

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนปัสในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคไต

นาย วรพจน์ เจริญมตะการผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE CORRELATION BETWEEN BLOOD BLYS LEVEL AND THE SEVERITY OF LUPUS
NEPHRITIS

Mister Worapot Treamtrakanpon

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

วรพจน์ เตรียมตระการผล : การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนบลิสในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัส (THE CORRELATION BETWEEN BLOOD BLYS AND THE SEVERITY OF LUPUS NEPHRITIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.นพ. ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์, 109 หน้า.

ที่มา B cell มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคทางภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคลูปัส ข้อมูลในปัจจุบันพบว่าโปรตีนบลิสเป็น B cell activating factor ที่จำเป็นในการพัฒนา B cells และผู้ป่วยโรคลูปัสมีระดับโปรตีน บลิสในเลือดที่สูงกว่าคนปกติ นอกจากนี้มีการค้นพบว่ายา ที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนบลิส สามารถรักษาผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนได้ ดังนั้นผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสที่มีระดับโปรตีนบลิสในเลือดที่แตกต่างกันน่าจะมีความรุนแรงทางคลินิกแตกต่างกันด้วย สำหรับโปรตีนเอพริลเป็น B cell activating factor อีกตัวซึ่งมีผลต่อ B cell ต่างจากโปรตีนบลิส ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนบลิสและโปรตีนเอพริลในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัสเพื่อในอนาคตจะเป็น biomarker ที่สำคัญในการพยากรณ์โรคได้

วิธีการศึกษา การศึกษาที่ทำในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสจำนวน 52 ราย ซึ่งได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาทั้งสิ้น โดยจะมีการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับโปรตีนบลิสและเอพริลในเลือดด้วยเทคนิค ELISA และตรวจค่า lab เบื้องต้น serology และตรวจปัสสาวะควบคู่ไปด้วย ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาตามวิธีมาตรฐานและได้รับการติดตามการรักษาอย่างต่อเนื่อง

ผลการศึกษา ระดับโปรตีนบลิสในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสมีระดับต่ำกว่าผู้ป่วยไตอักเสบในระยะสงบอย่างไม่มีนัยสำคัญ (1.32 ± 1.06 และ 1.97 ± 1.10 ; p-Value = 0.094) ขณะที่ระดับโปรตีนเอพริลในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสกลับพบระดับที่สูงกว่าแต่ไม่มีนัยสำคัญ (4.10 ± 2.09 และ 2.90 ± 0.50 ; p-Value = 0.317) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับโปรตีนบลิสไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงทางพยาธิสภาพไต renal SLEDAI และระดับ anti-dsDNA แต่กลับพบความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระดับคอมพรีเมนต์ ($R = 0.621$; p-Value = 0.002) การได้สเตียรอยด์ปริมาณต่ำ ($R = 0.543$, p-Value < 0.001) และการได้ยา mycophenolate ปริมาณสูง ($R = 0.369$; p-Value = 0.007) ขณะที่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีนเอพริลในเลือดไปในทางเดียวกันกับระดับโปรตีนรั่วในปัสสาวะ ($R = 0.438$; p-Value = 0.002) activity index ($R = 0.335$; P = 0.017) และระยะเวลาที่เป็นโรคลูปัส ($R = 0.353$; P = 0.017)

สรุปผลการศึกษา ระดับโปรตีนบลิสในเลือดสัมพันธ์กับอาการทาง systemic ของโรคลูปัสขณะที่ระดับโปรตีนเอพริลในเลือดสัมพันธ์กับไตอักเสบจากโรคลูปัส

ภาควิชา..... อายุรศาสตร์.....

ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552

.....

5174819430 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS : LUPUS NEPHRITIS/ B cell / BLyS / APRIL / RENAL SLEDAI / ELISA / MYCOPHENOLATE
/ ANTI-dsDNA

WORAPOT TREAMTRAKANPON : THE CORRELATION BETWEEN BLOOD BLyS LEVEL AND
THE SEVERITY OF LUPUS NEPHRITIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.YINGYOS
AVIHINGSANON, M.D. 109 pp.

Background: BLyS and APRIL are tumor necrosis factor-family cytokines that play an important role in generating and maintaining the mature B-cell pool. Elevated BLyS levels have been implicated in lupus nephritis, and BLyS antagonism has shown to be an effective therapeutic modality in lupus patients. The aim of the study was to assess the correlation between blood BLyS level and the severity of lupus nephritis. APRIL that is thought to be counterbalance of the autoimmunogenic effects of BLyS was also evaluated too.

Methods: 52 lupus nephritis patients that underwent kidney biopsy were evaluated prospectively for at least 6 mo. Renal SLEDAI score, anti-dsDNA, complements, blood BLyS and APRIL on biopsy day were assessed for correlation with pathological score. Analysis using a multivariate model was used to adjust the effect of immunosuppressive therapy. All patients are treated with the standard regimen, and will be monitored continuously.

Results: Blood BLyS level in the active lupus nephritis patients were lower than the remission group, whereas blood APRIL level in the active lupus nephritis patients were higher. BLyS level was not correlated with renal pathology, renal SLEDAI and anti-dsDNA, except for the complement level, low dose steroid usage and high dose mycophenolate usage. Surprisingly, APRIL level was instead correlated well with activity index, proteinuria and duration of disease.

Conclusions: Blood BLyS levels correlate with systemic lupus whereas blood APRIL levels correlate with lupus nephritis.

Department..... Medicine.....

Student's Signature.....

Field of Study..... Medicine.....

Advisor's Signature

Academic Year... 2009.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ด้านโรคไตอักเสบจากลูปัส และการทำวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียง ตั้งสง่า ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เขียมอ่อน ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ ผู้ให้คำปรึกษาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ทรงเกียรติ หลิวสุวรรณ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ ณ์รัฐฉติ ไทวนำชัย เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ พิสุทธิ กตเวทิน เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ แพทย์หญิง ปวีณา สุสัณฐิตพงษ์ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย

ขอขอบคุณ แพทย์หญิง อภิรดี ทองบุญ เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์ และเชื้อเพื่อข้อมูลที่เป็ประโยชน์สำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคไตทุกท่านผู้ให้ความช่วยเหลือและร่วมดูแลรักษาผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสที่เข้าร่วมการวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไตทุกท่านรวมถึง ทีม Lab Lupus อ. ยิ่งยศ ตีก อปร ชั้น 9 ซึ่งคอยช่วยเหลือในขั้นตอนต่างๆ ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการและให้กำลังใจสนับสนุนการวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ตึกธนาคารกรุงเทพ 3 ซึ่งคอยช่วยเก็บ specimen

ขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ สมาชิกในครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ ทูนิวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการสนับสนุนทุนการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	3
ปัญหาทางจริยธรรม.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
โรคไตอักเสบลูปัส.....	5
พยาธิกำเนิดของโรค.....	5
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ B ₁ LyS และ B lymphocyte กับโรคลูปัส.....	8
การจัดแบ่งความรุนแรงของโรคตามลักษณะทางพยาธิวิทยาและการดำเนินโรค.....	8
การประเมินความรุนแรงของโรคในทางคลินิก.....	40
การประเมินจาก clinical activity score.....	40
ปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ.....	42
การตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยา.....	44

	หน้า
บทที่ 3	
วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
ประชากร.....	46
การสังเกตและการวัด.....	48
การวัดระดับ BLyS และ APRIL ในเลือดด้วยวิธี ELISA.....	48
การรวบรวมข้อมูล.....	52
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
บทที่ 4	
ผลการวิจัย.....	55
ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย.....	55
ผลการศึกษา.....	57
บทที่ 5	
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อจำกัด และข้อเสนอแนะ.....	71
สรุปผลการวิจัย.....	71
อภิปรายผลการวิจัย.....	71
ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	74
ข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	100
ข้อมูล คำชี้แจง.....	101
หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย.....	104
เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยสำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โรคที่มีหลักฐานแสดงความผิดปกติของ B cell.....	13
2.2	การรักษาโรคคอไตอิมมูนด้วยวิธีปรับเปลี่ยนการทำงานของ B cell.....	15
2.3	การตอบสนองต่อยาต่างๆของ B cell ในแต่ละระยะ.....	16
2.4	คุณสมบัติของ BLyS family ligands และรีเซ็ปเตอร์.....	20
2.5	การแสดงออกและหน้าที่ของ BLyS family ของ primary B cell.....	28
2.6	การแสดงออกและหน้าที่ของ BLyS family ของ antigen-experienced B cell.....	30
2.7	หน้าที่ของ BLyS family โดยสรุป.....	32
2.8	การรักษาผู้ป่วยโรคลูปัสด้วย BLyS antagonism.....	36
2.9	การจัดกลุ่มของ lupus nephritis โดย International Society of Nephrology / Renal Pathology Society 2003.....	39
2.10	การให้คะแนนตาม SLEDAI-2K score.....	41
2.11	ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงความรุนแรง (activity index) และความเรื้อรัง (chronicity index) ของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัส.....	45
4.1	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัส.....	56
4.2	ข้อมูลผลการรักษาของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัส.....	59
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่าง pathological score, lupus activity parameters และ ประวัติการรักษาของผู้ป่วย.....	61
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่าง BLyS และ APRIL ในเลือด lupus activity parameters, pathological score และประวัติการรักษาของผู้ป่วย.....	62
4.5	ระดับ BLyS ในเลือดก่อนและหลังได้ยาสูตร mycophenolate	65
4.6	ความไวและความจำเพาะของการใช้ระดับ APRIL ในเลือดและการใช้ปริมาณ โปรตีนรั่วในปัสสาวะร่วมในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตร มาตรฐานที่ 6 เดือน.....	68
4.7	ระดับ APRIL ในเลือดและลักษณะทางพยาธิวิทยา.....	70

สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	กลไกพยาธิกำเนิดของโรค lupus.....	6
2.2	วัฏจักรชีวิตของ B cell.....	10
2.3	หน้าที่ของ B cell ในระบบภูมิคุ้มกัน.....	11
2.4	กลไกการทำลาย B cell ของยา Rituximab.....	17
2.5	การแสดงออกของ BLYS family บน B cell.....	21
2.6	ลำดับอิมูโนแอสิตของ Human BLYS และ TNF family ตัวอื่น.....	22
2.7	รีเซปเตอร์ของโปรตีน BLYS และ APRIL.....	24
3.1	การตรวจระดับ BLYS ในเลือดโดยวิธี ELISA.....	49
3.2	การเจือจาง calibrator diluent.....	50
3.3	standard curve จากการเจือจาง calibrator diluent.....	50
3.4	การตรวจระดับ APRIL ในเลือดโดยวิธี ELISA.....	51
4.1	ระดับ BLYS ในเลือดระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active และ inactive.....	58
4.2	ระดับ APRIL ในเลือดระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active และ inactive.....	58
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพรีเมนต์ C3.....	63
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพรีเมนต์ C4.....	63
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพรีเมนต์ CH50.....	64
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและปริมาณ prednisolone ที่ผู้ป่วยได้รับอยู่ขณะได้รับการตรวจขึ้นเนื้อไต.....	64
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดและ activity index.....	65
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดและปริมาณโปรตีนรั่วใน ปัสสาวะต่อวัน.....	66
4.9	ROC curve ของระดับ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่ทำการตรวจขึ้นเนื้อไตใน การพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือน.....	67
4.10	ระดับ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่ทำการตรวจขึ้นเนื้อไตในการพยากรณ์ ความล้มเหลวของการรักษา.....	68
4.11	ระดับ APRIL ในเลือดและลักษณะทางพยาธิวิทยา.....	69

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AI	Activity Index
Anti-dsDNA	Anti-double stranded DNA
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
BCMA	B Cell Maturation Antigen
BCR	B Cell Receptor
BLyS	B Lymphocyte Stimulator
BR3/BAFFr	B cell Activating Factor of the TNF Family receptor
CAML	CAlcium-signaling Modulating and cyclophilin Ligand
CD	Cluster Designation
CI	Chronicity Index
CRD	Cystein rich domain
CRP	C-Reactive Protein
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESRD	End Stage Renal Disease
FDC	Follicular Dendritic Cells
GC	Germinal Center
GFR	Glomerular Filtration Rate
Ig	Immunoglobulin
IL	InterLeukin
ISN/RPS	International Society of Nephrology / Renal Pathology Society
MHC	Major HistoCompatibility
mAb	monoclonal Antibody
NF- K B	Nuclear Factor Kappa B
NMDA	N-Methyl-D-aspartic Acid
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
TD	T-Dependent response
TI	T-Independent response

TNF	Tumor Necrotic Factors
TACI	Transmembrane Activator and CAML Interactor
TRAFs	TNF Receptor-Associated Factors
UPCR/UPCI	Urine Protein Creatinine Ratio/Index

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rational)

อาการทางไตในผู้ป่วยโรคไตเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญที่ต้องได้ยากดภูมิคุ้มกันที่ปัจจุบันการรักษาสู่มาตรฐานสามารถควบคุมโรคได้ ยิ่งถ้าเราทราบว่าอาการทางไตกำเริบขึ้นเร็วเท่าไร รุนแรงเท่าไร จะทำให้เริ่มการรักษาได้เร็วและเหมาะสมยิ่งขึ้น และเกิดภาวะไตวายเรื้อรังน้อยลงอีกด้วย ขณะนี้ยังไม่มีตัวชี้วัดที่แม่นยำและเหมาะสมพอในการทำนายอาการทางไตของผู้ป่วยโรคไต ทั้งในแง่การกำเริบของอาการทางไต ความรุนแรง และการตอบสนองต่อการรักษา มีหลายการศึกษาที่พยายามหาคำตอบเหล่านี้เช่น การวัด mRNA ของ chemokines และ growth factors ในปัสสาวะ การใช้เทคนิค gel electrophoresis หรือ desorption/ionization ในการวัดโปรตีนตัวใหม่ๆในปัสสาวะ นอกจากนี้จากหลักฐานที่แสดงถึง immune tolerance ที่ผิดปกติเป็นเหตุของการเกิดโรคไต มีการวัด function และปริมาณ protein ที่ express จากการทำงานของ T regulatory lymphocytes พบว่าระดับ FOXP3 mRNA ในเลือดที่สูงเป็นตัวพยากรณ์โรคที่ดีในผู้ป่วยโรคไต

โดยพยาธิกำเนิดของโรคไต เราทราบว่าหัวใจของการเกิดโรคคือ การเพิ่มขึ้นของ autoantibody ซึ่งมีปฏิกิริยาต่อ self antigen มากมาย มีหลายการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่าโรคไต มีการทำงานของ B lymphocyte ที่ผิดปกติ การรักษาค่าปัจจุบันมุ่งที่กำจัดหรือทำให้ activated B cell ไม่ทำงานเช่น plasmapheresis, anti-CD20 รวมทั้งยาใหม่ที่ block receptor ของ cytokine กลุ่ม TNF เช่น Belimumab (human BLyS mAb) หรือ Atarcept (soluble TACI Immunoglobulin G) เป็นต้น

TNF (Tumor Necrotic factor) family ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็น ligands และเป็น receptors ในการกระตุ้นและควบคุมโปรแกรม cell death ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ช่วงสองทศวรรษนี้มีการค้นพบ ligands ตัวใหม่ 2 ตัวชื่อ BLyS (B lymphocyte stimulator) และ APRIL (A proliferation-inducing ligand) ซึ่งเป็น B cell activating factors คู่แรก การค้นพบดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาการรักษากลุ่มโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและโรค autoimmune โดยการไปบล็อก ligand หรือ receptor ของ ligand ข้างต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของ ligand overexpression ในผู้ป่วยรูมาตอยด์และผู้ป่วยโรคไต

ด้วยเหตุผลนี้เอง ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ BlyS และ APRIL ในเลือดและปัสสาวะกับความรุนแรงของการกำเริบโรคไตลูบัสในผู้ป่วยที่สมควรได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต รวมถึงช่วงเวลาที่ดีติดตามหลังการรักษา เพื่อช่วยในการทำนายความรุนแรงของโรคและตัดสินใจการรักษาเร็วขึ้น และใช้ติดตามดูผลการตอบสนองต่อการรักษาอีกด้วย

1.2 คำถามการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary research question)

ระดับ BlyS ในเลือดมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการกำเริบโรคไตลูบัสในผู้ป่วยที่สมควรได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตหรือไม่

คำถามรอง (Secondary research question)

ระดับ BlyS ในเลือด มีความสัมพันธ์กับการกำเริบและการตอบสนองต่อการรักษาของภาวะไตอักเสบในผู้ป่วยลูบัส

ระดับ BlyS ในเลือด มีความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์อื่นของโรคเช่น ระดับ anti-dsDNA, complements, serum creatinine, ระดับ APRIL ในเลือดและ activity index จาก biopsy

ระดับ BlyS ในเลือด มีความสัมพันธ์กับการเสื่อมถอยของไตในระยะยาว

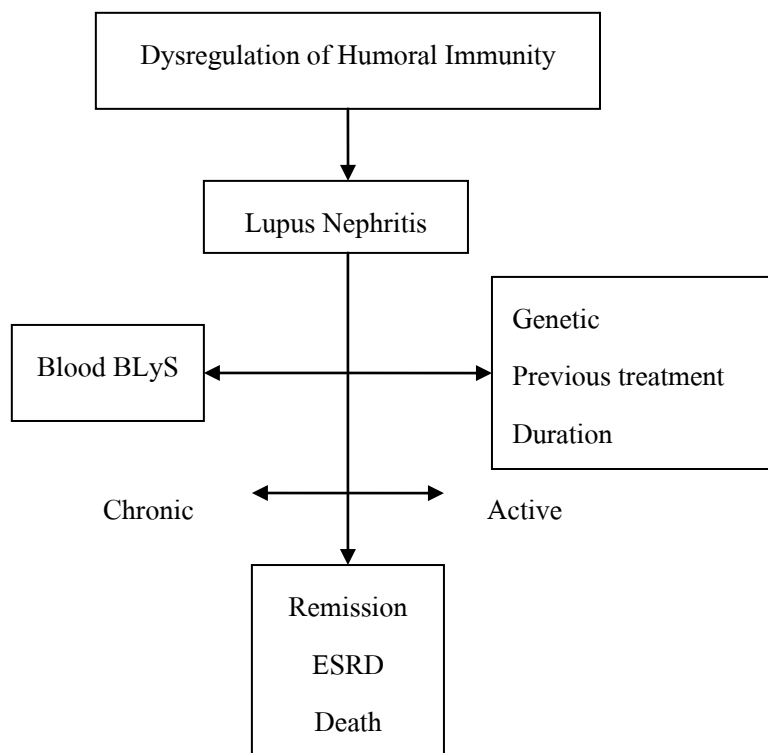
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ BlyS ในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูบัส

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ BlyS ในเลือดกับการกำเริบและการตอบสนองต่อการรักษาของภาวะไตอักเสบในผู้ป่วยลูบัส รวมถึงความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์อื่นของโรค

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ BlyS ในเลือดกับการเสื่อมถอยของไตในระยะยาว

1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

ใช้รูปแบบการวิจัยแบบ cross-sectional descriptive study

- คัดเลือกผู้ป่วยโรคลูปัสซึ่งได้รับการวินิจฉัยเข้าได้ตามเกณฑ์ของ American College of Rheumatology และเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจติดตามการรักษาที่รพ.จุฬาลงกรณ์ โดยผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางปฏิบัติการว่าอาจมีการกำเริบของไต โดยผู้ป่วยจะได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาเพื่อการวินิจฉัย
- นำตัวอย่างเลือดจำนวน 5 ซีซี ใส่ tube EDTA blood เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้จากการเจาะเลือดผู้ป่วยในขั้นตอนการเตรียมตัวก่อนรับการเจาะไต
- วัดระดับ BLYS และ APRIL ในเลือดโดยนักเทคนิค
- วัดระดับครีอะตินินในเลือด
- อ่านผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตและประเมิน activity index และ chronicity index โดยพยาธิแพทย์เฉพาะด้านท่านเดียวที่ไม่ทราบ clinical ของผู้ป่วย โดยอิงตาม the classification of glomerulonephritis in SLE revisited ของ ISN/RIS 2003 โดยรายงานทั้ง class และ activity index
- วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย

1.6 ปัญหาทางจริยธรรม

งานวิจัยนี้มีหลักฐานสนับสนุน คาดว่าจะเกิดผลดีมากกว่าผลเสียต่อตัวอย่าง(ถูกเจาะเลือด) ผู้ป่วยทุกคนให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (inform consent) หลังจากดำเนินการวิจัย อธิบายวัตถุประสงค์ ประโยชน์ที่ได้รับ และอันตรายที่อาจเกิดขึ้นซึ่งคาดว่าไม่น่าจะมีปัญหาทางจริยธรรม

1.7 ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำผลการศึกษานี้ไปใช้ในการทำนายความรุนแรงของโรคและตัดสินใจการรักษาเร็วขึ้นโดยเฉพาะกรณีที่คนไข้ไม่อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำ kidney biopsy ได้ นอกจากนี้ยังใช้ติดตามดูผลการตอบสนองต่อการรักษาอีกด้วย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคไตอักเสบรูมาติก (Lupus nephritis)

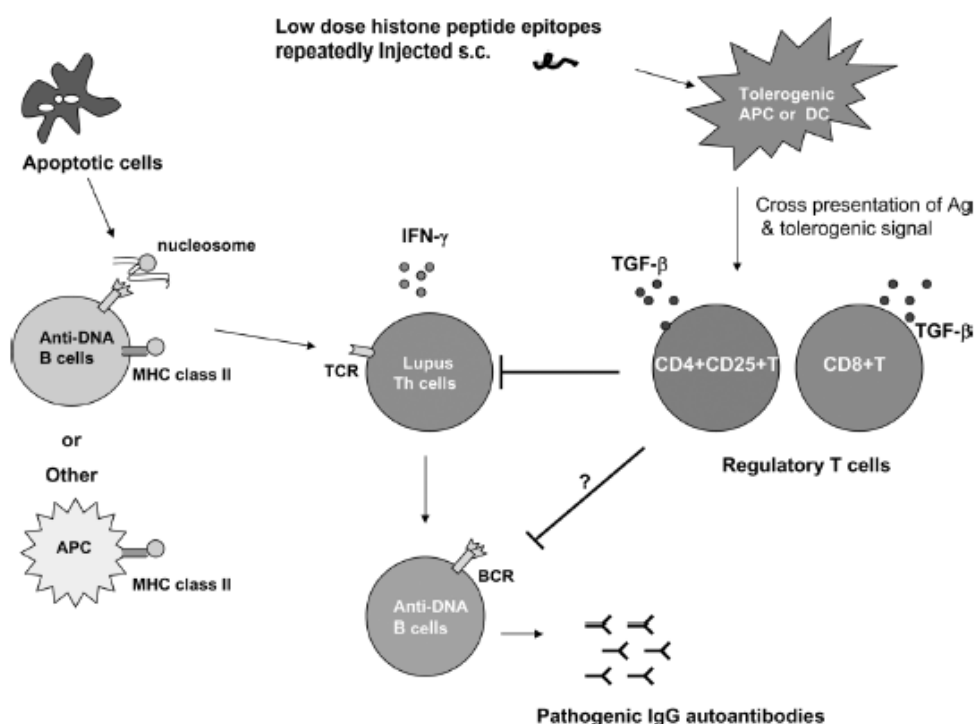
โรคเอสแอลอีหรือโรคไตอักเสบรูมาติกเป็นโรคของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์เนื้อเยื่อของตนเองได้หลายระบบหลายอวัยวะ ไตอักเสบจากโรคเอสแอลอีหรือไตอักเสบรูมาติก เป็นอวัยวะที่พบการอักเสบและกำเริบได้บ่อย ส่งผลต่อผู้ป่วยทั้งด้านร่างกาย เกิดความเจ็บป่วยทุพพลภาพรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ส่งผลด้านจิตใจ เกิดความทุกข์ทรมานจากความเจ็บป่วยเรื้อรังหรือมีความผิดปกติทางอารมณ์จากตัวโรคและภาวะแทรกซ้อนจากการรักษา นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อครอบครัวและสังคมของผู้ป่วย

โรคไตอักเสบรูมาติกพบประมาณ 50% ของผู้ป่วยโรคไตอักเสบรูมาติก อาการทางไตมีความรุนแรงต่างๆ กัน การประเมินความรุนแรงของการกำเริบของโรค นิยมใช้ SLEDAI score (The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) ซึ่งประเมินจากอาการทางคลินิกหรือใช้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น ค่าระดับครีอะตินินในเลือด ระดับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ เป็นต้น ปัญหาในปัจจุบันพบว่าไม่สามารถแยกสาเหตุของผลความผิดปกติของการตรวจทางห้องปฏิบัติการว่าเกิดจากโรคที่กำเริบ หรือเป็นผลจากกระบวนการอักเสบเรื้อรังที่เกิดขึ้นแล้ว ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความรุนแรงมากน้อยต่างกันและการรักษาก็แตกต่างกันอยู่กับระดับความรุนแรงเหล่านั้นด้วย บ่อยครั้งที่ต้องอาศัยการวินิจฉัยจากการตรวจชิ้นเนื้อไตในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมีข้อจำกัดในการตรวจชิ้นเนื้อไตและบางครั้งไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวในการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยได้ทุกครั้ง ปัจจุบันจึงมีความพยายามในการคิดค้นหาเครื่องมือที่จะนำมาวินิจฉัยภาวะไตอักเสบจากโรคไตอักเสบรูมาติกที่ไวขึ้น ผู้ป่วยไม่ต้องเจ็บตัวเท่ากับการตรวจชิ้นเนื้อไตและใช้ติดตามผู้ป่วยเพื่อบอกการกำเริบหรือการตอบสนองต่อการรักษาได้อีกด้วย

2.1.1 พยาธิกำเนิดของโรค

ปัจจุบันพยาธิกำเนิดของโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีการอธิบายว่าเกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและพบหลักฐานที่แสดงถึงการมีภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเนื้อเยื่อของตนเอง (autoantibody) เกิดขึ้นโดยเฉพาะต่อ nuclear components ของเซลล์ autoantigens ที่สำคัญที่พบได้แก่ nucleosomes ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของ chromatin โดยประกอบด้วยสายของ double stranded DNA (dsDNA) จับอยู่กับ histone นอกจากนี้ยังมี autoantigens อื่นที่พบ

ร่วมด้วย ได้แก่ ส่วนของ ribonucleoproteins, Ro/SS-A, La/SS-B และ phospholipids[1, 2] เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสะสมของ immunoglobulins และ complement breakdown products ในชั้นเนื้อไตของผู้ป่วยซึ่งนำไปสู่การอักเสบเรื้อรังของไตจนอาจทำให้เกิดไตวายเรื้อรังได้ กลไกพยาธิกำเนิดโดยสรุปแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 กลไกพยาธิกำเนิดของโรคลูปัส[1]

กลไกที่ใช้อธิบายพยาธิกำเนิดของโรคลูปัสในปัจจุบัน ได้แก่

1. ความผิดปกติของ apoptosis และการกำจัด apoptotic body

apoptosis เป็นกระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ซึ่งนำไปสู่การแตกสลายของส่วนประกอบภายในเซลล์ รวมถึงนิวเคลียสของเซลล์ ในระหว่างการเกิด apoptosis นั้น โครมาตินจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เฉพาะ ทำให้เกิดการปลดปล่อย nucleosomes ออกมา พบว่า nucleosomes และ lupus antigens ชนิดอื่นเช่น ribonucleoproteins จะปรากฏอยู่บนถุงน้ำ (blebs) ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ที่เกิด apoptosis เราเชื่อว่าถุงน้ำเหล่านี้เองที่เป็นแหล่งของ autoantigens ที่สำคัญในโรคลูปัส

โดยปกติแล้ว apoptotic cells ที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดโดยเม็ดเลือดขาวชนิด macrophage

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

มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับความผิดปกติของ apoptosis การกำจัด apoptotic bodies และบทบาทของ nucleosome/ antinucleosome complexes แต่การสูญเสียภาวะ self tolerance ในโรคลูปัส ยังมีการศึกษาไม่มากนักและทฤษฎีของการเกิดโรคจากการสูญเสียภาวะ self tolerance ได้รับความสนใจมากโดยเชื่อว่าความสัมพันธ์ของภาวะดังกล่าวมีบทบาทของเซลล์ด้านภูมิคุ้มกันมาเกี่ยวข้อง โดยบทบาทหลักเกี่ยวข้องกับ regulatory T cell

2. บทบาทของ nucleosome/antinucleosome complexes[4]

การศึกษากการตอบสนองของร่างกายในผู้ป่วยโรคลูปัส พบว่ามีการตรวจพบ antinucleosome antibody ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัส และพบว่าระดับปริมาณของแอนติบอดีจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ในหนูทดลองที่ได้รับการให้ nucleosome/antinucleosome complexes เข้าไปที่ไตจะทำให้เกิดการสะสมของ immune complexes ในบริเวณของ mesangium และเกิดภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะได้ นอกจากนั้นยังมีการตรวจพบ nucleosomal antigens ในบริเวณของ glomerular basement membrane ของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสอีกด้วย[5] มีสมมติฐานว่าบริเวณส่วน histone ของ nucleosome/antinucleosome complexes ซึ่งมีประจุเป็นบวก (cationic) จะเข้าไปจับกับส่วนของ heparin sulfate molecule ของ glomerular basement membrane หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นผ่านทางระบบ complement หรือกลไกที่ไม่ได้อาศัยระบบ complement ทำให้เกิดการอักเสบของหน่วยไตตามมา

การเกิดการสร้างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของร่างกาย มีหลายทฤษฎีที่พยายามอธิบาย ได้แก่ in situ formation theory อธิบายว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นสามารถจับกับแอนติเจนที่เนื้อเยื่อไตปกติได้ (เกิดจาก cross reaction) หรือ planted antigen theory อธิบายว่ามีแอนติเจนซึ่งสามารถไปเกาะยังตำแหน่งเนื้อเยื่อไตอยู่ก่อนและเกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีให้ไปจับแอนติเจนที่เนื้อไตในภายหลัง[6]

3. บทบาทของกรรมพันธุ์[7]

จากหลักฐานการศึกษาทางพันธุกรรมในหนูที่เป็นโรค lupus พบว่าหนูที่เป็นโรค lupus ไม่จำเป็นต้องพบ dsDNA, nucleosomes หรือ nuclear antigens อื่นๆ และพบว่าตำแหน่งของยีนที่ทำให้เกิดภาวะไตอักเสบอยู่คนละตำแหน่งกับยีนที่สร้าง antinuclear antibody บทบาทด้านกรรมพันธุ์จึงอาจมีความเกี่ยวข้องด้วย

ปัจจุบันพบว่าภาวะไตอักเสบจากโรค lupus มีการอธิบายผ่านกลไกหลายอย่างร่วมกันได้แก่ การสูญเสียภาวะ self tolerance การสร้างแอนติบอดีที่ผิดปกติ ความผิดปกติในการกำจัดสารแปลกปลอม การกระตุ้นของ cytokines ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่ออวัยวะในที่สุด

2.1.2 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ B LyS และ B lymphocyte กับโรค lupus

1. B cell และ autoimmune disease

วัฏจักรชีวิตและหน้าที่ของ B cell

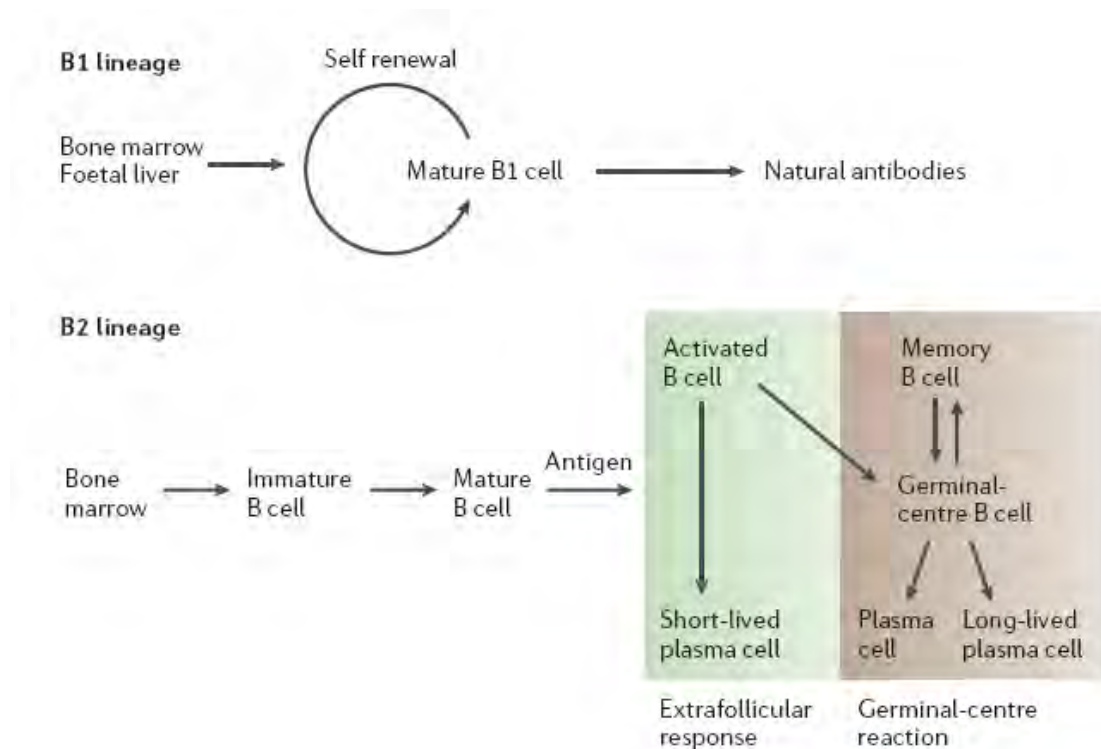
ความสำเร็จของการรักษาผู้ป่วยโรคอิมมูนช่วงแรกเริ่มต้นขึ้นจากการค้นพบความสัมพันธ์ของ autoantibody และโรคอิมมูน ยืนยันจากการพบ rheumatoid factor ในผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ ทำให้มีการเข้าใจว่า B cell เป็นสาเหตุหลักของโรคกลุ่มนี้ ต่อมาช่วงปี พ.ศ.2523 - 2533 เริ่มมีการศึกษา T cell มากขึ้นและมีการอ้างถึงทฤษฎีความผิดปกติของ apoptosis ทำให้เชื่อว่า T cell เป็นสาเหตุหลักของพยาธิสภาพ ภาวะระยะหลัง หลังจากมีการคิดค้นยา Rituximab (Mabthera, Rituxan) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ B cell มีประสิทธิภาพในการรักษา B cell lymphoma และนำมารักษาโรครูมาตอยด์ได้เป็นผลสำเร็จทำให้นักวิทยาศาสตร์หันกลับมาให้ความสนใจ B cell อีกครั้ง

B cell มีวัฏจักรชีวิตที่ซับซ้อนและน่าสนใจ การเข้าใจการเจริญเติบโตของ B cell นำไปสู่การรักษาใหม่ๆ โดยปกติ B cell ถูกแบ่งเป็น 2 ชนิดได้แก่ B1 cell และ B2 cell B1 cell พัฒนาขึ้นก่อน B2 cell และมีช่วงชีวิตที่ยาวกว่า สามารถแบ่งสร้างตัวเองได้และอาศัยอยู่ในช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องเยื่อหุ้มท้อง B1 cell จะสร้าง IgM (immunoglobulin M) ซึ่งถือว่าเป็นแอนติบอดีตัวแรกของร่างกาย มีความสำคัญในการกำจัด encapsulated bacteria และไม่ค่อยเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีบ่อยนัก[8] ในหนูพบว่า B1 cell มี 2 ชนิด ทำหน้าที่หลายอย่าง[9] เช่น การตรวจหาแอนติเจนในกระแสเลือด ในช่องปอดและช่องท้อง และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มให้ตอบสนองอย่างรวดเร็ว แต่ในมนุษย์กลับไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนนอกเหนือจากการสร้าง IgM ในผู้ป่วยโรค lupus พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวน B1 cell ด้วย[10]

B cell อีกชนิดคือ B2 cell มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่หลากหลายและมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา B2 cell กำเนิดและเจริญเติบโตในไขกระดูก มีขบวนการกำจัด B cell ที่ทำลายแอนติเจนของร่างกาย (central tolerance)[11] เช่นเดียวกับการพัฒนาของ T cell ในต่อมธัยมัส B2 cell ที่ออกจากไขกระดูกจะเข้ามาอยู่ในม้าม เรียกระยะนี้ว่า transitional stage มีความสำคัญในการเกิด peripheral tolerance B2 cell จะถูกแบ่งกลุ่มให้พัฒนาต่อเป็น follicular B cell และ marginal zone B cell (MZ-B) follicular B cell จะเคลื่อนตัวไปมา ระหว่างต่อมน้ำเหลืองและทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ขณะที่ MZ-B cell จะอยู่กับที่เฉพาะในต่อมน้ำเหลืองและทำหน้าที่จับ pathogens MZ-B cell มีลักษณะรูปร่างรวมถึงหน้าที่ในการตรวจหาแอนติเจนเช่นเดียวกับ B1 cell[12, 13]

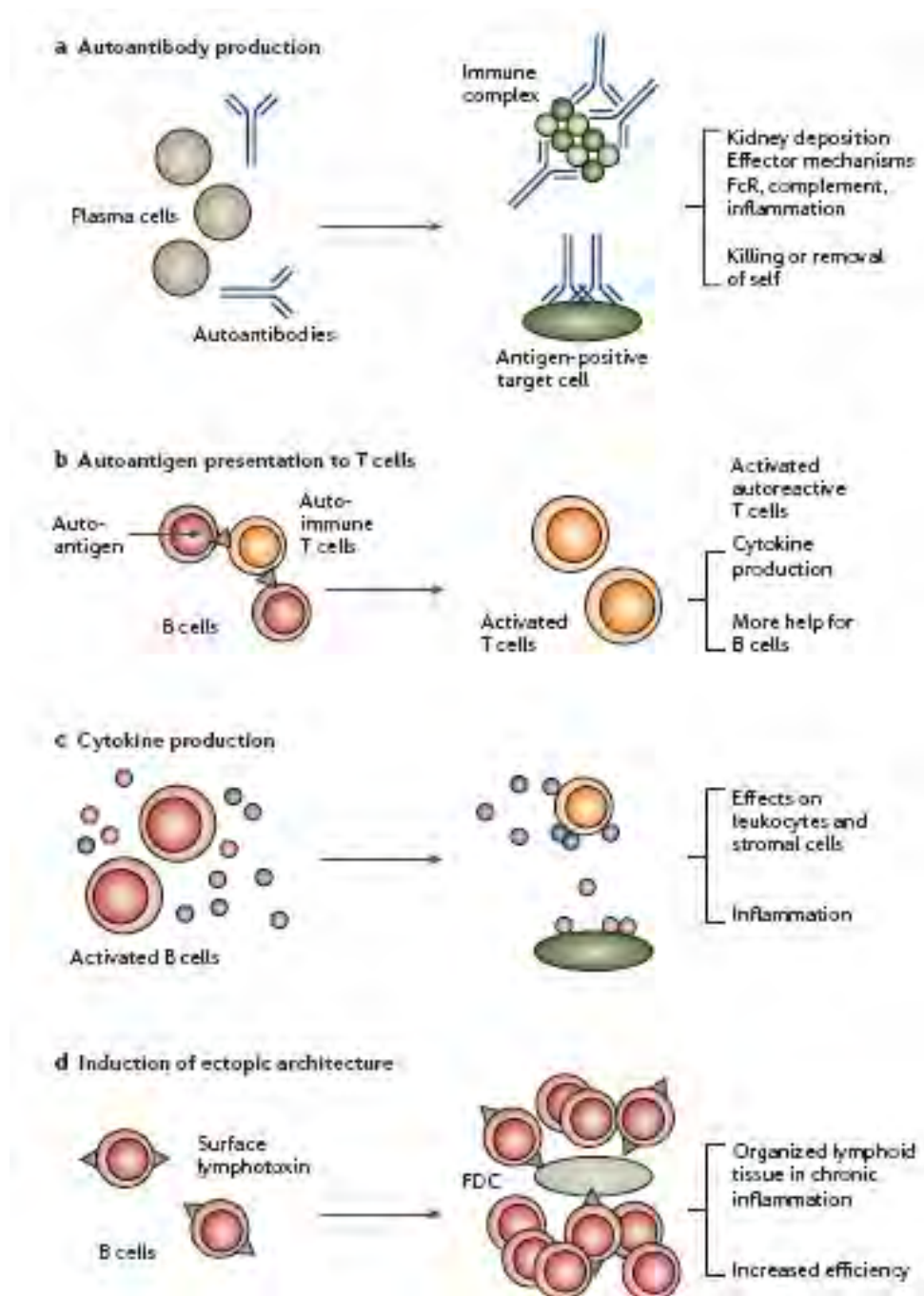
follicular B cell เมื่อพบกับแอนติเจนและได้รับการกระตุ้นจาก T helper cell จะเปลี่ยนแปลงตัวเองเป็น activated B cell ซึ่งจะพัฒนาต่อเป็น plasmablast หรือ plasma cell ที่มีอายุสั้น [14] ในหนูทดลองชั้นต้นอนันต์เกิดขึ้นบริเวณส่วนต่อระหว่าง red pulp และ white pulp (bridging channels) plasmablast มีอายุ 2-3 วันและจะตอบสนองต่อ pathogen เร็วมาก บางส่วนของ activated B cell จะเคลื่อนเข้าสู่ B cell follicles ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยแกนกลาง (germinal center) ที่เต็มไปด้วยร่างแหของกลุ่ม follicular dendritic cells (FDCs) ที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน บริเวณนี้ activated B cell จะพัฒนาต่อเป็น plasma cell plasma cell จะมี chemokine receptor ช่วยนำ plasma cell ออกจากม้าม[15] ไปอาศัยในไขกระดูกและมีอายุชั้ยยาว เรียก plasma cell เหล่านี้ว่า long-lived plasma cell plasma cell บางส่วนจะเปลี่ยนแปลงตัวเองเป็น memory B cell plasma cell มีความสามารถในการหลั่ง Ig (immunoglobulin) ที่จำเพาะและปริมาณมากกว่า plasmablast[14] สำหรับ memory B cell จะไวต่อ antigen ที่สัมผัส และแบ่งตัวต่อเป็น plasma cell ได้ปริมาณมากในระยะเวลายาวนานทั้ง plasma cell และ memory B cell มีอายุชั้ยเป็นปี วัฏจักรชีวิต B cell แสดงดังรูปที่ 2.2

หน้าที่หลักของ B cell คือการสร้างแอนติบอดีเพื่อจับกับแอนติเจนเป็น immune complexes และมีการกำจัดแอนติเจนนั้นออกไป ไม่ว่าจะเป็นการกำจัดโดยอาศัย phagocyte หรือกระบวนการ complement ชั้นต้นอนันต์เหล่านี้จะมีเม็ดเลือดขาวเข้ามาเกี่ยวข้อง เกิดการอักเสบและเมื่อ pathogen ถูกกำจัด การอักเสบจะหายไปแต่ถ้าขบวนการนี้เกิดขึ้นกับแอนติเจนของร่างกาย (self antigen) ร่างกายจะเกิดการอักเสบเรื้อรังจนอวัยวะเสียหายในที่สุด การพบ immune complexes ในผู้ป่วยโรค lupus การกระตุ้นหนูทดลองให้เกิดโรคออโตอิมมูนด้วย pathogenic antibody และสามารถตรวจพบ circulating autoantibody ได้ สิ่งเหล่านี้เป็นหลักฐานยืนยันบทบาทของ B cell ในการเกิดโรคออโตอิมมูน



รูปที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของ B cell B cell แบ่งเป็น 2 ชนิดได้แก่ B1 และ B2 cell B1 cell สามารถแบ่งตัวเองได้และอาศัยอยู่ในบริเวณช่องเยื่อหุ้มปอดและเยื่อหุ้มท้อง ทำหน้าที่สร้าง natural antibody ขณะที่ B2 cell ต้องอาศัยการกระตุ้นจาก antigen จึงสามารถสร้างแอนติบอดีที่เฉพาะและมีปริมาณมาก ปกติ B2 cell อาศัยอยู่ในระบบต่อมน้ำเหลืองและไขกระดูก[16]

หน้าที่อื่นของ B cell ได้แก่ การนำเสนอชิ้นส่วนของแอนติเจนแก่ T cell ผ่านทาง major histocompatibility (MHC) class 2 การหลั่ง interleukin 4 และ interferon gamma เรียกเม็ดเลือดขาวมาชุมนุมมากขึ้น[17-19]ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้น สุดท้าย B cell บางกลุ่มสามารถแสดง lymphotoxin- α/β ที่ผิวและกระตุ้นให้ FDC แบ่งตัวล้อมรอบจุดอักเสบ ส่งผลให้เกิดการทำลายแอนติเจนอย่างต่อเนื่อง[20-23] หน้าที่ทั้งหมดของ B cell ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 หน้าทีของ B cell ในระบบภูมิคุ้มกัน a) แอนติบอดีที่สร้างจาก B cell จะจับกับแอนติเจนเกิดเป็น immune complexes ที่สามารถถูกกำจัดผ่าน Fc-receptor-bearing effector cell หรือระบบ complement นอกจากนี้ B cell ยังเป็นตัวช่วยให้เกิดกระบวนการอักเสบอีกด้วย b) B cell ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ในการกระตุ้น T cell ให้พัฒนาเป็น activated T cell ซึ่งทำหน้าที่หลั่ง cytokine ต่างๆและย้อนกลับมากกระตุ้น B cell ให้พัฒนาต่อเป็น activated B cell c) activated B cells สามารถหลั่ง cytokines มากกระตุ้นเม็ดเลือดขาวและ stromal cell ให้มายัง

บริเวณที่มีการอักเสบ d) B cell สามารถสร้าง lymphoid tissue บริเวณที่เกิดการอักเสบเรื้อรังโดยแสดง surface lymphotoxin ได้ทั้งนี้เพื่อกระตุ้นให้เกิดประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อแอนติเจนเพิ่มขึ้น[16]

ความผิดปกติของ B cell กับการเกิดโรคอโตอิมมูน

ในอดีตนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า T cell เป็นต้นเหตุของกลุ่มโรคอโตอิมมูน จนกระทั่งปัจจุบันมีข้อมูลสนับสนุนมากขึ้นว่าโรคกลุ่มนี้สามารถตรวจพบ autoantibody ก่อนมีอาการของโรคขึ้น[24] ไม่ว่าจะเป็นการพบ antinuclear antibodies (ANA) หรือ antiphospholipid antibody (aPL) ในผู้ป่วยโรค lupus antiglutamic acid decarboxylase, antiislet และ antiinsulin antibody ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1[25-28] antiimmunoglobulin (rheumatoid factor) และ anticitrullinated peptide ในผู้ป่วยโรครูมาตอยด์และ antimyelin antibody ในผู้ป่วย multiple sclerosis[29-33]

นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามารดาที่ป่วยเป็นโรค lupus สามารถถ่ายโอนแอนติบอดีไปยังลูกและเกิด neonatal lupus syndrome ได้เช่นเดียวกับมารดาที่เป็นโรค myasthenia gravis[34, 35] จากข้อมูลเหล่านี้สามารถสรุปได้ 2 แบบคือ autoantibody เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเหล่านี้ หรือ autoantibody ที่พบเกิดจากการสร้างของ autoreactive B cells ที่ยังมีอยู่ในปริมาณมาก[36, 37] ปัจจุบันมีหลักฐานในหนูทดลองที่สรุปแล้วว่าโรครูมาตอยด์และโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เกิดขึ้นจาก autoantibody[33, 38, 39] ซึ่งสนับสนุนข้อสรุปแรกและมีหลักฐานที่ค้านข้อสรุปที่สองคือ พบว่า 50% ของ B cells ที่ออกจากไขกระดูกมนุษย์สามารถสร้าง autoantibody ได้ แต่หลังจากพัฒนาจนเป็น mature B cell กลับพบ autoreactive cells น้อยมากซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับในสัตว์ทดลอง [40] นอกจากนี้ความผิดปกติเล็กน้อยของขั้นตอน tolerance เพียงพอที่จะทำให้เกิดภาวะอโตอิมมูนได้[11] ในผู้ป่วยโรค lupus และโรครูมาตอยด์[28] พบ naïve mature B cell ประมาณ 25-50% ที่สร้าง autoantibody[41] ได้ แต่ autoantibody ถ้ายังไม่เกิดอันตรายต่อร่างกาย นอกจากได้รับการกระตุ้น (secondary trigger) ให้เกิดการอักเสบเรื้อรังขึ้นทั้งจากการติดเชื้อหรือ innate inflammatory response ปัจจุบันเรายอมรับว่า myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, Grave's disease และ autoimmune thrombocytopenia เป็นโรคที่เกิดจากการสร้าง autoantibody[42] ขึ้นและแอนติบอดีแต่ละชนิดสามารถเกิดอาการจำเพาะของแต่ละระบบได้เช่น NMDA antibody จะสัมพันธ์กับความผิดปกติของ neuropsychiatric[43] หรือ anti-dsDNA สัมพันธ์กับอาการทางไตในผู้ป่วยโรค lupus เป็นต้น ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างโรคที่เกิดจากความผิดปกติของ B cell และระบบอวัยวะที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2.1 โรคที่มีหลักฐานแสดงความผิดปกติของ B cell[16]

Disease	Target organ(s)
Autoimmune diseases	
Rheumatoid arthritis	Joints
Systemic lupus erythematosus	Systemic
Sjogren's syndrome	Salivary gland
ANCA-associated vasculitis	Vasculature
Idiopathic thrombocytopenia	Platelets
Autoimmune hemolytic anemia	Red blood cells
Guillain-Barre' syndrome	Peripheral nervous system
Chronic immune polyneuropathy	Peripheral nervous system
Autoimmune thyroiditis	Thyroid gland
Type 1 diabetes	Pancreatic islet cells
Addison's disease	Adrenal gland
Membranous glomerulonephropathy	Kidney
Goodpasture's disease	Lung, kidney
Autoimmune gastritis	Stomach
Pernicious anemia	Stomach
Pemphigus vulgaris	Skin, mucous membrane
Primary biliary cirrhosis	Liver
Dermatomyositis-polymyositis	Skeletal muscle, skin
Myasthenia gravis	Skeletal muscle
Celiac disease	Small intestine
Inflammatory diseases	
Immunoglobulin A nephropathy	Kidney
Henoch-Schonlein purpura	Vasculature, kidney
Chronic graft rejection	Graft
Atopic dermatitis	Skin
Asthma	Lung
Allergy	Skin, lung, gut

ตารางที่ 2.1 โรคที่มีหลักฐานแสดงความผิดปกติของ B cell[16] (ต่อ)

Disease	Target organ(s)
Potential involvement	
Systemic sclerosis	Connective tissue
Multiple sclerosis	Central nervous system
Lyme neuroborreliosis	Central nervous system
Ulcerative colitis	Large intestine
Interstitial lung disease	Lung

นอกจากนี้ความสามารถของ B cell ในการเป็นตัวนำเสนอนแอนติเจนให้กับ T cell รวมถึงการหลั่ง cytokines ต่างๆล้วนเป็นสาเหตุของการเกิด autoimmune disease ได้เช่นกันตัวอย่างเช่น การพบความสัมพันธ์เชิงสนับสนุน (amplification loop) ระหว่างการเกิด autoantibody กับการนำเสนอนแอนติเจนผ่าน T cell ของ Shlomchik และคณะ[44, 45] หรือการพบว่าหนูทดลองที่ได้รับการตกแต่งยีนสามารถเกิดโรคลูปัส โรครูมาตอยด์ และ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้โดยไม่พบการสร้างแอนติบอดี[39, 44, 46, 47] สิ่งเหล่านี้เองที่ทำให้อาการของผู้ป่วยโรคอโตอิมมูนรุนแรงหลากหลายและอธิบายว่าระดับ anti-dsDNA หรือ rheumatoid factors ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค[42, 48-50]

ปัจจุบันมีหลักฐานยืนยันกลไกการเกิดโรคอโตอิมมูนจาก B cell เพิ่มเติมไม่ว่าจะเป็น การเกิด fibrosis progression ในผู้ป่วยโรคผิวหนังแข็งหรือการเกิด lymphoid neogenesis ในผู้ป่วย Sjogren's syndrome เป็นต้น[22, 23]

B cell intervention strategies

เนื่องจากการเจริญเติบโตของ B cell ซับซ้อนจึงมีการรักษาที่หลากหลายในการที่จะลดการแบ่งตัวหรือการเติบโตของ B cell ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3 ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะในส่วนของการยาที่ได้รับการยอมรับและที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ก) B cell depletion

เป็นวิธีง่ายที่สุดในการกำจัด B cell ที่อาศัยอยู่นอกไขกระดูก ยาที่ได้รับการยอมรับแล้วคือ Rituximab ซึ่งเป็น anti-CD20 (surface marker บนผิว B cell) เริ่มแรกมีการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย B cell lymphoma ต่อมา FDA รับรองให้รักษาโรครูมาตอยด์ด้วย[51] ปัจจุบันมีการนำมาใช้รักษาโรคอโตอิมมูนหลายชนิดทั้ง idiopathic thrombocytopenic purpura, IgM-mediated

ตารางที่ 2.2 การรักษาโรคออโตอิมมูนด้วยวิธีปรับเปลี่ยนการทำงานของ B cell[16]

Target	Agent	Effect	Current status
FcR, FcRn	IVIg	Block immune complex signaling	Approved therapy
IgG	Anti-IL6R	Block B cell differentiation	Approved Castleman's disease Phase III arthritis
CD 20	Anti-CD20	Depletion of most types of B cells	Approved NHL, RA Phase II / III autoimmune disease
Anti-DNA antibodies	Injection of DNA-containing scaffolds	Remove anti-DNA pathogenic antibodies	Phase III
BAFF/BLyS	Anti-BLyS	Block BAFF/BLyS survival	Phase II RA, SLE
BAFF/BLyS	BR3-Ig	signals	Phase I RA
BAFF/BLyS	AMG 623		Phase I RA, SLE
BAFF/BLyS	Anti-BR3		Preclinical
BAFF/APRIL	TACI-Ig		Phase I RA, SLE
CD 22	Anti-CD22	Block CD 22 survival signal, cell depletion	Phase III SLE
Lymphotoxin- β receptor (LT β R)	LT β R-Ig	Block ectopic architecture, disrupt germinal centres	Phase II RA
Type I interferon	Anti-interferon- α	Block plasma cell production, other actions?	Phase I SLE
CD40 - CD40L	Anti-CD40	Block T-B help	Preclinical
	Anti-CD40L	Block T-B help	Preclinical

BAFF, B-cell-activating factor of the tumour-necrosis factor family; BLyS, B lymphocyte stimulator; BR3, BAFF receptor; Ig, immunoglobulin; IL6, interleukin-6; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus

ตารางที่ 2.3 แสดงการตอบสนองต่อยาต่างๆของ B cell ในแต่ละระยะ[16]

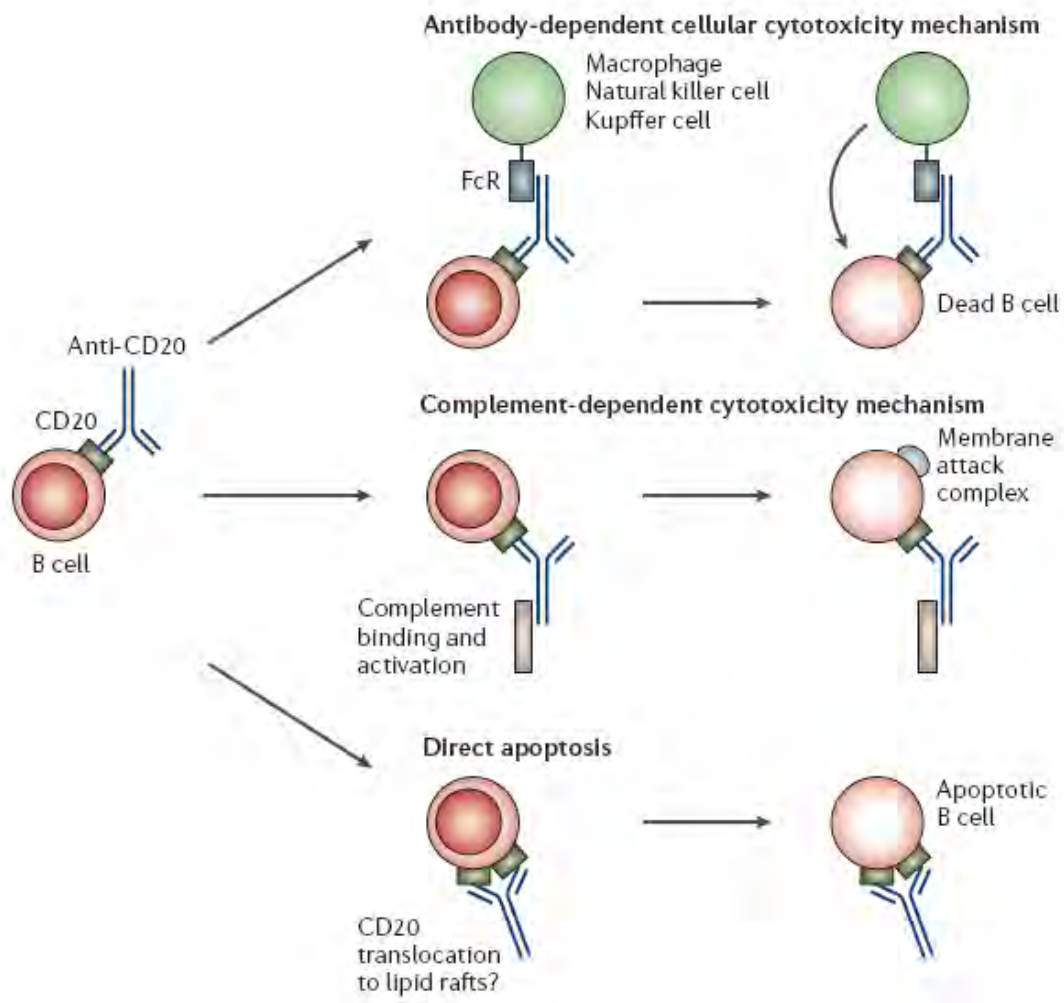
B cell stage	Inhibition of:			
	Anti-CD20	BLyS	BLyS + APRIL	CD40L
B1	?	-	-	?
Pro/Pre	-	-	-	-
Immature	√	-*	-*	-
Follicular	√	√	√	√‡
Marginal zone	√	√	√	-
Germinal centre	-?‡‡	-?‡‡	?	√‡
Memory	?	?	?	√‡
Plasma cell	-§	-§	?¶	-§

*BLyS จำเป็นในช่วง late transitional (T2) step ของการพัฒนา B cell ‡anti-CD40L or antagonistic anti-CD40 สามารถบล็อกทั้ง T-dependent primary และ secondary responses. § การบล็อก memory or extrafollicular B cell จะส่งผลให้ปริมาณ short-lived plasma cells ลดลงได้ ¶plasma cells ต้องใช้ APRIL-BCMA signalling ในการดำรงอยู่ ‡‡ยังไม่ทราบผลชัดเจนต่อ germinal-centre reactions ในไพรเมท APRIL, a proliferation-inducing ligand; BLyS, B lymphocyte stimulator; BCMA, B-cell maturation factor; CD40L, CD40 ligand

polyneuropathy, factor 8 deficiency, SLE, Sjogren's syndrome, inflammatory myositis, pemphigus vulgaris, neuromyelitis optica และ ANCA (antinuclear cytoplasmic antibody) associated vasculitis[42, 50, 52-62] กลไกของยาตัวนี้ในการทำลาย B cell แสดงดังรูปที่ 2.4

พบว่าหลังการฉีดยาตัวนี้ไม่นาน B cell ที่ถูกเคลือบด้วย anti-CD20 ไม่สามารถตรวจพบในกระแสเลือดอย่างไรก็ตามยายังไม่สามารถทำลาย B cell ในต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามได้ทั้งหมด[63] กลไกในการทำลาย B cell เชื่อว่าผ่านทาง antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) เป็นหลัก[64-67] นอกจากนี้ยังผ่านทาง complement-dependent cytotoxicity (CDC) และทำให้เกิด lipid raft environment มี calcium flux และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis พบว่า B cell ในเลือดจะต่ำเป็นเวลานานอย่างน้อย 6-12 เดือนหลังการให้ยา[68] อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ในไขกระดูกยังคงอยู่และพัฒนาต่อเป็น B cell ได้ รวมถึง plasma cell ในไขกระดูกก็ไม่ได้ถูกทำลายทำให้สามารถตรวจพบ Ig อยู่ซึ่งเป็นข้อดีของการรักษาวิธีนี้

การตรวจระดับ autoantibody ในผู้ป่วยรูมาตอยด์หลังได้ Rituximab พบว่า ระดับ rheumatoid factor ลดลง 2-3 เท่า เช่นเดียวกับ CRP ก็มีระดับลดลงเช่นกันรวมถึงอาการที่ดีขึ้น[69] ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางหลังได้ยาพบว่ามียกระดับ anti-dsDNA ต่ำชัดเจนร่วมกับระดับ plasma cell ในเลือดลดลงสู่ระดับปกติ[68] สิ่งเหล่านี้พิสูจน์ว่ายามีผลเฉพาะต่อ short-lived plasma cells ขณะที่ long-lived plasma cells ไม่ถูกทำลายด้วย Rituximab ทำให้มีการกำเริบของโรคขึ้นใหม่ในระยะเวลาไม่ถึงปี



รูปที่ 2.4 กลไกการทำลาย B cell ของยา Rituximab[16]

ปัจจุบันเริ่มให้ความสำคัญเรื่อง polymorphism ของ Fc receptors พบว่าผู้ป่วย follicular lymphoma, Waldenstrom's macroglobulinemia และผู้ป่วยโรคโลหิตจางแต่ละรายมีการตอบสนองต่อยาไม่เท่ากัน[70-73] อธิบายจากการที่ Fc receptor ซึ่งจำเป็นในขบวนการ ADCC จับหลวมไป การพัฒนาให้ยาจับกับ Fc receptor แน่นขึ้นน่าจะมีประโยชน์ นอกจาก Rituximab ยังมียากลุ่ม anti-

CD22 (Epratuzumab) และ anti-CD19 พบว่าสามารถลดปริมาณ B cell ในหนูทดลอง[73, 74] และ anti-CD52 (Alemtuzumab; Campath) ซึ่งสามารถลดปริมาณของทั้ง T cell และ B cell

ข) Manipulation of B cell survival

ในหนูทดลองพบว่า B cell activating factor (BAFF, BLyS) จำเป็นในการเติบโตของ B cell โดยเฉพาะในช่วง late transitional stage รวมถึง B cell ใน germinal center การพบว่าระดับ BLyS ในกระแสเลือดมีปริมาณสูงในผู้ป่วยโรคต่อติภูมิ มีหลักฐานว่า BLyS เกี่ยวข้องกับการ differentiation โดยอาศัย T cell[75] จากหลักฐานทั้งหมดทำให้มีการตั้งสมมติฐานว่า anti-BLyS จะยับยั้งโรคต่อติภูมิได้ ขณะนี้ anti-BLyS (Belimumab) มีการยืนยันแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรครูมาตอยด์และโรคลูปัส

การศึกษาในลิง การยับยั้ง BLyS จะลดจำนวน B cells ได้ครึ่งหนึ่งทั้งในเลือดและต่อมน้ำเหลือง [76, 77] MZ-B ตอบสนองต่อ anti-BLyS ดีกว่า Rituximab สำหรับ memory B cell และ germinal center B cells ไม่พบว่าจำนวนลดลง

ปัจจุบันมีการพัฒนายาที่ยับยั้ง TNF ligand อีกตัวคือ APRIL การยับยั้ง TNF ligand receptor เช่น anti-TACI ล้วนอยู่ในขั้นตอนการศึกษาในสัตว์ทดลอง ในแง่ประสิทธิภาพของ anti-BLyS เทียบกับ rituximab ยังต้องรอการพิสูจน์ต่อไป[67]

ค) Cytokines

มี cytokines หลายตัวที่จำเป็นในการพัฒนา B cell ได้แก่ interleukin 6 (IL6) จำเป็นในการพัฒนาให้เกิด plasma cell การมี IL6 ร่วมกับ TGF- β (tumor growth factor) จะกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของ IL17 producing T cell[78] ยา anti-IL6 (Tocilizumab) พบว่าได้ผลในผู้ป่วยรูมาตอยด์ (phase3) ผู้ป่วย systemic onset juvenile idiopathic arthritis และ Crohn's disease[79-82]

ผู้ป่วยโรคลูปัสพบว่าระดับ IFN type 1 ในเลือดสูงผิดปกติ IFN เป็น cytokine ที่มีหน้าที่มากมายเช่น การพัฒนาของ myeloid dendritic cell[83] การทำงานร่วมกับ CD40 ในการเหนี่ยวนำให้ B cell เปลี่ยนแปลงเป็น plasmablast การยับยั้ง IFN จึงอาจมีประโยชน์ในผู้ป่วยโรคลูปัส

2. The BLyS family of TNF cytokines and receptors

การตอบสนองของ humoral immunity เริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงของ naïve B cell ที่ถูกกระตุ้นจากแอนติเจนผ่าน B cell antigen receptor (BCR) เป็น activated B cell ที่จำเพาะและพัฒนาต่อเป็น plasma cell และ memory B cell ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างแอนติบอดี เมื่อมีการ

กระตุ้นรอบสอง memory B cell ที่เคยรู้จักจะถูกกระตุ้นให้ตอบสนองอย่างรวดเร็ว การที่ humoral immunity จะมีประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับความหลากหลายของ BCR ของ naïve B cell

ในระยะ 10 ปี การค้นคว้าเรื่อง B cell เพื่อตอบคำถามต่างๆเช่น สัดส่วนในระบบภูมิคุ้มกันชนิดและวัฏจักรชีวิตของ B cell สัญญาณนำ (signal) และการกระตุ้นการเจริญเติบโต ล้วนเพื่อความเข้าใจพยาธิสภาพของโรคออโตอิมมูน ทำให้เกิดการค้นพบ BCR และ TNF family และ รีเซปเตอร์ของมัน[84-86] B cell นั้นมี BCR ที่จำเพาะในแต่ละ population และจำเป็นในการเจริญเติบโต การตอบสนองและการพัฒนาหลังถูกกระตุ้นจากแอนติเจน[87] ขณะที่ B_{LYS} family molecules ควบคุมการอยู่รอดโดยตรงโดยการทำให้ naïve B cell มีชีวิตต่อและพัฒนาเป็น mature B cell ได้ ด้วยเหตุนี้การรักษาที่มุ่งเปลี่ยนแปลง B_{LYS} family จึงเป็นความหวังในการรักษา กลุ่มโรคออโตอิมมูนและมะเร็ง การพัฒนาวัคซีน และการเกิด transplant tolerance

The TNF/TNF receptor family

จากความรู้อันปัจจุบันเราทราบว่าสมาชิกของ TNF แต่ละตัวล้วนมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันตั้งแต่ organogenesis, lymphocyte activation, differentiation และการเกิด apoptosis[88] TNF ligands จัดเป็น type 2 transmembrane protein ออกฤทธิ์ในรูปแบบ homotrimers โดยจับกับผิวเซลล์ มีอยู่ 2 รูปแบบคือ membrane form และ soluble form ส่วน TNF receptors ก็เป็น transmembrane protein ที่มีส่วนยื่นจับกับ ligand ประกอบด้วย cystein rich domain (CRD) TNF receptors บางตัวมีส่วนของ cytoplasmic death domain (CDD) ซึ่งจะกระตุ้นโปรตีนที่ชื่อ TNF receptor-associated death domain (TRADDs) เช่น Fas เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis TNF บางตัวมีส่วนของ TRAFs (TNF receptor-associated factors) เหนี่ยวนำให้เกิดการอยู่รอด การพัฒนาและการทำงานในระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ TNF ligand บางตัวจะจับเฉพาะกับ TNF รีเซปเตอร์บางชนิด ขณะที่บางตัวจะทำปฏิกิริยากับ รีเซปเตอร์ตัวอื่นได้ด้วย การที่เป็นเช่นนี้ช่วยอธิบายว่าเหตุใดการกระตุ้นผ่าน TNF family จึงมีการตอบสนองที่แตกต่างหลากหลาย

B_{LYS} family จัดเป็นสมาชิกส่วนหนึ่งของ TNF ligands สมาชิกของ B_{LYS} family ส่วนใหญ่ค้นพบจากการศึกษาอื่น [89-91] ขณะที่บางส่วนพบโดยบังเอิญในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง และมีการตั้งชื่อซ้ำซ้อนกัน ตารางที่ 2.4 แสดงถึงคุณสมบัติของ B_{LYS} family ligands และรีเซปเตอร์ ส่วนรูปที่ 2.5 แสดงถึงการแสดงออกของ B_{LYS} family บน B cell

B_{LYS} family ประกอบด้วย 2 ligands ได้แก่ B_{LYS} และ APRIL ligands ทั้งสองชนิดพบได้ในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มเม็ดเลือดขาว ทั้งคู่เดิมเคยถูกสร้างในรูปแบบ monomer ที่ติดกับผนังเซลล์แต่จะจัดรูปเป็น trimers และถูกย่อยบางส่วนให้อยู่ในรูปอิสระโดยเอนไซม์ที่ชื่อ furin

ligands คู่นี้มีลักษณะบางส่วนที่เหมือนกับ TNF ligands ตัวอื่น แต่มีขนาดเล็กกว่า และมีรีเซปเตอร์เฉพาะที่แตกต่างจาก TNF ligands ตัวอื่น[92] ลำดับอミノแอซิดของ human BLyS และ TNF family ตัวอื่นแสดงในรูปที่ 2.6

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของ BLyS family ligands และรีเซปเตอร์[93]

	Ligands		Receptors		
	APRIL	BLyS	TACI	BCMA	BR3
Synonyms	TNFSF13a, TRCL-1	TNFSF13b, BAFF, TALL-1, zTNF-4, THANK	TNFSFr13a	TNFSFr13b	TNFSFr13c, BAFFr, Bcmd
Chromosomal location					
Human	17p13.1	13q34	17p11.2	16p13.1	22q13.2
Mouse	11	8	11	16	15
Interacts with	TACI(kD~ 6.4nM) BCMA(kD ~16nM)	TACI(kD~ 0.2nM) BCMA(kD~ 1.6µM) BR3(kD~16nM)	APRIL BLyS	APRIL BLyS	BLyS
Knockout/ mutant phenotype	Low IgA	Decreased TR, FO, MZ-B cells	Increased TR, FO, MZ-B cells; autoantibody	Decreased BM plasma cells	Decreased TR, FO, MZ-B cells
TRAF binding	N/A	N/A	2,5,6	1,2,3	3
Signaling	N/A	N/A	Classical NF-kB	Classical NF-kB	Non-classical NF-kB
Downstream modulators	N/A	N/A	XIAP? Others?	?	Bcl-xl, A1, Mcl-1, others?

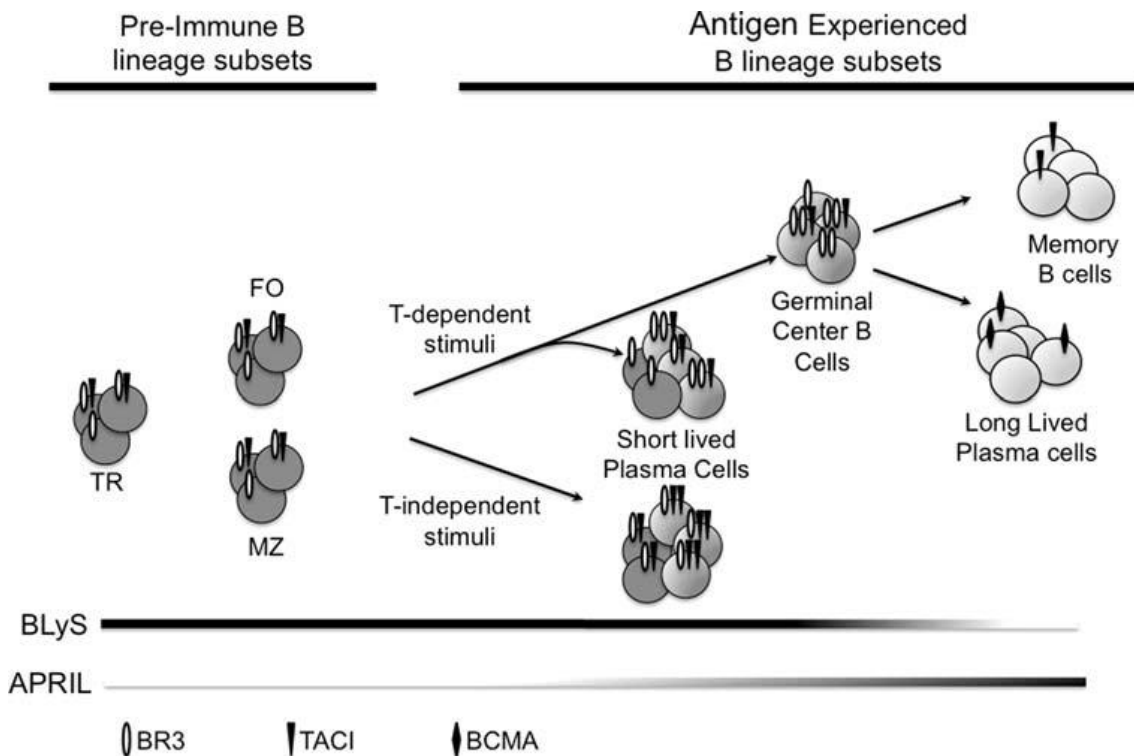
TACI, Transmembrane Activator and Calcium signaling modulating and cyclophilin ligand (CAML) Interactor;BCMA, B Cell Maturation antigen;NF-kB, Nuclear Factor Kappa B

BLYS

BLYS ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสิด 285 ตัว มวลโมเลกุล 17,038 ดาลตันมีสองรูปแบบคือ membrane form และ soluble form BLYS ในสัตว์จำพวกเปิดและไก่มีโครงสร้างที่เหมือนกับในหนูและคนถึง 75%[94-96] ส่วนโครงสร้างที่แตกต่างจาก TNF Ligands อื่นคือรูปทรงหลัง trimerization มีแกนกลางที่สั้นกว่าสามารถทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมและมีร่องลึกซึ่งเป็นขั้วลจับดีกับ basic BR3 receptor ในขณะที่จับกับ TACI และ BCMA ได้ไม่ดีเท่า APRIL

BLYS พบในเซลล์หลายชนิดทั้ง neutrophil, dendritic cell, monocyte, macrophage เป็นต้น[97] การสร้าง BLYS ถูกกระตุ้นผ่าน cytokines บางตัวเช่น interferon gamma และ IL-10[98] รูปอิสระที่เป็น trimeric form เป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์หลัก ขณะที่บางรูปแบบเช่น 60-mers สามารถออกฤทธิ์ผ่าน TACI ได้เช่นกัน[99]

โปรตีนตัวนี้สร้างจากยีนตำแหน่ง 13q34 ในมนุษย์ และโครโมโซมคู่ที่ 8 ในหนู นอกจากนี้ยังพบ polymorphism ของ BLYS ด้วยแต่ไม่ทราบความแตกต่างในหน้าที่ของมัน การศึกษาในหนู delta BAFF (dominant negative form ของ BLYS) ที่เกิดจากการตัดข้าม exon 4 [100, 101] มีส่วน N-glycosylation ที่ป้องกันการหลั่ง BLYS[102] ทำให้ลดจำนวน peripheral B cell และลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้[100]



รูปที่ 2.5 การแสดงออกของ BLYS family บน B cell[93]



รูปที่ 2.6 ลำดับอามิโนแอซิดของ human BLYS และ TNF family ตัวอื่น เช่น APRIL, LT α

APRIL (A PRoliferation-Inducing Ligand)

ค้นพบครั้งแรกจากการสกัด mRNA ใน cell lines มีคุณสมบัติในการกระตุ้น fibroblast [103] ยีนของ APRIL อยู่บนตำแหน่ง 17p13.3 ในมนุษย์ และโครโมโซมคู่ที่ 11 ในหนู[104] ความแตกต่างจาก TNF ligands อื่นได้แก่ หนึ่งมีส่วน exon ที่พร้อมถูกตัดให้อยู่ในรูป soluble form สองมีส่วน exon มากกว่า 1 ตำแหน่ง และสามตำแหน่งยีนใกล้เคียงกับ TNF family อีกตัวที่ชื่อ TWEAK (TNF Weak Inducer of Apoptosis)[105, 106] พบว่ามีการถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งในมนุษย์และหนู ขณะนี้ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

APRIL ประกอบด้วย 280 อามิโนแอซิด มีโครงสร้างเหมือน BLYS 50% และเหมือนกับ TNF family ตัวอื่นน้อยมาก (20-30%)[99, 107-109] APRIL จะจับกับ BCMA และ TACI ได้แต่ไม่จับกับ BR3 นอกจากนี้ จากการที่มีเบสที่ปลาย N ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับ surface proteoglycan ของเซลล์อื่นได้ แต่ก็ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามเชื่อว่า APRIL มีส่วนเกี่ยวข้องกับ B cell activation และ isotype switching[110, 111] และทำปฏิกิริยากับ plasma cell ในไขกระดูก

ผ่าน BCMA[112, 113] มีการพบว่า mouse osteoclast มี APRIL ปริมาณสูง ทำให้อาจเชื่อว่า APRIL อาจมีประโยชน์สำหรับ long-lived plasma cell ในไขกระดูก[114] ทำยสุดพบว่า APRIL เริ่มมีบทบาทในการเกิดมะเร็งบางชนิดด้วย[115-118]

BLYS family receptors

รีเซปเตอร์ ของ BLYS และ APRIL มี 3 ชนิดได้แก่ BCMA[119] TACI[120] และ BR3[84, 121-125] โดยทั่วไป สมาชิกกลุ่มนี้ต่างจาก TNF รีเซปเตอร์อื่นที่ไม่มีส่วน TRAD และมีส่วนของ ligand-binding CDDs น้อยกว่า ทำให้ขาด ligand-binding specificity BLYS receptor พบใน B cell, บางส่วนของ activated T cell และ dendritic cell โดยปกติรีเซปเตอร์จะอยู่บนผิวเซลล์ในรูป monomer หลังจากมีการจับกับ BLYS ligand จะมีการ form เป็น trimerization ของรีเซปเตอร์ และส่งสัญญาณผ่าน TRAF รีเซปเตอร์ของโปรตีน BLYS และ APRIL แสดงดังรูปที่ 2.7 คุณสมบัติของ BLYS receptor จะแยกกล่าวในรายละเอียดต่อไป

BCMA (B Cell Maturation Antigen)

เป็น transmembrane protein type 3 ขนาด 20 กิโลดาลตัน ค้นพบครั้งแรกใน human T cell lymphoma[119, 126] อยู่บนยีน 16p13.1 ในมนุษย์และโครโมโซมคู่ที่ 16 ในหนู BCMA จับกับ APRIL ได้แน่นกว่า BLYS โดยโครงสร้างแล้ว BCMA มีความเหมือนกับ TNF รีเซปเตอร์ ตัวอื่นน้อยที่สุด มี single CRD motif เหมือน BR3 BCMA สามารถทำปฏิกิริยากับ TRAF1, 2, 3 และกระตุ้นผ่าน NF-KB และ JNK kinase ได้[127] บทบาทของ BCMA ไม่ทราบแน่ชัด ยังคงต้องค้นคว้าต่อไป

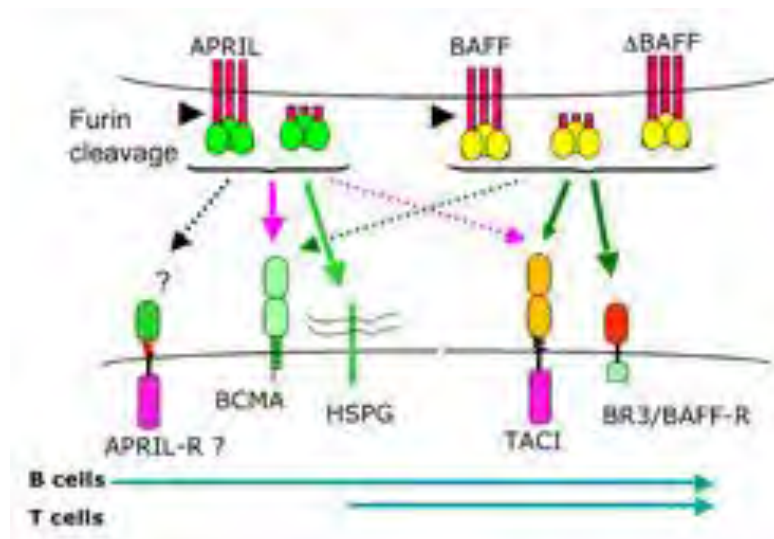
TACI (Transmembrane Activator and Calcium signaling modulating and cyclophilin ligand (CAML) Interactor)

เป็น transmembrane protein type 3 อีกตัวหนึ่ง ประกอบด้วย 293 อมิโนแอซิด ค้นพบครั้งแรกจากการศึกษา CAML[127] ในมนุษย์ตำแหน่งยีนอยู่ที่ 17p11.2 และในหนูบนโครโมโซมคู่ที่ 11 TACI จับกับ BLYS และ APRIL ดีพอๆกัน TACI มีส่วนของ CRDs 2 อันและมีส่วน intracytoplasmic domain ที่สามารถจับกับ TRAF2, 5 และ 6 จากนั้นกระตุ้นผ่าน CAML-independent pathway (NFAT, AP1 และ NF-KB) หน้าที่ของ TACI ยังไม่ทราบแน่ชัด[120] หลักฐานมีทั้งที่ยับยั้งและสนับสนุนการทำงานของ B cell เช่นการพบว่าหนูที่ไม่มียีน TACI จะเกิด B

cell hyperplasia, glomerulonephritis, proteinuria และพบ anti-dsDNA[128] และการกระตุ้น TACI ด้วย APRIL ทำให้ B cell มีชีวิตยืนยาวขึ้น[129]

BR3/BAFFr (BLyS Receptor 3)

ค้นพบหลังจากการที่สามารถกระตุ้น B cell survival ผ่านรีเซปเตอร์ที่ไม่ใช่ทั้ง TACI และ BCMA สามารถพบทั้งใน B cell ต้นกำเนิดและ mature B cell[123] โครงสร้าง BR3 ประกอบด้วย ส่วน CRD นอกเซลล์ 1 อันร่วมกับส่วนที่จับ TRAF3 ในเซลล์ การจับกันของ BLyS และ BR3 มีหลักฐานชัดเจนในหนู knockout และหนู mutant[124, 130] ว่าทำให้ B cell มีอายุยืน โดยผ่านสัญญาณทาง nonclassical NF- κ B และมีการ upregulation ของ Bcl-2 family members ซึ่งแตกต่างจากวิธีของ TACI ที่ Bcl-2 family จะยับยั้ง apoptosis ที่ตำแหน่งเหนือกว่า mitochondria



รูปที่ 2.7 รีเซปเตอร์ของโปรตีน BLyS และ APRIL พบว่ามีการใช้รีเซปเตอร์ร่วมกันคือ TACI และ BCMA แต่ก็มีรีเซปเตอร์เฉพาะเช่น heparan sulfate proteoglycan (HSPG) ใน APRIL และ BR3 ใน BLyS[93]

3. หน้าที่ของ BLyS family กับ preimmune B cell

การพัฒนาของ primary B cell และ subset

B cell เกิดจาก stem cell ในต้นขณะเป็นทารกในครรภ์ ในม้ามช่วงวัยเด็ก และในไขกระดูก เมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ multipotent cells ที่มี lymphoid pool gene expression จะเป็นเซลล์ตั้ง

ต้นของ B cell ระหว่างที่อยู่ในไขกระดูกทำหน้าที่สร้างอิมมูโนโกลบูลินทั้ง heavy และ light chain จะเรียกว่า BM pro และ pre B stages ต่อมาอิมมูโนโกลบูลินทั้ง heavy และ light chain จะรวมกันกับ Ig α และ Ig β เป็น BCR (B cell receptor) และมีการแสดงออกบนผิวเซลล์เรียกว่า immature (IMM) BM subset จากนั้น B cell จะออกจาก BM ไปยังม้าม ช่วงที่มีการพัฒนา ระหว่างนี้เรียก transitional (TR) development stage หลังจากนั้น B cell จะพัฒนาเต็มที่และทำหน้าที่เฉพาะอย่างสมบูรณ์ (mature privacy subsets) แบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ follicular (FO) และ marginal zone (MZ) population

ระหว่างพัฒนา B cell ขั้นตอนการเลือก B cell ที่จะมาทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันอยู่กับความจำเพาะของ BCR ที่เกิดขึ้นทั้งในระยะ IMM และระยะ TR ขั้นตอน negative และ positive selection ทำให้มีเพียง 10% ของ IMM cells เท่านั้นที่หลุดจากไขกระดูกและอีกน้อยกว่าครึ่งหนึ่งที่เหลือที่พัฒนาต่อเป็น preimmune B cell pool[131, 132]

negative selection คือ การกำจัด clone B cell ที่รู้จักแอนติเจนร่างกาย เกิดขึ้นทั้งในระยะ IMM และ TR B cell ที่มี BCR ที่จับแน่นจะถูกกำจัดออกเหลือแต่กลุ่มที่จับ BCR ได้แต่ไม่แน่นนัก [11] มีหลักฐานสนับสนุนในหนู transgenic[133-135] และในมนุษย์[41] ส่วน positive selection คือการเลือก clone B cell ที่มีความสามารถจับกับแอนติเจนนอกร่างกาย ("Tonic" BCR) ซึ่งพบในช่วง TR stage ขึ้นไป[136-140] พบว่าการที่ primary B cell อยู่รอดได้นั้นจำเป็นต้องมีการกระตุ้นผ่าน BCR signal อยู่เรื่อยๆ ไม่เช่นนั้นมันจะตาย [141] มีการทดลองเพาะเซลล์ chimera จากไขกระดูกพบว่า B cell ที่มาจาก cell lines 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีการแข่งขันกันเติบโตพร้อมกับการพัฒนา BCR specificity[142-145] เซลล์ที่มี BCR specificity สูงกว่าจะมีการอยู่รอดที่ยืนยาวกว่า[143, 144]

การแสดงออกของ BLyS receptor และการพัฒนาของ primary B cell

หลักฐานขณะนี้พิสูจน์ว่าการพัฒนาเป็น TR, FO และ MZ-B ต้องใช้ signal ของ BLyS ผ่าน BR3 เริ่มแรก immature B cell ในไขกระดูกจะมี BR3 และ TACI ปริมาณสูงและจะเพิ่มมากขึ้นในช่วง TR และสูงสุดช่วง preimmune FO และ MZ-B[146] จะไวต่อระดับ BLyS มาก พบว่ามีระดับ TACI, BR3 ที่แสดงออกสูงมากเช่นกัน[125, 147] signal ของ BLyS กับ BR3 จำเป็นต่อการอยู่รอดของ preimmune B cell ที่พัฒนาจาก TR stage

มีข้อมูลในหนู A/WySnJ[121-124, 148, 149] ที่มีการเพิ่ม 400 basepairs ที่หางยีน BR3 พบว่าหนูเหล่านี้มีการขาด mature B cell ปริมาณมาก อีกการศึกษาพบว่าการทำให้ระดับ BLyS เพิ่มขึ้นหรือทำให้มีการแสดงออกของ BLyS เพิ่มจะทำให้ B cell แบ่งตัวเพิ่มขึ้นและมีอาการ

ของ humoral autoimmune เกิดขึ้น นอกจากนี้หนูที่ถูกตัดยีน BLyS และ BR3 พบว่ามี B cell deficiency แบบเดียวกับหนู A/WySnJ[124, 130] อย่างไรก็ตามพบว่าในสัตว์ทดลองที่มีการตัดแต่งยีนในช่วง negative selection clone B cell ที่รู้จักแอนติเจนร่างกายไม่สามารถอยู่รอดได้แม้จะมี BLyS ปริมาณสูง สิ่งเหล่านี้สะท้อนถึงความสำคัญของ BCR และ BR3 ควบคู่กัน[150-154]

BLyS และ BR3 signal

BCR และ BR3 ใช้ mediators ที่ต่างกันในกระบวนการอยู่รอดของ B cell กล่าวคือ BCR จะจับกับ Src-tyrosine kinase กระตุ้นผ่าน รีเซปเตอร์ ที่มี oligomerization จากนั้นจะมีการสะสมของ signalosome ซึ่งจะเกิดภาวะที่ไวต่อการกระตุ้นของแคลเซียม มีการสร้าง MALT/BCL-10/CARMA complex และกระตุ้นผ่าน NF- κ B (classical)[155] ขณะที่ BR3 โดยอาศัยการร่วมมือของ TRAF3 ที่ทำให้เกิด NF- κ B inducing kinase (NIK) และกระตุ้นผ่าน nonclassical NF- κ B มีการสร้าง P52 จาก P100 ซึ่งเป็น substrate ของ BR3 ส่งผลให้เกิด survival ของ B cell ตามมา

NF- κ B family เป็น transcription factor ตัวหนึ่งของ B cell ถูกกระตุ้นผ่านรีเซปเตอร์หลายตัวที่แสดงบนผิวเซลล์หรือในเซลล์เช่น BCR, TLRs (toll like receptors) และ TNF รีเซปเตอร์[156] ประกอบด้วย pathway หลัก 2 ทางดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการกระตุ้นผ่านรีเซปเตอร์ตัวไหน แต่โดยหลักการมันจะกำจัด inhibitory domain ของ transcription protein ในรูปของ intracytoplasmic dimer[157] ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและสัมพันธ์กับ NF- κ B จัดอยู่ในกลุ่ม Bcl-2 family[125, 158]

TRAF3 มีความสำคัญในการเปลี่ยน P100 \rightarrow P52 ใน nonclassical NF- κ B โดยอาศัย kinase enzyme หลายตัว การย่อย TRAF3 จะเกิด NIK stabilization, INK α phosphorelation และการย่อย P100[159] พบว่าภาวะที่ขาด TRAF3 จะพบอัตราการอยู่รอดผ่าน BLyS เพิ่มขึ้น[160, 161] ทำให้เชื่อว่า BR3 มีบทบาทสำคัญในการย่อย TRAF[162-164]

นอกจากการกระตุ้นผ่าน NF- κ B แล้ว BLyS ยังควบคุมการอยู่รอดผ่าน BR3 signal โดยวิธีอื่นเช่น การเพิ่ม MTOR (mammalian target of rapamycin)[165] นำไปสู่การเพิ่ม anti-apoptotic protein ชื่อ myeloid cell leukemia 1 การเปลี่ยนตำแหน่งของ protein kinase C- δ ซึ่งยับยั้งการตายของเซลล์[166]

จากหลักฐานทั้งหมดสรุปได้ว่า BCR และ BLyS ต่างเกี่ยวเนื่องซึ่งกันและกัน ตัวอย่างเช่น B cell ที่ขาด BR3 จะไม่เจริญเป็น mature B cell แม้จะมีการแสดงออกของ BCR ทำนองเดียวกัน B

cell ที่ BCR ถูกทำลายไม่สามารถเจริญเป็น mature B cell ได้แม้จะมี BR3 ก็ตาม การแสดงออก และหน้าที่ของ BLyS family ของ Primary B cell ในระยะต่างๆสรุปดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การแสดงออกและหน้าที่ของ BLyS family ของ primary B cell ในระยะต่างๆ

[93]

Differentiation	Subset	Surface phenotype	BLyS binding	BLyS receptors	BLyS ligands	BLyS activity dependence
Progenitor subsets (Bone marrow)	Pro-B	B220 ^{lo} CD43 ⁺ AA4.1 ⁺	No	No	None	None
	Pre-B	B220 ^{lo} CD43 ⁺ AA4.1 ⁺ preBcR ⁺	No	No	None	None
	IMM (23 ⁻)	B220 ^{lo} ,sIgM ⁺ ,sIgD ⁻ ,CD23 ⁺	Low	No	None (?)	None described
	IMM (23 ⁺)	CD19 ⁺ B220 ⁺ sIgM ⁺ ,sIgD ⁻ ,CD23 ⁺	Low	BR3 TACI	None (?)	Biphasic BLyS binding within population
Transitional subsets (Spleen)	T1	IgM ^{hi} CD23 ⁻ B220 ^{int} AA4.1 ⁺	Low	BR3 TACI	None described	None described
	T2	IgM ^{hi} CD23 ⁺ B220 ⁺ A4.1 ⁺	Int	TACI BR3	BLyS	Survival, differentiation ?
	T3	IgM ^{lo} CD23 ⁻ B220 ^{hi} AA4.1 ⁺	Hi	TACI BR3	BLyS	Survival, differentiation ?
Mature primary subsets	FO	IgM ^{lo} CD23 ⁻ B220 ^{hi} AA4.1 ⁻	Hi	TACI BR3	BLyS	Survival
	MZ/ MZP	CD9 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD23 [±] CD21 ⁺	Hi	BR3 TACI ^{hi}	BLyS	Survival, differentiation ?
	B1	CD43 ⁺ CD23 ⁻ CD5 [±]	No?	No?	Partial BLyS dependence	Survival ?

4. หน้าที่ของ B₁LyS family กับ experienced B cell

antigen-experienced B cell แบ่งย่อยเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ antibody forming cell (AFCs), memory cell, short & long-lived plasma expanding cell (SLPC, LLPC), germinal center (GC) และ peritoneal B cell

การตอบสนองของ B cell แบ่งกลุ่มง่ายๆ เป็นกลุ่ม T-dependent response (TD) และกลุ่ม T-independence response (TI) โดยอาศัยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่าน T cell เป็นหลัก TD response พบใน FO B cell หลังจากที่ถูกจับแอนติเจนย่อยเป็นเปปไทด์สั้นๆ และนำเสนอ T cell ผ่าน MHC class 2 จะมีการเกิด class switch recombination (CSR) และ somatic hypermutation (SHM) ได้เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะใน germinal center (GC reaction) เซลล์ที่ผ่าน GC reaction ประกอบด้วย LLPCs ซึ่งอาศัยอยู่ในไขกระดูกและ memory B cell ซึ่งไม่ทราบที่อยู่ชัดเจน TI response ไม่อาศัย T cell และไม่เกิด GC reaction ดังนั้นจึงขาดความจำเพาะและไม่สามารถพัฒนาเป็น LLPCs ได้ TI antigen แบ่งเป็น TI-1 จะกระตุ้นผ่าน TLRs (Toll like receptor) ขณะที่ TI-2 ประกอบด้วย epitope ซ้ำๆ สามารถกระตุ้น BCR crosslink และจับ BCR ได้แน่นทั้ง TI-1 และ TI-2 พบใน MZ และ B1 cell

หลังจากสัมผัสแอนติเจนทั้ง TD และ TI response จะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วได้ short-lived plasma cells (SLPCs) และมีการสร้าง IgM เป็นหลัก บางส่วนเป็น IgG หลังจากนั้น TI response จะค่อยๆ ลดลงและหายไปภายใน 8-14 วัน ขณะที่ TD response ดำเนินอยู่ จะมีการสร้าง GC reaction ใน germinal center เองประกอบด้วยเซลล์ 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งแบ่งตัวเร็วมาก ขณะที่อีกกลุ่มไม่ค่อยแบ่งตัว ทำให้เห็นลักษณะพยาธิสภาพเป็น dark zone และ light zone CSR และ SHM เกิดขึ้นใน GC โดยมีการ switch ของ heavy chain Ig isotype และการสร้าง BCR ที่จำเพาะ clone cell ที่เกิดขึ้นจะถูกเลือกโดยไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน [167-169] และอยู่รอดเป็น LLPC และ memory B cell ซึ่งทั้งคู่หน้าตาไม่แตกต่างกันแต่หน้าที่แตกต่างกันชัดเจน [170-172] LLPC จะสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกรณี reinfection และเป็นแหล่งผลิต protective adaptive immunity ส่วน memory B cell จะแบ่งตัวเมื่อพบกับแอนติเจนทำให้ตอบสนองอย่างรวดเร็ว (anamnestic response)

B₁LyS receptor กับ TI activation

หลังจากที่สัมผัส TI-1 หรือ TI-2 แอนติเจน B cell จะมี upregulation ของ TACI [129] มากกว่านั้น TACI expression จะเพิ่มจำนวน AFCs ตามหลัง TI-2 response [173] บทบาทของ TACI ในการแบ่งตัวอย่างเร็วของ T cell ที่อายุสั้น ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน จากข้อมูลขณะนี้เชื่อว่า

เกี่ยวกับการควบคุม cell cycle TACI จะทำงานได้นั้นต้องถูกจับกับ multimeric ligand เช่น oligomerized BlyS หรือ surface bound APRIL[166] ปกติแล้ว SLPCs ไม่ว่าจะจาก TI หรือ TD response จะมีการแสดงออกของ TACI ปริมาณสูง ความแตกต่างของรีเซปเตอร์ในแต่ละเซลล์ อาจมีบทบาทในแง่ life span การกระตุ้น TACI จะส่งผลผ่าน classical NF- κ B โดยกลไก post-mitochondrial anti-apoptotic mechanism (รวมถึง stress response protein เช่น XIAP) ทำให้กลไก cell cycle checkpoint ผิดพลาด ทำให้ B cell แบ่งตัวและสร้าง Ig ต่อไป[174] ต่างจากการกระตุ้น BR3 ซึ่งผ่าน pre-mitochondrial survival mechanism การแสดงออกและหน้าที่ของ BlyS family ของ antigen-experienced B cell สรุปดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การแสดงออกและหน้าที่ของ BlyS family ของ antigen-experienced B cell [93]

Differentiation	Subset	Surface phenotype	BlyS receptors	BlyS ligand dependence	BlyS ligand activity
T-independent response	Early AFC/SLPC	B220 ^{lo} CD19 ⁺ sIg ⁺ iClg ^{hi}	BR3, TACI	?	?
T-dependent response	Early AFC/SLPC	B220 ^{lo} CD19 ⁺ sIg ⁺ iClg ^{hi}	BR3, TACI	?	?
	GC	B220 ⁺ CD19 ⁺ GL7 ⁺	BR3, TACI	?	*
	LLPC	B220 ^{lo} sIg ⁺ iClg ⁺	BCMA, TACI?	BlyS or APRIL	Survival ?
	Memory	B220 ⁺ sIg ⁺ IgD ⁻	TACI ?	None ?	?
Natural antibodies	Peritoneal B1a and B1b	CD43 ⁺ CD23 ⁺ CD5 [±]			

* พบว่า antigen-experienced B cell ที่ขาด BlyS และ BR3 จะมี GC formation ขนาดเล็กและคงอยู่เป็นระยะเวลาสั้นๆ

BLyS signal กับ germinal center reaction

กลไก negative และ positive selection โดยอาศัยความจำเพาะของ BCR ที่เกิดขึ้นใน GC เหมือนกับในขั้นตอนการพัฒนาของ primary B cell มีหลักฐานทำให้เชื่อว่า BLyS family น่าจะมีบทบาทตรงนี้เช่นกัน ปกติแล้ว BCR engagement และ CD40 ligation จะทำให้ BR3 upregulation[140] Qian และคณะแสดงให้เห็นว่า Act 1 ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้ง BR3 และ CD40 สามารถทำให้ GC มีการปรับการแสดงออกของ TNF family receptor ได้[175] TACI เพิ่มขึ้นในกลุ่ม TD เช่นกันแม้จะไม่มากเท่า TI แอนติเจน แม้ว่า BLyS-BR3 จะสำคัญใน TD response แต่ในการศึกษาของหนู AWySnJ ซึ่งขาด BR3 กลับพบว่า GC เกิดขึ้นแต่ประสิทธิภาพลดลง[122]

อีกการศึกษาที่สอดคล้องของกลุ่ม Manser พบว่า BR3 ไม่ใช่สิ่งสำคัญในการเกิด GC[176] แต่มีบทบาทในการดำเนินของ GC reaction โดยในการศึกษานี้ยังใช้ BCMA-Fc ไปบล็อก APRIL และ BLyS พบว่าได้ผลเหมือนการขาด BR3[176, 177] นอกจากนี้คณะ FDC network พบว่า GC จะไม่พัฒนาถ้า BLyS และ APRIL ถูกบล็อก[178] ซึ่งอาจอธิบายเหตุที่ B cell ใน GC มีจำนวนน้อยลงได้

BLyS signals ใน LLPC และ memory cells

หลักฐานที่มีพบว่า BCMA จำเป็นสำหรับ LLPC survival[175] BCMA สามารถจับได้ทั้งกับ BLyS และ APRIL และพบว่าการขาด APRIL หรือ BLyS ตัวใดตัวหนึ่ง ทำให้ LLPC อายุสั้นลง[113]โดยปกติ osteoclast จะหลั่ง APRIL ปริมาณมาก จึงไม่แปลกที่ LLPC จะใช้ APRIL เป็น survival factor นอกจากนี้ APRIL ยังจับกับ proteoglycan[179] ซึ่งพบมากในเซลล์อื่นของไขกระดูกด้วย กลไกของ BCMA signal ใน LLPC ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงยาก อย่างไรก็ตามพบว่า B cell และ plasma cell มีการกระตุ้นผ่าน classical NF- κ B ภายหลัง BCMA signal[180] และมีการสร้างโปรตีนที่ช่วยในการเสนอแอนติเจนและการเพิ่มการสร้าง IL2 ตรงกันข้ามกับ LLPC แม้ว่า memory B cell มีระดับ TACI สูงแต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ BLyS และ APRIL เลย[113] และพบว่าทำให้ anti-BLyS ไม่สามารถกำจัด memory B cell ได้[181]

5. BLyS family receptor และ cytokine กับ การเกิดโรค

จากบทบาทของ BLyS family ต่อ primary B cell และ antigen-experienced B cell ที่กล่าวมาทำให้เข้าใจถึงการมีส่วนเกี่ยวข้องของ ligands เหล่านี้กับการเกิดโรคออโตอิมมูนและโรคมะเร็ง การเข้าใจกลไกของ BLyS family มากขึ้นนำไปสู่การรักษาใหม่ที่เกี่ยวข้องกับ B cell immunity และ tolerance[182] เช่นการพัฒนาวัคซีนและ transplant tolerance ตัวอย่างความ

ผิดปกติเช่น พบการเพิ่มของซีรั่ม BLyS ในโรคออโตอิมมูนหลายโรคเช่น SLE, RA และ Sjogren' syndrome[177, 183-185] แม้ว่าความสัมพันธ์ยังต้องค้นคว้าต่อไป แต่การจำกัด autoreactive B cell ในระยะ TR differentiation จะช่วยบรรเทาอาการโรคลงได้[186] ในทางตรงข้ามผู้ป่วยที่ขาด TACI ทำให้ไม่สามารถตอบสนองต่อ BLyS และ APRIL จะเกิดโรค common variable immune disease (CVID)[187] ซึ่งมีความผิดปกติในการสร้าง Ig นอกจากนี้พบว่า ความผิดปกติของ TRAF ซึ่งเป็น tumor suppressor พบในผู้ป่วย multiple myeloma อีกด้วยหน้าที่ของ BLyS family โดยสรุปในตารางที่ 2.7

ปัจจุบัน B cell ablative therapy เป็นการรักษาหลักของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวทำโดยการให้ anti-CD20 การให้ BLyS-targeting therapy อาจได้ประโยชน์ถ้าให้เดี่ยวหรือให้ร่วมกับ ablative therapy ทั้งนี้ต้องรอผลการรักษาต่อไป

ตารางที่ 2.7 หน้าที่ของ BLyS family โดยสรุป[93]

Function	Mediated by				
	BLyS	APRIL	TACI	BCMA	BLyS-R
B cell costimulation	++	++	+	+	++
Plasmablast and plasma cell survival	++	++		++	
Ig class switch	++	++	++		++
Enhanced B cell APC function	++	++		++	
Survival of malignant B cells	++	++	+	+	+
T cell independent type II receptor	++	++	++		
Modulation of T cell dependent responses	++	+	++	++	++
T cell costimulation	++	+	+		+
B1 cell function	+	+	+		+
B cell development (beyond T-1)	++				++
Complete germinal centre formation	++		++	++	++
Survival/ proliferation of carcinomas		++			

6. บทบาทของ BlyS ในผู้ป่วยลูปัส

B lymphocyte stimulator (BlyS ชื่ออื่นๆได้แก่ BAFF, TALL-1, THANK, NFSF13B และ zTNF4) จัดอยู่ในกลุ่ม tumor necrosis factor (TNF) ligand superfamily ประกอบด้วย 285 อมิโนแอซิด โดยปกติมันจะอยู่ในรูปของ transmembrane protein type 2 และจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ furine protease ได้เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ขนาด 17 กิโลดาลตัน รูปร่างแบบ trimeric ในหลอดทดลองบางแห่งพบว่าในสภาวะที่เหมาะสม BlyS จะจับเป็นกลุ่มขนาด 60 โมโนเมอร์รูปร่างคล้ายกลุ่มไวรัส ในขณะที่ห้องปฏิบัติการบางแห่งไม่พบลักษณะเช่นนี้ ซึ่งต้องการพิสูจน์ต่อไป

พบว่า BlyS มีปริมาณมากในกลุ่มเซลล์ myeloid ซึ่งได้แก่ monocytes, macrophages dendritic cells หรือ neutrophils เป็นต้น การสร้างโปรตีนตัวนี้รวมถึง mRNA ถูกควบคุมโดย interferon gamma, interleukin 10, interferon α และ CD40L สำหรับ BlyS รีเซปเตอร์ ซึ่งมี 3 ชนิด ได้แก่ BCMA, TACI และ BAFFR พบจำกัดเฉพาะในกลุ่ม B cells โดย BlyS จะจับรีเซปเตอร์แน่นสุดในกลุ่ม B cell จับหลวมๆในกลุ่ม T cell และไม่จับกับ NK cell หรือ monocyte

กลไกการกระตุ้น signal ในเซลล์ของ BlyS ค่อนข้างซับซ้อน การจับของ BlyS และ รีเซปเตอร์ ต้องอาศัย TNF associated factors (TRAFs) (ประกอบด้วย TRAF1, 2, 3, 5 และ 6)[164, 188-190] ช่วยกระตุ้น phospholipase C- γ^2 [191] จากนั้นจึงผ่าน NF- κ B1 และ NF- κ B2[192, 193] สุดท้ายมีการเพิ่ม B cell survival[86, 124, 146, 194-196] นอกจากนี้กลไกสำคัญอีกอย่างคือการที่ BlyS เหนี่ยวนำให้มี upregulation ของ BCL-2 และหรือ BCL-XL[195] ปกติแล้ว B cell ที่มีการแสดงออกของ BCL-XL จะสามารถมีชีวิตยืนยาวได้แม้ไม่มี BlyS signal[197]

ความสำคัญของ BlyS-BAFFR กับการพัฒนาของ B cell

หนูที่ขาดยีน BlyS โดยพันธุกรรม พบว่ามีการลดลงของ mature B cells, ระดับ Ig และการตอบสนองของ Ig ผ่าน T cell dependent (TD) และ T cell independent (TI) แอนติเจน[84, 198]

หนูที่ขาดยีน BlyS receptor กลับมีผลลัพธ์ที่แตกต่างออกไปขึ้นกับรีเซปเตอร์เช่น หนูที่ขาดยีน BCMA กลับไม่พบความผิดปกติของ B cell ทั้งแง่ phenotype และ function[84, 199] การเพิ่มการแสดงออกของ BCMA บนผิวเซลล์ human plasmablasts[194] ก็ไม่พบความแตกต่างเช่นกัน เชื่อว่าเป็นเพราะ BlyS ยังสามารถผ่าน signal ทาง รีเซปเตอร์อื่นได้อีก

หนูที่ขาดยีน TACI กลับพบว่าการเพิ่มจำนวน B cell และการตอบสนอง Ig response ต่อ TD แอนติเจนคงเดิม อย่างไรก็ตาม Ig response ต่อ TI แอนติเจนกลับลดลง เมื่อหนู แก้วตัวลง พบว่ามีการสร้าง autoantibody เพิ่มขึ้น และสะสมในเนื้อไตและพบว่าอายุสั้นกว่าปกติ[128] การให้ anti-TACI mAb สามารถบล็อกการตอบสนองของ B cell ในหลอดทดลองได้ ตรงกันข้ามหนู

AWySnJ (ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของ BAFFR ยีน) พบว่ามีจำนวน mature B cell และการตอบ สนอง ทางภูมิคุ้มกันต่ำลงมาก แต่น้อยกว่าหนูที่ขาดยีน BLyS[125, 200] แม้จะฉีด BLyS เพิ่มให้แก่หนูเหล่านี้ ก็ไม่มีการเพิ่มจำนวน B cell ในม้าม และไม่พบว่า survival ของ B cell เพิ่มขึ้น เช่นกัน ในหลอด ทดลองพบว่า B cell ที่มี mutated BAFFR ยีน มีอายุสั้นกว่า[124] จากข้อมูลทั้งหมดกล่าวได้ว่า BLyS และ BAFFR มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดออโตอิมมูนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

BLyS และ Ig promoting effect

นอกจากผลของ BLyS ต่อการพัฒนาของ B cell การฉีด BLyS แก่หนูในช่วงที่ได้รับการ กระตุ้นแอนติเจนพบว่ามีเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี[195] เชื่อว่าเป็นผลจากการยับยั้ง B cell apoptosis[86, 124, 146, 194-196] การให้ BLyS ซ้ำๆแก่หนูในช่วงที่ไม่ได้รับการกระตุ้นแอนติเจน ก็ยังพบว่ามีเพิ่มขึ้นของทั้งจำนวน B cell และ Ig[90] BLyS สนับสนุน T cell independent classswitching ของ IgD+[201] ทั้งในหลอดทดลองและ in vivo แม้ว่าเพิ่มขึ้นของ autoantibody (เช่น anti-dsDNA) ในโรคลูปัสเชื่อว่าเป็นจากผลของ helper T cell dependent process แต่ตามทฤษฎีก็เป็นไปได้เช่นกันถ้ามีการแสดงออกของ BLyS ที่มากโดยไม่อาศัย helper T cell function

BLyS และ Antagonism ในหนูลูปัส

หลักฐานสนับสนุนการมี BLyS overexpression กับการโรคออโตอิมมูนในหนูเริ่มจาก พบว่ามีเพิ่มขึ้นของ BLyS นอกจากมี Ig ที่เพิ่มขึ้นแล้ว ในส่วนนี้พบว่าเป็น autoantibody ต่อ ร่างกายหลายชนิด มีการตรวจพบ circulating immune complex และการสะสม Ig ในไตหนู[89, 202, 203] ถัดมาหนูที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคลูปัส (NZB, NZW1F1, BWF1 และ MRL-*lpr/lpr*) พบว่ามีระดับ BLyS ที่สูงกว่าปกติในช่วงแรกของการเกิดโรค[202] และมีการตอบสนองต่อการให้ soluble fusion protein ที่จับกับ BLyS ได้เช่น TACI, BLyS R และ IgG Fc (TACI-Ig และ BLyS R-Ig)[193, 202]

ผลการให้ BAFFR-Ig ในหนู BWF1 พบว่าสามารถลดระดับ anti-dsDNA ได้ ขณะที่การให้ TACI-Ig ในหนู BWF1 เช่นกัน ในอีกการศึกษากลับไม่สามารถลดระดับ anti-dsDNA เลย[202] สิ่งที่เกิดขึ้นอาจเกิดจาก BLyS antagonists ที่ใช้แตกต่างกัน หรือประสิทธิภาพของการบล็อกด้วย BLyS antagonist อาจผ่านกลไก autoantibody independent ซึ่งซับซ้อนกว่าที่คิด

การเพิ่มขึ้นของ BLyS ในผู้ป่วยโรคลูปัส

จากการศึกษา cross-sectional พบว่าจำนวนผู้ป่วยโรคลูปัสที่มีระดับซีรั่ม BLyS สูงพบประมาณ 20-30% ของผู้ป่วยทั้งหมด[204, 205] และยังพบความสัมพันธ์กับระดับ anti-dsDNA แต่กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLyS และระดับ total IgG ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหนู Tg[89, 202, 203]

การศึกษาลำดับมา ศึกษาานาน 12 เดือนในผู้ป่วยลูปัส 68 คน และคนปกติ 20 คน โดยเทียบระดับซีรั่ม BLyS, ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ และ clinical activity[206] พบว่าในคนปกติจะมีระดับซีรั่ม BLyS คงที่ตลอด ขณะที่ผู้ป่วยโรคลูปัสพบว่า 25% มีระดับ BLyS สูงค้างและอีก 25% มีระดับ BLyS สูงเป็นพักๆ[206] เชื่อว่าการพบความผิดปกติของ BLyS ในรูปแบบหลังในผู้ป่วยโรคลูปัสเป็นผลจากการได้สเต็มเซลล์ขนาดสูง นอกจากนั้นระดับซีรั่ม BLyS กลับไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (วัดโดย SLEDAI)[206] เฉพาะบุคคล แต่พบความสัมพันธ์กับมหภาค (245 คนจาก 4 ศูนย์วิจัย ในช่วง 15 เดือน) ขณะนี้ยังไม่ทราบว่าทำไมจึงมี BLyS เพิ่มขึ้น ถึงแม้ BLyS ไม่มี proinflammatory property แต่ผลแง่บวกต่อ B cell survival และการสร้าง autoantibody สามารถทำให้โรคกำเริบได้

การรักษาผู้ป่วยลูปัสด้วย BLyS antagonism

จากความสัมพันธ์ของ BLyS กับการเกิด autoantibody และความรุนแรงของโรคลูปัส ทำให้มีการคิดค้นวิธีการรักษาโรคลูปัสในมนุษย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 การรักษาผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องด้วย BLYS antagonism[207]

Molecule	Companies	Description	Neutralizes			Clinical trial status
			BLYS	APRIL	HTs	
<i>In development</i>						
Lymphostat-B (Belimumab)	Human Genome Sciences/ GlaxoSmithKline	Haman anti-BLYS mAb	X		?	Phase II SLE and RA
TACI-Ig	ZymoGenetics/ Serono	Soluble TACI-Ig	X	X	X	Phase I SLE, RA, MM, and NHL
AMG 623*	Amgen	BLYS antagonist	X		?	Phase I SLE and RA
BR3-Fc	Genentech/ Biogen Idec	Soluble BLYS-R-Ig	X			Phase I RA
<i>Potential therapeutics</i>						
APRIL-specific BCMA-Ig	Genentech	Mutated version of BCMA that only binds APRIL		X	NT	Preclinical/exploratory
??	??	Soluble BCMA-Ig	X	X		Hypothetical
??	Human Genome Sciences	Anti-APRIL mAb		X		Hypothetical

APRIL, a proliferation-inducing ligand; BLYS-R, B-cell activating factor of the TNF family receptor; BCMA, B-cell maturation antigen; BLYS, B lymphocyte stimulator; mAb, monoclonal antibody; HTs, heterotrimers; MM, multiple myeloma; NHL, Non-Hodgkin's lymphoma; NT, not tested; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; TACI, transmembrane activator and CAML interactor.

*http://www.amgen.com/science/pipe_AMG623.html

Belimumab (Lymphostat-B) เป็น human anti-BLyS mAb ที่พัฒนาขึ้นโดยบริษัท GlaxoSmithKline กำลังอยู่ใน phase 2 trial ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางและรูมาตอยด์ พบว่าผลข้างเคียงในผู้ป่วยรูมาตอยด์ แต่กลับไม่แตกต่างในผู้ป่วยโรคโลหิตจาง BLyS inhibitor หรือ AMG623 อยู่ใน phase 1 ของผู้ป่วยโรคโลหิตจางและรูมาตอยด์ TACI-Ig ซึ่ง neutralize ทั้ง BLyS, APRIL และ BLyS/APRIL heterotrimer โดยบริษัท ZymoGenetics และ Serono อยู่ใน phase 1 ของผู้ป่วยโลหิตจาง, multiple myeloma, nonhodgkin's lymphoma, B-CLL และอยู่ใน phase 1b ของผู้ป่วยรูมาตอยด์

นอกจากการใช้ mAb หรือ receptor fusion protein ในการรักษาผู้ป่วยยังมี biologic antagonist วิธีอื่นที่น่าสนใจเช่น การใช้ BLyS analogues แย่งจับกับ BLyS-R โดยที่ไม่ออกฤทธิ์กระตุ้น signal การใช้ small molecule synthetic component compound แทน เป็นต้น

ปัจจุบันเราพบ isoform ของ BLyS ที่มีขนาดเล็กกว่าและไม่ออกฤทธิ์ สามารถรวมกับ BLyS เป็น heterotrimer ได้ชื่อ Δ BAFF[100] สำหรับการเปลี่ยนแปลงระดับ Δ BAFF กับโรคโลหิตจางยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การเพิ่มปริมาณ Δ BAFF isoform อาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถรักษาโรคโลหิตจางได้

ขณะนี้คำถามว่าใครควรได้ประโยชน์จากการให้ BLyS antagonist ยังไม่มีใครตอบได้ มีการวางทฤษฎีไว้ 2 ลักษณะคือ ข้อแรกเชื่อว่า BLyS เป็นตัวกระตุ้น (contributor) ให้อาการของโรคโลหิตจางรุนแรงขึ้นด้วยหลักฐานที่ว่า BLyS เป็น B cell survival stimulator ฉะนั้นควรให้ยาในคนที่มียกระดับ BLyS สูง อีกข้อเชื่อว่า BLyS เป็นตัวช่วยขับเคลื่อน (facilitator) การเกิดโรคโลหิตจาง จากหลักฐานที่พบว่าผู้ป่วยโรคโลหิตจางไม่จำเป็นต้องมียกระดับ BLyS ในปริมาณสูง แต่มีในระดับที่เพียงพอในการควบคุมการสร้างแอนติบอดี ฉะนั้นการให้ยาในคนที่มียกระดับ BLyS ปกติ จะมีความคุ้มค่ากว่าการให้ในผู้ป่วยที่มี BLyS ปริมาณมาก

7. APRIL กับโรคโลหิตจาง

การทดลองในหนู เช่น หนู BWF1 พบว่าการให้ BAFFR-Ig สามารถ neutralize APRIL ทำให้โรคสงบลง[193] ในหนู APRIL-Tg (มี overexpression ของ APRIL) พบว่า T cell อายุยาวขึ้นและมีการสร้างแอนติบอดีที่เหมาะสมโดยไม่มีความผิดปกติของจำนวน B cell หรือการกำเริบของอโตอิมมูน แม้ว่า homotrimers ของ APRIL ไม่สามารถจับกับ BAFFR แต่ APRIL ยังรวมกับ BLyS เป็น BLyS/APRIL heterotrimers (BAHT) ได้และจับกับ BAFFR ออกฤทธิ์เหมือน BLyS [208] ทำให้เชื่อว่าการมี APRIL overexpression จะนำไปสู่ออโตอิมมูนได้ แต่สมมติฐานนี้มีหลักฐานแย้งหลายอย่างเช่น หนู APRIL-Tg พบอาการคล้ายโลหิตจางน้อยมาก[209] และการศึกษาในมนุษย์พบว่าซีรั่ม APRIL แปรผกผันกับระดับ anti-dsDNA และความรุนแรงของโรค เนื่องจาก

หลักฐานขั้นต้นสนับสนุนว่า APRIL น่าจะมี negative signal ต่อ B cell ทำให้ขณะนี้มีความพยายามที่จะพัฒนายาที่มุ่งออกฤทธิ์เฉพาะต่อ BlyS โดยไม่มีผลต่อ APRIL

2.2 การจัดแบ่งความรุนแรงของโรคตามลักษณะทางพยาธิวิทยาและการดำเนินโรคของไตอักเสบลูโปส (pathological classification and natural history)

ปี พ.ศ. 2546 ทาง International Society of Nephrology / Renal Pathology Society [210] ได้มีการทบทวนแก้ไขการจัดกลุ่ม (classification) โดยทดแทนเกณฑ์ของ WHO เดิมซึ่งใช้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 โดยมีแพทย์หลายสาขาเข้าร่วม เช่น แพทย์ด้านโรคข้อและรูมาติซั่ม แพทย์โรคไต และพยาธิแพทย์ ที่ประชุมมีการเปลี่ยนแปลงในรายละเอียด เช่น ความผิดปกติของชั้นเนื้อในไตของผู้ป่วย ซึ่งนอกจากจะพบการเปลี่ยนแปลงของ glomerulus แล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงทั้งใน tubular interstitium และ vascular ร่วมด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีความแตกต่างทางชั้นเนื้อค่อนข้างมากและหลายรูปแบบ แม้กระทั่งผู้ป่วยรายเดียวกันแต่ต่าง glomerulus หรือใน glomerulus เดียวกัน แต่ต่าง segment กันก็จะมี การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน จุดมุ่งหมายในการสร้างเกณฑ์การจำแนกประเภทใหม่ก็เพื่อให้มีการจำแนกประเภทที่ชัดเจนและนำไปใช้ได้สะดวก ผู้เข้าร่วมประชุมได้แก้ไขในส่วนของคำจำกัดความและการวินิจฉัยให้เป็นมาตรฐานมากขึ้น นอกจากนี้ที่ประชุมยังสนับสนุนให้มีการใช้ chronicity parameter แบบใหม่และสนับสนุนการวินิจฉัยโดยใช้ light microscope ร่วมกับการย้อม immunofluorescence และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในกรณีที่มีวินิจฉัยยาก รายละเอียดของการจัดกลุ่มแสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 การจัดกลุ่มของ lupus nephritis โดย International Society of Nephrology

/ Renal Pathology Society[210]

Class I	Minimal mesangial lupus nephritis
	Normal glomeruli by light microscopy, but mesangial immune deposits by immunofluorescence
Class II	Mesangial proliferative lupus nephritis
	Purely mesangial hypercellularity of any degree or mesangial matrix expansion by light microscopy, with mesangial immune deposits may be a few isolated subepithelial or subendothelial deposits visible by immunofluorescence or electron microscopy, but not by light microscopy
Class III	Focal lupus nephritis †
	Active or inactive focal, segmental or global endo- or extracapillary glomerulonephritis involving <50% of all glomeruli, typically with focal subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations
Class III (A)	Active lesions: focal proliferative lupus nephritis
Class III (A/C)	Active and chronic lesions: focal proliferative and sclerosing lupus nephritis
Class III (C)	Chronic inactive lesions with glomerular scars: focal sclerosing lupus nephritis
Class IV	Diffuse lupus nephritis ‡
	Active or inactive diffuse, segmental or global endo- or extracapillary glomerulonephritis involving > 50% of all glomeruli, typically with diffuse subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations. This class is divided into diffuse segmental (IV-S) lupus nephritis when > 50% of the involved glomeruli have segmental lesions, and diffuse global (IV-G) lupus nephritis when > 50% of the involved glomeruli have global lesions. Segmental is defined as a glomerular lesion that involves less than half of the glomerular tuft. This class includes cases with diffuse wire loop deposits but with little or no glomerular proliferation
Class IV-S (A)	Active lesions: diffuse segmental proliferative lupus nephritis
Class IV-G (A)	Active lesions: diffuse global proliferative lupus nephritis
Class IV-S (A/C)	Active and chronic lesions: diffuse segmental proliferative and sclerosing lupus nephritis
Class IV-S (C)	Active and chronic lesions: diffuse global proliferative and sclerosing lupus nephritis
Class IV-G (C)	Chronic inactive lesions with scars: diffuse segmental sclerosing lupus nephritis
	Chronic inactive lesions with scars: diffuse global sclerosing lupus nephritis
Class V	Membranous lupus nephritis
	Global or segmental subepithelial immune deposits or their morphologic sequelae by light microscopy and by immunofluorescence or electron microscopy, with or without mesangial alterations. Class V lupus nephritis may occur in combination with class III or IV in which case both will be diagnosed class V lupus nephritis show advanced sclerosis
Class VI	Advanced sclerosis lupus nephritis
	> 90% of glomeruli globally sclerosed without residual activity

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

2.2.1 การประเมินความรุนแรงของโรคในทางคลินิก

โรคไตอักเสบจากโรคโรคไต เป็นโรคที่มีอาการทางคลินิกหลากหลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพที่ไตเป็นหลัก โดยทั่วไปผู้ป่วยมีพยาธิสภาพของไตที่ไม่รุนแรง (class I, II) อาจพบมีการรั่วของโปรตีนและเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะเพียงเล็กน้อยโดยไม่พบความผิดปกติอื่น มีการพยากรณ์โรคในระยะยาวที่ดีที่สุด แต่ในบางรายพบว่าอาจมี transformation คือ เปลี่ยนจาก class I, II ไปเป็น class III หรือ IV ได้ ในกลุ่มที่มีการอักเสบของไตที่รุนแรงขึ้น ได้แก่ class III, IV จะมีการรั่วของโปรตีนและเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะมากขึ้น มักพบมีการบวม (edema) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และมีการเสื่อมของการทำงานของไตได้ (renal failure) การพยากรณ์โรคในระยะยาวจะแยกว่า โดยเฉพาะใน class IV ซึ่งจะมีการเสื่อมการทำงานของไตได้รวดเร็วจนเกิดไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายได้ ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ส่วนในกลุ่มที่มีพยาธิสภาพของไตเป็นแบบ class V นั้น จะมาพบแพทย์ด้วยอาการบวม และ proteinuria เป็นหลัก (มักจะเป็น nephrotic range proteinuria) การเสื่อมการทำงานของไตจะเกิดขึ้นเร็วกว่าใน class IV ทำให้มีการพยากรณ์โรคโดยรวมดีกว่า แต่โรคมักไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษา

การกำเริบของภาวะไตอักเสบจากโรคโรคไต ในปัจจุบันอาจแบ่งได้เป็นชนิด nephritic flare โดยมีลักษณะที่พบได้แก่ มีปริมาณเซลล์ในปัสสาวะเพิ่มผิดปกติ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เม็ดเลือดขาว มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนในปัสสาวะ การเพิ่มขึ้นของระดับครีเอตินินในเลือด มีการลดลงของระดับคอมพลีเมนต์ หรือมีการเพิ่มขึ้นของระดับของ anti-dsDNA และชนิด nephrotic flare โดยมีลักษณะโปรตีนรั่วในปัสสาวะเด่น[211]

2.2.2 การประเมินจาก clinical activity score [212-214]

ปัจจุบันได้มีการคิดเครื่องมือในการวัดระดับความรุนแรงของโรคไตในทางคลินิก ซึ่งกลุ่มผู้ใช้จะพิจารณาแต่ละวิธีขึ้นกับความไว ความจำเพาะ ความถูกต้องเชื่อถือได้ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายด้วย activity score ที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ SLEDAI-2K ซึ่งได้ปรับปรุงขึ้นในปี พ.ศ.2545 โดยดัดแปลงจาก SLEDAI score เดิม โดยจะประเมินอาการที่เกิดขึ้นภายใน 10 วัน ก่อนการประเมิน โดยมีอาการทางคลินิก 24 หัวข้อและให้น้ำหนักของแต่ละอาการ ตั้งแต่ 1 ถึง 8

คะแนนแล้วแต่ชนิดของอาการ โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 105 คะแนน แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2.10 SLEDAI-2K แตกต่างจาก SLEDAI score เดิม โดยกรณีที่มีผื่น ผม่วง แผลในเยื่อเมือกหรือการมีโปรตีนรั่วในปัสสาวะ ถ้ากรณีที่ยังคงมีรอยโรคอยู่ให้ถือว่ายังมีอาการผิดปกติอยู่ ซึ่งหากเป็น SLEDAI score เดิมจะถือเฉพาะกรณีเกิดใหม่ไม่นับรวมกรณีที่ยังคงมีรอยโรคอยู่ ซึ่งพบว่า SLEDAI-2K ทำให้ประเมินผู้ป่วยได้ละเอียดและแม่นยำขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่ามีประโยชน์ในการพยากรณ์อัตราการเสียชีวิตได้

ตารางที่ 2.10 แสดงการให้คะแนนตาม SLEDAI-2K[215]

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

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

นอกจากนี้ยังมีการประเมินจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น เช่น anti-dsDNA โดยมี

การศึกษาที่บ่งว่าสามารถพยากรณ์การกำเริบของโรคได้[215, 216] โดยเฉพาะเป็นตัวชี้วัดการกำเริบของไตอักเสบ อย่างไรก็ตามก็มีการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วยที่มีอาการทางไตกำเริบก็สามารถพบว่าระดับลดลงหรือปกติได้[217]หรือการใช้ระดับ complement โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการกำเริบโรค ในทางเวชปฏิบัตินิยมใช้ในการวัดติดตามควบคู่กับอาการทางคลินิก อย่างไรก็ตามพบว่ามีควมไวและความจำเพาะต่ำ เนื่องจากระดับในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยอื่น เช่น อัตราในการสร้างเทียบกับอัตราของการใช้ ซึ่งพบว่าในภาวะที่เกิดการอักเสบจะมีทั้งการเพิ่มการสร้างและการใช้ complement นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะพบความสัมพันธ์ของระดับ complement กับอาการกำเริบทางคลินิก เช่น SLEDAI score แต่พบว่าไม่มีปัจจัยใดที่สามารถพยากรณ์การเกิดการกำเริบซ้ำได้

2.2.3 การปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะ

ปริมาณของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะเป็นตัวชี้วัดการเสื่อมของไตโดยพบว่าการเสื่อมของการทำงานของไตสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นในปัสสาวะ การมีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่มากขึ้นก็จะมีอาการเสื่อมของการทำงานของไตมากขึ้นโดยแสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ glomerular filtration rate (GFR) มากขึ้นและยังพบว่าถ้าสามารถลดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะลงก็จะสามารถชะลอการเสื่อมของไตได้ การใช้ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะเพื่อบอกการกำเริบของไตในผู้ป่วยโรคไตเป็นที่ยอมรับโดยเฉพาะในกลุ่มที่มี nephrotic flare การวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะทำได้โดย

1. ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะจากการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สามารถหาได้โดยการวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะ และปริมาณของปัสสาวะที่เก็บได้ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$24\text{-hr urine protein (g/day)} = [\text{Upro (mg/dl)} / 1000] \times [\text{V (ml/day)} / 100]$$

โดย 24-hr urine protein = ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นกรัมต่อวัน (g/day)

Upro = ระดับโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

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

การหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธีนี้ สามารถบอกปริมาณจริง (absolute value) ของ

โปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้และเป็นวิธีที่เคยได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุด (gold standard) ในการวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ แต่ต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ป่วยเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ภายใต้วงการนี้ อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากความผิดพลาดในการเก็บปัสสาวะ บางครั้งอาจเก็บปัสสาวะได้ไม่ครบและบางครั้งเก็บปัสสาวะมามากเกินไป ทำให้ปริมาณปัสสาวะที่ในการคำนวณปริมาณโปรตีนในปัสสาวะผิดไปจากความเป็นจริง

2. สัดส่วนของโปรตีนเทียบกับ creatinine ในปัสสาวะ (UPCI)[218]

การใช้ระดับโปรตีนในปัสสาวะเพียงอย่างเดียวอาจใช้ประเมินปริมาณโปรตีนในปัสสาวะได้ อย่างคร่าว ๆ แต่จะมีความผิดพลาดได้มากกว่าความเปลี่ยนแปลงของปริมาณปัสสาวะซึ่งเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาขึ้นกับปริมาณน้ำในร่างกาย

เนื่องจากในภาวะปกติร่างกายจะขับครีอะตินินออกมาในปัสสาวะในอัตราที่ค่อนข้างจะคงที่ และระดับของครีอะตินินในปัสสาวะก็จะเปลี่ยนแปลงตามปริมาณของปัสสาวะเช่นเดียวกับระดับโปรตีนในปัสสาวะ การนำระดับของโปรตีนในปัสสาวะมาเทียบกับระดับครีอะตินินในปัสสาวะจึงสามารถลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความเปลี่ยนแปลงของปริมาณปัสสาวะได้ และสามารถนำไปใช้ในการประเมินปริมาณโปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้ดี

สัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนในปัสสาวะเทียบกับระดับของครีอะตินินในปัสสาวะ (UPCR) สามารถหาได้โดยการวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะและระดับของครีอะตินินในปัสสาวะ แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$UPCI = Upro \text{ (mg/dL)} / Ucr \text{ (mg/dL)}$$

โดย UPCI = สัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนเทียบกับระดับของ creatinine ในปัสสาวะ

Upro = ความเข้มข้นของโปรตีนในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

Ucr = ความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dl)

การประเมินปริมาณโปรตีนในปัสสาวะโดยใช้ UPCR มีความสัมพันธ์ดี (good correlation) กับการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง[219-221] และมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่า เนื่องจากไม่ขึ้นกับปริมาณปัสสาวะทำให้ไม่มีปัญหาจากความผิดพลาดในการเก็บปัสสาวะ นอกจากนี้ UPCI ยังสามารถคำนวณได้จากการเก็บปัสสาวะเพียงครั้งเดียว (spot urine) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถบอกปริมาณจริง (absolute value) ของโปรตีนที่ขับออกทางปัสสาวะได้ และล่าสุดมีข้อมูลการศึกษาของ Birmingham และคณะ[222] พบว่าการวัดปริมาณโปรตีนจาก spot

urine (spot urine protein/creatinine ratio) มีความเชื่อถือได้ลดลงในการวินิจฉัยภาวะกำเริบซ้ำในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคไตโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับโปรตีนในปัสสาวะอยู่ที่ระหว่าง 0.5 กรัมถึง 3 กรัม

2.2.4 การตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยา

ปัจจุบันการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาถือเป็น gold standard ในการบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคไตเนื่องจากพบว่าผู้ป่วยเพียงร้อยละ 25-50 เท่านั้นที่มีความผิดปกติของปัสสาวะหรือการทำงานของไตที่ผิดปกติในระยะแรก ๆ [223] ซึ่งไม่มีความจำเพาะหรือไวพอในการวินิจฉัย นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยที่มีไตอักเสบรุนแรงบางรายที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาแบบเข้มงวดอาจไม่พบความผิดปกติของการทำงานของไต ทำให้การรักษาต่ำกว่าความรุนแรงที่เป็นจริง

มีการศึกษาพบว่าภาวะไตอักเสบ class II และ pure class V มีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า class III หรือ class IV ลักษณะทางพยาธิวิทยา เช่น การเพิ่มขึ้นหรือคงอยู่ของ subendothelial deposit พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่เพิ่มขึ้นและค่าการทำงานของไตที่แยกลง ส่วน mesangial หรือ subepithelial deposit มีความเสี่ยงน้อยที่ทำให้ไตมีความผิดปกติ การศึกษาของ Austin และคณะ [64] พบว่า activity index (AI) และ chronicity index (CI) สามารถบอกการพยากรณ์ของภาวะไตอักเสบจากโรคไตได้ดีโดยพบว่า cellular crescents, fibrinoid necrosis และ tubular atrophy เป็นปัจจัยทางพยาธิวิทยาที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคมากที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า activity index ที่พยากรณ์โรคได้ดีที่สุดคือ cellular crescents และ chronicity index ที่พยากรณ์โรคได้ดีที่สุดคือ interstitial fibrosis นอกจากนี้การลดลงของ glomerular scarring และ interstitial fibrosis หลังการรักษา ยังบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ดี [224]

ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งชี้ถึงความรุนแรง (activity) และความเรื้อรัง (chronicity) ในปัจจุบันที่ได้รับความนิยมเป็นการกำหนดโดยกลุ่มของ Austin และคณะ โดยมีการให้คะแนนเพื่อประเมินความรุนแรงตามลักษณะทางพยาธิวิทยาโดยให้คะแนนสูงสุดที่ 24 คะแนนโดยให้ความสำคัญกับลักษณะพยาธิวิทยาแบบ cellular crescents, fibrinoid necrosis หรือ karyorrhexis ซึ่งมีการให้น้ำหนักคะแนนเพิ่มเป็นสองเท่า ส่วนลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งชี้ถึงความเรื้อรังมีการพิจารณาทั้งรอยโรคที่อยู่บริเวณ glomerulus, tubulointerstitium ซึ่งให้คะแนนสูงสุดที่ 12 คะแนน ข้อมูลโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.11 ด้านล่าง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มี activity index สูงมีโอกาสเกิดการดำเนินงานของไตผิดปกติและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงกว่า [225, 226]

Esdaile และคณะ [227] พบว่า ลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ class IV, activity index,

vasculitis และ tubulointerstitial index มีผลต่อการพยากรณ์โรค และเช่นเดียวกับหลายการศึกษาพบว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ได้แก่ subendothelial deposit, cellular crescents

Nossent และคณะ[228] พบว่า chronicity index ที่มากกว่า 3 มีความสัมพันธ์กับการทำงานของไตและการรอดชีวิตของผู้ป่วยและยังช่วยบอกพยากรณ์โรค แต่อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อการรักษาทำให้พยาธิสภาพเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น

ตารางที่ 2.11 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงความรุนแรง (activity index) และความเรื้อรัง (chronicity index) ของภาวะไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง[229]

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

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

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

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

ข้อมูลทางพยาธิสภาพวิทยา บ่งชี้ถึงความรุนแรงของโรค และความเรื้อรังของโรค อย่างไรก็ตาม นอกจากความรุนแรงทางพยาธิวิทยาแล้ว วิธีการรักษา การตอบสนองต่อการรักษาต่างก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผู้ป่วยและต่อการทำงานของไตในระยะยาวด้วย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 ประชากร

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยโรคไตที่สงสัยว่ามีภาวะไตอักเสบจากโรคไต

3.1.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา (inclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคไตในร.พ.จุฬาลงกรณ์ซึ่งได้รับการวินิจฉัยเข้าได้ตามเกณฑ์ของ American College of Rheumatology ที่มีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไปโดย

1. ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางปฏิบัติการที่อาจมีการกำเริบของไตซึ่งอาจเป็นครั้งแรกหรือกำเริบซ้ำโดยต้องมีเกณฑ์สองในสามข้อคือ

- ระดับโปรตีนในปัสสาวะมากกว่า 0.5 กรัมต่อวัน
- จำนวนเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะมากกว่า 5 cells/ high power field
- การเพิ่มขึ้นของระดับครีอะตินินในเลือดเปรียบเทียบกับจากระดับครีอะตินินเดิมมากกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรในช่วง 1 เดือนที่ผ่านมา

2. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยภาวะการกำเริบของไตและได้รับการตรวจชิ้นเนื้อที่ไต โดยชิ้นเนื้อไตต้องมีความเพียงพอในการให้การวินิจฉัย กำหนดให้มีจำนวน glomeruli อย่างน้อย 5 glomeruli โดยได้รับการอ่านผลทางพยาธิวิทยาและประเมินระดับความกำเริบของไต (activity index) ตามกฎเกณฑ์ด้านล่างโดยพยาธิแพทย์โรคไต

ความรุนแรงทางพยาธิวิทยาประเมินจาก activity index ตาม National Institute of Health version

Glomerular abnormalities

- Cellular proliferation
- Fibrinoid necrosis/karyorrhexis
- Cellular crescents
- Hyaline thrombi, wire loops
- Leukocyte infiltration

Tubulointerstitial abnormalities

- Mononuclear cell infiltration

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

3.1.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

ผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจชิ้นเนื้อไตได้แก่

- ไตขนาดเล็กกว่า 9 เซนติเมตรสองข้าง
- ผู้ป่วยที่ไม่สามารถให้ความร่วมมือได้
- ผู้ป่วยที่ DBP > 95 มิลลิเมตรปรอททั้งที่ได้ยาคุมความดันโลหิตเต็มที่
- ผู้ป่วยที่ภาวะเลือดออกง่ายผิดปกติ
- ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ เช่น การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ รวมถึงนิ่วและอุบัติเหตุที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินปัสสาวะ
- ผู้ป่วยตั้งครรภ์

3.1.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง ใช้วิธีคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างกลุ่มเดียว

$$\begin{aligned} N &= [(Z \alpha + Z \beta) / C(r)]^2 + 3 \\ &= [(1.96 + 1.28) / 0.54]^2 + 3 \\ &= 37.8 \end{aligned}$$

ดังนั้นประชากรที่นำมาศึกษาเป็น 38 คน

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

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

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

$r = 0.5$ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ BLyS ในเลือดกับความรุนแรงทางพยาธิวิทยาใน ภาวะไตอักเสบจากโรคไต และค่านี้เป็นค่า r ที่ยอมรับได้ในการแปลผลทางสถิติ

3.2 การสังเกตและการวัด

3.2.1 ตัวแปรในการวิจัย

- ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ lupus nephritis แบ่งตาม International Society of Nephrology / Renal Pathology Society ปี พ.ศ.2546
- ระดับความรุนแรงของพยาธิวิทยาแบ่งตาม activity index ของ National Institute of Health
- ระดับ BLyS ในเลือดด้วยวิธี ELISA
- ระดับ APRIL ในเลือดด้วยวิธี ELISA
- ระดับโปรตีนในปัสสาวะ โดยวิธี 24 hour urine protein หน่วยเป็นกรัมต่อวันหรือเก็บโดยวิธี UPCI ซึ่งเก็บ spot urine เพื่อนำมาคำนวณตามสมการ [urine protein (มก./ คล.) / urine creatinine (มก./ คล.)]
- การวัดครีอะตินินในเลือด หน่วยเป็น มก./ คล.

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

- การตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (record form)

3.2.3 การคำนวณ

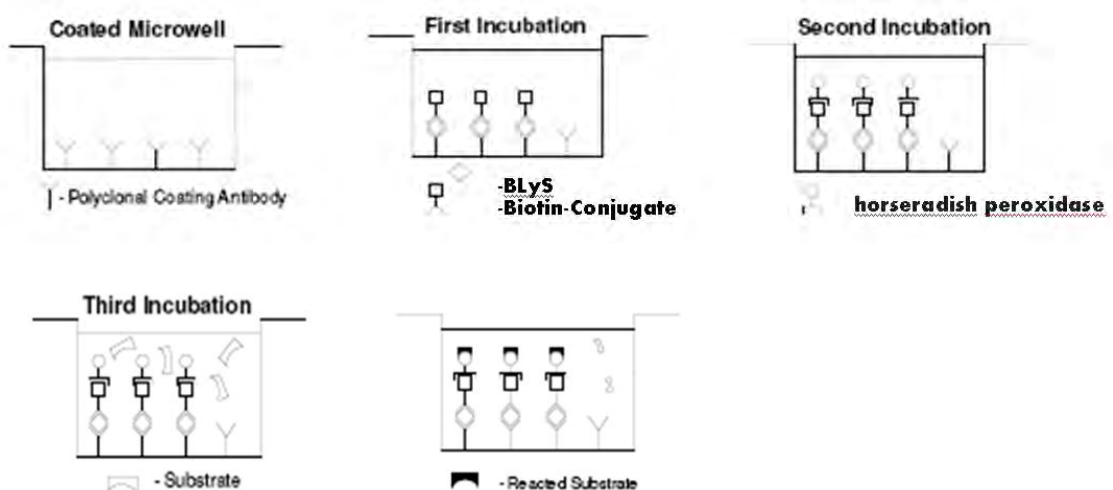
1. การวัดระดับ BLyS ในเลือดด้วยวิธี ELISA

ขั้นตอนการทำ

1. เตรียมน้ำยา, พลาสมาของผู้ป่วยที่จะทำการทดสอบ และชุดมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ
2. หยดบัฟเฟอร์ (diluent RD1-72) ลงในแต่ละหลุมของ BLyS microplate (ซึ่งจะมี mouse monoclonal antibody ต่อ BLyS เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม) ที่จะใช้ทดสอบ
3. ใส่พลาสมาของผู้ป่วย น้ำกลั่น (control) และชุดมาตรฐานสำหรับทดสอบ (standard sample ซึ่งประกอบไปด้วย recombinant human BLyS) ปริมาณ 50 μ L ลงในแต่ละหลุม คู่ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
4. ดูดน้ำยาออก และล้าง microplate ซ้ำๆ กัน 4 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้างเฉพาะ จากนั้นคว่ำ plate รอให้แห้ง

5. เติม polyclonal antibody ต่อ BLYS ที่เคลือบ horseradish peroxidase ลงไปในแต่ละหลุม คู่หนึ่งที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
6. ดูดน้ำยาออก และล้าง microplate ซ้ำๆ กัน 4 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้างเฉพาะ
7. เติม substrate ที่เตรียมไว้ (โดยทำการผสม hydrogen peroxide กับ tetramethylbenzidine ในปริมาณที่เท่าๆกันทิ้งไว้ 15 นาทีก่อนใช้) ปริมาณ 200 μL ลงไปในหลุม คู่หนึ่งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ระวังถูกแสง
8. เติมน้ำยา sulfuric acid 50 μL สำหรับหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สีในแต่ละหลุมควรเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง สำหรับหลุมที่ยังเป็นสีเขียวหรือยังเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่ทั่ว ให้เคาะข้างหลุมเบาๆเพื่อให้ น้ำยาผสมทั่ว
9. อ่านผลด้วยเครื่อง optical densitometry ภายใน 30 นาทีโดยใช้คลื่นแสงช่วง 540 หรือ 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไป plot บน calibrator (ที่เตรียมโดยการสร้างกราฟจากการเจือจางด้วย calibrator diluent – RD6Q และอ่านผลโดย optical densitometry เช่นกัน) และเทียบค่าเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพล่าง

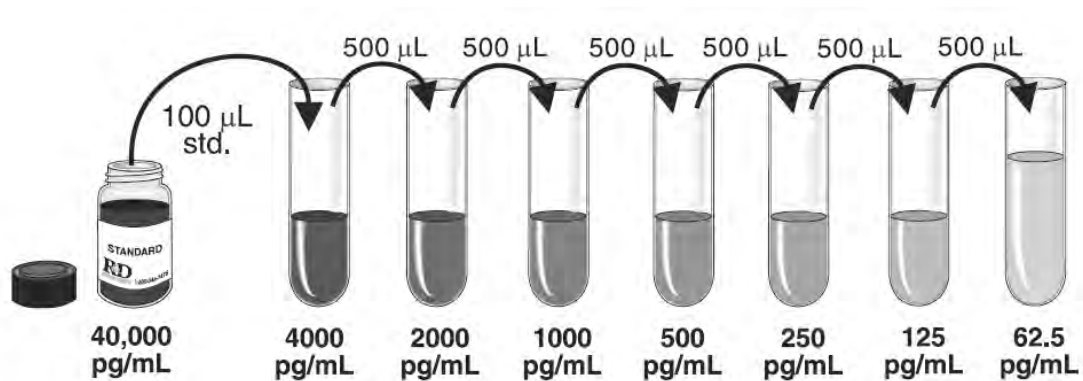
การตรวจระดับ BLYS ในเลือดใช้วิธี ELISA ของบริษัท R&D system และ Bender MedSystems GmbH โดยมีหลักการคร่าว ๆ ดังรูปล่าง



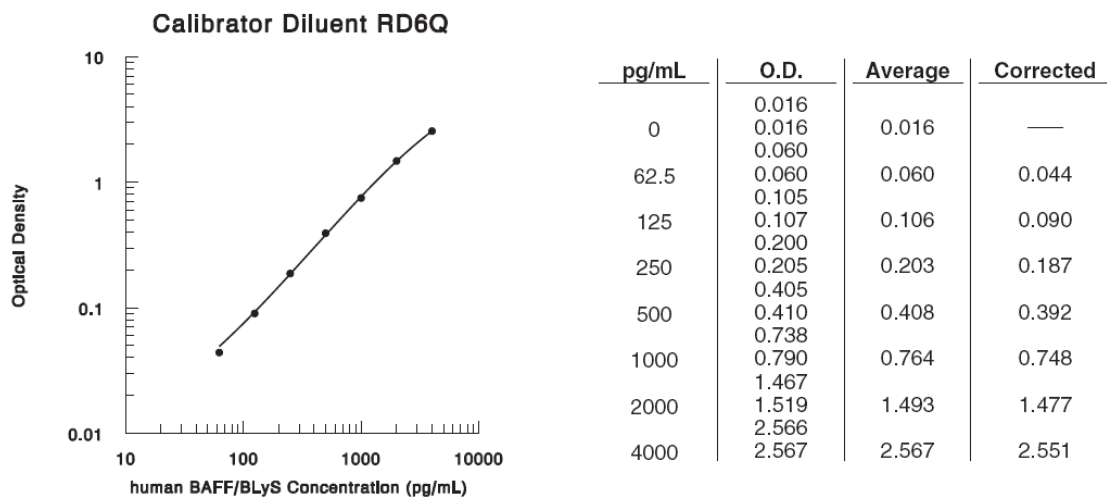
รูปที่ 3.1 การตรวจระดับ BLYS ในเลือดโดยวิธี ELISA

การเก็บสิ่งส่งตรวจสำหรับตรวจ BLYS

1. เก็บเลือดตัวอย่างจากผู้ป่วยแล้วนำมาปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดออกโดยใช้เครื่องปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,000 รอบนาน 15 นาทีและแยกเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ทันที ไม่ควรเก็บใน citrate tube
2. ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ประมาณ $50\ \mu\text{L}$.



รูปที่ 3.2 เป็นการเจือจาง calibrator diluent และวัดค่า OD เพื่อนำไปใช้ plot เป็นกราฟสำหรับคำนวณความเข้มข้นของ BLYS ในเลือด



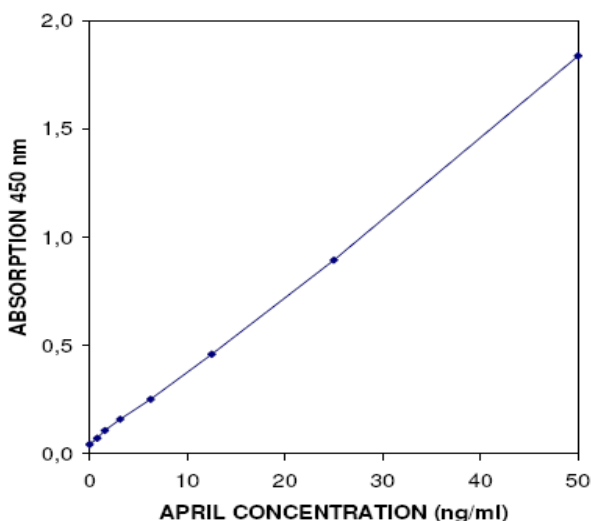
รูปที่ 3.3 standard curve จากการเจือจาง calibrator diluent

2. การวัดระดับ APRIL ในเลือดด้วยวิธี ELISA

ขั้นตอนการทำ

1. เตรียมน้ำยา, ปลายมาของผู้ป่วยที่จะทำการทดสอบ และชุดมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ

2. หยดบัฟเฟอร์ (BSA 20x) ลงในแต่ละหลุมของ APRIL microplate (ซึ่งจะมี rabbit monoclonal antibody ต่อ APRIL เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม) ที่จะใช้ทดสอบ
3. ใส่พลาสมาของผู้ป่วย น้ำกลั่น (control) และชุดมาตรฐานสำหรับทดสอบ (standard sample ซึ่งประกอบไปด้วย recombinant human APRIL) และ Biotin-Conjugated polyclonal antibody ต่อ APRIL ปริมาณ 50 μL ลงในแต่ละหลุมที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมงและเข้าเครื่องสั่นด้วยเพื่อผสมน้ำยากับ sample ให้เข้ากัน
4. ดูดน้ำยาออก และล้าง microplate ซ้ำๆกัน 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้างเฉพาะ จากนั้นคว่ำ plate รอให้แห้ง
5. เติม Streptavidin-HRP ลงไปในแต่ละหลุมและเข้าเครื่องสั่น อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
6. ดูดน้ำยาออก และล้าง microplate ซ้ำๆกัน 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้างเฉพาะ
7. เติม TMB substrate ที่เตรียมไว้ (โดยทำการผสม hydrogen peroxide กับ tetramethylbenzidine ในปริมาณที่เท่าๆกันทิ้งไว้ 15 นาทีก่อนใช้) ปริมาณ 100 μL ลงไปในหลุม อุณหภูมิห้อง 10 นาที ระวังถูกแสง
8. เติมน้ำยา phosphoric acid 100 μL สำหรับหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สีในแต่ละหลุมควรเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน สำหรับหลุมที่ยังเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินไม่ทั่ว ให้เคาะข้างหลุมเบาๆเพื่อให้น้ำยาผสมทั่ว
9. อ่านผลด้วยเครื่อง optical densitometry ภายใน 60 นาทีโดยใช้คลื่นแสงช่วง 450 หรือ 620 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไป plot บน calibrator (ที่เตรียมโดยการสร้างกราฟจากการเจือจางด้วย calibrator diluent – RD6Q และอ่านผลโดย optical densitometry เช่นกัน) และเทียบค่าเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพล่าง



รูปที่ 3.4 การตรวจระดับ APRIL ในเลือด
โดยวิธี ELISA

การเก็บสิ่งส่งตรวจสำหรับตรวจ APRIL

1. เก็บเลือดตัวอย่างจากผู้ป่วยแล้วนำมาปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดออกโดยใช้เครื่องปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,000 รอบนาน 15 นาทีและแยกเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C ทันที ไม่ควรเก็บใน citrate tube
2. ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ประมาณ 50 μL .

3. ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

- a. คำนวณจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยใช้สูตร

$$24\text{-hr urine protein (g/day)} = [\text{Upro (mg/dl)} / 1000] \times [\text{V (ml/day)} / 100]$$

- b. คำนวณสัดส่วนระหว่างระดับของโปรตีนในปัสสาวะเทียบกับระดับของ creatinine ในปัสสาวะ (UPCI) โดยใช้สูตร

$$\text{UPCI} = \text{Upro (mg/dl)} / \text{Ucr (mg/dl)}$$

3.3 สิ่งแทรกแซง

ไม่มี เนื่องจากการศึกษานี้เป็น cross-sectional descriptive study ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับ การวินิจฉัยพิจารณาการเจาะไตเพื่อตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและได้รับการรักษาตามเกณฑ์มาตรฐานอยู่แล้ว

3.4 การรวบรวมข้อมูล

3.4.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

เพศ อายุ ระยะเวลาในการวินิจฉัยโรคไต และอาการทางไต การกำเริบของระบบอื่น การรักษาที่ได้รับ ภาวะแทรกซ้อนของโรค ผลข้างเคียงจากการรักษา

3.4.2 ข้อมูลที่ศึกษา

การตอบสนองต่อการรักษา (อาการทั่วไป น้ำหนัก ความดัน การสงบของอาการกำเริบของระบบอื่น)

การเสื่อมถอยของไตในระยะยาว

CBC, Cr, urinalysis, 24 hr urine protein, UPCI, serum creatinine, SLEDAI score, C3, C4, CH50, anti-dsDNA, blood BLYS/APRIL และ renal biopsy indices ได้แก่

- classification IRS/RPS 2003
- activity index (NIH classification)
 - : endocapillary proliferation
 - : fibrinoid necrosis
 - : karyorrhexis
 - : cellular crescents
 - : hyaline thrombi
 - : wire loops
 - : tubulointerstitial leukocyte infiltration
 - : mononuclear cell infiltration
- chronicity index
 - : glomerular sclerosis
 - : fibrous crescents
 - : interstitial fibrosis
 - : tubular atrophy
- thrombotic microangiopathy

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

การสรุปข้อมูล: ข้อมูลเชิงปริมาณได้แก่ ระดับพลาสมา BLYS, ค่าครีอะตินินในเลือด, serum complement, anti-dsDNA, ANA, ระดับพลาสมา APRIL และ activity index ของผลชิ้นเนื้อไตวัดผลเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การนำเสนอข้อมูล: baseline characteristics และค่า lab จำแนกตาม severity ทาง pathology นำเสนอในรูปแบบตารางและ Box-plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล

เชิงปริมาณเช่น ระดับ BLYS ในเลือดกับ anti-dsDNA, ค่าครีอะตินินในเลือด, ระดับ APRIL ในเลือด หรือ activity score นำเสนอในรูปแบบ scatter diagram

การทดสอบสมมติฐาน: การเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มใช้ independent T-test (normal distribution data) และ Mann -Whitney U test (non - normal distribution data) สำหรับความสัมพันธ์ของข้อมูลใช้ Pearson's correlation (normal distribution data) และ Spearman's rank correlation (non-normal distribution data) กำหนด p-Value <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

สถิติคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS version 16

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษา

จากการศึกษา มีผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 60 รายเป็นผู้ป่วยเพศหญิง 57 ราย ผู้ป่วยเพศชาย 3 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคลูปัสรายใหม่หรือเริ่มกำเริบที่ได้รับการตรวจวินิจฉัย โดยการตรวจชิ้นเนื้อไตทุกรายจำนวน 52 รายและผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคลูปัสที่เคยได้รับการตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจชิ้นเนื้อไตและอยู่ในระยะสงบ 8 ราย

ข้อมูลในผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคลูปัสรายใหม่หรือเริ่มกำเริบพบว่า ผู้ป่วยอายุเฉลี่ย 32.90 ± 9.32 ปี ช่วงอายุระหว่าง 26-39 ปี เป็นเพศหญิง 50 ราย คิดเป็น 96% ระยะเวลาที่ทราบว่าเป็นโรคลูปัสก่อนการศึกษาครั้งนี้ 5.90 ± 4.44 ปี ค่ามัธยฐานของคะแนน renal SLEDAI อยู่ที่ 12 โดยช่วงคะแนนอยู่ระหว่าง 8-12 คะแนน มีการใช้ยาสเตียรอยด์มาก่อน 47 ราย คิดเป็น 90% ค่ามัธยฐานของขนาดยาสเตียรอยด์เฉลี่ยอยู่ที่ 22.5 มก.ต่อวันโดยช่วงขนาดยาสเตียรอยด์ที่ผู้ป่วยได้รับ 7.5-50 มก. ผู้ป่วยได้รับยากดภูมิชนิดอื่นก่อนเข้าการศึกษา 18 ราย ได้แก่ pulse methylprednisolone 3 ราย pulse cyclophosphamide 6 ราย oral mycophenolate mofetil 6 ราย azathioprine 1 ราย และ hydroxychloroquine 2 ราย ผู้ป่วยมีอาการของระบบอื่น 12 ราย หรือ คิดเป็น 23%

ข้อมูลในผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคลูปัสที่เคยได้รับการตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจชิ้นเนื้อไตและอยู่ในระยะสงบ พบว่า ผู้ป่วยอายุเฉลี่ย 30.88 ± 5.99 ปี ช่วงอายุระหว่าง 29-37 ปี เป็นเพศหญิง 7 ราย คิดเป็น 87.5% ระยะเวลาที่ทราบว่าเป็นโรคลูปัสก่อนการศึกษาครั้งนี้ 5.88 ± 3.14 ปี ค่ามัธยฐานของคะแนน renal SLEDAI อยู่ที่ 0 ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีการใช้ยาสเตียรอยด์มาก่อน 4 ราย คิดเป็น 50% ค่ามัธยฐานของขนาดยาสเตียรอยด์เฉลี่ยอยู่ที่ 1.25 มก.ต่อวันโดยช่วงขนาดยาสเตียรอยด์ที่ผู้ป่วยได้รับ 0-2.5 มก. ผู้ป่วยได้รับยากดภูมิชนิดอื่นก่อนเข้าการศึกษา 2 ราย ได้แก่ oral mycophenolate mofetil 1 ราย และ hydroxychloroquine 1 ราย ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ไม่มีใครที่มีอาการของระบบอื่นเลย ไม่พบความแตกต่างของข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วย 2 กลุ่ม ยกเว้นค่าคะแนน renal SLEDAI และระดับยาสเตียรอยด์ ข้อมูลพื้นฐานโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคไต

ตัวแปร	ระยะสงบ (8 ราย)	ระยะกำเริบ (52 ราย)	p-Value
อายุ (ปี)			0.554
Mean ± SD	30.88 ± 5.99	32.90 ± 9.32	
ช่วงอายุ (ปี)	29-37	26-39	
เพศ, จำนวน (เปอร์เซ็นต์)			0.445
เพศหญิง	7 (87.5)	50 (96)	
ระยะเวลาของโรค (ปี)			0.986
Mean ± SD	5.88 ± 3.14	5.90 ± 4.44	
ค่าคะแนน Renal-SLEDAI‡			<0.001†
ค่ามัธยฐาน	0	12	
ช่วงคะแนน	0	8-12	
การได้รับยาสเตียรอยด์มาก่อน จำนวน (เปอร์เซ็นต์)	4 (50)	47 (90)	0.013†
ค่ามัธยฐาน (มก.ต่อวัน)	1.25	22.5	
ค่ามัธยฐาน (มก.ต่อวัน)	0 – 2.5	7.5 - 50	
ช่วงขนาดยาสเตียรอยด์ (มก.ต่อวัน)			
ยากดภูมิชนิดอื่นที่ได้รับมาก่อน			
Pulse methylprednisolone	0	3	1.000
Pulse cyclophosphamide	0	6	0.585
Oral cyclophosphamide	0	0	1.000
Mycophenolate mofetil	1	6	1.000
Azathioprine	0	1	1.000
Hydroxychloroquine	1	2	1.000
อาการนอนกรนไปไต, จำนวน (เปอร์เซ็นต์)	0	12 (23)	

* เลือกเฉพาะกลุ่มที่เป็นโรคไตอักเสบจากโรคไต class **III** or **IV** ตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ ISN/RPS 2003

‡ คะแนน Renal-SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) มีเกณฑ์ 4 ข้อข้อละ 4 คะแนนได้แก่ ปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (UPCI or 24-hour urine protein) ≥ 0.5 กรัมต่อวัน, จำนวนเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะ ≥ 5 ตัวต่อ high power field (hpf) จำนวนเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ≥ 5 ตัวต่อ hpf และ จำนวน cellular casts ในปัสสาวะ ≥ 1 ตัวต่อ hpf.; † มีความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

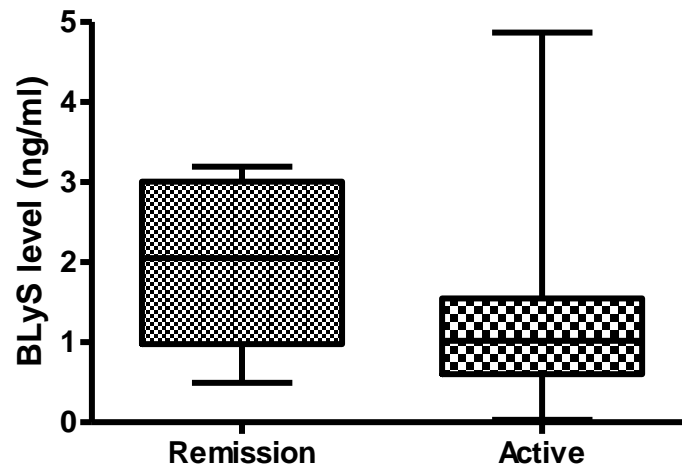
4.2 ผลการศึกษา

ข้อมูลในผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบพบว่ามีระดับ BlyS ในเลือดมีระดับต่ำกว่าในกลุ่มที่อยู่ในระยะสงบแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.32 ± 1.06 และ 1.97 ± 1.10 นก.ต่อมล., p-Value 0.094) ขณะที่ระดับ APRIL ในเลือดของกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบมีระดับสูงกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.10 ± 2.09 และ 2.90 ± 0.50 นก.ต่อมล., p-Value 0.317) แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ค่าซีรั่มครีอะตินินในกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบมีระดับสูงกว่าอย่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.06 ± 0.55 และ 0.62 ± 0.18 นก.ต่อมล., p-Value 0.009) ระดับโปรตีนรั่วในปัสสาวะในกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบมีระดับสูงกว่าอย่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3.59 ± 2.18 และ 0.62 ± 0.18 นก.ต่อมล., p-Value <0.001) ปริมาณเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะต่อ hpf ในกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบมีระดับสูงกว่าอย่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (50.84 ± 85.52 และ 0.75 ± 0.90 นก.ต่อมล., p-Value <0.001)

ข้อมูลในส่วน immunological parameters และข้อมูลทางพยาธิวิทยาโดยเฉพาะในผู้ป่วยกลุ่มไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบเท่านั้น โดยระดับคอมพลีเมนต์ C3 มีค่าเฉลี่ย 53.98 ± 28.66 มก.ต่อดล. ระดับ C4 มีค่าเฉลี่ย 10.21 ± 6.56 มก.ต่อดล. ระดับ CH50 มีค่าเฉลี่ย 13.50 ± 14.71 unit ต่อมล. ระดับ ANA titer มีค่าเฉลี่ย $1,731.20 \pm 3,320.79$ และระดับ anti-dsDNA มีค่าเฉลี่ย 355.26 ± 443.35

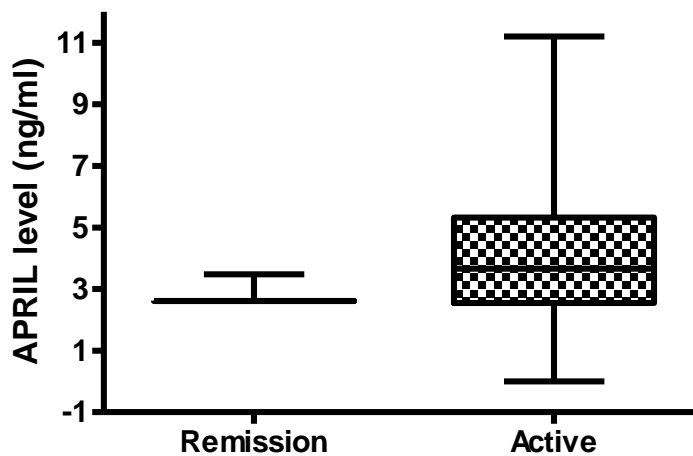
ความรุนแรงของลักษณะทางพยาธิสภาพไตประเมินโดย activity score โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 19 คะแนน คะแนนต่ำสุดอยู่ที่ 1 คะแนน ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยที่ศึกษาเท่ากับ 7.83 ± 5.01 คะแนน นอกจากนี้ยังมีลักษณะทางพยาธิสภาพเฉพาะซึ่งบ่งบอกว่าโรครุนแรงมาก ได้แก่ cellular crescents และ fibrinoid necrosis โดยจากการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่มี cellular crescents ร้อยละ 52 และ fibrinoid necrosis ร้อยละ 42 สำหรับลักษณะพยาธิสภาพที่บ่งบอกถึงความเรื้อรังประเมินโดย chronicity score โดยคะแนนสูงสุดอยู่ที่ 10 คะแนน คะแนนต่ำสุดอยู่ที่ 0 คะแนน ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยที่ศึกษาเท่ากับ 3.01 ± 2.70 คะแนน ข้อมูลผลการศึกษาโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.2

Blood BLYS between active and remission groups



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบระดับ BLYS ในเลือดระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active (N=52) และ inactive (N=8); p-Value = 0.094

Blood APRIL between active and remission groups



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบระดับ APRIL ในเลือดระหว่างผู้ป่วยกลุ่ม active (N=52) และ inactive (N=8); p-Value = 0.317

ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลผลการศึกษาระดับของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ตัวแปร	ระยะสงบ	ระยะกำเริบ*	p-Value
ระดับ BLYS, ng/ml ^a	1.97 ± 1.10	1.32 ± 1.06	0.094
ระดับ APRIL, ng/ml ^a	2.90 ± 0.50	4.10 ± 2.09	0.317
ข้อมูลทางคลินิก ^a			
ระดับซีรั่มครีอะตินิน (มก.ต่อดล.)	0.62 ± 0.18	1.06 ± 0.55	.009†
ระดับโปรตีนในปัสสาวะ (กรัมต่อวัน)	0.16 ± 0.16	3.59 ± 2.18	<0.001†
ปริมาณเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะ per hpf	0.75 ± 0.90	50.84 ± 85.52	<0.001†
ข้อมูล Immunological parameters ^a			
ระดับ C3	N/A	53.98 ± 28.66	
ระดับ C4	N/A	10.21 ± 6.56	
ระดับ CH50	N/A	13.50 ± 14.71	
ระดับ ANA	N/A	1,731.20 ±	
ระดับ Anti-dsDNA	N/A	3,320.79	
		355.26 ± 443.35	
ข้อมูลทางพยาธิวิทยา			
Activity score	N/A	7.83 ± 5.01	
Chronicity score	N/A	3.01 ± 2.70	

^a ข้อมูลแสดงในรูปแบบของ Mean ± SD

* เลือกเฉพาะกลุ่มที่เป็นโรคไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง class III หรือ IV ตามเกณฑ์การวินิจฉัยของ ISN/RPS 2003

† มีความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test.; N/A, not applicable

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่าง lupus activity parameters ต่างๆทั้งจากลักษณะทางคลินิก ค่า lab ปริมาณการใช้อายคดภูมิคุ้มกันก่อนตรวจชิ้นเนื้อไต ค่าความรุนแรงทางพยาธิวิทยาและระดับ BLYS และ APRIL ในเลือด พบว่า ความสัมพันธ์ของค่าความรุนแรงทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไตซึ่งแสดงเป็น 2 ค่าได้แก่ ค่า activity index และค่า chronicity index โดยค่า activity index มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับค่า renal

SLEDAI (r 0.635; p-Value <0.001) และค่าย่อยของ renal SLEDAI ทุกตัว (SCr r 0.396; p-Value < 0.005, Urine RBC r 0.497; p-Value 0.001, Urine WBC r 0.636; p-Value <0.001, urine protein r 0.472; p-Value 0.001) ค่า activity index ยังมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับค่า anti-dsDNA (r 0.511; p-Value 0.013) และสัมพันธ์ผกผันกับค่าคอมพรีเมนต์ (C3 r -0.419; p-Value 0.024, CH50 r -0.420; p-Value 0.037) นอกจากนี้ค่า activity index ยังมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระดับ APRIL ในเลือดอีกด้วย (r 0.335; p-Value 0.017)

ส่วนค่า chronicity index ซึ่งเป็นค่าความรุนแรงทางพยาธิวิทยาของขึ้นเนื้อไตอีกค่าหนึ่ง พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระยะเวลาก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการกำเริบทางไต (r 0.447; p-Value 0.001) ยากดภูมิ mycophenolate (r 0.275; p-Value 0.048) ยา ACEI (0.373; p-Value 0.006) และระดับ BLYS ในกระแสเลือด ขณะที่แปรผกผันกับระดับ anti-dsDNA (r -0.468; p-Value 0.024)

เมื่อย้อนศึกษาดูค่าความสัมพันธ์ของ BLYS และ APRIL พบว่าระดับ BLYS ในเลือดในวันที่ทำการตรวจขึ้นเนื้อไตมีความสัมพันธ์กับค่าคอมพรีเมนต์ไปในทางเดียวกัน (C3 r 0.560; p-Value 0.002, C4 r 0.621; p-Value 0.00, CH50 r 0.568; p-Value 0.003) และยังสัมพันธ์กับระดับยากดภูมิก่อนได้รับการตรวจขึ้นเนื้อไต (prednisolone dose r 0.543; p-Value <0.001, mycophenolate dose r 0.369; p-Value 0.007) และระดับ BLYS ที่ 6 เดือนหลังตรวจขึ้นเนื้อไต (r 0.580; p-Value 0.005) โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ renal SLEDAI score ขณะที่กลับพบความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างกับระดับ BLYS ในเลือดในวันที่ทำการตรวจขึ้นเนื้อไตกับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด PMN และ lymphocyte (WBC r -0.485; p-Value <0.001, PMN r -0.402; p-Value <0.001, lymphocyte r -0.417; p-Value 0.002) และระดับ anti-dsDNA แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับความสัมพันธ์ของระดับ APRIL ในเลือดพบว่าระดับ APRIL มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันระยะเวลาที่ผู้ป่วยป่วยจากโรค lupus มาก่อน (r 0.353; p-Value 0.017) ระดับโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (r 0.438; p-Value 0.002) และค่า activity index (r 0.335; p-Value 0.017 และ r 0.330; p-Value 0.017 เมื่อมีการปรับค่าตัวแปรจากยาสเตียรอยด์และยา mycophenolate)

ความสัมพันธ์ระหว่าง lupus activity parameters ต่างๆ ทั้งจากลักษณะทางคลินิก ค่า lab ปริมาณการใช้ยากดภูมิคุ้มกันก่อนตรวจขึ้นเนื้อไต ค่าความรุนแรงทางพยาธิวิทยาและระดับ BLYS และ APRIL ในเลือดสรุปดังตารางที่ 4.3 - 4.5 และนำเสนอในรูปแบบ scattergram ดังรูปที่ 4.3 ถึง 4.8

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง pathological score[‡], lupus activity parameters และประวัติการรักษาของผู้ป่วย

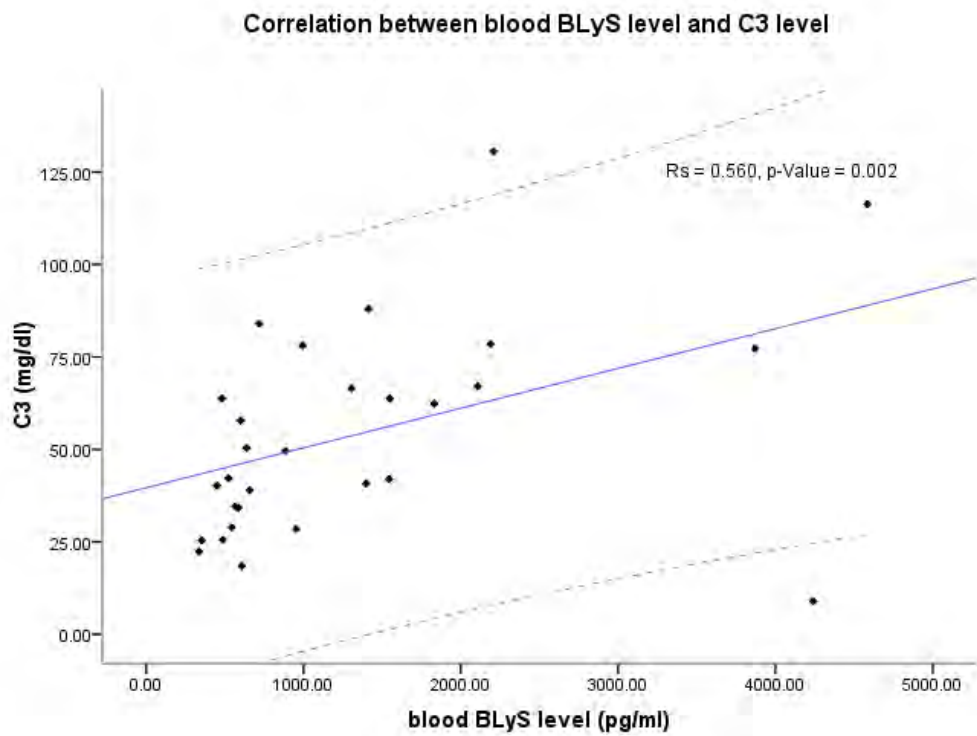
	Activity index			Chronicity index	
	Spearman <i>r</i>	p-Value		Spearman <i>r</i>	p-Value
R_SLEDAI	0.635	< 0.001*	Duration of disease	0.447	0.001*
SCr	0.396	0.005*	R_SLEDAI	- 0.196	0.613
Urbc	0.497	0.001*	Anti-dsDNA	- 0.468	0.024*
Uwbc	0.636	< 0.001*	CH50	0.406	0.044*
Uprotein	0.472	0.001*	Mycophenolate (dose)	0.275	0.048*
Anti-dsDNA	0.511	0.013*	ACEI (dose)	0.373	0.006*
C3	- 0.419	0.024*	Prednisolone (dose)	- 0.034	0.094
C4	- 0.246	0.270	BLyS	0.282	0.045*
CH50	- 0.420	0.037*			
APRIL	0.335	0.017*			

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ‡ pathological score โดย Austin และคณะปี พ.ศ.

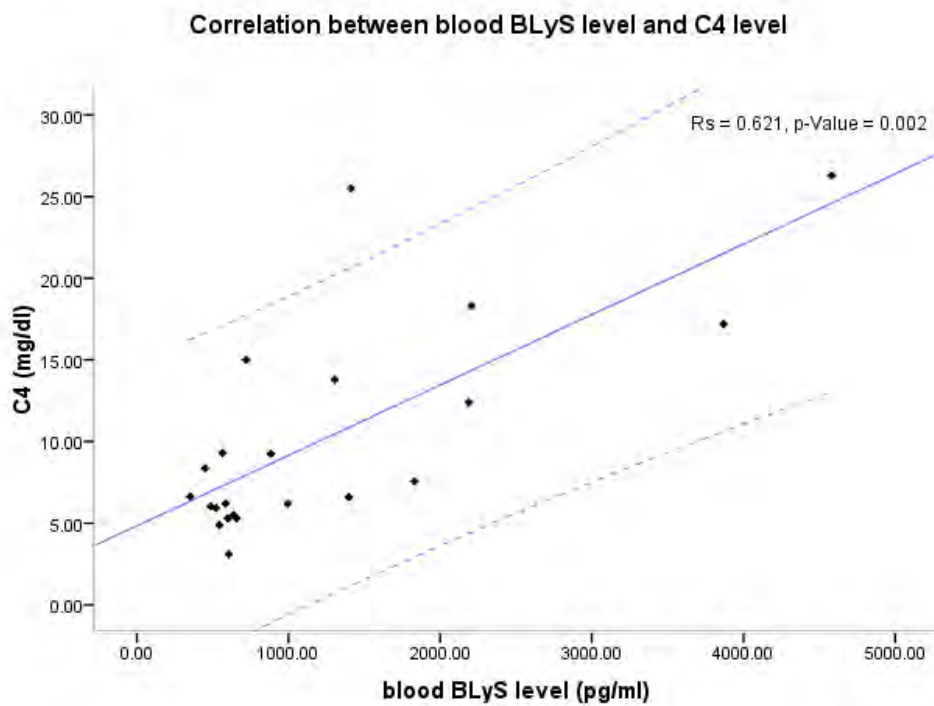
ตารางที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLyS และ APRIL ในเลือดและ lupus activity parameters, pathological score และประวัติการรักษาของผู้ป่วย

	BLyS		APRIL		
	Spearman	p-value	Spearman	p-value	
	<i>r</i>		<i>r</i>		
R_SLEDAI	0.255	0.057	Duration of disease	0.353	0.017*
Anti-dsDNA	- 0.362	0.090	R_SLEDAI	0.219	0.148
C3	0.560	0.002*	Uprotein	0.438	0.002*
C4	0.621	0.002*	WBC	0.267	0.061
CH50	0.568	0.003*	PMN	0.262	0.006
WBC	- 0.485	< 0.001*	Acitivity score	0.335	0.017*
PMN	- 0.402	< 0.001*		0.330	0.017†
Lymphocyte	- 0.417	0.002*			
Prednisolone (dose)	0.543	< 0.001*			
Mycophenolate (dose)	0.369	0.007*			
ACEI (dose)	0.272	0.051			
BLyS at 6 mo. apart	0.580	0.005*			

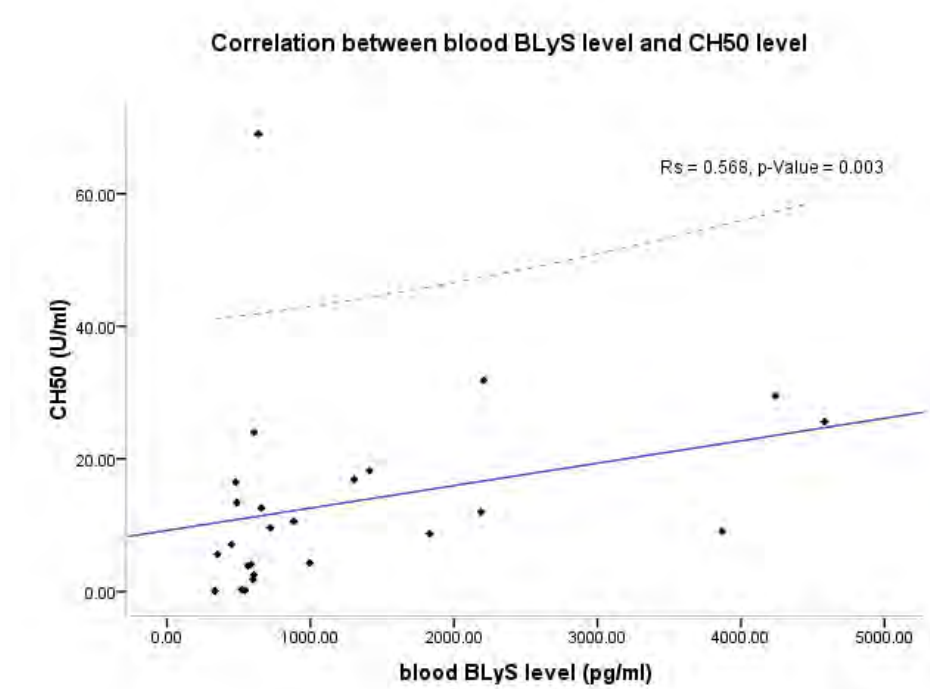
*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, †หลังจากมีการปรับค่าตัวแปรรบกวนจากยาสเตียรอยด์และยา mycophenolate



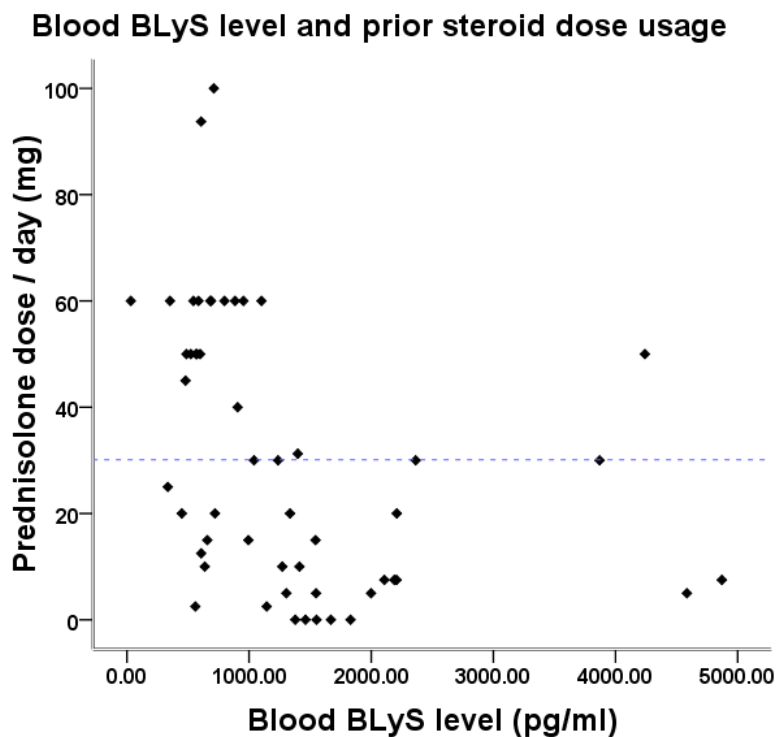
รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพริเมนต์ C3



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพริเมนต์ C4



รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและคอมพรีเมนต์ CH50

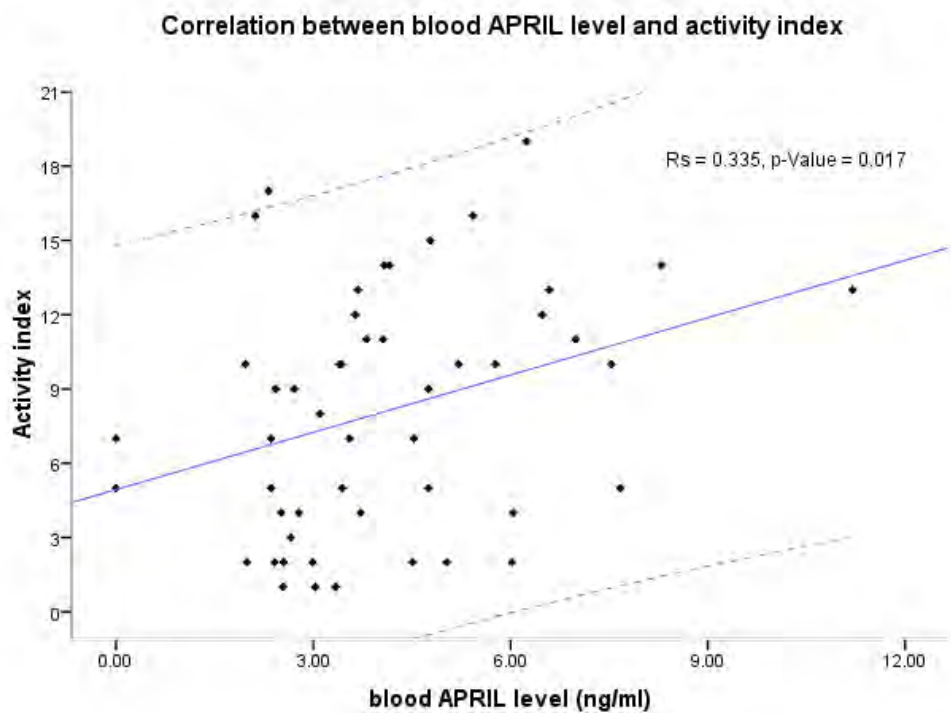


รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLYS ในเลือดและปริมาณ prednisolone ที่ผู้ป่วยได้รับอยู่ขณะได้รับการตรวจชิ้นเนื้อไต พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาขนาดมากกว่า 30 มก.ต่อวันมีระดับ BLYS ต่ำกว่า 1,500 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

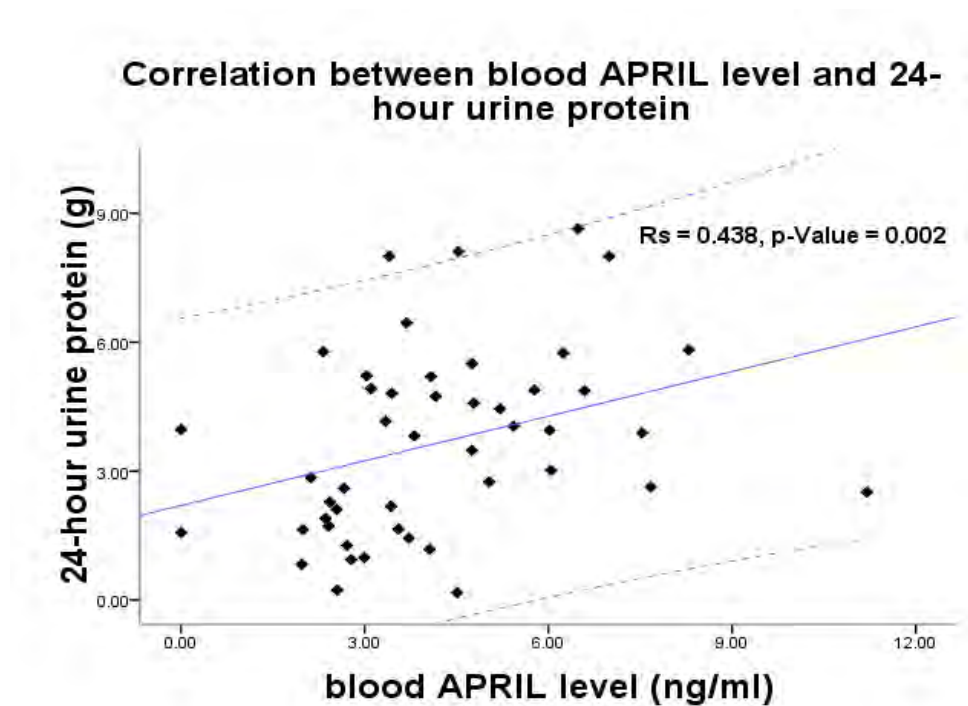
ตารางที่ 4.5 ระดับ BLYS ในเลือดก่อนและหลังได้ยาสูตร mycophenolate

Blood BLYS level (ng/ml)	Non-mycophenolate	Mycophenolate	p-Value
At baseline	1.158 ± 1.157	2.077 ± 1.372	0.137
After treatment	1.294 ± 0.799	2.925 ± 1.689	0.021*
Difference	0.136 ± 0.841	0.848 ± 1.782	0.309

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

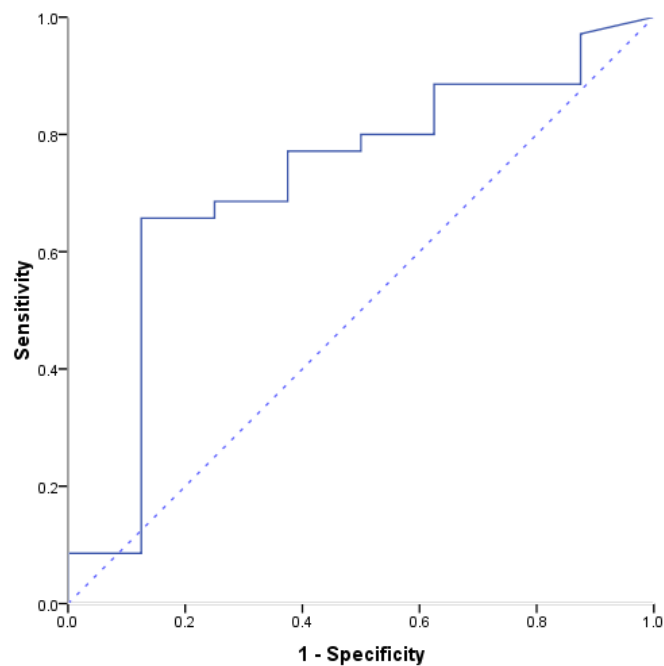


รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดและ activity index



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดและปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะต่อวัน

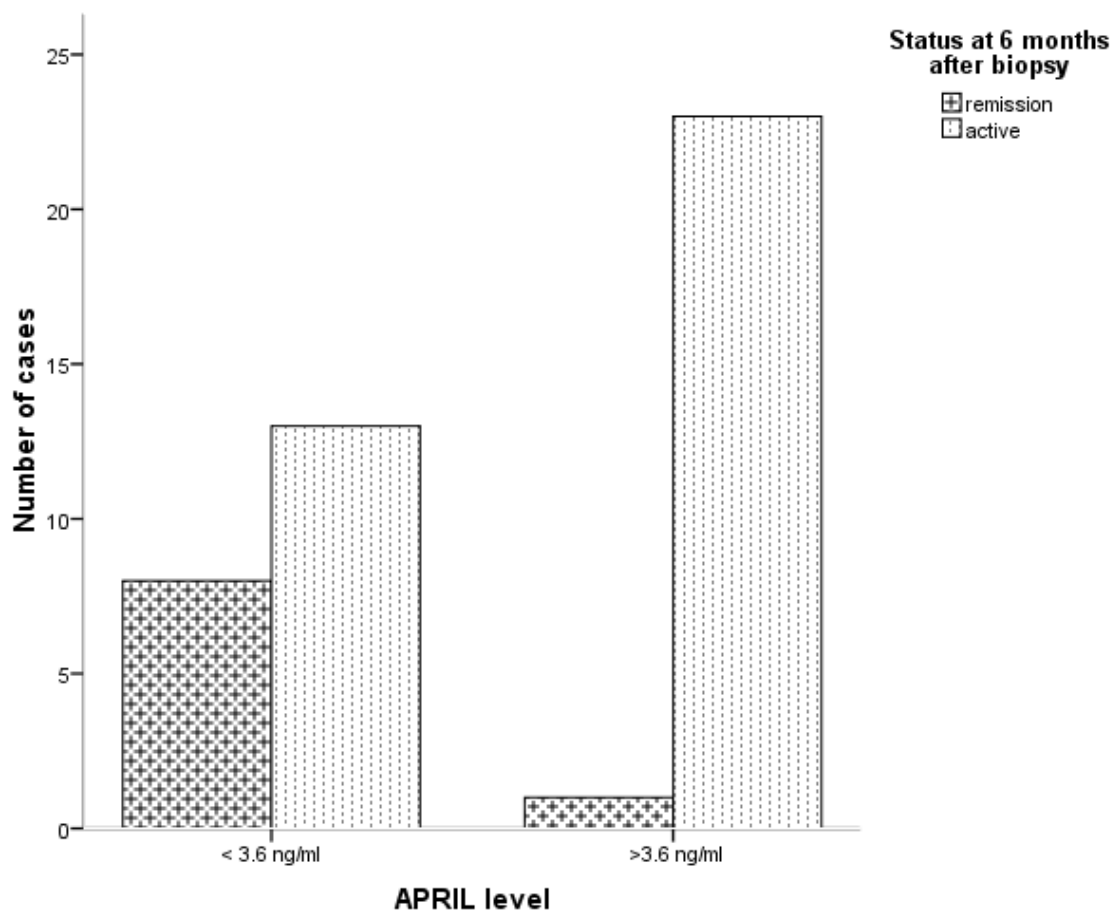
เมื่อติดตามการรักษาต่อเป็นระยะเวลานาน 6 เดือนหลังจากทำการตรวจชิ้นเนื้อไต พบว่ามีผู้ป่วยจำนวนมากไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานต่อเนื่อง โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับ APRIL ในเลือด ณ ช่วงเวลาที่เจาะไตแสดงเป็น ROC curve ดังรูปที่ 4.9 และเมื่อ cut off ที่ระดับ APRIL มากกว่า 3.6 นก./มล. พบว่าสามารถพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือน โดยค่า cut off ดังกล่าวจะมีความไวประมาณร้อยละ 63.9 และความจำเพาะประมาณร้อยละ 88.9 ค่า positive predictive value ร้อยละ 95.8 และมีค่า negative predictive value ร้อยละ 38.1 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการใช้ปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะโดย cut off ที่มากกว่า 2.5 กรัมต่อวันในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือน พบว่าได้ความจำเพาะประมาณร้อยละ 88.9 เท่ากันและเมื่อนำทั้งสองวิธีมารวมกัน สามารถพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือนในผู้ป่วยที่มีทั้งสองข้อด้วยความจำเพาะร้อยละ 98.8 แสดงดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.6



รูปที่ 4.9 ROC curve ของระดับ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่ทำการตรวจชิ้นเนื้อไต ในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือน

ผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดกับความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือนโดยทำการเปรียบเทียบลักษณะทางพยาธิวิทยา ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีระดับ APRIL มากกว่า 3.6 นก./มล.และต่ำกว่า พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในส่วน of endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, PMN infiltration และ hyaline deposits แสดงดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.7

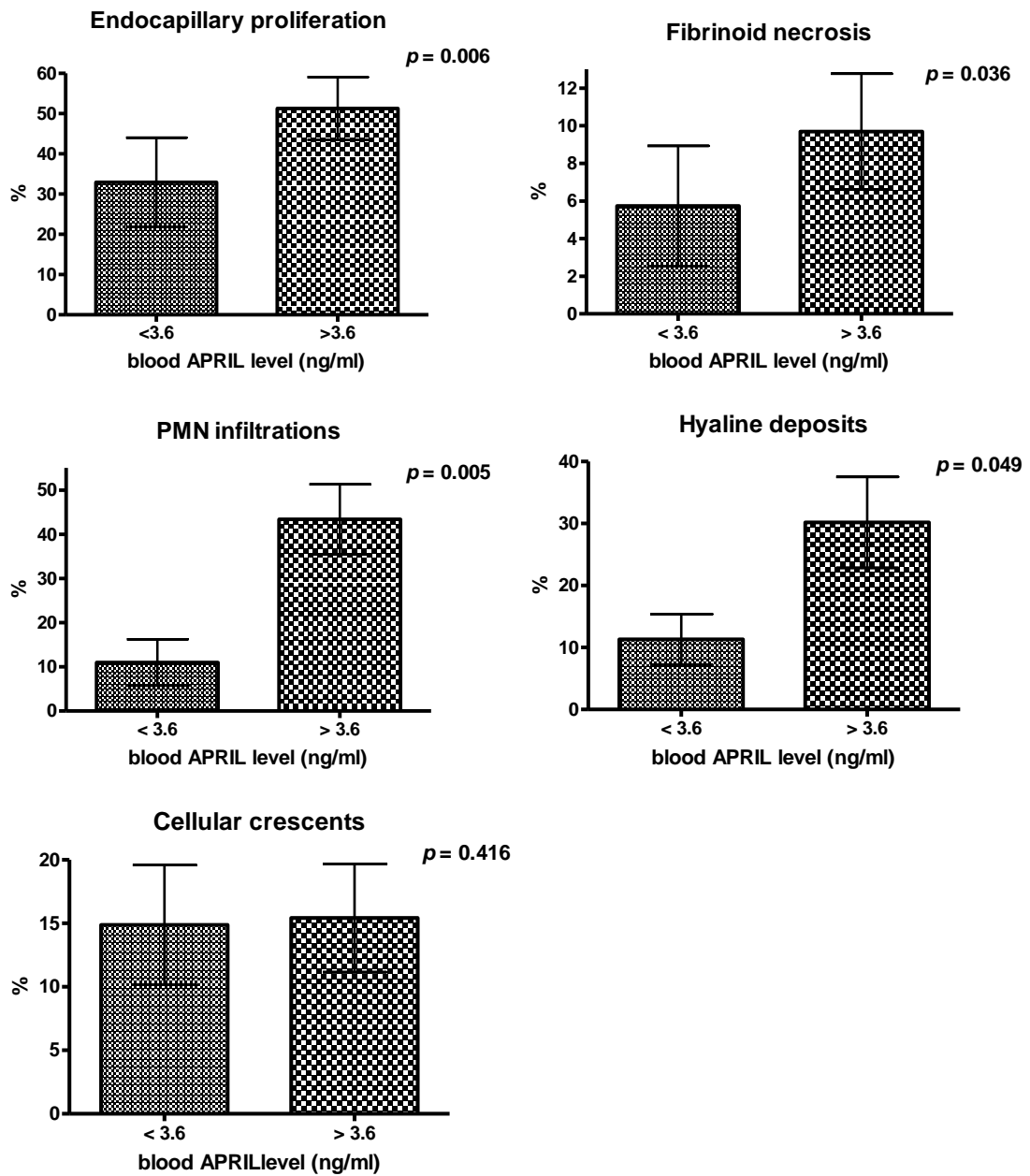
Blood APRIL levels in predicting clinical outcome of active lupus nephritis.



รูปที่ 4.10 ระดับ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยช่วงเวลาที่ทำการตรวจชิ้นเนื้อไตในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือนโดยใช้ค่า cut off ที่ 3.6 นก./มล.

ตารางที่ 4.6 ความไวและความจำเพาะของการใช้ระดับ APRIL ในเลือดและการใช้ปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะร่วมในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือน

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	LR+	LR-
Urine protein \geq 2.5 g/day	75	88.9	96.4	47.1	6.8	0.3
Blood APRIL \geq 3.6 ng/ml	63.9	88.9	95.8	38.1	5.8	0.4
Combined Urine protein and blood APRIL	47.9	98.8				



รูปที่ 4.11 ระดับ APRIL ในเลือดและลักษณะทางพยาธิวิทยา

ตารางที่ 4.7 ระดับ APRIL ในเลือดและลักษณะทางพยาธิวิทยา

% ± SD	Low APRIL level	High APRIL level	p-Value
Endocapillary proliferation	27.9 ± 34.2	58.3 ± 36.3	0.006*
Fibrinoid necrosis	4.9 ± 12.7	9.7 ± 14.5	0.036*
PMN infiltrations	14.2 ± 28.6	43.4 ± 37.2	0.005*
Hyaline deposits	10.1 ± 16.3	30.2 ± 34.4	0.049*
Cellular crescents	12.8 ± 19.2	15.4 ± 19.9	0.416

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่า ระดับ BLYS ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสโดยเทคนิค ELISA มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันระดับคอมพรีเมนต์ ปริมาณยาสเตียรอยด์ ปริมาณยา mycophenolate และระดับ BLYS ในเลือดที่ 6 เดือนถัดไป ขณะที่พบความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือดโดยรวมและปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกตามชนิดทั้ง lymphocyte และ PMN

นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสโดยเทคนิค ELISA มีสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับระยะเวลาที่เป็นมานานของโรคลูปัส ความรุนแรงของโรคทั้งในแง่ของระดับโปรตีนรั่วในปัสสาวะและค่า activity index และเมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโดยใช้ค่า cut off ที่ระดับ APRIL มากกว่า 3.6 นก./มล.สามารถแยกกลุ่มที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่รุนแรงมากและน้อยออกจากกันชัดเจน (ทั้งในส่วน of endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, PMN infiltrations และ hyaline deposits) และยังใช้ค่า cut off ที่ระดับนี้ในการพยากรณ์ความล้มเหลวของการรักษาด้วยสูตรมาตรฐานที่ 6 เดือนด้วยค่าความไวร้อยละ 63.9 และค่าความจำเพาะร้อยละ 88.9

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษานี้ในส่วน of ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยพบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการของโรคลูปัสเป็นมานานอย่างน้อยเกือบ 6 ปีร่วมกับมีการใช้ยาสเตียรอยด์ก่อนการตรวจชิ้นเนื้อไตถึงร้อยละ 90 มีปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะระดับ nephrotic range (> 3 กรัมต่อวัน) เนื่องจากมีกลุ่ม class III+V หรือ IV+V ร่วมอยู่ในกลุ่มศึกษาประมาณร้อยละ 33 ผลพยาธิวิทยาพบมีลักษณะ activity index ไม่สูงร่วมกับมีลักษณะ chronicity index ร่วมด้วยซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางคลินิกเช่น ระยะเวลาของโรคที่เป็นมานาน มีการใช้ยากดภูมิมาก่อน และมีลักษณะ nephrotic proteinuria เด่น

ผลการศึกษานี้ในส่วน of ลักษณะทางพยาธิวิทยายังสนับสนุนผลการศึกษาก่อนหน้านี้ไม่ว่าจะเป็นความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันระหว่าง activity index กับ renal SLEDAI ทั้ง 4 ข้อ (ระดับซีรั่มครีอะตินิน ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ปริมาณโปรตีนรั่วในปัสสาวะ)

และระดับ anti-dsDNA และมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับระดับคอมพรีเมนต์ทั้ง 3 ตัว สำหรับ chronicity index พบว่าความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับระยะเวลาของโรค ปริมาณยากดภูมิ mycophenolate และปริมาณยากลุ่ม ACEI (angiotensin converting enzyme inhibitor) ซึ่งยาเหล่านี้จะทำให้ตัวโรคมีความรุนแรงลดลงและเหลือร่องรอยแผลเป็นให้เห็น ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (ซึ่งไม่ได้เลือกกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้เข้ามาศึกษาด้วยเนื่องจากผิวดิจิทัล) ยิ่งควรจะพบลักษณะ chronicity ให้เห็นชัดเจนว่าแต่จะสามารถแยกได้จากกลุ่มที่ได้รับการรักษาตรงที่ระดับซีรั่มครีอะตินินจะสูงกว่ามากและมี activity index ที่สูงกว่าชัดเจน

จากการศึกษานี้พบว่าระดับ BLYS ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเริ่มกำเริบมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับระดับคอมพรีเมนต์ทั้ง 3 ตัวแต่มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับปริมาณ prednisolone ที่ผู้ป่วยได้รับและมีแนวโน้มที่ความสัมพันธ์จะแปรผกผันกับระดับ anti-dsDNA เป็นลักษณะที่บ่งบอกว่า BLYS มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่เป็นไปในทิศทางตรงข้ามซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาในอดีต[230, 231] มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการได้รับยา prednisolone มาก่อนทำให้ระดับ BLYS ในเลือดต่ำลงได้จึงทำให้ระดับ BLYS ที่ควรจะสูงในรายที่มีอาการรุนแรงกลับต่ำลงมากจากการได้รับยา prednisolone[231] การที่จะยืนยันว่าระดับ BLYS สัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับความรุนแรงของโรคไม่สามารถทำได้เนื่องจากการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ได้รับยา prednisolone มาก่อนมากถึง 90% การที่จะเลือกผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยาทำได้ลำบากเนื่องจากการจัดคิวเจาะไตทำได้ยากใช้เวลานาน การชะลอการรักษามักเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยและในรายที่ได้รับการเจาะไตก่อนที่จะได้รับยาส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงทำให้ความหลากหลายของความรุนแรงน้อย การแปลผลเป็นไปได้ยากยิ่ง

นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ BLYS ในเลือดมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับปริมาณเม็ดเลือดขาวซึ่งยังไม่มีรายงานผลลัพธ์เช่นนี้ในการศึกษาก่อน ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ BLYS ถูกเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocytes ใช้เพื่อดำรงตนอยู่สำหรับการพัฒนาต่อเป็น mature B cell ที่สร้าง autoantibodies ในการกำเริบของโรค ขณะที่ความสัมพันธ์ลักษณะเดียวกันกับเม็ดเลือดขาวชนิด PMN ยังไม่ทราบเหตุผลชัดเจน โดยปกติแล้ว BLYS มีการสร้างและหลั่งมาจาก T cells, myeloid cells และ dendritic cells เป็นส่วนใหญ่ มีส่วนน้อยมากที่สร้างจาก B lymphocytes เพื่อใช้สำหรับการกระตุ้นตัวเองในลักษณะ autocrine การศึกษานี้ยังพบความสัมพันธ์ชนิดแปรผกผันกับปริมาณยา mycophenolate อีกด้วยโดยความเห็นส่วนตัวของผู้วิจัยสันนิษฐานว่ายา mycophenolate ยับยั้งการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ทำให้ปริมาณการใช้ BLYS ในเลือดลดลงทำให้ปริมาณ BLYS ในเลือดสูงขึ้น โดยผู้วิจัยได้ลองทำ subgroup analysis เทียบระดับ BLYS ในเลือดก่อนและหลังการได้ยาสูตรมาตรฐานเป็นเวลา 6 เดือน (ดังตารางที่ 4.5)

พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา mycophenolate มาก่อนมีระดับ BLyS ในเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา mycophenolate แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ระดับ BLyS ในเลือดในกลุ่มที่ได้รับยากลับ mycophenolate มานาน 6 เดือนกลับมีระดับที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาชัดเจนและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า BLyS สัมพันธ์กับอาการทาง systemic ค่อนข้างเด่นรวมถึงไวต่อปริมาณยากดภูมิทั้งสิ้นเตียรอยด์และ mycophenolate แสดงให้เห็นว่า BLyS มีความสัมพันธ์กับโรค lupus จริงแต่ไม่สามารถนำค่าระดับ BLyS ในเลือดไปใช้ในการบอกความรุนแรงของโรคไตอักเสบจาก lupus เนื่องจากไม่พบความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันระหว่างระดับ BLyS ในเลือดกับลักษณะทางคลินิก renal SLEDAI และลักษณะทางพยาธิวิทยาของไตอักเสบเลย นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ BLyS ที่ 6 เดือนยังพบความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันระดับ BLyS ตั้งต้นอีกด้วย (มีการเก็บเลือดจากผู้ป่วยเดิมประมาณ 20 รายที่ 6 เดือนหลังการรักษา) ซึ่งบ่งบอกว่าว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ BLyS ค่อนข้างช้าและอาจไม่ไวพอในการใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยความรุนแรงของโรค

ระดับ APRIL ในเลือดพบว่ามีสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับระยะเวลาที่เป็นโรคซึ่งตรงกับความรู้พื้นฐานเดิมที่ทราบกันกล่าวคือ APRIL มีความจำเป็นในช่วงระยะหลังของการพัฒนา B cell ในขั้นตอนของการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัย T cell ซึ่งการเกิดอาการจากโรค lupus แสดงว่าได้ผ่านขั้นตอนการรับรู้แอนติเจนแล้วดังนั้นยิ่งโรคเป็นมานาน APRIL ควรจะมีระดับสูงขึ้นเช่นเดียวกันยังเป็นช่วงที่โรคกำเริบระดับ APRIL ควรจะสูงเช่นกันจากการที่ inflammatory cells อื่นมีการหลั่ง APRIL ในปริมาณสูงขึ้นเพื่อให้ mature B cells มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นโดยมีผลของการวิจัยนี้ที่สอดคล้องได้แก่ การพบความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับ renal SLEDAI และ activity index หลังมีการปรับค่ารบกวนจากปริมาณยาเตียรอยด์และยา mycophenolate อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ของ APRIL กับ parameters ทาง systemic อื่นเลย อาจเป็นผลจากจำนวน n อาจไม่มากพอหรือ APRIL ในเลือดอาจสัมพันธ์กับไตโดยเฉพาะเท่านั้น ในอนาคตควรมีงานวิจัยอื่นเพื่อยืนยันความสัมพันธ์นี้เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL กับความรุนแรงของไตอักเสบจาก lupus

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มที่มีระดับ APRIL ในเลือดที่มากกว่า 3.6 ng./ml. และต่ำกว่า พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในส่วน of endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, PMN infiltration และ hyaline deposits ซึ่งช่วยยืนยันความสัมพันธ์ของระดับ APRIL กับความรุนแรงของโรคไตอักเสบ lupus อีกด้วย และกลุ่มที่มีระดับ APRIL ในเลือดที่มากกว่า 3.6 ng./ml. ยังพบว่ามีโอกาสล้มเหลวจากการรักษาด้วยยาสูตรมาตรฐานถึงร้อยละ 95.8 และเมื่อใช้ระดับ APRIL ในเลือดที่มากกว่า 3.6 ng./ml. ร่วมกับระดับโปรตีนรั่วใน

ปีสภาวะที่มากกว่า 2.5 กรัมต่อวันจะเพิ่มความจำเพาะในการวินิจฉัยความล้มเหลวของการตอบสนองต่อการรักษาได้ถึง 98.8% จากเดิมการใช้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งมีความจำเพาะสูงร้อยละ 89.9 มีข้อสังเกตอย่างหนึ่งคือการใช้วิธีใดวิธีหนึ่งไม่ได้แนะนำให้ใช้ค่าปริมาณโปรตีนรั่วในปีสภาวะที่มากกว่า 2.5 กรัมต่อวันมาใช้วินิจฉัยความล้มเหลวของการตอบสนองต่อการรักษาถึงแม้จะมีความไวเหนือกว่าการใช้ระดับ APRIL ในเลือดที่มากกว่า 3.6 นก./มล.ก็ตามเนื่องจากปริมาณโปรตีนรั่วในปีสภาวะเป็นเกณฑ์ข้อหนึ่งในการประเมินผลการตอบสนองต่อยากดภูมิและผู้ป่วยในกลุ่มศึกษามี class III+V หรือ IV+V ซึ่งการใช้เกณฑ์การตอบสนองการรักษาโดยอาศัยปริมาณโปรตีนรั่วที่น้อยกว่า 0.5 กรัมต่อวันอาจทำให้ผู้ป่วยที่ remission มีปริมาณน้อย

จากผลการวิจัยสรุปให้เห็นความน่าสนใจของระดับ BLyS และ APRIL ในเลือดที่มีความสัมพันธ์กับโรคลูปัสโดย BLyS สัมพันธ์กับ systemic lupus ขณะที่ APRIL สัมพันธ์กับ local lupus โดยเฉพาะไตอักเสบจากโรคลูปัส

5.3 ข้อจำกัดของงานวิจัย

เนื่องจากเป็นการศึกษาที่มีตัวอย่างไม่มากนักและมาจากกลุ่มผู้ป่วยรพ.จุฬาลงกรณ์เพียงกลุ่มเดียว ทำให้ความหลากหลายของตัวอย่างไม่มากนัก ผู้ป่วยที่มารับการรักษาส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ผ่านการรักษาด้วยยากดภูมิมาบ้างแล้วหรือป่วยด้วยโรคลูปัสมาซักระยะก่อนมาถึงมือแพทย์ที่รพ.จุฬาลงกรณ์ ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดีรักษายากทำให้ผลการศึกษามีปัจจัยกวนมากและผลลัพธ์ที่ได้มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้เนื่องจากการเลือกตัวอย่างย้อนหลังไปประมาณสองปีทำให้ผลการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการบางอย่างไม่ครบ การแปลผลต้องใช้วิธีทางสถิติช่วยซึ่งบางครั้งมี clinical significant แต่ไม่มี statistic significant เช่น ความแตกต่างระหว่างระดับ BLyS ในผู้ป่วยโรคลูปัสที่ได้รับและไม่ได้รับยา mycophenolate หรือ ความแตกต่างระหว่างระดับ APRIL ในกลุ่มไตอักเสบจากโรคลูปัสรายใหม่หรือเริ่มกำเริบและกลุ่มที่อยู่ในระยะสงบ เป็นต้น

นอกจากนี้ระดับ BLyS และ APRIL ในเลือดนอกจากขึ้นกับการสร้างจากเม็ดเลือดขาวแล้วยังขึ้นอยู่กับการขจัดของสารด้วย การที่แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ สารเหล่านี้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวควบคู่ไปด้วยเช่นการวัดระดับ BLyS และ APRIL mRNA จะเป็นการสนับสนุนข้อสรุปให้มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

5.4 ข้อเสนอแนะ

5.4.1 การนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (Implication for practice)

ถึงแม้การศึกษาจะทำในกลุ่มประชากรไม่มากนัก แต่ผลการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ของระดับ APRIL ในเลือดที่สามารถนำมาเป็นตัวชี้วัดเพื่อบอกความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัสได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่เจ็บตัวและมีความปลอดภัย (non-invasive) เมื่อเทียบกับการเจาะไตตรวจทางพยาธิวิทยา สามารถตรวจได้บ่อยในช่วงติดตามการรักษา ดังนั้นในอนาคตอาจนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกเพื่อประเมินความรุนแรงของโรค โดยนำมาประกอบการพิจารณาการรักษาในผู้ป่วยแต่ละราย ใช้ติดตามการเกิดภาวะไตอักเสบก่อนที่จะมีอาการแสดงทางคลินิกหรือแม้กระทั่งเพื่อพยากรณ์ผลการรักษาในอนาคตได้

ปัจจุบันมีการพัฒนายากลุ่มที่ต่อต้านฤทธิ์ของ BLYS และ APRIL ในการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด B cell โรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด B cell และโรคลูปัสซึ่งอยู่ในช่วง phase 3 ผลที่ได้ยังไม่น่าพอใจนัก เนื่องจากส่วนใหญ่ได้ผลในรายที่มีระดับ BLYS ในเลือดสูงและการเห็นผลตอบสนองต่อยาใช้เวลานานซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่ใช้เวลาสั้นไม่เกินสองปี การที่เราตรวจระดับ BLYS และ APRIL ในเลือดนอกจากดูความรุนแรงของโรคแล้วยังช่วยเลือกผู้ป่วยที่อาจจะได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วยยากลุ่มที่ต่อต้านฤทธิ์ของ BLYS และ APRIL อีกด้วยและยังใช้ในการติดตาม compliance ของยาอีกด้วย

สำหรับระดับ BLYS ในเลือดถึงแม้ว่าจะไม่พบความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพยาธิวิทยาของไตอักเสบจากโรคลูปัสแต่พบว่ามีสัมพันธ์กับลักษณะทาง systemic เด่น การนำ BLYS ไปใช้เพื่อเฝ้าติดตามการกำเริบของโรคในระยะเริ่มแรกในรายที่โรคสงบมานานและไม่ได้ใช้ยากดภูมิอาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้แทนคอมพรีเมนส์ได้

5.4.2 การนำไปใช้ในเชิงงานวิจัยในอนาคต (Implication for further research)

Biomarker ในผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบันเพื่อลดข้อจำกัดในการตัดชิ้นเนื้อไตมาตรวจ มีผู้ศึกษาถึง biomarker ต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็นจากในเลือดในปัสสาวะหรือในชิ้นเนื้อไตเช่นเดียวกับผู้วิจัยที่ได้ศึกษาโดยวัดระดับ BLYS และ APRIL ในเลือดของผู้ป่วยเพื่อบอกความรุนแรงของพยาธิสภาพไต ถึงแม้ข้อมูลการศึกษานี้เป็นแบบ cross-sectional study แต่ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า APRIL ในเลือดอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในอนาคตในการประเมินภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัสได้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้เนื่องจากการวินิจฉัยผู้ป่วยระยะเริ่มแรกเป็นไปได้ด้วยความรวดเร็วร่วมกับปัจจุบันการรักษาได้มาตรฐานเพิ่มขึ้นทำให้การ

ติดตามผลการทำงานของไตในระยะยาวของผู้ป่วยที่มีระดับ APRIL สูงไม่เห็นความแตกต่างชัดเจน จากกลุ่มที่มีระดับ APRIL ต่ำจึงควรมีการเฝ้าติดตามผู้ป่วยต่อไปอีกจะช่วยให้สามารถประเมิน ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ APRIL ในเลือดกับการทำงานของไตในระยะยาวได้อีกด้วย

สำหรับระดับ BLyS และระดับ APRIL ในปีสสาวะ ผู้วิจัยได้ทดลองสุ่มวัดในผู้ป่วยกลุ่ม เดียวกันจำนวน 20 รายในวันที่ทำการตรวจระดับเลือดเพื่อดูระดับ BLyS และ APRIL ในเลือด โดย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ BLyS และระดับ APRIL ในปีสสาวะกับลักษณะทางคลินิก ข้อมูล immunological parameters และลักษณะทางพยาธิวิทยา ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากจำนวน ตัวอย่างไม่เพียงพอในการแปลผลหรือการตรวจสอบเหล่านี้ในปีสสาวะอาจมีปัจจัยกวนจากหลาย สาเหตุ เช่น การไม่ถูกขับออกทางไตเนื่องจากไตวายเฉียบพลันหรือมีปัจจัยเรื่องการดูดซึมกลับหรือ การหลั่งสารเหล่านี้เข้ามาเกี่ยวข้อง

รายการอ้างอิง

- [1] Oelke K, Richardson B. Pathogenesis of lupus. *Arthritis Rheum* 2002;47:343-45.
- [2] Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:529-58.
- [3] Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Lorenz H, Geiler T, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:28-35.
- [4] Berden JH, Grootsholten C, Jurgen WC, van der Vlag J. Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect? *J Nephrol* 2002;15 Suppl 6:S1-10.
- [5] van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CG, van den Born J, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:57-66.
- [6] Su W, Madaio MP. Recent advances in the pathogenesis of lupus nephritis: autoantibodies and B cells. *Semin Nephrol* 2003;23:564-8.
- [7] Waters ST, McDuffie M, Bagavant H, Deshmukh US, Gaskin F, Jiang C, et al. Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosome, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. *J Exp Med* 2004;199:255-64.
- [8] Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:347-62.
- [9] Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 2005;23:7-18.
- [10] Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I. Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:433-52.

- [11] Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature** 2005;435:590-7.
- [12] Lopes-Carvalho T, Kearney JF. Marginal zone B cell physiology and disease. **Curr Dir Autoimmun** 2005;8:91-123.
- [13] Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. **Nat Rev Immunol** 2001;1:177-86.
- [14] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. **Nature Rev Immunol** 2005;5:230-42.
- [15] Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. **Nat Rev Immunol** 2003;3:822-9.
- [16] Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY** 2006;5:564-76.
- [17] Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. **Curr Dir Autoimmun** 2005;8:25-54.
- [18] Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. **J immunol** 2005;174:6781-90.
- [19] Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. **J immunol** 2005;175:7103-7.
- [20] Gommerman JL, Browning JL. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. **Nat Rev Immunol** 2003;3:642-55.
- [21] Braun A, Takemura S, Vallejo AN, Goronzy JJ, Weyand CM. Lymphotoxin beta-mediated stimulation of synoviocytes in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 2004;50:2140-50.
- [22] Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nat Immunol** 2006;7:344-53.
- [23] Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol** 2006;6:205-17.

- [24] Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004;363:1544-6.
- [25] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:1526-33.
- [26] McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, et al. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:1226-32.
- [27] Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol Rev* 2005;204:232-49.
- [28] Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2005;201:1659-67.
- [29] Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR, Holmdahl R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2005;35:1643-52.
- [30] Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741-9.
- [31] Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004;50:380-6.
- [32] Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003;349:139-45.
- [33] Melanitou E, Devendra D, Liu E, Miao D, Eisenbarth GS. Early and quantal (by litter) expression of insulin autoantibodies in the nonobese diabetic mice predict early diabetes onset. *J Immunol* 2004;173:6603-10.

- [34] Lee LA. Transient autoimmunity related to maternal autoantibodies: neonatal lupus. **Autoimmun Rev** 2005;4:207-13.
- [35] Vincent A, McConville J, Farrugia ME, Bowen J, Plested P, Tang T, et al. Antibodies in myasthenia gravis and related disorders. **Ann N Y Acad Sci** 2003;998:324-35.
- [36] Eisenberg R. Do autoantigens define autoimmunity or vice versa? **Eur J Immunol** 2005;35:367-70.
- [37] Lim ET, Berger T, Reindl M, Dalton CM, Fernando K, Keir G, et al. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. **Mult Scler** 2005;11:492-4.
- [38] Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, Reichert DE, Allen PM. Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. **J Immunol** 2004;172:7694-702.
- [39] Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, et al. Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. **Diabetes** 2004;53:2581-7.
- [40] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science** 2003;301:1374-7.
- [41] Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. **J Exp Med** 2005;201:703-11.
- [42] Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. **Annu Rev Immunol** 2006;24:467-96.
- [43] Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. **Eur J Neurol** 2005;12:392-8.
- [44] Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. **J Exp Med** 1999;189:1639-48.

- [45] Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. **Nat Rev Immunol** 2001;1:147-53.
- [46] Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S, et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. **J Clin Invest** 2005;115:3072-82.
- [47] O'Neill SK, Shlomchik MJ, Glant TT, Cao Y, Doodles PD, Finnegan A. Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. **J Immunol** 2005;174:3781-8.
- [48] Liu CC, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. **Curr Opin Rheumatol** 2005;17:543-9.
- [49] Croker JA, Kimberly RP. SLE: challenges and candidates in human disease. **Trends Immunol** 2005;26:580-6.
- [50] Sfrikakis PP, Boletis JN, Tsokos GC. Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. **Curr Opin Rheumatol** 2005;17:550-7.
- [51] Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med** 2004;350:2572-81.
- [52] Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nat Rev Immunol** 2006;6:394-403.
- [53] Looney RJ, Anolik J, Sanz I. Treatment of SLE with anti-CD20 monoclonal antibody. **Curr Dir Autoimmun** 2005;8:193-205.
- [54] Keystone EC. B cells in rheumatoid arthritis: from hypothesis to the clinic. **Rheumatology (Oxford)** 2005;44 Suppl 2:ii8-ii12.
- [55] Cohen SB. B-cell depletion for rheumatic diseases: where are we? **MedGenMed** 2005;7:72.
- [56] Panayi GS. B cell-directed therapy in rheumatoid arthritis--clinical experience. **J Rheumatol Suppl** 2005;73:19-24; discussion 9-30.
- [57] Edwards JC, Cambridge G. Prospects for B-cell-targeted therapy in autoimmune disease. **Rheumatology (Oxford)** 2005;44:151-6.

- [58] Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Wolbink GJ, Mansour K, et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. **Arthritis Rheum** 2005;52:2740-50.
- [59] Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U. Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. **Am J Respir Crit Care Med** 2006;173:180-7.
- [60] Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. **Rheumatology (Oxford)** 2005;44:1542-5.
- [61] Silverman GJ. Anti-CD20 therapy in systemic lupus erythematosus: a step closer to the clinic. **Arthritis Rheum** 2005;52:371-7.
- [62] Chambers SA, Isenberg D. Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. **Lupus** 2005;14:210-4.
- [63] Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K, Combs D, Fielder P, Yang J, et al. Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in Macaca fascicularis. **J Immunother** 2005;28:212-9.
- [64] Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K, Nimmerjahn F, Tedder TF. Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. **J Exp Med** 2006;203:743-53.
- [65] Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. **J Exp Med** 2004;199:1659-69.
- [66] Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. **Blood** 2004;104:2635-42.
- [67] Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. **J Immunol** 2005;174:817-26.

- [68] Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2004;50:3580-90.
- [69] Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 2003;48:2146-54.
- [70] Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. **J Clin Oncol** 2005;23:474-81.
- [71] Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Sanz I, Rosenblatt J, et al. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2003;48:455-9.
- [72] Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. **Blood** 2002;99:754-8.
- [73] Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. **J Clin Oncol** 2003;21:3940-7.
- [74] Yazawa N, Hamaguchi Y, Poe JC, Tedder TF. Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005;102:15178-83.
- [75] Ng LG, Mackay CR, Mackay F. The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. **Mol Immunol** 2005;42:763-72.
- [76] Vugmeyster Y, Seshasayee D, Chang W, Storn A, Howell K, Sa S, et al. A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and

- lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys. **Am J Pathol** 2006;168:476-89.
- [77] Halpern WG, Lappin P, Zanardi T, Cai W, Corcoran M, Zhong J, et al. Chronic administration of belimumab, a BLYS antagonist, decreases tissue and peripheral blood B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. **Toxicol Sci** 2006;91:586-99.
- [78] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity** 2006;24:179-89.
- [79] Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. **Expert Opin Biol Ther** 2005;5:683-90.
- [80] Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, et al. Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum** 2005;52:818-25.
- [81] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. **Annu Rev Immunol** 2005;23:1-21.
- [82] Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. **Blood** 2005;106:2627-32.
- [83] Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. **Immunity** 2004;20:539-50.
- [84] Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. **Science** 2001;293:2111-4.
- [85] Schneider P, Takatsuka H, Wilson A, Mackay F, Tardivel A, Lens S, et al. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. **J Exp Med** 2001;194:1691-7.

- [86] Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, Wang L, Lefevre EA, Cachero TG, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. **J Exp Med** 2000;192:129-35.
- [87] Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, et al. B cell receptor signal strength determines B cell fate. **Nat Immunol** 2004;5:317-27.
- [88] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell** 2001;104:487-501.
- [89] Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. **J Exp Med** 1999;190:1697-710.
- [90] Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Science** 1999;285:260-3.
- [91] Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. **J Exp Med** 1999;189:1747-56.
- [92] Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends Biochem Sci** 2002;27:19-26.
- [93] Trembl JF, Hao Y, Stadanlick JE, Cancro MP. The BLyS family: toward a molecular understanding of B cell homeostasis. **Cell Biochem Biophys** 2009;53:1-16.
- [94] Koskela K, Nieminen P, Kohonen P, Salminen H, Lassila O. Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius. **Scand J Immunol** 2004;59:449-57.
- [95] Guan ZB, Ye JL, Dan WB, Yao WJ, Zhang SQ. Cloning, expression and bioactivity of duck BAFF. **Mol Immunol** 2007;44:1471-6.
- [96] Schneider K, Kothlow S, Schneider P, Tardivel A, Gobel T, Kaspers B, et al. Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. **Int Immunol** 2004;16:139-48.

- [97] Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. **Immunol Lett** 2008;116:1-6.
- [98] Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. **Blood** 2001;97:198-204.
- [99] Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. **Blood** 2008;111:1004-12.
- [100] Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, Nemazee D. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. **J Biol Chem** 2003;278:38220-8.
- [101] Gavin AL, Duong B, Skog P, Ait-Azzouzene D, Greaves DR, Scott ML, et al. deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. **J Immunol** 2005;175:319-28.
- [102] Vogt G, Chapgier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, et al. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. **Nat Genet** 2005;37:692-700.
- [103] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. **J Exp Med** 1998;188:1185-90.
- [104] Kelly K, Manos E, Jensen G, Nadauld L, Jones DA. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. **Cancer Res** 2000;60:1021-7.
- [105] Pradet-Balade B, Medema JP, Lopez-Fraga M, Lozano JC, Kofschoten GM, Picard A, et al. An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. **EMBO J** 2002;21:5711-20.

- [106] Kolfshoten GM, Pradet-Balade B, Hahne M, Medema JP. TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL. **Biochem Pharmacol** 2003;66:1427-32.
- [107] Wallweber HJ, Compaan DM, Starovasnik MA, Hymowitz SG. The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. **J Mol Biol** 2004;343:283-90.
- [108] Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J, et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. **J Biol Chem** 2005;280:7218-27.
- [109] Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. **Semin Immunol** 2006;18:263-75.
- [110] Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, Good KL. BAFF, APRIL and human B cell disorders. **Semin Immunol** 2006;18:305-17.
- [111] Sakurai D, Hase H, Kanno Y, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. **Blood** 2007;109:2961-7.
- [112] Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. **Blood** 2008;111:2755-64.
- [113] Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. **J Immunol** 2008;180:3655-9.
- [114] O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. **J Exp Med** 2004;199:91-8.
- [115] Mackay F, Tangye SG. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. **Curr Opin Pharmacol** 2004;4:347-54.
- [116] Jelinek DF, Darce JR. Human B lymphocyte malignancies: exploitation of BLYS and APRIL and their receptors. **Curr Dir Autoimmun** 2005;8:266-88.
- [117] Ware CF. APRIL and BAFF connect autoimmunity and cancer. **J Exp Med** 2000;192:F35-8.

- [118] Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 2007;109:729-39.
- [119] Madry C, Laabi Y, Callebaut I, Roussel J, Hatzoglou A, Le Coniat M, et al. The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int Immunol* 1998;10:1693-702.
- [120] von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 1997;278:138-41.
- [121] Miller DJ, Hayes CE. Phenotypic and genetic characterization of a unique B lymphocyte deficiency in strain A/WySnJ mice. *Eur J Immunol* 1991;21:1123-30.
- [122] Miller DJ, Hanson KD, Carman JA, Hayes CE. A single autosomal gene defect severely limits IgG but not IgM responses in B lymphocyte-deficient A/WySnJ mice. *Eur J Immunol* 1992;22:373-9.
- [123] Lentz VM, Cancro MP, Nashold FE, Hayes CE. Bcmd governs recruitment of new B cells into the stable peripheral B cell pool in the A/WySnJ mouse. *J immunol* 1996;157:598-606.
- [124] Harless SM, Lentz VM, Sah AP, Hsu BL, Clise-Dwyer K, Hilbert DM, et al. Competition for BlyS-mediated signaling through Bcmd/BR3 regulates peripheral B lymphocyte numbers. *Curr Biol* 2001;11:1986-9.
- [125] Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, et al. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 2001;11:1547-52.
- [126] Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1147-54.
- [127] Stockfleth E, Trefzer U, Garcia-Bartels C, Wegner T, Schmook T, Sterry W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:53-6.

- [128] Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 2003;18:279-88.
- [129] Trembl LS, Carlesso G, Hoek KL, Stadanlick JE, Kambayashi T, Bram RJ, et al. TLR stimulation modifies BLyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *J Immunol* 2007;178:7531-9.
- [130] Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, MacKay F, Rao SP, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 2004;173:2331-41.
- [131] Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 1993;151:4431-44.
- [132] Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev* 1986;93:103-24.
- [133] Nemazee D, Buerki K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8039-43.
- [134] Basten A, Brink R, Peake P, Adams E, Crosbie J, Hartley S, et al. Self tolerance in the B-cell repertoire. *Immunol Rev* 1991;122:5-19.
- [135] Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 1991;353:765-9.
- [136] Wang H, Ye J, Arnold LW, McCray SK, Clarke SH. A VH12 transgenic mouse exhibits defects in pre-B cell development and is unable to make IgM+ B cells. *J Immunol* 2001;167:1254-62.
- [137] Levine MH, Haberman AM, Sant'Angelo DB, Hannum LG, Cancro MP, Janeway CA, Jr., et al. A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2743-8.

- [138] Clarke SH, McCray SK. VH CDR3-dependent positive selection of murine VH12-expressing B cells in the neonate. **Eur J Immunol** 1993;23:3327-34.
- [139] Gu H, Tarlinton D, Muller W, Rajewsky K, Forster I. Most peripheral B cells in mice are ligand selected. **J Exp Med** 1991;173:1357-71.
- [140] Smith SH, Cancro MP. Cutting edge: B cell receptor signals regulate BlyS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors. **J immunol** 2003;170:5820-3.
- [141] Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. **Cell** 1997;90:1073-83.
- [142] Rosado MM, Freitas AA. The role of the B cell receptor V region in peripheral B cell survival. **Eur J Immunol** 1998;28:2685-93.
- [143] McLean AR, Rosado MM, Agenes F, Vasconcellos R, Freitas AA. Resource competition as a mechanism for B cell homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997;94:5792-7.
- [144] Freitas AA, Rosado MM, Viale AC, Grandien A. The role of cellular competition in B cell survival and selection of B cell repertoires. **Eur J Immunol** 1995;25:1729-38.
- [145] Sprent J, Basten A. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. **Cell Immunol** 1973;7:40-59.
- [146] Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP. Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. **J immunol** 2002;168:5993-6.
- [147] von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. **Immunity** 2001;14:573-82.
- [148] Lentz VM, Hayes CE, Cancro MP. Bcmd decreases the life span of B-2 but not B-1 cells in A/WySnJ mice. **J immunol** 1998;160:3743-7.
- [149] Hoag KA, Clise-Dwyer K, Lim YH, Nashold FE, Gestwicki J, Cancro MP, et al. A quantitative-trait locus controlling peripheral B-cell deficiency maps to mouse Chromosome 15. **Immunogenetics** 2000;51:924-9.

- [150] Stadanlick JE, Cancro MP. BAFF and the plasticity of peripheral B cell tolerance. **Curr Opin Immunol** 2008;20:158-61.
- [151] Sasaki Y, Derudder E, Hobeika E, Pelanda R, Reth M, Rajewsky K, et al. Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. **Immunity** 2006;24:729-39.
- [152] Shinnars NP, Carlesso G, Castro I, Hoek KL, Corn RA, Woodland RT, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. **J Immunol** 2007;179:3872-80.
- [153] Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. **Nat Rev Immunol** 2005;5:435-45.
- [154] Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG, Scholz JL, Miller JP, Quinn WJ, 3rd, et al. Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling. **Nat Immunol** 2008;9:1379-87.
- [155] Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, Watarai H, et al. PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. **J Exp Med** 2005;202:1423-31.
- [156] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev** 2004;18:2195-224.
- [157] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol** 2004;25:280-8.
- [158] Sen R. Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. **Immunity** 2006;25:871-83.
- [159] Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. **Mol Cell** 2001;7:401-9.
- [160] Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. **Immunity** 2008;28:391-401.

- [161] He JQ, Zarnegar B, Oganessian G, Saha SK, Yamazaki S, Doyle SE, et al. Rescue of TRAF3-null mice by p100 NF-kappa B deficiency. **J Exp Med** 2006;203:2413-8.
- [162] Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. **J Biol Chem** 2004;279:26243-50.
- [163] Ni CZ, Oganessian G, Welsh K, Zhu X, Reed JC, Satterthwait AC, et al. Key molecular contacts promote recognition of the BAFF receptor by TNF receptor-associated factor 3: implications for intracellular signaling regulation. **J Immunol** 2004;173:7394-400.
- [164] Xu LG, Shu HB. TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. **J Immunol** 2002;169:6883-9.
- [165] Patke A, Mecklenbrauker I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Tarakhovskiy A. BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta- and Akt-dependent mechanism. **J Exp Med** 2006;203:2551-62.
- [166] Mecklenbrauker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovskiy A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCdelta-mediated nuclear signalling. **Nature** 2004;431:456-61.
- [167] Hauser AE, Junt T, Mempel TR, Sneddon MW, Kleinstein SH, Henrickson SE, et al. Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. **Immunity** 2007;26:655-67.
- [168] Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, et al. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. **Nature** 2007;446:83-7.
- [169] Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. **Immunity** 2007;27:190-202.
- [170] Anderson SM, Hannum LG, Shlomchik MJ. Memory B cell survival and function in the absence of secreted antibody and immune complexes on follicular dendritic cells. **J Immunol** 2006;176:4515-9.

- [171] Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science** 1996;272:54-60.
- [172] Gray D, Bergthorsdottir S, van Essen D, Wykes M, Poudrier J, Siepmann K. Observations on memory B-cell development. **Semin Immunol** 1997;9:249-54.
- [173] Mantchev GT, Cortesao CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ. TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. **J Immunol** 2007;179:2282-8.
- [174] Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001;2:550-6.
- [175] Qian Y, Qin J, Cui G, Naramura M, Snow EC, Ware CF, et al. Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival. **Immunity** 2004;21:575-87.
- [176] Rahman ZS, Rao SP, Kalled SL, Manser T. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. **J Exp Med** 2003;198:1157-69.
- [177] Stohl W, Xu D, Kim KS, Koss MN, Jorgensen TN, Deocharan B, et al. BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2005;52:2080-91.
- [178] Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, et al. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. **Blood** 2004;103:2257-65.
- [179] Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. **J Exp Med** 2005;201:1375-83.
- [180] Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT. B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. **J Immunol** 2005;175:2814-24.

- [181] Scholz JL, Crowley JE, Tomayko MM, Steinel N, O'Neill PJ, Quinn WJ, 3rd, et al. BLYS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15517-22.
- [182] Trembl LS, Quinn WJ, 3rd, Trembl JF, Scholz JL, Cancro MP. Manipulating B cell homeostasis: a key component in the advancement of targeted strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56:153-64.
- [183] Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 2006;54:723-32.
- [184] Stohl W. Therapeutic targeting of B lymphocyte stimulator (BLYS) in the rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006;6:351-8.
- [185] Gottenberg JE, Busson M, Cohen-Solal J, Lavie F, Abbeduto K, Kimberly RP, et al. Correlation of serum B lymphocyte stimulator and beta2 microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1050-5.
- [186] Hondowicz BD, Alexander ST, Quinn WJ, 3rd, Pagan AJ, Metzgar MH, Cancro MP, et al. The role of BLYS/BLYS receptors in anti-chromatin B cell regulation. *Int Immunol* 2007;19:465-75.
- [187] Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest* 2007;117:1550-7.
- [188] Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, et al. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med* 2000;192:137-43.
- [189] Shu HB, Johnson H. B cell maturation protein is a receptor for the tumor necrosis factor family member TALL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9156-61.

- [190] Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, Rogier E, Madry C, Inoue J, et al. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2000;165:1322-30.
- [191] Hikida M, Johmura S, Hashimoto A, Takezaki M, Kurosaki T. Coupling between B cell receptor and phospholipase C-gamma2 is essential for mature B cell development. *J Exp Med* 2003;198:581-9.
- [192] Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 2002;3:958-65.
- [193] Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, Wang H, Lee W, French DM, et al. BAFF/BlyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 2002;17:515-24.
- [194] Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 2003;112:286-97.
- [195] Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med* 2000;192:953-64.
- [196] Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:1453-66.
- [197] Amanna IJ, Dingwall JP, Hayes CE. Enforced bcl-xL gene expression restored splenic B lymphocyte development in BAFF-R mutant mice. *J Immunol* 2003;170:4593-600.
- [198] Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune

- disease. impaired B cell maturation in mice lacking BlyS. **Immunity** 2001;15:289-302.
- [199] Xu S, Lam KP. B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. **Mol Cell Biol** 2001;21:4067-74.
- [200] Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, et al. BAFF-R, a novel TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science** 2001;293:2108-11.
- [201] Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. **Nat Immunol** 2002;3:822-9.
- [202] Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature** 2000;404:995-9.
- [203] Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, McCabe S, Miner K, Solovyev I, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000;97:3370-5.
- [204] Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. **J Immunol** 2001;166:6-10.
- [205] Cheema GS, Roschke V HD, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Arthritis Rheum** 2001;44:1313-9.
- [206] Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. **Arthritis Rheum** 2003;48:3475-86.
- [207] Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov** 2006;5:235-46.
- [208] Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, et al. BlyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients

- with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* 2002;169:4314-21.
- [209] Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodriguez D, Gomez-Caro R, et al. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 2002;109:1587-98.
- [210] Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65:521-30.
- [211] Moroni G, Quaglini S, Maccario M, Banfi G, Ponticelli C. "Nephritic flares" are predictors of bad long-term renal outcome in lupus nephritis. *Kidney Int* 1996;50:2047-53.
- [212] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
- [213] Uribe AG, Vila LM, McGwin G, Jr., Sanchez ML, Reveille JD, Alarcon GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31:1934-40.
- [214] Ibanez D, Gladman D, Urowitz M. Summarizing disease features over time: II. Variability measures of SLEDAI-2K. *J Rheumatol* 2007;34:336-40.
- [215] Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:685-708.
- [216] Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2342-9.
- [217] Ho A, Barr SG, Magder LS, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2350-7.

- [218] Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. **N Engl J Med** 1983;309:1543-6.
- [219] Schwab SJ, Christensen RL, Dougherty K, Klahr S. Quantitation of proteinuria by the use of protein-to-creatinine ratios in single urine samples. **Arch Intern Med** 1987;147:943-4.
- [220] Rodby RA, Rohde RD, Sharon Z, Pohl MA, Bain RP, Lewis EJ. The urine protein to creatinine ratio as a predictor of 24-hour urine protein excretion in type 1 diabetic patients with nephropathy. The Collaborative Study Group. **Am J Kidney Dis** 1995;26:904-9.
- [221] Perrone RD, Steinman TI, Beck GJ, Skibinski CI, Royal HD, Lawlor M, et al. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of ¹²⁵I-iothalamate, ¹⁶⁹Yb-DTPA, ^{99m}Tc-DTPA, and inulin. The Modification of Diet in Renal Disease Study. **Am J Kidney Dis** 1990;16:224-35.
- [222] Birmingham DJ, Rovin BH, Shidham G, Nagaraja HN, Zou X, Bissell M, et al. Spot urine protein/creatinine ratios are unreliable estimates of 24 h proteinuria in most systemic lupus erythematosus nephritis flares. **Kidney Int** 2007;72:865-70.
- [223] Contreras G, Pardo V, Cely C, Borja E, Hurtado A, De La Cuesta C, et al. Factors associated with poor outcomes in patients with lupus nephritis. **Lupus** 2005;14:890-5.
- [224] Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Thervet E, Vrtovsni F, Remy P, et al. Outcome of relapse in lupus nephritis: roles of reversal of renal fibrosis and response of inflammation to therapy. **Kidney Int** 2002;61:2176-86.
- [225] Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, et al. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. **Am J Med** 1983;75:382-91.

- [226] Austin HA, 3rd, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: contributions of clinical and histologic data. **Kidney Int** 1994;45:544-50.
- [227] Esdaile JM, Levinton C, Federgreen W, Hayslett JP, Kashgarian M. The clinical and renal biopsy predictors of long-term outcome in lupus nephritis: a study of 87 patients and review of the literature. **Q J Med** 1989;72:779-833.
- [228] Nossent HC, Henzen-Logmans SC, Vroom TM, Berden JH, Swaak TJ. Contribution of renal biopsy data in predicting outcome in lupus nephritis. Analysis of 116 patients. **Arthritis Rheum** 1990;33:970-7.
- [229] Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. **Kidney Int** 1984;25:689-95.
- [230] Chu VT, Enghard P, Schurer S, Steinhauser G, Rudolph B, Riemekasten G, et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2009;60:2083-93.
- [231] Petri M, Stohl W, Chatham W, McCune WJ, Chevrier M, Ryel J, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2008;58:2453-9.

ภาคผนวก

ข้อมูล คำชี้แจง

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนบิลิสในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัส

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นาย วรพจน์ เตரியมตระการผล
ที่อยู่ 136/20 ถนน นเรศ แขวง สีพระยา เขต บางรัก กทม. 10500
เบอร์โทรศัพท์ 085-3185640 (มือถือ)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัส ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุ ผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคลูปัสเป็นโรคทางภูมิคุ้มกันที่พบบ่อยในทางคลินิก ภาวะไตอักเสบจากโรคดังกล่าวมีความรุนแรงในระดับที่แตกต่างกัน บางครั้งพบว่าลักษณะทางคลินิกไม่ไปด้วยกันกับพยาธิสภาพ ความรุนแรงที่ไต จึงจำเป็นต้องมีการตรวจด้วยวิธีจำเพาะคือการเจาะไตมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยความรุนแรง ประเมินการรักษา การเจาะไตเป็นหัตถการที่มีข้อจำกัดในผู้ป่วยบางราย เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกง่าย ภาวะความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้ และมีความเป็นไปได้ยากในการใช้การเจาะไตเพื่อติดตามการรักษา ปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางอนุชีวโมเลกุล คณะผู้วิจัยมีความต้องการจะพัฒนาการตรวจโปรตีนในเลือด เพื่อบอกการกำเริบของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัส ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย ติดตามผลการรักษาบอกพยากรณ์โรคในผู้ป่วยลูปัส ทดแทนการตรวจชิ้นเนื้อไตในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ โปรตีนบลิส ในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไตอักเสบจากโรคลูปัส จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยคือ 38 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเจาะเลือดปริมาณ 10 ซีซี เพื่อตรวจระดับ BLYS และ APRIL ในวันที่เจาะเนื้อไต

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใครขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

เสียเวลา ไม่สะดวก ไม่สบาย ความเสี่ยงต่อร่างกายจากการเจาะเลือด เป็นต้น

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียง ของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ผู้ป่วยจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากผลการวิจัย การรักษาผู้ป่วยเป็นไปตามผลการตรวจทางพยาธิวิทยาและตามมาตรฐานการการดูแลผู้ป่วย อย่างไรก็ตามผลการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยไตอักเสบจากโรคลูปัสในอนาคต

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความ
สัตย์จริง

ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย / ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย
ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นพ. วรพจน์ เตรียมตระการผล ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน
ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้
เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบ
บันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิก
การให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่
นพ.วรพจน์ เตรียมตระการผล หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-2564251 ต่อ 202 หรือ 085-3185640

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูล
ส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อ
ประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูล
ของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับ
การเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

 <p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p> <p style="text-align: right;">หน้า 1 / 2</p>
--	--

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนบิลิสในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไต
อักเสบจากโรคไต

วันที่ให้คำยินยอม วันที่....เดือน..... พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาวได้อ่านรายละเอียดจากเอกสาร
ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วม
โครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่
พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการ
วิจัยนี้ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย
วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย
และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัย
จนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจน
ข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะ
ได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ยกเว้นการชดเชยเป็นตัวแทนจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล
และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับ
ต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัยคณะกรรมการ
พิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของ
ผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น
โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติ
ทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

	<p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p> <p style="text-align: right;">หน้า 1 / 2</p>
---	--	--

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

..... ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

..... ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยสำหรับผู้แทน โดยชอบธรรม (Informed Consent Form)

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนบิลิสในเลือดกับความรุนแรงของภาวะไต
อักเสบจากโรคลูบัส

วันให้ความยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....(ชื่อ-นามสกุล
ผู้แทนโดยชอบธรรม) ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นของ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/
นางสาว.....(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมการวิจัย) ได้อ่าน
รายละเอียดจากเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่
.....แล้วข้าพเจ้ายินยอมให้ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว
.....(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมวิจัย) เข้าร่วมใน
โครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม
และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนาม
ในใบยินยอมเข้าร่วมในการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยได้รับ การอธิบายจากผู้วิจัยถึง
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้น
จากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยและแนวทางการรักษาโดยวิธีอื่น
อย่างละเอียด ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยมีเวลาและ โอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัย
ทั้งหมดจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย
สงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย พอใจ

ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยได้รับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการ
วิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ยกเว้นการชดเชยเป็นตัว
เงินจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจถึงสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัย เมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้ง
เหตุผลและการบอก เลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ผู้เข้าร่วม
การวิจัยจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยเป็นความลับ และจะ
เปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่น ใน นามของบริษัทผู้สนับสนุน

การวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อาจจะได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้ความยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมการวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวผู้เข้าร่วมการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้าและ ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัย และสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อของผู้เข้าร่วมการวิจัย จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในรูปแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การ ตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้น และมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีให้ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว.....(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมวิจัย) เข้าร่วมในโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารใบยินยอมนี้

.....ลงนามผู้แทนโดยชอบธรรม

(.....) ชื่อผู้แทนโดยชอบธรรมตัว

บรรจง

.....ความสัมพันธ์ของผู้แทนโดย

ชอบธรรมกับผู้เข้าร่วมการวิจัย

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย อาการไม่พึงประสงค์ หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้แทนโดยชอบธรรมของผู้เข้าร่วมการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นาย วรพจน์ เตரியมตระการผล	
วัน เดือน ปีเกิด	7 มีนาคม พ.ศ. 2521 จังหวัดกรุงเทพมหานคร	
ประวัติการศึกษาและการทำงาน		
	นิสิตคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์	2539-2545
	แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลชัยภูมิ	2545-2546
	แพทย์ใช้ทุนปีที่ 2 – 3 โรงพยาบาลบำเหน็จณรงค์ จังหวัดชัยภูมิ	2546-2548
	แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2548-2551
	กำลังศึกษาอายุรศาสตร์ต่อยอดสาขาวิชาโรคไต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2551–ปัจจุบัน
ปริญญาและประกาศนียบัตร		
	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์	2545
	วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์	2551
สมาชิกสมาคมวิชาชีพ		
	สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย	
	สมาชิกสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย	
	สมาชิกสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย	
	สมาชิกแพทยสภา	