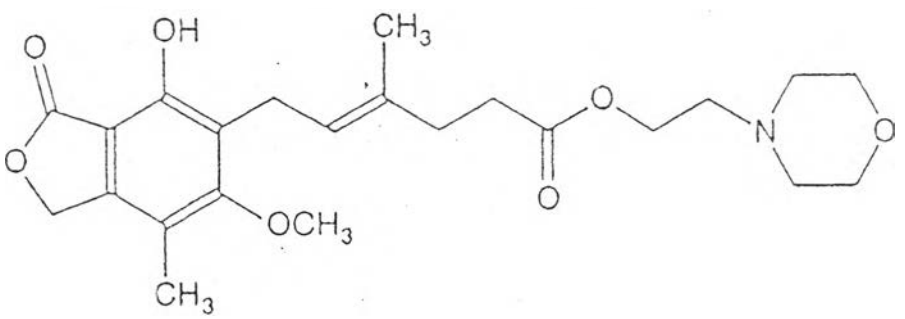
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. มัยโคฟีโนเลตโมฟีติล(mycophenolate mofetil, MMF)

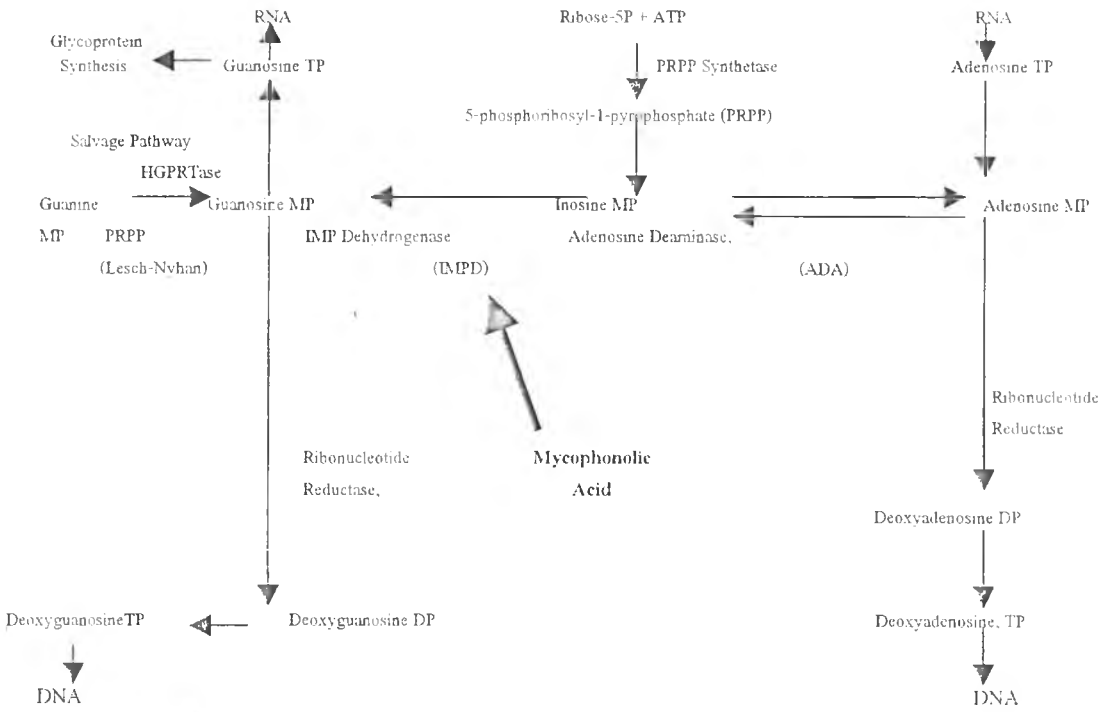
1.1 บทนำ

MMF เป็นสารประกอบ ester ของ mycophenolic acid [2-morpholinoethyl 41 ester of mycophenolic acid (MPA)] มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 ถูกค้นพบโดย Florey และคณะเมื่อ 50 ปีก่อนโดยได้มาจาก Penicillium species



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของยา MMF

20 ปีที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์พบว่า MPA สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ mammalian cell cultures และในการศึกษารักษาโรคเรื้อนกวาง(psoriasis) และมะเร็งระยะท้าย(advanced malignant tumors) พบว่า MPA ออกฤทธิ์เฉพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes ทั้ง T และ B-cells[7] โดยอาศัย specific uncompetitive binding ต่อ inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) ดังรูปที่ 2 ซึ่งเอนซัยม์นี้มีความจำเป็นต่อขบวนการสังเคราะห์ guanine nucleotides ใน de novo pathway ซึ่งเซลล์อื่นๆในร่างกายรวมถึง polymorphonuclear cell เซลล์ประสาท สามารถใช้ salvage pathway ทดแทนได้ นอกจากจะมีผลต่อการแบ่งตัวของ lymphocytes แล้วยังลดความสามารถในการจับของ adhesion molecules อีกด้วยทางอ้อมซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการกดภูมิต้านทานของ MPA[7]



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสร้าง DNA

การออกฤทธิ์ของ MPA มิได้ผ่านทาง interleukin-2 (IL-2) ที่สามารถมีผลต่อ T และ B lymphocytes ได้เช่นกัน ตัวอย่างยาที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวคือ cyclophillins เช่น cyclosporine และ tracolimus (FK506) นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ต่างจาก azathioprine ที่ต้อง incooperated กับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nucleic acids ทำให้ MMF สามารถใช้ร่วมกับยากลุ่ม cyclophillins และต่างไปจาก azathioprine ได้

การศึกษาไปข้างหน้าขนาดใหญ่หลายสถาบันทำในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตแสดงให้เห็นว่า ยา MMF ชนิดทานสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิด acute rejection ลงร้อยละ 50 ในเวลา 6 เดือน เมื่อใช้ร่วมกับยา cyclosporine และ corticosteroids เมื่อเทียบกับยาหลอกหรือเทียบกับ azathioprine ไม่ว่าจะใช้ยา antithymocyte globulin หรือไม่ก็ตาม[3,4] โดยขนาดที่ใช้คือ 2 หรือ 3 กรัมต่อวัน วันละ 2 เวลาแต่เนื่องจากในขนาด 3 กรัมต่อวันไม่ได้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น มีแต่ฤทธิ์ข้างเคียงที่มากขึ้น จึงแนะนำให้ใช้ยานี้ในขนาด 2 กรัมต่อวัน

1.2 การวิเคราะห์ยา MMF

ในปัจจุบันการวิเคราะห์ยา MMF และอนุพันธ์อันได้แก่ MPA และ MPA glucuronide (MPAG) ในพลาสมา ปัสสาวะ[8]และน้ำดี ใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้รังสีอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรในการตรวจวัด สำหรับ MPA และ MPAG[9] นั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.100-40.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 4.00-400 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร intra และ inter assay น้อยกว่าร้อยละ 5

MPA และ MPAG ในพลาสมาสามารถคงสภาพอยู่ได้อย่างน้อย 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 1-4 องศาเซลเซียส และนาน 11 เดือนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสก่อนจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับ MMF ในพลาสมานั้นสามารถวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 0.400-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร intra และ inter assay น้อยกว่าร้อยละ 5 เช่นกัน MMF ในเลือดและในพลาสมาจะสลายไปตามอุณหภูมิคือ ประมาณร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิห้องเมื่อเวลาผ่านไป 2.0 และ 3.2 ชั่วโมงตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 1-4 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไป 7.6 และ 6.8 ชั่วโมงตามลำดับ ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเมื่อผ่านไป 6 วัน และจะคงสภาพได้อย่างน้อย 4 เดือนที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ฉะนั้นหากจะวิเคราะห์ MMF จะต้องเก็บพลาสมาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสทันทีและทำการวิเคราะห์ในระยะเวลาดังกล่าว

1.3 Metabolism

มี 2 การศึกษาที่เกี่ยวกับการดูดซึม การกระจาย metabolism และการขจัดออกจากร่างกาย ภายหลังได้ทาน ^{14}C-lebelled MMF โดยการศึกษาแรกใช้สารคาร์บอนกัมมันตรังสี lebelled

ที่ส่วนของ MPA อีกการศึกษา lebelled ที่ส่วนของ morpholino ซึ่งแต่ละส่วนมีคุณลักษณะแตกต่างกันแต่ละการศึกษา อาสาสมัคร 4 รายได้ทานยาดังกล่าวในรูปสารละลายขนาด 1 กรัมหลังจากอดอาหารมาก่อนหน้านี้ โดยจะได้รับ ^{14}C ปริมาณ 74 และ 100 μci จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และอุจจาระ เป็นระยะในเวลา 7 วันหลังทานยาและทำการวัดด้วย liquid scintillation counting และ morpholine-^{14}C MMF วัดด้วยวิธี HPLC ต่างหาก

พบว่าหลังทานยา mycophenolate-^{14}C MMF ยาจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว ระดับความเข้มข้นสูงสุดในเวลาเฉลี่ย 45 นาที (Tmax) และค่าครึ่งชีวิต (half life, T_{1_2}) เฉลี่ย 17.6 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับ 16.0 และ 17.0 ชั่วโมงของ MPA และ MPAG ตามลำดับ ค่าพื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นและเวลา 0-24 ชั่วโมงของ MPA และ MPAG เฉลี่ยร้อยละ 17 และ 76 ของสารกัมมันตรังสีทั้งหมดตามลำดับ ค่าสัดส่วนความเข้มข้น blood-to-plasma total radioactivity ค่อนข้างคงที่เฉลี่ย 0.59 บ่งว่ามีการกระจายของ MPA และ MPAG เพียงเล็กน้อยในส่วนของเซลล์เม็ดเลือด สามารถตรวจ recovered radioactivity ร้อยละ 90.4 ภายหลัง 72 ชั่วโมงหลังได้รับสารกัมมันตรังสีโดยอยู่ในปัสสาวะร้อยละ 96.3 ซึ่งร้อยละ 55.7 ตรวจพบภายใน 12 ชั่วโมงภายหลังทานยาซึ่งเกือบทั้งหมดอยู่ในรูป MPAG มี MPA เพียงเล็กน้อย(เฉลี่ยร้อยละ 0.6)และ acyl glucuronide conjugate of MPA เฉลี่ยร้อยละ 0.3 มีเพียงร้อยละ 5 ของสารกัมมันตรังสีทั้งหมดที่ตรวจพบในอุจจาระ

พบว่าหลังทานยา morpholine-^{14}C MPA ยาจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วมีระดับความเข้มข้นสูงสุด(Cmax) ในเวลาเฉลี่ย 53 นาที และค่าครึ่งชีวิต (half life, T_{1_2}) เฉลี่ย 4.34 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารกัมมันตรังสีในเลือดน้อยว่าในพลาสมาเพียงเล็กน้อย การตรวจพลาสมาที่เก็บระหว่าง 0.25-6 ชั่วโมงด้วย HPLC บ่งว่ามีอนุพันธ์อยู่ 4 ชนิด 3 ชนิดแรกคือ 1.) N-(2-carboxymethyl)-morpholine(CMM), 2.) N-(2-hydroxyethyl)-morpholine(HEM) และ 3.) N-oxide ของ HEM (HEMNO) ร้อยละ 76 2.9 และ 10 ของ AUC_{0-6} ตามลำดับ ชนิดที่4 ยังไม่ทราบองค์ประกอบซึ่งมีอยู่ร้อยละ 2.7 การขจัดทิ้งของสารกัมมันตรังสีเกือบทั้งหมดออกทางปัสสาวะโดยร้อยละ 77.2 ขจัดออกภายใน 12 ชั่วโมง ร้อยละ 92.1 ขจัดออกภายใน 24 ชั่วโมงและร้อยละ 94.4 ขจัดออกภายใน 168 ชั่วโมงหลังทานยา มีเพียงร้อยละ 1 ที่ขจัดทางอุจจาระ พบว่า CMM เป็นอนุพันธ์ที่พบมากที่สุดในปัสสาวะ(ร้อยละ 80.8 ภายใน 24 ชั่วโมง) พร้อมๆกับอนุพันธ์อื่นอีก 4 ชนิด 3 ชนิดเหมือนในพลาสมา(HEM, HEMNO, unidentified metabolite) อีก 1 ชนิดที่เหลือ ไม่ทราบองค์ประกอบ

โดยสรุปแล้ว MMF ถูกดูดซึมเกือบร้อยละ 100 และเปลี่ยนไปในรูป de-esterified อย่างรวดเร็วในอาสาสมัครที่อดอาหารมา MPA เกือบทั้งหมดเปลี่ยนไปเป็น MPAG ซึ่งขับออกทางปัสสาวะ

1.4 Protein binding

ใน pooled-plasma หรือ ซีรั่มอัลบูมิน 4.4 กรัมต่อเดซิลิตรมี free fraction ของ MPA อยู่ 1.25 $\pm$ 0.08% (mean $\pm$ standard deviation, SD) ในช่วงความเข้มข้นของ MPA ระหว่าง 1-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าในช่วงการรักษาการจับกับอัลบูมินจะไม่เปลี่ยนแปลง หากซีรั่มอัลบูมินลดลงร้อยละ 53.3 ถึง 0.92 free fraction จะเพิ่มขึ้น 0.7-69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MPA ไม่จับกับ α_1-acid glycoprotein การจับกับซีรั่มอัลบูมินนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงถ้าได้รับยา warfarin, digoxin, phenytoin, cyclosporine และ tracolimus หรือ prednisolone ในระดับความเข้มข้นในพลาสมาช่วงการรักษา(normal therapeutic plasma concentration) แต่จะเพิ่ม free fraction ของ MPA 6-8 เท่า หากความเข้มข้นของ sodium salicylate เพิ่มขึ้นไม่มาก นอกจากนี้ในภาวะไตวาย ระดับจะ MPAG เพิ่มขึ้นและหากระดับถึง 475 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะทำให้ free fraction ของ MPA เพิ่มขึ้นจากเดิม 3 เท่าตัว

นอกจากนี้ ในคน free fraction ของ MPA ยังขึ้นกับการขจัดเป็นแบบ restrictive หรือ non restrictive ซึ่ง clearance จากตับประมาณ 24 ลิตรต่อชั่วโมงในอาสาสมัครปรกติที่ได้ cholestyramine MPA เองอาจจะแทนที่ยาอื่นๆได้ แต่พบว่าแม้ระดับ MPA สูงถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็มีผลเพียงเล็กน้อยต่อ warfarin, digoxin, propanolol, phenytoin และ theophylline ในผู้ป่วย moderate to severe compensated hepatic cirrhosis มี free fraction เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.80 ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับพลาสมาปรกติ[10]

MPAG จับกับ human plasma ประมาณร้อยละ 82 ในระดับอัลบูมินปรกติ หากระดับ MPAG สูงขึ้นด้วยเหตุใดๆ free fraction ของ MPAG ก็จะสูงขึ้นตาม

โดยสรุปในเลือด MPA ร้อยละ 99.99 อยู่ในพลาสมา มีเพียงร้อยละ 0.01 ที่อยู่ในเซลล์ อาศัยข้อมูลจากการศึกษา ^{14}C MPA ADME

1.5 Pharmacokinetics in renal transplant patients

ในช่วงระยะหลังผ่าตัดเนื่องจากมีการทำงานของไตยังไม่ดี ระบบทางเดินอาหารทำงานไม่ดี รวมทั้งน้ำหนักเริ่มลดลง plasma protein มากขึ้น ทำให้ pharmacokinetics ของ MMF ดีขึ้นด้วย

ความเสี่ยงต่อ renal allograft rejection ในช่วงแรกหลังเปลี่ยนไตมากที่สุดที่ 3 เดือน ในช่วงนี้เองเป็นการยากที่จะทำการหา pharmacokinetics ของMMF ในแบบ single dose การเปรียบเทียบผลดังกล่าวอาศัย Cmax, Tmax และ AUC_{0-12} ฉะนั้นค่าครึ่งชีวิตจึงไม่สามารถหาได้ด้วยในช่วงแรก จะใช้ค่า Cmax และ AUC0-12 ในการเปรียบเทียบในระยะเวลาต่างๆหลังปลูกถ่ายไต

1.5.1 First dose pharmacokinetics in patients and healthy individuals

ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า first dose pharmacokinetics parameters ของ MPA และ MPAG ในเวลาต่างๆหลังการปลูกถ่ายไต

ตาราง 1 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) สำหรับการทานยา MMF ครั้งแรกของผู้ป่วยปลูกถ่ายไตกับอาสาสมัครปรกติ[11]
12

Group[a]	Day 1 RT patients	Day 1 RT patients	Day 1 RT patients	Day 1 RT combined	Late RT patients	Healthy volunteers
BID dose(g)	1.0	1.5	1.75	1.5	1.5	1.5[b]
N	6	5	6	47	10	36
Mycophenolic acid parameters						
Cmax(μg/ml)	2.6 ± 2.5	5.1 ± 6.2	3.2 ± 3.5	6.6 ± 6.6	29.7 ± 14.2	32.8 ± 8.2
Tmax(h)	6.1 ± 4.8	9.6 ± 3.6	4.8 ± 4.3	4.5 ± 5.4	1.2 ± 0.8	0.90 ± 0.4
AUC0-12(μg•h/ml)	12.3[c] ± 5.8	19.5[c] ± 13.9	18.8[c] ± 9.45	21.4 ± 17.5	52.1 ± 17.7	51.5[b] ± 15.1
Mycophenolic glucuronide parameters						
Cmax(μg/ml)	NR	NR	NR	32.9 ± 17.4	59.8 ± 19.7	43.3 ± 13.1
Tmax(h)	NR	NR	NR	8.65 ± 6.8	2.8 ± 0.8	1.7 ± 0.5
AUC0-12(μg•h/ml)	NR	NR	NR	220 ± 140	420 ± 140	234[b] ± 87

a Day 1 patients are on the first day post-transplant; late patients were at least 3 months post-transplant. The combined group on day 1 consists of all patients with renal transplants who received bid 1.5g, and includes the 5 patients in the table from the reported study.

b Healthy volunteers given single dose and truncated AUC0-12 is shown for comparison.

c Reported values halved, see text

Abbreviations: AUC0-12 = area under the concentration-time curve at 12 hours; BID = twice daily doses; Cmax = maximal concentration; NR = not reported; RT = renal transplant; Tmax = time to reach the maximal drug concentration.

ในช่วงแรกๆนั้นการศึกษาทำในผู้ป่วยที่ทานยา MMF 1 ครั้งต่อวันฉะนั้นเมื่อจะนำมาเปรียบเทียบจำเป็นต้องคูณ 2 ในค่าของความเข้มข้น

Day 1 combined group คือผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้งหมดที่ได้รับ MMF ขนาด 1.5 กรัมวันละ 2 ครั้ง และ 5 คนจากการศึกษาก่อน late post transplant data คือกลุ่มที่ปลูกถ่ายไตแล้วอย่างน้อย 3 เดือนโดยทั้งหมดมีซีรั่มครีอะตินินน้อยกว่า 2.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับ hemoglobin มากกว่า 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ทุกคนได้รับยา cyclosporine[13]

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม late renal transplant patients กับ healthy volunteers แล้วพบว่า เภสัชจลนศาสตร์เหมือนๆกันเว้นแต่ค่า MPAG AUC0-12 ที่กลุ่ม renal transplant patients จะมีค่ามากกว่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในกลุ่มที่มีการทำงานของ graft ดี เภสัชจลนศาสตร์ก็เกือบจะเหมือนคนปรกติ ซึ่ง MPAG ที่มากขึ้นแสดงถึงหารทำงานของไตที่ด้อยกว่าเล็กน้อยในการขจัด MPAG

เปรียบเทียบเภสัชจลนศาสตร์ของ MPA ใน late และ Day 1 renal transplant patients เห็นว่า Cmax, AUC0-12 ต่ำกว่าและ Tmax นานกว่าในกลุ่ม Day 1 patients Tmax ของ MPAG ก็นานกว่าเช่นกัน แม้ว่า Cmax, MPAG AUC0-12 จะกระทบไม่มากเหมือน MPA parameters ก็ตาม ค่า Tmax ที่นาน ก็บ่งว่าการดูดซึมที่ช้าในกลุ่มนี้

1.5.2 Sing e dose pharmacokinetics in patients

การศึกษา 3-period randomized crossover[14] ดู interaction ระหว่าง MMF กับ ganciclovir โดยใช้ MMF ขนาด 1.5 กรัมในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตชาย 12 คน โดยทุกคนผ่าตัดมาอย่างน้อย 3 เดือน พบว่า Cmax เฉลี่ย 30.9 $\pm$ 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Tmax เฉลี่ย 0.9 $\pm$ 0.3 ชั่วโมง และ AUC_{∞} เฉลี่ย 80.3 $\pm$ 16.4 ไมโครกรัมชั่วโมงต่อมิลลิลิตร ซึ่งก็ใกล้เคียงกับค่าในอาสาสมัครที่ทาน MMF 1.5 กรัมเช่นกัน แต่ MPAG ค่อนข้างขึ้นกับ renal glomerular filtration rate (GFR) ทำให้ parameters ของ MPAG แตกต่างจากในคนปรกติ

1.5.3 Multiple dose pharmacokinetics in patients

เภสัชจลนศาสตร์ของผู้ป่วยที่ทาน MMF อยู่ตลอด 2 ครั้งต่อวันนั้น แสดงในตารางที่ 3 late set แสดงถึงผู้ป่วย Caucasian ที่ปลูกถ่ายไตมาอย่างน้อย 3 เดือน มีการทำงานของไตคงที่ และได้รับ MMF 1.5 กรัมวันละ 2 ครั้งอย่างน้อย 2 สัปดาห์ 3-week posttransplant set มาจากการศึกษาผู้ป่วยญี่ปุ่น ที่ 3 สัปดาห์ Cmax, MPA AUC0-12 เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ในการศึกษาหนึ่ง[12]พบว่า เมื่อปลูกถ่ายไตไปนาน 20 วันแล้ว ค่า parameters ต่างๆยังคงต่ำคิดเป็นร้อยละ 50 ของ late patient group ในการศึกษาอื่นเมื่อเทียบกันแล้วค่า MPA AUC0-12 ของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นมีค่ามากกว่าของชาวผิวขาว

ตารางที่ 2 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) สำหรับการทานยา MMF วันละ 2 ครั้งของผู้ป่วยปลูกถ่ายไต[12 15]

Time from transplant	Day 20	Day 20	Day 20	3 weeks	3 weeks	Late[a]
BID dose(g)	1.0	1.5	1.75	1.0	1.5	1.5
N	6	5	6	6	8	13
Mycophenolic acid parameters						
Cmax(μg/ml)	8.2 ± 3.6	13.0 ± 8.4	18.7 ± 12.2	12.0 ± 4.9	13.9 ± 8.3	23.2 ± 11.9
Tmax(h)	1.6 ± 1.3	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.8	2.1 ± 1.5	2.25 ± 1.2	0.9 ± 0.2
AUC0-12(μg•h/ml)	32.7[c] ± 5.45	36.6[c] ± 5.15	59.5[c] ± 6.95	47.0 ± 15.3	60.3 ± 25.3	61.3[b] ± 28.7
Mycophenolic glucuronide parameters						
Cmax(μg/ml)	NR	NR	NR	90.2 ± 34.4	116 ± 43.1	111 ± 26.5
Tmax(h)	NR	NR	NR	4.0 ± 1.3	4.8 ± 1.8	3.0 ± 1.2
AUC0-12(μg•h/ml)	NR	NR	NR	820 ± 400	1000 ± 450	1040 ± 290

a Late patients were at least 3 months post-transplant.

b AUC0-12 over the interdosage interval.

c Reported values halved, see text

Abbreviations: AUC0-12 = area under the concentration-time curve at 12 hours; BID = twice daily doses; Cmax = maximal concentration; NR = not reported; RT = renal transplant; Tmax = time to reach the maximal drug concentration.

โดยรวมแล้วค่า MPA AUC0-12 ในช่วงแรกของการปลูกถ่ายไตมีค่าประมาณร้อยละ 30-50 ของค่าที่ได้ในช่วงหลังปลูกถ่ายไปนานมากกว่า 3 เดือนเมื่อให้ขนาดยาเท่าเดิม ปรากฏการณ์นี้มีหลายๆปัจจัยมาเกี่ยวข้อง ไม่เพียงแต่เรื่องการดูดซึมจากทางเดินอาหาร เพราะแม้แต่ยาฉีดเข้าเส้นเลือดเองก็ยังเกิดปรากฏการณ์นี้เช่นกัน ระดับของอัลบูมินที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น 1 ใน 3 ในผู้ป่วยส่วนใหญ่

เป็นที่น่าสังเกตุว่าการเกิด acute rejection นั้น อยู่ในช่วงนี้เช่นกันซึ่งพบว่า total plasma MPA concentration สัมพันธ์กับผลของการปลูกถ่ายอวัยวะ[16] แม้ว่า free MPA จะเป็นส่วนที่ active ก็ตาม[17]

จากข้อมูล combined dose-normalised pharmacokinetic นั้น พบว่าเพศไม่มีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ MPA และ MPAG เชื้อชาติอาจจะมีผลแต่น่าจะเป็นเพราะเรื่องน้ำหนักมาเกี่ยวของชางผิวขาวมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าชาวเอเชียทำให้ค่า AUC และ Cmax มีค่ามากกว่า แต่ผลนี้จะไม่เกิดในคนปรกติทั่วๆไป ในทางคลินิกการใช้ยาตามน้ำหนักตัวไม่ได้ผลที่ดีไปกว่าการใช้ยาขนาดเดียวกับทุกๆคน[16]

1.6 Enterohepatic recirculation following administration[8 10 13]

พลาสมา MPAG มี secondary peak ไม่ว่าจะทานหรือฉีดโดยมีความสัมพันธ์กับค่า Cmax เหมือนๆกับค่า MPA การศึกษาในหนูหลายชิ้นพบว่า หลังจากให้หนูกิน 14C MMF และใส่สายในท่อทางเดินน้ำดีและท่อทางเดินปัสสาวะ พบว่ามี recovery ภายใน 24 ชั่วโมงร้อยละ 77 และ 21 ตามลำดับ โดยระดับของ MPA ลดลงอย่างรวดเร็ว

ประมาณกันว่า AUC ที่ขับทางน้ำดีน้อยกว่า 1 ใน 3 ส่วน นอกจากนี้ในหนูทดลองพบว่าสารกัมมันตรังสีของยายังถูกดูดซึมกลับทางลำไส้อีกด้วยซึ่งแสดงให้เห็นว่ามี enterohepatic recycling ในเภสัชจลนศาสตร์ของ MMF

การศึกษาในช่วงแรกๆเกี่ยวกับ MMF เพื่อป้องกันการเกิด rejection ในผู้ป่วยปลูกถ่ายตับเองพบว่าผู้ป่วย 17 รายที่ได้รับ MMF ในขนาด 1.75-2.5 กรัมต่อวันจากนั้นวัดระดับ MPAG ในน้ำดีจากสาย choledochocholedochostomy และ nasogastric tube พบค่าเฉลี่ยร้อยละ 18 (ช่วง 16.5-26.0)ของยาที่ให้และน้อยกว่าร้อยละ 1 ที่ขับออกในรูปของ MPA

ในการศึกษา crossover โดยใช้อาสาสมัครในระหว่างการให้ cholestyramine (ก่อน 24 , 1 ชม. และหลังได้ MMF 3 วัน) โดยให้ MMF ในขนาด 1.5 กรัม พบว่า cholestyramine รบกวนระดับ MPA อย่างมาก MPA AUC72 ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 37(10-61) จากที่ควรจะเป็นและระดับ

MPAG เพิ่มขึ้นเมื่อลดขนาด cholestyramine ลงแต่ค่า Cmax ยังคงเท่าๆเดิมแสดงว่า cholestyramine ไม่ได้กวนการดูดซึมในช่วงแรกแต่รบกวนในส่วน enterohepatic recycling การดูดซึมในลำไส้อาศัยขบวนการ deglucuronidation โดย gut flora ในส่วนของลำไส้ใหญ่ ฉะนั้นโรคในลำไส้ใหญ่ หรืออุจจาระร่วงรุนแรงหรือแม้แต่ drug interaction ในบริเวณนี้ก็ก่อกวนต่อเภสัชจลนศาสตร์เช่นกัน

1.7 Pharmacokinetic interactions with MMF

ตั้งแต่ MMF ถูกเปลี่ยนเป็น MPA และ MPAG ด้วย plasma esterases และ glucuronidation ฉะนั้นยาหรือ metabolites ที่ผ่านทาง cytochrome P450 ก็น่าจะมีผลต่อเภสัชจลน์ศาสตร์ในส่วนนี้เช่นกันแต่ในทางคลินิกไม่ได้เป็นเช่นนั้นกลไกการเกิด interaction มักเกี่ยวกับ enterohepatic recycling และ renal tubular competition with MPAG

ตัวอย่างของ enterohepatic recycling เช่น cholestyramine หรือ bile acid sequestratants อื่นๆ ยาปฏิชีวนะที่ฆ่า gut flora โดยเฉพาะ gram-negative anaerobes ซึ่งจำเป็นในขบวนการ deglucuronidation เพื่อดูด MPA กลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง

ตัวอย่างของ renal tubular competition with MPAG โดยรวม MPA ไม่ได้ลดลง แต่ยาอื่นๆอาจมีระดับเพิ่มขึ้นได้ โดยเฉพาะระดับMPAG ที่สูงๆ ซึ่ง interaction ต่างๆรวบรวมไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของ concomitant drug medication ต่อค่าเภสัชจนศาสตร์ต่างๆของยา MMF ชนิดรับประทาน[11 14 18]

Drug medication	N	Study design	MPA plasma PK	MPAG plasma PK	Drug plasma PK
Aluminium/magnesium Hydroxide(Maalox®) 10 ml qid orally	10	Crossover study in patients with RA using an oral SD of 2g	Cmax ↓ 37% AUC ↓ 15 %	Cmax ↓ 26% AUC ↓ 11 %	NA
Cotrimoxazole 800 mg/160 mg SD orally	12	Crossover study in healthy individuals using an SD of 1.5g	Cmax ↔ AUC ↓ 7%	Cmax ↔ AUC ↔	ND
Aciclovir 800 mg SD orally	12	Crossover study in healthy individuals using an SD of 1g	Cmax ↔ AUC ↑ 9%	Cmax ↔ AUC ↑ 10 %	Cmax ↑ 18% AUC ↑ 18%
Cyclosporine SS orally	10	Sequential study in patients with RT using 1.5g	ND	ND	Cmax ↔ AUC ↔
Ganciclovir 5 mg/kg IV infusion	12	Crossover study in patients with RT using 1.5g	Cmax ↓10% AUC ↔	Cmax ↔ AUC ↔	Cmax ↔ AUC ↔

ตารางที่ 3 (ต่อ) ผลของ concomitant drug medication ต่อค่าเภสัชจนศาสตร์ต่างๆของยา MMF ชนิดรับประทาน[11 14 18]

Oral contraceptive SD	18	Crossover study in healthy women using a SD of 1g	Cmax ↓ 9% AUC ↔	Cmax ↑ 7% AUC ↔	EE: Cmax ↑ 14% EE:AUC ↔ NET: Cmax ↑ 10% NET: AUC ↑ 8%	12
Cholestyramine 4g tid orally	12	Crossover study in healthy individuals using a SD of 1.5g	Cmax ↓ 6% AUC ↓ 39%	Cmax ↔ AUC ↓ 34%	NA	12

a. Cotrimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole) twice daily for 7 days.

b. (Sandimmune®) dose at steady state was 275-450 mg/day on a bid schedule; mean trough blood cyclosporine concentration at steady state was~150 μg/L.

c. Two tablets of Ortho Novum® [norethindrone 1 mg (NET) and ethinyl estradiol 35 mg (EE)].

Abbreviations and symbol: bid = twice daily; IV = intravenous administration; MPA = mycophenolic acid; MPAG mycophenolic glucuronide; n = numberof participants; NA = not applicable; ND = not done; pk = pharmacokinetic; PO = orally; qid = 4 times daily; RA = rheumatoid arthritis; RT = renal transplant; SD = single dose; SS = steady-state; ↔ indicates effect was less than ± 5%; ↑ indicates effect was an increase; ↓ indicates effect was a decrease.

1.7.1 ผลของอาหาร

การทานอาหารซึ่งมีปริมาณไขมันร้อยละ 46.5 พบว่า เมื่อได้รับยาขนาด 2 กรัม ดังกล่าวทานอาหารหรืออดอาหารไม่ได้เปลี่ยนแปลง MPA AUC เลย เพียงแต่ Tmax เพิ่มขึ้นจาก 1.0 ชม.เป็น 2.0 ชม.แทนและค่าเฉลี่ย Cmax ลดลงร้อยละ 24.6 ทั้งนี้เป็นผลมาจาก delay gastric emptying time ระดับ MPAG AUC24 และ Cmax เพิ่มขึ้น ร้อยละ 29.8 และ 14.1 ตามลำดับ แสดงว่าการรับประทานอาหารมีผลต่อ glucuronidation อย่างไรก็ตามอาหารไม่ได้กวน MPA AUC แต่อย่างใด จึงสามารถทานยานี้พร้อมอาหารได้

1.7.2 ผลของ concomitant antacids

การได้รับ Maalox 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี aluminium hydroxide 1200 มิลลิกรัม magnesium hydroxide 600 มิลลิกรัม โดยแบ่งให้ 4 ครั้งทุก 4 ชม.ในวันก่อนได้รับยา MMF 2 กรัม จากนั้นได้ Maalox อีก 3 doses ห่างกันทุก 4 ชม.พบว่า AUC24 เฉลี่ยและ Cmax ของ MPA ลดลงร้อยละ 16.8 และ 37.7 ตามลำดับในขณะที่ Tmax ยังคงเหมือนเดิม MPAG ก็เช่นกันกับ MPA[18]

การที่ MPAG กับ MPA ลดลงพอๆกันเพราะเนื่องจาก reabsorption ระดับพลาสมา MPA ลดลงทั้ง initial และ secondary peaks บ่งว่ามีทั้งการลดลงของ absorption และ reabsorption จาก enterohepatic recycling การทาน MMF ร่วมกับ antacids ลดประสิทธิภาพของ MMF เอง

1.7.3 Drug interactions

นอกจาก cholestyramine แล้วยังมียาอื่นๆอีกที่ทำการศึกษาถึงผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา อาทิ cyclosporine, a combination oral contraceptive, cotrimoxazole(trimethoprim-sulfamethoxazole), aciclovir และ ganciclovir ซึ่ง aciclovir และ ganciclovir ศึกษาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตนอกนั้นศึกษาในอาสาสมัครปรกติทั้งสิ้น

single dose ทั้ง 1หรือ 2 กรัมของ MMF ร่วมกับ concomitant drugs ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเภสัชจลนศาสตร์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ใน aciclovir มีพลาสมา MPAG AUC24 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (เฉลี่ยร้อยละ 10) และ aciclovir (เฉลี่ยร้อยละ 18) ซึ่งเกิดจากมี competition กันใน renal tubular secretion ใน ganciclovir MMF ลด renal clearance

เฉลี่ยร้อยละ 12 โดยไม่มีการศึกษาไหนจำเป็นต้องปรับขนาดยา MMF หรือ concomitant medicationลง

การศึกษาต่างๆไม่ได้ขจัดปัจจัย pharmacodynamic interactions เพราะจำกัดด้วยการศึกษา single dose ในอาสาสมัครปรกติ เว้นแต่ ganciclovir[14] และ cyclosporine ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

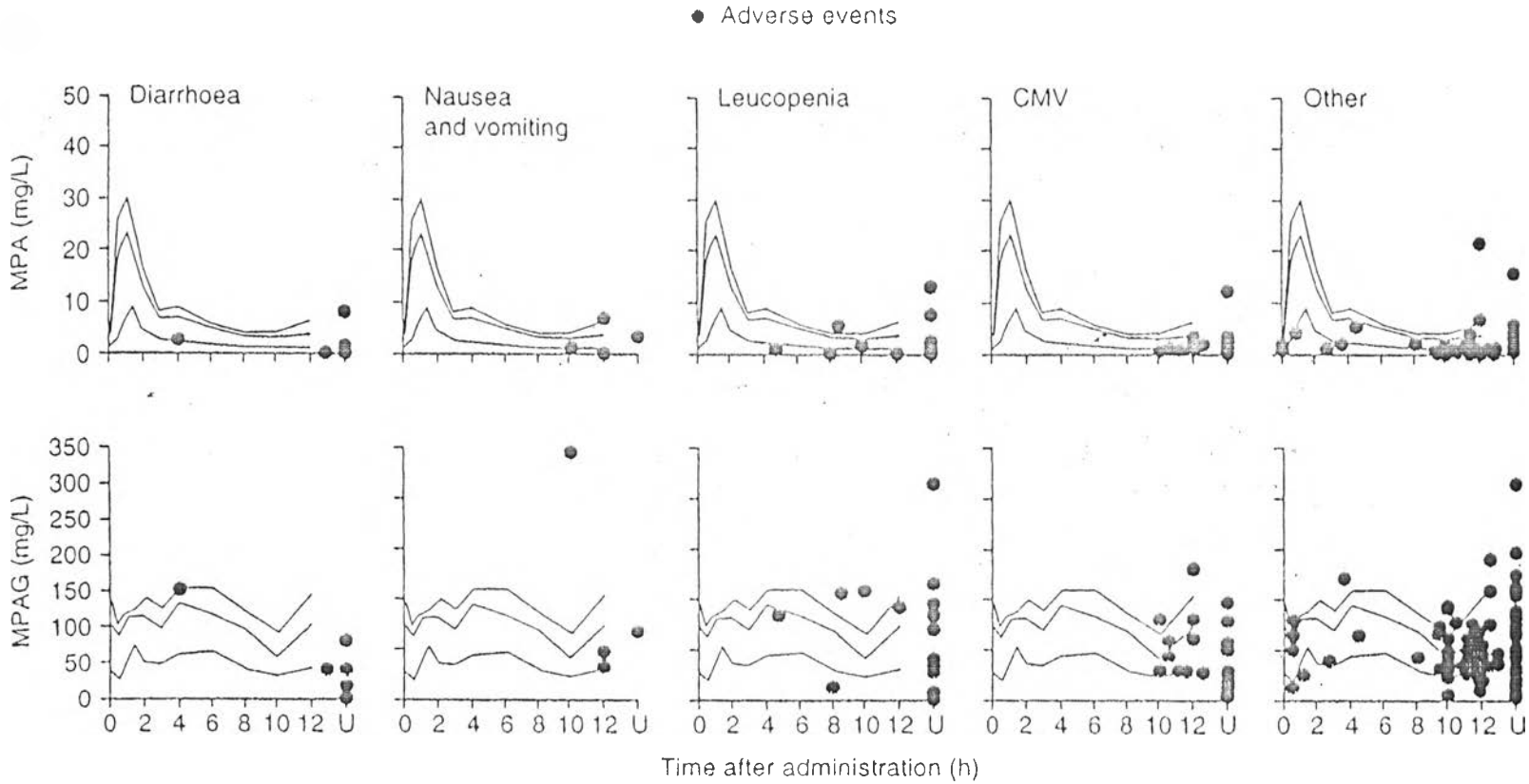
1.8 ความสัมพันธ์ทางคลินิกระหว่าง pharmacokinetics และ pharmacodynamics

1.8.1 ความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมา MPA และฤทธิ์ข้างเคียง

ใน double blind large scale clinical study[2-4] เมื่อเกิดฤทธิ์ข้างเคียงขึ้นก็จะเก็บตัวอย่างเลือดมาวิเคราะห์ระดับ MPA และ MPAG ซึ่งใช้เป็นค่าเปรียบกับผู้ป่วยปลูกถ่ายไตในระดับที่ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

การศึกษาหลายชิ้นที่เกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ทำในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่การทำงานของไตอยู่ในระดับคงที่แล้วและข้อมูลอยู่ในลักษณะ MPA และ MPAG 0-12 ชม. โดยพวก delayed graft function (DGF) ได้ถูกตัดออกไป ข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้สร้าง percentile distributions ของ ระดับ MPA และ MPAG ได้เป็นอย่างดี

ระดับพลาสมา MPA และ MPAG ระหว่างเกิดฤทธิ์ข้างเคียง(ไม่ว่า อุจจาระร่วง คลื่นไส้ อาเจียน เม็ดเลือดขาวต่ำ การติดเชื้อ cytomegalovirus (CMV) ที่อวัยวะต่างๆ) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ percentile distribution แล้วพบว่าระดับ MPA หรือ MPAG ไม่สัมพันธ์กับ percentile distribution ที่สูงแต่อย่างใด ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MPA และ MPAG กับฤทธิ์ข้างเคียงที่รุนแรงในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ทานยา MMF วันละ 2 ครั้ง แต่ละกราฟเส้นต่อเนื่องแสดงถึงระดับ percentile ที่ 50, 90 และ 95 ตามลำดับเพื่อเป็นกลุ่มอ้างอิงที่ไม่มี delayed graft function และ ฤทธิ์ข้างเคียง จุดต่างๆแสดงถึงค่าความเข้มข้นของผู้ป่วยขณะเกิดฤทธิ์ข้างเคียง

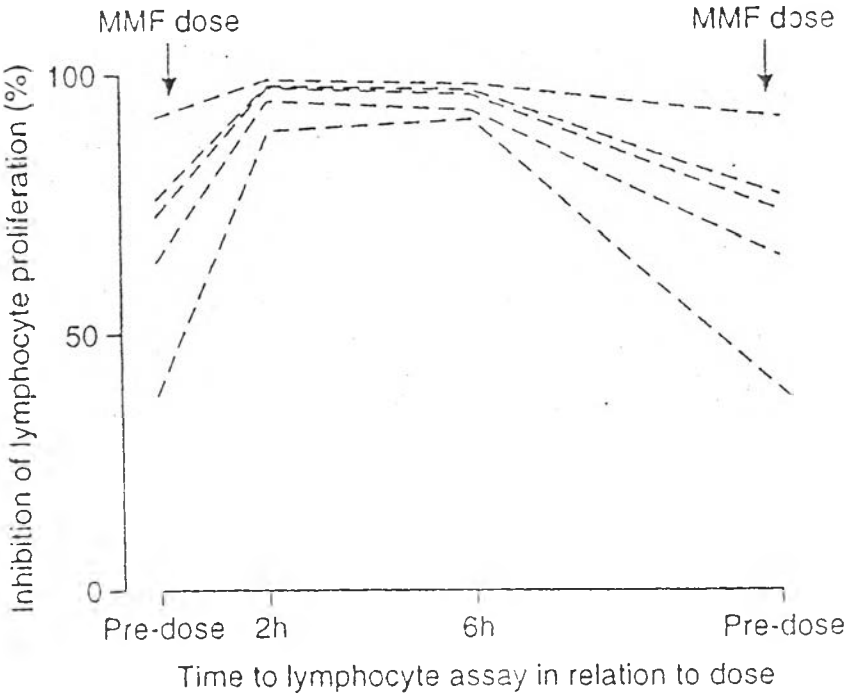
1.8.2 **ความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมา MPA กับฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน**(correlations of MPA concentration with immunosuppressive effects)

ในหลอดทดลองระดับ MPA แสดงความสัมพันธ์กับการกด IMPDH เป็น classical sigmoidal เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของ lymphocytes[19] ทั้ง T และ B-cells ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย mitogen ใน human peripheral blood และ mixed lymphocyte reaction(MLR) ระดับของ free MPA concentration ที่ยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC50) อยู่ในช่วง 20 – 100 นาโนโมลลาต่อ ลิตร(ประมาณ 0.3 – 1.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การยับยั้งอย่างสมบูรณ์เกิดโดย free MPA เข้มข้นประมาณ 1 มิลลิโมลลาต่อลิตร

จากผลการตอบสนองต่อการยับยั้งภูมิต้านทานใน lymphocyte transformation [17]พบว่า free concentration ของ MPA ให้ผลมากกว่า MPA ในพลาสมาทั้งหมด(free fraction กับ protein-bound) อย่างไรก็ตาม free fraction ก็ยังคงมีสัดส่วนคงที่กับค่า MPA ทั้งหมด ฉะนั้นการใช้ค่า MPA ทั้งหมดก็สามารถเป็นตัวแทนของ free fraction ได้เช่นกัน

ในการศึกษาแรกๆ[12]เพื่อหาช่วงขนาดยานั้นได้เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ได้รับ MMF ใน interdosage และใช้ in vitro mitogen lymphocyte transformation assays[19] เหมือนกัน โดยการยับยั้งคิดเป็นร้อยละเทียบกับก่อนได้ยาและหลังได้ยา 2 และ 6 ชม. ในผู้ป่วย 5 รายดังรูปที่ 4 ค่าต่างๆที่ได้มาขึ้นกับสภาพต่างๆในการตรวจโดยเฉพาะการเจือจางตัวอย่างซึ่งไม่สามารถเป็นตัวแทนของค่าที่ได้ในคนจริงๆได้ รูปแสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามขนาด MMF ที่เพิ่มขึ้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงการกด phytohaemagglutinin(PHA)-induced lymphocyte proliferationโดยเก็บพลาสมาตัวอย่างในวันที่ 20 หลังการปลูกถ่ายไตโดยได้รับยา cyclosporine, corticosteroids และ MMF วันละ 2 ครั้ง ตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลาก่อนทานยาและหลังนาน 2 และ 6 ชั่วโมง

1.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเภสัชจลนศาสตร์กับประสิทธิภาพทางคลินิก (Correlations of plasma MPA pharmacokinetic parameters with clinical effectiveness)

ความสัมพันธ์ pharmacokinetic กับ pharmocodynamic ไม่ตรงไปตรงมาเช่นเดียวกับ mitogen-stimulated antiproliferative effect on lymphocytes in vitro ไป clinical acute rejection[19] ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 20-45 ไม่มีอาการต้านไตทางคลินิกแม้ได้ยาเพียง cyclosporine และ steroids การวินิจฉัย acute rejection อาศัย criteria และเทคนิคพอสมควร เนื่องจาก lymphocyte มีส่วนสำคัญใน acute rejection ฉะนั้นการได้รับ MPA ก็น่าจะมีประสิทธิผลทางคลินิกเช่นกัน

จากการใช้ logistic regression พบว่า AUC0-12 มีความสัมพันธ์กับการเกิด acute rejection ค่า Cmax ก็เช่นกันแต่ค่านี้ก็เป็นส่วนหนึ่งของ AUC0-12 หากต้องการลด rejection ลงร้อยละ 50 ค่า AUC0-12 ควรอยู่ประมาณ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งขนาดที่ทานประมาณ 1 กรัม 2 ครั้งต่อวันในการปลูกถ่ายไตระยะแรก หากต้องการลด

rejection ลงร้อยละ 90 ค่า AUC0-12 ควรอยู่ประมาณ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งขนาดที่ทานประมาณ 1.5-1.75 กรัม 2 ครั้งต่อวัน ตามตารางที่ 3

ทั้งนี้ข้อมูลทั้งหมดนี้เป็นค่าประมาณว่าสามารถกด rejection ได้ การศึกษาหา intent-to-treat ซึ่งรวมผู้ที่ถอนตัวจากฤทธิ์ข้างเคียงข้างเคียงของยาบ่งว่า ขนาดยา 2 กรัมต่อวันก็เพียงพอ

1.8.4 Therapeutic drug monitoring

จากข้อมูลข้างต้น therapeutic drug monitoring ของพลาสมา MPA อาจมีความจำเป็นโดยเฉพาะขนาดยาน้อยๆ เนื่องจาก MMF มีค่าไม่หลากหลายระหว่างผู้ป่วย ฉะนั้นในผู้ที่ทานร่วมกับ cyclosporine และ corticosteroids ขนาดยาไม่น่าจะเกิน 2-3 กรัมต่อวัน แต่ถ้าในขนาดที่ต่ำกว่านี้หาก AUC0-12 มีค่าต่ำ ก็อาจมีความจำเป็นที่ จะเพิ่มขนาดยาขึ้น

ความสัมพันธ์ระหว่าง pharmacokinetic และ pharmacodynamic อาศัยค่า AUC0-12 เป็นหลัก ค่า C trough อาจเป็นค่าที่หาได้ง่ายกว่าแต่ก็มีความหลากหลายในแต่ละผู้ป่วยเองเพราะ enterohepatic recycling ในแต่ละคนแตกต่างกัน ในปัจจุบัน TDM ของ MPA ยังมิได้พิสูจน์ทางคลินิกว่ามีที่ใช้ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตที่ไม่มีปัญหาแต่ทั้งนี้คงต้องรอการศึกษาต่อไป ในทางปฏิบัติเราควรตรวจ MPA ในผู้ป่วย short bowel syndrome, ileostomy หรือผู้ป่วยทางเดินอาหาร

1.9 สรุป

MMF เป็น prodrug ของ MPA สามารถดูดซึมได้หมดและรวดเร็วซึ่ง de-esterification เป็น MPA โดยมี systemic availability เกือบร้อยละ 100 ถูกเปลี่ยนเป็น MPAG เกือบทั้งหมดและขับออกทางปัสสาวะ

Enterohepatic recycling เกี่ยวกับการขับ MPAG ในทางเดินน้ำดีเป็นส่วนสำคัญต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ MPA โดยเฉพาะ AUC0-12 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพทางคลินิกในการป้องกัน acute rejection ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต MPA และอนุพันธ์ของมันดูเหมือนจะมี drug interaction กับยาอื่นๆน้อยซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เองทำให้มีความหลากหลายในผู้ป่วยเองและระหว่างผู้ป่วยน้อย สามารถคาดการณ์ได้ว่าเภสัชจลนศาสตร์จะเป็นอย่างไร

2. Acute Graft Rejection

2.1 บทนำ

จากความสำเร็จในการปลูกถ่ายอวัยวะอย่างมากในปัจจุบันส่งผลให้การปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) เป็นที่ยอมรับและกระทำกันอย่างแพร่หลาย เพื่อรักษาทดแทนการทำงานของไตในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease) แม้ว่าความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน และยากดภูมิคุ้มกันจะก้าวหน้าขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน แต่ความสำเร็จของการปลูกถ่ายไตก็ยังไม่สูงเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาการต่อต้านไตที่ปลูกถ่าย (graft rejection) ซึ่งเป็นขบวนการปกติที่ร่างกายใช้กำจัดหรือต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่แฝงเข้ามา เรียกอวัยวะที่นำมาทำการปลูกถ่ายว่า graft สามารถจำแนก graft ตามความสัมพันธ์ระหว่างผู้ให้ (donor) และผู้รับ (recipient) ออกได้เป็น 4 ประเภทคือ

1) autograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นคนคนเดียวกัน เช่นการปลูกถ่ายผิวหนังบริเวณปกติ ไปยังบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ

2) syngraft (isograft) หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นคนละคนกันแต่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ จึงไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้าน graft เช่นเดียวกับ autograft ได้แก่ การปลูกถ่ายอวัยวะจากพี่น้องฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน

3) allograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นสัตว์ species เดียวกัน แต่มีลักษณะพันธุกรรมแตกต่างกัน ยิ่งต่างกันมากเท่าไร โอกาสที่จะเกิดการปฏิเสธ graft ยิ่งเพิ่มขึ้น เป็น graft ที่ทำการปลูกถ่ายมากที่สุดในปัจจุบัน

4) xenograft หมายถึง ผู้ให้และผู้รับเป็นสัตว์คนละประเภทกัน (species) กำลังมีการศึกษา xenograft transplantion มากขึ้นในปัจจุบันแต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ในบทความนี้จะใช้ graft แทนคำว่า allograft เนื่องจาก autograft และ syngraft จะไม่เกิดปฏิกิริยา graft rejection และ ยังไม่สามารถทำ xenograft transplantion ในคน

แบ่ง graft rejection โดยอาศัยระยะเวลาในการต่อต้าน graft ออกเป็น 3 ชนิด คือ

1) Hyperacute graft rejection หมายถึง การต่อต้าน graft ที่เกิดขึ้นทันทีภายในระยะเวลาอันสั้นหลังจากทำการปลูกถ่ายไต กลไกเกิดจากปฏิกิริยาแอนติบอดีย์ต่อสิ่งแปลกปลอมที่เคยรู้จัก (preformed antibodies) โดย preformed antibodies นี้จะทำปฏิกิริยากับ HLA class I และหมู่เลือด ABO ของผู้บริจาคบนเยื่อบุผนังหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (comple-ment), การอุดตันและการทำลายหลอดเลือดอย่างมาก นำมาซึ่งการสูญเสียการทำงาน

ของไตใหม่ในระยะเวลาอันสั้นจากการขาดเลือด มักพบในผู้ป่วยที่เคยผ่านการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ การตั้งครรภ์หรือการได้เลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือด ก่อนหน้าทำการปลูกถ่ายอวัยวะสามารถป้องกันภาวะ hyperacute graft rejection ได้โดยการตรวจสอบ preformed antibodies ต่อ graft ด้วยวิธี cross match ระหว่างซีรั่มของผู้ให้ กับ tlymphocyte ของผู้รับ หากพบปฏิกิริยาต่อกัน ก็ควรเปลี่ยนผู้ให้หรือผู้รับ พบปฏิกิริยาชนิดนี้น้อยมากในปัจจุบัน

2) Acute graft rejection หมายถึง การต่อต้าน graft ที่เกิดขึ้นเฉียบพลันในระยะเวลาเป็นวันถึงเดือน ส่วนใหญ่เกิดหลังจากปลูกถ่ายไต 1 สัปดาห์ กลไกเกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันผ่าน T lymphocyte เป็นหลัก ส่งผลให้เกิดการทำลาย graft ผ่านเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ macrophage โดยปฏิกิริยา delayed type hypersensitivity (DTH), B cell โดยปฏิกิริยาแอนติบอดีย์ และ cytotoxic T cell โดยปฏิกิริยา cell mediated cytotoxic ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

3) Chronic allograft rejection หมายถึง การเสื่อมหน้าที่ของ graft ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องค่อยเป็นค่อยไป ใช้ระยะเวลาหลายปีก่อนที่ไตจะสูญเสียหน้าที่จนหมด โดยเฉลี่ยเริ่มต้นหลังจากประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายอวัยวะช่วงแรก 6 เดือนถึง 1 ปี ลักษณะทางพยาธิสภาพและการดำเนินโรคเช่นเดียวกับ chronic renal failure ไม่ว่าจากสาเหตุใดก็ตาม คือพบ atherosclerotic change, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis และ tubular atrophy ยังไม่ทราบกลไกการเกิด chronic rejection ชัดเจน เชื่อว่าเกิดจากปฏิกิริยาทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ภาวะแทรกซ้อนจากความดันโลหิตสูง, ไขมันในเลือดสูง และยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ดังนั้นอาจเรียก chronic rejection ใหม่ให้ถูกต้องว่า chronic allograft nephropathy

การที่ร่างกายจะเกิดปฏิกิริยาต่อต้านหรือยอมรับ graft ได้นั้น แสดงว่าร่างกายจะต้องมีความสามารถในการแยกแยะความเป็นตัวของตนเองออกจากผู้อื่น ซึ่งต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันคือ T lymphocyte และสารประกอบเชิงซ้อนที่อยู่บนผิวของเซลล์ต่างๆ (glycoprotein) เรียกกลุ่มของ glycoprotein ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ และมีหน้าที่บอกความเป็นตนเองนี้ว่า major histocompatibility complex (MHC) ในมนุษย์เรียก MHC อีกชื่อว่า Human leukocyte antigen (HLA) ระบบ HLA นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก (polymorphism) ทำให้โอกาสที่บุคคล 2 คนจะมี HLA เหมือนกันทุกประการเป็นไปได้ยาก นอกจากเป็นพี่น้องฝาแฝดกัน

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมแผงเข้ามาในร่างกายในที่นี้คือ allograft T lymphocyte จะทำหน้าที่ตรวจสอบดูว่า graft นั้นมี HLA ตรงกับของตนเองหรือไม่ หากตรงกันก็จะเกิดปฏิกิริยายอมรับ graft แต่หากไม่ตรงกันก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อต้านขึ้น (graft rejection) นำมาซึ่งการทำลายและการ.สูญเสียหน้าที่ของอวัยวะที่นำมาปลูกถ่าย แบ่งการตอบสนองของร่างกายต่อ allograft ออก

เป็น 5 ระยะคือ 1) ระยะรับรู้ alloantigen (allorecognition phase) 2) ระยะการกระตุ้น T lymphocyte (T cell activation phase) 3) ระยะการตอบสนองของ helper T cell (T_H cell effector phase) 4) ระยะทำลาย alloantigen (effector phase) 5) ระยะสิ้นสุดหรือควบคุมการตอบสนอง (self regulatory phase)

2.2 Immunogen and antigen

immunogen หมายถึง สารซึ่งเมื่อให้เข้าไปในร่างกายในสภาวะที่พอเหมาะ แล้วสามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่างกับ antigen ซึ่งหมายถึงสารที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้น

พบว่า immunogen ทุกชนิด จะมีคุณสมบัติเป็น antigen ด้วย แต่มีสารบางชนิดมีคุณสมบัติเป็น antigen แต่ไม่เป็น immunogen ตัวอย่างเช่น hapten โดยปกติ hapten เป็นสารที่มีขนาดเล็กไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้โดยลำพัง แต่เมื่อนำมารวมตัวกับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า carrier จะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ hepten ได้ (อ่านรายละเอียดในบท "Acute Inteistitial Nephritis") ส่วนใหญ่ immunogen เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ แต่มีเพียงส่วนเล็ก ๆ บางส่วนบนผิวเท่านั้นที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับ แอนติบอดีย์ หรือ T lymphocyte ของร่างกาย เรียกบริเวณเหล่านี้ว่า epitopes หรือ antigenic determinants เรียกส่วนที่สามารถจับกับ epitopes ได้จำเพาะบนแอนติบอดีย์ หรือ T lymphocyte ว่า paratope

epitope แต่ละตำแหน่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโน หรือ monosaccharide เรียงตัวต่อกัน 4 ถึง 6 ตัว อาจเรียงต่อเนื่องบนสาย peptide หรือไม่ต่อเนื่องบนสาย peptide แต่เขามาใกล้กันด้วยการม้วนพับของสาย peptide พบว่า T lymphocyte จะทำปฏิกิริยาจำเพาะ กับ epitope เกิดจากกรดอะมิโนเรียงต่อเนื่องกันบนสาย peptide และจับอยู่กับ MHC molecule บนผิวของเซลล์ต่างๆ เท่านั้น แต่ B lymphocyte หรือ แอนติบอดีย์ จะทำ ปฏิกิริยาได้ทั้ง epitope ที่เกิดจากกรดอะมิโนเรียงต่อเนื่องไม่ต่อเนื่องบนสาย peptides โดยไม่จำเป็นต้องจับกับ MHC molecule บนผิวของเซลล์ต่างๆ

2.3 Major histocompatibility system (MHC)

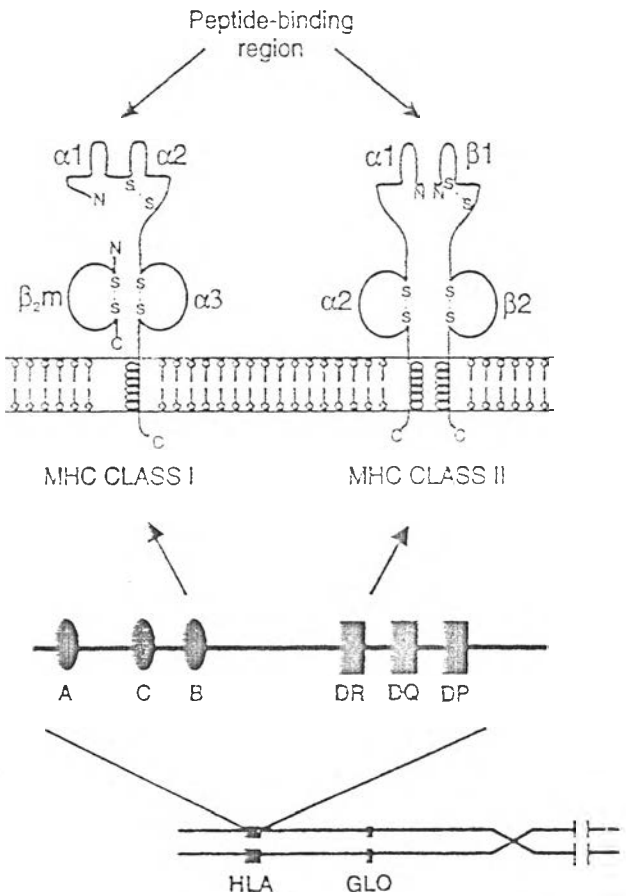
MHC เป็นระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและการแสดงออกของ glycoprotein ที่ระบุความเป็นตนเอง แยกจากผู้อื่น บนผิวของเซลล์ต่าง ๆ เป็นตำแหน่งที่ T lymphocyte ใช้รับรู้ว่า graft ที่ปลูกถ่ายนั้นเป็นของตนเองหรือของผู้อื่น นำมาซึ่งปฏิกิริยาการยอมรับหรือต่อต้าน graft MHC ถูกควบคุมด้วยยีนที่มี allele จำนวนมากบนแขนข้างสั้น ของโครโมโซมคู่ที่ 6 โดยแต่ละ

allele จะถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมออกมาเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน (codominance) แบ่ง MHC ออกตามโครงสร้าง หน้าที่ และตำแหน่งที่พบได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ 1) MHC class I ได้แก่ HLA-A.B และ C 2) MHC class II ได้แก่ HLA-DP,DQ และ DR พบว่า HLA-A.B และ DR เท่านั้น ที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของ graft (graft survival)

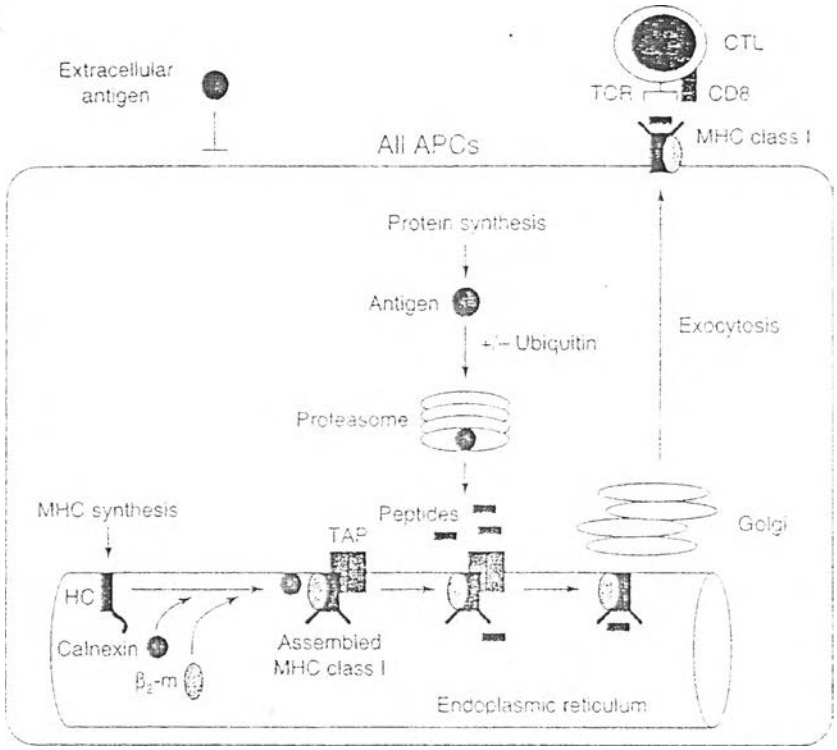
2.3.1 MHC class I ประกอบด้วย HLA 3 กลุ่ม คือ HLA-A, B และ C พบอยู่บนผิวของเซลล์ทุกชนิดที่มีนิวเคลียส แต่จะมีความหนาแน่นแตกต่างกัน โดยพบจำนวนมากบนผิวของเยื่อบุผนังหลอดเลือด และเซลล์ต่าง ๆ ที่เจริญเติบโตจากไขกระดูก พบจำนวนน้อยในเซลล์กล้ามเนื้อ และตรวจไม่พบในเซลล์ประสาท (neuron), เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) โครงสร้างของ MHC class I ประกอบด้วยโปรตีน 2 สายจับคู่กันด้วยพันธะเปปไทด์ โดยเรียกสายที่มีขนาดใหญ่กว่า (44 kD) ว่า heavy chain ซึ่งประกอบด้วยส่วนย่อย (domain) 3 ส่วน คือ $\alpha 1$, $\alpha 2$ และ $\alpha 3$ เรียกสายที่มีขนาดสั้นกว่า (12 kD) ว่า β_2 microglobulin light chain (รูปที่ 5) MHC class I ทำหน้าที่เสนอแอนติเจนแปลกปลอมให้กับ T lymphocyte ที่มี CD_8^+ บนผิวเซลล์ โดยแอนติเจนเหล่านั้นถูกสร้างขึ้นจากโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งอาจเป็นโปรตีนปกติ (alloprotein) หรือผิดปกติ เช่น viral protein และ tumor protein แล้วถูกย่อยด้วยเอ็นซัมย์ large multifunctional protease (LMP) ใน cytoplasm เพื่อให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กประมาณ กรดอะมิโนเรียงตัวกัน 9 ถึง 10 ตัวก่อนจึงจะแสดงความเป็นแอนติเจนต่อ T cell ได้ หลังจาก แอนติเจนถูกย่อยเป็น epitope เล็ก ๆ จะถูกส่งไปรวมกับ MHC class I ใน endoplasmic reticulum (ER) โดยอาศัย transporter associated with antigen processing (TAP) protein แล้วส่งต่อออกไปบนผิวเซลล์ในรูป MHC class I – peptide complex (รูปที่ 6) เป็นที่น่าสังเกตว่า TAP และ LMP ถูกควบคุมด้วยยีนบนตำแหน่ง MHC class II ซึ่งแสดงถึงการทำงานร่วมกันของโมเลกุลทั้งสอง จากได้กล่าวข้างต้น แอนติเจน 1 ตัวประกอบด้วย epitope จำนวนมากมายเหตุใดจึงมีเพียงบาง epitope เท่านั้นที่ถูกเลือกนำไปจับกับ MHC class I เพื่อนำไปแสดงความเป็นแอนติเจนต่อ T lymphocyte บนผิวเซลล์ เชื่อว่าส่วนหนึ่งอาจถึงกำหนดโดยปัจจัยทางพันธุกรรมทำให้แต่ละบุคคลมีความไวต่อแอนติเจนแต่ละชนิดไม่เท่ากัน

2.3.2 MHC class II ประกอบด้วย HLA 3 กลุ่ม คือ HLA-DP, DQ และ DR พบอยู่บนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่เสนอแอนติเจนต่อ T lymphocyte (antigen presenting cells) เท่านั้น ได้แก่ macrophage, dendritic cell, renal mesangial cell, Kuffer's cell, alveolar type 2 lining cell และ B lymphocyte สามารถเพิ่มปริมาณการแสดงออกของ MHC class II บนผิวเซลล์ต่าง ๆ โดยการกระตุ้นด้วย cytokine เช่น interferon-gamma (IFN γ), interleukin 2 (IL-2) โครงสร้าง MHC class II ประกอบด้วยโปรตีน 2 สาย จับคู่กันด้วยพันธะเปปไทด์ คือ alpha chain ขนาด 34 kD และ beta chain ขนาด 29 kD แต่ละสายของโปรตีนประกอบด้วยส่วนย่อย 2 ส่วน คือ $\alpha 1$, $\alpha 2$

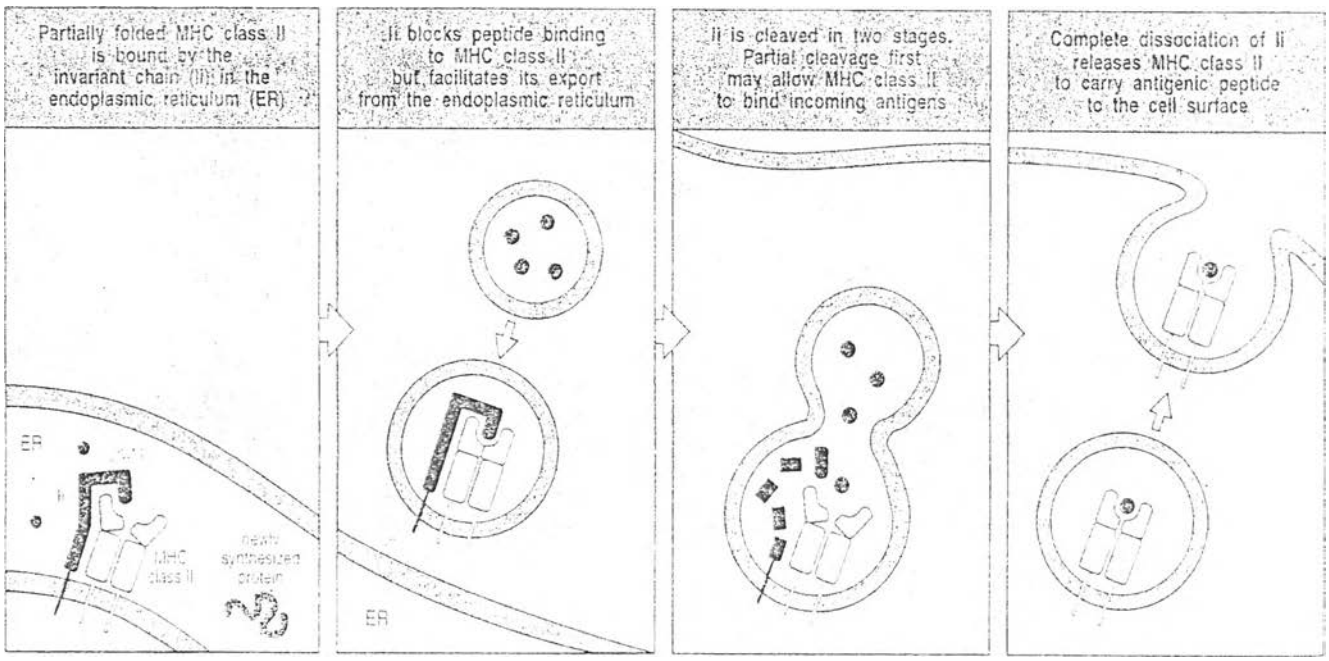
และ β_1 β_2 ตามลำดับ (รูปที่ 5) ส่วนที่ทำหน้าที่จับกับ epitope (peptide binding cleft) คือ ส่วนที่อยู่ระหว่าง $\propto$1 ของ heavy chain และβ_1 ของ light chain สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาดกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 13 ถึง 20 ตัว เพื่อเสนอต่อ T lymphocyte ที่มี CD_4^+ บนผิวเซลล์ โดยแอนติเจนส่วนใหญ่ที่จับกับ MHC class II เป็นแอนติเจนแปลกปลอมที่ได้จากภายนอกเซลล์ แต่นำเข้ามาภายในเซลล์ด้วยขบวนการ endocyto-sis แล้วถูกย่อยต่อเป็น epitope เล็ก เพื่อนำไปรวมกับ MHC class II ที่ ER โดยอาศัยการช่วยเหลือจาก compartment for peptide loading (CPL) (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง major histocompatibility complex (MHC) MHC class I และ II เป็น transmembrane glycoproteins ที่ทำหน้าที่บอกความเป็นตัวเองแยกจากผู้อื่น สร้างจากยีนจำนวน 3 คู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6คำย่อ : N = amino terminus of polypeptide chain, C = carboxyl terminus of polypeptide chain และ S..S = intrachain disulfide bonds[20]



รูปที่ 6 แสดงขบวนการตระเตรียม peptide antigen ของ MHC class I ภายใน antigen presenting cells (APC) เริ่มต้นจากการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์โดยเอ็นซัยม์ proteasome ให้กลายเป็น peptide ขนาดเล็กหลายๆ ชิ้น เพื่อนำไปรวมกับ MHC class I ใน endoplasmic reticulum โดยอาศัยการช่วยเหลือจาก transporter associated with antigen processing (TAP) ก่อนจะถูกส่งออกไปยังผิวเซลล์ร่วมกันโดยขบวนการ exocytosis[21]



รูปที่ 7 แสดงขบวนการตระเตรียม peptide antigen ของ MHC class II ภายใน antigen presenting cell ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 4 ขั้นตามลำดับดังนี้คือ 1) ขั้นตอนการสร้าง MHC class II ที่มี class II associated invariant chain peptide (CLIP) จับอยู่บนตำแหน่ง antigen binding groove ภายใน endoplasmic reticulum (ER) 2) ขั้นตอนการย่อยโปรตีนภายนอกเซลล์ให้กลายเป็น peptide ขนาดเล็กภายใน endosome 3) ขั้นตอนการรวม peptide antigen กับ MHC class II ซึ่งอาศัยการช่วยเหลือจาก compartment for peptide loading (CPL) เพื่อขจัดเอา CLIP ออกจาก antigen binding groove 4) ขั้นตอนการส่ง peptide ที่จับกับ MHC class II แล้วออกสู่ภายนอกเซลล์

โดยสรุป MHC maleoule มีหน้าที่ 2 ประการหลัก ๆ คือ 1) ทำหน้าที่ระบุความเป็นตนเองแยกจากผู้อื่น 2) ทำหน้าที่ส่งต่อแอนติเจนที่แปลกปลอมภายนอกและภายในเซลล์ให้กับ T lymphocyte เพื่อก่อให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายต่อ nonself antigen

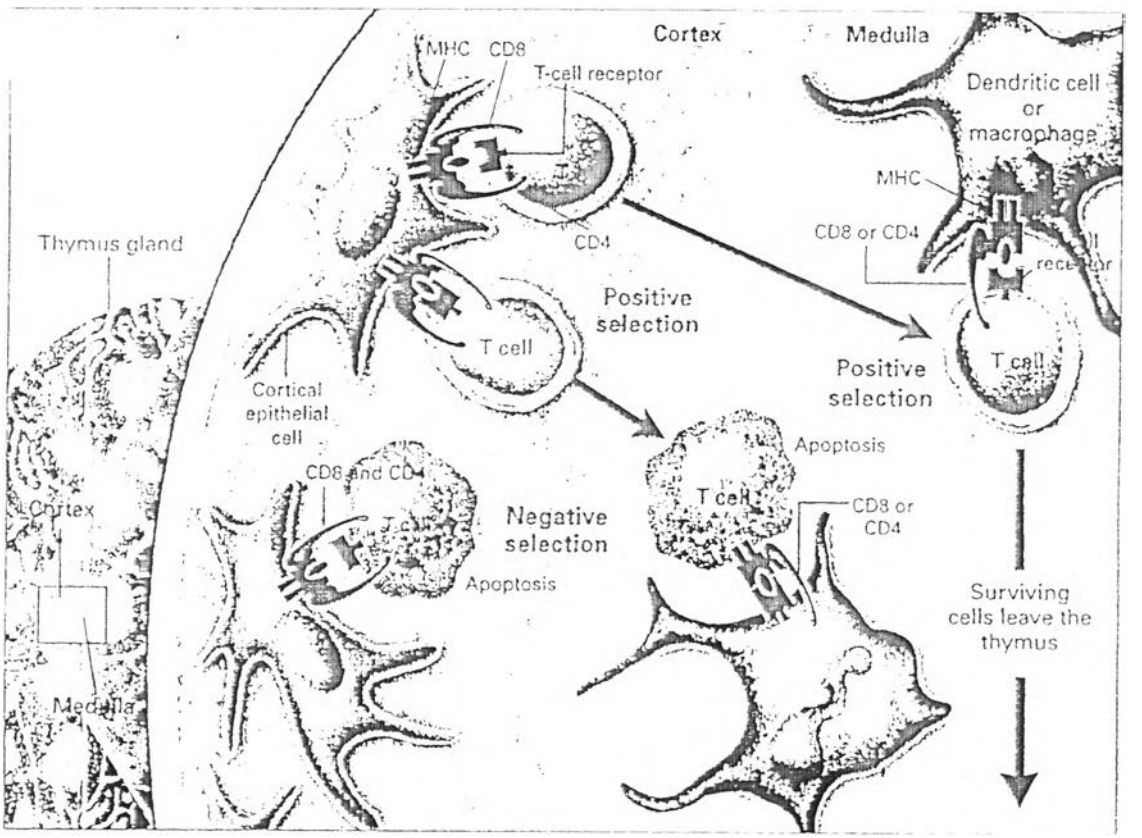
2.4 T lymphocyte

T lymphocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งในร่างกาย ที่มีความสำคัญมากในขบวนการต่อต้านหรือปฏิเสธ graft เนื่องจาก T lymphocyte มีคุณสมบัติ 1) สามารถจำแนกได้ว่าสิ่งใดเป็นสิ่งแปลกปลอมและสิ่งใดเป็นของตนเอง (differentiation of self from non-self) ซึ่งอาศัยตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (T cell receptor : TCR) 2) มีความจำเพาะ (specificity) 3) มีความจำ (memory) กล่าวคือ เมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดิมเข้ามาจะตอบสนองได้รวดเร็ว และรุนแรงกว่าการตอบสนองที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับแอนติเจนเป็นครั้งแรก จำแนก T lymphocyte โดยอาศัย marker บนผิวเซลล์ (CD_4, CD_8) ออกเป็น 4 ชนิดใหญ่ ๆ คือ 1) CD_4^+, CD_8^- T cell ได้แก่ helper T cell (TH cell) 2) CD_4^-, CD_8^+ T cell ได้แก่ suppressor T cell (Ts cell), และ cytotoxic T cell (CTL) 3) CD_4^-, CD_8^- T cell (double negative ; DN) ได้แก่ immature T cell (thymocyte), natural killer cell (NK cell) 4) CD_4^+, CD_8^+ T cell (double positive ; DP) พบเป็นส่วนน้อยในภาวะปกติ ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัดในปัจจุบัน T lymphocyte เริ่มต้นจาก stem cell ในไขกระดูกเคลื่อนที่ออกมาเจริญเติบโตในต่อมทัยมัส (thymus gland) ตั้งแต่ในครรภ์ โดยระยะแรก T cell ที่พบจะเป็นชนิด DN กระจายอยู่ในชั้นนอก (cortex) ของ thymus gland ซึ่ง T cell ในระยะนี้นอกจากจะไม่มี CD_4 และ CD_8 บนผิวเซลล์แล้ว ยังไม่พบ TCR บนผิวเซลล์เช่นกัน ต่อมา DN cell จะถูกกระตุ้นให้ปรากฏทั้ง CD_4 , CD_8 และ TCR ปริมาณน้อย ๆ บนผิว แต่ก่อน T lymphocyte จะออกจาก thymus gland สู่กระแสเลือดจะถูกคัดเลือก (selection) 2 ครั้ง โดยในขั้นแรก T lymphocyte ที่มีความสามารถจับกับ MHC class I และ class II บนผิวของ epithelial cell ในชั้น cortex จะเจริญเติบโตต่อไปเป็น CD_8^- T cell และ CD_4^- T cell ตามลำดับ แต่ T lymphocyte ที่ไม่สามารถจับกับ MHC class I และ II ได้จะเกิดการตายด้วยขบวนการ apoptosis ส่งผลให้ T lymphocyte ร้อยละ 95 ที่เจริญจากไขกระดูกตายไป เรียกขบวนการนี้ว่า positive selection ขั้นที่สอง ซึ่งเป็นขั้นที่ต่อเนื่องจากขั้นแรก T lymphocyte จะผ่านเข้ามาในชั้นใน (medulla) ของ thymus gland ในชั้นนี้ T lymphocyte ที่มีความสามารถจับกับ self MHC บนผิวของ medullar dendritic cell สูง (high affinity) จะเกิดการตาย เรียกขบวนการนี้ว่า negative selection ซึ่งเป็นขบวนการหนึ่งที่ร่างกายใช้เพื่อ tolerance ต่อ self antigen หากมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะเกิดภาวะ autoimmunity ตามมาได้ (รูปที่ 8) หลังจากสิ้นสุดขั้นตอนการ selection T lymphocyte จะแยกย้ายกันทำหน้าที่ โดย

กระจายไปอยู่ตาม ต่อมน้ำเหลืองต่าง ๆ และกระแสเลือด แบ่ง T lymphocyte ที่สำคัญในภาวะ graft rejection ตามหน้าที่ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่นี้ คือ

2.4.1 Effector T cell เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยตรงหรือโดยอ้อมผ่านการหลั่งสารต่าง ๆ มีความสำคัญในระยะทำลาย alloantigen สามารถตรวจพบ CD_8^+, CD_4^+ บนผิวเซลล์

2.4.1.1 cytotoxic T cell (CTL) เป็นเซลล์สำคัญในการกำจัดเชื้อที่หลบซ่อนภายในเซลล์ (intracellular organism) และเซลล์ผิดปกติอื่น ๆ เช่น tumor cell, allogenic cell เป็นต้น



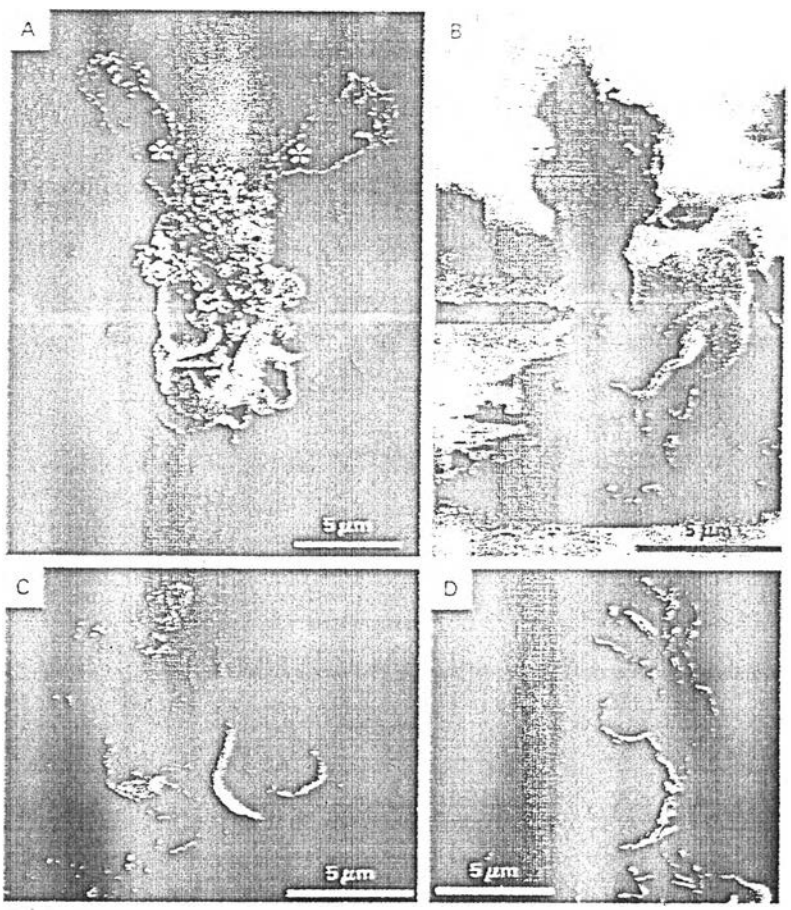
รูปที่ 8 แสดงขบวนการ positive และ negative selection ของ T lymphocyte ใน thymus gland[22]

2.4.1.2 Delayed type hypersensitivity T cell (T_{DTH} cell) เป็น T lymphocyte ที่มีความสามารถสร้าง lymphokine ต่าง ๆ ได้แก่ IFN γ, IL-2, 10 และ tumor necrotic factor-alpha (TNFα) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการเคลื่อนที่และการทำงานของ monocyte และ macrophage นำมาซึ่งปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันไวชนิด delayed type hypersensitivity

2.4.2 Regulatory T cell เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน

2.4.2.1 Helper T cell (T_H cell) ตรวจพบ CD_4^+ บนผิวเซลล์ มีบทบาทสำคัญในระยะ allorecognition ทั้งใน acute และ chronic graft rejection

2.4.2.2 Suppressor T cell (Ts cell) ตรวจพบ CD_8^+ บนผิวเซลล์ มีคุณสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันไม่ให้มากเกินไป (regulatory phase)



รูปที่ 9 ภาพต่อเนื่องของ scanning electron microscope แสดงขบวนการ immunologic crosstalk ระหว่าง antigen presenting cell (dendritic cell) และ helper (CD_4^+) T cell (แสดงโดยเครื่องหมายดอกจัน) A แสดง CD_4^+ T cells 2 ตัวจับกับ dendritic cell ที่มีแขนขามากมายยื่นออกมา B แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ dendritic cell หลังจับกับ CD_4^+ T cells C และ D แสดง dendritic cell ยื่นผนังเซลล์โอบล้อมรอบ CD_4^+ T cell เพื่อให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์ขณะจับกันเพิ่มขึ้น[23]

2.5 ระยะรับรู้และตอบสนองต่อ allograft (allorecognition phase)

เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการรับรู้และตอบสนองต่อ alloantigen คือ T_H cell ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นว่า T lymphocyte จะใช้ TCR บนผิวรับรู้เพียงส่วนประกอบย่อยบางส่วนของแอนติเจน (fragmented peptide หรือ epitope) ที่เกาะกับ MHC molecule เท่านั้น ไม่ได้รับรู้ทั้งโมเลกุลของแอนติเจน (native structural protein) ดังนั้นจำเป็นจะต้องอาศัยการช่วยของ APC ซึ่งต่างจาก B lymphocyte ที่สามารถรับรู้แอนติเจนในรูปดั้งเดิม (native form) โดยไม่ต้องได้รับการช่วยเหลือจาก APC (รูปที่ 9)

2.5.1 Antigen presenting cell (APC) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เสนอแอนติเจนแปลกปลอม ในที่นี้ หมายถึง alloantigen ให้กับ MHC class II restricted T cell (T_H cell) โดยเซลล์ที่จะสามารถเป็น APC ได้นั้น ต้องมีคุณสมบัติสำคัญดังนี้คือ 1) สามารถจับกินและย่อยสลาย alloantigen ภายในเซลล์ได้ 2) สามารถสร้างและส่งต่อ MHC class II molecule ให้ปรากฏบนผิวเซลล์ได้ แบ่ง APC โดยอาศัยความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T_H cell ออกเป็น 2 ชนิด คือ

ก. professional APC เป็น APC ที่มีความสามารถกระตุ้น T_H cell ได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากมี costimulatory ligand จำนวนมากบนผิวเซลล์ เซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น professional APC ได้แก่ macrophage และ dendritic cell

ข. nonprofessional APC เป็น APC ที่มีความสามารถจำกัดในการกระตุ้น T_H cell เนื่องจากมี costimulatory ligand บนผิวเซลล์น้อยกว่า แต่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ costimulatory ligand ได้โดยการกระตุ้นด้วย TNFα, TNF γ และ heat shock protein (เป็นโปรตีนที่ได้จากการสลายของเซลล์ที่ตายด้วยขบวนการ necrosis) แบ่งเซลล์ชนิดนี้ย่อยออกเป็น 2 ชนิด คือ

ข.1 กลุ่มที่มีระดับ costimulatory ligand อยู่บ้าง แต่มีปริมาณน้อยกว่า professional APC ได้แก่ tissue macrophage เช่น alveolar type 2 cell, Kuffer's cell และ renal mesenchymal cell

ข.2 กลุ่มที่มีระดับ costimulatory ligand อยู่น้อยในภาวะปกติ ได้แก่ B lymphocyte, endothelial cell และ epithelial cell

2.5.2 T cell receptor (TCR) โมเลกุลบนผิวของ T lymphocyte ที่มีหน้าที่รับรู้แอนติเจนที่เกาะติดกับ MHC molecule บนผิวของ APC เรียกว่า T cell receptor (TCR) ประกอบด้วยโปรตีน 2 สายที่มีโครงสร้างต่างกันมารวมกัน (heterodimer) ได้แก่ α และ β chain ซึ่งแต่ละสายมีโครงสร้างคล้ายกับ immunoglobulin (Ig) คือ ประกอบด้วย constant domain และ variable domain

เชื่อมต่อกันด้วย joining segment เฉพาะส่วนของ variable domain เท่านั้น ที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนแปลกปลอมโดย variable domain ถูกควบคุมด้วยยีนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (diversity) จำนวนมากประมาณ 400 ยีน ก่อให้เกิด antigenic binding site แตกต่างกันได้ถึง 10^{15} แบบ กลุ่มของ T lymphocyte ที่มี antigenic binding site เหมือนกัน เรียกว่า T cell clone หรือ repertoire ซึ่ง antigenic binding site บน variable domain นี้เองที่ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดความสามารถของ T lymphocyte ในการจับกับ alloantigen constant domain เป็นส่วนปลายทางด้าน carboxyl terminal มีหน้าที่ยึด TCR กับผนังเซลล์ lymphocyte และเป็นส่วนสำคัญในการส่งต่อสัญญาณการกระตุ้น T lymphocyte หลังจากจับกับ alloantigen เรียก TCR ที่จับกับ peptide segment ที่เกาะกับ MHC molecule บนผิวของ APC นี้ว่า trimolecular complex of antigen presentation

2.5.3 ขั้นตอนในการรับรู้ของ T lymphocyte ต่อ allograft เชื่อว่าเริ่มต้นจากการบาดเจ็บของ allograft ที่จะนำมาใช้ปลูกถ่าย โดยการบาดเจ็บนี้อาจเกิดขึ้นก่อนทำการผ่าตัดนำ allograft ออก (procurement) ได้แก่ การบาดเจ็บเนื่องจากการขาดเลือดมาเลี้ยง (warm ischemic injury) หรือการบาดเจ็บเนื่องจากภาวะสมองตาย (brain death) ในกรณีได้รับ graft มาจากผู้ตาย (cadaver) หรือเกิดหลังทำการผ่าตัดนำ allograft ออกแล้ว เช่น การบาดเจ็บเนื่องจากการขาดเลือดมาเลี้ยง (cold ischemic injury), การบาดเจ็บจากการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ และการบาดเจ็บหลังการมีเลือดมาเลี้ยง (reperfusion injury) ไม่ว่าการบาดเจ็บจะเกิดในระยะใดก็ตาม จะนำมาซึ่งขบวนการอักเสบ ซึ่งจะมีการชุมนุมของ APC เป็นจำนวนมากในบริเวณ graft จากการสร้างและหลั่งสาร chemokine จากปฏิกิริยาการบาดเจ็บโดยตรงหรือโดยอ้อมผ่านขบวนการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (complement) และขบวนการแข็งตัวของเลือด (coagulation) ในกรณีที่การบาดเจ็บเกิดก่อนนำ graft ออกจาก donor APC ที่อยู่ใน graft ส่วนใหญ่จะเป็นของ donor แต่ถ้าการบาดเจ็บเกิดหลังนำ graft ออกจาก donor APC ที่พบอยู่ใน graft หลังการปลูกถ่ายส่วนใหญ่เป็นของ recipient แบ่งการรับรู้ alloantigen ออกตามแหล่งที่มาของ APC ได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.5.3.1 direct allorecognition หมายถึงขบวนการรับรู้ alloantigen โดยใช้ donor APC เป็นสื่อชักนำให้ recipient T_H cell ตอบสนองต่อ alloantigen ที่เกาะบน donor MHC molecule ส่วนน้อยร้อยละ 2 ที่ T_H cell สามารถตอบสนองต่อ donor MHC molecule โดยไม่มี alloantigen เกาะ ทั้งนี้เนื่องจาก donor MHC molecule มีลักษณะคล้ายคลึง (molecular mimiacry ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในบท Acute Interstitial Nephritis) กับ donor peptide ที่จับกับ recipient MHC แต่ขบวนการนี้เกิดขึ้นไม่บ่อย เนื่องจาก MHC molecule ที่ขาดการจับกับ peptide fragment จะคงตัวไม่นานพอที่จะสิ้นสุดการกระตุ้น T_H cell เชื่อว่าขบวนการ direct allorecognition มีความสำคัญต่อการต่อต้าน graft ในระยะแรก (acute rejection) ดังนั้น

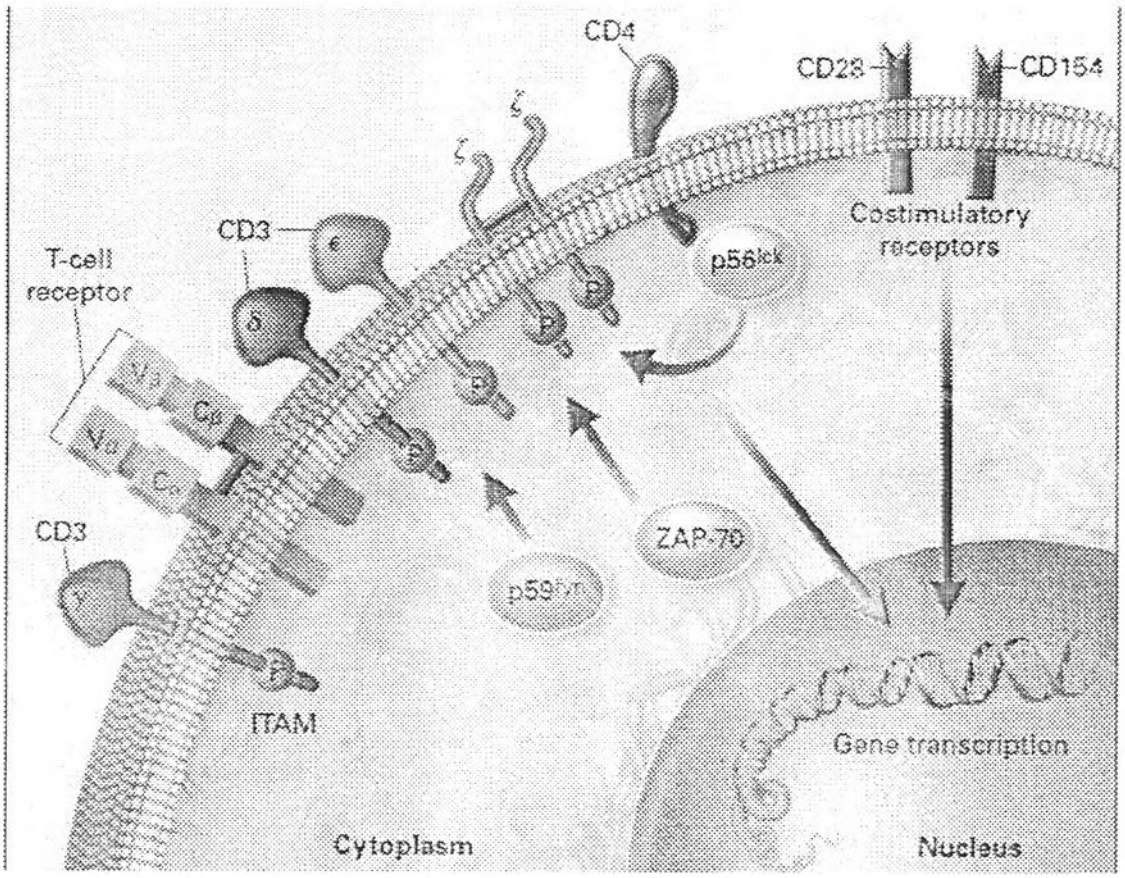
allograft ที่มี donor APC อยู่เป็นจำนวนมากจะเกิดปฏิกิริยา rejection ได้สูงเป็นเหตุผลหนึ่งที่อาจอธิบายว่า ทำไม cadaveric graft จึงมี graft survival สั้นกว่า living graft ชัดเจน (codaveric graft ได้รับการบาดเจ็บก่อนการ procurement สูงกว่า living graft จึงมี donor APC สะสมภายใน graft ปริมาณมากกว่า)

2.5.3.2 indirect allorecognition หมายถึงขบวนการรับรู้ alloantigen โดยใช้ recipient APC เป็นสื่อชักนำให้ recipient T_H cell ตอบสนอง โดย alloantigen อาจถูกจับด้วย recipient APC ในตำแหน่งที่ปลูกถ่ายอวัยวะจากการชักนำด้วยขบวนการบาดเจ็บ หรือในตำแหน่งที่ไกลออกไป จากการหลุดลอยของ alloantigen ไปตามกระแสเลือด เชื่อว่าขบวนการ indirect allorecognition มีความสำคัญต่อ chronic allograft rejection มากกว่า acute rejection และมีความสามารถสร้าง T cell clone ได้หลากหลายกว่า direct allorecognition

จะเห็นว่าทั้ง indirect และ direct allorecognition ใช้ recipient T_H cell ร่วมกัน และมีขบวนการบาดเจ็บเป็นส่วนกระตุ้นในปฏิกิริยารุนแรงขึ้นเหมือนกัน พบว่า alloantigen ส่วนใหญ่ที่ T_H cell รับรู้และตอบสนองได้ดีคือ peptide segment ในส่วน variable region ของ MHC class I นอกจากนี้พบว่าในระยะแรกของการตอบสนองต่อ alloantigen มี T cell clone จำนวนจำกัด แต่ในระยะหลังของการตอบสนองต่อ alloantigen (chronic or late acute rejection) มี T cell clone จำนวนมาก เชื่อว่าเกิดผ่านขบวนการ intramolecular spreading และ intermolecular spreading (อ่านรายละเอียดในบท SLE) ซึ่งยืนยันความสำคัญของ indirect allorecognition ใน chronic rejection

การนำเสนอ alloantigen ของ APC ต่อ T_H cell นั้นเชื่อว่าส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง (regional lymph node) หรือ ม้าม (spleen) เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า T_H cell ที่ยังไม่เคยได้รับกระตุ้นด้วย antigen หลังจากเติบโตจาก thymus gland (naïve cell) มีการเดินทางเฉพาะ lymphoid organ และกระแสเลือดเท่านั้น ต่างจาก memory T cell ที่สามารถเดินทางออกจากกระแสเลือดและต่อมน้ำเหลืองเข้ายังทุกอวัยวะได้รวมทั้ง graft ดังนั้น APC จะต้องนำ alloantigen ที่ตระเตรียมเสร็จแล้วบน MHC class II molecule เคลื่อนที่ออกจาก donor kidney ไปยัง lymph node และ spleen เพื่อที่จะกระตุ้น naïve cell ให้พร้อมที่จะเป็น activated T cell ต่อไป

I20109945



รูปที่ 10 แสดง transmembrane protein ต่างๆ ที่ทำหน้าที่ร่วมกันถ่ายทอดสัญญาณการกระตุ้นผ่านลงไปภายใน helper T cell หลังจากจับกับ ligand ที่จำเพาะ ส่งผลให้มีการ transcription โปรตีนต่างๆ จำนวนมากที่จำเป็นในการแบ่งตัวของเซลล์เริ่มต้นจาก transmembrane protein ชนิด T cell receptor และ CD_3 จับกับ ligand ก่อให้เกิดสัญญาณที่ 1 ตามด้วย CD154 (CD40L) และ CD28 จับกับ ligand ก่อให้เกิด coactivation signal และ signal 2[24]

2.6 **ระยะกระตุ้น** helper T cell (T_H cell activation phase)

หลังจาก naïve T_H cell จับกับ trimolecular complex แล้วจะเกิดสัญญาณผ่านลงไปภายในเซลล์กระตุ้นให้ naïve T_H cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนรูปร่าง (differentiation) เป็น activated T_H cell ที่มีความสามารถสร้างสารต่าง ๆ มากมาย เพื่อตอบสนองต่อ allograft ซึ่งขบวนการเหล่านี้ต้องอาศัยการทำงานร่วมกัน ของโมเลกุลต่าง ๆ เช่น CD_3 , adhesion molecules, costimulatory signal เป็นต้นจึงเกิดสัญญาณที่สมบูรณ์ (รูปที่ 10)

ก. CD_3 molecule เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนพบอยู่บนผิวของ T lymphocyte ประกอบด้วย polypeptide เส้นสั้น ๆ 5 เส้น คือ γ,d,ε,δ และ γ เรียงอยู่ชิดและทำงานร่วมกับ TCR เพื่อส่งสัญญาณกระตุ้น (signal transduction) ผ่านลงไปในภายในเซลล์ เรียกการทำงานร่วมกันของ TCR และ CD_3 นี้ว่า TCR-CD_3 complex พบว่าเมื่อให้ monoclonal antibody ได้แก่ OKT_3 (monoclonal Anti-ε_3 chain of CD_3 antibodies) จะกระตุ้นให้ T lymphocyte ปลดปล่อย

cytokine จำนวนมากออกมาโดยเฉพาะ TNF∝ นำมาซึ่งอาการ flu-like ที่เรียกว่า cytokine release syndrome ในระยะแรก ตามด้วยการยับยั้งการตอบสนองของ T_H cell ต่อแอนติเจนทุกชนิด (paralyze T cell recognition) ซึ่งยืนยันความสำคัญของ TCR- CD_3 complex

ข. costimulatory signal เนื่องจากการจับกันระหว่าง MHC molecule และ TCR นั้นเกิดในระยะเวลาค่อนข้างสั้นและไม่มั่นคง (high specificity , low affinity) เพียงพอที่จะสิ้นสุดขบวนการกระตุ้น T_H cell จนเกิดการแบ่งตัว ดังนั้นจำเป็นจะต้องมีโครงสร้างที่ทำหน้าที่ช่วยยึดเซลล์ทั้งสองไว้ด้วยกัน นอกเหนือจาก trimolecular complex เรียกโครงสร้างเหล่านี้ว่า costimulatory signal ซึ่งมีมากมาย ดังตารางที่ 4 แต่ที่สำคัญคือ CD40 (gp 39) และ CD40L (CD 154) ; CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) และ CD28 หาก T_H cell ได้รับการกระตุ้นเพียง trimolecular complex โดยไม่ได้รับการช่วยเหลือจาก costimulatory signal จะส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ภาวะ apoptosis หรือ anergy

ค. adhesion molecules เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะ (adhesion) ระหว่างเซลล์ หรือระหว่างเซลล์กับ matrix ได้แก่ selectin, integrins (LFA, VLA) และ Ig superfamily (ICAM-1,2, VCAM) แบ่งความสำคัญของ adhesion molecule ออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะ allorecognition ทำหน้าที่ช่วยยึด T_H cell กับ APC เพื่อให้ TCR สำรวจดูร่อง (groove) บน TCR ว่ามี foreign peptide มาแอบแฝงหรือไม่ 2) ระยะ T_H cell activation (เมื่อ TCR พบ foreign peptide ที่เกาะบน MHC ของ APC แล้ว) ทำหน้าที่ช่วยยึด T_H cell กับ APC จนสิ้นสุดขบวนการกระตุ้น T_H cell และช่วยส่งสัญญาณร่วมกับ costimulatory signal ส่งไปกระตุ้น T_H cell พบว่าตัวที่มีความสำคัญในขบวนการกระตุ้น T_H cell คือ integrins บนผิวของ T_H cell และ Ig superfamily บนผิวของ APC 3) ระยะ effector ทำหน้าที่ช่วยยึด activated T_H cell และ inflammatory cells อื่นๆ กับผนังหลอดเลือดก่อนที่เซลล์เหล่านี้จะเคลื่อนแทรกผนังหลอดเลือดลงไปเกิดปฏิกิริยาต่อต้าน graft

ตารางที่ 4 Adhesion/Costimulatory Molecules กับ Cellular Ligands

Receptor	Ligand
CD4	MHC class II
CD8	MHC class I
LFA-1 (CD11a)	ICAM-1 (CD54)
LFA-1 (CD11a)	ICAM-2 (CD102) , ICAM-3
CD2	LFA-3 (CD58)
CD28, CTLA4	B7-1 (CD80)
CD28, CTLA4	B7-2 (CD86)
VLA4 ($\alpha 4\beta 1$)	VCAM-1 (CD106)
L-selectin (CD62L)	MadCam-1
P-selectin (CD62P)	Sialyl-LewisX
$\alpha 4\beta 7$	MadCam-1, VCAM-1
PECAM (CD31)	CD31
CD31	$\alpha v\beta 3$ (VNR)
CD45	Glycolipids
CD40	CD40 Ligand
CD44	Hyaluronate PLNad
4-1 BB (CD137)	Heat shock protein (HSP)

ง. cell cycle control

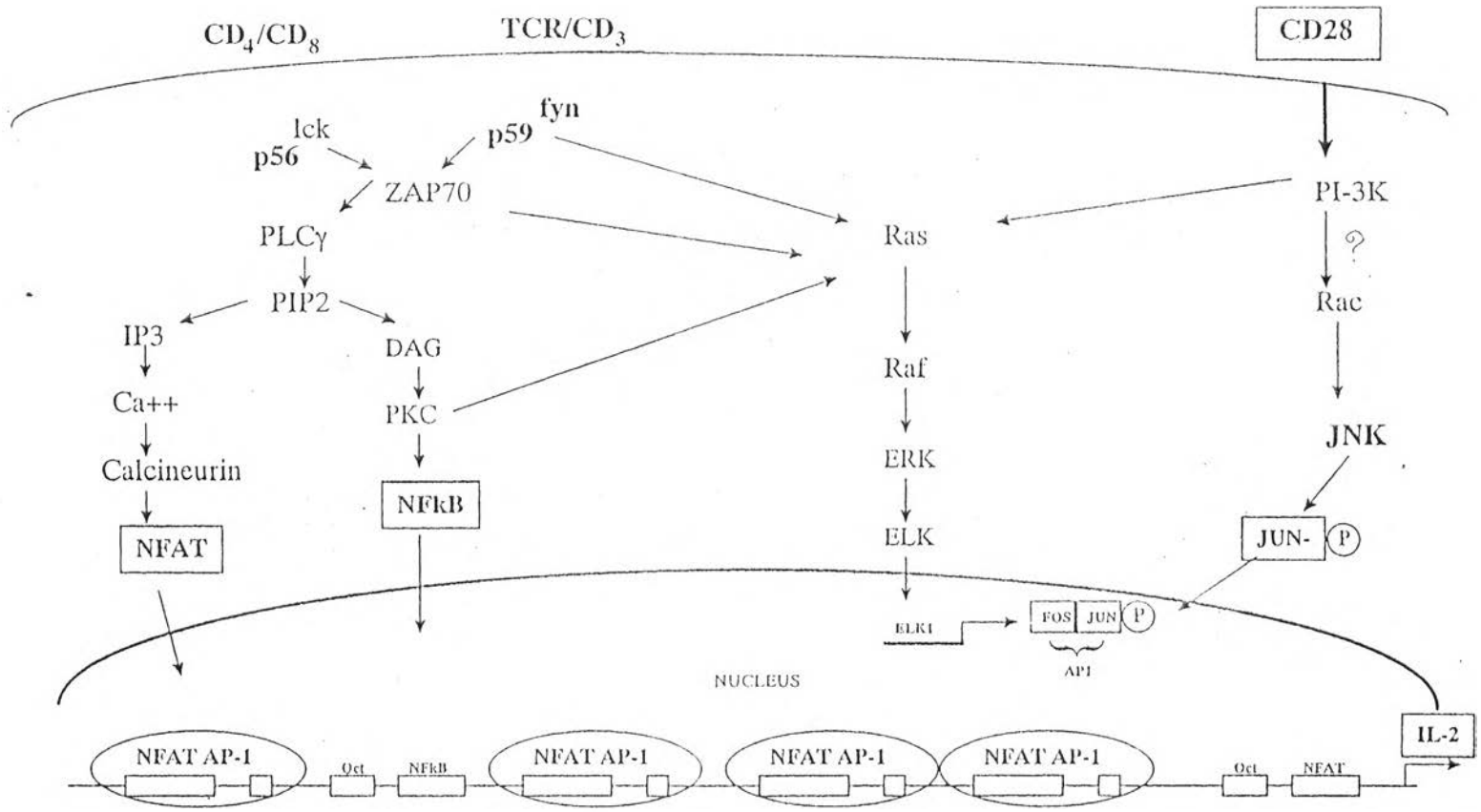
หลังจากที่ T_H cell ถูกกระตุ้น เซลล์จะออกจากระยะพักฟื้นคือ G_0 phase เข้าสู่ G_1 phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการเตรียมเซลล์ สำหรับการสังเคราะห์ DNA เพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์ในระยะต่อไป ในระยะ G_1 phase กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เวลาทั้งหมดส่วนใหญ่ใช้ในการสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการสร้าง DNA และ RNA เช่น purine, pyrimidine และเอ็นซัมย์ต่างๆ ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญในการออกฤทธิ์ของยา azathioprine, mycophenolate mofetil (cellcept), leflunomide และ brequinar ต่อมาเซลล์จะเข้าสู่ S phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการแบ่ง DNA กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ G_2 phase และ M phase ซึ่งกินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง และ 30 นาที ตามลำดับ โดย G_2 phase จะเป็นระยะที่เซลล์สร้างสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ในระยะ S phase อันได้แก่ เอนไซม์, โปรตีนต่าง ๆ เช่น microtubules

การแบ่งตัวของเซลล์นี้จะมีกระบวนการควบคุมอย่างแม่นยำและสลับซับซ้อน โดยเฉพาะระยะ G_1 ต่อกับระยะ S และระยะ G_2 ต่อระยะ S

โดยตัวที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์ดำเนินจากระยะหนึ่งไปสู่ระยะต่อไป คือ cyclins และ cyclin dependent kinases (CDK) และตัวยับยั้งไม่ให้เซลล์ดำเนินจากระยะหนึ่งไปสู่ระยะต่อไป คือ CDK inhibitors แบ่งตัวยับยั้งออกตามความจำเพาะในการยับยั้ง cyclin และ CDK ได้เป็น 2 ตระกูล คือ ตระกูลที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อ cyclin/CDK4 หรือ 6 complex ได้แก่ INK 4 family ประกอบด้วย $P15^{INK4b}$, $P16^{INK4a}$, P18. 19 และ 20 และตระกูลที่ออกฤทธิ์ไม่จำเพาะต่อชนิด cyclin/CDK ได้แก่ Cip/Kip family ประกอบด้วย $p21^{CipIWafI}$, $p27^{Kip1}$ และ $p57^{Kip2}$ สามารถยับยั้งได้ทั้ง CDK 2,4 และ 6 ตัวยับยั้ง cyclin และ CDK ทั้ง 2 ตระกูลส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งในระยะ G_1 ต่อกับระยะ S (restriction point) และจัดเป็นส่วนหนึ่งของ tumor suppress gene product

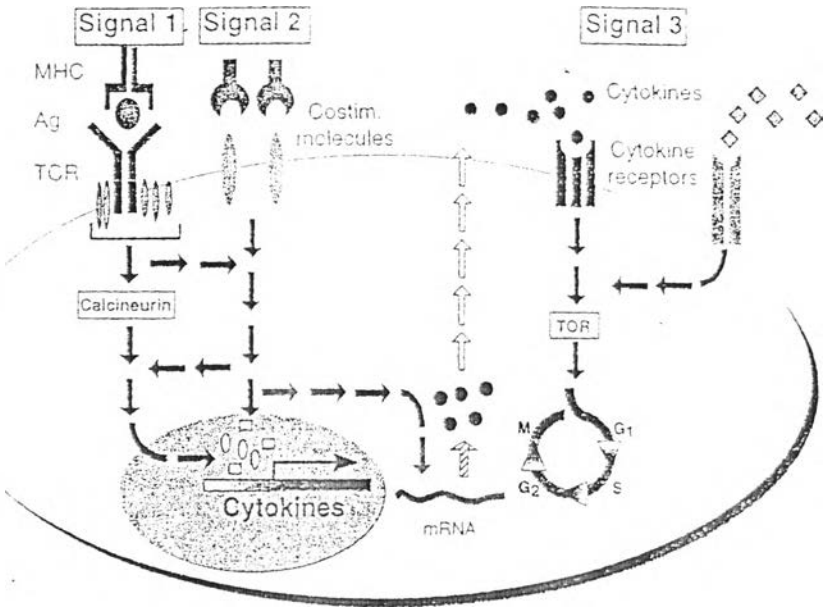
จ. transcription factor จะเห็นว่า cell cycle จำเป็นต้องใช้โปรตีนภายในเซลล์จำนวนมากในการควบคุมและยับยั้งขบวนการแบ่งตัวให้เป็นไปอย่างเหมาะสม โดยโปรตีนเหล่านี้จะถูกสร้าง (transcription) ขึ้นมาจากสาย DNA เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์ แต่การสร้างโปรตีนเหล่านี้ไม่ได้เกิดขึ้นโดยตรงหลังเซลล์ได้รับการกระตุ้น หากต้องผ่านตัวควบคุมอีกหลายตัวที่เรียกว่า transcription factor ยิ่งโปรตีนชนิดนั้นมีความสำคัญต่อ cell cycle มากเท่าใดยิ่งจำเป็นต้องใช้ transcription factor หลายตัวเท่านั้น เช่น IL-2 ซึ่งต้องอาศัย transcription factor 4 ชนิด ได้แก่ nuclear factor of activated T cell (NF-AT). activator protein-1 (AP-1 ซึ่งประกอบด้วย c-Jun และ c-Fos จับคู่กัน), nuclear factor-Kappa B (NF-KB) และ octamer-1 (Oct-1) ในการจับกับ transcription factor binding element บนสาย DNA จึงจะเริ่มกระบวนการสร้างโปรตีนชนิดนี้ออกมาได้ ไม่สมารถใช้ transcription factor ตัวใดตัวหนึ่งกระตุ้นการ transcript IL-2 ได้ (รูปที่ 11)

แบ่งขั้นตอนการกระตุ้น T_H cell จนสิ้นสุดขบวนการแบ่งตัว และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยอาศัยสัญญาณการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ออกเป็น 4 ขั้นตามลำดับ ดังนี้ (รูปที่ 12 และ 13)

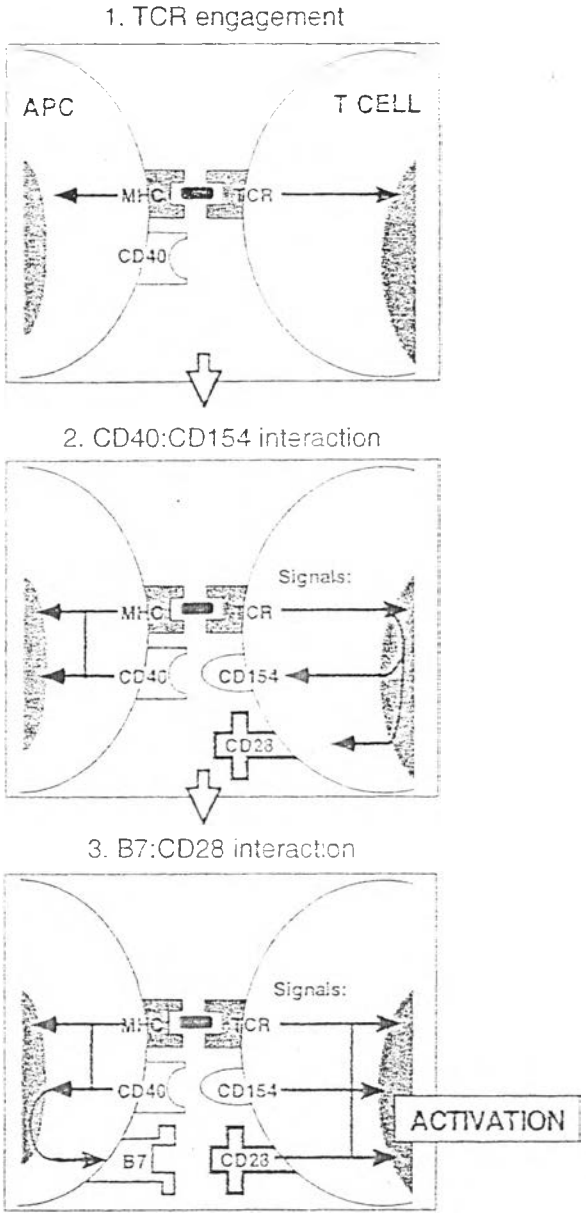


รูปที่ 11 แสดง signal transduction ต่างๆ ภายใน T_H cell หลังจากถูกกระตุ้นด้วยการจับกันระหว่าง transmembrane protein ชนิด TCR/CD3 complex, CD4/CD8 และ CD28 กับ ligand ที่จำเพาะบนผิวเซลล์ซึ่ง intracellular signals ทั้งหมดนี้จะร่วมกันกระตุ้น transcription factor ชนิดต่างๆ ได้แก่ NFAT, AP-1 NFKB และ Oct ก่อให้เกิดการ transcript โปรตีนต่างๆที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ โดยเฉพาะ interleukin 2 (IL-2)

คำย่อ : PLC γ = phosphatidyl-inositol phospholipase c-gamma, IP3 = inositol 1,4,5 triphosphate, DAG = Diacylglycerol, PKC = protein kinase C, PI-3K = phosphatidyl-inositol 3 kinase, JNK = Janus kinase[25]



รูปที่ 12 แสดงการทำงานร่วมกันของทั้ง 3 signal ในขั้นตอนการกระตุ้น T cell โดย signal และ 2 ร่วมกันทำให้เกิดการสร้าง cytokine ที่จำเป็นในการเกิด signal ที่ 3 และทั้ง 3 signal ร่วมกันผลักดัน resting cell ให้เข้า cell cycle process (G1-S-G2-M) เพื่อให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ในที่สุด[26]



รูปที่ 13 แสดงลำดับการกระตุ้น T cell ด้วย signal ต่างๆ ตามลำดับเริ่มด้วย signal 1 เกิดจากการจับกันระหว่าง TCR และ MHC-peptide complex ต่อด้วย coactivation signal ซึ่งเกิดจากการจับระหว่าง CD40 และ CD154 และสุดท้าย signal 2 ที่เกิดจากการจับกันระหว่าง B7 และ CD28[26]

2.6.1 T-cell antigen receptor mediated activated signal (signal 1)

หลังจากการจับกับ (engagement) ระหว่าง TCR-CD_3 complex กับ peptide-MHC class II complex ของ APC จะก่อให้เกิดสัญญาณแรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์เพื่อกระตุ้น naïve T_H cell ให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงตนเองเป็น activated T_H cell โดยอาศัยขบวนการ phosphorylation ใส่หมู่ PO_4^{3-} ลงไปในเอนไซม์ phosphatidyl-inositol phospholipase C-gamma-1 (PLC-γ1) ซึ่งต้องอาศัยการช่วยเหลือของเอนไซม์ tyrosine kinase ($p59^{Fyn}$, $p56^{lok}$) ที่เกาะกับ intracellular tail ของ TCR-CD_3 complex และ CD_4 ตามลำดับ หลังจากนั้นเอนไซม์ PLC-γ1 จะทำการย่อย membrane phospholipid (phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate ; PIP_2) ให้กลายเป็น diacylglycerol (DAG) และ inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) (รูปที่ 11)

ก. IP_3 มีคุณสมบัติกระตุ้นการปลดปล่อย calcium ion ออกจาก intracellular organelle (mitochondria และ ER) ส่งผลให้ระดับ calcium ซึ่งปกติมีอยู่น้อยมากเทียบกับภายนอกเซลล์ (10^3 ถึง 10^5 เท่า) เพิ่มสูงขึ้น ระดับ intracellular Ca^{2+} ที่สูงนี้จะจับกับ calmodulin เกิดเป็น Ca^{2+}-calmodulin complex ก่อให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ calcineurin (calcium-calmodulin dependent phosphatase) ซึ่งเป็นเอนซัยม์สำคัญ ในขบวนการดึงเอาหมู่ PO_4^{3-} ออกจาก transcription factor โดยเฉพาะ nuclear factor of activated T cells (NFAT) ส่งผลให้ NFAT active เคลื่อนที่เข้าไปจับกับ regulatory region ของ IL-2 นำมาซึ่งการสร้าง (transcription) IL-2 ร่วมกับ transcription factor อื่น นอกจากนี้ NFAT ยังอาจควบคุมการสร้าง cytokine อื่น ๆ อีก เช่น IFN γ, IL_4, TNFα และ GM-CSF พบว่า calcineurin เป็นตำแหน่งที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยา cyclosporin และ tacrolimus (FK506) โดย cyclosporin จะจับกับ cyclophilin และ FK 500 จับกับ FK 506 binding protein (FKBP) ภายในเซลล์ก่อนจะไปออกฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin

ข. DAG หลังจาก IP3 กระตุ้นการปลดปล่อย Ca^{2+} ออกมาจำนวนมากภายในเซลล์ Ca^{2+} เหล่านี้จะร่วมกับ DAG กระตุ้นเอนไซม์ protein kinase C ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกระตุ้นการสร้าง 1) nuclear regulatory element protooncogen C-fos และ C-jun ซึ่งทั้งสองตัวเมื่อรวมตัวกันจะเกิด transcription factor AP-1 2) NF-kB

นอกจากนี้ cytoplasmic tail δ chain (CD_3) ของ TCR-CD_3 complex ยังส่งสัญญาณผ่านเซลล์ลงไปทาง ras-MAP kinase pathway เชื่อว่า มีลำดับดังนี้คือ shc, GRB2, m Sos, Ras, Raf และ extracellular signal regulated kinase (ERK) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น c-Fos ของ transcription factor AP-1 อีกทางหนึ่ง (รูปที่ 11)

2.6.2 Coactivation signal (CD40 : CD40L signal)

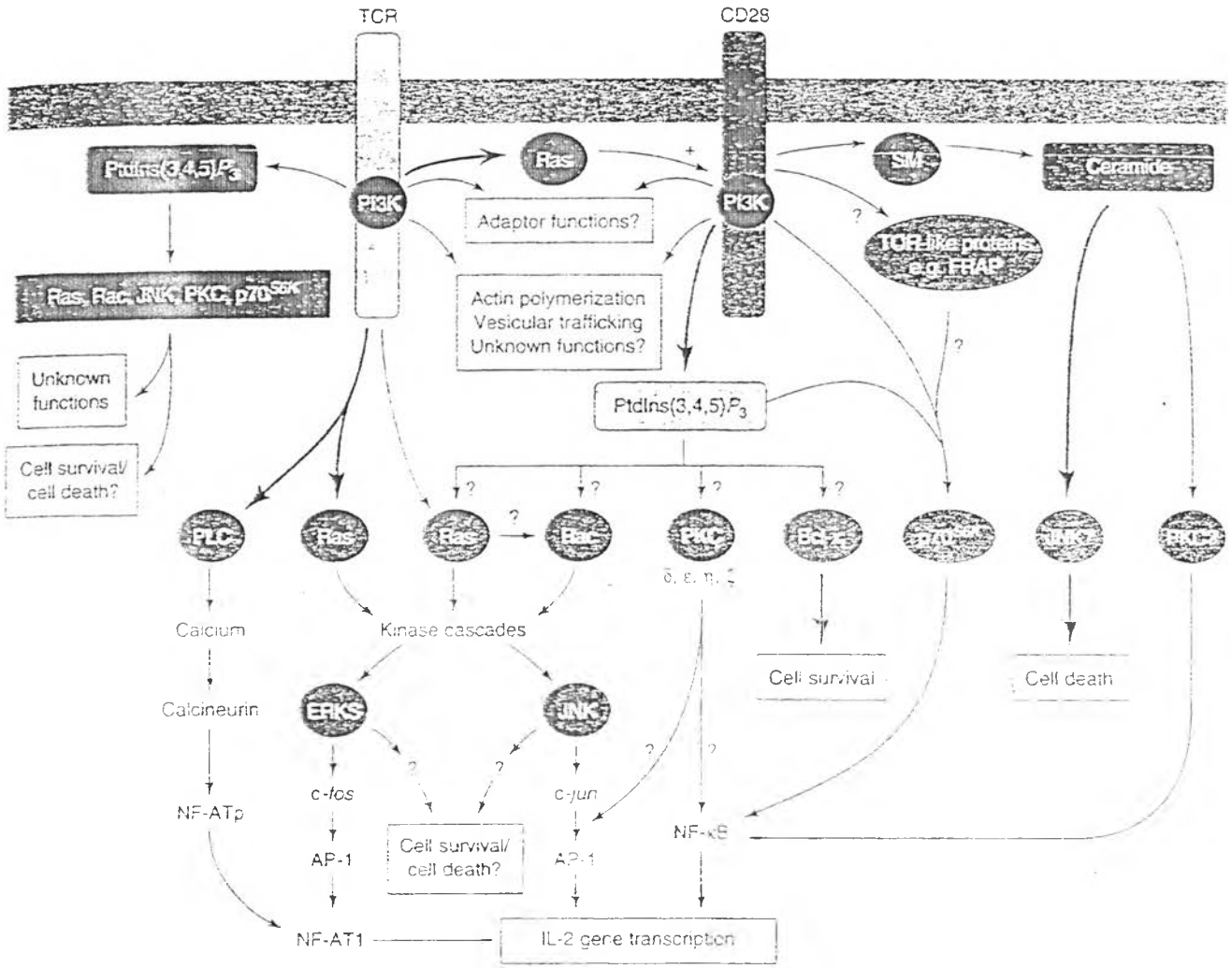
พบ CD40 บนผิวของ professional APC และ B lymphocyte CD40L หรือ CD154 บนผิวของ T lymphocyte ทั้งสองเป็นโปรตีนในตระกูล tumor necrotic factor (TNF) และ TNF

receptor (TNFR) ตามลำดับ การจับกันของ CD40 และ CD40L พบตั้งแต่เริ่มมีการกระตุ้น signal 1 การจับกันของทั้งสองโมเลกุลส่งผลให้ APC แสดง B7.2 และ ICAM-1 ที่มีอยู่แล้วบนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น และแสดง B7.1 โดยปกติไม่พบ B7.1 บนผิวของ resting APC นำมาซึ่งการส่งเสริมการกระตุ้นสัญญาณที่ 2 ต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่า T lymphocyte ใช้ ligand นี้ ช่วย B lymphocyte สร้างแอนติบอดีย์ และ class switching (เปลี่ยน IgM เป็น IgG หรือ IgE) ความผิดปกติของ signal นี้นำมาซึ่งโรค hyper IgM syndrome

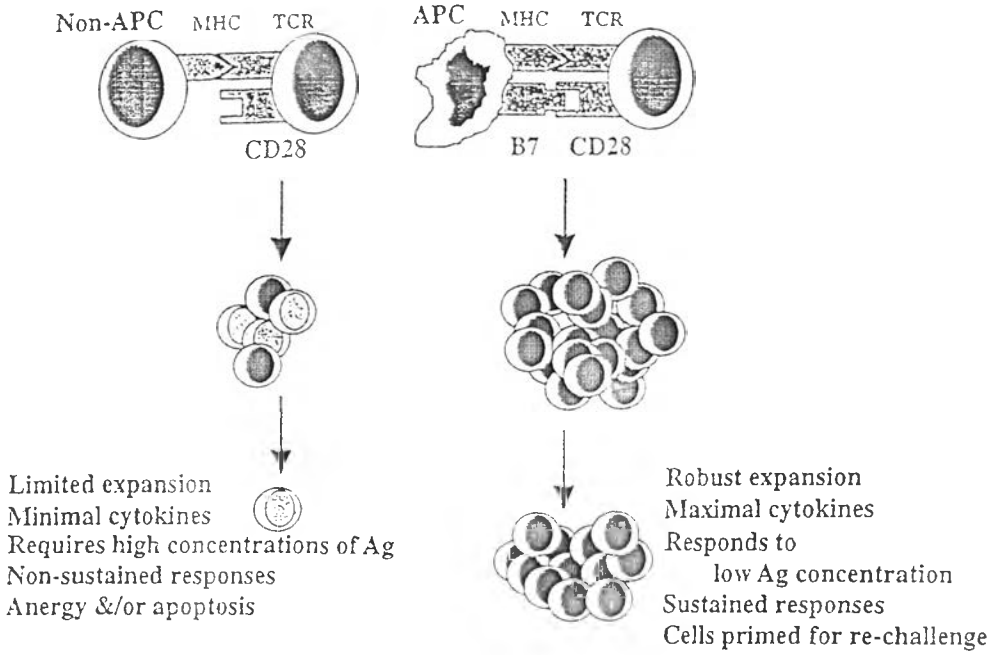
2.6.3 Antigen-nonspecifie surface molecules provide costimulation signal (signal 2)

หลังจาก coactivation signal กระตุ้นให้ APC แสดง B7.1 และ B7.2 บนผิวเซลล์ โมเลกุลเหล่านี้จะเหนี่ยวนำ T lymphocyte โดยการจับกับ CD28 บนผิวเซลล์ ก่อให้เกิดสัญญาณที่ 2 ผ่าน intracellular motif (YMNM) ลงไปกระตุ้นเอนไซม์ phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3-kinase) ภายใน T_H cell ซึ่งมีคุณสมบัติชักนำหมู่ PO_4^{3-} ของ ATP ไปส่งให้กับ D-3 phosphoinositol lipid ก่อให้เกิดสารใหม่ 3 ชนิด คือ phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns (3) P), phosphatidylinositol 3,4,- biphosphate (PtdIns (3,4) P_2) และ phosphatidylinositol 3,4,5 – triphosphate (PtdIns (3,4,5) P_3) โดย Pt dIns (3,4,5) P_3 จะเป็นตัวสำคัญในขบวนการส่งทอดสัญญาณผ่าน Ras หรือ Rac, MAP kinase family (ERKs และ JNK), C-fos และ C-jun และ AP-1 ตามลำดับร่วมกับสัญญาณที่ 1 เพื่อกระตุ้นขบวนการ transcription (รูปที่ 14)

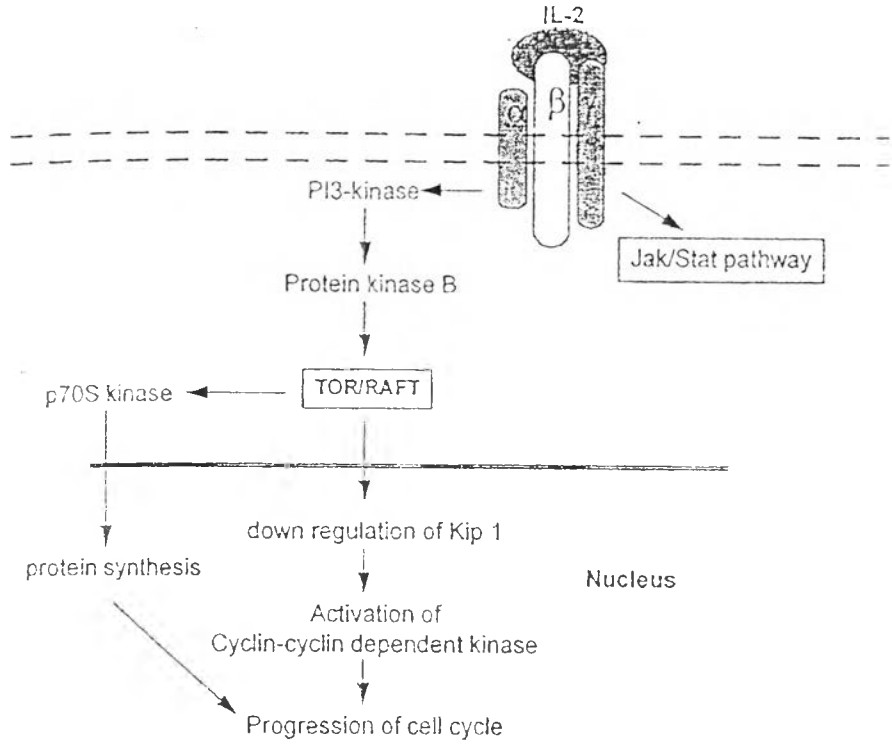
ผลลัพธ์ที่ได้จากกระตุ้นเซลล์ด้วยสัญญาณที่ 2 นำมาซึ่ง 1) การลดความจำเป็นที่จะต้องใช้ปริมาณ antigen จำนวนมากเพื่อกระตุ้น T_H cell (antigenic stimulation threshold) โดยปกติ T_H cell จะตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีนั้นจะต้องได้รับการกระตุ้นจาก antigen ในปริมาณที่พอเหมาะ 2) stabilize cytokine transcription gene product ได้แก่ IL-2,4,IFNγ และ TNFα หลังกระตุ้นด้วยสัญญาณที่ 1 นำมาซึ่งการเกิดสัญญาณที่ 3 ต่อไป 3) รักษาระดับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ โดยการเพิ่มขึ้นของ anti-apoptotic factor (bcl-xL) 4) สร้างสารที่จำเป็นในการผลักดันให้ T_H cell เข้าสู่ระยะ S phase ร่วมกับ signal 1 5) ป้องกัน T_H cell ที่ได้รับการกระตุ้น เกิดภาวะ anergy รูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดง transmembrane signal ที่เกิดจากการกระตุ้น CD28 บนผิวเซลล์ นำมาซึ่งการกระตุ้นเอ็นซัยม์ phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI-3 kinase) ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนต่างๆ มากมายภายในเซลล์ คำย่อ : PtdIns $(3,4,5)P_3$ = phosphatidyl-inositol 3,4,5 triphosphate, PKC = protein kinase C, JNK = Janus kinase, AP-1 = activator protein 1, NF-AT = Nuclear factor of activated T cell, NF-KB = Nuclear factor-kapper B, IL-2 = interleukin-2[27]



รูปที่ 15 แสดงผลของ CD28 costimulatory signal ในการกระตุ้น helper T cell ด้านขวาแสดงผลลัพธ์ที่ได้จากการมี costimulatory signal ร่วมกับ signal 1 (trimolecular complex signal) ด้านซ้าย แสดงผลลัพธ์ที่ได้จากการขาด costimulatory signal ในการกระตุ้น helper T cell[25]



รูปที่ 16 แสดงส่วนประกอบและผลลัพธ์จากการกระตุ้นตัวรับของ IL-2 (IL-2 receptor) คำย่อ : TOR = Targets of rapamycin, PI-3-kinase = phosphatidyl-inositol 3-kinase[27]

โดยสรุปหลังจากสิ้นสุดการกระตุ้น naïve T_H cell ด้วยสัญญาณที่ 1 และ 2 จะก่อให้เกิดการสร้าง IL-2 และ growth factor ต่างๆ รวมทั้งตัวรับของ growth factor เหล่านั้นนำมาซึ่งการเกิดสัญญาณที่ 3 ต่อไป มีเพียงสัญญาณที่ 1 เท่านั้นที่อาศัยการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง T_H cell และ alloantigen (antigen specific activation) ต่างสัญญาณที่ 2 และ costimulatory signal ที่ไม่ต้องอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะดังกล่าว

2.6.4 cytokines as mediator of productive T-cell coactivation (signal 3) รูปที่ 16

IL-2 และ growth factor ต่างๆ ที่ได้จากสัญญาณที่ 1 และ 2 จะร่วมกันกับสัญญาณที่ 1 และ 2 ก่อให้เกิดการกระตุ้น naïve T_H cell จนสมบูรณ์ก่อให้เกิดการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงตัวเองเป็น activated T_H cell โดย IL-2 อาจได้มาจากเซลล์เดียวกัน (autocrine effect) หรือ T_H cell อื่นในบริเวณใกล้เคียงกัน (paracrine effect)

การออกฤทธิ์ของ IL-2 ต้องอาศัยการจับกับตัวรับเฉพาะ (IL-2 receptor : IL2R) บนผิว activated T_H cell (ปกติไม่พบ IL-2R บน resting T_H cell) ซึ่งตัวรับนี้ประกอบด้วย transmembrane protein chain 3 ส่วน คือ CD25, CD122 และ CD132 มีเพียง CD25 segment

ของ IL-2R เท่านั้นที่สามารถถูกยับยั้งด้วย monoclonal antibodies ได้แก่ fully humanized (daclizumab) และchimeric (basiliximab) ดังนั้นจึงได้นำยาเหล่านี้มาใช้ป้องกันการเกิด acute graft rejection ในปัจจุบัน

หลังจาก IL-2 จับกับ IL-2R บนผิวเซลล์จะเกิดสัญญาณ ผ่านเข้าไปภายในเซลล์เพื่อกระตุ้น multifunctional phosphatidyl-inositol kinase-mamalian target of rapamycin (mTOR) เดิมมีชื่อว่า FRAP หรือ RAFT ซึ่ง mTOR นี้เป็นตัวสำคัญในการกระตุ้นสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อ cell cycle control ได้แก่ cyclin และ CDK ดังได้กล่าวแล้วตอนต้น mTOR ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญคือ $p70^{56}$ kinase ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ PO_4^{3-} เข้าไปใน 40 S ribosomal protein $P70^{56}$ และ protein phosphatase 2A (PP2A) ซึ่ง down regulation Kip1 ส่งผลให้เซลล์เคลื่อนที่ผ่าน G1 เข้าสู่ระยะ S phase นำมาซึ่งการแบ่งตัวของเซลล์ในที่สุด พบว่ายา rapamycin (sirolimus) สามารถยับยั้งขบวนการนี้โดยจับกับ FKBP ภายในเซลล์ นำมาซึ่งการการยับยั้ง mTOR, การเพิ่มความคงทน (stability) ของ $P27^{kip}$ ซึ่งเป็นตัวinhibit CDK2/ cyclin D , ยับยั้งขบวนการ hyperphosphorylation ของ retinoblastoma protein และลด E2F DNA dependent factor ซึ่งขบวนการทั้งหมดนี้จะส่งผลให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์ ในระยะ restriction point ระหว่าง G1 และ S phase นอกจากนี้ sirolimus ยังมีคุณสมบัติ promote ขบวนการ apoptosis โดยการลด Bcl-2 activity

โดยสรุปเริ่มต้นจากการกระตุ้น signal การกระตุ้น T_H cell ทั้งหมดเพื่อให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน (เข้าสู่ M phase) โดยขั้นตอน surface receptors ผ่าน signal transduction และ transcription factors ก่อให้เกิดการสร้าง gene products และโปรตีนต่าง ๆ ที่จำเป็นในขบวนการแบ่งตัว เช่น growth factor, growth promotor, cytokine และเอนไซม์ต่าง ๆ ในขบวนการสร้าง purine และ pyrimidine หลังจากนั้นเซลล์ก็จะเข้าสู่ระยะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation)

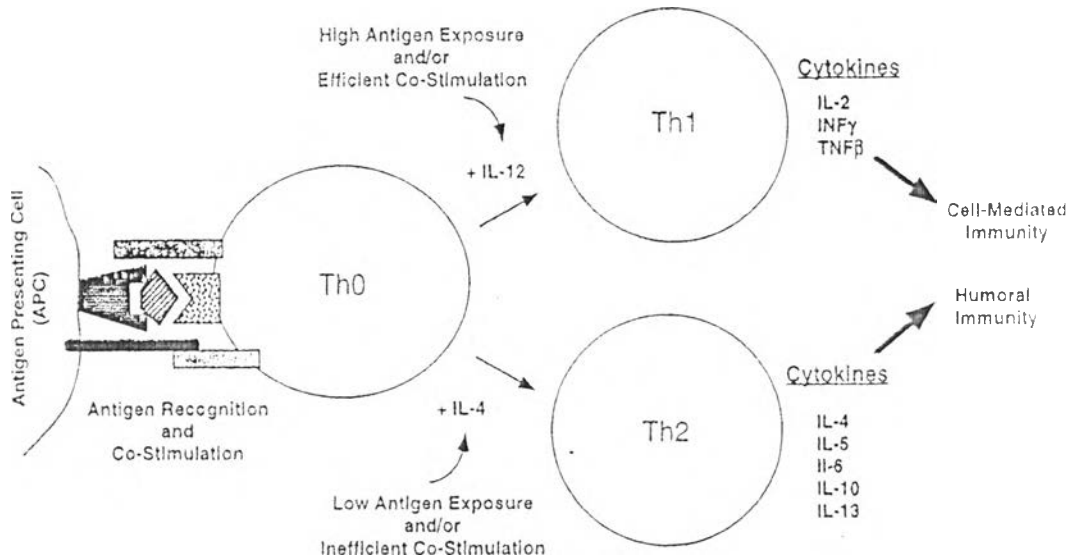
2.7 ระยะการตอบสนองของ helper T cell (T_H cell effector phase)

หลังจาก naïve T_H cell ได้รับการกระตุ้นและเปลี่ยนแปลงตนเองไปเป็น activated T_H cell จะเคลื่อนที่ออกจากต่อมน้ำเหลือง และม้ามเข้ามายังบริเวณที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยอาศัยการช่วยเหลือของ chemokine และ adhesions ที่สร้างจากเซลล์ที่ได้รับการบาดเจ็บในตำแหน่งที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ พบว่า activated T_H cell เหล่านี้มีคุณสมบัติสร้างสารต่างๆ มากมายซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้น CD_8^+ T cell ให้กลายเป็น cytotoxic T cell, กระตุ้น macrophage และ stromal cell ให้เกิดปฏิกิริยา delayed type hypersensitivity และกระตุ้น B lymphocyte ให้สร้างแอนติบอดีย์ออกมาทำลาย alloantigen เรียกสารต่างๆ ที่ T lymphocyte สร้างนี้ว่า cytokine

2.7.1 cytokine เป็น polypeptides หรือ glycoprotein ที่ตอบสนองไม่จำเพาะต่อแอนติเจนออกฤทธิ์โดยอาศัยการจับกับตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ โดยทั่วไปมีขนาด 15 ถึง 25 kD มีระยะเวลาการออกฤทธิ์สั้น และมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์ (CMIR) และชนิดไม่อาศัยเซลล์ (HIR) โดยทำหน้าที่เป็น

1. ตัวกระตุ้นขบวนการอักเสบ (proinflammation) และตัวยับยั้งขบวนการอักเสบ (antiinflamma-tion)
2. ตัวกระตุ้น cell growth, proliferentiation differentiation
3. ตัวกระตุ้นและยับยั้งการตายของเซลล์ต่างๆ โดยผ่านขบวนการ apoptosis
4. ตัวกระตุ้นให้เกิดขบวนการ fibrogenesis และ tissue remodeling
5. chemotactic factor จะกล่าวแยกในหัวข้อ 6.2 พบว่า cytokine ทุกชนิดมีคุณสมบัติร่วมกัน 4 ประการคือ 1) redundancy หมายถึง cytokine มากกว่า 1 ชนิดสามารถออกฤทธิ์คล้ายกัน พบหลักฐานหลายประการสนับสนุนคุณสมบัติ redundancy เช่น ตัวรับของ IL-2,4,7,9 และ 15 ประกอบด้วย γ chain เหมือนกัน ซึ่ง γ chain นี้มีบทบาทสำคัญในขบวนการ signal transduction ของ receptor นอกจากนี้มีการศึกษา knock-out ยีนที่ทำหน้าที่สร้าง cytokine ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการ acute rejection ได้แก่ IL-2, 4 และ IFN γ ในสัตว์ทดลองก็ไม่ปรากฏว่าสามารถหยุดยั้งขบวนการ rejection ได้ ดังนั้นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยากดภูมิคุ้มกันในอนาคตจึงไม่ควรยับยั้งการสร้าง cytokine แต่ละชนิด แต่ควรอยู่ในตำแหน่งตัวรับของ cytokine เป็นหลัก 2) pleiotropic activity หมายถึง cytokine 1 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างขวางและมีผลต่อเซลล์หลายชนิด 3) cascade formation หมายถึง cytokine ที่สร้างออกมาก่อนจะสามารถกระตุ้นการสร้างและการปลดปล่อย cytokine อีกชนิดถัดมา 4) amplification หมายถึง cytokine บางตัวมีฤทธิ์กระตุ้นให้มีการสร้าง cytokine หรือ cytokine receptor สำหรับตัวเองเพิ่มขึ้นเพื่อขยายขนาดปฏิกิริยา

สามารถแบ่ง T_H cell ย่อยออกโดยพิจารณาจากชนิดและคุณสมบัติของ cytokine ที่สร้างได้เป็น 3 กลุ่ม คือ T_{H0}, T_{H1}, และ T_{H2} cell ดังรูปที่ 17 ตารางที่ 5 และ 6



รูปที่ 17 แสดง helper T (T_H) cell ทั้ง 3 ชนิด เริ่มต้นจาก naïve Th cell (Th0) หลังได้รับการกระตุ้นด้วย antigen presenting cell จะเปลี่ยนตัวเองเป็น 1) activated Th1 ซึ่งมีคุณสมบัติสร้าง cytokine หลายชนิด เช่น interleukin 2 (IL-2), interferon-gamma (IFN γ) และ tumor necrotic factor beta (TNF β) ที่จำเป็นในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดผ่านเซลล์ (cell-mediated immunity) โดยอาศัยการช่วยเหลือจาก interleukin 12 (IL-12) 2) activated Th2 ซึ่งมีคุณสมบัติสร้าง cytokine หลายชนิด เช่น interleukin 4,5,6,10 และ 13 ที่จำเป็นในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่ผ่านเซลล์ (humoral immunity) โดยอาศัยการช่วยเหลือจาก interleukin 4 (IL-4)

ตารางที่ 5 สรุปหน้าที่ของ cytokine ชนิดต่าง ๆ จำแนกตามประเภทของ T_H cell

T_{H1} cell		T_{H2} cell		
IFN γ (สร้างจาก T cells, NK cells)	IL-2 (สร้างจาก T cells)	IL-4 (สร้างจาก T cells, mast cells และ basophils)	IL-5 (สร้างจาก T cells และ mast cell)	IL-10 (สร้างจาก T cells และ macrophage)
Activates and recruits macrophage inhibits and migration of macrophage helps to generate cytotoxic T cells Increase MHC class I and II expression may support proliferation and Ig secretion of B cells Leads predominantly to production of Ab of IgG 2 isotype High amount of IFN-γ can suppress or kill activated B cells	Most effective for the generation of cytotoxic T cells Stimulates prolifertion of CD4	Serves as T cell growth factor promotes T_{H2} differentiation helps to generate cytotoxic T cells activates resting B cells to proliferate and differentiate Increase MHC class II and B7 on B cells provokes IgE และ IgG, production by B cells increases expression of adhesion molecules on endothelium is chemoattractant for macrophages	Helps to generate cytotoxic T cell activates resting B cell to proliferate and differentiate	Potent suppressor of macrophage and T cell function Decrease MHC class II and B7 expression on monocyte does not effect alloantigen presentation by other APC's Enhances CTL proliferation and cytotoxicity stimulates monocyte Fcy RI expression and ADCC can suppress T_{H1} cells

ตารางที่ 5 (ต่อ) สรุปหน้าที่ของ cytokine ชนิดต่าง ๆ จำแนกตามประเภทของ T_H cell

Can inhibit T_{H2} clones Increases the secretion of inflammatory mediators such as IL-1 and TNF-α				

ก. T_{H0} cell หรือ naïve T_H cell สร้าง cytokine เฉพาะ IL-2 เป็นตัวตั้งต้นของทั้ง T_{H1} และ T_{H2}

ข. T_{H1} cell สร้าง cytokine ชนิด IL-2, IFNγ, TNFα และ lymphotoxin (perforin และ granzyme) มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้น macrophage, NK cell และ cytotoxic T cell และแอนติบอดีย์ที่จำเป็นต่อขบวนการ cell cytotoxicity นำมาซึ่งการทำลายชนิด CMIR ได้แก่ lymphocyte mediated cytotoxicity, delayed type hypersensitivity และ alloantibody mediated complement and cell mediated cytotoxicity ตัวกระตุ้นสำคัญในการเปลี่ยน T_{H0} cell เป็น T_{H1} cell คือ IFNγ และ IL-2 ซึ่งสร้างมาจาก APC

ค. T_{H2} cell สร้าง cytokine ชนิด IL-4,5,6,9,10, และ 13 รวมทั้ง GM-CSF มีหน้าที่สำคัญ

1) ในการกระตุ้น B lymphocyte ให้เจริญเติบโต เปลี่ยนแปลงเป็น plasma cell ก่อให้เกิด Ig class switching (IgM→IgG, IgE) ซึ่งมีความสำคัญในขบวนการ HIR

2) การกระตุ้น inflammatory mediator releasing cell ได้แก่ eosinophil, basophil และ mast cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคภูมิแพ้ และขบวนการกำจัดพยาธิที่รุกรานเข้ามาในร่างกาย

3) ยับยั้งปฏิกิริยาชนิด CMIR และกระตุ้น T_H cell ให้เกิดการ tolerance ซึ่งเป็นขบวนการ counter regulation ของระบบภูมิคุ้มกันไม่ให้ตอบสนองมากเกินไป ตัวกระตุ้น T_{H0} cell ให้เปลี่ยนเป็น T_{H2} cell คือ IL-4 โดยที่ต้องไม่มี IL-12 อยู่

พบว่าในภาวะ acute graft rejection จะมีการสะสมของทั้ง T_{H1} และ T_{H2} cell ในกระแสเลือด และใน allograft แต่มี T_{H1} cell เด่นกว่า ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าปัจจัยใดเป็นตัวโน้มน้าวให้เกิดความสัมพันธ์เช่นนี้ เชื่อว่าส่วนหนึ่งเป็นผลจากขบวนการบาดเจ็บที่กล่าวแล้วข้างต้น, ขนาดของแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยาต่อ APC หรือการติดเชื้อ เช่น CMV เป็นต้น นอกจากนี้ T_H ทั้ง 2 ชนิด ยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานซึ่งกันและกันโดย IFN จาก T_{H1} สามารถยับยั้งการทำงานของ T_{H2} clone และ IL-10 จาก T_{H2} สามารถยับยั้งการทำงานของ T_{H1} clones

2.7.2 chemokine เป็น polypeptide เช่นเดียวกับ cytokine บางครั้งก็อาจถูกจัดอยู่เป็นชนิดหนึ่งของ cytokine มีคุณสมบัติสำคัญ คือ ชักนำให้เกิดการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาว มาชุมนุมบริเวณที่มีการอักเสบ ซึ่งมีความเข้มข้นของ chemokine สูง การออกฤทธิ์ของ chemokine เช่นเดียวกับ cytokine คือ จำเป็นต้องจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ ปัจจุบันพบ chemokine มากกว่า 40 ชนิด แต่ละชนิดมีโครงสร้างเป็นโปรตีนเหมือนกันร้อยละ 20 ถึง 70 แบ่งเป็นชนิดใหญ่ ตามตำแหน่ง N-terminal cysteine ในโครงสร้างได้เป็น 4 ชนิด คือ

ก. CXC chemokine (∝ chemokine) เป็น chemokine ที่มีกรดอะมิโน 1 ตัว แทรกอยู่ระหว่าง N-terminal cysteine 2 ตัว (ใช้ X แทน กรดอะมิโน) ได้แก่ IL-8, GOP-2. ENA-78 เป็นต้น ทั้งหมดมีคุณสมบัติดึงดูด neutrophil เป็นหลัก

ข. CC chemokine (β chemokine) เป็น chemokine ที่ไม่มีกรดอะมิโนแทรกระหว่าง N-terminal cysteine ได้แก่ eotaxin, monocyte/macrophage chemoattractant protein (MCP 1,2) macrophage inflammatory protein (MIP-1α, MIP-1β) และ regulation upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) ซึ่งมีคุณสมบัติชุมนุม eosinophil, monocyte/ macrophage และ lymphocyte ตามลำดับ (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในบท ANCA associated vasculitis และ Acute interstitial nephritis)

ตารางที่ 6 cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายอวัยวะ

Cytokine	Cell source	Cell target	Primary action
Interleukin-2	T cells	T cells	Growth, cytokine production
		NK cells	Growth, ↑ cytolytic function
		B cells	Growth, ↑ antibody synthesis
Interleukin-4	CD4+ cells, mast cells	T cells	Growth
		Macrophages	Inhibit activation
Transforming growth	T cells, macrophages	T cells	Inhibit activation and maturation
factor-beta		Macrophages	Inhibit activation
Gamma-interferon	T cells, NK cells	Macrophages	Activation
		Endothelial cells	Activation
		NK cells	Activation
			↑ Class I and class II MHC expression
Interleukin-10	T cells	Macrophages	Inhibit function
		B cells	Stimulation
Interleukin-12	T cells, B cells, NK cells, monocytes	NK cells	Stimulation
		T cells	Stimulate differentiation

ตารางที่ 6 (ต่อ) cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายอวัยวะ

Cytokine	Cell source	Cell target	Primary action
Interleukin-1	Macrophages, T cells,	Macrophages	↑ Acute phase reactants
	Epithelial and endothelial cells	Vascular endothelium	Inflammation
		Liver and hypothalamus	Fever
Tumor necrosis factor	Macrophages, T cells, NK cells,	Vascular endothelium	↑ Expression of adhesion molecules
	Mast cells	Neutrophils	Inflammation
		Macrophages	Fever
		Liver and hypothalamus	↑ Acute phase reactants
Interleukin-6	Macrophages, vascular endothelial	Liver	↑ Acute phase reactants (fibrinogen)
	Cells, fibroblasts, T cells	B cells	Growth, stimulate differentiation

MHC = major histocompatibility complex; NK = natural killer.

ค. C-Chemokine เป็น chemokine ที่มีเฉพาะ N-terminal cysteine เท่านั้น ในกลุ่มนี้มี chemokine ชนิดเดียวคือ lymphotactin มีหน้าที่ชุมนุม lymphocyte

ง. CX_3C chemokine เป็น chemokine ที่มีกรดอะมิโน 3 ตัวแทรก ระหว่าง N-terminal cystein ได้แก่ fractokine และ neurotactin

พบเซลล์จำนวนมากในบริเวณที่มีการอักเสบทั้งจากปฏิกิริยาตอบสนองต่อ allograft และปฏิกิริยาตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ ที่มีความสามารถสร้างและหลั่ง chemokine ได้แก่ endothelial cell, platelets, subendothelial tissue และ tissue macrophage.

2.8 ระยะปฏิบัติการ (effector phase)

หลังจาก T_H cell ถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง cytokine และ chemokine ต่างๆ ออกมาจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการชุมนุมของเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น lymphocyte, macrophage NK cell และ neutrophils นำมาซึ่งการทำลาย allograft โดยอาศัยปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างเซลล์และสารที่เซลล์สาร แบ่งปฏิกิริยาการทำลายออกเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.8.1 Cell mediated cytotoxicity เป็นขบวนการทำลายเซลล์ของ allograft โดยอาศัยความสามารถในการรับรู้ความเป็น non self antigen ของ effector cells 2 ชนิดคือ cytotoxic T cell และ Natural killer cell

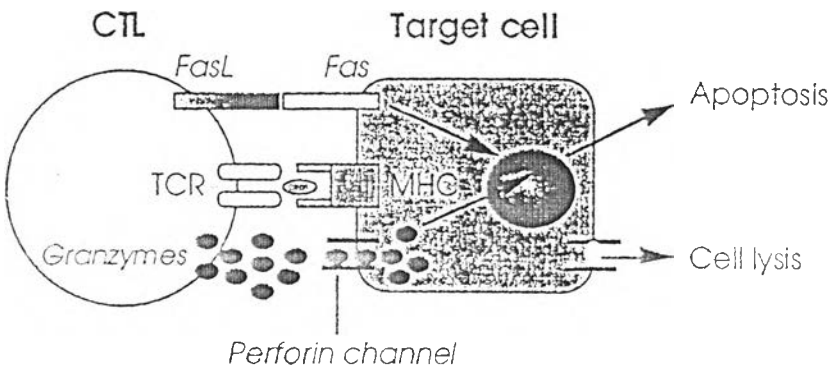
2.8.1.1 cytotoxic T cell (CTL)

การกระตุ้น CTL ให้พร้อมที่จะทำลายเซลล์ต่างๆ อาศัยการทำงานร่วมกันของ MHC class I direct allorecognition, costimulatory signal 2 (B7/CD28 pathway) และ growth factor ที่สำคัญคือ IL-2 โดยในระยะแรก IL-2 ส่วนใหญ่ได้จาก T_{H0} cell ต่อเมื่อ CTL ถูกกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วก็จะสามารถสร้าง IL-2 ย้อนกลับมากระตุ้นตนเองแทน (amplification) กลไกการทำลาย target cell อาศัยการทำงานร่วมกันของ (รูปที่ 18)

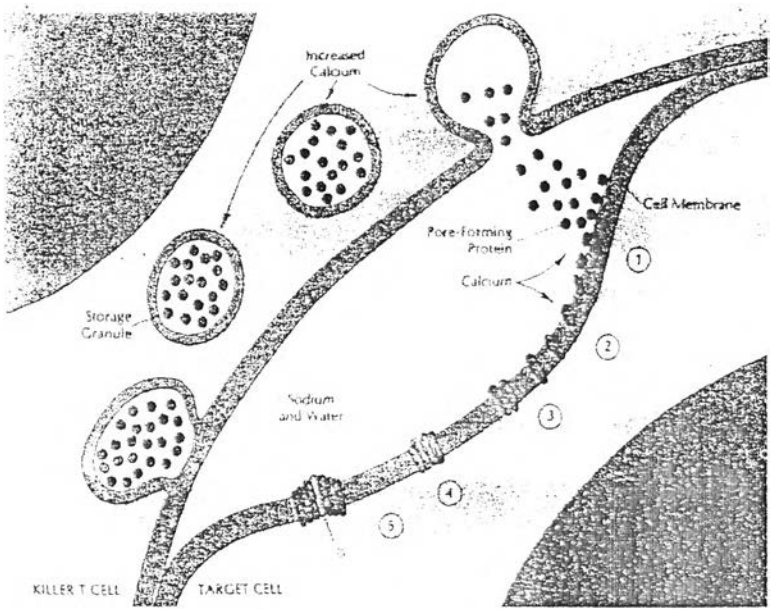
ก. perforin-granzyme mediated ปกติทั้ง perforin และ granzyme B (serine protease) จะสะสมอยู่ภายใน granule ของ CTL มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันในการทำลายเซลล์แปลกปลอมที่แฝงเข้ามาในร่างกายทั้งสอง จะถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์โดยขบวนการ exocytosis พบว่า perforin มีลักษณะและคุณสมบัติคล้ายกับ Cq complement คือเมื่อรวมตัวกัน (perforin polymerization) บนผิวของ membrane phosphalipid ของ target cell จะเกิดเป็น pore ขนาดประมาณ 200 $\mathring{A}$ คล้าย membrane attack protein (C5-q) pore ที่เกิดขึ้นนี้จะก่อให้เกิดการตายของ target cell 3 วิธีคือ 1) เป็นรูสำหรับให้น้ำผ่านเข้าไปภายในเซลล์

ส่งผลให้เกิดภาวะ hypoosmolarity และ osmolysis 2) เป็นทางผ่านเข้าของ Ca^{2+} ปริมาณมากจากภายนอกเซลล์ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นขบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ 3) เป็นชักนำเอา granzyme B เข้าไปกระตุ้นเอ็นซัยม์ caspases ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์สำคัญในขบวนการเกิด apoptosis (รูปที่ 19)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 แสดงกลไกการฆ่า target cell ของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของ Fas และ FasL, granzyme B และ perforin หลังจาก CTL รับรู้ความแตกต่างของ MHC class I บนผิวของ target cell[30]



รูปที่ 19 แสดงกลไกการทำลาย target cell โดย perforin ที่สะสมภายใน storage granule ของ killer T cell (NK cell. CTL) perforin มีลักษณะและคุณสมบัติคล้าย Cq complement หลังถูกปลดปล่อยจากเซลล์โดยขบวนการ exocytosis จะจับตัวกัน (polymerize) บน phospholipid membrane ของ target cell เกิดเป็นรูสำหรับให้สารน้ำและเกลือแร่เข้าสู่เซลล์[31]

ข. Fas-FasL interaction หลังจาก CTL ถูกกระตุ้นจะแสดง FasL บนผิวซึ่ง FasL จะวิ่งไปจับกับ Fas receptor บนผิวของ target cell ก่อให้เกิดการ apoptosis ของ target cell

โดยสรุป CTL ทำลาย target cell โดยกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายชนิด apoptosis เป็นส่วนใหญ่ผ่านการเพิ่ม intracellular Ca^{2+}, การจับกันระหว่าง Fas และ Fas L และ granzyme B

2.8.1.2 Natural killer cell (NK cell) เป็น lymphocyte ที่ไม่แสดงลักษณะของ T และ B cells บนผิวนั้นหมายถึงไม่มีทั้ง TCR และ surface Ig ที่จะจับกับแอนติเจน ดังนั้นกลไกการทำลาย alloantigen จึงไม่จำเพาะ มีความสามารถทำลายที่มีนิวเคลียสทุกชนิดที่ไม่แสดง MHC class I ที่ NK cell รู้จักบนผิว ดังนั้น target cells ของ NK cell คือ tumor cells, allograft และ viral infected cell เป็นต้น สามารถเพิ่ม activity ในการทำลาย target cells ของ NK cell

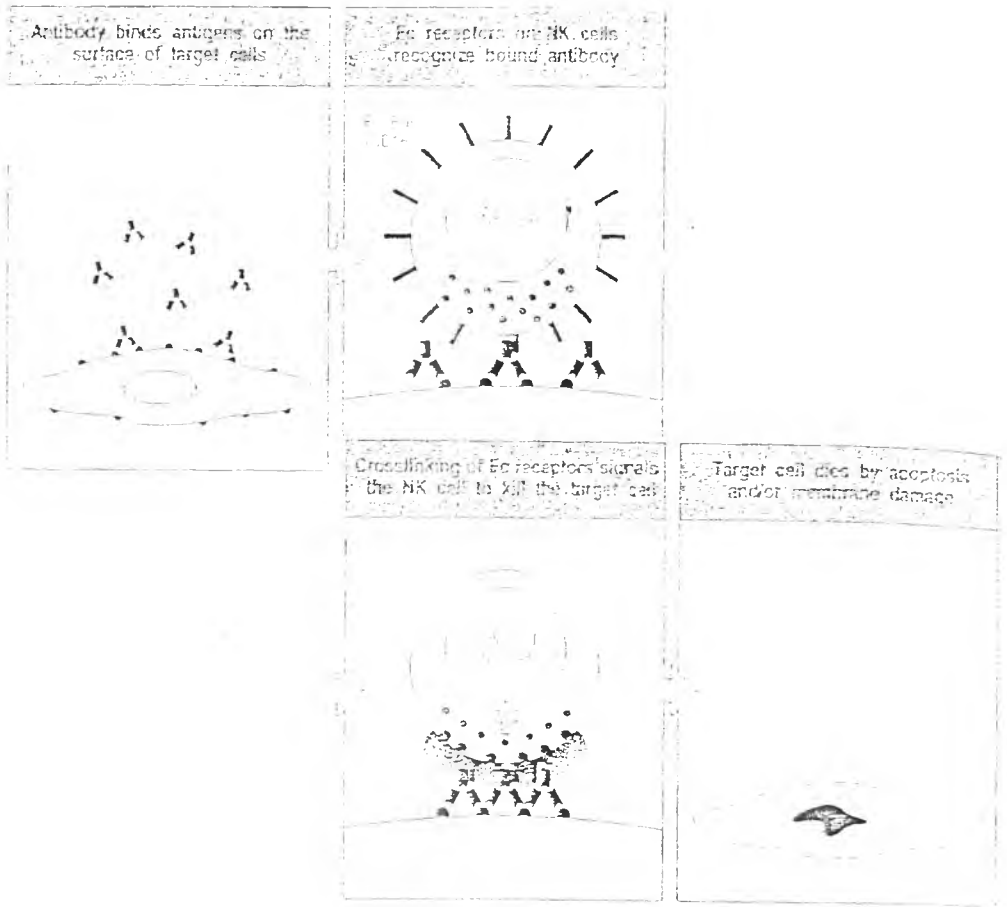
โดยการกระตุ้นด้วย IFN, TNF และ IL-2 กลไกการทำลายเซลล์ต่าง ๆ ของ NK cell เหมือน CTL นอกจากนี้ยังสามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ serine elastase ด้วย (รูปที่ 19)

2.8.2 Delayed type hypersensitivity (DTH)

เป็นปฏิกิริยาการทำลาย allograft โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด ได้แก่ sensitized T lymphocyte, macrophage, endothelial cell และ stromal cells และสารต่างๆ ที่เซลล์เหล่านี้สร้าง ได้แก่ lymphokine, monokine และ extracellular matrix จัดเป็นปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันไวชนิดหนึ่ง เริ่มต้นจาก activated T_{H1} cell สร้าง IFN γ, TNF α, IL-1 และ macrophage chemotactic factor ต่างๆ (MCP1,2; MIF1) กระตุ้นการชุมนุมและการทำหน้าที่ของ macrophage ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในขบวนการ natural immunity คือ มีคุณสมบัติจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยไม่จำเป็นต้องรู้จักกันมาก่อน นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติสร้างสารหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น 1) reactive oxygen species (ROS) และ proteases เช่นเดียวกับ neutrophil ก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการชุมนุมของเซลล์เหล่านี้ 2) vasoactive substance และ vascular activating factor ก่อให้เกิดการเพิ่ม permeability ของผนังหลอดเลือด เพื่อนำมาเซลล์และสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบมายังบริเวณที่มีการต่อต้าน graft ร่วมทั้งเปลี่ยนผนังหลอดเลือดให้พร้อมในขบวนการอักเสบ โดยการเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecule บนผิว เป็นต้น 3) stromal cell proliferation และ matrix production ได้แก่ platelet derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor beta (TGF β) นำมาซึ่งขบวนการเกิดพังผืดในบริเวณที่มีการอักเสบเพื่อช่วยล้อมรอบและจำกัดขอบเขตของปฏิกิริยาการอักเสบ

2.8.3 Alloantibodies

Alloantibodies สร้างจาก B lymphocyte โดยการช่วยเหลือของ T_H cell ชนิดของ alloantibodies ที่สร้างนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ cytokine ที่ผลิตจาก T_H cell เป็นหลัก ในกรณี T_{H1} cytokine จะก่อให้เกิดการสร้าง alloantibodies ชนิด IgG_1 และ IgG_2 แต่ในกรณี TH2 cytokine จะก่อให้เกิดการสร้าง alloantibodies ชนิด IgG_1, IgG_4, IgA และ IgE ซึ่งแต่ละ isotype และ subtype ของ alloantibodies มีคุณสมบัติในการจับและการตอบสนองต่อแอนติเจนแตกต่างกันขึ้นกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจนของ alloantibodies ใน acute rejection เชื่อว่าส่วนใหญ่จะเป็นตัวส่งเสริมให้ขบวนการอักเสบรุนแรงขึ้น เช่น กระตุ้นปฏิกิริยา complement, ช่วยในขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของ macrophage (opsonization) และช่วยในขบวนการทำลายเซลล์แปลกปลอมของ CTL และ NK cell (antibody dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC) รูปที่ 20

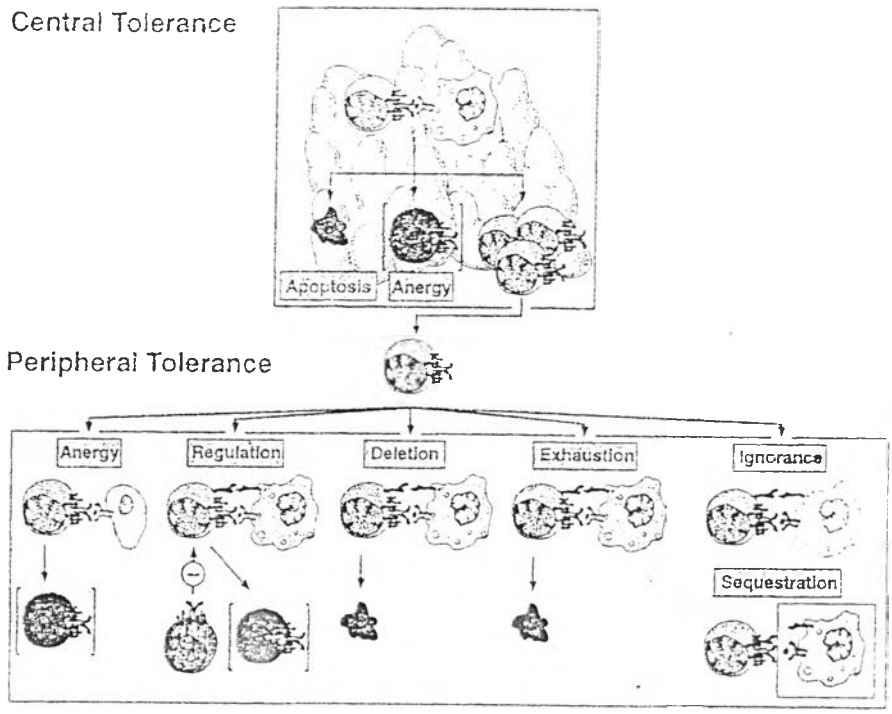


รูปที่ 20 แสดงขบวนการ antibody dependent cytotoxicity (ADCC) ซึ่งเป็นกลไกการทำลาย target cell โดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง killer cell (NK cell หรือ CTL) กับ alloantibodies[32]

2.9 Regulatory phase

เป็นระยะที่ควบคุมปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาวะสมดุล เพื่อป้องกันไม่ให้ปฏิกิริยาเกิดมากเกินไปนำไปจนสู่ภาวะ autoimmunity พบว่าภายหลังจากขบวนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่แผงมาได้หมด การตอบสนองส่วนใหญ่จะกลับคืนสู่สภาวะปกติ (self limited) โดย lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นแล้ว จะเกิดขบวนการ apoptosis เพื่อลดจำนวนเซลล์ลง (clonal contraction) มีส่วนน้อยที่เหลือรอด กลายเป็น memory T cell เพื่อคอยจดจำและตอบสนองต่อแอนติเจนเดิมที่อาจจะเข้ามาใหม่ ซึ่งขบวนการนี้อาศัยการทำงานร่วมกันของ suppressor T cell และกลไกต่าง ๆ เช่น activated induced apoptosis และ idiotypic regulation ในทางตรงข้ามหากสิ่งแปลกปลอมไม่สามารถกำจัดได้หมด เช่น ในการปลูกถ่ายอวัยวะปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันก็จะยังคงอยู่ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นจะต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกันต่อเนื่องในระยะยาว ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงที่สำคัญ คือ ภาวะการติดเชื้อ และเนื้องอก ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามศึกษากลไก immune regulation

เพิ่มขึ้น เพื่อหวังจะหยุดการใช้ยากดภูมิคุ้มกันในระยะยาว ซึ่งจะกล่าวเฉพาะกลไกที่มีการศึกษาและให้ความสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน



รูปที่ 21 แสดงกลไกในการเกิด central และ peripheral tolerance ของ T lymphocyte ต่อ self antigen[25]

2.9.1 immunologic tolerance เป็นสภาวะที่ร่างกายไม่มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อ แอนติเจนใดแอนติเจนหนึ่ง แม้ว่าจะให้แอนติเจนนั้นซ้ำกี่ครั้งก็ตาม แต่ถ้าให้แอนติเจนอื่นเข้าไป T cell ก็ยังสามารถตอบสนองได้เป็นปกติ ภาวะนี้อาจเกิดอย่างสมบูรณ์ (complete) หรือไม่สมบูรณ์ (partial) ก็ได้ คือ มีการตอบสนองบ้างแต่ลดความรุนแรงลง แบ่งการเกิด tolerance ออกเป็น 2 ชนิด ตามตำแหน่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการ tolerance (รูปที่ 21)

ก) central tolerance คือภาวะ tolerance ที่เกิดตั้งแต่ T lymphocyte เจริญเติบโตใน thymus gland ขบวนการนี้แม้ว่าจะสามารถป้องกันไม่ให้ร่างกายเกิดภาวะ autoimmunity ได้แต่ไม่สามารถป้องกันได้อย่างเต็มที่ จำเป็นต้องมีภาวะ peripheral tolerance ช่วย เชื่อว่ากลไกการ tolerance เกิดจากการ anergy หรือ deletion ของ T lymphocyte ดังได้กล่าวแล้วในเรื่อง clonal selection

ข) peripheral tolerance เป็นภาวะ tolerance ที่เกิดขึ้นภายหลังจาก T lymphocyte เจริญเติบโตเคลื่อนที่ออกจาก thymus gland เข้ามาอยู่ใน lymphnode พบกลไกอย่างน้อย 6 ชนิด ในการเกิด peripheral tolerance ดังนี้

ข.1) Anergy เป็นภาวะ hyporesponsive ของ T-cell antigen/MHC complex เนื่องจากขาด costimulation หรือ signal 2 สามารถแก้ไขภาวะ anergy โดยการกระตุ้น T lymphocyte ด้วย cytokine

ข.2) Regulations (suppression) หมายถึงขบวนการที่ปฏิกิริยาการเกิดภูมิคุ้มกันโน้มเอียงไปด้าน T_{H2} มากกว่า T_{H1} ส่งผลให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาการตอบสนองภูมิคุ้มกันชนิด CMIR

ข.3) Deletion เป็นขบวนการตายของ T lymphocyte หลังจาก TCR จับกับ ligand ที่เป็น self antigen ซึ่งกลไกการเกิดคล้ายกับภาวะ central tolerance แต่ภาวะนี้มีความสำคัญน้อยกว่าขบวนการอื่นในการเหนี่ยวนำให้ T lymphocyte เกิด peripheral tolerance

ข.4) Exhaustion เป็นขบวนการตายของ T lymphocyte ที่กระตุ้นผ่าน Fas : Fas ligand (CD95 : CD95L) หรือผ่าน TNF-α หลังจาก T lymphocyte ได้รับการกระตุ้นซ้ำๆ กันจาก self antigen ปริมาณมากติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน

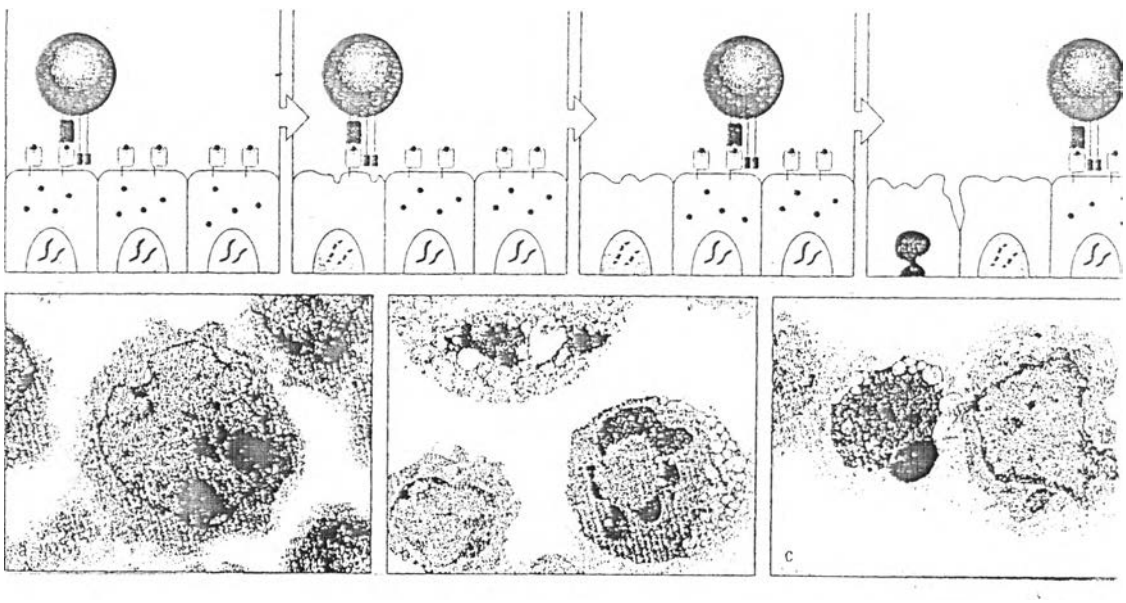
ข.5) Ignorance เป็นการไม่ตอบสนองของ T lymphocyte หลังจาก TCR จับกับ self peptide คล้ายกับภาวะ anergy แต่ต่างกันตรงที่ T lymphocyte ในภาวะนี้ยังสามารถ proliferation ได้ สามารถกระตุ้น T lymphocyte ให้กลับมาตอบสนองต่อ antigen เดิมใหม่ได้ โดยการเปลี่ยนชนิดของ APC แสดงถึงความสำคัญของ APC ในระบบการตอบสนองของ T-cell

ข.6) Sequestration เป็นภาวะ tolerance ที่เกิดเนื่องจาก self antigen อยู่ในบริเวณพิเศษ (privilege area) ที่ T lymphocyte ไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ เช่น ในระบบประสาทส่วนกลางหรือ T lymphocyte เข้าได้แต่ถูกทำลายจนหมด เช่น testis เนื่องจาก stromal tissue บริเวณนี้มี Fas ligand ปริมาณมากบนผิวเซลล์

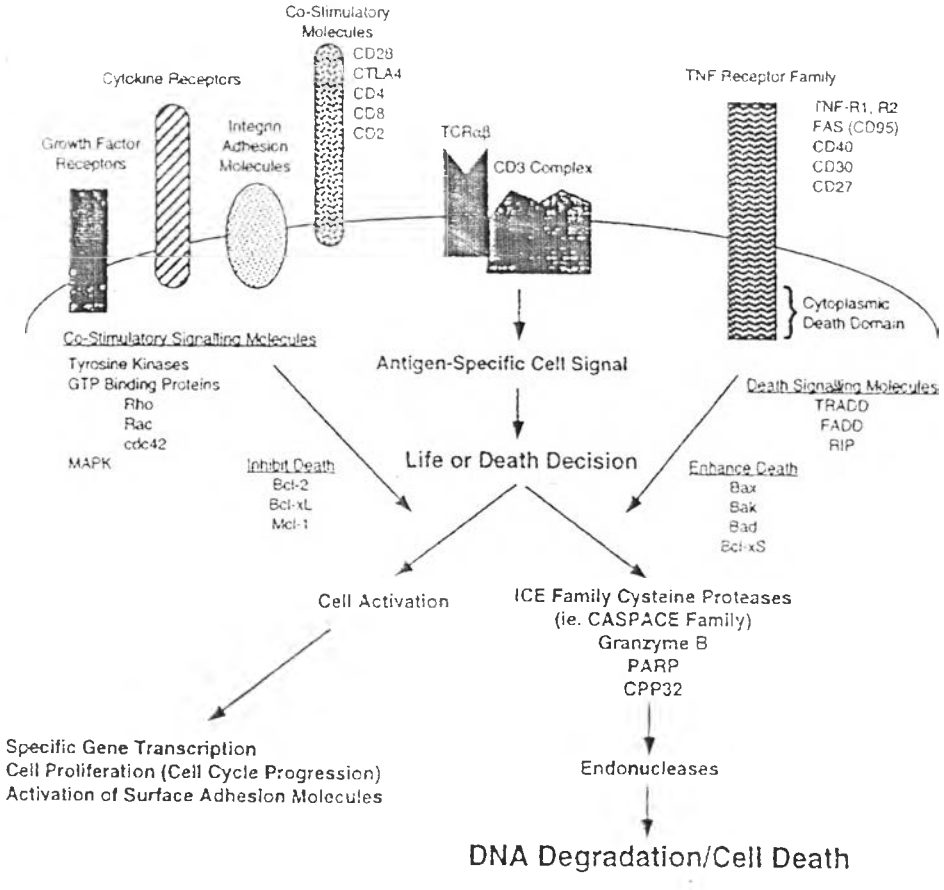
2.9.2 activated induced cell death (AICD)

หลังจาก T lymphocyte ได้รับการกระตุ้นซ้ำๆ กันต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน แทนที่จะเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ตามปกติ แต่จะเกิดขบวนการตรงกันข้าม คือ 1) กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์โดยขบวนการ apoptosis จากการจับกันระหว่าง Fas และ Fas L 2) กระตุ้นให้เกิด T cell anergy ผ่านกลไกการจับกันระหว่าง cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA4 ; CD152) และ B7.1, B7.2 เรียกการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ว่า activated induced cell death (AICD)

2.9.2.1 apoptosis เป็นกลไกการตายของเซลล์ชนิดหนึ่งหลังถูกกระตุ้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยภายนอก เช่น cell death factors, growth factor withdrawal หรือ ปัจจัยภายใน เช่น DNA damage หรือ ความผิดปกติของ cellular mechanism ต่าง ๆ กระบวนการนี้จำเป็นต้องอาศัยพลังงานและการกระตุ้นเอนไซม์ caspases ซึ่งมีคุณสมบัติย่อยสลายโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่มีกรดอะมิโน cysteine เป็นส่วนประกอบ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในนิวเคลียส และ cytoplasm ตามลำดับดังนี้ คือ cell shrinkage, DNA fragmentation, nuclear condensation, membrane blebbing และเกิดเป็น apoptotic bodies ตามมาด้วยการจับกินของ macrophage อย่างรวดเร็วไม่ทันที่จะเกิดขบวนการอักเสบขึ้นภายในร่างกาย cell death factor และ cell death receptor ที่สำคัญ ได้แก่ Fas ligand (FasL) : Fas (CD95) และ TNF : TNFR FasL และ TNF เป็น cytokine ชนิดหนึ่งในตระกูล tumor necrotic factor ส่วน Fas และ TNFR เป็น transmembrane protein สำหรับ cell death receptor ความผิดปกติในขบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดภาวะ autoimmunity หรือการสูญเสีย self tolerance (รูปที่ 22, 23)



รูปที่ 22 แสดงการตายของเซลล์ด้วยวิธี apoptosis หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย FasL บนผิวของ T lymphocyte a) แสดง cell shrinkage และ nuclear condensation b) แสดง marked nuclear condensation และ membrane blebbing c) แสดง apoptotic bodies[33]



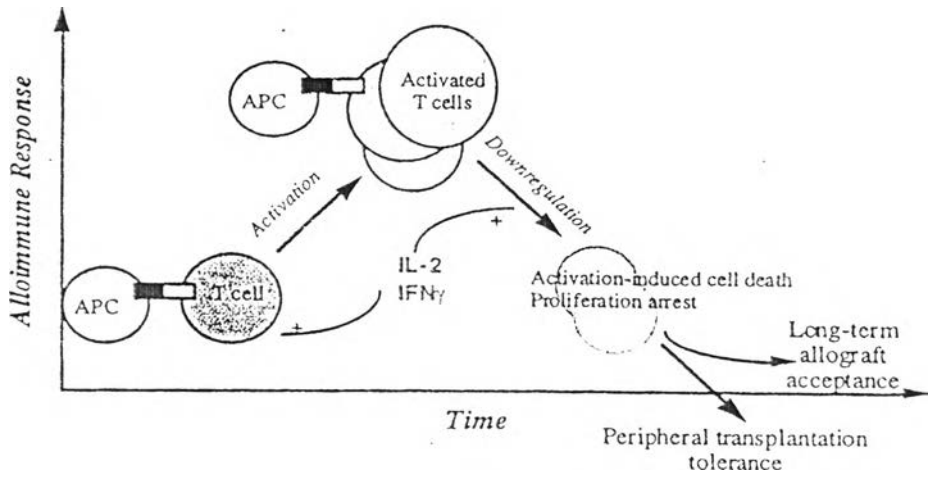
รูปที่ 23 แสดงกลไกการเกิดขบวนการ apoptosis ภายในเซลล์โดยผ่านตัวกระตุ้น ได้แก่ Bax, Bak, Bad และ Bcl-xS และตัวยับยั้ง ได้แก่ Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 นำมาซึ่งการกระตุ้นเอ็นซัยม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนและ nucleus ได้แก่ caspase, endonuclease จนเกิด DNA degradation และ cell death ในที่สุด[33]

ปัจจุบันพบยาหลายชนิดที่มีคุณสมบัติชักนำ (induce) ให้เกิดขบวนการ apoptosis ได้แก่

- OKT_3 (monoclonal anti CD3 antibody) จะกระตุ้นให้มีการสร้าง CD95-L (FasL) และ TNFα มากขึ้น ทำให้เกิดการ apoptosis ของ activated lymphocyte
- Polyclonal antithymocyte หรือ antilymphocyte globulins (ATGs หรือ ALGs) เป็น T-cell activating antibody ATGs สามารถกระตุ้นการ apoptosis ของ resting T cell ผ่าน CD95-L และ activated T cell ผ่านขบวนการอื่นที่ไม่ใช่ CD95-L
- Monoclonal anti-CD2 antibodies สามารถกระตุ้น apoptosis ผ่านทาง CD95-L ได้เช่นกัน
- Methotrexate (MTX) สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดย pathway อื่นที่ไม่ใช่ CD95-L
- Daunorubicin และ doxorubicin ทำให้เกิด apoptosis ของทั้ง resting และ activated T cell

2.9.2.2 AICD induced by Fas and FasL

พบ cell death receptor หลายชนิด ได้แก่ Fas (CD95), TNFR, CR30. TRAMP (CD3), และ TRAIL receptor (CD4) บนผิว T lymphocyte ที่มีความสามารถจับกับ cell death factor ก่อให้เกิดขบวนการ apoptosis ของ T_H cell โดยพบ cell death receptor เหล่านี้จะปรากฏบนผิวของ T_H cell หลังถูกกระตุ้นด้วย IL-2 นอกจากนี้ IL-2 ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการเกิด apoptosis ของ T_H cell โดยผ่านการลดการ expression ของ FLICE-like inhibitory protein (FLIP) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งสำคัญของ Fas signal ในสัตว์ทดลองที่ขาด IL-2 พบว่า T cells จะดื้อต่อการเกิด AICD ส่งผลให้เกิด severe autoimmune disease ได้ ตรงจุดนี้ทำให้ต้องหันมามองว่าในปัจจุบันมียาจำนวนมากที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและการออกฤทธิ์ของ IL-2 เช่น cyclosporin, tacrolimus, monoclonal anti-CD25 antibody ดังนั้นอาจส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถเกิด tolerance ต่อ allograft ได้ จึงจำเป็นต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกันต่อเนื่องไปตลอด (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่า interferon gamma (IFN γ) และ interleukin 2 (IL-2) มี 2 บทบาทซึ่งตรงข้ามกับบทบาทแรกคือ กระตุ้นให้ T lymphocyte แบ่งตัว เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงเป็น active form หลังจากสัมผัสกับแอนติเจนแปลกปลอมและบทบาทที่สองคือ กระตุ้นให้ T lymphocyte เกิดการตายโดยวิธี activated induced cell death หลังจากแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในช่วงแรก ซึ่งเป็นบทบาทสำคัญในการเกิด peripheral tolerance ต่อ albantigen[20]

2.9.2.3 cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) engagement

สามารถตรวจพบ CTLA-4 บนผิวของ T_H cell หลังการกระตุ้น CTLA-4 มีความสามารถในการจับกับ B7.1 และ B7.2 บนผิวของ APC ได้ดีกว่า CD28 มาก ผลของการจับกันระหว่าง ligand ทั้งสองนำมาซึ่งขบวนการหยุดยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และหยุดปฏิกิริยาตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากใน resting T_H cell ไม่มี CTLA-4 ดังนั้น CTLA-4 จึงทำหน้าที่เป็น negative feed back ที่สำคัญในการสิ้นสุดขบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจุบันได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการนำเอา CTLA-4 Ig มาใช้จับ ligand ดังกล่าวเพื่อกระตุ้นให้เกิด immunologic tolerance

2.10 ลักษณะทางพยาธิสภาพของไตที่ถูกปฏิเสธ

ในปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐานของการทำการตรวจชิ้นเนื้อของไตที่ปลูกถ่ายหรือการบอกถึงความรุนแรงของการเกิดการต่อต้านเนื้อเยื่อ ในปี พ.ศ. 2537 ได้มีการประชุมเพื่อกำหนดแนวทาง

ในการแบ่งแยกความรุนแรงของการต่อต้านเนื้อเยื่อไตที่ปลูกถ่ายโดยใช้ลักษณะทางพยาธิสภาพ ณ เมือง Banff ประเทศแคนนาดา ซึ่งได้ตีพิมพ์ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2535 และได้ปรับปรุงอีกครั้งในปี พ.ศ. 2537 และ พ.ศ. 2539 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันในนาม Banff 97 ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าว ได้ให้ความสำคัญของการเกิด vascular และ tubular lesion ใน rejection มากกว่าความรุนแรงของ cellular infiltration ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เกณฑ์การวินิจฉัยของ renal allograft biopsies **ของ** Banff 97[34]

1. Normal, see Definitions

2. Antibody-mediated rejection

Rejection demonstrated to be due, at least in part, to anti-donor antibody

A. Immediate (hyperacute)

B. Delayed (accelerated acute)

3. Borderline changes: "Suspicious" for acute rejection

This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of mild tubulitis

(1 to 4 mononuclear cells/tubular cross section) and at least i1

4. Acute/active rejection

Type (Grade)	Histopathological finding
IA	Cases with significant interstitial infiltration (> 25% of parenchyma affected) and foci of moderate tubulitis (>4 mononuclear cells/ tubular cross section or group of 1tubular cells)
IB	Cases with significant interstitial infiltration (> 25% of parenchyma affected) and foci of severe tubulitis (>10 mononuclear cells/ tubular cross section or group of 10 tubular cells)
IIA	Cases with mild to moderate intimal arteritis (v1)
IIB	Cases with severe intimal arteritis comprising > 25% of the luminal area (v2)

III	Cases with "transmural" arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells (v3 with accompanying lymphocytic inflammation)

5. Chronic/sclerosing allograft nephropathy[b]

Grade	Histopathological findings
Grade I (mild)	Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy without (a) or with (b) specific changes suggesting chronic rejection
Grade II (moderate)	Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (a) or (b)
Grade III (severe)	Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy and tubular loss (a) or (b)

6. Other — Changes not considered to be due to rejection,

The recommended format of report is a descriptive narrative sign out followed by numerical codes in parentheses. Categorization should in the first instance be based solely on pathologic changes, then integrated with clinical data as a second step. More than one diagnostic category may be used if appropriate.

[b]Glomerular and vascular lesions help define type of chronic nephropathy; chronic/recurrent rejection can be diagnosed if typical vascular lesions are seen.

2.10.1 ปริมาณของชิ้นเนื้อและวิธีการ

ในข้อกำหนดของ Banff กำหนดปริมาณของชิ้นเนื้อที่

1. พอเพียง (adequate) หมายถึง ชิ้นเนื้อที่ได้มานั้นต้องมี glomeruli อย่างน้อย 10 อัน ร่วมกับเส้นเลือดแดง 2 เส้น

2. ต่ำสุด (minimal sample) หมายถึง ชิ้นเนื้อที่ได้มานั้นมี glomeruli เท่ากับ 7 อัน ร่วมกับเส้นเลือดแดง 1 เส้น ทั้ง adequate และ minimal sample ควรจะมีส่วนของ cortex อย่างน้อย 2 แห่ง

3. ไม่พอเพียง (Inadequate) หมายถึง ชิ้นเนื้อที่ได้มานั้นมี ไม่มี glomeruli หรือเส้นเลือด ซึ่งชิ้นเนื้อที่ไม่พอเพียงนี้ไม่สามารถนำมาพิจารณาตัดสินว่าเกิดการต่อต้านเนื้อเยื่อหรือไม่

หลังจากได้ชิ้นเนื้อแล้วควรทำการตัดให้ได้ slide 7 แผ่น โดยแต่ละแผ่นมีความหนา 3-4 ไมครอน หลังจากนั้น นำมาย้อมด้วย

H & E (hematoxylin และ eosin) 3 แผ่น

PAS (periodic acid-Schiff reagent) และ/หรือ silver stain 3 แผ่น

Masson's Trichrom stain 1 แผ่น

การย้อมด้วย PAS หรือ silver เพื่อที่จะแยกให้เห็น basement membrane ชัดเจนยิ่งขึ้น ช่วยในการพิจารณาดูความรุนแรงของ tubulitis ซึ่งจะต้องอาศัยการนับจำนวนเซลล์ที่แทรกเข้าไปอยู่ระหว่าง tubular epithelium นอกจากนี้ยังใช้สังเกต tubular atrophy double contour of glomerular capillaries และ arteriolar hyalinosis ในได้อีกด้วย

สามารถย้อมสีด้วย Masson's Trichrome มีประโยชน์เพื่อค้นหา interstiterstitial fibrosis ได้ง่ายขึ้น

2.10.2 วิธีพิจารณาความรุนแรงในการต่อต้าน graft

การพิจารณาความรุนแรงของขบวนการ rejection แบ่งพิจารณาออกเป็นส่วน ๆ โดยแต่ละส่วนมีความรุนแรงตั้งแต่ 0-3 ดังนี้

1. GLOMERULUS (G)
2. INTERSTITIUM (I)
3. TUBULAR (T)
4. VESSEL (V)

2.10.2.1. การอักเสบของ glomeruli (glomerulonephritis) (ตารางที่ 8)

โดยปกติหลังจากทำการปลูกถ่ายไตแล้ว สามารถตรวจพบ mononuclear cells แทรกอยู่ภายใน glomeruli ร่วมกับการบวมของ endothelial cell ได้ แม้ว่าการพบ glomerulonephritis จะไม่สามารถแยกออกจาก acute graft rejection ได้ชัดเจนนัก แต่การพบมี endocapillary cell infiltration อาจบ่งชี้ไปทาง antibody-mediated rejection มากกว่า

แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับภาวะที่มีการอักเสบของ glomeruli (glomerulonephritis)

ตารางที่ 8 แสดงระดับความรุนแรงของ glomerulonephritis ("g")[34]

g0 = No glomerulitis
g1 = Glomerulitis น้อยกว่า ร้อยละ 25 ของ glomeruli ทั้งหมด
g2 = Segmental or global glomerulitis ร้อยละ 25 ถึง 75 ของ glomeruli ทั้งหมด
g3 = Glomerulitis (mostly global) มากกว่า ร้อยละ 75 ของ glomeruli ทั้งหมด

การพบ PMN ใน glomerular capillaries ไม่ได้บ่งถึง glomerulitis เสมอไป แต่อาจพบในภาวะอื่นได้อีก เช่น antibody-mediated rejection หรือระยะเริ่มต้นของ thrombotic microangiopathy

2.10.2.2 **การอักเสบของเนื้อเยื่อ** interstitium (interstitial inflammation) ตารางที่ 9

ลักษณะของ interstitial inflammation ไม่มีความจำเพาะและไม่มีอยู่ในเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะ rejection แต่การพบ inflammation ที่รุนแรงหรือกระจายทั่วไปก็อาจจะบ่งถึงการมีภาวะ rejection ได้ในการจำแนกเซลล์ต่าง ๆ ในภาวะ rejection ควรทำร่วมกันหลายวิธี

ได้แสดงการแบ่งระดับความรุนแรงของ Banff ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงระดับความรุนแรงของ mononuclear cell interstitial inflammation ("i")[34]

i0 – No or trivial interstitial inflammation (< 10% of unscarred parenchyma)
i1 – 10 to 25% of parenchyma inflamed
i2 – 26 to 50% of parenchyma inflamed
i3 – more than 50% of parenchyma inflamed

Indicate the presence of remarkable numbers of eosinophils, PMNI, or plasma cells (specify which) with an asterisk (*)

ได้แก่ การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา, กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยทั่วไปเซลล์ที่พบในปฏิกิริยา graft reject ส่วนใหญ่เป็น T lymphocyte (50%) รองลงมาเป็น macrophage (25%) และ monocyte ตามลำดับ หากพบ eosinophils, neutrophil หรือ plasma cell สะสมในบริเวณ interstitium มากกว่าร้อยละ 5 ของเซลล์ทั้งหมด ให้รายงาน "i" เพิ่มในการบอกความรุนแรงของโรคและต้องพิจารณาแยกภาวะการ

ติดเชื้อและภาวะ hypersensitivity ไว้ด้วย การพิจารณา interstitial inflammation จะต้องมีการอักเสบของชั้น cortex ร่วมด้วยอย่างน้อยร้อยละ 10 และต้องไม่พิจารณาเนื้อเยื่อ interstitium บริเวณที่มี fibrosis, immediate subcapsular cortex และชั้น adventitia รอบหลอดเลือดดำและท่อน้ำเหลืองขนาดใหญ่

2.10.2.3 **การอักเสบของท่อไต** (tubulitis) ตารางที่ 10

tubulitis และ arteritis ถือเป็น cardinal sign ของภาวะต่อต้าน graft โดยการบอกความรุนแรงของ tubulitis จะพิจารณาตามจำนวน mononuclear cell ที่แทรกอยู่ใน 1 พื้นที่หน้าตัดขวางของ tubule ที่มีการอักเสบรุนแรงที่สุด แต่ถ้า tubule ส่วนใหญ่ถูกตัดตามแนวยาวให้พิจารณานับจำนวน mononuclear cell ที่แทรกอยู่เฉลี่ยต่อจำนวน tubular epithelial cells 10 ตัว เนื่องจากการอักเสบของท่อไตพบได้เสมอใน atrophic tubules ดังนั้นจึงไม่แบ่งความรุนแรงของการอักเสบจากบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในระดับปานกลางถึงรุนแรง

ตารางที่ 10 แสดงระดับความรุนแรงของ tubulitis ("t")[34]

t_0	No mononuclear cells in tubules
t_1	Foci with 1 to 4 cells/tubular cross section or 10 tubular cells
t_2	Foci with 5 to 10 cells/tubular cross section
t_3	Foci with > 10 cells/tubular cross section, or the presence of at least two areas of tubular basement membrane destruction accompanied by i2/i3 inflammation and t2 tubulitis else where in the biosy.

2.10.2.4 **การอักเสบของหลอดเลือด** (vasculitis) ตารางที่ 11

Banff 97 พิจารณาความสำคัญของ intimal arteritis หรือ endothelialitis (mononuclear cell แทรกเข้าไปใต้ต่อชั้น endothelium) แยกจาก arteritis ที่มีการอักเสบในชั้น tunica media และ/หรือ fibrinoid necrosis ของผนังหลอดเลือด ในการบอกความรุนแรงของ vasculitis ให้พิจารณาจากหลอดเลือดที่มีการอักเสบมากที่สุดเช่นเดียวกับ tubulitis นอกจากนี้ในการรายงานต้องมีการบันทึกจำนวนของหลอดเลือดทั้งหมดที่มีในชิ้นเนื้อที่ตรวจ และจำนวนหลอดเลือดทั้งหมดที่มีการอักเสบ รวมทั้ง interstitial hemorrhage และ infarction เนื่องจากอาจเป็นลักษณะที่บ่งบอกถึงการมี severe arteritis ได้ทางอ้อม

ตารางที่11 แสดงระดับความรุนแรงของ internal arteritis ("v")[34]

v0 – No arteritis
v1 – Mild-to-moderate intimal arteritis in at least one arterial cross section
v2 – Severe intimal arteritis with at least 25% luminal area lost in at least one arterial cross section
v3 – Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid change and medial smooth muscle necrosis with lymphocytic infiltrate in vessel

2.10.3 การประเมินความรุนแรงของภาวะ acute rejection

หลังจากพิจารณาความรุนแรงแยกตามกายวิภาคของ nephron แล้ว จะนำผลที่ได้มารวมเพื่อบอกความรุนแรงโดยรวมของภาวะ acute rejection ซึ่งตาม Banff 97 ให้ความสำคัญกับการอักเสบของท่อไต (หัวข้อ 2.10.2.3) และหลอดเลือด (หัวข้อ 2.10.2.4) มากกว่าการอักเสบของ glomeruli (หัวข้อ 2.10.2.1) และ interstitium (หัวข้อ 2.10.2.2) เนื่องจากมีหลักฐานมากมายสนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อ graft survival และการตอบสนองต่อการรักษาโดย type I แสดงถึง tubulitis, type II แสดงถึง vascular rejection ที่มี intimal arteritis และ type III แสดงถึง severe vascular rejection ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด transmural arteritis หรือมี fibrinoid และ smooth muscle necrosis ส่วนในกรณีที่มีเพียง mild tubulitis และ/หรือ mild focal interstitial inflammation จัดอยู่ใน "borderline" (ตารางที่ 8)

2.11 แนวทางการวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค

acute graft rejection มักเกิดในช่วงแรกหลังผ่าตัด (60 วัน) ควรจะคิดถึงภาวะนี้เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของระดับซีรั่ม creatinine (Cr) ร่วมกับตรวจพบไข้ ปัสสาวะออกน้อย (oliguria) น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ขาบวม ความดันโลหิตสูง และกดเจ็บบริเวณ graft แต่ในปัจจุบันที่มีการใช้ cyclosporin กันอย่างแพร่หลายอาจจะไม่พบอาการอย่างอื่นนอกจากการมีระดับซีรั่ม Cr เพิ่มขึ้นเท่านั้น

เนื่องจากสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของระดับซีรั่มครีอะตินินมีมากมายเพื่อความสะดวกในการวินิจฉัยแยกโรคควรแยกพิจารณาออกตามระยะเวลาที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของระดับซีรั่มครีอะตินิน

2.11.1 immediate posttransplantation period หมายถึงการทำงานของ graft ผิดปกติ จนจำเป็นต้องได้รับการฟอกเลือดทดแทนภายในสัปดาห์แรกหลังผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ เรียกอีกชื่อว่า delayed graft function เนื่องจากส่วนใหญ่จะยังไม่เห็นการทำงานของ graft เลยหลังผ่าตัด สาเหตุของภาวะนี้ได้แก่

ก. postischemic acute tubular necrosis (ATN) เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มนี้เกิดได้บ่อยในผู้ป่วยที่มี cold ischemic time มากกว่า 24 ชั่วโมง, ได้รับ induction cyclosporin ขนาดมากกว่า 10 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก., ได้รับการฟอกเลือดด้วย bioincompatible membrane ภายใน 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด, อายุมาก และมี severe vascular disease เป็นต้น

ข. Hyperacute rejection (HAR) เป็น antibody-mediated rejection syndrome มักจะเกิดในเวลาเป็นชั่วโมงหลังจากผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ พบใน recipient ที่มี Ab ต่ออวัยวะของผู้ให้อยู่ก่อนแล้ว (preformed antibody) Ab นี้จะจับกับ endothelium ของ graft ก่อให้เกิดการกระตุ้น complement ตามมา Ab ที่พบส่วนใหญ่เป็น IgG Ab ต่อ MHC class I และ IgM Ab ต่อ A หรือ B blood group แต่ก็มีรายงานพบ Ab ต่อ endothelial-specific Ag และกับ MHC class II Ag ด้วย

ภาวะ hyperacute rejection มักจะถูกวินิจฉัยโดยศัลยแพทย์ที่ผ่าตัด เนื่องจาก graft ที่วางลงไปมีสีคล้ำไม่แดงเหมือนปกติ ไม่มีปัสสาวะและเมื่อทำ renal scan หรือ duplex doppler ไม่พบว่ามี blood flow มาเลี้ยง การทำ biopsy จะพบว่ามี intrarenal coagulopathy ร่วมกับ thrombi ใน small artery และ glomeruli อาจพบว่ามี renal necrosis ด้วย

ค. Accelerated rejection มักพบใน 2-5 วันหลังผ่าตัด อาจจะเกิดจากการได้รับ donor Ag มาก่อน occult T cell crossmatch หรือได้รับ graft ที่ positive B cell crossmatch ในการวินิจฉัยจำเป็นต้องใช้ renal biopsy ซึ่งมักจะเป็น cellular rejection

ง. atheroemboli และ thrombosis

ต้นเหตุของ emboli อาจมาจากหลอดเลือดของผู้ให้ (ในขณะ organ procurement หรือขณะทำการตรวจ angiogram) หรือผู้รับในกรณีที่สาเหตุของ emboli มาจากผู้บริจาค ส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่และมีโอกาสน้อยที่ graft จะฟื้นกลับมาทำงานได้

thrombosis ส่วนใหญ่เกิดร่วมกับภาวะ graft rejection แต่สามารถเกิดโดยลำพังซึ่งพบไม่บ่อย (อุบัติการเฉลี่ยร้อยละ 0.5 ถึง 6) มักพบในผู้ป่วยที่มี cold ischemic time นาน, ได้รับไตด้านขวาหรืออายุมาก

จ. Urinary tract obstruction

เกิดได้บ่อยจาก ureteral necrosis หรือ hematoma กดทับ เนื่องจากพบ allograft rejection ได้บ่อยในผู้ป่วย delayed graft function และเป็นการยากที่จะวินิจฉัยแยกโรค ดังนั้น หากทำ ultrasound ไม่พบลักษณะ urinary tract obstruction และ vascular thrombosis ให้พิจารณาตัดชิ้นเนื้อตรวจพยาธิทุกราย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง ได้แก่ อายุน้อย, cold ischemic time นานกว่า 24 ชั่วโมง, เคยผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ, ตั้งครรภ์หรือได้รับเลือดหรือผลิตภัณฑ์ของเลือด

2.11.2 early posttransplantation peroid หมายถึง การสูญเสียการทำงานของ graft หลังผ่าตัด 1 ถึง 12 สัปดาห์ สาเหตุของภาวะนี้ ได้แก่

ก. acute rejection เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุด

ข. cyclosporin หรือ tacrolimus nephrotoxic ยืนยันการวินิจฉัยโดยการวัดระดับ whole blood cyclosporin มีค่ามากกว่า 300 มก.ต่อ ดล.

ค. infection โดยเฉพาะเชื้อ cytomegalovicus (CMV)

ง. recurrent of primary disease ได้แก่ focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), hemolytic uremic syndrome (HUS), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) และ anti-GBM antibody disease

จ. drug induced acute interstitial nephritis พบได้ไม่บ่อย

การวินิจฉัยแยกโรคในกลุ่มนี้เริ่มต้นด้วยการเจาะเลือดวัดระดับ cyclosporin ก่อนหากมีค่าสูงกว่า 300 มก.ต่อ ดล. ให้ลองลดขนาดยาลง 0.5 ถึง 1 มก.ต่อ กก. ก่อนขอดูผล 1 ถึง 2 วัน หากระดับซีรั่มครีอะตินินหรือการทำงานของไตยังไม่ดีขึ้นให้พิจารณาทำ renal ultrasound เพื่อตัดสาเหตุ urinary tract obstruction แล้วจึงทำการตัดชิ้นเนื้อพิสูจน์

2.11.3 late acute posttransplantation peroid หมายถึง การสูญเสียการทำงานของ graft หลังจากได้ทำงานแล้วในช่วงแรกมากกว่า 3 เดือน สาเหตุที่พบ ได้แก่

ก. prerenal azotemia เนื่องจาก volumn depletion

ข. cyclosporin หรือ tacrolimus nephrotoxicity

ค. acute rejection เนื่องจากการลดขนาดของยากดภูมิคุ้มกันเร็วเกินควรหรือผู้ป่วยไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำ (noncompliance)

ง. urinary tract obstruction

จ. recurrent of primary disease

ฉ. renal artery stenosis มักตรวจพบความดันโลหิตสูงร่วมด้วย

ช. denovo renal disease

ซ. infection ได้แก่ human polymavirus type BK ซึ่งเป็นสาเหตุของ interstitial nephritis ที่พบได้เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ส่วนใหญ่อาการของโรคมักเริ่มต้นหลังผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะเฉลี่ยเดือนที่ 11 การวินิจฉัยแยกโรคในกลุ่มนี้ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 10.2

2.12 การรักษาภาวะ acute rejection

หลังจากได้รับการยืนยันชัดเจนว่าเป็น acute rejection แล้วขั้นตอนถัดมาควรตรวจสอบความเพียงพอของขนาดยาที่ได้รับ และความร่วมมือของผู้ป่วย เนื่องจาก เป็นปัจจัยเสี่ยงที่อาจนำมา ซึ่งการเกิดภาวะ rejection ซ้ำหลังจากให้การรักษาแล้วขั้นตอนนี้ประกอบด้วย 1) ค้นหาว่ามีการลดขนาดยากดภูมิคุ้มกันเร็วไปหรือไม่ โดยเฉพาะ steroid 2) ได้รับยาที่กระตุ้นการเมตาบอลิซึมของยาในกลุ่ม cyclosporin, tacrolimus และ sirolimus ได้แก่ P_{450} enzyme inducer เช่น rifampicin, ยากันชัก เป็นต้น 3) ได้รับขนาดไม่พอเหมาะกับขนาดตัว โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ตัวโต เช่น ยา mycophenolate mofetil 4) ได้รับยาที่ยับยั้งการดูดซึมของยากดภูมิคุ้มกันที่ลำไส้ เช่น bile acid sequestrants. 5) ผู้ป่วยไม่ร่วมมือ หรือไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำ อาจเนื่องจากปัจจัยทางเศรษฐานะ หรือปัญหาทาง จิตใจ เป็นต้น

ควรเริ่มทำการรักษาตั้งแต่แรกที่สงสัย ไม่ควรรอจนกระทั่งได้ผลการตรวจทางพยาธิสภาพยืนยันแล้ว แต่ผู้ป่วยทุกรายที่ให้การรักษาต้องได้รับการตัดชิ้นเนื้อพิสูจน์ เพื่อยืนยันการวินิจฉัยและเพื่อบอกความรุนแรงของภาวะ rejection

ยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้รักษามี 4 กลุ่ม ด้วยกัน คือ

1. Pulse methyl prednisolone ให้ขนาด 3 ถึง 5 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ให้ทางหลอดเลือดดำ ติดต่อกัน 3 ถึง 5 วัน เชื่อว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง cytokine ทุกชนิด ผ่านทาง NFkB

2. anti T cell antibodies ได้แก่ แอนติบอดีย์ต่อ T lymphocyte ทั้งหมดได้แก่ polyclonal antithymocyte globulin ซึ่งสกัดจากม้า และ polyclonal thymoglobulin ซึ่งสกัดจากกระต่าย และ monoclonal anti-CD_3 antibodies (OKT_3)

3. Nonantibody rescue therapies ใช้ในกรณี refractory rejection คือไม่ได้ผลหลังจากใช้วิธีที่ 1 และ 2 แล้ว ได้แก่ ยา tacrolimus และ mycophenolate mofetil

4. Allograft irradiation ทำการฉายแสงเฉพาะบริเวณที่วาง allograft ใช้ในกรณีได้รับการรักษาดังกล่าวข้างบนแล้วไม่ได้ผลหรือมีการติดเชื้อรุนแรงในร่างกาย แต่ผลที่ได้ยังไม่ดีเท่าที่ควร และผลในการกดภูมิคุ้มกันจำกัดในระยะอันสั้น