

ผลของการใช้สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) ต่ออาการของโรคแอสแอลอีโนโมเดล
สัตว์ทดลองโรคลูปัส



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The effect of STING inhibitor (ISD-017) on the phenotypes of Systemic lupus erythematosus (SLE) in the lupus mouse model.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใช้สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) ต่อ
	อาการของโรคแอสแอลอีโนโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส
โดย	นายอิสรา อาลี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงณัฐริยา ธีรฤฎาญจน์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงประภาพร พิสิษฐ์กุล)	

อิสรา อาลี : ผลของการใช้สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) ต่ออาการของโรคเอสแอลอีในโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส. (The effect of STING inhibitor (ISD-017) on the phenotypes of Systemic lupus erythematosus (SLE) in the lupus mouse model.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. นพ.ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

รายงานก่อนหน้านี้อธิบายถึงการมีส่วนร่วมของ Fc gamma receptor IIb (Fcγ2b) ในการพัฒนาโรค systemic lupus erythematosus (SLE) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการส่งสัญญาณที่เพิ่มสูงขึ้นของอินเตอร์เฟอรอน ชนิดที่ 1 (type I interferon) โดยการขาดยีน stimulator of interferon genes (STING) ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* สามารถช่วยรักษาฟีโนไทป์ของโรคลูปัสได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษาสารยับยั้ง STING (ISD017) เปรียบเทียบกับยาที่ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษา cyclophosphamide (CYC) ในการบรรเทาอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคลูปัสในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* (*Fcγ2b*-deficient) ที่มีสภาวะ proteinuria และมีการแสดงออกถึง autoantibody นอกจากนี้เรายังได้ประเมินผลกระทบของการรักษาต่อฟีโนไทป์ของโรคลูปัสด้วย โดยหนูทดลองอายุ 24 สัปดาห์ที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* จะถูกแบ่งออกเป็นสามกลุ่ม คือ หนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ cyclophosphamide (25 mg/kg, intraperitoneal, 1 ครั้งต่อสัปดาห์) หนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 (10 mg/kg, intraperitoneal, 3 ครั้งต่อสัปดาห์) และ หนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ถูกทดสอบด้วย PBS (intraperitoneal, 3 ครั้งต่อสัปดาห์) ซึ่งจะได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลาอีก 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการรักษา จะมีการเก็บตัวอย่างซีรัม ม้าม และไตของหนูทดลองเพื่อวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของโรคลูปัส พบว่าหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* มีอัตราการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC และ ISD-017 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูทดลองทั้งสองกลุ่มยังแสดงอาการรุนแรงของไตอักเสบ (glomerulonephritis) น้อยกว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมอีกด้วย ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นอีกว่า cyclophosphamide สามารถลด germinal center B cells (B220+GL-7+) ในขณะที่ ISD-017 สามารถลด activated T cells (CD4+CD69+) ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* นอกจากนี้ ISD-017 ยังสามารถช่วยลด granulocytes (Ly6c+Ly6g+) และไซโตไคน์ชนิด IL-1β ได้ การรักษาด้วย ISD-017 ในโรคลูปัสที่มีอาการแสดงสามารถช่วยลดความรุนแรงของโรคไตอักเสบลูปัสและช่วยชีวิตหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ *Fcγ2b* และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของ ISD-017 กับ cyclophosphamide ในการรักษาโรคไตอักเสบลูปัสในหนูทดลองที่ขาด *Fcγ2b* พบว่า ISD-017 ช่วยลด activated T cells และ granulocyte ในขณะที่ cyclophosphamide มีเป้าหมายการออกฤทธิ์โดยตรงต่อ activated B cell จากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงเป้าหมายต่อการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันระหว่าง ISD-017 และ cyclophosphamide และแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้ง STING มีศักยภาพเพียงพอที่จะพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรค SLE ได้ต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6272006430 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Lupus nephritis, Sting, SLE, Sting inhibitor

Isara Alee : The effect of STING inhibitor (ISD-017) on the phenotypes of Systemic lupus erythematosus (SLE) in the lupus mouse model.. Advisor: TRAIRAK PISITKUN, M.D.

The contribution of Fc gamma receptor 11b (Fcgr2b) in developing systemic lupus erythematosus (SLE) and its correlation with heightened type I interferon signaling has been described. The absence of the stimulator of interferon genes (STING) in the Fcgr2b-deficient mice rescues the lupus phenotypes. The objective of this study is to assess the therapeutic efficacy of a STING inhibitor (ISD017) compared to standard treatment (cyclophosphamide) in ameliorating symptoms associated with lupus disease in Fc gamma receptor 11b-deficient (Fcgr2b-deficient) mice that have already developed proteinuria and autoantibodies. Additionally, we aim to evaluate the impact of the treatments on lupus disease phenotypes. Twenty-four-week-old Fcgr2b-deficient mice were divided into three treatment groups: cyclophosphamide (25 mg/kg, intraperitoneal, once per week), ISD-017 (10 mg/kg, intraperitoneal, three times per week), or control vehicle and the treatment period lasted for 8 weeks. At the end of the treatment period, the mice's serum samples, spleens, and kidneys were collected to analyze lupus disease phenotypes. The Fcgr2b-deficient mice significantly survived longer with cyclophosphamide and ISD-017 treatment than the non-treated mice. The ISD017 and cyclophosphamide-treated mice showed less severity of glomerulonephritis than non-treated mice. While cyclophosphamide reduced germinal center B cells (B220⁺GL-7⁺), ISD017 decreased activated T cells (CD4⁺CD69⁺) in the Fcgr2b-deficient mice. In addition, ISD017 reduced granulocytes (Ly6c⁺Ly6g⁺) and IL-1 β . ISD017 treatment in symptomatic lupus reduced the severity of lupus nephritis and rescued the Fcgr2b-deficient mice. ISD017 worked comparably to cyclophosphamide for treating lupus nephritis in the Fcgr2b-deficient mice. In contrast, ISD017 reduced activated T cells and granulocytes, while cyclophosphamide targeted activated B cells. These results suggested the different targeted pathways between ISD-017 and cyclophosphamide. STING inhibitors can potentially be a new therapeutic drug for SLE patients.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา รวมถึงคุณ Søren Riis Paludan, Prof. ที่อนุเคราะห์สารทสอบ ISD017 คุณ Silvia Bolland, Ph.D. ที่อนุเคราะห์หนูทดลอง และอาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำแนะนำและชี้แจงตลอดระยะเวลาการศึกษานี้ ตลอดจนสมาชิก Center of Excellence in Systems Biology ทุกท่านที่คอยสนับสนุนในด้านการดำเนินงาน

อิสรา อาลี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ที่มาและความสำคัญ.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
3. ขอบเขตงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
1. โรคเอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus, SLE).....	3
1.1 กลไกที่ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านตนเอง.....	3
1.2 ระบาดวิทยาในโรคลูปัส.....	5
1.3 อาการและอาการแสดงทางคลินิกในโรคลูปัส.....	5
2. อินเทอเพียร์รอนชนิดที่ 1 และ plasmacytoid dendritic cells.....	13
3. บทบาทของ interferon Type I กับการเกิดภูมิคุ้มกันในโรค SLE.....	14
4. Fcgr11b receptor กับ systemic lupus erythematosus.....	14
5. การเหนี่ยวนำของ Type I interferon (IFN-I).....	15
6. Stimulator of interferon genes (Sting).....	15
7. Stimulator of interferon genes (Sting) in lupus mouse models.....	16

8. ISD-017 (STING-antagonist) ISD-017	17
9. Cyclophosphamide (CYC)	18
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	19
1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	19
2. การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	19
3. วิธีวิจัย.....	20
3.1 สัตว์ทดลอง.....	20
3.2 การศึกษาการมีชีวิตรอด.....	20
3.3 การทดสอบ Antinuclear antibodies (ANA).....	20
3.4 การวัดปริมาณ anti ds-DNA.....	21
3.5 Cellular analysis.....	21
3.6 การตรวจวัดปริมาณ Creatinine ในเลือดและปัสสาวะ.....	22
3.7 การตรวจวัดปริมาณ Cytokine ในเลือด.....	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	24
1. ISD-017 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ที่มีอาการของโรคอย่างชัดเจน.....	24
2. ISD-017 ลดความรุนแรงของ glomerulonephritis ในหนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ..	25
3. CYC ลดการแสดงออกของ activated B cell	28
4. ISD-017 ยับยั้งการแสดงออกของ activated T cell	32
5. ISD-017 ลดการแสดงออกของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและไซโตไคน์ชนิด IL-1 β	36
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	41
บรรณานุกรม.....	45
ประวัติผู้เขียน.....	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การจำแนกโรค SLE โดย ACR ดัดแปลงจาก (29).....	8
ตารางที่ 2 แสดง Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) ดัดแปลงจาก (41).....	10



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 บทบาทของ plasmacytoid dendritic cells และอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 (44).....	13
รูปที่ 2 ภาพรวมแสดงการส่งสัญญาณของวิถี Sting (55).....	15
รูปที่ 3 ภาพแสดงของ ISD-017 ใน FP (fusion protein) ใน Hemagglutinin ของ influenza A (8)	17
รูปที่ 4 กราฟแสดงควมมีชีวิตรอด (The survival curve) ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ติดตามจน ครบเวลา 8 เดือน.....	24
รูปที่ 5 แสดงค่าของครีตินิน (Creatinine) ในเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม.....	25
รูปที่ 6 แสดงค่า Urine-Albumin / Urine-Creatinine ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม.....	26
รูปที่ 7 แสดงภาพสัณฐานวิทยาของโกลเมอรูลัส (glomerulus) จากไตของหนูทดลองด้วยการย้อม ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin stain (H&E stain).....	27
รูปที่ 8 แสดงค่าความเสียหายของโกลเมอรูลัส (Glomerular Score)	27
รูปที่ 9 แสดงค่าของ Interstitial Score	28
รูปที่ 10 แสดงค่าของ antinuclear antibody (ANA).....	29
รูปที่ 11 แสดงค่าของ anti-dsDNA.....	29
รูปที่ 12 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด germinal center B cells (B220 ⁺ GL ⁻⁷⁺) ที่ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันเ็นหนูทดลอง 3 กลุ่ม.....	30
รูปที่ 13 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด mature activated B cells (B220 ⁺ IAb ⁺) ที่ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันเ็นหนูทดลอง 3 กลุ่ม.....	31
รูปที่ 14 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด plasma cell (B220 ⁺ CD138 ⁺) ที่วิเคราะห์ด้วย เทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันเ็นหนูทดลอง 3 กลุ่ม.....	32
รูปที่ 15 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD ⁴ +CD45RB ^{hi} ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันเ็นหนูทดลอง 3 กลุ่ม.....	33

รูปที่ 16 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 34

รูปที่ 17 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 35

รูปที่ 18 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD69⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 36

รูปที่ 19 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD11c⁺CD11b⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 37

รูปที่ 20 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด Ly6c⁺Ly6g⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 38

รูปที่ 21 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 38

รูปที่ 22 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-6 ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม..... 39

รูปที่ 23 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-23 IL-1a IFN- γ TNF- α MCP-1 IL-12p70 IL-10 IL-27 IL-17A IFN- β และ GM-CSF ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม.... 40

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

โรคเอสแอลอี หรือ Systemic Lupus Erythematosus (SLE) เป็นโรคแพ้ภูมิตัวเองที่เกิดจากการสูญเสีย self-tolerance ซึ่งจะสร้างแอนติบอดีต่อต้านแอนติเจนของตัวเอง โดยการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนจะทำให้เกิด immune complex แล้วไหลไปตามระบบไหลเวียนของเลือดและเกิดการสะสมของ immune complex ที่อวัยวะต่างๆ ส่งผลให้เกิดอาการบาดเจ็บในหลายอวัยวะ (1) SLE เป็นหนึ่งในปัญหาวิกฤตด้านสุขภาพ ที่สำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เนื่องจากความรุนแรงของโรคในชาวเอเชียที่ค่อนข้างมากและเป็นสาเหตุทำให้ อวัยวะล้มเหลวในผู้ป่วยโรค SLE จึงเป็นภาระทางเศรษฐกิจต่อประเทศของเรา โดยการวินิจฉัยทางคลินิกของ SLE เป็นไปตาม American College of Rheumatology (ACR) 1997 เช่น แอนตินิวเคลียร์ แอนติบอดี (Antinuclear antibody, ANA) ที่ต้องมีผลเป็นบวกมากกว่า 1: 160 ร่วมกับอาการทางคลินิกอย่างน้อย 4 อย่างใน อวัยวะต่างๆ (2) สาเหตุของโรค SLE ประกอบด้วยปัจจัยหลายประการ คือปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม โดยข้อบกพร่องของ Fc gamma receptor IIb (FcγRIIb) ที่เป็นตัวรับสัญญาณการยับยั้งเพียงตัว เดียวในตระกูล FcγR เป็นหนึ่งในปัจจัยทางพันธุกรรมที่นำไปสู่โรคเอสแอลอี (3) ซึ่งในผู้ป่วย SLE ในภูมิภาคเอเชีย แปซิฟิกสามารถพบความหลากหลายของพันธุกรรมของ FcγRIIb ได้บ่อย

การตรวจพบ autoantibody ใน SLE บ่งบอกถึงข้อบกพร่องของการทำงานของ B cell โดยความ ข้อบกพร่องในการทำงานของ B cell อาจเกิดความผิดปกติภายใน B cell เอง หรือจากการกระตุ้นทางอ้อมจาก การมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์อื่น อย่างเช่น Antigen presenting cell หรือ T cell ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการก่อ โรค นอกจากการมี autoantibody ในผู้ป่วย SLE แล้ว การทำงานที่มากขึ้นของ type I interferon หรือความ ผิดปกติของการส่งสัญญาณที่ทำให้มีการสร้าง type I IFN เพิ่มมากขึ้นก็เป็นหนึ่งในกลไกการก่อโรคที่สำคัญ (4, 5) ดังนั้นการศึกษาในโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัสเพื่อทำความเข้าใจเพิ่มเติมเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของ SLE จะนำมาซึ่ง การออกแบบการรักษาที่มีประสิทธิภาพในผู้ป่วยเอสแอลอี

Stimulator of interferon genes (STING) เป็นโปรตีนตัวกลางที่ใช้รับสัญญาณจากตัวกระตุ้น dsDNA และ c-GAMP ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้าง type I IFN เพิ่มมากขึ้น ได้มีการรายงานไว้ในโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส ซึ่งรวมถึงหนูเมาส์ที่ขาด FcγRIIb ด้วยว่ามีการเพิ่มขึ้นของการส่งสัญญาณ type I IFN ซึ่งความบกพร่องนี้จะนำไปสู่ การสูญเสียสัญญาณการยับยั้งและเพิ่ม auto-antibodies จนในที่สุดหนูจะพัฒนากลายเป็นโรค SLE ได้เองเมื่อ อายุ 6-8 เดือน (6, 7)

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในหนูที่ขาดยีน Fcgr2b และ Sting และพบว่าหนูอุปสที่ขาดยีน Fcgr2b ไม่เกิด อาการแสดงของโรคแอสแอลอีถ้าปราศจากการส่งสัญญาณผ่าน STING (7) นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้านี้ได้มี การใช้โมเลกุลสำหรับยับยั้งการทำงานของ STING (ISD017) ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ในหนูโมเดลอุปสที่ขาดยีน Fcgr2b โดยได้ให้ ISD017 ตั้งแต่หนูอายุ 6 สัปดาห์ ก่อน จะเริ่มมี antinuclear antibody และอาการของ โรคอุปส ซึ่งได้ประสิทธิภาพในการลดการเกิด glomerulonephritis และลดการสร้าง autoantibody ในหนู ทดลอง (8) จากการศึกษาที่สนับสนุน แนวทางที่จะนำ ISD017 มาใช้ในการรักษาโรค SLE

อย่างไรก็ตาม ในการจะนำ ISD017 มาใช้ในการรักษาโรค SLE ได้จริงก็ควรจะมีการศึกษา เพื่อแสดง ประสิทธิภาพของตัวยับยั้ง STING (ISD017) ในหนูโมเดลอุปสที่มีอาการหรืออาการแสดง ของโรคแล้ว เพราะ ในทางปฏิบัติการให้ยาไปก่อนที่จะมีอาการของโรค SLE เกิดขึ้นแก่คนกลุ่มเสี่ยง อาจไม่สามารถทำได้จริง ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายที่จะตรวจหาผลของการยับยั้ง STING (ISD107) ต่อการรักษาโรค SLE โดยผู้วิจัย จะ ทำการศึกษา กลไกระดับโมเลกุลโดยใช้โมเดล สัตว์ทดลองโรคอุปส คือ หนูอุปสที่ขาดยีน Fcgr2b อายุ 6-8 เดือน ซึ่งมีระดับ autoantibody ใน ขนาดสูงร่วมกับมี proteinuria โดยนำหนูที่มีอาการของโรค SLE นี้มาให้ ISD017 โดยเปรียบเทียบกับ ยา cyclophosphamide ซึ่งเป็นยากดภูมิที่ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษาภาวะ lupus nephritis (LN) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและค้นหากกลไกของ ISD017 ในการรักษาโรคอุปส

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาผลการรักษาของ ISD-017 (ตัวยับยั้ง STING) ในโมเดลสัตว์ทดลองหนูโรคไต อักเสบอุปสที่มี อายุ 5-6 เดือนที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ต่ออาการแสดงของโรค SLE
- 2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของ ISD-017 กับ CYC (cyclophosphamide) ในโมเดลสัตว์ทดลอง หนูโรคไตอักเสบอุปสที่มีอายุ 5-6 เดือนที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ต่ออาการแสดงของโรค SLE

3. ขอบเขตงานวิจัย

หนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่เป็น C57BL/6 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Bolland S. (NIH, Maryland, USA) และหนู Wild type ซื้อมาจาก the National Laboratory Animal Center จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย ซึ่งโครงการนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยใน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการวิจัยเลขที่ 003/2563 หนูที่มีความบกพร่อง ของ Fcgr11b จะถูกเลี้ยงและติดตามจนมีอายุประมาณ 5-6 เดือนโดยหลังจากนั้นจะทำการให้สาร ทดสอบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ต้องได้รับสารทดสอบไปเรื่อยๆ จนมีอายุครบ 8 เดือน และ เปรียบเทียบการรอดชีวิตกับหนูทดลองในกลุ่มที่ใช้ควบคุม รวมถึงหนูกลุ่ม Wild type

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. โรคเอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)

โรคเอสแอลอี(systemic lupus erythematosus) เป็นโรคที่เกิดจากการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง ทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะได้หลายระบบ โรคเอสแอลอีพบได้ในทุกช่วงอายุ ร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยในช่วงเด็กและวัยรุ่น อัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 4.5-5:1 ซึ่งต่างกับผู้ใหญ่ที่มีอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 9-10:1 (9) และการแสดงออกของโรค SLE ส่วนใหญ่มักพบในกลุ่มชาวเอเชีย มากกว่าชาวคอเคเซียน (10) โดยอาจมีความรุนแรงแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของโรคหรือปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีอาการต่างกันอย่างชัดเจน แต่มีหลักฐานว่าโรคนี้อาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยของเพศหญิงและฮอร์โมนเพศ จึงเป็นโรคที่พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการเกิดโรคที่แท้จริงและแน่ชัด แต่จากการศึกษากลไกความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันรวมทั้งพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย ทำให้เห็นภาพรวมของปัจจัยในการก่อโรค และพยาธิกำเนิดของโรคเอสแอลอีได้ โดยเชื่อว่าผู้ที่จะเป็นโรคจะต้องมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมจนเกินขีดความสามารถในการรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันไว้ ก็จะเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองขึ้น (11)

1.1 กลไกที่ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านตนเอง

เนื่องจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย มีความซับซ้อนมากซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันแบบ เครือข่าย (network) ของเซลล์หลายชนิด และสารที่หลั่งจากเซลล์เหล่านี้เพื่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันขึ้นมา ดังนั้นการสูญเสีย self tolerance จนเกิดภูมิคุ้มกันต้านตนเองอาจเกิดขึ้นได้หลายแบบ เนื่องจากสาเหตุที่ยังไม่ทราบแน่ชัดจึงมีการตั้งสมมุติฐานต่างๆ เพื่ออธิบายถึงการเกิดโรคกลไกสำคัญที่คาดว่ามีส่วนต่อการเกิดภูมิคุ้มกันต้านตนเองคือ (12)

1.1.1 ความผิดปกติในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Abnormal in regulation of immune response) ได้แก่

1.1.1.1 ความผิดปกติในการทำงานของ Ts lymphocyte (CTLs) ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการกระตุ้น autoreactive lymphocytes มีผลทำให้ autoreactive lymphocytes ถูกกระตุ้นมากเกินไปจนเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต้านตนเองขึ้นมา ซึ่งเป็นกลไกที่สันนิษฐานกันมานานแล้วแต่ยังขาดหลักฐานสนับสนุนที่ยังมีไม่มากนัก (13)

1.1.1.2 ความผิดปกติในการสร้างและการทำงานของ cytokines ซึ่งเป็นกลุ่มสารสำคัญที่มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (14, 15) เช่น interferons (IFN), tumor

necrosis factor (TNF), Interleukin-2 (IL-2) เป็นต้น ซึ่งยังเป็นที่ยกเถียงกันว่าความผิดปกติอาจเป็นผลจากความบกพร่องของ lymphocytes ที่ควบคุมการหลั่งสารเหล่านี้ โดยไม่ถือว่าเป็นสาเหตุโดยตรงที่มีผลต่อการเกิดโรค

1.1.1.3 ความผิดปกติในการทำลาย autoreactive lymphocytes (apoptosis) มีผลให้เซลล์เหล่านี้ยังคงอยู่ในร่างกายในปริมาณสูงและสามารถกระตุ้นให้ทำลายเนื้อเยื่อของตนเองได้ (16-18) โดยพบว่าเมื่ออัตราการเกิด apoptosis ที่มากกว่าปกติในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง lymphocyte และ neutrophil และเซลล์ที่สำคัญในอวัยวะต่างๆ (19) ประกอบกับความผิดปกติของกลไกการกำจัด apoptotic body จึงทำให้มี cellular debris เหลือจำนวนมาก ซึ่งเชื่อว่าเป็นแหล่ง self antigen ที่สำคัญในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี (20)

1.1.2. Expose of anatomically sequestered antigens เป็นกรณีที่ self antigens มีการหลุดเข้าสู่ periphery ที่ปกติไม่เคยสัมผัสกับ lymphocytes ใน periphery มาก่อนทำให้ lymphocytes รับรู้ antigen นี้เหมือนกับสิ่งแปลกปลอมและตอบสนองต่อ antigen นั้น เป็นผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจนถึงขั้นทำให้เกิดโรคในคนที่มีแนวโน้มว่าจะเกิดได้ (21, 22)

1.1.3. Polyclonal activation เป็นกลไกที่เชื่อว่ามีสารกระตุ้นนอกร่างกาย (exogenous polyclonal activators) เช่น microbial antigens ที่สามารถกระตุ้น anergic autoreactive lymphocytes ใน periphery ให้กลายเป็น active autoreactive lymphocytes ซึ่งการเกิด polyclonal activation สามารถกระตุ้น autoreactive lymphocytes หลายชนิดพร้อมๆ กัน โรคภูมิคุ้มกันต้านตนเองที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบเกิดทั่วร่างกาย (systemic autoimmune diseases) มากกว่า แบบเฉพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง (organ specific autoimmune diseases) (14)

1.1.4. Molecular mimicry เกิดจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก เช่น microbial antigens ที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ที่คล้ายคลึง (molecular mimicry) กับ self antigen เมื่อร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ microbial antigen เหล่านี้ จึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองต่อ self antigen ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันด้วยมีผลให้การสร้างและกระตุ้นการทำงานของ autoreactive lymphocytes ที่เฉพาะเจาะจงต่อ self antigen เกิดตามมา (21-23)

1.2 ระบาดวิทยาในโรคลูปัส

โรคเอสแอลอีสามารถพบได้ทั่วโลก และพบได้ในทุกช่วงอายุร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัย ในช่วงเด็กและวัยรุ่น อัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 4.5-5:1 ซึ่งต่างกับผู้ใหญ่ที่มีอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 9-10:1 (9) ความชุกของโรคนี้นั้นประชากรทั่วไปพบ 1 ใน 2,000 คน และอาจมีความแตกต่างกัน ในแต่ละชนชาติ (24) ส่วนใหญ่มักพบในกลุ่มชาวแอฟริกัน-อเมริกัน แอฟริกัน-แคริบเบียน และชาวเอเชียมากกว่า ชาวคอเคเซียน (10) ในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษาและรายงานข้อมูลทางระบาดวิทยาในโรคลูปัสตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526 (25) อย่างไรก็ตามข้อมูลทางระบาดวิทยาในประเทศไทยยังได้รับการศึกษาน้อยและยังถือว่ามีจำนวนจำกัด เมื่อเทียบกับข้อมูลทางระบาดวิทยาในโรคลูปัสในประเทศอื่นในทวีปเอเชีย และทวีปยุโรป แหล่งข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย ทำการวิจัยโดยแพทย์เฉพาะทางด้านโรคข้อและรูมาติสซั่ม โรคผิวหนัง โลหิตวิทยา โรคไต และภูมิคุ้มกันวิทยา จากข้อจำกัดเรื่องแหล่งข้อมูลด้านสุขภาพในประเทศไทยมีเพียงการรายงานความชุกผู้ป่วยโรคเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน คือ 40 : 10,000 คน (26) แต่ ณ ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์ และความชุกของโรคลูปัสในประชากรไทยทั้งหมด แต่พบว่ามีความชุกโรคลูปัสร้อยละ 91-98 ในเพศหญิงที่มีอายุ เฉลี่ยประมาณ 31.6-33.2 ปี (27, 28)

1.3 อาการและอาการแสดงทางคลินิกในโรคลูปัส

อาการและอาการแสดงในโรคลูปัสมีความหลากหลาย ทั้งในแง่ของความผิดปกติที่สามารถพบได้ในหลายอวัยวะ และความผิดปกตินั้นก็สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายรูปแบบ ซึ่งความรุนแรงในแต่ละรูปแบบก็มีการแสดงออกที่แตกต่างกันได้หลายระดับ โดยอาจมีการแสดงออกพร้อมกันในขณะเวลาเดียวกันใกล้เคียงกัน หรือมีอาการ แสดงในเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นการรักษาจำเป็นต้องพิจารณาตามอาการแสดง และระดับความรุนแรงให้ เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย (29)

1.3.1 อาการและอาการแสดงโดยทั่วไป

อาการทั่วไปของโรคลูปัสที่แพทย์ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วย คือ อาการผื่นรูปผีเสื้อที่หน้า ผม่วง ปวดข้อ ข้อ อักเสบ บวมและมีปัสสาวะเป็นฟองในเพศหญิงที่อายุน้อย หรือช่วงเจริญพันธุ์ ซึ่งผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการทั่วไปที่ไม่จำเพาะเช่น ไข้ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ผม่วง ปวดเมื่อยตัว หรืออาจพบมีต่อมน้ำเหลืองโตทั่วร่างกาย และตับม้ามโต อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มาพบแพทย์นั้น บางรายอาจมีอาการแสดงไม่มากนัก โดยพบความผิดปกติเพียง 1-2 อวัยวะ จึงมีความจำเป็นที่ต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเพื่อระบุอาการและโรคที่แน่ชัดเพื่อการดำเนินการรักษาที่เหมาะสมกับผู้ป่วยต่อไป

1.3.2 อาการและอาการแสดงเฉพาะอวัยวะ

1.3.2.1.อาการทางข้อ

อาการทางข้อเป็นอาการเริ่มแรก que พบได้บ่อยที่สุด ในผู้ป่วยโรค lupus ในบางรายมีอาการแสดงทางข้อถึง ร้อยละ 90 เมื่อติดตามผู้ป่วยในระยะยาว (30) อาการทางข้อมีอาการแสดงที่แตกต่างกันหลายรูปแบบตั้งแต่ความรุนแรงน้อยไปถึงความรุนแรงมาก ได้แก่ อาการปวดข้อมีข้ออักเสบร่วม อาการปวดข้อแต่ไม่มีข้ออักเสบร่วม อาการข้ออักเสบแบบเรื้อรังหรือเฉียบพลัน และอาการข้อฝืดรูป

1.3.2.2 อาการทางผิวหนังและเยื่อเมือก

อาการแสดงที่พบบ่อยในโรค lupus และมีความชุกสูงประมาณร้อยละ 40-80 คือ อาการทางผิวหนังและเยื่อเมือก ซึ่งลักษณะอาการแสดงมีได้หลายรูปแบบและถูกแบ่งกลุ่มของอาการแสดงทางผิวหนังในโรค lupus ตาม the Gilliam classification system for LE skin disease (31) ได้แก่

1 กลุ่มอาการแสดงทางผิวหนังที่มีลักษณะไม่จำเพาะเจาะจง (LE non-specific) คือ อาการแสดงทางผิวหนังที่พบได้ในผู้ป่วยโรค lupus และผู้ป่วยโรคอื่นๆ หรือในภาวะอื่นๆ เช่น แผลในปาก (2) ผื่นร่วง ผื่นผิวหนัง และถุงน้ำปอง (32) เป็นต้น

2 กลุ่มอาการแสดงทางผิวหนังที่มีลักษณะจำเพาะเจาะจง (LE specific) คือ อาการแสดงทางผิวหนัง ที่ลักษณะทางพยาธิสภาพในชั้นเนื้อ มีลักษณะเฉพาะกับโรค lupus (29) โดย Gilliam classification ได้แบ่งอาการแสดงออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ผื่น lupus เฉียบพลัน (acute cutaneous lupus erythematosus, ACLE) ผื่น lupus กึ่งเฉียบพลัน (subacute cutaneous lupus erythematosus, SCLE) และผื่น lupus เรื้อรัง (chronic cutaneous lupus erythematosus, CCLE) (33)

1.3.2.3 อาการทางไต

อาการและอาการแสดงจากไตอักเสบที่มักพบบ่อยในผู้ป่วยโรค lupus คือ อาการบวมบริเวณเท้าและขาบวมบริเวณหน้าและหน้าตา ปัสสาวะเป็นฟอง มีโปรตีนในปัสสาวะ (34) ปัสสาวะบ่อยขึ้น โดยเฉพาะเวลากลางดึก ความผิดปกติทางไตในโรค lupus มีอาการแสดงที่มีตั้งแต่ความรุนแรงน้อยไปถึงความรุนแรงที่อาจทำให้ไตสูญเสียการทำงานไปอย่างถาวรได้ โดยตำแหน่งที่พบการอักเสบที่เป็นผลทำให้เกิดความผิดปกติทางไตในโรค lupus ได้บ่อย คือ การอักเสบที่โกลเมอรูลัส (glomerulonephritis) หรือที่เรียกไตอักเสบ lupus (lupus nephritis) ซึ่งพบได้บ่อยร้อยละ 14-60 และเป็นอาการกำเริบที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองรองจากภาวะการมีเม็ดเลือดขาวต่ำ และข้ออักเสบกำเริบ (28)

1.3.2.4 อาการทางระบบประสาทและทางจิต

อาการผิดปกติทางระบบประสาทที่มีสาเหตุจากโรค lupus (neuropsychiatric SLE, NPSLE) มีอาการแสดง ที่หลายรูปแบบ เช่น มีอาการชัก พุดไม่รู้เรื่อง ปวดศีรษะ แขนขาอ่อนแรง โดยพบว่า มี

ความเกี่ยวเนื่องกับระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system)

1.3.2.5 อาการทางระบบโลหิต

ความผิดปกติทางระบบโลหิตพบได้บ่อยในโรคลูปัส ประชากรไทยมีความผิดปกติขณะแรกวินิจฉัยโรคลูปัสได้ถึงร้อยละ 77 (28) โดยมีอาการแสดงคือ มีอาการซีด อ่อนเพลียจากโลหิตจาง ติดเชื้อโรคได้ง่ายจากการมีเม็ดเลือดขาวต่ำ มีจุดจ้ำเลือด เลือดออกผิดปกติจากการมีเกล็ดเลือดต่ำ โดยทั้งนี้ผู้ป่วยอาจมีเม็ดเลือดขาวผิดปกติเพียงแค่ ชนิดเดียว หรืออาจผิดปกติร่วมกันทั้ง 3 ชนิดก็ได้

1.3.2.6 อาการทางหัวใจ

ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหัวใจของผู้ป่วยโรคลูปัสสามารถเกิดความผิดปกติและมีอาการแสดงได้ หลากหลายลักษณะ ได้แก่ หัวใจเต้นผิดจังหวะ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เยื่อหัวใจอักเสบ และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบซึ่งเป็นอาการที่พบได้บ่อยที่สุด เนื่องจากการวินิจฉัยที่สามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อน ประกอบกับผู้ป่วยมักมีอาการเจ็บแน่นหน้าอก หายใจหอบเหนื่อย หรือมีไข้ร่วมด้วย (35) จึงง่ายต่อการวินิจฉัยในเบื้องต้นเพื่อประเมินอาการของผู้ป่วย

1.3.2.7 อาการทางปอด

อาการทางปอดที่สามารถพบได้ในผู้ป่วยโรคลูปัสเกิดขึ้นได้ในหลายตำแหน่ง เช่น เนื้อปอดทางเดินหายใจ เยื่อหุ้มปอด และหลอดเลือด เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติที่ทางเดินหายใจ ทำให้ทางเดินหายใจ อุดตัน หายใจลำบาก เสียงแหบ เยื่อหุ้มหลอดลมหนาตัวและบวม (bronchitis) หลอดลมโป่งพอง (bronchiectasis) หรือหลอดลมตีบ (bronchiolitis obliterans) ได้ และทำให้เกิดความผิดปกติในเนื้อปอดทั้ง ชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง (36) โดยผู้ป่วยมักมีอาการหายใจหอบเหนื่อยไอแห้งๆ เจ็บหน้าอก หรืออาจมีอาการขาดออกซิเจนร่วมด้วย

1.3.2.8 อาการทางระบบทางเดินอาหาร

อาการทางระบบทางเดินอาหารในโรคลูปัสมีอาการแสดงที่สำคัญได้แก่ อาการปวดท้อง คลื่นไส้ ถ่ายเหลว และอาเจียน โดยอาการที่พบได้บ่อยที่สุดคืออาการปวดท้อง (37) ซึ่งสาเหตุหลักของความผิดปกติในระบบทางเดินอาหารของผู้ป่วยโรคลูปัสสามารถแบ่งออกเป็น 3 สาเหตุ ได้แก่ สาเหตุโดยตรงจากโรคลูปัส สาเหตุจากการใช้ยาที่ใช้ในการรักษาโรค และสาเหตุอื่นๆ โดยพบว่าสาเหตุจากการใช้ยาที่ใช้ในการรักษาโรคเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้ป่วยโรคลูปัส (38)

โรคลูปัสเป็นโรคที่สามารถมีอาการผิดปกติในหลายๆอวัยวะได้พร้อมกัน มีอาการแสดงได้หลากหลาย รูปแบบ ตั้งแต่รุนแรงน้อยไปถึงรุนแรงมากจนสาเหตุของการสูญเสียการทำงานของอวัยวะนั้นๆ โดยอาจจะมี อาการและอาการที่มีความเฉพาะเจาะจง หรือไม่เฉพาะเจาะจงในโรคลูปัสได้ ผู้ป่วยแต่ละราย ไม่จำเป็นต้องมีอาการครบทุกระบบ หรือมีอาการรุนแรงเสมอไป โดยทั่วไปมักมี

อาการรุนแรงในช่วง 2-3 ปีแรก หลังจากนั้นโรคจะเริ่มสงบ แต่จะมีอาการกำเริบเป็นครั้งๆ โรคลูปัส เป็นโรคที่มีผู้ป่วยมีอาการได้หลากหลายตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้บางครั้งมีอาการคล้าย เหมือนกับโรคอื่นๆ ได้ (39) ดังนั้นการวินิจฉัยที่แน่นอน จำเป็นต้องมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการและการ ตรวจจากผู้เชี่ยวชาญเพื่อยืนยันการวินิจฉัย

เนื่องจากอาการของผู้ป่วยโรคลูปัสมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล The American College of Rheumatology จึงได้ตั้งเกณฑ์สำหรับวินิจฉัย ประกอบด้วยเกณฑ์ 11 ข้อ หากผู้ป่วยมี ลักษณะทางคลินิก และ/ หรือผลทางห้องตรวจปฏิบัติการอย่างน้อย 4 ข้อขึ้นไปถือว่าเข้าเกณฑ์ สำหรับวินิจฉัย และอาจจะระบุได้ว่ามีความสัมพันธ์กับโรคลูปัส (40) อาการและอาการแสดงของโรค ในผู้ป่วยแต่ละรายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของ autoantibody เช่น anti-DNA antibody หรือ ส่วนประกอบของนิวเคลียสเกิดเป็น immune complex ไปสะสมบริเวณผนังเส้นเลือดหรือกรวยไต ก่อให้เกิดการอักเสบได้

การวินิจฉัยโรคลูปัสในปัจจุบันแพทย์ส่วนใหญ่มักอ้างอิงตามเกณฑ์ของ American College of Rheumatology (ACR) พ.ศ. 2540 ดังแสดงในตารางที่ 1 ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การจำแนกโรค SLE โดย ACR ดัดแปลงจาก (29)

	คำจำกัดความ
1. Malar rash	ผื่นแดง ราบหรือนูนบริเวณโหนกแก้ม ส่วนใหญ่โตนบริเวณร่องข้าง จมูก
2. Discoid lesion	ผื่นนูนแดง ขอบเขตชัดเจน มีสะเก็ด ซึ่งบริเวณกลางผื่นอาจมี ลักษณะรอยแผลเป็นกลางแผลร่วมกับมีคอลลาลาเจนอุดตันรูขุมขน (follicular plugging)
3. Photosensitivity	เป็นผื่น แพ้แสงมากผิดปกติสังเกตโดยผู้ป่วยเองหรือแพทย์
4. Oral ulcer	เป็นแผลในปากหรือ nasopharynx มักเป็นแผลที่ไม่เจ็บ สังเกตโดย แพทย์
5. Non-erosive arthritis	ข้ออักเสบมากกว่า 2 ข้อ โดยมีลักษณะข้อบวม ปวด และมีน้ำไขข้อ แต่ไม่มีลักษณะกระดูกกร่อน (erosion) ในภาพรังสี
6. Pleuritis or pericarditis	เยื่อหุ้มปอดอักเสบ หรือ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ
7. Renal disorder	ตรวจพบไข่ขาวในปัสสาวะ (proteinuria) มากกว่า 0.5 กรัม/วัน ตลอดเวลา หรือพบไข่ขาวในปัสสาวะตั้งแต่ +3 (ถ้าไม่ได้ตรวจวัด ปริมาณแน่นอน) หรือ มี cast ซึ่งอาจเป็นชนิดเม็ดเลือดแดง

	คำจำกัดความ
	ฮีโมโกลบิน granular, tubular หรือพบร่วมกัน
8. Seizure, psychosis	โรคจิตเภทที่ไม่ได้เกิดจากยาหรือความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม
9. Hematologic disorder	เม็ดเลือดแดงแตกหรือเม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 4,000 เซลล์/มม ³ หรือลิมโฟไซต์ต่ำกว่า 1,500 เซลล์/มม. ³ หรือเกร็ดเลือดต่ำกว่า 100,000 เซลล์/มม. ³ โดยไม่มีสาเหตุอื่นๆ อย่างน้อย สองครั้ง
10. Immunologic disorder	ตรวจพบ anti-native DNA (ds-DNA) หรือ anti-Sm antibody หรือ antiphospholipid antibody โดย (1) พบระดับ IgG หรือ IgM anticardiolipin antibody ในปริมาณที่สูงกว่าคนปกติ (2) ตรวจพบ lupus anticoagulant ด้วยวิธีมาตรฐาน (3) ตรวจ serology สำหรับซิฟิลิสให้ผลบวกลง เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน ซึ่งทำการยืนยันด้วย treponema palladium immobilization หรือ fluorescent treponemal antibody
11. Positive ANA	พบ antinuclear antibody ด้วยวิธี immunofluorescence หรือการตรวจที่เทียบเท่า ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งในปริมาณที่สูงกว่าปกติและไม่ได้รับยาซึ่งสามารถก่อให้เกิดกลุ่มอาการ drug-induced lupus

ตัวชี้วัดกิจกรรมเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการประเมินการดำเนินโรคและระดับความรุนแรง โดยครอบคลุมทั้งการประเมินการกระทำจากโรคที่กระทำต่อผู้ป่วยมีผลให้ผู้ป่วยรู้สึกไม่สุขสบายแต่แพทย์อาจตรวจวัดไม่ได้ซึ่งต้องประเมินจากความรู้สึกของผู้ป่วย (subject aspect) เช่นอาการเจ็บปวด หรืออ่อนเพลีย ฯลฯ และการประเมินสิ่ง ที่แพทย์สามารถมองเห็นหรือตรวจวัดได้ (objective aspect)

ตัวชี้วัด Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (ตารางที่ 2) ได้ถูก พัฒนาโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโรคข้อ ปัส จุดประสงค์เพื่อประเมินระดับกิจกรรมจากโรค ณ ขณะที่ประเมินโดยเน้นแพทย์เป็นผู้ประเมินอาการแสดงและความผิดปกติที่สามารถตรวจพบความผิดปกติได้ โดยเป็นตัวชี้วัดที่ประเมินกิจกรรมโดยภาพรวม ซึ่งประเมินอาการทางคลินิกของ 9 ระบบ ได้แก่ ระบบประสาท ข้อและกล้ามเนื้อ ไต เยื่อ เยื่อเมือก เยื่อหุ้มหัวใจและปอด หลอดเลือด เม็ดเลือด และระบบทั่วไป ร่วมกับประเมินผลตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป รวมถึงการตรวจทางภูมิคุ้มกัน คือ anti-ds DNA anti body และระดับคอมพลีเมนต์มีการให้น้ำหนัก คะแนนในแต่ละหัวข้อในช่วง

1-8 คะแนนตามความสำคัญของอวัยวะและความรุนแรงของอาการ โดยแบ่งระดับ กิจกรรมจากโรค lupus ตามคะแนนสำหรับตัวชี้วัด SLEDAI ดังนี้

คะแนน SLEDAI = 0 โรคอยู่ในระยะสงบ หรือไม่มีกิจกรรม

คะแนน SLEDAI = 1-5 โรคมียากิจกรรมเล็กน้อย

คะแนน SLEDAI = 6-10 โรคมียากิจกรรมปานกลาง

คะแนน SLEDAI = 11-19 .โรคมียากิจกรรมมาก

คะแนน SLEDAI \geq 20 โรคมียากิจกรรมสูงมาก

ตารางที่ 2 แสดง Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) ดัดแปลงจาก (41)

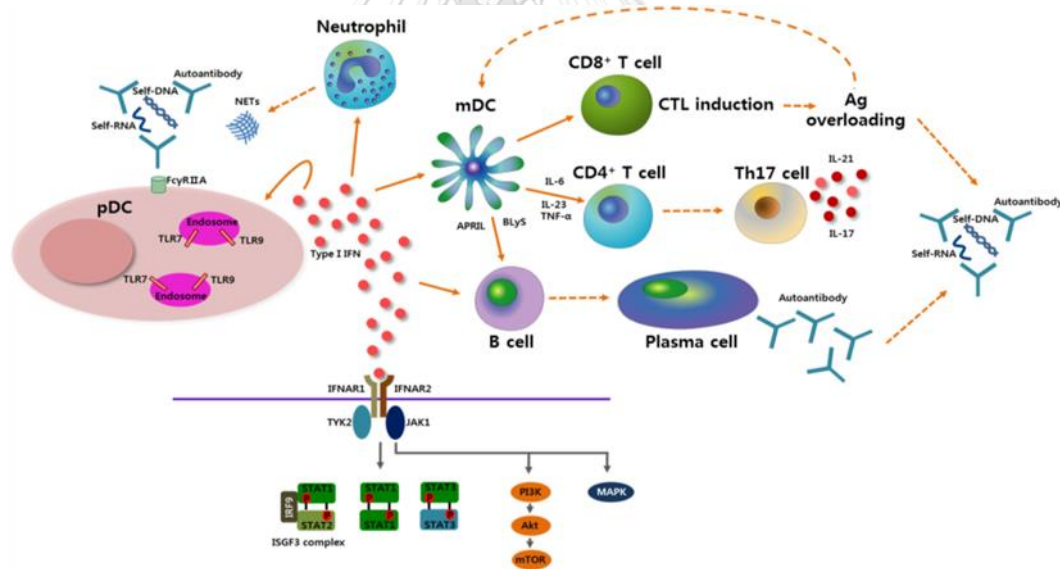
Score	Descriptor	Description
8	Seizure	Recent onset. Exclude metabolic, infectious, or drug-related causes.
8	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Includes hallucinations; incoherence; marked loose associations; impoverished thought content; marked illogical thinking; bizarre, disorganized or catatonic behavior. Exclude the presence of uremia and offending drugs.
8	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation or impaired memory or syndrome other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Includes a clouding of consciousness with a reduced capacity to

Score	Descriptor	Description
		focus and an inability to sustain attention on environment, and at least two of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, and drug-related causes.
8	Visual	Retinal changes from systemic lupus erythematosus: cytooid bodies, retinal hemorrhages, serous exudates or hemorrhages in the choroid, optic neuritis (not due to hypertension, drugs, or infection).
8	Cranial nerve	New onset of a sensory or motor neuropathy involving a cranial nerve.
8	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous; unresponsive to narcotics.
8	Cerebrovascular accident	New syndrome. Exclude arteriosclerosis
4	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation.
4	Myositis	Proximal muscle aching or weakness associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase levels, electromyographic changes, or a biopsy showing myositis.
4	Casts	Heme, granular, or erythrocyte.
4	Hematuria	More than 5 erythrocytes per high power field. Exclude other causes (stone,

Score	Descriptor	Description
		infection).
4	Proteinuria	More than 0.5 grams of urinary protein excreted per 24h. New onset or recent increase of > 0.5 g/24h.
4	Pyuria	More than 5 leukocytes per high-power field. Exclude infection
2	New malar rash	New onset or recurrence of an inflammatory type of rash
2	Alopecia	New or recurrent. A patch of abnormal, diffuse hair loss.
2	Mucous membranes	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations.
2	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	Pericarditis	Pericardial pain with at least one of rub or effusion. Confirmation by electro- or echocardiography
2	Fever	More than 38 °C after the exclusion of infection.
2	Thrombocytopenia	Fewer than 100,000 platelets
2	Leukopenia	Leukocyte count of < 3000/mm ³ (not due to drugs)

2. อินเทอเพียรอนชนิดที่ 1 และ plasmacytoid dendritic cells

Type I interferons (IFN-I) คือ cytokines ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อที่ทำให้เกิดโรค ประกอบด้วย IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ และ IFN- ω แม้ว่า IFN-I จะถูกผลิตขึ้นโดยเม็ดเลือดขาวทุกชนิด แต่เซลล์ที่ผลิต IFN-I เป็นหลักคือ plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (5) และเซลล์ชนิดนี้พบเพียง 0.2-0.8% ใน peripheral mononuclear cells (PBMCs) แต่ความสามารถในการผลิต IFN-I นั้นสูงกว่าเซลล์ประเภทอื่น 100–200 เท่า (42) เมื่อเซลล์มีกระบวนการหลัง IFN จะเข้าจับกับ type I IFN α receptor (IFNAR) ซึ่งเป็น heterodimeric receptor ที่ประกอบด้วย IFNAR1 และ IFNAR2 บนเซลล์เป้าหมาย จากนั้นจะเกิดการส่งสัญญาณผ่านวิถี JAK/STAT และเริ่มการถอดรหัสยีน IFN-stimulated genes (ISGs) ดังแสดงในรูปที่ 1 (43) หลักฐานหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่าการผลิต IFN-I ที่สูงในผู้ป่วยโรคเอสแอลอีทำให้เกิดการแสดงออกของยีน IFN-stimulated genes (ISGs) มากเกินไปใน PBMC เช่น ISG15 และ Mx1 (44) ด้วยเหตุนี้อินเทอร์เฟอรอนจึงเป็น ตัวการที่มีความสำคัญทางคลินิกและมีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรค เช่น พยาธิวิทยาของไต และการมีอยู่ของ autoantibodies ต่อ dsDNA (44)



รูปที่ 1 บทบาทของ plasmacytoid dendritic cells และอินเทอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 (44)

3. บทบาทของ interferon Type I กับการเกิดภูมิคุ้มกันโรค SLE

หลังจากการรับรู้ของ self-nucleic acids ที่มี immune complexes จะเกิดการกระตุ้น pDCs ให้มีการผลิต IFN-I ซึ่งส่งผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด (ภาพที่ 1) การนำเสนอ immune complex ของ dendritic cells ผ่านโมเลกุล MHC นำไปสู่การกระตุ้น CD4⁺ T cells เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ซึ่งกลายเป็นเซลล์ Th1 หรือ Th17 และเกิดการผลิต cytokines (45) T cells ที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะมีส่วน ทำให้ B cells ถูกกระตุ้นจนเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งกลายเป็น plasma cells ซึ่งสามารถหลั่ง soluble autoantibodies ในปริมาณสูง ในรูปแบบของ IgG โดยไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และ autoantibodies เหล่านี้มีผลทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อต่างๆได้ (46) นอกจากนี้ IFN-I ยังกระตุ้น myeloid DCs (mDCs) เพื่อผลิตสารกระตุ้นต่างๆ เช่น B lymphocyte stimulator (BLyS), a proliferation-inducing ligand (APRIL), interleukin-6 (IL-6), IL-23, และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) โดย BLyS และ IL-6 แสดงให้เห็นอย่าง ชัดเจนถึงบทบาทที่สำคัญในการเกิดโรค SLE (43) นอกจากนี้ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ที่ถูกเหนี่ยวนำ โดย IFN-I มีแนวโน้มต่อการได้รับแอนติเจนในปริมาณมากเกินไป สมควรส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเกิด immune complexes เช่นเดียวกับการผลิต autoantibody ใน SLE (44-46) ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทหน้าที่ต่างๆของ IFN-I ที่มีหน้าที่ควบคุมภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or Acquired Immunity) ในโรค SLE ซึ่งยาชีวภาพต่างๆที่มีเป้าหมายในวิถีนี้โดยได้รับการออกแบบและมีความ เกี่ยวข้องในการทดลองทางคลินิกของโรค SLE

4. Fcgr11b receptor กับ systemic lupus erythematosus

เมื่อร่างกายมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจนเกิดเป็น Immune complexes ซึ่งสามารถไปจับกับ Fc gamma receptors (Fc γ Rs) และเกิดการกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเวลาต่อมา (47) ในสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด Fc γ Rs ถูกจำแนกออกเป็น 4 ชนิดได้แก่ Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3 และ Fc γ R4 แต่มีเพียงชนิดเดียวที่ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยยั้งนั้นคือ Fc γ R2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาความสามารถในการต้านทานและการกระตุ้นของ B cells (48) โดยหนูที่ขาด Fc γ R2b จะพัฒนาจนมีลักษณะภายนอกที่เข้าได้กับโรค lupus รวมถึงโรคไตอักเสบ, การสะสมของ Immune complexes และการผลิต autoantibody ที่มากขึ้น (49) หนูที่เป็นโรค lupus ที่ขาด Fc γ R2b มีการแสดงออกที่ชัดเจนของ IFN, Anti-dsDNA, ANA, LN และโรคโลหิตจางเช่นเดียวกับผู้ป่วยโรค SLE (50) ข้อบกพร่องของ Fcgr11b นี้ยังถูกระบุว่าเป็นหนึ่งในยีนที่มีความไวต่อ SLE ในมนุษย์ (1) ที่น่าสนใจคือ ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ FcGR11b ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอีทั่วภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกที่เกิดขึ้นอย่าง อย่างเป็นปกติ (3) นอกจากนี้ความหลากหลายของ FcGR11b มีความเกี่ยวข้องกับความไวต่อโรค SLE

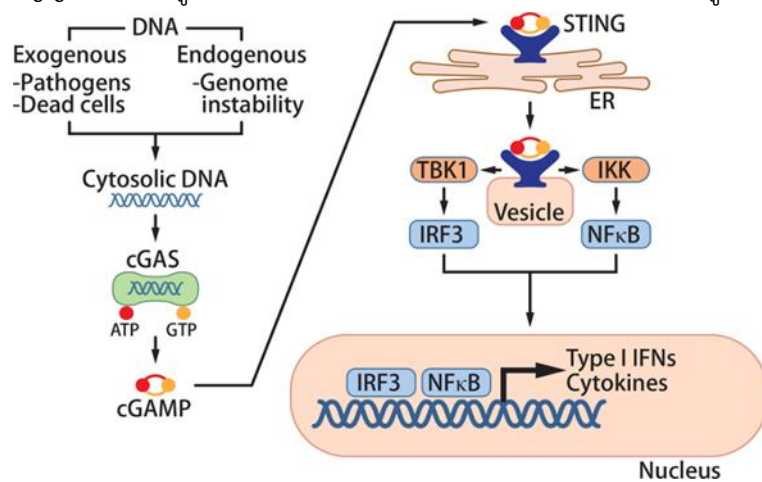
ในทวีปเอเชีย เช่น ไทย จีน และญี่ปุ่น (51) ดังนั้นเราจึงเลือกโมเดลสัตว์ทดลองโรค lupus เพื่อศึกษาการเกิดโรคในเชิงลึก เพื่อเป็นตัวแทนของโรค SLE ในมนุษย์

5. การเหนี่ยวนำของ Type I interferon (IFN-I)

ในโรค SLE วิธีการรับรู้กรดนิวคลีอิกเป็นตัวหลักสำคัญในการผลิต IFN-I โดยการค้นพบที่สำคัญได้มีการระบุถึงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญของบทบาทวิธีการรับรู้กรดนิวคลีอิก (nucleic acid sensing pathway) กับการเกิดโรค SLE คือการค้นพบความผิดปกติทางพันธุกรรมในหนู BxSB ที่มี Yaa (Y-linked autoimmune accelerator) locus (52) ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ Yaa locus คือการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีนบน X-chromosome ไปบน Y-chromosome ของยีน Yaa ซึ่งยีนที่ทำหน้าที่ตอบสนองของหนู BxSB ที่มีอาการแสดงของโรค lupus คือ toll-like receptor 7 (TLR7) นอกจากนี้ หนูเมาส์ MRL/lpr ที่บกพร่องใน TLR7 ยังพบว่ามีการระดับของ autoantibody ที่ลดลงและมีการกระตุ้นลิมโฟไซต์ด้วย (53) อย่างไรก็ตามด้วยยั้ง TLR7 ไม่ได้มีผลต่อการรักษาผู้ป่วยโรค เอสแอลอีที่มากนัก (54) ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า TLR7-independent pathway อาจจะมีอิทธิพลต่อการส่ง สัญญาณของ IFN-I

6. Stimulator of interferon genes (Sting)

หลักฐานหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่าการรับรู้กรดนิวคลีอิกอย่างไม่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการผลิตอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 และส่งเสริมความรุนแรงของ SLE โดยที่กรดนิวคลีอิกที่ได้รับมาจาก extracellular organisms เช่น แบคทีเรีย และไวรัสจะมีการรับรู้ผ่านทาง Toll-like-receptor (TLRs) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่กรดนิวคลีอิกที่อยู่ในไซโตซอลจะไม่ขึ้นกับการรับรู้ผ่านทาง TLRs ซึ่งผลการศึกษาล่าสุดพบว่า Stimulator of interferon genes (Sting), a.k.a. Transmembrane Protein 173 (Tmem173) เป็นเสมือนตัวตรวจรับรู้กรด นิวคลีอิกในไซโตซอล เมื่อถูกกระตุ้นแล้วจะมีการส่งสัญญาณการรับรู้และเกิดการผลิต IFN-I (55) ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ภาพรวมแสดงการส่งสัญญาณของวิถี Sting (55)

หลังจากที่ cytosolic nucleic acids และ cyclic dinucleotides ที่สังเคราะห์โดย Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) จับกับ Sting ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของ ER และกระตุ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ Sting ชักนำให้ TBK1 เต็มหมู่ฟอสเฟสให้กับ IRF3 และเคลื่อนที่เป็นคู่เข้าสู่นิวเคลียสร่วมกับ NF- κ B เพื่อกระตุ้นให้ เกิดการผลิต IFN- β และไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ (56) ที่น่าสนใจคือ mouse embryonic fibroblasts (MEFs) ที่ได้จาก หนู Sting-knockout ที่เป็น 129SvEv3 \times C57BL/6J พบการลดลงของการผลิต IL-6 และ IFN- β หลังจาก การทรานส์เฟกด้วยชิ้นส่วนของ DNA ที่หลากหลาย (57) นอกจากนี้ การส่งสัญญาณของ cGAS-STING สามารถกระตุ้น pDCs ของมนุษย์เพื่อกระตุ้นการผลิต IFN- β ได้และการ knockdown ของ Sting โดยใช้ siRNA ในเซลล์ CAL-1 มีผลทำให้การตอบสนองของ IFN ลดลงได้(58) จากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า Sting มีบทบาทที่สำคัญต่อ การรับรู้และกระตุ้นการผลิต IFN- β รวมถึงการรับรู้ cytosolic nucleic acids และ cyclic dinucleotides ของ pDCs ที่รับรู้ผ่านทางกลไกนี้ด้วย

จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง V155R ในยีน Sting ส่งผลทำให้ เกิดการกระตุ้นวิถีของ IFN และส่งผลให้เกิดโรค familial inflammatory syndrome กับ lupus-like manifestations ในมนุษย์ (59) การกลายพันธุ์ของ Sting ยังทำให้เกิดโรคใหม่ที่เรียกว่า “Stimulator of Interferon Genes (STING)–Associated Vasculopathy with Onset in Infant (SAVI)” (60) จากรายงาน เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า Sting อาจมีบทบาทในโรคภูมิคุ้มกันตนเองของมนุษย์

เพื่อทำความเข้าใจเพิ่มเติมเกี่ยวกับพยาธิสรีรวิทยาของ SLE เราจะทำการสำรวจกลไกระดับโมเลกุลโดย ใช้โมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส กล่าวคือ หนูที่มีความบกพร่องต่อ Fcgr1b ซึ่งความบกพร่องนี้จะนำไปสู่การสูญเสีย สัญญาณการยับยั้งและเพิ่ม auto-antibodies จนในที่สุดหนูจะพัฒนากลายเป็นโรค SLE ได้เอง

7. Stimulator of interferon genes (Sting) in lupus mouse models

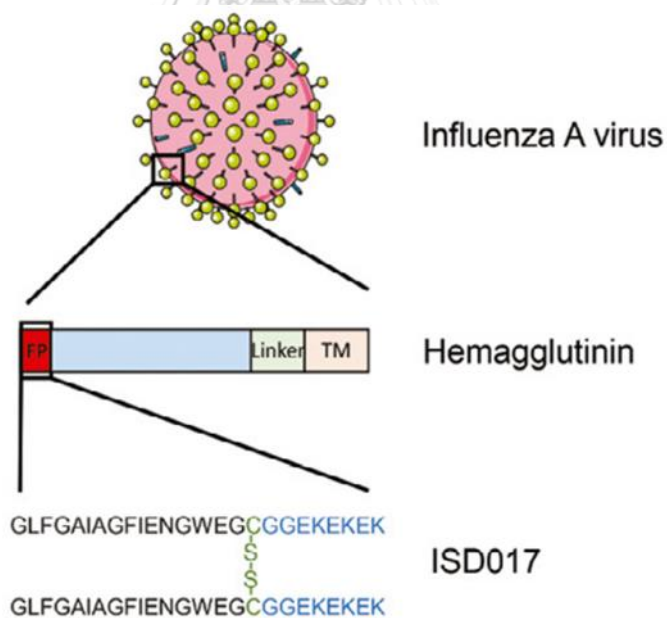
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ Stimulator of interferon genes (Sting) ที่เป็นโปรตีนตัวกลางในการ รับรู้กรดนิวคลีอิกในไซโทซอล กับโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส พบว่าเมื่อ STING ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการสร้าง type I IFN (IFN- β) ที่สูงขึ้นอย่างผิดปกติที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค SLE รวมถึงหนูเมาส์ที่ขาด Fcgr1b ด้วยว่ามีการเพิ่มขึ้นของการส่งสัญญาณ type I IFN ซึ่งความบกพร่องนี้จะนำไปสู่การสูญเสียสัญญาณการยับยั้ง และเพิ่ม auto-antibodies จนในที่สุดหนูจะพัฒนากลายเป็นโรค SLE ได้เอง (6, 7) โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ใน หนูที่มีความบกพร่องของยีน Fcgr2b และ Sting พบว่าหนูลูปัสที่ขาดยีน Sting ไม่เกิดอาการแสดงของโรค SLE แม้ว่าหนูดังกล่าว

จะขาดยีน Fcgr2b แสดงให้เห็นถึงการมีบทบาทที่สำคัญของยีน Sting ต่อการเกิดอาการแสดง ของโรค SLE โมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส (7)

นอกจากนี้ยังมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าที่มีการใช้โมเลกุลเพื่อยับยั้งการทำงานของ STING (ISD017) ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ในโมเดลหนูลูปัสที่ขาดยีน Fcgr2b โดยมีการใช้สาร ISD017 กับหนูตั้งแต่อายุ 6 สัปดาห์ ก่อนจะเริ่มมี antinuclear antibody (ANA) และอาการแสดงของโรคลูปัส พบว่ามีประสิทธิภาพในการลด การเกิด glomerulonephritis และลดการสร้าง autoantibody ในหนูทดลองได้(8) จากการศึกษาที่สนับสนุน แนวทางที่จะนำ ISD017 มาใช้ในการรักษาโรค SLE และพัฒนาการรักษาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

8. ISD-017 (STING-antagonist) ISD-017

เป็นเปปไทด์ที่ได้มาจากส่วนของ FP (fusion protein) ใน Hemagglutinin ของ influenza A virus โดยในธรรมชาติจะมีลักษณะอยู่เป็นสายคู่กันแบบ dimeric ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 3 โดยจากการศึกษา ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ISD-017 มีความสามารถในการยับยั้ง STING ผ่านการยับยั้งกระบวนการ ER-to-Golgi trafficking ของ STING เป็นผลทำให้ STING ไม่สามารถที่จะส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการแสดงออก ของโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้ (8)



รูปที่ 3 ภาพแสดงของ ISD-017 ใน FP (fusion protein) ใน Hemagglutinin ของ influenza A (8)

9. Cyclophosphamide (CYC)

Cyclophosphamide มีชื่อทางเคมีว่า 2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazophosphorine 2-oxide monohydrate เป็นสารในกลุ่ม Phosphamide ester ของ mechlorethamine จัดว่าเป็นสารในกลุ่ม Alkylating agent โดยการที่ยาอยู่ในรูปของ monohydrate จะอยู่ในรูปของ unionized และละลายได้ในไขมันส่วนสารที่อยู่ในรูป anhydrous จะละลายในน้ำได้น้อยและอยู่ในรูปที่ไม่คงที่ Cyclophosphamide เป็นยาที่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ โดยอาศัยเอนไซม์จาก cytochrome P450 จนได้ สารที่ออกฤทธิ์ได้คือ 4-hydroxycyclophosphamide, aldophosphamide, phosphoramidate mustard สามารถจับกับสาย DNA และ RNA ทำให้ไม่สามารถเกิดการสังเคราะห์โปรตีนได้และทำให้เซลล์ตายในที่สุด สำหรับ acrolein เป็นสารพิษที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงยา เมื่อไปสะสมบริเวณกระเพาะปัสสาวะแล้วจะทำให้เกิดภาวะ Hemorrhagic cystitis โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ในหนูทดลองโรคอุปสรรคพบว่า Cyclophosphamide สามารถลดระดับของ antinuclear antibody ลดการเกิด immune complex deposition และสามารถลดการเสียหายของ glomerulus ได้ (61)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

งานวิจัยนี้มีการใช้ตัวอย่างทางชีวภาพจากหนูทดลองที่อยู่ในโครงการการศึกษาผลของการใช้สารยับยั้ง การทำงานของสติง (ISD-017) ต่ออาการของโรคแอสแอลอีโนโมเดลสัตว์ทดลองโรคลูปัส ซึ่งผ่านการรับรองจาก คณะกรรมการการจริยธรรมการวิจัยในคนแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการวิจัยเลขที่ 003/2563 โดยมีการใช้ เลือด ปัสสาวะ ไต ม้าม และปลายหางของ หนูทดลอง 4 กลุ่มดังนี้

- 1.1 หนูกลุ่ม Wild type
- 1.2 หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม
- 1.3 หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ ISD-017
- 1.4 หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ CYC

2. การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยอ้างอิงจำนวนสัตว์ทดลองจากรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่มี การศึกษาถึงสารทดสอบ ISD-017 ในสัตว์ทดลองโมเดลโรคลูปัส (8)

จากการคำนวณด้วยสูตรจะได้ขนาดตัวอย่างของหนูในแต่ละกลุ่มการทดสอบต้องมีจำนวน ตั้งแต่ 6 ตัวขึ้นไป ดังนั้นจะใช้ตัวอย่างจากหนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ ISD-017 หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ CYC และหนูกลุ่มที่มีความบกพร่อง ของ Fcgr11b ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม โดยเริ่มนั้นหนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ ISD-017 มีจำนวน 15 ตัว หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ CYC มีจำนวน 9 ตัว และหนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมมีจำนวน 20 ตัว

3. วิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่เป็น C57BL/6 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Bolland S. (NIH, Maryland, USA) และหนู Wild type ซื้อมาจาก the National Laboratory Animal Center จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย ซึ่งโครงการนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการวิจัยเลขที่ 003/2563

3.2 การศึกษาการมีชีวิตรอด

หนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b จะถูกเลี้ยงและติดตามจนมีอายุประมาณ 5-6 เดือน โดยหลังจากนั้นจะทำการให้สารทดสอบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ต้องได้รับสารทดสอบไปเรื่อยๆจนมีอายุครบ 8 เดือน และเปรียบเทียบการรอดชีวิตกับหนูทดลองในกลุ่มที่ใช้ควบคุม รวมถึงหนูกลุ่ม Wild type หลังจากนั้นจะทำการ การุณยฆาตเพื่อเก็บชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ ไต ม้าม และปลาซมา เพื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อไป โดยสุดท้ายนั้นหนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ ISD-017 เหลือจำนวน 15 ตัว หนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ให้สารทดสอบ CYC เหลือจำนวน 9 ตัว และหนูกลุ่มที่มีความบกพร่องของ Fcgr11b ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเหลือจำนวน 11 ตัว

3.3 การทดสอบ Antinuclear antibodies (ANA)

ซีรัมที่ได้จากหนูทดลองจะถูกเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:800 เพื่อใช้ในการทดสอบ Antinuclear antibodies (ANA) ด้วยวิธี indirect immunofluorescence โดยใช้ชุด kit ยี่ห้อ EUROIMMUN (IIFT Mosaic : Hep-20-10/Liver (Monkey)) จากนั้นหยด 30 ul ของซีรัมที่เจือจางแล้วลงในหลุมแต่ละหลุมบนสไลด์ โดยมี Phosphate Buffered Saline (PBS) ถูกใช้เป็น negative control บ่มในอ่างหรือกล่องที่มีความชื้นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเททุกอย่างออกใจหมดโดยระวังไม่ให้เกิดการปะปนซึ่งกันและกันระหว่างหลุมแต่ละหลุม ล้างด้วย PBS อย่างเบามือและระวังการสัมผัสกันระหว่างหลุม ต่อด้วยการเติม Goat anti-mouse IgG-Alexa (1:500) ปริมาณ 30 ul ลงในหลุมแต่ละหลุม บ่มในอ่างหรือกล่องที่มีความชื้นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทและล้างด้วย PBS เช่นกับขั้นตอนก่อนหน้า จากนั้นเติม mounting fluid ลงในหลุมแต่ละหลุมประมาณ 2-4 หยด และปิดทับ ด้วยกระจกบางใสโดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดฟองอากาศบริเวณหลุมตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ และนำไปวิเคราะห์ผล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4 การวัดปริมาณ anti ds-DNA

เติม ds-DNA ที่ละลายด้วย carbonate coating buffer (NaHCO₃, Na₂CO₃) ที่มีความเข้มข้น 10 ug/ml ปริมาตร 100 ul ลงใน 96 well plate ปิดฝาด้วยพลาสติกใส บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำคืน เท coating buffer ที่บ่มทิ้ง และล้างด้วย 1x PBS+0.05%Tween ปริมาตร 300 ul ต่อหลุม 5 ครั้ง เติม blocking solution (FBS, BSA, tween in PBS) ปริมาตร 100 ul ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เท blocking solution ที่บ่มทิ้ง และล้างด้วย 1x PBS+0.05%Tween ปริมาตร 300 ul ต่อหลุม 5 ครั้ง เติมซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1:100 ปริมาตร 100 ul ต่อหลุม (2-3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทที่บ่มทิ้ง และล้างด้วย 1x PBS+0.05%Tween ปริมาตร 300 ul ต่อหลุม 5 ครั้ง จากนั้น เติม HRP conjugated goat anti-mouse ที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1 : 4,000 ปริมาตร 100 ul ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทที่บ่มทิ้ง และล้างด้วย 1x PBS+0.05%Tween ปริมาตร 300 ul ต่อหลุม 5 ครั้ง จากนั้นเติม 100 ul ของ ABTS Peroxidase Substrate Solution A และ B ใน อัตราส่วน 1:1 ลงในหลุมแต่ละหลุม บ่มในที่มืดประมาณ 5-10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 ul ของ ABTS stop solution วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.5 Cellular analysis

หลังจากที่หนูทดลองมีอายุครบตามที่ต้องการจะทำการการรณยฆาตเพื่อเก็บม้ามมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นตัดแบ่งหนึ่งในสามส่วนมาบดผ่านที่กรองขนาด 70 ไมครอน ที่อยู่ใน 6 well plate ที่เติม 1x PBS ที่เย็นจัดปริมาตร 5 ml เพื่อให้ แยกเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 1500 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม ACK buffer (NH₄Cl, KHCO₃ และ EDTA) เพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม BSA buffer (0.5% BSA ใน 1x PBS) ปริมาตร 10 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 1500 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลาย ตะกอนเซลล์ด้วย BSA buffer ประมาณ 1-2 ml ขึ้นกับปริมาณของตะกอนเซลล์ จากนั้นแบ่งเซลล์บางส่วนไปนับ ด้วย hemacytometer และเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 20×10⁶ /1ml โดยเซลล์ที่ได้จะถูกใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 ul ในแต่ละหลุมจากนั้นจะถูกย้อมด้วยสีย้อมแอนติบอดี (flow antibody) ได้แก่ anti-CD4 (clone: GK1.5; cat.100423), CD8 (clone: 53-6. 7; cat. 100708), CD62L (clone: MEL-14; cat. 104417), CD44(clone: IM7; cat.103035) , CD3ε (clone: 145-2C11; cat.100312) , ICOS (clone: C398.4A; cat. 313517), CD11c (clone: N418; cat. 117312), B220 (clone: RA3-6B2; cat. 103222), CD11b (clone:M1/70; cat. 101228), I-Ab (clone: AF6-120.1; cat. 116406), PDCA-1 (clone: 129c1; cat.127103), CD80 (clone: 16-

10A1; cat. 104733), GL7 (clone: GL7; cat. 144604), CD138 (clone:281 - 2; cat.142506) (Biolegend, San Diego, CA, USA) ที่ถูกเตรียมให้เป็น Mastermix (flow antibody, FBS และ BSA buffer) ในปริมาตร 50 ul ต่อหลุมเป็นเวลา 15 นาทีในมีมีดบนน้ำแข็ง ในขณะที่เดียวกันการเตรียม compensation เพื่อใช้หักล้างการวิเคราะห์ข้อมูลสามารถทำได้โดยเลือกตัวแทนสีของแต่ละชนิดประเภทสี ได้แก่ FIT-C, PE, PerCP/Cy5.5, PE/Cy7, APC และ APC/Cy7 มาเชื่อมกับ เซลล์ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า โดยใช้ 50 ul จาก stock เซลล์ที่มีความเข้มข้น 20×10^6 /1ml ผสมกับ FBS 5 ul สี ย้อม 0.3 ul และ BSA buffer 44 ul ต่อหลุมบ่มเป็นเวลา 15 นาทีในมีมีดบนน้ำแข็ง ในขณะที่ Unstained จะถูก เตรียมเช่นเดียวกันแต่จะไม่ผสมสีย้อม (เซลล์, FBS, และ BSA buffer) เมื่อครบเวลาที่ 15 นาทีเติม BSA buffer ปริมาตร 100 ul และนำ 96 well plate ไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 1500 rpm 5 นาที คว่ำ 96 well plate เพื่อเทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วย BSA buffer ปริมาตร 200 ul 2 รอบ จากนั้นละลายด้วย Fixative solution (Flow Fix, 1% Paraformaldehyde) เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometer และวิเคราะห์ข้อมูล ด้วย โปรแกรม FlowJo โดยค่าที่ได้จะถูกแสดงในค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากการคำนวณจำนวนเซลล์จากหนึ่งของมุมของหนูทดลอง จากทั้งหมดสามส่วน และแสดงในค่า cell number ที่ถูกคำนวณจากหนึ่งของมุมของหนูทดลอง ให้เป็นทั้งหมดสามส่วนตามที่ถูกต้องแบ่งมา

3.6 การตรวจวัดปริมาณ Creatinine ในเลือดและปัสสาวะ

การตรวจวัดปริมาณ Creatinine ในเลือดและปัสสาวะทำโดยใช้ Quantichrom Creatinine Assay Kit (DICT-500) เลือดจะถูกนำไปปั่นที่ 3500 rpm 15 นาที เพื่อเก็บ serum และใช้ในการทดสอบ โดย 30 ul ของ serum และปัสสาวะ (เจือจาง 50 เท่า) ของหนูทดลองจะถูกนำไปใส่ใน 96 well plate (2-3 ซ้ำ) จากนั้นเติม 200 ul ของ working reagent (1 : 1 Reagents A และ B) ผสมอย่างเบามือให้ตัวอย่างและสารทดสอบเข้ากันดี วัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกๆ ตัวอย่างที่ 1 และ 5 นาที ที่ความยาวคลื่น 490-530nm (peak absorbance at 510nm) และนำมาคำนวณตามสูตรเพื่อหาปริมาณ Creatinine ในเลือดและปัสสาวะ

สูตรคำนวณ

$$\text{Creatinine concentration} = \frac{\text{ODSAMPLE 5} - \text{ODSAMPLE 1} \times n \times 2 \text{ (mg/dL)}}{\text{ODSTD 5} - \text{ODSTD 1}}$$

3.7 การตรวจวัดปริมาณ Cytokine ในเลือด

เลือดที่ได้จากหนูทดลองที่อายุครบ 8 เดือนจะถูกเก็บหลังการการุณยฆาต และถูกปั่นแยกเอาซีรัมด้วย เครื่อง Centrifuge ที่ 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นซีรัมจะถูกนำไปทดสอบเพื่อหาปริมาณไซโตไคน์ด้วย ชุดทดสอบ LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (Cat. No.

740446) โดยเริ่มจากเติม Assay buffer ซีรัม และ bead อย่างละ 12.5 μL ลงในหลุม 96 well plate ที่มีลักษณะเป็น V-bottom Plate และนำไปเขย่า ด้วยเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 1050 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นเสร็จจะสังเกตเห็นเป็นตะกอนสีฟ้าที่ก้นหลุม จากนั้นคว่ำ plate ลง และซับน้ำให้แห้ง และเติม 1X wash buffer ปริมาตร 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และ Centrifuge ที่ 1050 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการคว่ำ plate ลง และซับน้ำให้แห้ง จากนั้นเติม Detection antibody 12.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ และนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม สาร SA-PE 12.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ ต่อด้วยนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีและ Centrifuge ที่ 1050 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการคว่ำ plate ลง และซับน้ำให้แห้งเติม 1X wash buffer ปริมาตร 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometer

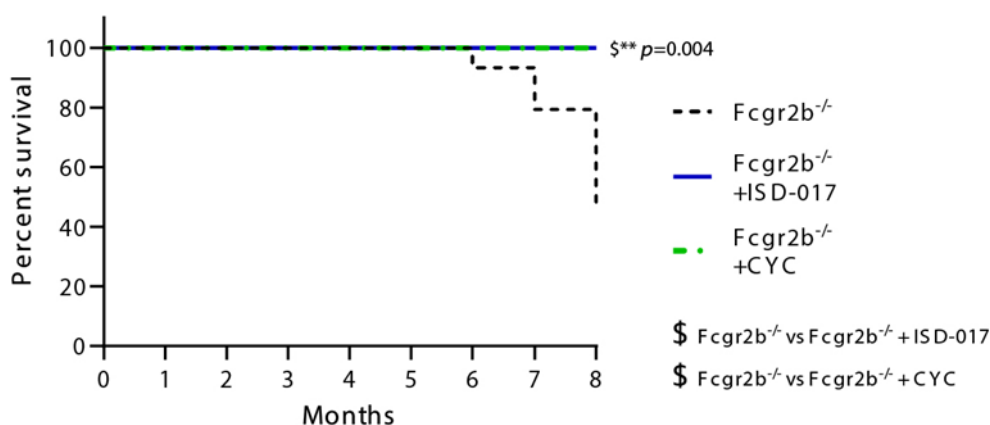


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ISD-017 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ที่มีอาการของโรคอย่างชัดเจน

หนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b^{-/-} ถูกเลี้ยงจนมีอายุราว 5-6 เดือน และถูกทดสอบด้วยสารทดสอบผ่านทาง Intraperitoneal คือ สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml, 3 ครั้งต่อสัปดาห์ และ cyclophosphamide (CYC) ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ซึ่งมีกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วยสารละลาย PBS เป็นเวลา 3 ครั้งต่อสัปดาห์ จนมีอายุครบ 8 เดือน และทำการการุณยฆาตเก็บม้าม ไต เลือด และปัสสาวะ เพื่อทำการวิเคราะห์กลุ่มเซลล์ต่างๆที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในม้าม รวมถึงศึกษาความเสียหายที่เกิดขึ้นในไตของหนูทดลอง ตลอดจนศึกษาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่อาจจะมีกรั่วไหลออกมาเนื่องจากความเสียหายของไตในหนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b^{-/-} และการแสดงออกของ anti-ds-DNA หรือ Antinuclear antibody (ANA) ในเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม โดยการมีชีวิตรอดของหนูทดลองที่ถูกเลี้ยงจนมีอายุ 8 เดือน พบว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมเริ่มมีการตายตั้งแต่อายุราว 6 เดือน และทยอยตายหลังจากนั้นเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับสาร ISD-017 และ CYC ที่ไม่พบว่ามี การตายตลอดจนอายุครบ 8 เดือน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p=0.004$ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 4

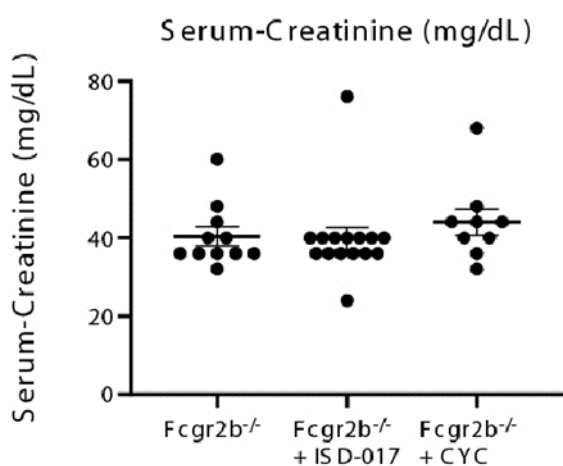


รูปที่ 4 กราฟแสดงควมามีชีวิตรอด (The survival curve) ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ติดตามจนครบเวลา 8 เดือน

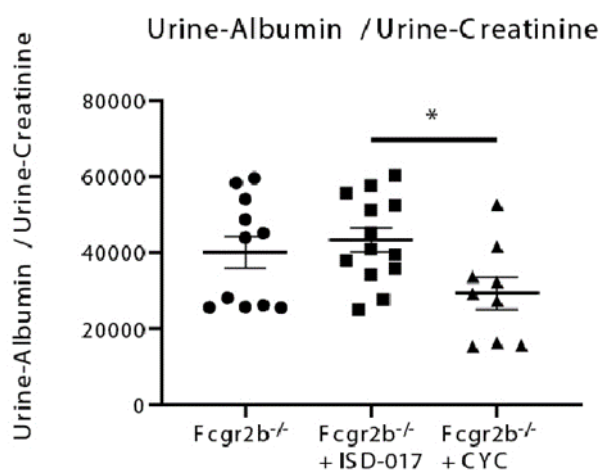
(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$ เครื่องหมาย dollar sign (\$) แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

2. ISD-017 ลดความรุนแรงของ glomerulonephritis ในหนูที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b

โรคไตอักเสบรูบัส (Lupus nephritis) เป็นสาเหตุสำคัญของการเพิ่มอัตราการเจ็บป่วย และการเสียชีวิตในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus (SLE) มีอาการแสดงของโรคหลากหลาย ตั้งแต่ไม่มีอาการแสดงทางไตใดๆ จนโรคไตรุนแรงต้องได้รับการบำบัดทดแทนทางไต ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้มีการประเมินสมรรถภาพการทำงานของไตในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b^{-/-} โดยได้ทำการตรวจวัดปริมาณ Creatinine ในซีรัมที่ได้จากเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งเป็นของเสียที่ผลิตจากกล้ามเนื้อ ซึ่งของเสียดังกล่าวจะถูกขับออกที่ไตถ้าไตทำงานผิดปกติครีตินินก็จะคั่งในร่างกาย และพบว่าหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีปริมาณ Creatinine ที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $P \geq 0.05$ ในขณะที่การตรวจวัดปริมาณ Albumin ต่อ Creatinine ในปัสสาวะของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มพบว่าหนูในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ Albumin ต่อ Creatinine ในปัสสาวะที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 มีปริมาณ Albumin ต่อ Creatinine ในปัสสาวะที่มากกว่า เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร CYC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.049$ ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ



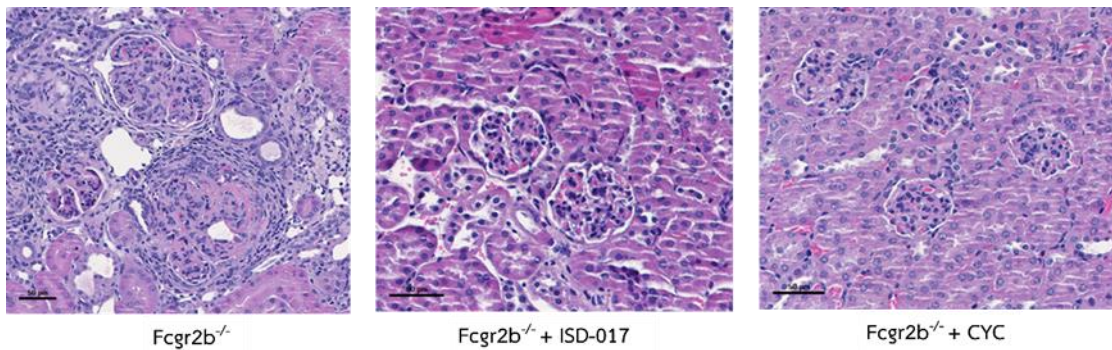
รูปที่ 5 แสดงค่าของครีตินิน (Creatinine) ในเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (N = 9-15 ต่อกลุ่ม)



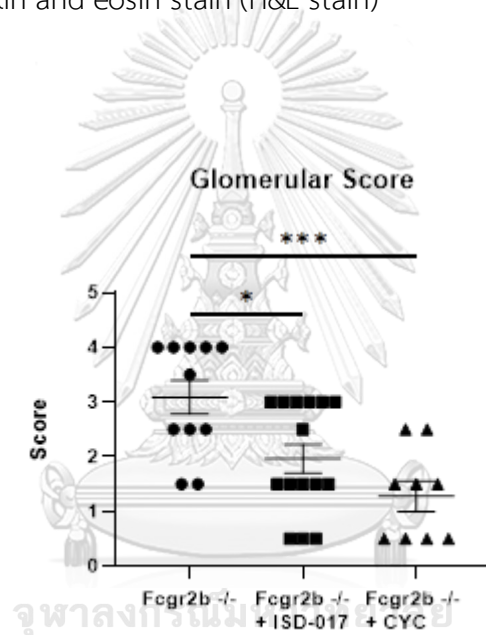
รูปที่ 6 แสดงค่า Urine-Albumin / Urine-Creatinine ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (N = 9-15 ต่อกลุ่ม)

Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

เมื่อพิจารณาพยาธิสภาพของโกลเมอรูลัส (glomerulus) เพื่อประเมินความเสียหายภายในไตของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบมีความเสียหายของ Glomerulus มากที่สุดตามภาพสัณฐานวิทยาจากการย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยค่าความเสียหายดังกล่าวถูกแสดงอยู่ในรูปของค่า Glomerular Score คือ เมื่อทำการเปรียบเทียบหนูทดลองในกลุ่มควบคุมกับหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 และ CYC พบว่า หนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 มีค่าความเสียหายของโกลเมอรูลัสที่น้อยกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0172$ เช่นเดียวกับหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ CYC ซึ่งมีค่าความเสียหายของโกลเมอรูลัสที่น้อยกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0007$ ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 7 แสดงภาพสัณฐานวิทยาของโกลเมอรูลัส (glomerulus) จากไตของหนูทดลองด้วยการย้อมด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin stain (H&E stain)

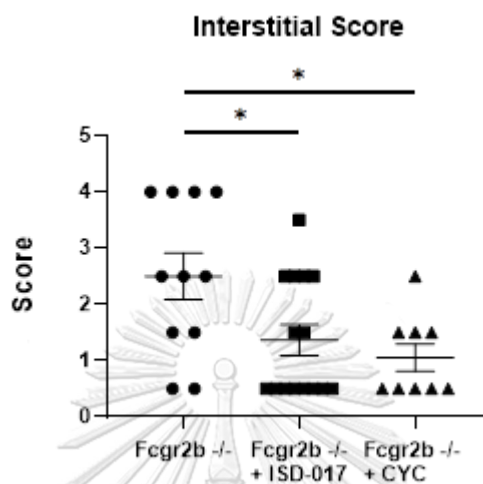


รูปที่ 8 แสดงค่าความเสียหายของโกลเมอรูลัส (Glomerular Score)

(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$.

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการตรวจสอบและพิจารณาค่าความเสียหายของ Interstitial ที่เมื่อถูกตรวจวัดแล้วจะแสดงอยู่ในรูปของ Interstitial Score พบว่า ค่า Interstitial Score ของหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารทดสอบ มีค่าสูงกว่าหนูที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม โดยค่าของ Interstitial Score ของหนูที่ไม่ได้รับสารทดสอบมีค่าสูงกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0373$ และ เช่นเดียวกันค่าของ Interstitial Score ของหนูที่ไม่ได้รับสาร

ทดสอบมีค่าสูงกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0173$ ดังแสดงในรูปที่ 9

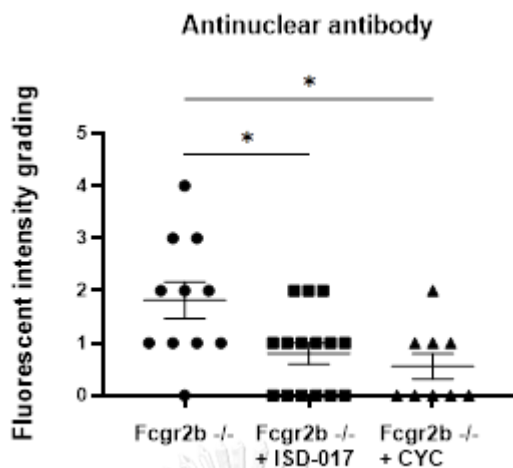


รูปที่ 9 แสดงค่าของ Interstitial Score

(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$.

3. CYC ลดการแสดงออกของ activated B cell

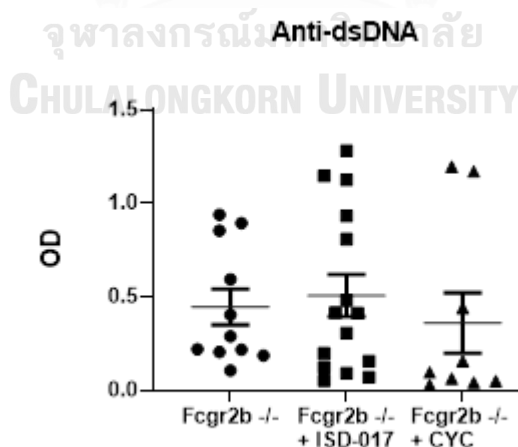
การตรวจวัด antinuclear antibody (ANA) เป็นการตรวจพื้นฐานที่ช่วยประเมินโรคแพ้ภูมิตัวเอง ซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ทั้งร่างกาย และเป็นหนึ่งในการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค Systemic lupus erythematosus (SLE) โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้มีการตรวจประเมินหา antinuclear antibody ในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าหนูในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารทดสอบมีค่าของ antinuclear antibody สูงกว่าหนูที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม โดยหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 มีค่า antinuclear antibody น้อยกว่าหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0211$ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC มีค่า antinuclear antibody น้อยกว่าหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0109$ โดยหนูในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC มีค่าของ Antinuclear antibody ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มอื่นๆ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงค่าของ antinuclear antibody (ANA)

(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$.

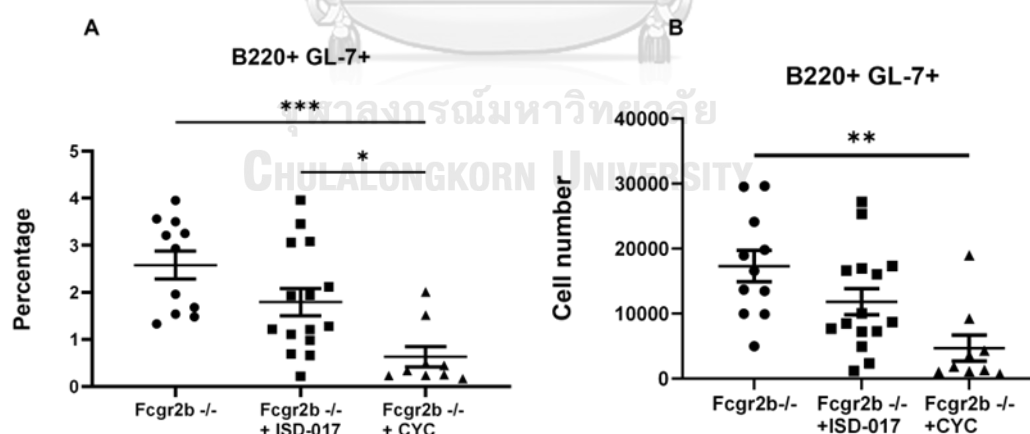
ในขณะที่ผลของการตรวจวัดการแสดงออกของ anti-dsDNA ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าการแสดงออกของ anti-dsDNA ในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $P \geq 0.05$ แสดงให้เห็นว่าสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ ISD-017 และ CYC ไม่มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการควบคุมหรือลดการแสดงออก anti-dsDNA ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงค่าของ anti-dsDNA

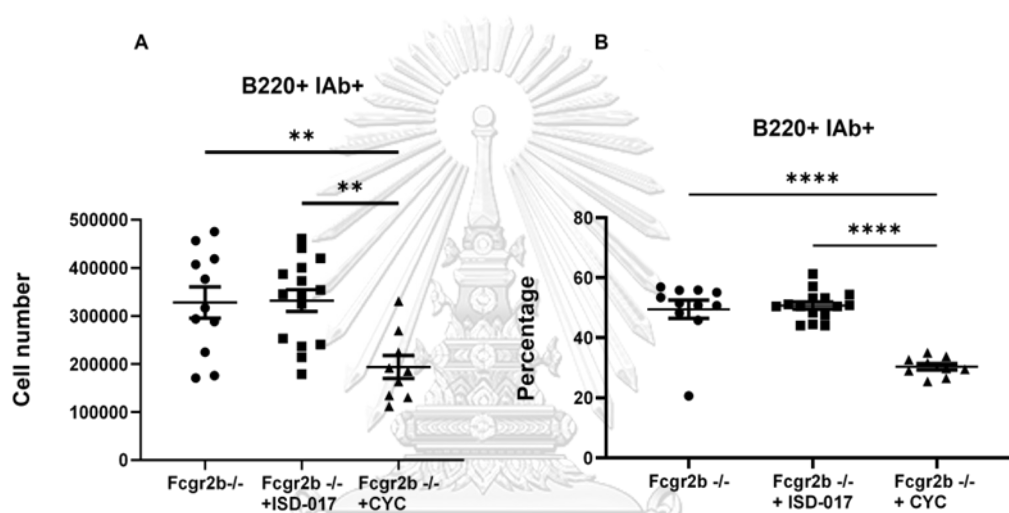
(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

การตรวจวัดเพื่อประเมินการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่ใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ต่างๆในร่างกายเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแสดงออกของกลุ่มเซลล์นั้นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับอาการหรือโรคต่างๆ ที่เราสนใจศึกษาด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในหนูที่ความบกพร่องของ Fcgr2b และถูกทดสอบด้วยสารทดสอบ ISD-017 และ CYC พบว่ากลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) มีการแสดงออกที่ลดลงในหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ CYC เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบในค่าของเปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0003$ เช่นเดียวกันกับหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 ที่มีการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) ลดน้อยลงเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบในค่าของเปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0231$ ในขณะที่เมื่อพิจารณาการแสดงออกของ germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) ในค่าของ cell number ยังคงพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ CYC มีการแสดงออกของ germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) ที่ลดน้อยลงเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0019$ แต่มีความแตกต่างกันในค่าของ cell number อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $P \geq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบกับหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 12 (A-B)



รูปที่ 12 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) , B ค่าเป็น cell number ของ germinal center B cells (B220⁺GL⁻7⁺) (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

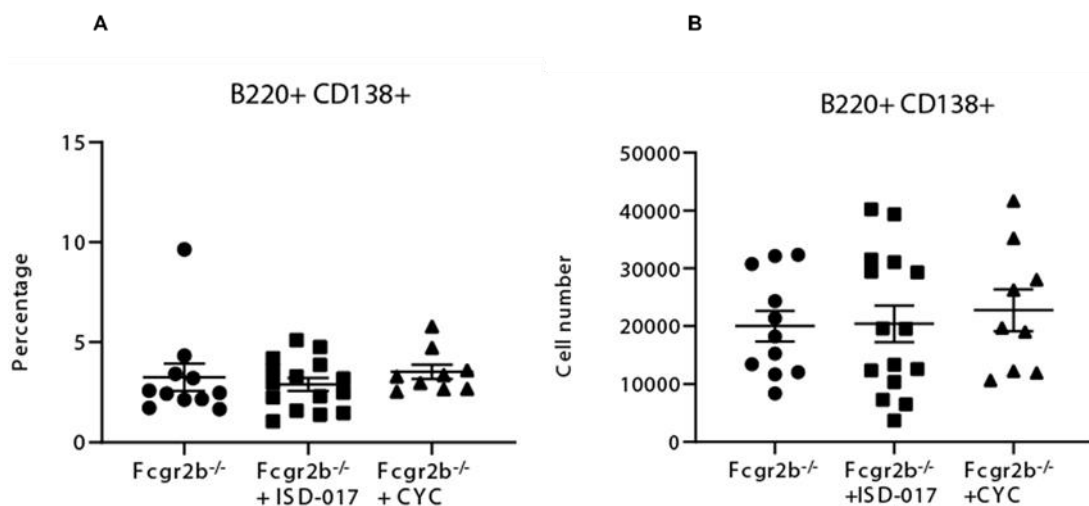
กลุ่มเซลล์ชนิด mature activated B cells (B220⁺IAb⁺) มีการแสดงออกที่ลดลงน้อยที่สุดในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.0001$ ในค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับค่าที่แสดงเป็น cell number กลุ่มเซลล์ชนิด mature activated B cells (B220⁺IAb⁺) มีการแสดงออกที่ลดลงน้อยที่สุดในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.0069$ และ $P = 0.0030$ ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 13 (A-B)



รูปที่ 13 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด mature activated B cells (B220⁺IAb⁺) ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม

A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ mature activated B cells (B220⁺IAb⁺), B ค่าเป็น cell number ของ mature activated B cells (B220⁺IAb⁺) (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ และ **** $p < 0.0001$

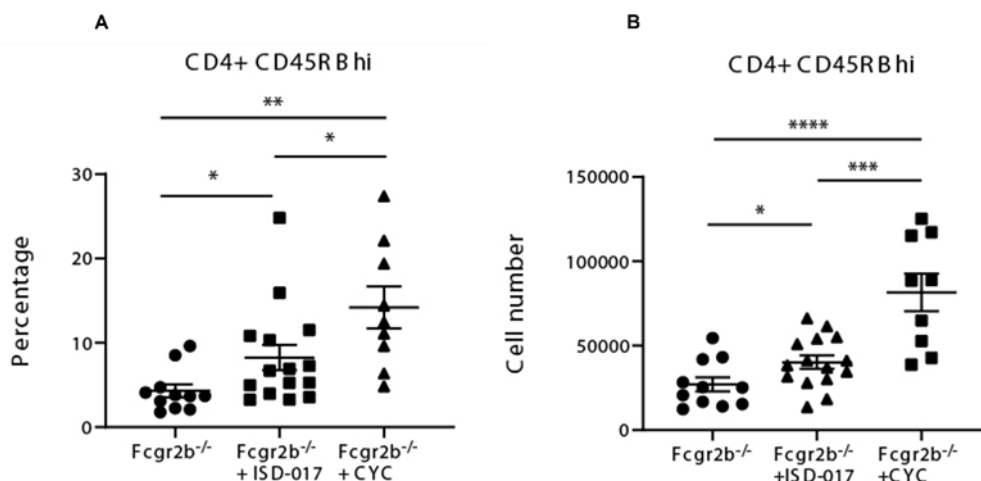
ในขณะที่การแสดงของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด plasma cell (B220⁺ CD138⁺) มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $P \geq 0.05$ ในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มทั้งค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ และค่าที่เป็น cell number ซึ่งให้เห็นว่าสารทดสอบ ISD-017 และ CYC ไม่มีความเกี่ยวข้องกับบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด plasma cell (B220⁺ CD138⁺) ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 14 (A-B)



รูปที่ 14 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด plasma cell (B220⁺ CD138⁺) ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ plasma cell (B220⁺ CD138⁺), B ค่าเป็น cell number ของ plasma cell (B220⁺ CD138⁺) (N = 9-15 ต่อกลุ่ม).

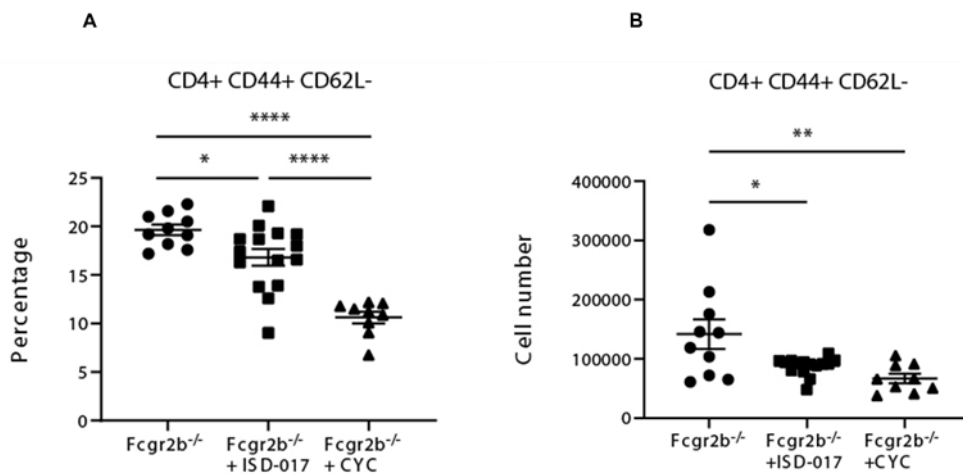
4. ISD-017 ยับยั้งการแสดงออกของ activated T cell

จากการทดสอบการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าสารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD45RB^{hi} ได้มากขึ้นในค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0471$ และ $P = 0.0011$ ตามลำดับ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD45RB^{hi} ได้มากกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0421$ เมื่อพิจารณาค่าที่เป็น cell number พบเช่นเดียวกันว่าสารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD45RB^{hi} ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0331$ และ $P < 0.0001$ ตามลำดับ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD45RB^{hi} ได้มากกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0001$ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 15 (A-B)



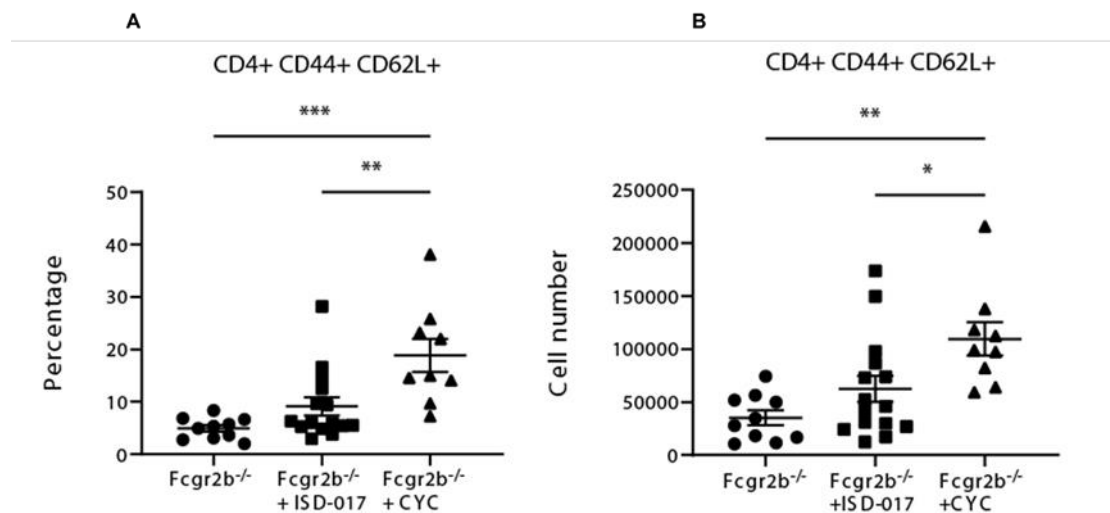
รูปที่ 15 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD⁴+CD45RB^{hi} ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ CD⁴+CD45RB^{hi}, B ค่าเป็น cell number ของ CD⁴+CD45RB^{hi} (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 และ *****p* < 0.0001

กลุ่มเซลล์ชนิด CD⁴+CD44⁺CD62L⁻ เมื่อพิจารณาค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในกลุ่มนี้ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า สารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถลดการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD⁴+CD44⁺CD62L⁻ ได้น้อยลง เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* = 0.0299 และ *p* < 0.0001 ตามลำดับ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร CYC สามารถลดการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD⁴+CD44⁺CD62L⁻ ได้มากกว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* < 0.0001 และเมื่อพิจารณาค่าที่ cell number พบว่า สารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถลดการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD⁴+CD44⁺CD62L⁻ ได้น้อยลง เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* = 0.0183 และ *p* = 0.0032 ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 16 (A-B)



รูปที่ 16 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม
 A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ CD4⁺CD44⁺CD62L⁻, B ค่าเป็น cell number ของ CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 และ *****p* < 0.0001

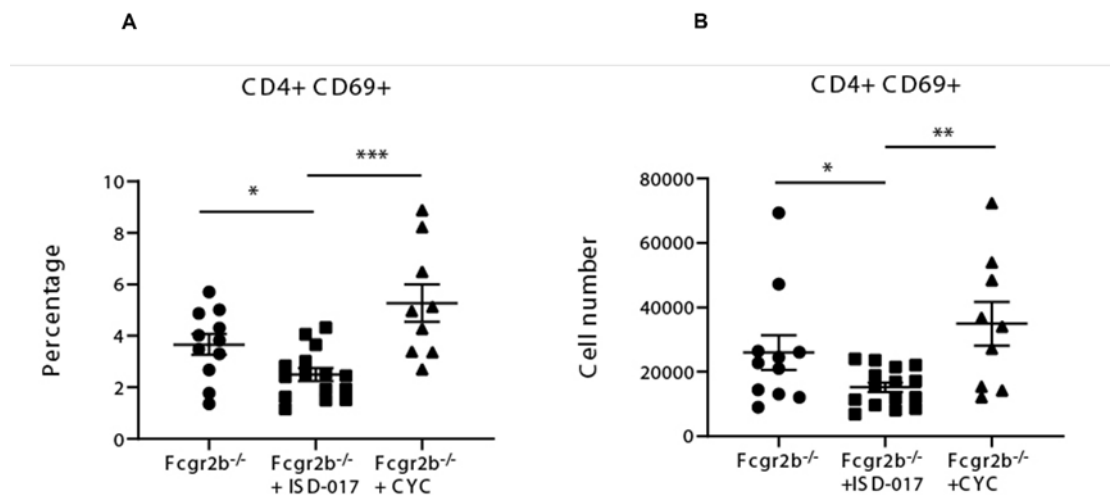
กลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ เมื่อพิจารณาค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในกลุ่มนี้ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า สารทดสอบ CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* = 0.0002 และ *p* = 0.0043 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าที่เป็น cell number ของเซลล์ในกลุ่มนี้ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า สารทดสอบ CYC สามารถกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* = 0.015 และ *p* = 0.0313 ตามลำดับดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 17 (A-B)



รูปที่ 17 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD44⁺CD62L⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม

A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ CD4⁺CD44⁺CD62L⁺, B ค่าเป็น cell number ของ CD4⁺CD44⁺CD62L⁺ (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

ในขณะที่เมื่อพิจารณาการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD69⁺ ในค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 สามารถลดการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD69⁺ ได้น้อยลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0024$ และ $p = 0.0003$ ตามลำดับ เช่นเดียวกับในค่าที่เป็น cell number หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 สามารถลดการแสดงออกของกลุ่มเซลล์ชนิด CD4⁺CD69⁺ ได้น้อยลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0370$ และ $p = 0.0091$ ตามลำดับดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 18 (A-B)

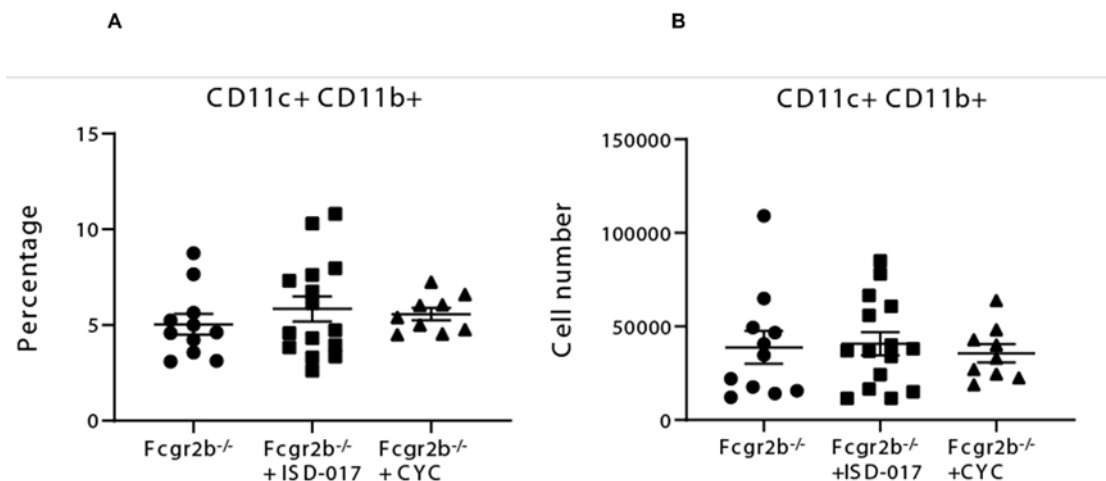


รูปที่ 18 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺CD69⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม

A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ CD4⁺CD69⁺, B ค่าเป็น cell number ของ CD4⁺CD69⁺ (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

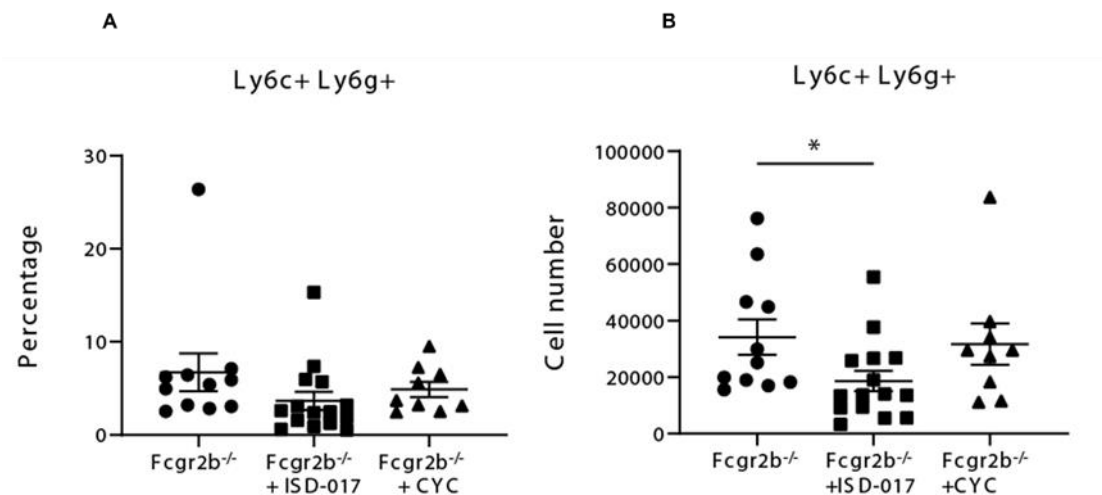
5. ISD-017 ลดการแสดงของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและไซโตไคน์ชนิด IL-1 β

เมื่อหนูทดลองทั้งสามกลุ่มได้รับสารทดสอบและทำการตรวจวัดเพื่อประเมินการแสดงออกของกลุ่มเซลล์พบว่า กลุ่มเซลล์ชนิด CD11c⁺CD11b⁺ มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติในหนูทดลองทั้งสามกลุ่มในค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ $p \geq 0.05$ และเช่นเดียวกันในค่าที่เป็น cell number กลุ่มเซลล์ชนิด CD11c⁺CD11b⁺ มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติในหนูทดลองทั้งสามกลุ่ม $p \geq 0.05$ ดังแสดงในรูปที่ 19 (A-B)



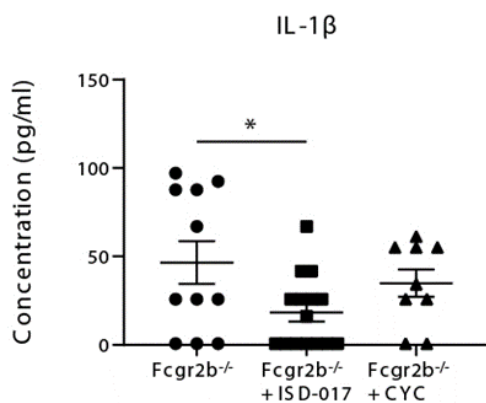
รูปที่ 19 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด CD11c⁺CD11b⁺ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ CD11c⁺ CD11b⁺, B ค่าเป็น cell number ของ CD11c⁺ CD11b⁺ (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

โดยเมื่อพิจารณาค่าที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มเซลล์ชนิด Ly6c⁺ Ly6g⁺ ในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 และ CYC เปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบพบว่า กลุ่มเซลล์ชนิด Ly6c⁺ Ly6g⁺ มีการแสดงที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \geq 0.05$ ในขณะที่เมื่อพิจารณาค่าที่เป็น cell number ของกลุ่มเซลล์ชนิด Ly6c⁺ Ly6g⁺ พบว่า หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 สามารถลดการแสดงออกของเซลล์ในกลุ่มนี้ได้ดีกว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0315$ ในขณะที่หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC มีการแสดงออกของเซลล์ในกลุ่มนี้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p \geq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 20 (A-B)



รูปที่ 20 แสดงกลุ่มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิด $Ly6c^+Ly6g^+$ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม A ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ $Ly6c^+Ly6g^+$, B ค่าเป็น cell number ของ $Ly6c^+Ly6g^+$ (N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

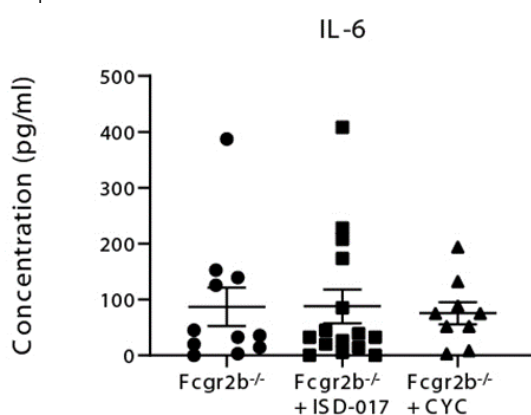
นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ได้มีการประเมินการแสดงออกของไซโตไคน์เพื่อศึกษาและหาความเกี่ยวข้องที่อาจจะเป็นสาเหตุในการเกิดโรค SLE ซึ่งเมื่อทำการประเมินการแสดงออกของไซโตไคน์ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 สามารถลดการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.0482$ ในขณะที่หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ CYC มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ $p \geq 0.05$ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม

(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

เมื่อพิจารณาการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-6 ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า หนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-6 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p \geq 0.05$ ซึ่งให้เห็นว่า สารทดสอบ ISD-017 และ CYC ไม่มีบทบาทหรือความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกไซโตไคน์ชนิด IL-6 ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 22

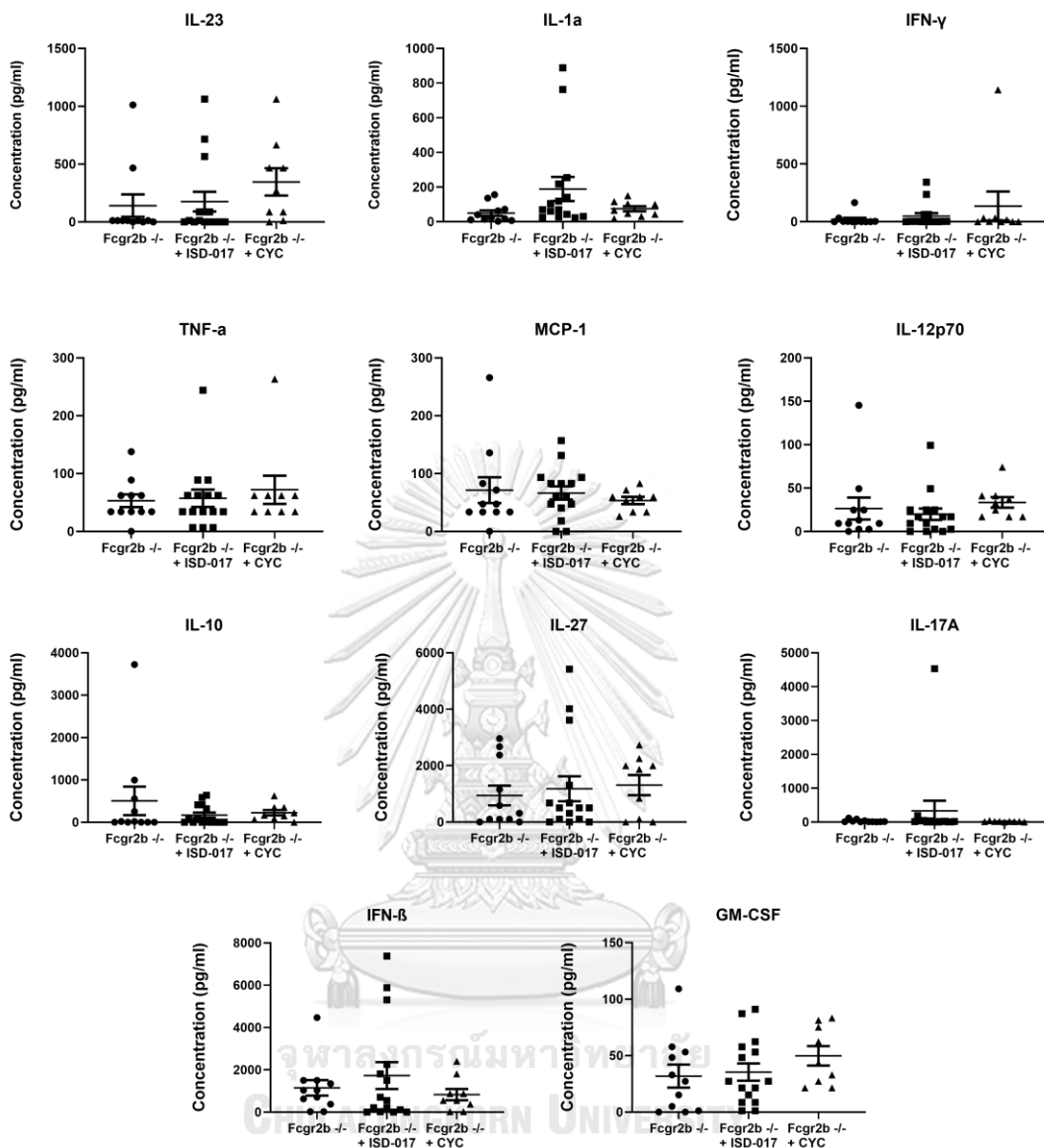


รูปที่ 22 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-6 ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหนูทดลอง 3 กลุ่ม

(N = 9-15 ต่อกลุ่ม). Error bars แสดงด้วยค่าของ SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, และ *** $p < 0.001$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อพิจารณาการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-23 IL-1a IFN- γ TNF- α MCP-1 IL-12p70 IL-10 IL-27 IL-17A IFN- β และ GM-CSF ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า หนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-23 IL-1a IFN- γ TNF- α MCP-1 IL-12p70 IL-10 IL-27 IL-17A IFN- β และ GM-CSF แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p \geq 0.05$ ซึ่งให้เห็นว่า สารทดสอบ ISD-017 และ CYC ไม่มีบทบาทหรือความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกไซโตไคน์ชนิด IL-6 ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงไซโตไคน์ชนิด IL-23 IL-1a IFN-γ TNF-α MCP-1 IL-12p70 IL-10 IL-27 IL-17A IFN-β และ GM-CSF ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry เปรียบเทียบกันในหลอดลอง 3 กลุ่ม

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การเพิ่มขึ้นของระดับอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 (type I IFN) และการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ยีน IFN-stimulated genes (ISGs) มักถูกตรวจสอบในเลือดและเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรค SLE และ บ่งชี้ถึงการเกิดโรคที่รุนแรง (44) ซึ่งการทำงานที่มากเกินไปของอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 นี้ เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของ plasmacytoid dendritic cells (pDCs) และการรับรู้กรดนิวคลีอิกที่ ผิดปกติ นำไปสู่การเหนี่ยวนำยีน IFN-responsive genes และส่งเสริมการตอบสนองในการผลิตของ ออโตอิมมูน (autoimmune) ต่อมาในภายหลัง (62) STING เป็นตัวรับรู้กรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ (cytosolic DNA) และเป็นตัวกระตุ้นการผลิตอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับ การเกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) (63) หนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มการส่ง สัญญาณของอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 หรือมีการแสดงออกของ STING ที่เพิ่มมากขึ้นจะแสดงลักษณะ คล้ายโรคลูปัส ในทางกลับกัน การระงับการส่งสัญญาณ STING ช่วยบรรเทาอาการคล้ายโรคลูปัสใน หนูทดลองได้ (7, 64, 65) การยับยั้งอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) หรือโมเลกุลขนาดเล็กได้แสดงให้เห็นผลลัพธ์ที่น่ายินดีในการลดกิจกรรม ของโรคในผู้ป่วย SLE (66) ในทางเดียวกันสารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) กำลังถูกพัฒนา เพื่อเป็นตัวบำรุงรักษาที่มีศักยภาพในการปรับแต่งการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติในโรค SLE

ISD-017 ที่เป็นสารยับยั้งการทำงานของสติง (STING) ซึ่งสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ STING จาก เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ไปยังกอลจิแอฟพาราตัส (golgi apparatus) ที่เป็นหนึ่งในกระบวนการส่งสัญญาณของวิถี STING (STING pathway) เป็นผลให้เกิด การลดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ และอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่ 1 (8) จาก การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการให้สาร ISD-017 กับหนูที่อายุน้อยสามารถลด anti-dsDNA , inflammatory cytokines, และ glomerulonephritis ได้ (8) อย่างไรก็ตามหนูที่มีแนวโน้มเป็น โรคลูปัสระยะพรีคลินิกที่ได้รับการรักษาด้วย ISD-017 อาจไม่แสดงถึงสถานการณ์ทางคลินิกที่แท้จริง ของผู้ป่วย SLE ที่มีฟิโนไทป์ของลูปัสที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นเราจึงได้ทำการทดสอบหนูทดลองที่ แสดงถึงการมีอยู่ของระดับ autoantibody และ proteinuria ด้วย ISD-017 และยาที่ใช้เป็น มาตรฐานในการรักษานั้นคือ cyclophosphamide (CYC) และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ และกลุ่มของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายของสารทั้งสองนี้

การทดสอบด้วยสารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถลดอัตราการเสียชีวิตของหนู ทดลองที่มีความบกพร่องของ FcγR2b ได้เมื่อเปรียบเทียบกัน ซึ่งให้เห็นว่า ISD-017 อาจมีศักยภาพที่

จะใช้เป็นยารักษาโรค SLE ได้ ถึงแม้ว่าหนูที่ได้รับสารทดสอบ ISD-017 จะไม่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณค่า serum creatinine ในกลุ่มของของหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ซึ่งมีเพียง CYC ที่สามารถลด urine protein creatinine ratio ได้ในขณะที่ได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ CYC ที่เป็นยากลุ่ม alkylating agents ที่มีฤทธิ์ยับยั้งวัฏจักรของเซลล์แบบไม่จำเพาะเจาะจง ออกฤทธิ์อย่างชัดเจนต่อเซลล์ในระยะแบ่งตัว หรืออาจทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพักตัว (quiescent cell) ซึ่งเป็นผลให้สามารถลดปริมาณค่าของ proteinuria ในอาการโรคไตอักเสบ (Glomerular disease) ของหนูทดลองได้ (67) นอกจากนี้ ISD-017 และ CYC สามารถลดค่าของ glomerular scores และ interstitial scores ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นการยืนยันความสามารถของ ISD-017 ในการลดความรุนแรงของโรคไตอักเสบจาก lupus ซึ่งคล้ายกับการรักษามาตรฐานของ CYC

การมีอยู่ของ autoantibody ใน systemic lupus erythematosus (SLE) บ่งบอกถึงการทำงานของ B cell ที่บกพร่อง ซึ่งความบกพร่องนี้อาจเกิดจากความผิดปกติภายใน B cell เอง หรืออาจเกิดจากการกระตุ้นโดยแอนติเจนที่เกิดจากโรค SLE เช่นเดียวกับการปรากฏตัวของ antinuclear antibody (ANA) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune diseases) โดยการตรวจหา ANA เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของตัวเอง ซึ่งมีความจำเพาะแบบโพลีโคลนอล (polyclonal specificity) (68) โดย ANA อาจเกิดขึ้นได้หลังจากที่มีการทำงานของเซลล์ชนิด polyclonal B cell (69) ซึ่งความสามารถในการทำให้เกิดการลดลงของ ANA แต่ไม่สามารถลด anti-dsDNA ของสารทดสอบ ISD-017 และ CYC ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายาเหล่านี้อาจจะออกฤทธิ์ต่อเซลล์ชนิด activated B cells แต่ไม่มีบทบาทหรือความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ชนิด plasma cells

นอกจากนี้ยังพบว่าเฉพาะหนูทดลองที่ได้รับสารทดสอบ CYC เท่านั้นที่สามารถลดเซลล์ชนิด germinal center B cell (B220⁺GL7⁺) และสามารถยับยั้งเซลล์ชนิด mature activated B cells (B220⁺IAb⁺) ได้ ในขณะที่การขยายจำนวนของเซลล์ชนิด plasma cells ไม่แตกต่างจากหนูทดลองในกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นถึงเป้าหมายของกลไกที่แตกต่างกันระหว่างสารทดสอบ ISD-017 และ CYC โดยบริเวณ germinal center เป็นบริเวณที่ส่งเสริมการพบกันของ B cell และ antigens ที่ถูกนำเสนอโดย antigens presenting cell (APCs) นำไปสู่กระบวนการที่เซลล์เปลี่ยนแปลงไปให้มีลักษณะเฉพาะ (cell differentiation) เพื่อทำหน้าที่ต่อไป ทำให้ germinal center B cell เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่เป็นสาเหตุมาจากกระบวนการ somatic hypermutation ของ germinal center B cell (70) ในทางตรงกันข้าม plasma cell ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างเต็มที่กลับอยู่ในสภาวะสงบและแสดงถึงการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่น้อยลง (71).

ซึ่งสารทดสอบ CYC ที่เป็น alkylating agent มักจะทำปฏิกิริยาและมีอิทธิพลต่อเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในสภาวะสงบ (quiescent cell) นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ให้หลักฐานที่เน้นถึงบทบาทสำคัญของ CYC ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะในการควบคุมการแสดงออกและการทำงานของเซลล์ที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องในบทบาททางภูมิคุ้มกันของ B cell (72)

กลุ่มของเซลล์ชนิด Effector memory T cells เป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ผลิต inflammatory cytokines และช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ B cell ยิ่งไปกว่านั้นการกระตุ้น T cell ยิ่งส่งเสริมให้เกิดการกระตุ้น B cell และนำไปสู่การหลั่ง autoantibody เป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ (46) โดยสารทดสอบ ISD-017 และ CYC สามารถลดการขยายจำนวนของ effector memory T cells ได้ แต่ที่น่าสนใจคือ activated naïve T cells มีการเพิ่มจำนวนขึ้นในระหว่างที่มีการทดสอบด้วยสารทั้งสองตลอดระยะเวลา 2 เดือน ข้อมูลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เสริมกำลังให้ T effector ขับเคลื่อนให้เกิดภูมิต้านทานตนเอง (autoimmunity) อย่างต่อเนื่องต่อไป

สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) สามารถลดจำนวนของ CD69⁺CD4⁺ T cells ในขณะที่ยา CYC ไม่มีผลต่อการลดจำนวนของ CD69⁺CD4⁺ T cells ซึ่ง CD69 จะมีการแสดงออกบนผิวของ T cell เป็นตัวบ่งชี้ของ T cell ที่ได้รับการกระตุ้นในช่วงเริ่มต้น (early-activated marker) และนำไปสู่การผลิตไซโตไคน์ต่างๆที่เกี่ยวข้อง และส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น (30) โดยการกระตุ้นให้เกิด CD69⁺ T cells เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เหล่านี้กับ dendritic cell และสามารถเกิดขึ้นได้ผ่านโมเลกุลของ MHC เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในการทำงานของเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การเกิด cell differentiation ของ Th1 หรือ Th17 และเกิดการผลิตไซโตไคน์ต่างๆ ที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (45) และถึงแม้ว่า ISD-017 จะไม่สามารถลดระดับของ anti-dsDNA ได้ แต่การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างระดับการแสดงออกของ CD69 และคะแนนดัชนีกิจกรรมโรค SLE (SLEDAI) ที่ยังคงมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการประเมินกิจกรรมของโรคได้ (74) ดังนั้น CD69⁺ T cell จึงอาจเป็นสาเหตุของโรค ที่เป็นต้นเหตุในการกระตุ้นให้เกิดการดำเนินของโรคนั้นเอง

เมื่อพิจารณา granulocytes (Ly6c⁺ Ly6g⁺) เซลล์ในกลุ่มนี้มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับบทบาทการดำเนินของโรค SLE โดยสามารถกระตุ้นเซลล์ในภูมิคุ้มกันชนิด B-cell หรือ T-Cell ให้มีการทำงานที่ผิดปกติไปจากเดิม นั่นคือ เหนี่ยวนาให้เกิดการสร้าง type-I interferons, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), B-cell activating factor (BAFF) และ a proliferation-inducing ligand (APRIL) ซึ่งการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโมเลกุลเหล่านี้ เป็นสาเหตุสำคัญในการกระตุ้น

การเกิดโรค SLE และการควบคุมการแสดงออกทาง epigenetic ของโรค ด้วยสาเหตุนี้จึงอาจส่งผลเสียต่อการพัฒนาและความก้าวหน้าของการดำเนินของโรค SLE ได้ (75) หลักฐานอีกหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่า เซลล์ภูมิคุ้มกัน granulocytes มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในผู้ป่วย SLE ที่เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิด anti-self antibodies ก็จะไปกระตุ้นให้เกิด neutrophil extracellular trap (NETs) ซึ่งจะมีการปลดปล่อยสารประกอบเชิงซ้อนของ DNA ขนาดใหญ่ (large DNA complexes) มากมายและนำไปสู่การกระตุ้นเซลล์ plasmacytoid dendritic cells ที่เป็นเซลล์หลักในการหลั่ง type-I interferons ซึ่งการเสียสมดุลของการสร้าง และการกำจัด NETs นี้ อาจเป็นสาเหตุสำคัญในการพัฒนาของโรค SLE ได้ (76) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ที่มีรายงานถึงความเกี่ยวข้องกับโรค SLE ซึ่งมีหลักฐานรายงานในหนูลูปส์ว่าการแสดงออกของยีน IL-1 β ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและเร่งการลุกลามของโรค (77,78)

สารยับยั้งการทำงานของสติง (ISD-017) สามารถช่วยลดการขยายตัวของกลุ่มเซลล์ชนิด granulocytes (Ly6c⁺ Ly6g⁺) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงสามารถลดปริมาณของ IL-1 β ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ในขณะยา CYC ไม่สามารถทำได้ ตลอดจนช่วยลดความเสียหายของไตในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ที่แสดงให้เห็นในพยาธิสภาพที่เป็นผลมาจาก NETs (79) โดยบทบาทของ ISD-017 ที่สามารถช่วยชีวิตในโรคไตอักเสบลูปส์อาจมาจากการลดลงของนิวโทรฟิล (neutrophils) และ NETs

โดยสรุปแล้วจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ISD-017 สามารถลดไตอักเสบลูปส์ในหนูทดลองที่มีความบกพร่องของ Fcgr2b ได้ โดย CYC มีเป้าหมายโดยตรงต่อ activated B cells ในขณะที่ ISD-017 มีผลต่อบทบาทของ activated T cells และ neutrophils. ดังนั้นการให้สารทดสอบ ISD-017 ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของสติง (a STING inhibitor) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ ISD-017 ที่มีความเป็นไปได้สำหรับการใช้รักษาโรค SLE ที่มีอาการของ glomerulonephritis ร่วมด้วย

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Crispín JC, Hedrich CM, Tsokos GC. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(8):476-84.
2. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(9):1725.
3. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*. 2000;13(2):277-85.
4. Katsuyama T, Tsokos GC, Moulton VR. Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1088.
5. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity*. 2006;25(3):383-92.
6. Bouis D, Kirstetter P, Arbogast F, Lamon D, Delgado V, Jung S, et al. Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019;143(2):712-25.e5.
7. Thim-Uam A, Prabakaran T, Tansakul M, Makjaroen J, Wongkongkathep P, Chantaravisoot N, et al. STING Mediates Lupus via the Activation of Conventional Dendritic Cell Maturation and Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *iScience*. 2020;23(9):101530.
8. Prabakaran T, Troldborg A, Kumpunya S, Alee I, Marinković E, Windross SJ, et al. A STING antagonist modulating the interaction with STIM1 blocks ER-to-Golgi trafficking and inhibits lupus pathology. *EBioMedicine*. 2021;66:103314.
9. Levy DM, Kamphuis S. Systemic lupus erythematosus in children and adolescents. *Pediatric clinics of North America*. 2012;59(2):345-64.
10. Julian T, Hwee-Lin W. Systemic lupus erythematosus in Asia: is it more common and more severe?. *APLAR Journal of Rheumatology* 2006; (9):320–326.
11. Kyttaris VC. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;662:265-83.

12. Limpanasithikul W. Molecular and cellular basis of autoimmune diseases. *Chula Med J* 1995 Jun; 39(6): 403-411.
13. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology today*. 1995;16(2):90-8.
14. Cavallo MG, Pozzilli P, Thorpe R. Cytokines and autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*. 1994;96(1):1-7.
15. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunology today*. 1995;16(3):150-9.
16. Cohen PL, Eisenberg RA. The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunology today*. 1992;13(11):427-8.
17. Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis and rheumatism*. 1994;37(10):1415-20.
18. Mountz JD, Talal N. Retroviruses, apoptosis and autogenes. *Immunology today*. 1993;14(11):532-6.
19. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(1):202.
20. Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, van der Vlag J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(5):371-5.
21. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology today*. 1993;14(9):426-30.
22. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(5):2125-9.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunity in defense and disease. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 2nd. 1994: 376-408.
24. Renau AI, Isenberg DA. Male versus female lupus: a comparison of ethnicity, clinical features, serology and outcome over a 30 year period. *Lupus*. 2012;21(10):1041-8.

25. Deesomchok U, Tumrasvin T. Clinical study of Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 1983;66(11):680-7.
26. Chaiamnuay P, Darmawan J, Muirden KD, Assawatanabodee P. Epidemiology of rheumatic disease in rural Thailand: a WHO-ILAR COPCORD study. *Community Oriented Programme for the Control of Rheumatic Disease. The Journal of rheumatology*. 1998;25(7):1382-7.
27. Kasitanon N, Louthrenoo W, Sukitawut W, Vichainun R. Causes of death and prognostic factors in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2002;20(2):85-91.
28. Kasitanon N, Intaniwet T, Wangkaew S, Pantana S, Sukitawut W, Louthrenoo W. The clinically quiescent phase in early-diagnosed SLE patients: inception cohort study. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2015;54(5):868-75.
29. N. K. systemic lupus erythematosus. Bangkok: O.S. Printing House; 2017: 446.
30. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine*. 2004;83(1):1-17.
31. Bossingham D. Systemic lupus erythematosus in the far north of Queensland. *Lupus*. 2003;12(4):327-31.
32. Werth VP, White WL, Sanchez MR, Franks AG. Incidence of alopecia areata in lupus erythematosus. *Archives of dermatology*. 1992;128(3):368-71.
33. Gilliam JN, Sontheimer RD. Skin manifestations of SLE. *Clinics in rheumatic diseases*. 1982;8(1):207-18.
34. Cojocar M, Cojocar IM, Silosi I, Vrabie CD. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*. 2011;6(4):330-6.
35. Badui E, Garcia-Rubi D, Robles E, Jimenez J, Juan L, Deleze M, et al. Cardiovascular manifestations in systemic lupus erythematosus. Prospective study of 100 patients. *Angiology*. 1985;36(7):431-41.

36. Matthay RA, Schwarz MI, Petty TL, Stanford RE, Gupta RC, Sahn SA, et al. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus: review of twelve cases of acute lupus pneumonitis. *Medicine*. 1975;54(5):397-409.
37. Janssens P, Arnaud L, Galicier L, Mathian A, Hie M, Sene D, et al. Lupus enteritis: from clinical findings to therapeutic management. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:67.
38. Tian XP, Zhang X. Gastrointestinal involvement in systemic lupus erythematosus: insight into pathogenesis, diagnosis and treatment. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(24):2971-7.
39. Liu CC, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. *Current opinion in rheumatology*. 2005;17(5):543-9.
40. Gill JM, Quisel AM, Rocca PV, Walters DT. Diagnosis of systemic lupus erythematosus. *American family physician*. 2003;68(11):2179-86.
41. Lam GK, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*. 2005;23(5 Suppl 39):S120-32.
42. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:432595.
43. Kim JM, Park SH, Kim HY, Kwok SK. A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):14158-70.
44. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2610-5.
45. Rönnblom L, Elkon KB. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(6):339-47.
46. Crompton SP, Morawski PA, Bolland S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(9):1033-46.

47. Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KG. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:69-88.
48. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006;24(1):19-28.
49. Bolland S, Yim YS, Tus K, Wakeland EK, Ravetch JV. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcγRIIB(-/-) mice. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(9):1167-74.
50. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:271694.
51. Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5780):1669-72.
52. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*. 2007;27(5):801-10.
53. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*. 2006;25(3):417-28.
54. Kirou KA, Gkrouzman E. Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2013;148(3):303-12.
55. Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nature immunology*. 2013;14(1):19-26.
56. Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Molecular cell*. 2014;54(2):289-96.
57. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009;461(7265):788-92.
58. Bode C, Fox M, Tewary P, Steinhagen A, Ellerkmann RK, Klinman D, et al. Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA

via the cGAS-STING signaling pathway. *European journal of immunology*. 2016;46(7):1615-21.

59. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg MC, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(12):5516-20.

60. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Sanchez GAM, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *The New England journal of medicine*. 2014;371(6):507-18.

61. Hurd, E. R. Ziff, M. The mechanism of action of cyclophosphamide on the nephritis of (NZB x NZW)F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol*. 1977 Jul;29(1):132-9

62. Soni C, Perez OA, Voss WN, Pucella JN, Serpas L, Mehl J, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA. *Immunity*. 2020;52(6):1022-38 e7.

63. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, and Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013;339(6121):786-91.

64. Ahn J, Gutman D, Saijo S, and Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):19386-91.

65. Gao D, Li T, Li XD, Chen X, Li QZ, Wight-Carter M, et al. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(42):E5699-705.

66. Morand EF, Furie R, Tanaka Y, Bruce IN, Askanase AD, Richez C, et al. Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2020;382(3):211-21.

67. Ponticelli C, Escoli R, and Moroni G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? *Autoimmun Rev*. 2018;17(10):1022-7.

68. Andrade LEC, Damoiseaux J, Vergani D, and Fritzler MJ. Antinuclear antibodies (ANA) as a criterion for classification and diagnosis of systemic autoimmune diseases. *J Transl Autoimmun*. 2022;5:100145.

69. Klinman DM, Shirai A, and Ishigatsubo Y. Polyclonal B cell activation and B cell cross-reactivity during autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* 1994;347:115-23.
70. Young C, and Brink R. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity.* 2021;54(8):1652-64.
71. Amanna IJ, and Slifka MK. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2010;236(1):125-38.
72. Fassbinder T, Saunders U, Mickholz E, Jung E, Becker H, Schlüter B, et al. Differential effects of cyclophosphamide and mycophenolate mofetil on cellular and serological parameters in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy.* 2015;17(1):92.
73. Cibrian D, and Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-53.
74. Su CC, Shau WY, Wang CR, Chuang CY, and Chen CY. CD69 to CD3 ratio of peripheral blood mononuclear cells as a marker to monitor systemic lupus erythematosus disease activity. *Lupus.* 1997;6(5):449-54.
75. Smith CK, and Kaplan MJ. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology.* 2015;27(5):448-53.
76. Yu Y, and Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of clinical & cellular immunology.* 2013;4.
77. Boswell JM, Yui MA, Endres S, Burt DW, and Kelley VE. Novel and enhanced IL-1 gene expression in autoimmune mice with lupus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 1988;141(1):118-24.
78. Lemay S, Mao C, and Singh AK. Cytokine gene expression in the MRL/lpr model of lupus nephritis. *Kidney international.* 1996;50(1):85-93.
79. Pisitkun P, Ha HL, Wang H, Claudio E, Tivy CC, Zhou H, et al. Interleukin-17 cytokines are critical in development of fatal lupus glomerulonephritis. *Immunity.* 2012;37(6):1104-15.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อิสรา อาลี
วัน เดือน ปี เกิด	03 กุมภาพันธ์ 2537
สถานที่เกิด	ประเทศไทย
ผลงานตีพิมพ์	<p>Prabakaran T, Troldborg A, Kumpunya S, Alee I, Marinković E, Windross SJ, Nandakumar R, Narita R, Zhang BC, Carstensen M, Vejvisithsakul P, Marqvorsen MHS, Iversen MB, Holm CK, Østergaard LJ, Pedersen FS, Pisitkun T, Behrendt R, Pisitkun P, Paludan SR. A STING antagonist modulating the interaction with STIM1 blocks ER-to-Golgi trafficking and inhibits lupus pathology. <i>EBioMedicine</i>. 2021 Apr;66:103314. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103314. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33813142; PMCID: PMC8047499.</p> <p>Chantaravisoot N, Kaewsapsak P, Mayuramart O, Nimsamer P, Mankhong S, Chomta N, Bootsri R, Alee I, Wongkongkathep P, Treeprasertsuk S, Payungporn S. COVID-19 active case findings based on self-collected saliva samples with CRISPR-Cas12a detection. <i>Exp Biol Med (Maywood)</i>. 2022 Jul;247(14):1228-1234. doi: 10.1177/15353702221090181. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35473361; PMCID: PMC9379603.</p>