9):3046-3050.

14. Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation.* May 27 2011;91(10):1098-1102.

15. Panomvana D, Traiyawong T, Towanabut S. Effect of CYP3A5 genotypes on the pharmacokinetics of carbamazepine when used as monotherapy or co-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

administered with phenytoin, phenobarbital or valproic acid in Thai patients. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques.* 2013;16(4):502-510.

16. Zhang J, Zhang X, Liu L, Tong W. Value of CYP3A5 genotyping on determining initial dosages of tacrolimus for Chinese renal transplant recipients. *Transplantation proceedings.* Nov 2010;42(9):3459-3464.
17. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* Apr 2004;5(3):243-272.
18. Henderson LK, Nankivell BJ, Chapman JR. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* Aug 2011;11(8):1570-1575.
19. Racusen LC. Protocol transplant biopsies in kidney allografts: why and when are they indicated? *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* Jan 2006;1(1):144-147.
20. Naesens M, Kuypers DR, De Vusser K, et al. The histology of kidney transplant failure: a long-term follow-up study. *Transplantation.* Aug 27 2014;98(4):427-435.
21. Knops N, Levtchenko E, van den Heuvel B, Kuypers D. From gut to kidney: transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation. *International journal of pharmaceutics.* Aug 16 2013;452(1-2):14-35.
22. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 2007;357(25):2562-2575.
23. MacPhee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation.* Jan 27 2008;85(2):163-165.

24. Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation.* Oct 27 2003;76(8):1233-1235.

25. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* Feb 2014;14(2):272-283.

26. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* Apr 2008;8(4):753-760.

27. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation.* Aug 15 2009;88(3 Suppl):S62-67.

28. Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* Dec 2001;11(9):773-779.

29. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Therapeutic drug monitoring.* Aug 2010;32(4):394-404.

30. Tang HL, Xie HG, Yao Y, Hu YF. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the CYP3A5 nonexpressers than expressers. *Pharmacogenetics and genomics.* Nov 2011;21(11):713-720.

31. Kim IW, Moon YJ, Ji E, et al. Clinical and genetic factors affecting tacrolimus trough levels and drug-related outcomes in Korean kidney transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology.* May 2012;68(5):657-669.

32. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* May 2006;34(5):836-847.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

33. Yaowakulpatana K, Vadcharavivad S, Ingsathit A, et al. Impact of CYP3A5 polymorphism on trough concentrations and outcomes of tacrolimus minimization during the early period after kidney transplantation. *European journal of clinical pharmacology*. Mar 2016;72(3):277-283.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายสุวศิน อุดมกาญจนนันท์

วันเดือนปีเกิด 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานภาพ โสด

ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์โรคไต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษาและทำงาน

พ.ศ. 2535-2546 ประถมศึกษาและมัธยมศึกษาโรงเรียนเซนต์คาเบรียล

พ.ศ. 2546-2552 นิสิตคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2552-2555 แพทย์ใช้ทุนโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี

พ.ศ. 2555-2558 แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

พ.ศ. 2558-ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ. 2552 แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)

พ.ศ. 2558 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย

สมาชิกสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University