บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบัน anticardiolipin antibodies (ACAs) ได้รับความสนใจอย่างยิ่งจากการทดสอบซึ่งใช้แต่เพียงในงานวิจัย กำลังจะเปลี่ยนไปเป็นการทดสอบในงานประจำวัน เพื่อใช้ในงานวินิจฉัยโรคหรือใช้อธิบายอาการทางคลินิก ดังนั้นการพัฒนาการทดสอบขึ้นเพื่อใช้ในงานวิทยานิพนธ์นี้ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Gharavi และคณะ(31) โดยใช้ peroxidase conjugate antihuman IgG, IgA, IgM (polyvalent) แทนการใช้ peroxidase coconjugate IgG,หรือ IgA,หรือ IgM (monovalent) เพื่อให้เหมาะสมในการใช้เป็น screening test การตรวจเฉพาะบาง isotype เช่นการใช้ conjugate antihuman IgG เป็น screening test อาจทำให้ sensitivity ของการทดสอบไม่ดีในแง่ที่อาจตรวจไม่พบบาง isotype หากจะตรวจโดยใช้conjugate monovalent ทั้ง 3 isotype จะทำให้สิ้นเปลืองเวลาและวัสดุอย่างมาก แต่การใช้ conjugate polyvalent เพื่อตรวจหา ACAs พร้อมกันทั้ง 3 isotype มีข้อเสียคือต้องนำมาตรวจแยก isotype ซ้ำเมื่อ screening test ให้ผลบวก นอกจากนี้ค่าสูงสุดของคนปกติ ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินผลบวกหรือลบ เมื่อตรวจโดยใช้ conjugate จะสูงกว่าเมื่อใช้ conjugate monovalent (ตามรูปที่ 8 และตารางที่ 6)

วิธีการตรวจ ACAs ที่ได้รับการปรับปรุงนี้สามารถนำไปใช้ในงานทดสอบประจำวันเพื่อการตรวจวินิจฉัยให้แก่ผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถปรับปรุงให้เป็น quantitative assay ได้ตามความต้องการ เกี่ยวกับความจำเพาะของการทดสอบนั้น ผลการตรวจ ACAs ในซีรั่มผู้ป่วย multiple myeloma ที่ให้ผลการทดสอบ ACAs ปกติ เป็นการแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สิ่งที่ conjugate ไปจับอยู่นั้นเป็น immunoglobulin ที่จำเพาะต่อ cardiolipin จริง ซึ่งทำให้ conjugate จับได้จำนวนมากพอและแสดงปฏิกิริยาระหว่าง enzyme-substrate ต่อมา ในระดับสูงกว่าคนปกติ

Inhibition study เป็นการยืนยันถึงความจำเพาะของการทดสอบ อีกวิธีหนึ่ง เพื่อแสดงให้เห็นว่า immunoglobulin ที่ติดอยู่ในหลุมทำให้ enzyme conjugated antihuman globulin ไปเกาะติดอีกทีและ ทำให้เกิดสีจากการย่อย substrate ต่อมานั้น เป็นการจับอย่างจำเพาะต่อ cardiolipin (Cl) จึงทำให้ binding activity ต่อ Cl ลดลง เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ cardiolipin เสียครั้งหนึ่งก่อน

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาระดับ ACAs ในคนปกติจำนวนมากถึง 111 คน โดยหาแบบรวมทุก isotype เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินในการตรวจกรอง และหาค่าปกติของแต่ละ isotype เพื่อจำแนก isotypeของ ACAs อีกครั้ง การตรวจคนปกติจำนวนมากทำให้ได้ค่าที่เป็นตัวแทนของคนปกติที่ดี

คนไข้ SLE ในการศึกษานี้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มาติดตามการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก ให้ผลบวก ACAs(11/81) ราย คิดเป็น 13.5% และคนไข้ SLE กลุ่มที่รับการรักษาอยู่ในโรงพยาบาลให้ผลบวก ACAs(6/19) คิดเป็น 31.5% ส่วนคนไข้ SLE (Inpatients) พวกที่มีอาการทางระบบประสาทด้วยให้ผลบวก ACA(3/9) = 33% และผู้ป่วยที่ไม่มีอาการทางระบบประสาทให้ผลบวก(3/10) = 30% แม้อัตราร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลบวก ACAs ในคนไข้ SLE ที่กำลังรับการรักษาอยู่ในโรงพยาบาลจะให้ผลบวก ACAs สูงกว่าผู้ป่วย SLE (Outpatients) แต่ความแตกต่างในค่าเฉลี่ย OD ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม SLE ที่มาติดตามการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก ก็สามารถพบ ACAs ระดับสูงได้ในคนไข้บางราย ดังนั้นดูเหมือนความถี่ของการพบ ACAs ในคนไข้ 2 กลุ่มนี้ น่าจะให้ความหมายดีกว่าในแง่ที่ ACAs อาจมีความสัมพันธ์กับการมีอาการรุนแรงในคนไข้เหล่านี้ แต่กลุ่มผู้ป่วย SLE ที่กำลังรับการรักษาในโรงพยาบาลที่นำมาทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงยังไม่อาจนำมาวิเคราะห์ได้ชัดเจนมากนัก จากรายในต่างประเทศพบว่า แม้ ACAsจะมีความสัมพันธ์กับอาการอุดตันในเส้นเลือด การแท้งและการมีเกร็ดเลือดต่ำ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับ activity หรือความรุนแรงของโรค

ความชุกของ ACAs ในคนไข้ SLE ที่เคยมีผู้อื่นรายงานไว้แตกต่างกันมากตั้งแต่ 20-80%(24,88,58,57) ความชุกที่แตกต่างกันอย่างมากมายนี้ มีสาเหตุสำคัญอยู่ 2 ประการ

คือ:- 1) กลุ่มผู้ป่วยถูกคัดเลือกมาศึกษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 2) ความไวของการทดสอบซึ่งแตกต่างกันมากในแต่ละรายงาน โดยแตกต่างกันทั้งวิธีการทำการทดสอบ และวิธีการ ตัดสินผล บวก-ลบ ซึ่งตัดสินตั้งแต่ >2SD->5SD Loizou[28] ให้ความเห็นต่อความแตกต่างของอุบัติการณ์นี้ไว้ว่า เป็นเพราะการตัดสินผลบวกใช้วิธีต่างๆกัน ส่วน Sturfelt[87] กล่าวว่าการคัดเลือกผู้ป่วยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับอาการบางอย่าง ทำให้ได้รายงานที่มีอุบัติการณ์สูง อุบัติการณ์ ACAs ในประเทศไทยยังไม่มี รายงานมาก่อน แต่เปรียบเทียบกับรายงานต่างประเทศ พบว่าเปอร์เซ็นต์ในรายงานนี้ ค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเป็นเพราะความไวของการทดสอบนี้ค่อนข้างต่ำ หรือเป็นความแตกต่างของกลุ่มที่นำมาทำการศึกษา อย่างไรก็ดีการทดลองนี้มีความจำเพาะดี ถ้าดูจากกลุ่มควบคุมที่เป็นคนไข้ multiple myeloma ซึ่งให้ค่า ACAs ปกติ ค่อนข้างต่ำ แต่รายงานในต่างประเทศพบ false positive ในคนไข้ hypergammaglobulinemia ซึ่งมีผู้วิจารณ์ไว้ว่าอาจเป็นเพราะการทดสอบมีความไวสูง จึงให้ผลบวกปลอมได้[55]

คนไข้แพ้วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่เตรียมจากสมองแกะ (Semple vaccine) เป็นคนไข้ในกลุ่ม accidental allergic encephalomyelitis (AAE) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ดีของโรคทางระบบประสาทที่มี immunopathogenic basis การพบ ACAs ในคนไข้แพ้วัคซีนในกลุ่มที่มีอาการมาก มากกว่ากลุ่มที่มีอาการน้อย และไม่มีอาการอย่างชัดเจน เป็นข้อมูลที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ถึงบทบาท ACAs ในโรค autoimmune disease โดยเฉพาะต่อระบบประสาท ACAs ในผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจมีความสำคัญเช่นเดียวกับ Anti-MBP ดังที่รายงานไว้[18] เกี่ยวกับหลักฐานสนับสนุนอีกประการอยู่ที่การพบ ACAs และ Anti-MBPในระดับสูงตั้งแต่อาการเริ่มต้นและค่อยๆลดลง ในระยะเวลาต่อมาเมื่ออาการดีขึ้น แต่การที่ทั้งระดับ ACAs และ Anti-MBP กลับสูงขึ้นในระยะ convalescent (>10วัน แสดงว่า antibody ดังกล่าว ทั้งสองชนิดไม่ได้เป็นตัวการในด้านความรุนแรงของโรคทั้งหมด แต่อาจมีขบวนการอื่น เช่นระบบ CMI ด้วย โดยที่ antibody เป็นตัวส่งเสริมความรุนแรงของโรคเท่านั้น บทบาทของ ACAs อาจต่างกับ Anti-MBP ก็ได้ โดยที่ ACAs อาจเป็นตัวรบกวน blood brain barrier และทำให้ Anti-MBP หลั่งไหลไปทำลายเนื้อสมองโดยง่าย จากข้อมูลดังกล่าว ไม่สนับสนุนว่า ACAs ทำลายเนื้อสมองได้โดยตรง แต่ไม่อาจเป็นหลักฐานที่คัดค้านได้ชัดเจน ทั้งนี้ Levine และ Welch [36] ได้กล่าวไว้ในบทบรรณาธิการ ถึงผู้ป่วยโรคระบบประสาท ที่ไม่ได้เกิดจาก

การอุดตันของเส้นเลือดในระบบประสาทส่วนกลาง และพบ ACAs ร่วมด้วยนั้น เป็นไปได้ว่า ACAsซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ phospholipid ได้หลายชนิดอาจจะไปจับกับ phospholipid ที่สมอง (cerebral phospholipids) และเป็นไปได้เช่นกัน ที่จะจับกับ PL ที่ blood brain barrier ทำให้เราต้องเฝ้าสังเกตุ และตรวจหาหลักฐานทางคลินิค (clinical evidence) ที่แสดงถึงความผิดปกติของไขสันหลัง(myelopathy) หรือมีการทำลายเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มเส้นประสาท (demyelination) ในคนไข้ที่ตรวจพบ ACAs

การที่คนไข้บางรายให้ผล ACAs ขึ้นๆลงๆ (fluctuation) ไม่คงที่ในคนไข้บางราย คนไข้ 19/25 รายที่ได้รับการเจาะเลือดมากกว่า 1 ครั้ง และ 6/19 รายนี้ให้ผลขึ้นๆลงๆ ไม่คงที่ Kalunian และคณะ(88) เคยให้ข้อสังเกตเช่นเดียวกันนี้ คือมีผู้ป่วย 3 ใน 10 รายมีความเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกัน 1 ใน 3 จากที่เคยตรวจพบในตอนแรกพบว่าหายไปภายใน 2 เดือน ภายหลังได้รับยา cyclophosphamide แต่อีก 2 ราย มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงโดยไม่มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรค (disease manifestation) Sturfelt(87) รายงานคนไข้ SLE รายหนึ่งในกลุ่มที่เขาศึกษา มีระดับ ACAs ลดลงเป็นปกติเมื่อให้ high dose prednisolone ระดับของ ACAs ในคนไข้ซึ่งมีพยาธิสภาพทางสมอง ประสาท และปลายประสาท โดยมีสาเหตุมาจาก immunopathogenic basis ได้แก่โรค Guillain Barre syndrome, multiple sclerosis และ post-infectious encephalitis ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะพบเพียง 23.5% แต่ก็พบว่ามีความแตกต่างกับ ACAs ในคนไข้ที่มีการติดเชื้อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS infection) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Colaco และคณะ(8) รายงานการตรวจพบ ACAs ในโรคระบบประสาทต่าง ๆ ได้แก่ myasthenia gravis,Lambert Eaton myasthenic syndrome และmultiple sclerosis แต่ไม่พบใน GBS และพบ IgM มากกว่า IgG ซึ่งเขาได้เสนอความคิดว่า ในโรคเหล่านี้ membrane antigen ที่อวัยวะซึ่งเกิดพยาธิสภาพอาจมีโครงสร้างคล้ายกับ bacterial antigen ซึ่งมีอยู่ทั่วๆไป และทำให้เกิดการสร้าง autoantibodies ซึ่งโดยกลไกการ cross-reaction ระหว่าง antibody ต่อจุลชีพกับ autoantigen

นอกจากนั้นแม้ว่า ACAs อาจจะไม่มีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพโดยตรง แต่ตัว

ACAs อาจจะสามารถจับกับ immunologically active cell membrane ได้และสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบอิมมูนได้ต่อไปในที่สุด

นอกจากนี้ ACAs ยังตรวจพบได้ใน CNS infection ได้ 4 ใน 31 ราย เป็นวัณโรค 2 ราย (2 ใน 7) และ virus infection 2/14 ราย ซึ่งน่าสังเกตว่าเป็น rabies ทั้ง 2 ราย ซึ่งควรเป็นเรื่องที่นำมาศึกษาต่อ ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วย rabies ก็มี autoimmune phenomenon อยู่ด้วย(20) Vaarala และคณะ(66) ได้รายงานการตรวจพบ ACAs ใน acute infection ถึง 26% แต่แอนติบอดีที่ตรวจพบ มีเฉพาะรายที่ติดเชื้อ chicken pox เท่านั้น ที่ถูก inhibit ได้ด้วย cardiolipin liposome ซึ่งดูเหมือนว่า ACAs ที่พบในรายงานนี้มีผลบวกปลอมมาก น่าสนใจว่า ACAs ที่ตรวจพบในสภาวะต่างๆเหล่านี้มี binding activity pattern ต่อ phospholipids ต่างๆแตกต่างกันบ้างหรือไม่อย่างไร

isotype ของ ACAs ที่ตรวจพบในคนไข้ทั้งกลุ่ม SLE, คนไข้แพ้วัคซีนและคนไข้โรคต่างๆ ทางระบบประสาทส่วนใหญ่จะพบ IgG ในเกือบทุกราย บางรายมี IgA หรือ IgM หรือพบทั้ง 3 isotype พร้อมกัน Gharavi และคณะ(31) ตรวจพบ IgG ACA ถึง 90% ของกลุ่มที่ให้ผลบวก ACAs และอีก 10%ไม่พบ IgG พบแต่ IgA และ/หรือ IgM และไม่พบว่า IgM ACA มีความสัมพันธ์กับอาการ thrombosis, thrombocytopenia และ recurrent fetal loss แต่ใน immunologic disease ส่วนใหญ่เป็น IgM มากกว่า IgG

รายงานจากผู้วิจัยหลายคณะ (57,58,63) ส่วนใหญ่พบ IgG ACAs เป็นพื้น และมี IgA และ IgM ร่วมด้วยเป็นบางราย Frampton และคณะ(8) รายงานการตรวจพบ IgA ACA ในคนไข้ GBS ถึง 23% โดยพบว่า IgG ACAs มีความสัมพันธ์กับระยะที่อาการของโรครุนแรงที่สุด (associate with peak disease severity)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้โดยเฉพาะในคนไข้แพ้ Semple vaccine อาจเป็นไปได้ว่า ACAs อาจมีบทบาทในความผิดปกติของ blood brain barrier เพราะพบมีความสัมพันธ์กันระหว่างระดับ ACAs กับความรุนแรงของอาการแพ้และในกลุ่มของ

immunopathogenic ก็พบว่าค่าเฉลี่ยของ ACAs ในกลุ่มนี้สูงกว่ากลุ่มที่เกิดจากสาเหตุอื่น อย่างไรก็ดี ข้อมูลจากคนไข้ทั้ง 2 กลุ่ม แม้จะให้ความหมายที่สนับสนุนว่า ACAs มีความสัมพันธ์กับโรค autoimmune ที่มีผลต่อระบบประสาท แต่ยังไม่มีหลักฐานว่า ACAs อาจเป็นตัวการก่อโรค หรืออาจเป็นผลจากพยาธิสภาพเหล่านั้นก็ได้ อย่างไรก็ตาม การที่พบ ACAs ในโรคทางระบบประสาทที่มี Immunopathogenic basis เป็นจำนวนไม่มากนัก แสดงว่า ACAs ไม่น่าจะเป็นตัวการร่วมในการก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เหล่านี้ และการรบกวน blood brain barrier ในโรคเหล่านี้อาจชักนำให้เกิดได้จากหลาย machanism ด้วยกัน

ปัญหาหนึ่งที่เป็นที่สนใจของผู้ที่ศึกษาเรื่อง anticardiolipin antibodies ก็คือ ACAs เป็น antiphospholipid antibodies ชนิดเดียวกับที่พบในคนไข้ syphilis หรือไม่ ในคนไข้ autoimmune disease นั้น พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ชัดเจน ระหว่างการพบ ACAs และการเกิด thrombosis[35] thrombocytopenia[4] และ recurrent fetal loss[78] อาการเหล่านี้ไม่พบเป็นอาการแทรกซ้อนในคนไข้ syphilis ด้วย ในการศึกษานี้พบว่าคนไข้ SLE 17 ราย ซึ่ง ACAs ให้ผลบวก มีรายเดียวที่ VDRL agglutination ให้ผลบวกเพียงต่ำๆ (reactive 1:1) ได้นำวิธีการตรวจ VDRL โดยวิธี ELISA ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีของ Harris และคณะ[58] มาศึกษา binding activity ของซีรั่มคนไข้ SLE ที่ ACAs positive และซีรั่มคนไข้ syphilis ต่อ VDRL-Ag.และ cardiolipin พบว่า antiphospholipids antibodies ในคนไข้ syphilis และ คนไข้ SLE มี binding activity ต่อ antigen ทั้งสองชนิด ด้วยรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยซีรั่มผู้ป่วย syphilis จะจับกับ VDRL-Ag. ได้ดีที่สุดแต่จับกับ cardiolipin และ negatively charged phospholipid ได้น้อยมาก แต่ซีรั่มผู้ป่วย SLE จะจับกับ cardiolipin ได้ดีกว่า แต่จับกับ VDRL-Ag ได้เพียงเล็กน้อย Harris และคณะ[31] ได้ศึกษาความแตกต่างนี้ โดยดูความสามารถของ phospholipid หลายชนิด ในการยับยั้งการจับของซีรั่มผู้ป่วย SLE และ syphilis ต่อ VDRL Ag และ cardiolipin พบว่าซีรั่มผู้ป่วย syphilis ถูกยับยั้งด้วย VDRL-Ag ได้ดีกว่า cardiolipin และถูกยับยั้งด้วย negatively charged phospholipid อื่นๆ ได้แก่ phosphatidic acid และ phosphatidylserine ได้บ้างไม่มาก (ไม่เกิน 15%) แต่ซีรั่มผู้ป่วย SLE ถูกยับยั้งด้วย cardiolipin, phosphatidyl-serine และ phosphatidic acid ได้ดีที่สุด แต่ถูกยับยั้งด้วย VDRL Ag ได้เพียงเล็กน้อย

(ไม่เกิน 50%) Kataoka และ Nojima (61) พบว่า ในการทดสอบ VDRL ซีรั่มผู้ป่วย syphilis จับกับ cardiolipin ไม่ได้จับกับ phosphatidylcholine Harris (60) ให้ความเห็นว่า การมี phosphatidylcholine และ cholesterol อยู่ใน VDRL-Ag ด้วยจำนวนที่เหมาะสม อาจทำให้การวางตัว (conformation) ของโมเลกุล cardiolipin เปลี่ยนแปลงไปในอันที่จะทำให้จับกับแอนติบอดีจากผู้ป่วย syphilis ได้ดีขึ้น การที่ anti-phospholipid จากผู้ป่วย autoimmune disease สามารถจับกับ negatively charged phospholipid ได้ดี อาจมีความหมายสำคัญในทางคลินิกเป็นอย่างยิ่ง เขาได้สรุปว่าแอน-ติบอดีต่อ phospholipid น่าจะแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ "syphilitic group" ซึ่งมีความจำเพาะต่อ cardiolipin ใน VDRL-Ag และ " Autoimmune group" ซึ่งทำปฏิกิริยากับ phospholipid ได้หลายชนิด