

การศึกษาปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าในตัวนำไฟฟ้าในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิตด้วยการวิเคราะห์วิธี
คาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนต์ซิน-ไดอะซีเตท- ซัคซินิมิดิล- เอสเทอร์

นางสาว พรรณธิพา ต้นสุวรรณค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE STUDY OF POST TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) IN
LIVING RELATED KIDNEY TRANSPLANTATION BY CARBOXY-FLUORESCCEIN
DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY

Miss Pantipa Tonsawan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต
ด้วยการวิเคราะห์วิธีคาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนซ์-ไดอะซีเตท-ซัลฟิโนมิดิล-เอส
เธอร์

โดย นางสาว พรพนธิพา ต้นสุวรรณค์

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราคูญ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชคตะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ นายแพทย์ สุรสีห์ พร้อมมูล)

พรรณนิพา ต้นสุวรรณค์: การศึกษาปฏิกิริยาภูมิแพ้ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตด้วยภาวะการวิเคราะห์วิธีคาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนต์ซิน-ไดอะซีเตท- ซัคซินิมิดิล- เอสเธอร์ (THE STUDY OF POST TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) IN LIVING RELATED KIDNEY TRANSPLANTATION BY CARBOXY-FLUORESCCEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY. อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.นพ. เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์, 110 หน้า.

ที่มา การติดตามการตอบสนองของทางระบบภูมิคุ้มกันหลังการปลูกถ่ายไต มีความสำคัญในการดูแลรักษาผู้ป่วย การประเมินมี 2 ชนิดคือการตอบสนอง humoral และ cellular การประเมินการตอบสนองชนิด humoral ทำได้โดยการตรวจ donor specific HLA antibody ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าเป็นการทดสอบที่สำคัญในการระบุความเสี่ยงต่อ humoral rejection ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่าย ส่วนการตรวจการตอบสนอง cellular นั้น ในอดีตได้มีการศึกษาโดยใช้ $[^3\text{H}]$ -thymidine MLR ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงประโยชน์การตรวจ $[^3\text{H}]$ -thymidine MLR เนื่องจากมีข้อจำกัดและความคลาดเคลื่อนจากการตรวจ การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายที่จะนำวิธี MLR-CSFE ซึ่งถูกนำมาใช้ทดแทนวิธีเดิม เพื่อประเมินการตอบสนองของทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยพร้อมผู้บริจาคไตที่เข้าร่วมการศึกษา จะได้รับการเจาะเลือดเพื่อนำไปแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว หลังจากนั้นนำเม็ดเลือดขาวจากผู้บริจาคไตจะถูกนำไปฉายแสง 3000 rad (เสมือนเป็นตัวกระตุ้น) ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยจะนำไปย้อมสี CFSE (Invitrogen™, UK) แล้วนำเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยและผู้บริจาคมาเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง การทดสอบนี้จะมีตัวกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Phytohemagglutinin และ pool irradiated donors) เป็นตัวควบคุมและใช้เป็นการทดสอบเปรียบเทียบ การศึกษานี้จะตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ interleukin (IL)17 ใน supernatant และนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปวัดปริมาณการแบ่งตัวของ T-cell ด้วย flow cytometer จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม FLOWJO® ซึ่งจะมีการรายงานผลเป็นค่า proliferation index (PI), stimulation index (SI), CD4, CD8 T-cell การคำนวณการทำงานของไตใช้สมการ Modification of Diet in Renal Disease (re-express IDMS traceable)

ผลการศึกษา ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 22 ราย ค่าเฉลี่ยของ HLA mismatch เท่ากับ 2.32 ± 1.6 โดยมีจำนวนผู้ป่วย 7 รายที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธจากการตรวจชิ้นเนื้อ (กลุ่มที่ 1) และมีจำนวน 15 รายที่ไม่มีภาวะไตปฏิเสธ (กลุ่มที่ 2) พบว่าระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตกลุ่มที่ 1 สั้นกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (4.9 ± 3.9 Vs 8.6 ± 3.2 ปี; $p=0.03$) ค่าเฉลี่ยการทำงานของไตในผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 น้อยกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (41.7 ± 19.2 Vs 80.6 ± 19.0 มล/นาที/1.73 เมตร²; $p<0.001$) การศึกษาพบว่าค่า proliferation index stimulation index และปริมาณ CD4 ระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 จะมีปริมาณ CD8 ($30.5 \pm 11.0\%$ Vs $20.8 \pm 9.8\%$; $p=0.16$) และความเข้มข้นของ IL17 (54.8 ± 44.6 Vs 8.75 ± 8.05 pg/ml; $p=0.16$) มากกว่ากลุ่มที่ 2 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการศึกษา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธอาจมีปริมาณ CD8 และปริมาณความเข้มข้น IL17 มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธ การทดสอบด้วยวิธี MLR-CSFE น่าจะได้รับการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นการทดสอบติดตามการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน cellular หลังปลูกถ่ายไต

ภาควิชาอายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชาอายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2553.....

5274788730: MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: MIXED LYMPHOCYTE REACTION / RENAL TRANSPLANTATION / INTERLEUKIN 17/CFSE

PANTIPA TONSAWAN: THE STUDY OF POST TRANSPLANT MIXED LYMPHOCYTE REACTION (MLR) IN LIVING RELATED KIDNEY TRANSPLANTATION BY CARBOXY-FLUORESCHEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) ASSAY. ADVISOR: ASSOC. PROF. KEARKIAT PRADITPORNILPA, M.D., 110 PP.

Background: Post-kidney transplant immune monitorings comprise humoral and cellular monitoring. Post-transplant donor specific HLA antibody predicts the allograft outcome and is biomarker for humoral mediated rejection. However, post-transplant cellular immune monitoring by [³H]-thymidine MLR has yielded controversial results, which are possibly caused by the variability of [³H]-thymidine for cellular proliferation. In the present study, the MLR-CSFE assay which could provide more precise results, was utilized to assess cellular immune monitoring.

Methods: Twenty two living related kidney transplant recipients were included. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of donor-recipient were isolated by Ficoll density gradient. The donor's PBMCs (stimulator) were irradiated at 3000 rad. The recipient's PBMCs (responder) were labeled with CFSE nuclear dye (Invitrogen™, UK). Phytohemagglutinin and pool irradiated donors were used as positive control stimulators. After 96 hours of MLR, the cells were harvested and analyzed for biomarker namely; proliferation index (PI), stimulation index (SI), percentage of CD4, CD8 T-cell. FLOWJO® software was utilized as flow cytometry analytic tool. The eGFR was calculated by re-express IDMS traceable Modification of Diet in Renal Disease equation. The MLR supernatants were collected for IL-17 concentrations and assayed by ELISA (R&D, UK).

Results: Of 22 patients, seven had history of biopsy proven allograft rejection (Group 1) while the remaining fifteen had no history of allograft rejection (Group 2). The duration of transplant vintage in Group 1 was significantly lower than Group 2 (4.9±3.9 Vs 8.6±3.2 years; $p=0.03$). The mean eGFR of Group 1 was significantly lower than Group 2 (41.7±19.2 and 80.6±19.0 ml/min/1.73m²; $p<0.001$). The mean HLA mismatch was 2.32±1.6. The values of CD4, PI, and SI between both groups were comparable. Group 1 showed slightly higher percentage of CD8 (30.5±11.0% Vs 20.8±9.8%; $p=0.16$) and IL17 concentrations (54.8±44.6 Vs 8.75±8.05 pg/ml; $p=0.16$) than Group 2.

Conclusions: In post-transplantation, the rejected recipients had higher percentage of CD8 and IL-17 concentrations than the non-rejected recipients. Post-transplant MLR-CFSE assay should be further validated for post transplant immune monitor in renal transplant recipient.

Department :Medicine..... Student's Signature.....

Fields of Study :Medicine..... Advisor's Signature.....

Academic Years :2010.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านดังต่อไปนี้ ที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง สมความมุ่งหมายตามที่กำหนดไว้

มูลนิธิโรคไตแห่งประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เขียมช่อง หัวหน้าหน่วยโรคไต และ

อาจารย์หน่วยโรคไตทุกท่าน

ที่คอยให้คำแนะนำต่าง ๆ และช่วยติดตามผลการศึกษาในการทำงานวิจัยตลอดมา

เพื่อนแพทย์ประจำบ้านต่อยอดโรคไต ที่คอยช่วยเหลือ และช่วยดูแลผู้ป่วยแทนผู้วิจัยในช่วงเวลาที่ต้องทำงานวิจัย

นายพงษ์ศักดิ์ พันธุ์สิน และเจ้าหน้าที่หน่วยโรคไตโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกคน ที่ช่วยให้ความช่วยเหลือโดยไม่คำนึงถึงสิ่งตอบแทน จนงานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ HLA สภาเภสัชกรรมและห้องปฏิบัติการระบบภูมิคุ้มกัน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อด้านห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและแนะนำการใช้อุปกรณ์จนเสร็จสิ้นงานวิจัย

ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี สละเวลาเพื่อเดินทางมาเข้าร่วมงานวิจัย ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิแท่ง.....	ฒ
สารบัญแผนภูมิรูปภาพ.....	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2. คำถามการวิจัย.....	4
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4. สมมติฐาน.....	4
1.5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	5
1.6. วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	5
1.7. ปัญหาทางจริยธรรม.....	7
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	60

3.1 รูปแบบการวิจัย.....	60
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	60
3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	60
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	61
3.5 การดำเนินการวิจัย.....	62
3.6 การรวบรวมข้อมูล.....	68
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	68
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	69
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	86
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก.....	101
ภาคผนวก ข.....	105
ภาคผนวก ค.....	107
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	110

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของ Innate Immunity และ Adaptive Immunity.....	9
ตารางที่ 2 แสดงวิธีการตรวจหา anti HLA antibody	19
ตารางที่ 3 แสดงการแบ่งวิธีการตรวจ cellular immune monitoring.....	24
ตารางที่ 4 แสดงสารเรืองแสงที่ใช้สำหรับงาน Flow cytometry.....	30
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียแต่ละวิธีที่ใช้ตรวจการทำงานของ T-cell.....	44
ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของ MLC และการเกิดภาวะปฏิเสธไต ในการศึกษาของ Bach และคณะ.....	49
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่รวบรวมการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวกับ MLR ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต.....	53
ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจวิธี MLR-CFSE ในผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการปลูกถ่ายไต.....	55
ตารางที่ 9 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน control plate.....	66
ตารางที่ 10 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน MLR plate.....	67
ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยที่เข้าการศึกษา.....	70
ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดของการเกิดภาวะปฏิเสธไตในผู้ป่วยแต่ละราย.....	70
ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต.....	72
ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต.....	74
ตารางที่ 15 แสดงผล proliferation index ในการทดสอบ MLR.....	76

ตารางที่ 16 แสดงค่า proliferation index ในผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบทั้ง 2 กลุ่ม.....79

ตารางที่ 17 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ estimated GFR และผลการตรวจ MLR-CFSE assay.....84

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	แสดงอัตราความชุกผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาด้วย Renal replacement therapy ในประเทศไทย.....1	1
รูปที่ 2	แสดงการตอบสนองต่อแอนติเจนของ humoral immunity และ cellular immunity.....10	10
รูปที่ 3	แสดงการเกิด T-cell activation และ differentiation.....11	11
รูปที่ 4	แสดงการนำเสนอแอนติเจนผ่าน MHC class I และ II.....12	12
รูปที่ 5	แสดงการนำเสนอแอนติเจนด้วยวิธี direct และ indirect pathway.....13	13
รูปที่ 6	แสดงกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อการปลูกถ่ายไต.....14	14
รูปที่ 7	แสดงอัตราการเกิด rejection และอัตราการเกิด calcineurin nephrotoxicity ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากการติดตาม 10 ปี.....15	15
รูปที่ 8	แสดงผลทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากการติดตาม 10 ปี.....15	15
รูปที่ 9	แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด chronic allograft nephropathy.....16	16
รูปที่ 10	แสดงความสัมพันธ์ของ HLA mismatch ต่อ graft survival.....18	18
รูปที่ 11	แสดงความสำคัญของ HLA antibody และระยะเวลาที่พบหลังปลูกถ่ายไตภายใน 1 ปี และ หลัง 1 ปี ต่อ graft survival.....20	20
รูปที่ 12	ความสัมพันธ์ระหว่าง PRA และ graft survival rate.....21	21
รูปที่ 13	อัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วย DSA negative และ positive ก่อนการปลูกถ่ายไต 22	22
รูปที่ 14	แสดงความสัมพันธ์ของการตรวจพบ DSA ทั้งก่อนและหลังปลูกถ่ายไต และการเกิด Allograft rejection.....22	22
รูปที่ 15	แสดงถึงหลักการตรวจ MLR ด้วยวิธี two-way และ one-way.....25	25

รูปที่ 16	แสดงผลของ [³ H]-thymidine ต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว.....	26
รูปที่ 17	แสดงกลไกการยับยั้งการเติบโตของ CFSE.....	28
รูปที่ 18	แสดงหลักการการทำงานของ flow cytometry.....	29
รูปที่ 19	แสดง histogram การตรวจ flow cytometry	30
รูปที่ 20	แสดงกราฟ histogram แบบ 1 parameter.....	31
รูปที่ 21	แสดงกราฟ histogram แบบ 2 parameter.....	31
รูปที่ 22	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของ fluorescence เซลล์ที่ย้อม CFSE และรอบการแบ่งตัวของเซลล์.....	32
รูปที่ 23	แสดงการตรวจโดยใช้วิธี CFSE-flow cytometry ประเมินการแบ่งตัวของเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เปรียบเทียบให้เห็นในเวลาที่แตกต่างกัน.....	33
รูปที่ 24	แสดงภาพการวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ด้วย flow cytometry.....	33
รูปที่ 25	แสดงการย้อมด้วย monoclonal antibody จำเพาะต่อเซลล์ที่ต้องการวัด.....	34
รูปที่ 26	แสดงการวิเคราะห์ proliferation ของ T cell subset โดยภายหลังการย้อมด้วย PE conjugate anti-CD4 และ PE conjugate anti-CD8.....	34
รูปที่ 27	แสดงวิธีการคำนวณ T-cell proliferation ด้วยการตรวจ MLR-CFSE assay.....	35
รูปที่ 28	แสดง kinetic ของ MLR-CFSE และ [³ H]-Thymidine-MLR assay.....	37
รูปที่ 29	แสดงการตรวจด้วยวิธี [³ H]-Thymidine -MLR assay.....	37
รูปที่ 30	แสดงการตรวจ limiting dilution assay(LDA).....	38
รูปที่ 31	แสดงการศึกษาของ Harmon และคณะ โดยการตรวจวิธี CTL assay ต่ออัตราการผลิตและ การทำงานของไต.....	39

รูปที่ 32 แสดงการศึกษาของ Harmon และคณะ โดยการตรวจวิธี MLR assay ต่ออัตราการผลิตซีวิตและ
การทำงานของไต.....40

รูปที่ 33 แสดงการใช้ MHC tetramer ในการตรวจหา specific T cells ด้วยวิธี flow cytometry.....41

รูปที่ 34 แสดงวิธีการตรวจ enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT) assay.....42

รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ผลการตรวจ IFN- γ Elispot assay และค่า GFR-MDRD
และการเกิด rejection.....43

รูปที่ 36 แสดงวิธีการตรวจที่อาจจะสามารถใช้เป็น non invasive
เพื่อช่วยในการวินิจฉัย allograft rejection.....46

รูปที่ 37 แสดงประโยชน์การใช้ immune monitoring มาใช้ในการปรับใช้ยากดภูมิคุ้มกัน47

รูปที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า MLC และ creatinine clearance (CCr)
ในการศึกษาของ Bach และคณะ.....48

รูปที่ 39 แสดงความสัมพันธ์ของ MLR โดยดูจาก stimulation index (SI) และrelative response (RR)
กับ graft function และการเกิด rejectionในการศึกษาของ Cullen และคณะ.....50

รูปที่ 40 แสดง graft survival แยกตามกลุ่ม hypo-responder และ กลุ่ม hyper-responder
ด้วยการตรวจวิธี MLC ในการศึกษาของ El Agroudy AE และคณะ.....51

รูปที่ 41 แสดงการเปรียบเทียบค่า GFR ในผู้ป่วยกลุ่ม hyporesponse และกลุ่ม response จากการ
ตรวจด้วยวิธี [³H]-thymidine -MLR ในการศึกษาของ Ferraris JR และคณะ.....52

รูปที่ 42 แสดงการเกิด chronic allograft nephropathy ในผู้ป่วยกลุ่ม hyporesponse (SI<6.5)
และกลุ่ม response (SI >6.5) จากการตรวจด้วยวิธี [³H]-thymidine -MLR
ในการศึกษาของ Ferraris JR และคณะ.....52

รูปที่ 43 แสดงการ differentiation of human Th17 cells.....	56
รูปที่ 44 แสดงบทบาทการทำงานของ pro-inflammatory; IL17.....	57
รูปที่ 45 แสดงตำแหน่งการนับเซลล์ในช่องของred blood cell บน hemocytrometer.....	65

สารบัญแผนภูมิแท่ง

หน้า

แผนภูมิที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่า proliferation index ในการทดสอบ MLR.....	77
แผนภูมิที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่า proliferation index ระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม.....	78
แผนภูมิที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ CD4, CD8 และอัตราส่วน CD4/CD8 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย.....	80
แผนภูมิที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ interleukin 17 ในการทดสอบ MLR-CFSE แต่ละวิธี.....	81
แผนภูมิที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ interleukin 17 ในการทดสอบ MLR แต่ละชนิดระหว่างกลุ่มผู้ป่วย.....	82
แผนภูมิที่ 6 แสดงความแตกต่างของค่า stimulation index ระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม.....	83

สารบัญแผนภูมิรูปภาพ

หน้า

แผนภูมิรูปภาพที่ 1 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และ eGFR MDRD.....	84
แผนภูมิรูปภาพที่ 2 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และระยะเวลาหลังผ่าตัดปลูกถ่ายไต.....	85
แผนภูมิรูปภาพที่ 3 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และ จำนวน HLA mismatch.....	85

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

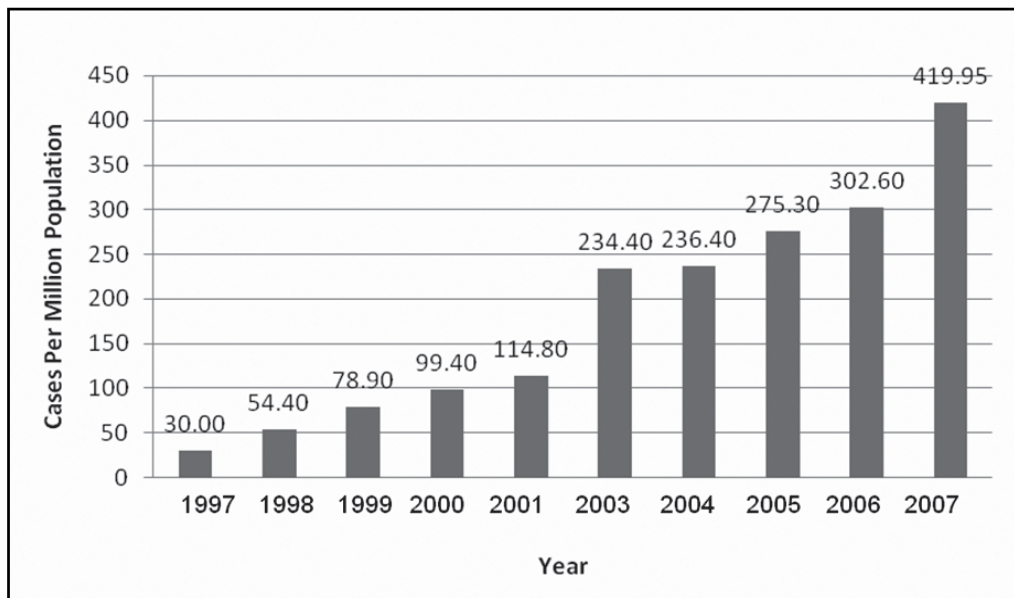
MLR/MLC	Mixed lymphocyte reaction/ Mixed lymphocyte culture
CFSE	Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cell
PRA	Panel reactive activity
DSA	Donor specific antibody
HLA	Human leukocyte antigen
AbMR	Antibody mediated rejection
DMSO	Dimethyl sulfoxide
PHA/I	Phyto-hemagglutinin/Ionomycin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	Phosphate Buffered Saline
SI	Stimulation index
PI	Proliferation index
IL	Interleukin

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (background and rationale)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมีจำนวนสูงขึ้น จนเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก จากข้อมูล USRDS ปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีอัตราความชุกของโรคไตวายเรื้อรัง สูงถึง 1,626 ต่อประชากร 1 ล้านคน[17] ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2551 มีรายงานอัตราความชุกผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้ายที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี renal replacement therapy(RRT) ประมาณ 419.95 ต่อ 1 ล้านประชากร[14, 18] และมีแนวโน้มจะสูงมากขึ้นในอนาคต (รูปที่ 1) ภาวะไตวายถือเป็นปัญหาที่สำคัญที่ทำให้เสียชีวิตและถือเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ การรักษาภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายประกอบด้วย การฟอกไตทางผังหน้าท้อง การฟอกไตด้วยเครื่องไตเทียม และการปลูกถ่ายไต นอกจากนี้อุบัติการณ์ที่สูงแล้ว ค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยโรคไตวายโดยเฉพาะวิธี RRT ก็มีมูลค่าสูงเช่นกัน [18]



รูปที่ 1 อัตราความชุกผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาด้วย RRT ในประเทศไทย[18]

ปัจจุบันนั้นถือว่าการปลูกถ่ายไตเป็นการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด กล่าวคือเป็นวิธีการรักษาที่มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยน้อยที่สุด และเป็นการรักษาที่ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับอีก 2 วิธี [19] การปลูกถ่ายไตทำได้ 2 วิธี ได้แก่ ปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต (cadaveric kidney transplantation) และการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต (living kidney transplantation) ปัญหาการปลูกถ่ายไตแก่ผู้ป่วย

การทำงานของไตภายหลังการปลูกถ่ายจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย[1, 20-21] ได้แก่ ปัจจัยของผู้บริจาค (donor factors) เช่น อายุ โรคประจำตัว ค่าการทำงานของไต [renal function creatinine clearance(CCr)] ชนิดไตบริจาค (living related donor หรือ cadaveric donor) ปัจจัยของผู้รับบริจาคไต (recipient factors) เช่น อายุ โรคประจำตัว สาเหตุของโรคไตวายเรื้อรัง ตลอดจนเทคนิคและระยะเวลาการผ่าตัด เช่น เวลาที่ไตขาดเลือด (total ischemic time) การดูแลหลังการผ่าตัด นอกจากนี้ยังมีปัจจัย immunologic factor ได้แก่ human leukocyte antigen (HLA) matching และ serum crossmatch รวมทั้งการใช้ยากดภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ

การประเมินความเข้ากันได้ของผู้บริจาคไต (Donor) และผู้รับไต (Recipient) ก่อนการปลูกถ่ายไตมีความสำคัญมีประโยชน์ในการตัดสินใจผ่าตัดรักษา การเลือกใช้ยากดภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมและการพยากรณ์ผลการปลูกถ่ายไต การประเมินดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับทั้งในส่วนของ humoral immunity และ cellular immunity

การประเมิน humoral immunity ทำได้ดังนี้ [22]

1.การตรวจการเข้ากันได้ของ HLA (HLA matching)

HLA matching คือการตรวจความแตกต่างของ HLA ที่อยู่บนโครโมโซมระหว่าง donor และ recipient การตรวจจะเน้นตำแหน่งที่สำคัญใน HLA class I และ class II ได้แก่ HLA-A, HLA-B และ HLA-DR ซึ่งมีการรายงานผลทั้งหมด 6 ตำแหน่ง การตรวจ HLA สามารถตรวจได้ 2 วิธีคือ microcytotoxic assay และ DNA typing

2.การทดสอบ antibody ของ recipient ต่อ HLA

การตรวจ HLA antibody ประกอบด้วย 3 วิธีได้แก่การตรวจ panel reactive antibody (PRA) การตรวจ serum crossmatch และการตรวจ single donor HLA antibody

การตรวจ PRA คือการประเมินโอกาสของ recipient จะที่มี antibody ต่อ donor ทำโดยการตรวจดูปฏิกิริยาระหว่าง serum ของ recipient และเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งเซลล์ที่ใช้ทดสอบเปรียบเสมือนตัวแทนประชากร การรายงานผลจะบอกเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ของ PRA หากค่า PRA สูงมากจะทำให้โอกาสที่ recipient ได้ไตจากผู้บริจาคทั่วไปจะค่อนข้างยาก

การตรวจ serum crossmatch เป็นการตรวจความเข้ากันได้ระหว่าง current serum ของผู้รับบริจาคและ lymphocyteของผู้บริจาคไต ปัจจุบันทำได้โดย cytotoxicity, anti-human-globulin-enhance cytotoxicity, flow cytometry และ solid phase assay

การตรวจ HLA antibody ต่อ donor antigen (DSA) วิธี single bead เป็นการตรวจหา antibody ของผู้รับบริจาคที่จำเพาะต่อ antigen ของผู้บริจาคไต

มีข้อมูลแสดงให้เห็นว่า PRA เป็น marker ที่ช่วยบอก anti-HLA antibody ทั้งในก่อนและหลังการผ่าตัดไต และระดับค่า PRA ที่สูงสามารถทำนาย renal outcome [13, 23-25] DSA มีผลต่อการทำงานของไตที่แย่และการเกิด allgraft rejection [26] ยังมีข้อมูลไม่มากที่แสดงถึงบทบาทการประเมิน cellular immunity ต่อการทำงานของไต อย่างไรก็ตามเชื่อว่าการตอบสนองของ alloreactive T cell เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา รวมทั้งปัจจุบันมีความรู้เรื่อง T-cell mediated rejection และ tolerance มากขึ้น ทำให้ทราบบทบาท T-cell เป็นศูนย์กลาง (central mediator) ของการเกิด rejection ทั้ง direct effect ที่ T-cell มีผลก่อความเสียหายต่อไตโดยตรง และ indirect effect ที่มีส่วนช่วย B-cell ในการสร้าง immune response ต่อ donor antigen[27]

ดังนั้นการประเมิน T-cell immunity น่าจะมีประโยชน์ในการตัดสินใจ ในการรักษาทั้งในแง่การเลือกยากดภูมิคุ้มกันและดูแลรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต ในปัจจุบันการศึกษาต่างๆ จึงมุ่งประเด็นในการทดสอบ cellular immune response เพื่อประเมิน immunologic (tolerance) ในผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายไตและอวัยวะอื่น

การประเมิน cellular immunity แบ่งการทดสอบ 2 ส่วน ได้แก่ [28-30]

1. Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay เป็นการวิธีการตรวจวัดการตอบสนองของ T-cell (activated T-cell และ memory T-cell) ต่อ antigen โดยวัดไซโตไคน์ที่เซลล์สร้างขึ้นมา หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นจาก mitogen หรือแอนติเจน โดยใช้การตรวจ specific monoclonal antibodies และนับจุดที่เกิดปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวบ่งชี้เซลล์ที่สร้างไซโตไคน์

2. Mixed lymphocyte reaction (MLR) assay และ cell-mediated lymphotoxicity (CML) assay ทั้ง 2 วิธี ถือเป็นวิธีการที่ใช้กันในการศึกษา T-cell mediated immunity โดย MLR เป็นการทดสอบ T lymphocyte ในการตอบสนองต่อ histocompatibility antigen หรือโมเลกุลของ MHC ที่ต่างจากตัวมัน การประเมินการตอบสนองเป็น T cell ซึ่งส่วนใหญ่เป็น CD4+ T cell proliferation โดยเป็นการตรวจดูว่า lymphocyte ของผู้ให้สามารถกระตุ้น lymphocyte ของผู้รับ ให้มีการตอบสนองอย่างน้อยเพียงใด ถ้า lymphocyte ของผู้ให้และผู้รับมีความเหมือนกันก็จะมีปฏิกิริยาตอบสนองน้อย แต่ถ้ามีความต่างกันมาก ปฏิกิริยาก็จะยิ่งมาก ส่วน CTL assay เป็นการทดสอบประเมินความสามารถของ CD8+ cytotoxic T-cell ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย ซึ่งทั้ง 2 วิธีสามารถบอก alloreactivity ทั้ง direct และ indirect effect ได้ [27, 31]

นอกจากนี้ปัจจุบัน Interleukin 17 (IL17) เป็น proinflammatory cytokine ที่สร้างมาจาก Th-cell ที่ ซึ่งเป็นที่ให้ความสนใจและศึกษาใน organ transplantation ว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเกิด acute rejection ในหลายอวัยวะเช่น ปอด หัวใจ ตับ และไขกระดูก [32-34] ซึ่งในการปลูกถ่ายไตยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความเข้มข้นของ IL17 ใน supernatant MLR

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง post transplant MLR-CFSE และ supernatant IL17 กับ renal graft outcome (renal allograft function และ renal allograft rejection) เพื่อประเมินการนำผลตรวจ MLR และ ปริมาณความเข้มข้นของ IL17 ใน supernatant MLR-CFSE ไปใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไต เช่น ช่วยวินิจฉัยภาวะ rejection ตั้งแต่ระยะแรก ใช้เป็นแนวทางในการปรับยากดภูมิคุ้มกันให้เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละคน (immunologic monitoring) และเป็นตัวชี้วัด (predictive biological maker) เพื่อทำนายผลการปลูกถ่ายไต (outcome) ของผู้ป่วย

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก (primary research Question)

Post-transplantation MLR-CFSE มีความสัมพันธ์กับ renal allograft function หรือไม่

คำถามรอง (secondary research Question)

2. Post-transplantation MLR-CFSE มีความสัมพันธ์กับ renal allograft rejection หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives)

วัตถุประสงค์หลัก (Primary objective)

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ Post-transplantation mixed lymphocyte reaction-CFSE ซึ่งรายงานเป็น stimulation index กับ renal allograft outcome (renal allograft function และ rejection)

วัตถุประสงค์รอง (Secondary objectives)

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง CD4 T-cell subset ของ MLR-CFSE และ CD8 T-cell subset ของ MLR-CFSE กับ renal allograft outcomes (renal allograft function และ rejection)

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ interleukin -17 ใน supernatant MLR-CFSE กับ renal allograft outcomes (renal allograft function และ rejection)

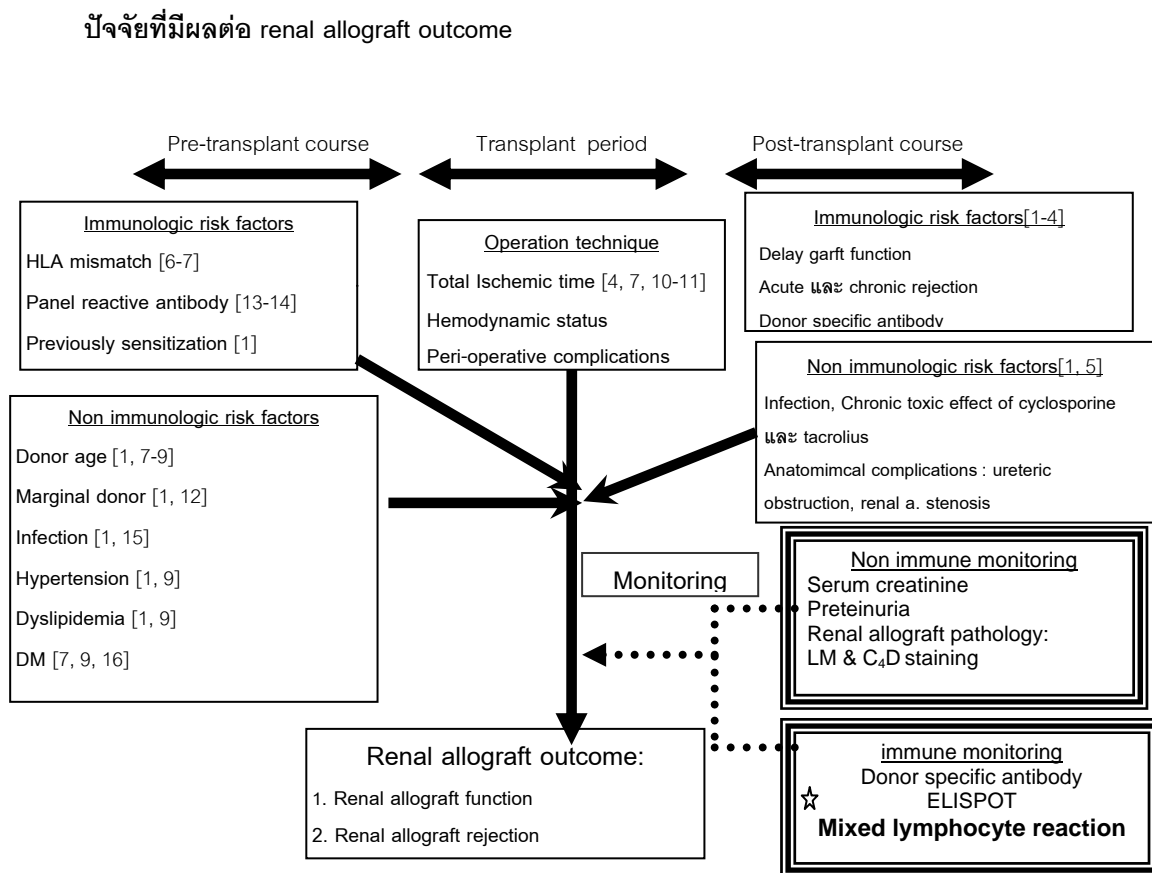
1.4 สมมุติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

Post-transplantation mixed lymphocyte reaction มีความสัมพันธ์กับ renal allograft renal allograft function และ renal allograft rejection

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น (basic assumptions)

ผลของการทำงานของไตในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้จะเน้นศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับทาง Immune เป็นหลัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงพยายามตัดปัจจัยอื่นด้าน non immune ที่อาจมีผลรบกวนการตรวจออกไป

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



1.7 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

รูปแบบการวิจัย: การวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive, restrospective study)

ประชากร (population) คือผู้ป่วยไทยอายุมากกว่า 18 ปีที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือผู้ป่วยไทยที่อายุมากกว่า 18 ปีที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต (living kidney transplantation) และตรวจติดตามการรักษา ที่แผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ขนาดประชากรตัวอย่าง 20 ราย (แสดงรายละเอียดบทที่ 3)

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่มีอายุมากกว่า 18 ปี
2. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตชนิด living kidney transplantation ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. ตรวจติดตามการรักษาในแผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
4. มีแฟ้มประวัติการผ่าตัดและข้อมูลการตรวจรักษาที่สามารถค้นได้
5. สามารถติดต่อให้ผู้บริจาคไตมาเจาะเลือดได้

เกณฑ์การคัดออกจากงานวิจัย(Exclusion criteria)

- 1.มีประวัติการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุการลดลงของการทำงานของไต เช่น CMV infection, recurrent UTI
- 2.มีความผิดปกติของ anatomical ที่เป็นสาเหตุการลดลงของการทำงานของไต (renal function) เช่น renal artery stenosis, renal vein thrombosis, obstructive uropathy
- 3.เกิด recurrent หรือ De-novo glomerular disease ที่เป็นสาเหตุทำให้มีการลดลงของการทำงานของไต

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operative definition)

ปฏิกิริยาลิมโฟไซด์ (Mixed lymphocyte reaction) คือการประเมิน cellular immune response ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) ของ donor และ recipient โดยใช้ CFSE flow cytometry assay ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของT-cell (T-cell proliferation)

ผลลัพธ์การปลูกถ่ายไต (renal allograft outcome)

Renal allograft function: glomerular filtration rate (GFR) จากการคำนวณด้วยวิธี MDRD equation

สูตรการคำนวณ GFR (mL/min/1.73 m²) = 175 x (S_{Cr})^{-1.154} x (Age)^{-0.203} x (0.742 if female) x (1.212

if African American) (conventional units)

Long term graft function: ผู้ป่วยที่มีค่า estimated glomerular filtration rate (eGFR) ได้จากการคำนวณด้วยวิธี MDRD equation > 60 ml/1.73m² หลังการปลูกถ่ายไตเป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี และไม่เคยมีประวัติ renal allograft rejection

Acute Allograft rejection: การลดลงของ renal allograft function อย่างเฉียบพลัน และมีผลตรวจชิ้นเนื้อตรวจยืนยัน

Chronic allograft rejection: การลดลงของ renal allograft function แบบเรื้อรัง และมีผลตรวจชิ้นเนื้อตรวจยืนยัน

Recurrent glomerular disease: การเกิดโรค glomerular disease หลังการปลูกถ่ายไตซ้ำโรคเดิมผู้ป่วย และมีผลตรวจชิ้นเนื้อยืนยัน

De-novo glomerular disease: การเกิดโรค glomerular disease หลังการปลูกถ่ายไตโดยที่ผู้ป่วยไม่เคยเป็นมาก่อน หรือเกิด glomerular disease ชนิดอื่นๆ และมีผลตรวจชิ้นเนื้อยืนยัน

1.9 คำสำคัญ (Key words)

Mixed lymphocyte reaction

Renal transplantation

Interleukin 17

CFSE

1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)

หากการศึกษาพบความสัมพันธ์ Post-transplantation mixed lymphocyte reaction กับ renal allograft outcome (renal allograft function) อาจสามารถนำข้อมูลที่ได้จาก มาเพื่อ

- 1.เป็นตัวชี้วัด (biological marker) บอกรายการณโรค (prognosis) ต่อผลการปลูกถ่ายไตในอนาคต
- 2.ใช้เป็นตัวช่วยในการตัดสินใจปรับเพิ่มหรือลดยา (immunologic monitoring) และเลือกสูตรยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drug) ให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย

1.11 ปัญหาด้านจริยธรรม (Ethical considerations)

1.ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตจะได้รับการอธิบายผลดีและผลเสียของการเข้าร่วมโครงการ โดยลงชื่อยินยอม เป็นลายลักษณ์อักษร (Inform consent)

2.การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่มีความจำเป็นต้องตรวจเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคไตประมาณ 40 ซีซี ซึ่ง ปริมาณเลือดดังกล่าว ไม่น่าจะมีผลข้างเคียงในการเจาะเลือดครั้งนี้ (กรณีเกิดปัญหารายละเอียดในภาคผนวก ก)

3.ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับ มีเพียงผู้วิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษาเท่านั้นที่ทราบ ข้อมูล

4.การนำเสนอผลการวิจัยจะเป็นภาพรวมของการศึกษาทั้งหมด ไม่ได้ระบุรายบุคคล

1.12 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)

1.การศึกษาจะตรวจเลือด ทั้งในผู้บริจาคไตและผู้รับไตพร้อมกัน ดังนั้นต้องมีการโทรนัดหมายวันและ เวลา ที่ผู้บริจาคไตและผู้รับไตสะดวกการเดินทาง โดยผู้วิจัยจะพยายามโทรนัดหมายการเจาะเลือดในวันที่ผู้รับไต ต้องมาตรวจติดตามการรักษา ที่แผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2.วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีหลายขั้นตอนที่อาจมีผลเกิดความคลาดเคลื่อนในแต่ละบุคคล ดังนั้น จึงมีการกำหนดจำนวนเจ้าหน้าที่เทคนิคปฏิบัติการ

3.หากเกิดความผิดพลาดที่มีผิดต่อการตรวจวิเคราะห์อาจต้องติดต่อผู้บริจาคไตและผู้รับไตมาเพื่อเจาะ เลือดอีกครั้ง

1.13 ข้อจำกัดในการวิจัย (limitation)

1.ผล renal allograft outcome (rejection และ allograft function) มีผลจากปัจจัยหลายอย่างคือ ปัจจัยด้าน immune และ non-immune แต่การศึกษานี้มีการกำหนด exclusion ผู้ป่วยเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว มา

2.การเก็บข้อมูลผู้ป่วยบางส่วนในงานวิจัยนี้เป็นการเก็บย้อนหลัง ซึ่งผู้ป่วยบางรายอาจมีข้อมูลบางส่วน ขาดหายไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การดูแลผู้ป่วยปลูกถ่ายไตมีความจำเป็นที่จะต้องเข้าใจความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันพื้นฐาน เพื่อที่จะได้เข้าใจถึงหลักการและเหตุผลในการตรวจทางห้องปฏิบัติการก่อนปลูกถ่ายไต การเตรียมผู้ป่วยก่อนผ่าตัด การเลือกใช้ยากดภูมิคุ้มกัน รวมถึงการเฝ้าติดตามผลแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วย เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการศึกษา mixed lymphocyte reaction (MLR) หลังการปลูกถ่ายไตว่ามีความสัมพันธ์กับ renal allograft outcomes หรือไม่ ซึ่ง MLR ถือว่าเป็นการตรวจประเมินด้าน cellular immunity จึงรวบรวมความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายไตไว้ดังนี้

2.1 ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) [35-37]

ระบบภูมิคุ้มกันจะมีหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย บทบาทสำคัญของระบบนี้คือการทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ไหลวนอยู่ในกระแสเลือด ผ่านอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ แบ่งระบบภูมิคุ้มกันเป็น 2 ส่วน (ตารางที่ 1) ได้แก่

2.1.1 Innate immunity คือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด หรือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific) ทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการต่อสู้และป้องกันเชื้อโรคที่เข้ามาในร่างกาย สามารถต่อสู้และกำจัดเชื้อโรคได้ทันทีโดยใช้เวลาเป็นนาทีหรือชั่วโมง ภูมิคุ้มกันชนิดนี้มีลักษณะพิเศษคือตอบสนองเฉพาะกับเชื้อโรคเท่านั้น จะไม่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่เชื้อโรค ทำให้ไม่ตอบสนองต่อเนื้อเยื่อตนเอง ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดโรค ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

2.1.1.1 ด่าน (barrier) ทำหน้าที่ป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง, ทางเดินอาหาร และทางเดินหายใจ

2.1.1.2 เซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินและย่อยทำลาย พร้อมกับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเซลล์ เหล่านี้ ได้แก่ macrophage, neutrophils และ natural killer cells

2.1.1.3 โปรตีนต่างๆ ที่ออกฤทธิ์เพื่อช่วยและทำลายเชื้อโรค เช่น ไซโตไคน์ คอมพลีเมนต์

2.1.1.4 การอักเสบ (inflammation)

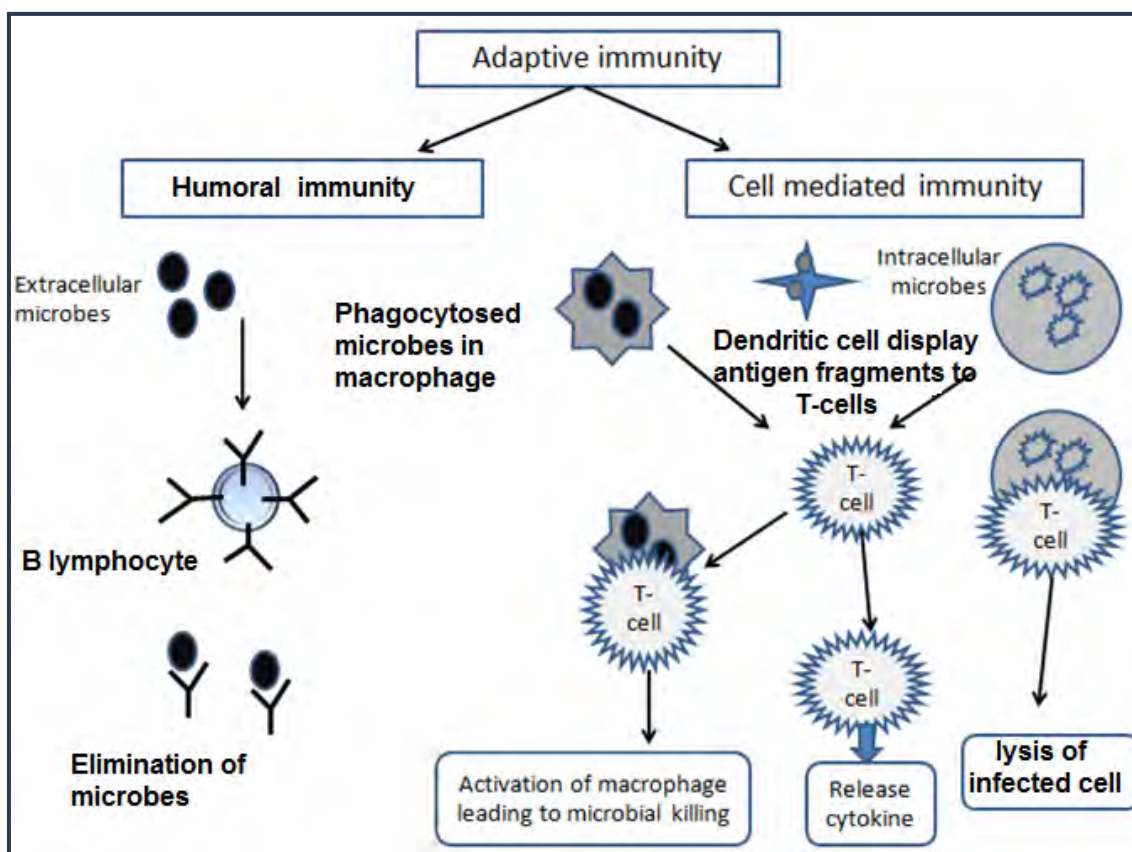
2.2 Adaptive immunity เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบเจาะจง (specific) ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดขึ้น หลังจากร่างกายได้รับการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม (antigen) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบนี้ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ ทั้งชนิด B-cell และ T-cell Adaptive immunity ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ cellular immunity และ humoral immunity (รูปที่ 2)

2.2.1 Cellular immunity เป็นระบบภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ โดยหากมีแอนติเจนจะเข้ามากระตุ้น T lymphocyte ด้วยการนำเสนอของantigen presenting cell (APC) ให้กลายเป็น activated T lymphocyte ซึ่งแอนติเจนจะกระตุ้นทั้ง CD8 (Tc) และ CD4 lymphocyte (Th) แล้วแต่จะนำเสนอโดย โมเลกุลของ MHC class I หรือ class II หลังจากนั้น activated Th lymphocyte จะทำหน้าที่หลั่งไซโตไคน์ต่างๆ ไปกระตุ้น macrophage ให้จับกินเชื้อโรค และ ไซโตไคน์บางตัว ก็ไปกระตุ้น B lymphocyteที่รับรู้แอนติเจนเดียวกันให้มีการแบ่งตัวและเปลี่ยนเป็น plasma cell ส่วน activated Tc lymphocyte จะกลายเป็น cytotoxic T lymphocyte ทำหน้าที่สำคัญใน CMIR

2.2.2 Humoral immunity เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีการสร้าง antibody โดยแอนติเจนจะจับกับ B lymphocyte ที่มี receptor จำเพาะเจาะจงกับมัน (clonal selection) ทำให้เกิดสัญญาณกระตุ้นให้ B lymphocyte แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยที่ทุกตัวจะมีความจำเพาะกับแอนติเจนตัวเดียวกัน และต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell ซึ่งสร้างและหลั่งแอนติบอดีออกมาในเลือดรวมทั้งสารคัดหลั่งต่างๆ แล้วไปมีผลทำลาย target cell โดยขบวนการ phagocytosis ซึ่งอาศัย complement (opsonization) หรือผ่านขบวนการ antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) ส่งผลให้เกิด lymphocytosis การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต้องอาศัยการทำงานของ CMIR และ HIR ร่วมกัน

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของ Innate Immunity และ Adaptive Immunity

คุณลักษณะ	Innate immunity	Adaptive immunity
เวลาในการตอบสนอง	นาทีหรือชั่วโมง	4-7 วันในการตอบสนองครั้งแรกที่พบแอนติเจน
ความจำเพาะ (specificity)	จำเพาะกับ pathogen associated molecular pattern (PAMPs)	มีความจำเพาะสูงมากต่อ epitope ของ antigen
ความจำ (memory)	ไม่มี	มีความจำและตอบสนองได้รุนแรงและรวดเร็ว
ความหลากหลาย (diversity)	มีจำกัดเพราะมี receptor ไม่มาก	มีความหลากหลายมาก
Self/non-self discrimination	แยกได้เนื่องจากจำเพาะกับเชื้อโรคเท่านั้น	เนื่องจาก receptor สร้างมาแบบ random บางครั้งทำให้มี autoimmunity ได้
ชนิดของเซลล์	Macrophage, monocyte, neutrophil, NK, dendritic cell	T cells และ B cells



รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองต่อแอนติเจนของ humoral immunity และ cellular immunity (ดัดแปลงจาก[37])

2.3 ขั้นตอนในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Phase of immune response)[35, 38]

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเริ่มต้นจากสิ่งแปลกปลอม (foreign antigen) เข้ามาในร่างกาย ร่างกายเกิดการรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น ขบวนการเหล่านี้แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ recognition, activation และ effector phase

2.3.1 Recognition phase เป็นขั้นตอนการรับรู้แอนติเจน ประกอบด้วย การจับกันระหว่างแอนติเจนและ receptor ที่อยู่บนผิว lymphocyte โดยการนำเสนอ antigen presenting cell (APC) T cells จะใช้ T cell receptor (TCR) ในการ recognize antigen ที่อยู่ภายใน antigen binding groove ของ major histocompatibility (MHC) molecules ซึ่งอยู่บนผิวเม็ดเลือดขาวและ professional antigen presenting cell (APC) ในมนุษย์มี MHC molecules 2 ชนิด คือ MHC class I และ MHC class II โดยการทำงานจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของรูปร่างและหน้าที่ (รูปที่ 4)

MHC class I จะทำหน้าที่เสนอแอนติเจนจากภายใน (endogenous antigen) ซึ่งได้แก่ HLA-A, HLA-B, HLA-C ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ทั่วไป

MHC class II จะทำหน้าที่เสนอแอนติเจนจากภายนอก (exogenous antigen) ซึ่งได้แก่ HLA-DR, HLA -DP และ HLA- DQ

2.3.2 Activation phase เป็นระยะที่มีขบวนการต่างๆเกิดขึ้นภายในเซลล์ลิมโฟไซต์หลังจากการรับรู้แอนติเจน ขบวนการเหล่านี้ ได้แก่

2.2.1 Proliferation (การเพิ่มจำนวน) ลิมโฟไซต์ที่รับรู้แอนติเจนจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจาก clone ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น

2.2.2 Differentiation หลังจากที่ได้เสนอแอนติเจนให้กับ naïve T-lymphocyte จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็น activated lymphocyte เพิ่มจำนวนมากขึ้น และจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น effector T-cell ชนิดต่าง และมีหน้าที่แตกต่างกันดังนี้ (รูปที่ 3)

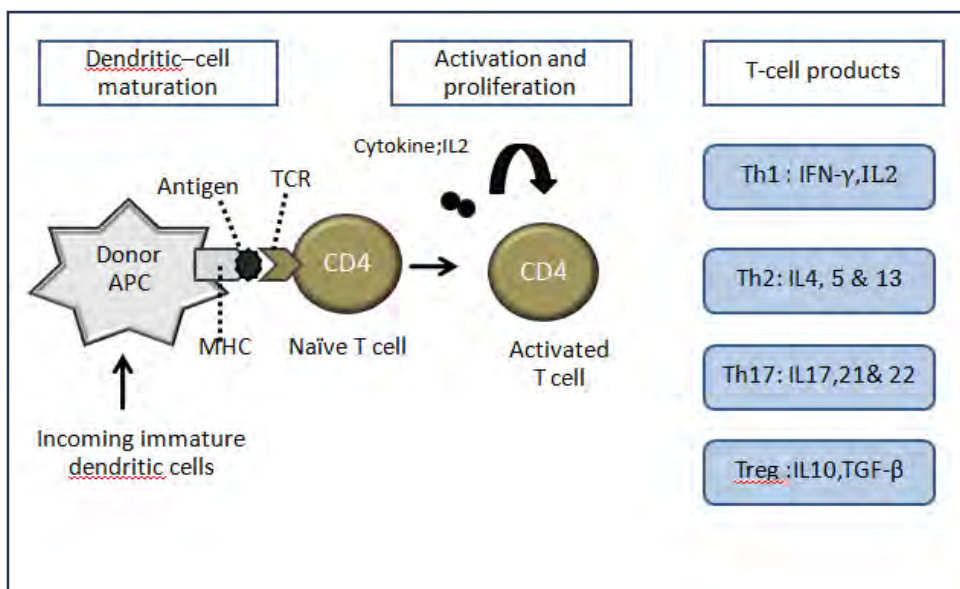
Type 1 helper (Th1) จะสร้าง IFN- γ , IL 2 ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตอบสนองของ cellular immune

Type 2 helper (Th2) จะสร้าง IL4, 5 และ 13 กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ humoral immune

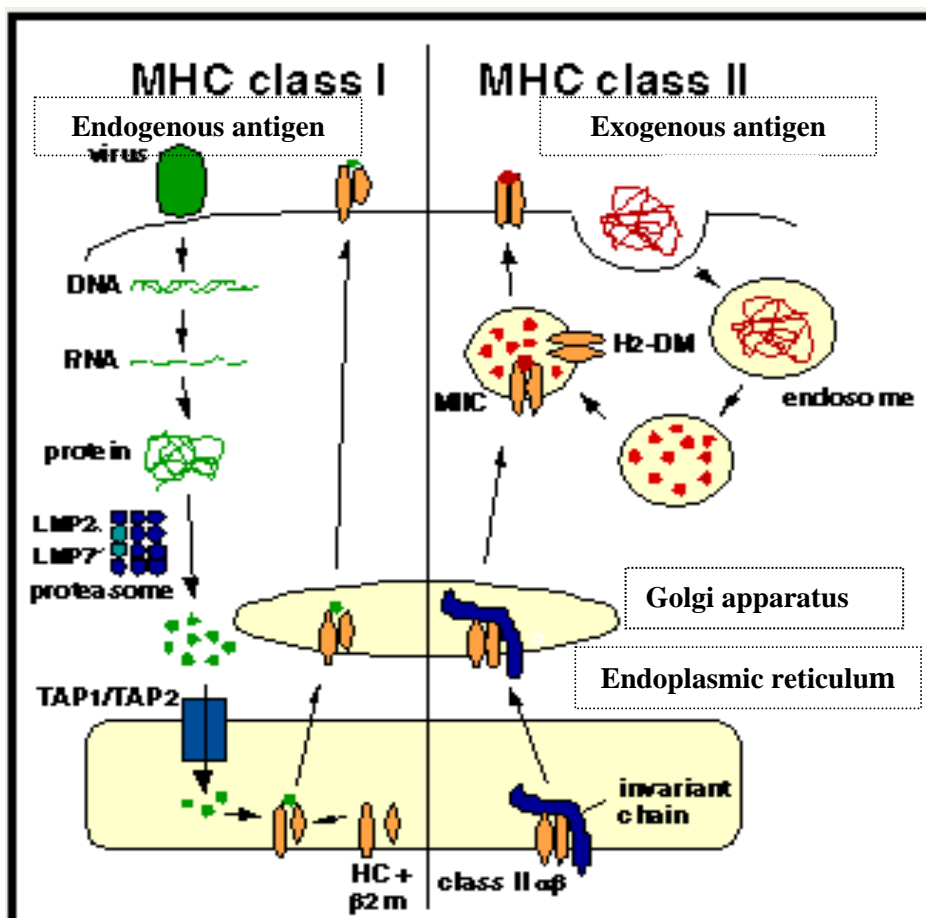
Regulatory T-cell จะสร้าง IL10 และ TGF- β เป็นตัวที่บดทลายสำคัญในการจำกัดการตอบสนองทาง immune ที่มากเกินไปทำให้เกิดภาวะไตปฏิกิริยา

Type 17 helper (Th17) จะสร้าง IL 17, 21 และ 22 เป็นตัวที่มีบทบาททำให้เกิด glucocorticoid-resistant rejection

2.3.4 Effector phase เป็นระยะที่ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นออกฤทธิ์กำจัดแอนติเจนโดยทำลายเซลล์



รูปที่ 3 แสดงการเกิด T-cell activation และ T-cell differentiation (ดัดแปลงจาก[38])



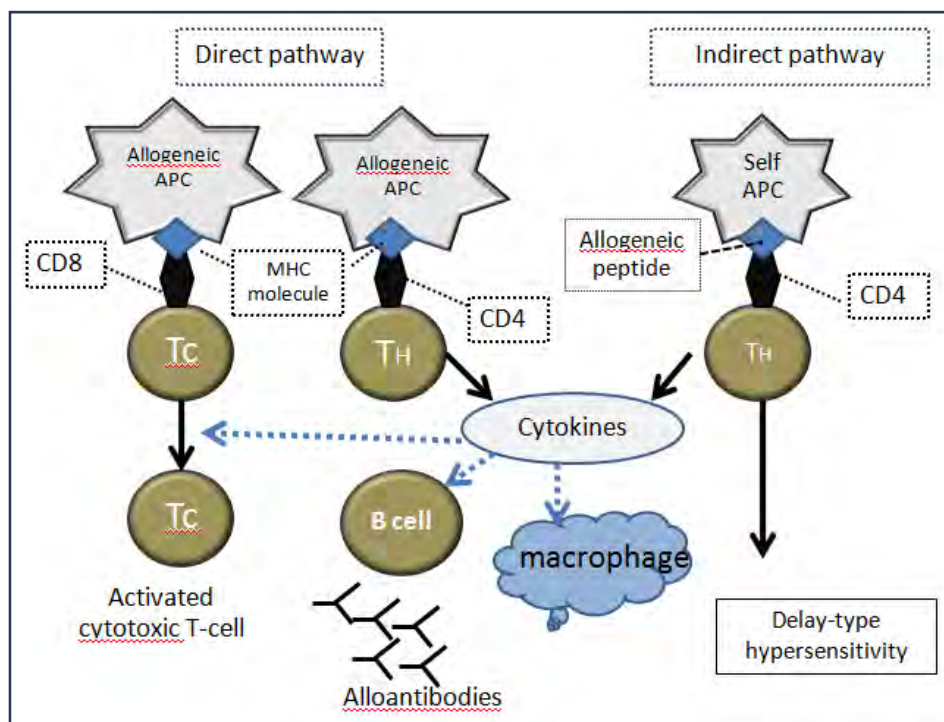
รูปที่ 4 แสดงการนำเสนอแอนติเจนผ่าน MHC class I และ II

2.4 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการปลูกถ่ายไต [1, 39]

เมื่อมีการปลูกถ่ายอวัยวะจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งที่ไม่ใช่คู่แฝด (identical twin) จะเกิดปฏิกิริยาการปฏิเสธ (rejection) เกิดขึ้นซึ่งเกิดจากการที่มีปฏิกริยากับแอนติเจนที่ไม่ใช่ของตนเอง (non self antigen) จาก allograft เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการแยก self และ non self antigen อย่างชัดเจน โดยสิ่งแปลกปลอม (foreign antigen or non self antigen) ที่สำคัญที่สุดของการปลูกถ่ายอวัยวะ คือ human leukocyte antigens (HLA) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของ major histocompatibility (MHC) ขบวนการ rejection เริ่มจากมีการนำเสนอแอนติเจน (antigen presentation) และ allorecognition โดยกลไกการเกิด allorecognition มี 2 ประเภท (รูปที่ 5) คือ

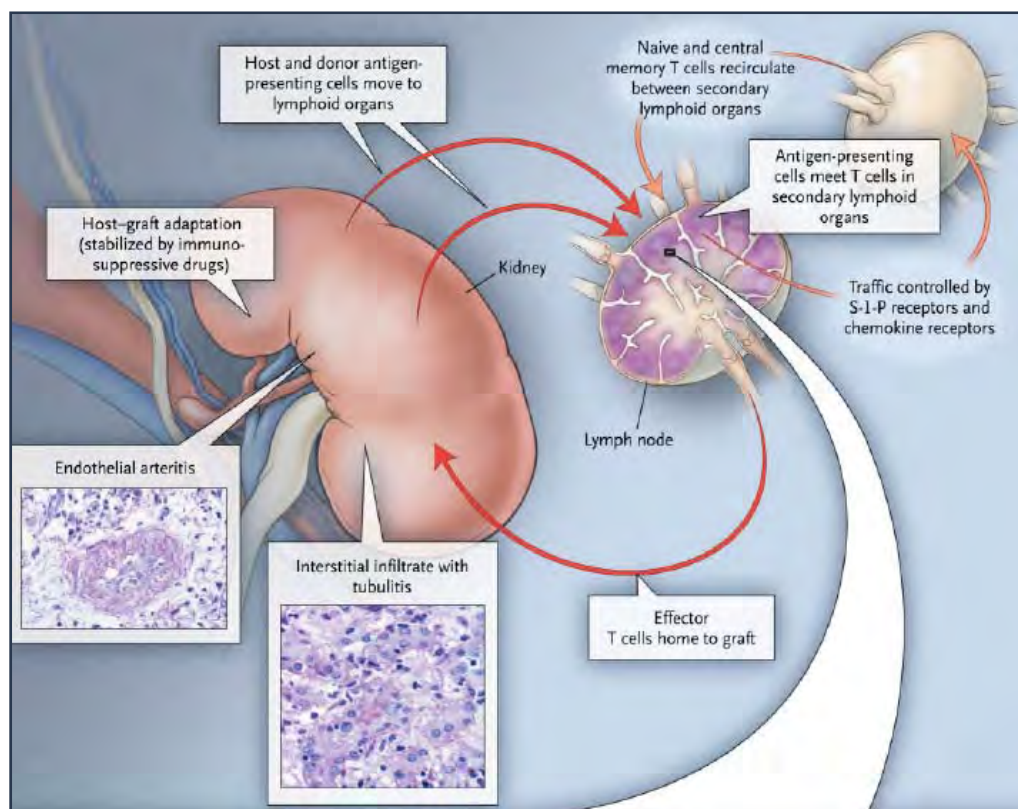
2.4.1 Direct allorecognition เกิดโดย donor T cell lymphocyte จะนำเสนอ foreign HLA molecules โดยตรง โดยไม่มีการผ่าน recipient antigen presenting cell (APC) โดย direct allorecognition มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการเกิด mixed lymphocyte reaction (MLR) และก่อให้เกิด early acute transplant rejection

2.4.2 Indirect allorecognition เกิดจาก foreign HLA molecules ถูก recognize และนำเสนอโดย recipient antigen presenting cell โดยพบว่า indirect allorecognition มีความสัมพันธ์กับการเกิด late rejection และการ induce ให้เกิด tolerance ผ่าน indirect allorecognition ซึ่งมีผลต่อ long term graft survival



รูปที่ 5 แสดงการนำเสนอแอนติเจนด้วยวิธี direct และ indirect pathway(ดัดแปลงจาก[39])

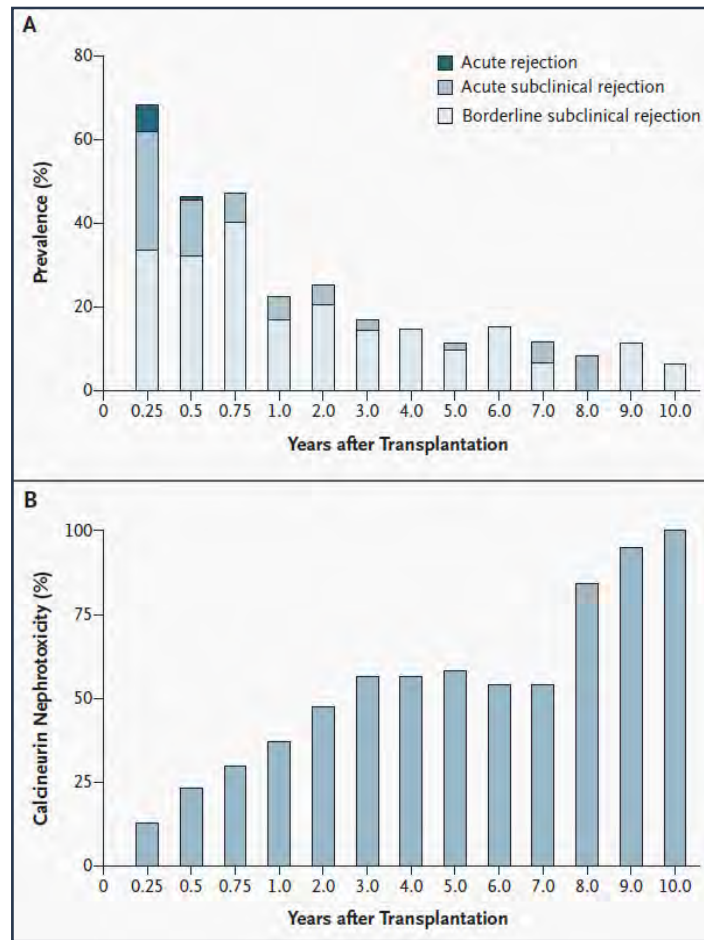
พบว่า donor APC เสนอแอนติเจนให้กับ T-cell ได้โดยตรง (direct pathway) จะมีผลทำให้เกิด inflammation เกิดขึ้นได้ทันทีและส่งผลทำให้เกิด acute rejection ถ้าเป็น host APC จะกลับเข้าสู่อวัยวะที่เป็น secondary lymphoid เพื่อเสนอแอนติเจนให้กับ naïve และ memory T-cell จากนั้นก็จะมี clonal proliferation และ differentiation แล้วเดินทางกลับไป graft (homing) ซึ่งการเดินทางกลับจะถูกควบคุม sphingosine-1-phosphate (S-1-P) และ chemokine receptor ได้แก่ CXCR3 และ CCR5 หลังจากนั้น cytotoxic T-cell (effector) ก็จะทำหน้าที่ทำลาย target cell โดยการกระตุ้นผ่าน FAS-L ซึ่งมีผลต่อ caspase cascade เกิดเซลล์ apoptosis ทำให้มีการอักเสบเกิดขึ้นที่ graft และ หลอดเลือด (รูปที่ 6)



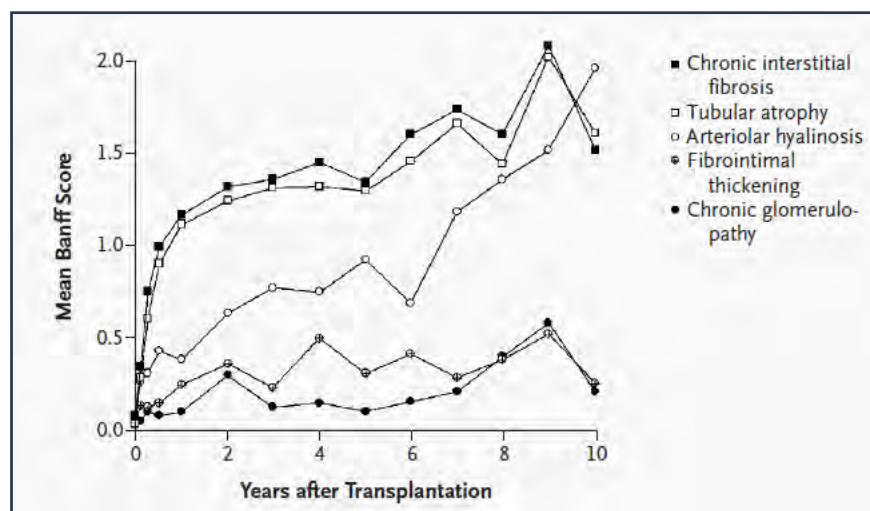
รูปที่ 6 กลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อการปลูกถ่ายไต[1]

2.5 การดำเนินโรคหลังการปลูกถ่ายไต

หลักการที่สำคัญในการปลูกถ่ายไตคือการให้ยากดภูมิคุ้มกันเพื่อลดการเกิดภาวะไตปฏิเสธ โดยยาที่ใช้ตัวหลักคือยาในกลุ่ม calcineurin inhibitor (CNI) ได้แก่ cyclosporine (CSA) และ tacrolimus (Tac) อย่างไรก็ตามพบว่ายากลุ่มนี้ในระยะยาวจะมีผลทำให้ไตทำงานลดลง มีผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิของไตเป็นสาเหตุทำให้เกิด graft loss ได้ Nankivell[40] ศึกษาติดตามผลพยาธิวิทยาในผู้ป่วยหลังปลูกไตจำนวน 119 ราย โดยการทำการเจาะตรวจชิ้นเนื้อแบบ sequential เป็นเวลา 10 ปี พบว่าอัตราการเกิดไตปฏิเสธจะเกิดในช่วง 3 เดือนแรก แต่หลังจากนั้นจะมีปัญหาภาวะ subclinical rejection (รูปที่ 7 A) ในขณะเดียวกันก็พบว่ามีปัญหาเรื่อง CNI toxicity มีมากขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 7B) นอกจากนี้ผลพยาธิวิทยาพบว่ามีเกิดการเกิด interstitial fibrosis และ tubular atrophy (รูปที่ 8) สุดท้ายมีผลทำให้เกิด chronic allograft dysfunction (เดิมเรียกว่า chronic allograft nephropathy) และทำให้เกิด graft loss ตามมาได้

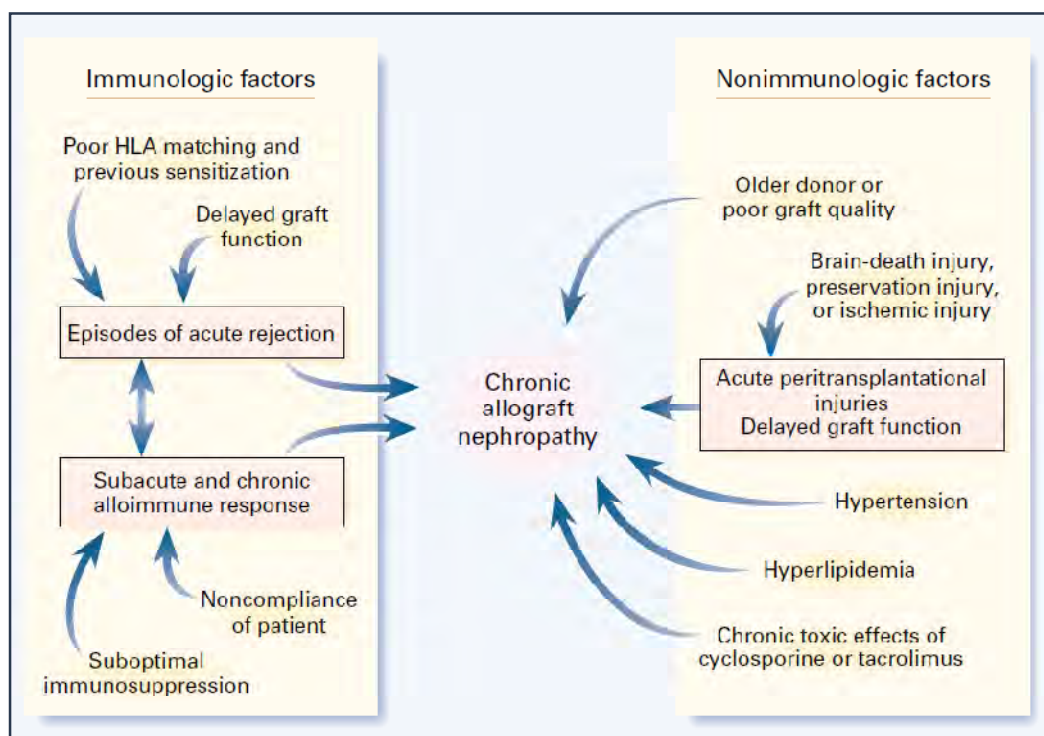


รูปที่ 7 อัตราการเกิด rejection (A) และ อัตราการเกิด calcineurin nephrotoxicity (B) ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากการติดตาม 10 ปี [40]



รูปที่ 8 ผลทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากการติดตาม 10 ปี [40]

กลไกการเกิด allograft dysfunction มีปัจจัยหลัก ๆ 2 กลุ่มคือ immunologic และ non-immunologic พบว่าปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งทาง immunologic คือการเกิดภาวะ rejection ซึ่งอาจเกิดจากการให้ยากดภูมิคุ้มกันที่ต่ำไป ส่วนปัจจัยทาง non-immunologic คือ ผลข้างเคียงจากการใช้ยากดภูมิคุ้มกันที่มากเกินไป โดยเฉพาะยาในกลุ่ม CNI (รูปที่ 9) ดังนั้นหากมีการปรับปัจจัยทั้ง 2 ด้านให้เหมาะสมก็อาจจะลดการเกิด allograft dysfunction ได้



รูปที่ 9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด chronic allograft nephropathy [1]

2.6 หลักการของการติดตามระบบภูมิคุ้มกันหลังการปลูกถ่ายไต (immunologic monitoring)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาปัญหาเรื่อง rejection มีปริมาณลดลง เนื่องจากมีการพัฒนายากดภูมิคุ้มกันตัวใหม่ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ในระยะยาวกลับพบว่า renal allograft outcome ไม่ได้แตกต่างจากที่ผ่านมา เพราะยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้มีผลต่อการทำงานต่อไต ปัจจุบันจึงมีแนวความคิดใหม่ในการดูแลผู้ป่วยปลูกถ่ายไต โดยการลดการให้ยากดภูมิคุ้มกันในรายที่เหมาะสมเพื่อลดผลข้างเคียงจากยาดังกล่าว อย่างไรก็ตามการลดยากดภูมิคุ้มกันในรายที่ไม่เหมาะสมก็อาจทำให้เกิดภาวะไตปฏิเสธเกิดขึ้น ดังนั้นเชื่อว่าผู้ป่วยที่มี high alloimmunity ควรได้รับยากดภูมิที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อป้องกันการเกิดภาวะไตปฏิเสธ ในทางตรงกันข้ามหากผู้ป่วยมี low alloimmunity ก็ควรลดปริมาณยาลงเพื่อลดการผลข้างเคียง เช่น การติดเชื้อ การเกิดโรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน รวมทั้งผลต่อไตโดยเฉพาะยาในกลุ่ม CNI

จากที่กล่าวมาข้างต้น T-cell ถือว่ามีบทบาทสำคัญ (central role) ของระบบภูมิคุ้มกันในการเกิดภาวะ rejection นอกจากนี้การทำงานของ T-cell จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic) ดังนั้นหากสามารถหาวิธีประเมิน T-cell reactivity (alloimmunity หรือ allresponse) ในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตได้ เพื่อให้ทราบ immune status ก็น่าจะมีประโยชน์อันนำไปสู่การวางแผนการรักษาที่เหมาะสมได้ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดของการประเมินต่อไป

2.7 การประเมิน immunologic risk assessment [22]

แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ humoral และ cellular immunologic risk assessment (ในที่นี้จะกล่าวรายละเอียดในภาพรวมทั้งก่อนและหลังการปลูกถ่ายไต)

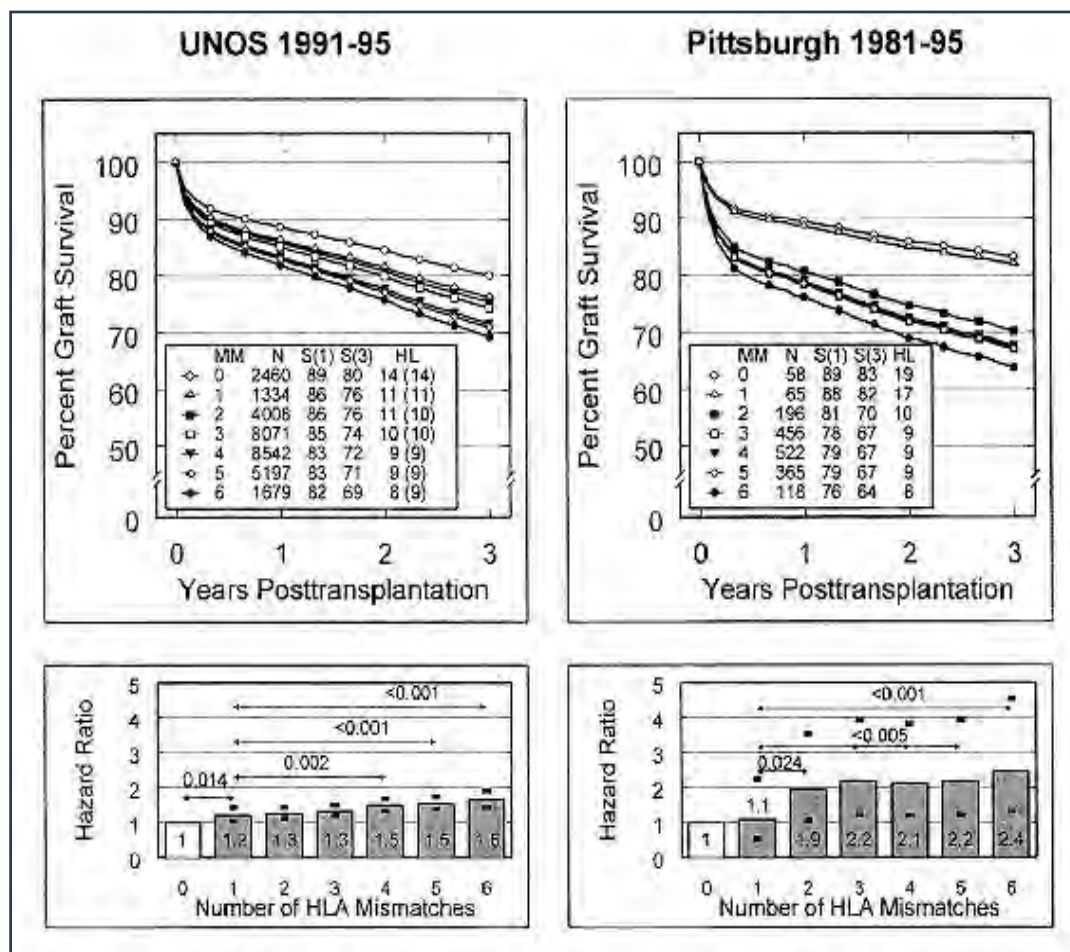
2.7.1 การประเมิน humoral immunity

ก่อนการปลูกถ่ายไตเป็นการประเมินที่ทำเป็นประจำและถือเป็นการประเมินขั้นพื้นฐานที่ต้องทำ ได้แก่ crossmatch โดยวิธี complement dependent cytotoxic assay, panel reactive antibody (PRA) และ donor specific anti-HLA antibody (DSA) ซึ่งเป็นการตรวจหา anti-HLA antibody ทั้งที่จำเพาะต่อ donor HLA antigen (crossmatch และ DSA) และต่อ HLA antigen ของประชากรทั่วไป (PRA) โดยมีการศึกษามากมายที่พบว่า การตรวจพบ humoral risk ก่อนการปลูกถ่ายไตมีผลต่อ renal allograft outcomes

ส่วนการประเมินหลังปลูกถ่ายไตส่วนใหญ่ยังไม่ใช้การตรวจที่ทำเป็นประจำทุกราย แต่ปัจจุบันมีข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจ HLA antibody มากขึ้น และพบว่าสามารถใช้เป็นตัวทำนาย (predictor) ต่อ graft outcome ทั้งการเกิด graft rejection และ graft survival ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

1). การตรวจการเข้ากันได้ของ HLA (HLA typing)

HLA typing คือการตรวจดูความแตกต่างของ HLA ที่อยู่บนโครโมโซมระหว่างผู้บริจาคไต (donor) และผู้รับ (recipient) การตรวจจะเน้นตำแหน่งที่สำคัญใน HLA class I และ class II ได้แก่ HLA-A ,HLA-B และ HLA-DR ซึ่งมีการรายงานผลทั้งหมด 6 ตำแหน่ง การตรวจ HLA สามารถตรวจได้ 2 วิธีคือ microcytotoxic assay และ DNA typing ถือเป็น pre-transplant test ที่สำคัญ มีรายงานจากข้อมูล UNOS รวมรวมผู้ป่วยทั้งหมด 31,291 ราย และข้อมูล Pittsburgh รวมรวมผู้ป่วย 1,780 ราย [6] แสดงให้เห็นว่า graft survival จะมีความสัมพันธ์แบบผกผัน (inverse correlation) กับจำนวน HLA mismatch (MM) โดยจำนวน MM ที่มากจะมี hazard ratio (HR) ต่อ graft loss มากขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของ HLA mismatch ต่อ graft survival [6]

2). การทดสอบ antibody ของ recipient ต่อ HLA donor

การตรวจ HLA antibody ประกอบด้วย 3 วิธีได้แก่ การตรวจ serum crossmatch, การตรวจ panel reactive antibody (PRA) และการตรวจ single donor HLA antibody

- Serum crossmatch เป็นการตรวจความเข้ากันได้ระหว่าง current serum ผู้รับบริจาคและ lymphocyte ของผู้บริจาคไต ปัจจุบันทำได้โดย cytotoxicity, anti-human-globulin-enhanced cytotoxicity, flow cytometry และ solid phase assay

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการตรวจหา anti HLA antibody

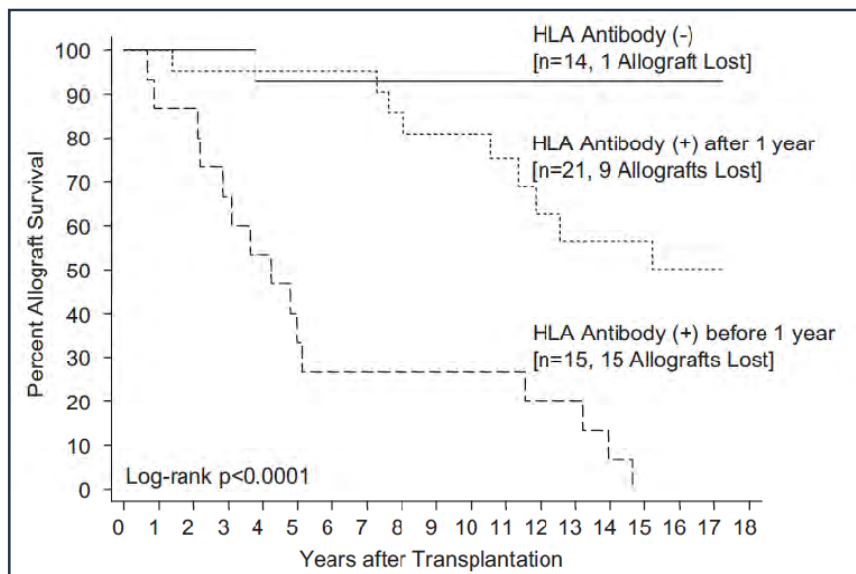
	Cells based	Solid phase
Sensitivity of method	CDC<CDC+AHG<Flow	ELISA<Flow beads
HLA molecules	Natural configuration on cell surface	Isolated proteins bound on artificial surface
HLA antigens	HLA phenotypes	Pooled HLA antigens, phenotypes, and single antigens
False-positive reactions	Non-HLA-specific antibody	Reaction with cryptic epitopes on denatured HLA molecules.
False-negative reactions	Antibody level below detection	Loss of epitope expression on isolated molecules

- Complement dependent cytotoxicity assays (CDC) Patel และ Terasak^[23] ได้ศึกษาในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้งหมด 225 ราย และตรวจวิธี complement dependent cytotoxicity assay (CDC) พบว่าหากปลูกถ่ายไตในกลุ่ม crossmatch negative มีผู้ป่วยจำนวน 8 ใน 195 ราย (ร้อยละ 4) และในกลุ่ม crossmatch positive มีผู้ป่วยจำนวน 24 ใน 30 ราย (ร้อยละ 80) เกิดการปฏิเสธไตภายใน 48 ชั่วโมงขึ้น ($P<0.01$) ซึ่งผล crossmatch เป็นบวกรวมถึงผู้ป่วยมี preformed DSA จะพบมากหากเป็นผู้ป่วยที่เคยตั้งครรรค์มาก่อน ได้รับเลือด และผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตครั้งที่ 2 ปัจจุบันจึงถือเป็นที่ปฏิบัติว่าหากผล crossmatch ด้วยวิธี CDC เป็นบวกถือเป็นข้อห้ามของการปลูกถ่ายไต

เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี CDC มีข้อจำกัดเรื่องความไวในการวินิจฉัย เทคนิคการตรวจที่ต้องอาศัย complement จึงมีการตรวจด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติมคือ AHG-CDC, flow cytometry และ solid phase ซึ่งแต่ละวิธีก็มีความไวและความจำเพาะที่แตกต่างกัน ทำให้ต้องระวังการแปลผลตรวจ (ตารางที่ 2)

Terasaki[41] ได้ศึกษาติดตาม HLA antibody ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต 2,231 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มี HLA antibody positive จะมี failed graft ที่ 1 และ 2 ปีสูงกว่า ผู้ป่วย HLA antibody negative (6.6% Vs 3.3% ; $p<0.0007$, 15.1 % Vs 6.8 ; $P<0.00000002$) ตามลำดับ สรุปว่า post transplant HLA antibody สามารถใช้เป็นตัวทำนาย (predictor) graft survival ได้

นอกจากนี้ Lee PC และคณะ [42] ได้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่เริ่มพบ HLA antibody ก็มีความสำคัญต่อ graft loss พบว่าในกลุ่มที่ HLA antibody (+) ภายใน 1 ปีหลังปลูกถ่ายไตจะมี graft failure ถึงร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และเมื่อวิเคราะห์ multivariable ปัจจัยระยะเวลาที่พบ antibodies ใน 1 ปี พบว่า Hazard ratio ที่เกิด graft failure เป็น 7.7 เท่า เมื่อติดตามไปที่ 10 ปี พบว่า graft survival ในกลุ่ม early antibody (+) เท่ากับร้อยละ 27 เทียบกับร้อยละ 80 ในกลุ่ม late antibody (+) รูปที่ 11



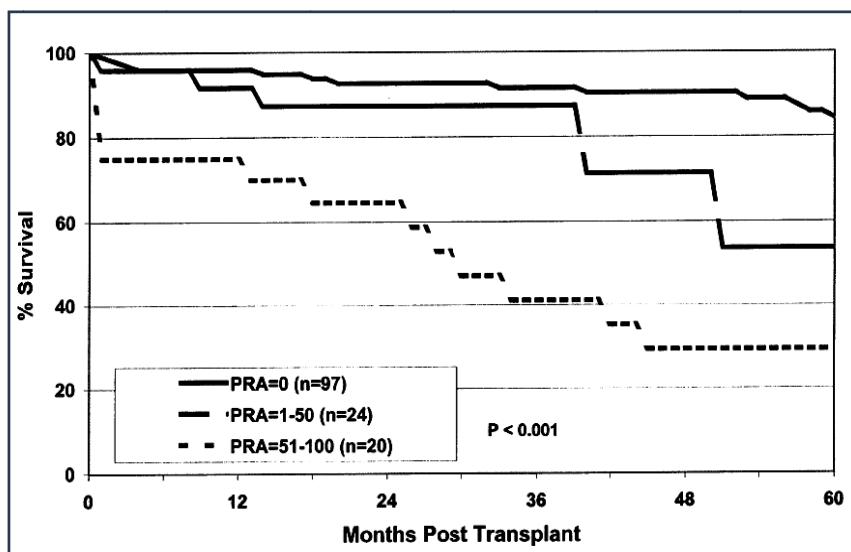
รูปที่ 11 แสดงความสำคัญของ HLA antibody และระยะเวลาที่พบหลังปลูกถ่ายไตภายใน 1 ปี และหลัง 1 ปี ต่อ graft survival[42]

- Panel reactive activity (PRA) คือการประเมินโอกาสของ recipient จะมี antibody ต่อ donor ทำโดยการตรวจดูปฏิกิริยาระหว่าง serum ของ recipient และเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งเซลล์ที่ใช้ทดสอบเปรียบเสมือนตัวแทนประชากร (HLA antigen) การรายงานผลจะบอกเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของ PRA หากค่า PRA สูงมากจะทำให้โอกาสที่ recipient ได้ไตจากผู้บริจาคทั่วไปจะค่อนข้างยาก เนื่องจากส่วนใหญ่เป็น broadly reactive antibodies ต่อ common epitope ของ HLA molecule

การประเมิน PRA ก่อนปลูกถ่ายไต [13]

พบว่า PRA ในช่วงก่อนปลูกถ่ายไตในแต่ละคนจะมีความแตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยทั่วไปก็จะตรวจก่อนผ่าตัดไม่เกิน 3 เดือน หากผล PRA ใน serum ระบุว่ามีความจำเพาะ HLA ของ donor ก็อาจจะช่วยทำนายผล crossmatch ได้ และหากผล HLA matching ระหว่าง donor และ recipient เป็น Zero mismatch พบว่า antibody ต่อ HLA -Cw, DQ และ DP ก็จะมีผลต่อ graft outcome

Baramaและคณะ[14] ได้ศึกษาในผู้ป่วย living kidney transplantation โดยมี 1- haploidentical พบว่า PRA ที่ตรวจพบก่อนการปลูกถ่ายไตมีผล renal allograft survival พบว่าหากผู้ป่วยมี PRA สูง จะทำให้ renal allograft survival ต่ำกว่าค่า PRA น้อยหรือไม่พบ PRA เลย (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง PRA และ graft survival rate[14]

การประเมิน PRA หลังการปลูกถ่ายไต[13]

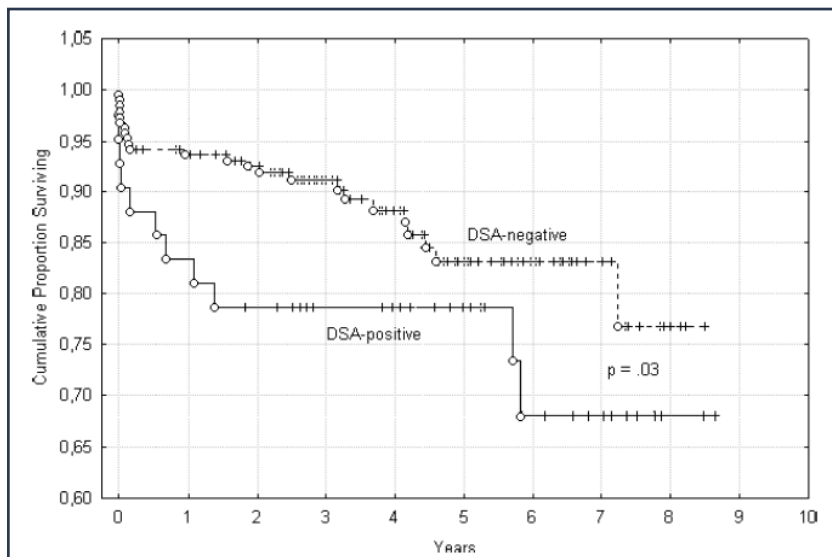
แม้ว่าหลังการปลูกถ่ายไตจะได้รับภูมิคุ้มกัน แต่ immune response ยังเกิดอยู่ตลอด พบว่าหากมี de novo antibodies เกิดขึ้นหลังการปลูกถ่ายไตก็มีความสัมพันธ์กับการเกิด rejection และการทำงานของไตที่แย่งลง ดังนั้นการตรวจติดตาม anti HLA antibody หลังปลูกถ่ายไตจึงมีความสำคัญโดยเฉพาะ DSA มีคำแนะนำว่าควรได้รับการตรวจ PRA ทุกเดือนใน 3 เดือนแรก หลังจากนั้นทุก 3 เดือนจนครบ 1 ปี และตรวจทุกปี ซึ่งการตรวจควรตรวจด้วยวิธี ELISA หรือ flow cytometry เพื่อให้มีความไว และความจำเพาะสูง

- การตรวจ single donor HLA antibody หรือ donor specific antibody เป็นการตรวจหา antibody ของผู้รับบริจาคที่จำเพาะต่อ antigen ของผู้บริจาคไต พบว่าแม้ผล crossmatch จะให้ผลลบแต่มีหลายการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ DSA (performed Ab) เป็นบวกก่อนการปลูกถ่ายไตส่งผลให้มี renal allograft survival ต่ำกว่ากลุ่มที่ DSA เป็นลบ

การประเมิน DSA ก่อนการปลูกถ่ายไต

Lefaucheur และคณะ[43] ศึกษาความสำคัญของ DSA ในระยะก่อนปลูกถ่ายไตต่อผล allograft outcome โดยมีผู้ป่วยจำนวน 237 ราย เป็น living KT 16 ราย และ cadaveric KT 221 ราย แล้วติดตามไปเป็นระยะเวลาเฉลี่ย 8 ปี พบว่าผู้ป่วยที่มี DSA บวกจะมี graft survival ที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มี DSA ลบอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 67.9% และ 77.3 ตามลำดับ; $p = 0.03$) (รูปที่ 13) นอกจากนี้พบว่าอุบัติการณ์การเกิด AMR ในผู้ป่วยที่มี DSA บวกสูงกว่าผู้ป่วยที่มี DSA ลบ 9 เท่า ($p < 0.001$) ความเสี่ยงจะมากขึ้นหากมีคะแนนของ DSA สูง (score 6-8) เทียบกับ DSA (score 4) ($p < 0.001$)

การศึกษานี้สรุปว่าการที่ผู้ป่วยมี Preformed DSA เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้เกิด graft loss และ การเกิดภาวะ Antibody mediated rejection



รูปที่ 13 อัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วย DSA negative และpositive ก่อนการปลูกถ่ายไต [43]

การประเมิน DSA หลังการปลูกถ่ายไต

Zhang Q. และคณะ[44] ทำการศึกษาผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจำนวน 49 ราย แล้วตรวจติดตาม donor-specific antibody (DSA) เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะไตปฏิเสธ และ graft dysfunction พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 8 ราย (ร้อยละ49) เกิด acute humoral rejection (AHR) และ 11 ราย (ร้อยละ 22.4) เกิด acute cellular rejection การเกิด AHR และ ACR นี้มีความความสัมพันธ์ที่ดี (strong association) กับ pretransplant HLA sensitization ($p=0.005$ และ $p=0.02$) และเมื่อวิเคราะห์ในผู้ป่วย ที่เกิด AHR และ ACR พบว่าการตรวจพบ DSA positive หลังการปลูกถ่ายไตจะสัมพันธ์กัน ซึ่งการตรวจ DSA มักจะมีก่อนหรือพร้อมกับการเกิด rejection ($P<0.001$) (รูปที่ 14)

	AHR+	AHR-	ACR+ Type 1	ACR+ Type 2	ACR-
Pretransplant antibody					
Negative	1	28	2	1	26
Positive	7	13	7	1	12
<i>P</i> Value		0.005			0.02
Posttransplant antibody					
Negative antibody	0	19	1	0	18
Positive non-DSA	0	19	1	0	18
Positive DSA	8	3	7	2	2
<i>P</i> Value		<0.001			<0.001

รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของการตรวจพบ DSA ทั้งก่อนและหลังปลูกถ่ายไตและการเกิด allograft rejection[44]

เมื่อติดตามต่อไปเพื่อดู renal function พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มี DSA บวก จะมีค่า SCr ที่สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ DSA ลบ (2.24 ± 1.01 และ 1.41 ± 0.37 ตามลำดับ; $p < 0.01$) การศึกษานี้สรุปว่าการตรวจ DSA สามารถใช้เป็นตัวพยากรณ์และการวินิจฉัยการเกิด rejection นอกจากนี้ก็นำมาทำนาย graft survival ได้

2.7.2 การประเมิน cellular immunity [22, 28-29, 35, 45-48]

แบ่งได้ 2 วิธีหลัก คือ non-antigens-specific assay และ antigen-specific assay (ตารางที่ 3) ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดบางส่วน

1). Non-antigens-specific assays

เป็นการ determine phenotype ของ surface marker หรือ functional state ส่วนใหญ่ข้อมูลการตรวจวิธี non-antigens-specific จะเป็นการวัดปริมาณสารที่อยู่ในเลือด หรือปัสสาวะผู้ป่วย ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR), DNA หรือ protein microarray โดยสารที่จะตรวจถือว่าเป็น T-cell activation marker เช่น soluble CD30 (sCD30), intracellular ATP, calcneurin และ nuclear factor activated T-cells (NFAT) เป็นต้น

sCD30 เป็นสารสร้างมาจาก activated CD4+ Th2 และ CD8+ T-cell สามารถวัดได้โดยใช้ ELISA การศึกษาทั้งผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทั้งในระยะ pre และ post-transplantation พบว่า sCD30 เป็นตัวบ่งชี้ (predictor) ในการเกิด acute rejection อย่างไรก็ตาม sCD30 ไม่ได้พบเฉพาะในภาวะ rejection เท่านั้น แต่สามารถพบได้ในการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียด้วย ทำให้ sCD30 มีข้อจำกัดในการใช้ในการประเมินผู้ป่วย

2). Antigen-specific assays

เป็นการตรวจวัดการตอบสนองของ B และ T cell ต่อ specific donor antigen ตรงกันข้ามกับ non-antigens-specific การตรวจด้วยวิธี antigen-specific assays มีข้อดีก็คือ

- สามารถบอกผู้ป่วยเป็นภาวะ high donor-specific alloresponse
- สามารถบอกได้ว่ามี donor-specific hyporesponse และ alloreactivity ต่อ third parties ได้ ซึ่งบ่งชี้การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น (immune status) ว่าเป็นระยะ tolerance หรือ graft acceptable หรือไม่

แบ่งการตรวจ cell proliferation assays ได้เป็น 3 กลุ่มหลักดังนี้

การประเมิน antigen-specific T-cell proliferation

การประเมิน antigen-specific T-cell function

การประเมิน antigen-specific T-cell cytokine production

ดังจะกล่าวรายละเอียดต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงการแบ่งวิธีตรวจ cellular immune monitoring

<u>Antigen-specific assays for immune monitoring</u>	
1.	Cell proliferation assays
1.1.	Mixed lymphocyte reaction (MLR)
1.2.	Limiting dilution assays (LDA)
1.3.	Cell-mediated lymphotoxicity
1.4.	Tetramer technology
1.5.	Measurement of cell division by CFSE labeling
2.	Enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT)
3.	Delayed-type hypersensitivity (Trans-vivo DTH assay)
4.	Detection of donor-specific-antibodies
5.	Detection of hematopoietic chimerism
<u>Non-antigen-specific assays for immune monitoring</u>	
1.	Pre and post-transplant measurement of soluble immune mediators
1.1.	Circulating cytokines levels
1.2.	Soluble CD30 level measurement
1.	Regulatory T cells
2.	Non-antigen-specific stimulation (Immuknow measurement)
3.	Analyses of T cell receptor repertoire
4.	Proteomic biomarker
5.	Detection of tolerogenic dendritic cells
6.	Gene analyses
6.1.	Gene polymorphisms
6.2.	Quantification of mRNA precursors
6.3.	Microarray analysis of gene expression

• T- Cell proliferation assays

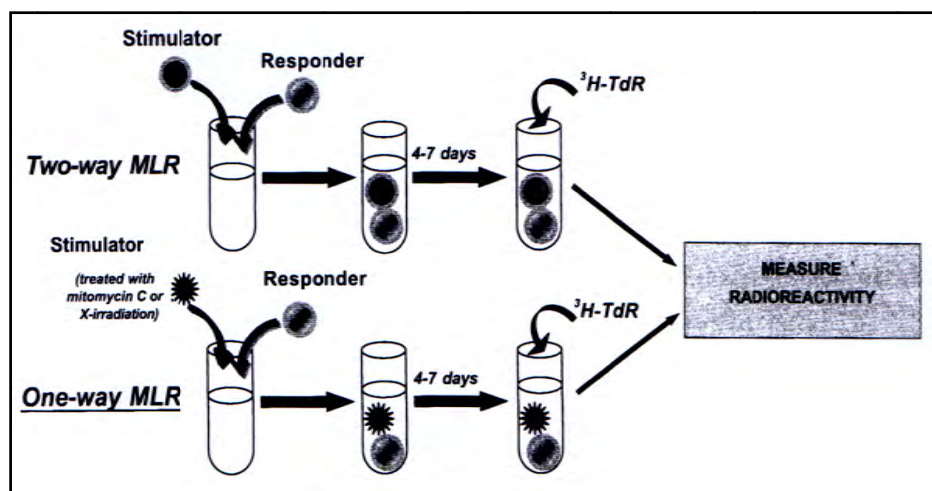
เป็นการวัดการตอบสนองด้านการแบ่งตัว (proliferation response) ของลิมโฟไซต์ต่อตัวกระตุ้น โดย การวัดจะเป็นเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงก่อนที่ได้รับตัวกระตุ้นและจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวใหม่หลังจาก ได้รับตัวกระตุ้น ตัวกระตุ้นที่ใช้ คือแอนติเจนของ donor ส่วนมากได้จากลิมโฟไซต์ วิธีนี้เป็น การตรวจที่ทำได้ ยาก ส่วนใหญ่การประเมิน proliferation response จะวัดปริมาณการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) สามารถแบ่งการตรวจวิธี cell proliferation assay ได้ดังนี้

Mixed lymphocyte reaction (MLR)[35]

เป็นการศึกษาในหลอดทดลองแรกๆ เพื่อดูการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ histocompatibility antigen หรือ MHC molecule ที่ต่างจากตัวมัน โดยนำเอาลิมโฟไซต์ของ recipient (responder) และ donor (ถือว่าเป็นตัวกระตุ้น หรือ stimulator) มาเพาะเลี้ยงรวมกันใช้เวลาประมาณ 3-7 วัน เพื่อประเมินการตอบสนองการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (cell proliferation) โดยการตรวจจะใช้การ uptake [³H]-Thymidine แบ่งการตรวจด้วยวิธี MLR เป็น 2 วิธีคือ one-way MLR และ two-way MLR (รูปที่ 15)

1). **One-way MLR** เป็นการตรวจการตอบสนองของ T lymphocyte ของผู้รับต่อตัวกระตุ้น (donor cell) โดยการนำ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ของ recipient มาเพาะเลี้ยง ร่วมกับ donor cell ที่ผ่านการฉายแสง หรือการเติม mitomycin-C เพื่อให้ donor cells หยุดการสร้าง DNA แต่เซลล์ยังไม่ตาย ซึ่ง donor lymphocyte (stimulator) จะแสดง alloantigen ที่ต่างจาก recipient lymphocyte (responder) จึงมีผลกระตุ้นให้ responder cell เกิดการแบ่งตัว

2). **Two-way MLR** มีหลักการขั้นตอนเหมือนกันกับ one-way MLR แต่ต่างกันตรงที่ donor lymphocyte ที่นำมาเพาะเลี้ยงจะไม่ผ่านการฉายแสง ทำให้เซลล์ทั้งสองคือ donor และ recipient lymphocyte เกิดการกระตุ้นซึ่งกันและกัน ทำให้แบ่งตัวไปพร้อมๆกัน



รูปที่ 15 แสดงถึงหลักการตรวจ MLR ด้วยวิธี two-way และ one-way[35]

จนกระทั่งใน 18 ชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงจะมีการเติม [³H]-Thymidine หลังจากนั้นนำลิมโฟไซต์มา lysed แล้วนับ DNA โดยนับเป็น mean count per minute (cpm) ค่าที่วัดได้จะนำมาคำนวณเป็นข้อมูลที่แสดงถึง cellular proliferation ได้แก่ stimulation index (SI) และ relative response (RR) โดยค่า stimulation index หมายถึง อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ lymphocyte ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเซลล์ donor เทียบกับการแบ่งตัว

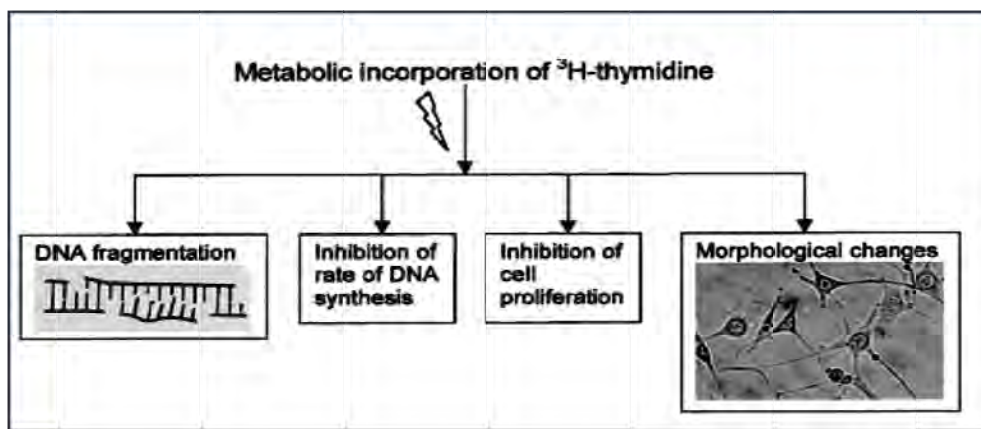
$$\text{Stimulation index (SI)} = \frac{\text{CPM เฉลี่ยของ donor หรือ third party(experimental)culture}}{\text{CPM เฉลี่ยของ autologous (background) culture}}$$

$$\text{Relative response (RR)} = \frac{\text{Donor CPM-autologous cpm(background culture)}}{\text{Third party cpm-autologous cpm (background culture)}}$$

(CPM = count per minute)

ค่า SI และ RR ตั้งอยู่บนสมมติฐานว่าหาก HLA-incompatibility สูง น่าจะเกิดปฏิกิริยา MLR ที่มาก (hyper-responsive) และควรมีความสัมพันธ์กับ poor renal allograft outcome ทั้งในแง่ graft survival และเกิดภาวะปฏิเสธไต แต่ในทางตรงกันข้ามความสัมพันธ์ MLR ที่เกิดปฏิกิริยาน้อย (hypo-responsive or non reactivity) จะมี renal allograft function ที่ดีกว่าและเกิดภาวะปฏิเสธไตน้อยกว่ากลุ่มที่เกิดปฏิกิริยามาก

การเติม tritiated thymidine หรือ [³H]-thymidine เพื่อเป็นการดูการสังเคราะห์ DNA และการแบ่งตัวของเซลล์ หลักการคือนำลิโพโซมที่ถูกกระตุ้นมาเติม thymidine ซึ่งเป็น nucleoside ที่จำเป็นในการสร้าง DNA โดย thymidine จะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี [³H]-thymidine เมื่อเซลล์จะนำ [³H]-thymidine เข้าไปใน DNA ระหว่างที่มีการแบ่งตัว จะมีผลทำลาย DNA (รูปที่ 16) โดยทำให้มีการเปลี่ยน DNA จาก soluble nucleoside เป็น insoluble DNA polymers หลังจากนั้นนำมาตกตะกอน DNA ด้วย trichloroacetic acid แล้วกรองบน glass fiber filter ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วใส่ scintillation fluid นำไปวัดรังสี β ของ [³H]-thymidine ด้วยเครื่อง beta scintillation counter มีหน่วยเป็น count per min (cpm) ค่า cpm ที่ได้แสดงถึงการแบ่งตัวของลิโพโซม ถ้ามีการแบ่งตัวและสร้าง DNA มาก ค่า cpm ก็จะมีสูงตามไปด้วย



รูปที่ 16 แสดงผลของ [³H]-thymidine ต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว [51]

ข้อเสียของการตรวจวิธี $[^3\text{H}]$ -thymidine [51]

การตรวจ MLR โดยวิธี $[^3\text{H}]$ -thymidine มีข้อด้อยหลายอย่าง ได้แก่ วิธีการทำยุ่งยากใช้เวลานาน สารและเครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดมีราคาสูง ผู้ตรวจมีความเสี่ยงที่ต้องสัมผัสสารกัมมันตรังสีที่ใช้ และสารดังกล่าวไปมีผลทำลาย DNA และยับยั้งการสร้าง DNA และการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ยังมีปัญหาในการแปลผล กล่าวคือหากวัดปริมาณ $[^3\text{H}]$ -thymidine แล้วมีการ uptake ที่ต่ำสาเหตุ อาจเกิดจาก เซลล์ที่แบ่งตัวมีปริมาณน้อยจริง หรือปริมาณ T-cell ที่ต่ำ หรือ การทำงาน T-cell ไม่ดีทำให้ปริมาณ uptake มาได้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น สุดท้ายอาจเกิดจากปัญหาในขั้นตอนการเติม $[^3\text{H}]$ -Thymidine การตรวจ MLR ด้วยวิธี $[^3\text{H}]$ -thymidine ยังมีข้อเสียคือจะไม่สามารถระบุรอบของการแบ่งตัวและชนิดของเซลล์ (phenotype of cell) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการย้อมภายในเซลล์โดยใช้ fluorescein dye และการตรวจเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ CFSE flow cytometry ในการตรวจการแบ่งตัวของเซลล์กันแพร่หลาย ดังจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

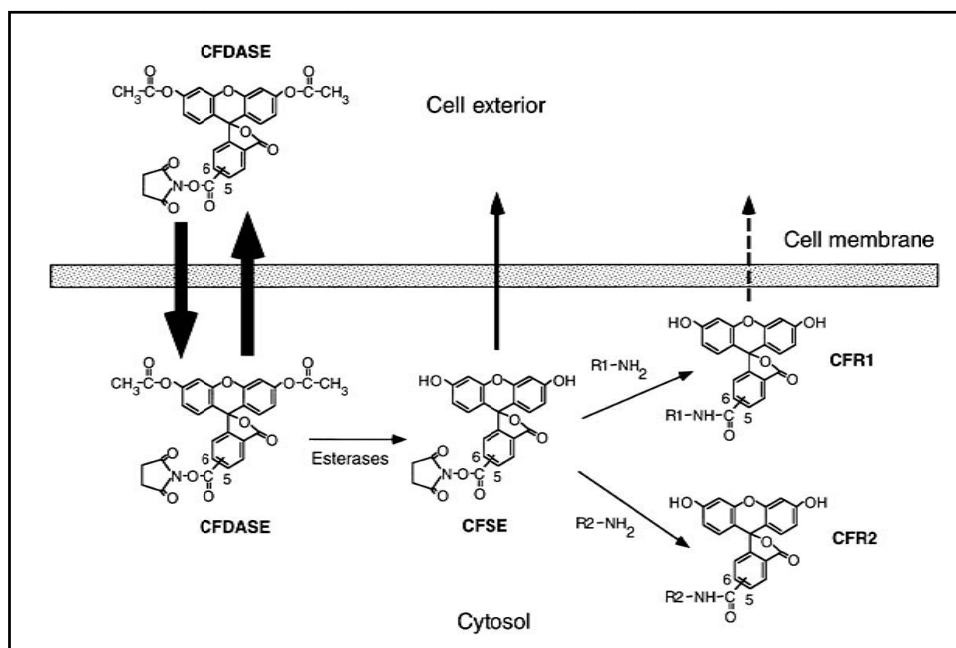
Fluorescein dye[52] ที่ใช้วัดเซลล์ proliferation มีหลายชนิด แต่ที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายคือ 5- (และ-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDASE) ซึ่งมีคุณสมบัติคือ ไม่เรืองแสง, สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีคุณสมบัติละลายในไขมันสูง (high lipophilic) หลังจาก CFDASE เข้าในเซลล์จะถูกเอนไซม์ esterases ที่อยู่ภายในเซลล์ ตัดกลุ่มของ acetate ออก 2 ตำแหน่ง ทำให้ได้เป็น carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE) ซึ่ง CFSE จะมีคุณสมบัติการแพร่ลดลง ส่งผลให้สารออกจากเซลล์ได้ช้า หลังจากนั้น CFSE จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม amino แล้วเกิดพันธะ covalent ในตำแหน่ง 5- (และ-6)-carboxyfluorescein (CF) ในเซลล์ โดยถ้าจับกับ R1-NH₂ จะได้เป็น CFR1 ซึ่งยังสามารถแพร่ออกนอกเซลล์หรือสลายตัวเร็วได้ แต่ถ้าจับกับ R2-NH₂ ได้เป็น CFR2 ซึ่งไม่สามารถแพร่ออกจากเซลล์ได้ทำให้ fluorescent ติดค้างภายในเซลล์ (รูปที่ 17)

หลักการการทำงานของ flow cytometry

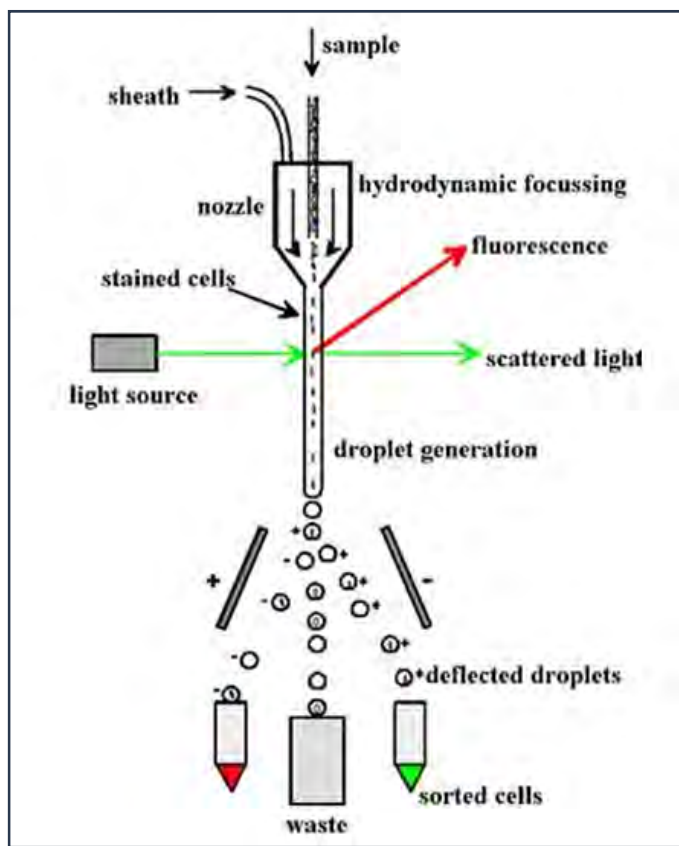
Flow Cytometry คือวิธีการวัด (metry) คุณสมบัติของเซลล์ (cyto) ซึ่งอยู่ในสารละลายที่กำลังไหล(flow) โดยใช้เลเซอร์ Flow Cytometry อาศัยหลักจากความรู้ด้านต่างๆ มากมาย เช่น คอมพิวเตอร์ อิเล็กทรอนิกส์ ระบบจลศาสตร์ของน้ำ เทคโนโลยีด้านเลนส์กระจก รวมทั้ง แอนติบอดี และสารฟลูออเรสเซนต์

การทำงานของ Flow Cytometer อาศัยการวัดเซลล์ที่กำลังไหลอยู่ ซึ่งจะวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ขณะที่ไหลผ่านทางพวย (nozzle) ของเครื่องเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในอัตราเร็ว 500-1,000 เซลล์/วินาที เมื่อเซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีตัวมารับการหักเหของแสงเรียกว่า Detector ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถหาขนาดของเซลล์ได้ และวัดค่าการหักเหของแสงที่ออกจากเซลล์จะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่งข้อมูล

การวัดการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับการดูดซับ และการเปล่งแสงของเซลล์ในความยาวคลื่นต่างๆ โดย Flow Cytometer จะใช้ฟิลาเตอร์กรองแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่เดินทางผ่านเซลล์ลงสู่ Detector การวัดแสงที่กระจายออกจะวัดอยู่ 2 ที่คือ แสงส่วนที่กระจายผ่านเซลล์ (Forward scatter signal: FSC) จะบอกถึงความสัมพันธ์ของขนาดเซลล์ และสัญญาณแสงที่กระจายออกด้านข้าง (Side scatter signal: SSC) จะบอกถึงข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะ Granule ของเซลล์ ลำแสงทั้งสองทางนี้จะผ่านเลนส์ และฟิลาเตอร์ซึ่งทำหน้าที่หักเหแสง และกรองสัญญาณแสงไปยัง Photomultiplier tube ซึ่งเป็น Detector เพื่อตรวจวัดแสงในความยาวคลื่นตามชนิดของสีย้อมที่เราใช้ (ตารางที่ 4) เพราะสีย้อมต่างชนิดกันจะเปล่งแสงให้ความยาวคลื่นที่ต่างกันออกไป โดยเครื่อง Flow Cytometer แต่ละรุ่นจะมี Photomultiplier tube ต่างกันไปตามความสามารถในการทำงาน รูปแบบการกระเจิงแสงเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์ในการวัดคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงซึ่งขึ้นอยู่กับรูปทรง และขนาดของเซลล์



รูปที่ 17 แสดงกลไกการย้อมติดสารเรืองแสงของ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester โดยเริ่มจาก 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDASE) แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์[52] (ลูกศรที่แสดงในภาพหมายถึงทิศทางการเคลื่อนที่ และขนาดของลูกศรยังบอกถึงความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์)



รูปที่ 18 แสดงหลักการทำงานของ flow cytometry

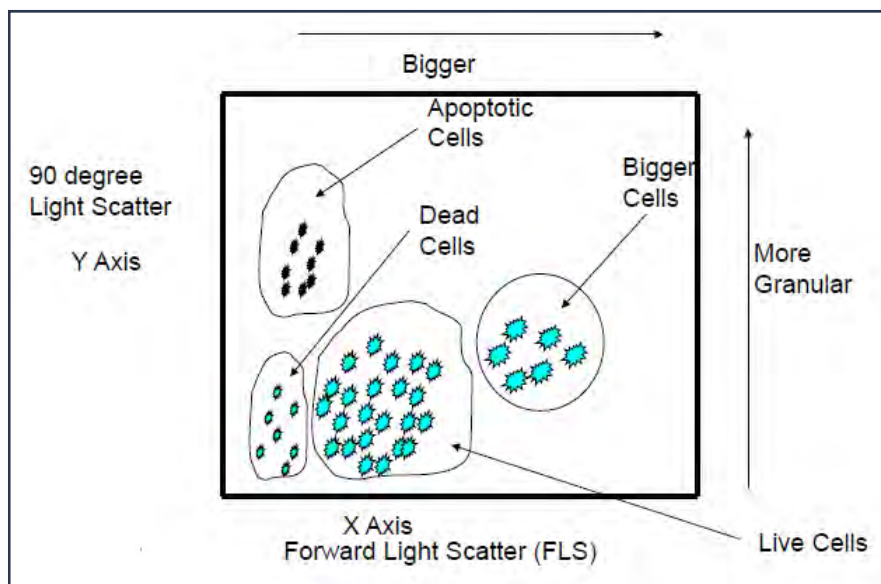
หลังจาก detector วัดคุณสมบัติของเซลล์ไปแล้ว เซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงจะรับประจุลบเล็กน้อยตามการเรืองแสงที่เกิดขึ้น แต่ละหอยดที่ไหลผ่านจะถูกแยกด้วยสนามไฟฟ้าโดยตรงจาก Deflection plates ในแนวตั้งซึ่งสามารถปรับได้ตามความเหมาะสมเพื่อคัดแยกเซลล์ที่เราสนใจออกเป็นหยดตามประจุบวกหรือประจุลบ โดยเซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงมากคือ มีแอนติบอดีติดสีที่ย้อมเรืองแสงจับอยู่มาก ส่วนเซลล์หรือโมเลกุลที่เรืองแสงน้อยคือ มีฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีจับอยู่น้อย และเซลล์ที่ไม่มีฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีจับอยู่เลย หยดที่มีประจุที่เราต้องการจะถูกเก็บในหลอดพิเศษแยกเก็บไว้ ส่วนหยดที่ไม่มีประจุจะถูกแยกทิ้งไป (รูปที่ 18)

หลักสำคัญของการวัด flow cytometry คือการเลือกเซลล์ที่มีชีวิต (live cell) มาทำการวิเคราะห์ศึกษาเท่านั้นเรียกว่า gating โดยอาศัยการดู histogram ซึ่งจะมีการกระจายตัวแตกต่างกัน (รูปที่ 19)

ตารางที่ 4 แสดงสารเรืองแสงที่ใช้สำหรับงาน flow cytometry

Fluorochrome	Ex(nm)	Em(nm)	MW	Notes
Fluorescein (FITC)	495	519	389	pH sensitive
R-Phycoerythrin (PE)	480,565	675	240 k	R670, Tri-Color, Quantum Red
PE-Cy5(Cy5PE)	480,565,650	667		
PE-Cy7	480,565,743	767		
PE-Texas Red (TRPE)	480,565	613		Red 613,ECD
PerCP	490	675		Peridinin chlorophyll protein
Texas Red	689	615	626	Sulfonyl chloride
Allophycocyanin (APC)	650	660	104 k	

คำย่อ Ex= E-excitation , Em= E-emission, MW = molecular weight

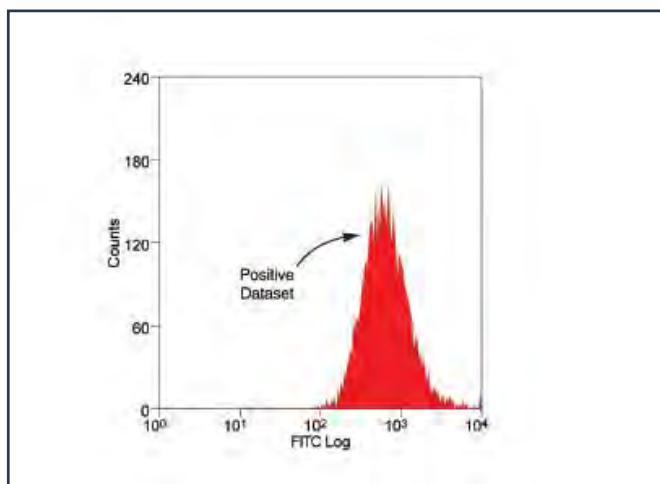


รูปที่ 19 แสดง histogram การตรวจ flow cytometry แสดงการกระจายตัวของเซลล์แต่ละชนิด

การแสดงผลการตรวจ flow cytometry ด้วย histogram

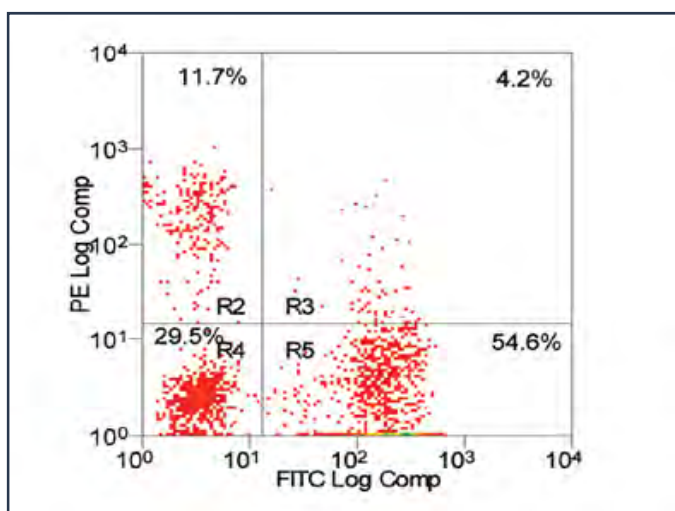
มี 2 ลักษณะคือ 1 parameter histogram และ 2 parameter histogram ดังนี้

1-parameter histogram เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์แกน X คือ ค่าการวัด 1 ชนิด ซึ่งมักจะใช้ relative fluorescence หรือความเข้มของแสง ส่วนแกน y คือจำนวนเซลล์ที่วัดได้ (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 แสดงกราฟ histogram แบบ 1 parameter

2-parameter histogram เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ค่าการวัด 2 ค่าซึ่งจะใช้แทน แกน X และแกน Y และจุดซึ่งแทนจำนวนเซลล์ โดยจะค่าการวัดที่ใช้แสดงอาจเป็น SSC, FSC หรือความเข้มของ fluorescein ก็ได้ (รูปที่ 21)

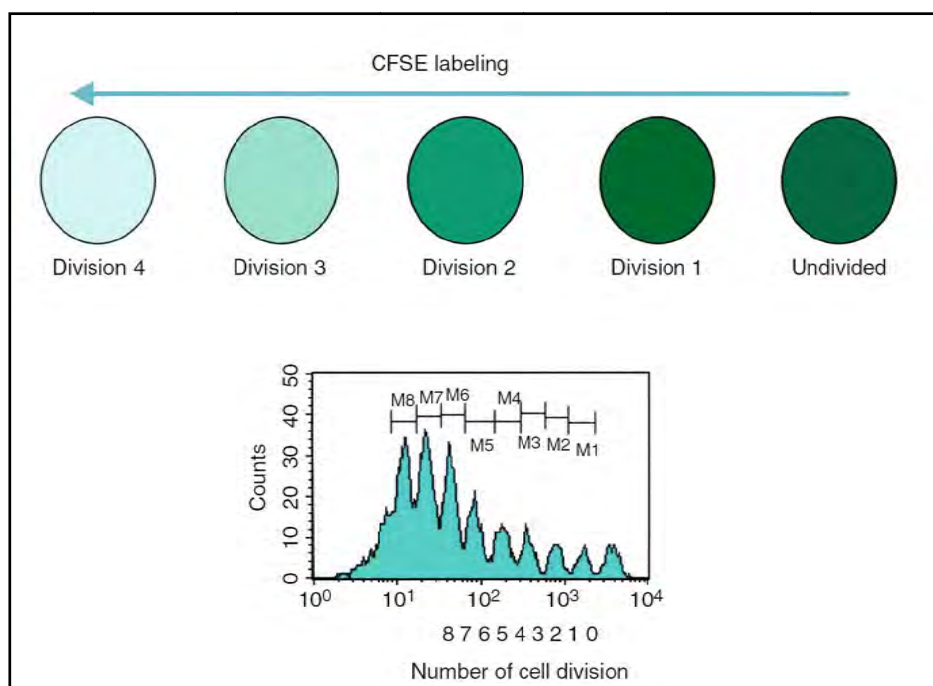


รูปที่ 21 แสดงกราฟ histogram แบบ 2 parameter ซึ่งเป็นการย้อม fluorescein ชนิด PE (แกน Y) และ FITC (แกน X) แบ่งผลออกเป็น 4 ส่วนดังนี้ R2 คือ PE-labeled B cells positive, R5 คือ FITC-labeled T cells positive, R3 คือย้อมติดทั้งสองชนิด และ R4 คือย้อมไม่ติดทั้ง FITC และ PE

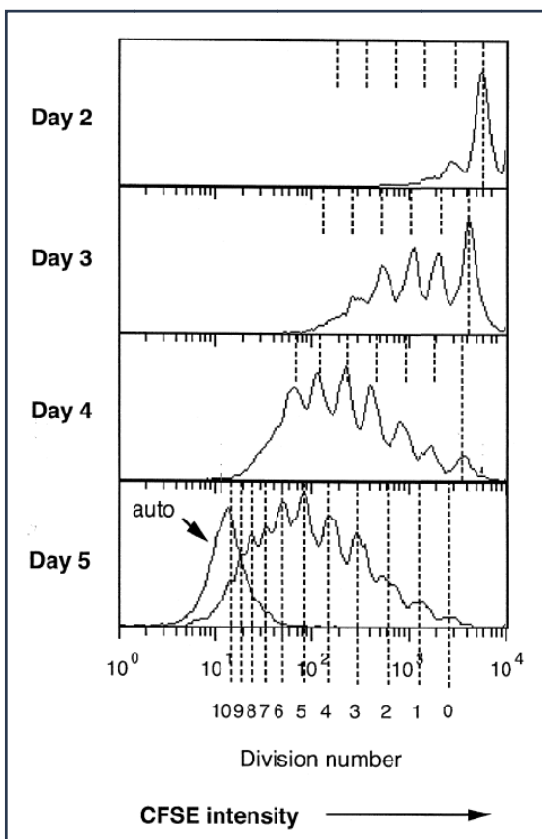
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) flow cytometry [53, 54]

คศ. 1994 Lyon และคณะ[55] ได้มีการใช้และเสนอว่า CFSE เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการดูการแบ่งตัวของเซลล์ เพราะไม่เพียงแต่บอกจำนวนเซลล์ แต่สามารถคำนวณรอบการแบ่งตัว และการย้อมติดสีของ daughter cell เท่ากันในแต่ละรอบการแบ่งตัว ต่อมามีการใช้ CFSE เพื่อดูปริมาณการแบ่งตัวของเซลล์จาก alloreactive T-cell response กันอย่างแพร่หลาย

เนื่องจากการตรวจ MLR มีข้อจำกัดเรื่องการสัมผัสสารสารกัมตภาพรังสี ทำให้การทดสอบโดยวิธี CFSE flow cytometry เพื่อประเมินตอบสนองของ alloreactive T-cell จึงถูกนำมาแทนที่การใช้ MLR- [³H]-Thymidine ที่มีข้อดีก็คือ หลีกเลี่ยงการสัมผัสสารกัมตภาพรังสี ตรวจบอกจำนวนรอบการแบ่งตัวเซลล์ (mitotic activity) และสามารถระบุชนิดของ T-cell (phenotype ที่มีการแบ่งตัวได้ [46, 56] เนื่องจากสาร CFSE จะสามารถแพร่ผ่าน cell membrane ได้อย่างอิสระ แล้วเข้าไปจับกับ cytoplasmic protein แล้วถูก esterase enzyme ตัด carboxy group ออกด้วยกลไกดังที่กล่าวมา ทำให้ fluorescence ติดอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ โดยที่ไม่สามารถแพร่ไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกันได้ ดังนั้นทุกรอบของการแบ่งเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จะทำให้การติด fluorescence ลดลงครึ่งหนึ่ง ทำให้สามารถทราบจำนวนเซลล์ที่แบ่งเพิ่มขึ้นได้เมื่อตรวจวิเคราะห์เซลล์ด้วย flow cytometry [45, 56] (รูปที่ 22)

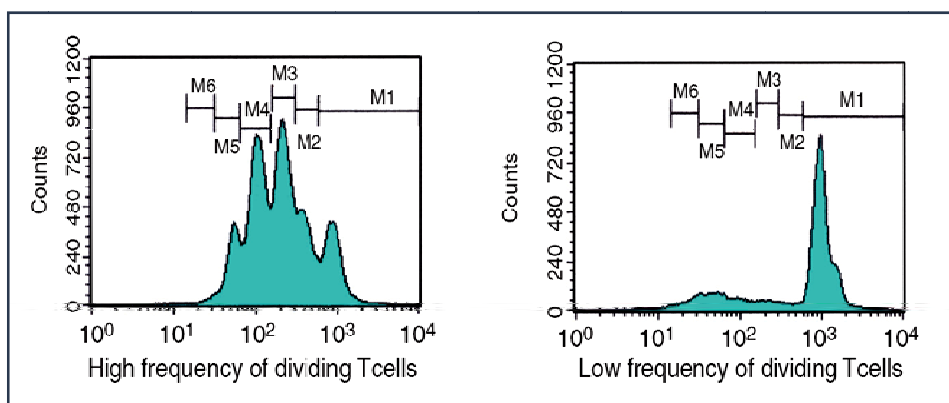


รูปที่ 22 แสดงความเข้มของ fluorescence เซลล์ที่ย้อม CFSE โดยวงกลมสีเขียวด้านบนที่แสดงจะแทนความเข้มของ fluorescence ความเข้มของ CFSE จะลดลงครึ่งหนึ่งในทุกรอบของการแบ่งตัว (M1 ถึง M8 คือจำนวนรอบการแบ่งตัว) ในขณะที่กราฟด้านล่างแกน X คือความเข้มของ fluorescence แกน Y คือจำนวนเซลล์ที่นับได้จากการวัด flow cytometry [48]



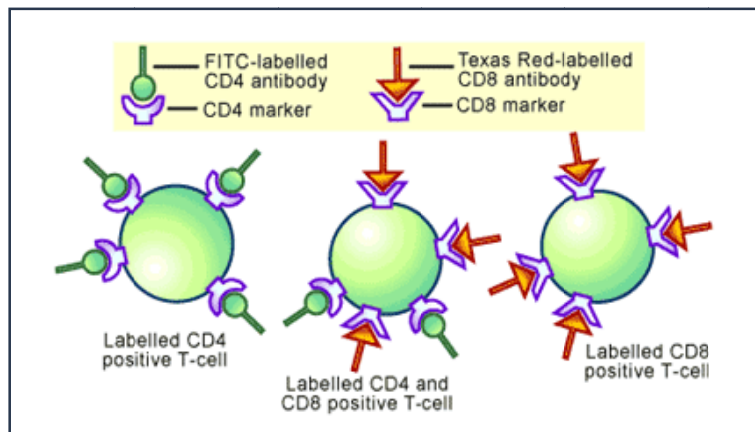
รูปที่ 23 แสดงการตรวจโดยใช้วิธี CFSE-flow cytometry ประเมินการแบ่งตัวของเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เปรียบเทียบให้เห็นในแต่ละเวลาที่แตกต่างกัน โดยเส้นประหมายถึงขอบเขตการแบ่งตัวในแต่ละรอบ หากมีการแบ่งตัวมากขึ้นในแต่ละรอบ เมื่อนำไปวัด flow cytometry ความเข้มของ CFSE ก็ลดลงครั้งหนึ่งเรื่อยๆ ซึ่งการแปลผลต้องระวังหากพบว่าความเข้มลดลงน้อยกว่าปกติแสดงว่ามี autofluorescence (ลูกศรสีดำ) ซึ่งเกิดจากเซลล์ตัวกระตุ้น (stimulated cell)[53]

MLR- CFSE assay เป็นการประเมิน T cell response ต่อ alloantigen (donor cell) ที่แตกต่างกัน โดยอาศัยปริมาณการแบ่งตัวของ T cell (T cell proliferation) โดยใช้ histogram จากการวัด flow cytometry พบว่าถ้ามีการตอบสนองมาก ทำให้มีการแบ่งเซลล์มากจะเห็น histogram มีหลายยอด (peak) มีสูงและเมื่อแบ่งตัวมาก ความเข้มแสงก็จะลดลงและจะขยับมาทางซ้ายมือ ต่างจากกรณีที่มีการตอบสนองน้อยจะพบว่า histogram ค่อนข้างเตี้ยและไม่เห็นยอดการแบ่งตัว (รูปที่ 24)

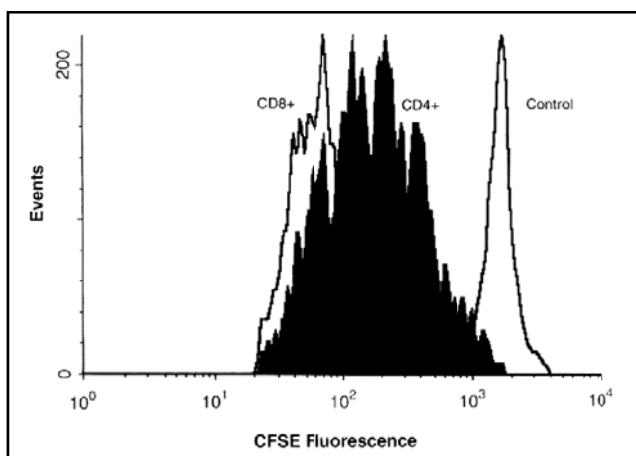


รูปที่ 24 แสดงภาพการวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ด้วย flow cytometry โดยซ้ายมือแสดงถึงเซลล์มีการแบ่งตัวมาก และขวามือแสดงถึงเซลล์มีการแบ่งตัวน้อย

MLR- CFSE assay สามารถบอก phenotype ของเซลล์ที่แบ่งตัวได้โดยอาศัยการย้อมด้วย antibody จำเพาะต่อเซลล์ที่ต้องการวัด ซึ่งมีสารเรืองแสงที่เคลือบติดกับ antibody นั้นๆ (รูปที่ 25) ทำให้เมื่อนำไปวัด flow cytometry ก็มีการดูดซับและเปล่งแสงที่ต่างกัน เช่น phycoerythrin (PE) conjugate anti-CD4 , FITC anti-CD4 หรือ PE conjugate anti-CD8 , FITC anti-CD8 ดังนั้นจึงสามารถระบุ phenotype ของ T cell ที่แบ่งตัวตอบสนองต่อ alloantigen ได้ (รูปที่ 26)



รูปที่ 25 แสดงการย้อมด้วย monoclonal antibody จำเพาะต่อเซลล์ที่ต้องการวัด ซึ่งมีสารเรืองแสงที่เคลือบติดกับ antibody เช่น การย้อมด้วย FITC anti-CD4 หาก T-cell นั้นคือ CD4 ก็จะมีเรืองแสงสีเขียว การย้อมด้วย FITC anti-CD8 หาก T-cell นั้นคือ CD8 ก็จะมีเรืองแสงสีแดงเป็นต้น



รูปที่ 26 แสดงการวิเคราะห์ proliferation ของ T cell subset โดยภายหลังการย้อมด้วย PE conjugate anti-CD4 และ PE conjugate anti-CD8 ทำให้แยก CD4 T cell (shaded histogram) และ CD8 T cell (open histogram)

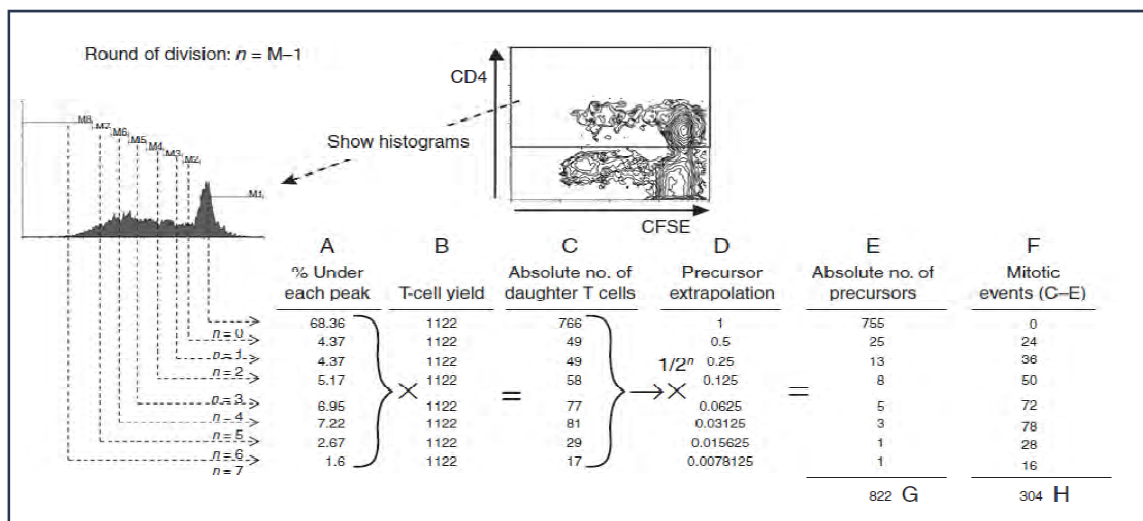
การคำนวณ proliferation index [57]

การวัดด้วย flow cytometry จะได้ CFSE fluorescence histograms ของ CD4+ และ CD8+ T cells ซึ่งจะแสดงข้อมูลการแบ่งตัวในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากนั้นจะเลือก CD4+ และ CD8+ T cell ที่จะนำมาวัดโดยดูจาก gate และ CFSE fluorescence การวัดจำนวนรอบการแบ่งตัวจะอาศัยหลักการของความเข้ม CFSE ดังที่กล่าวมา ซึ่งจะได้จำนวนการแบ่งตัวตั้งแต่ 0 ถึง n รอบ โดยจำนวนรอบสูงสุดประมาณ 7-8 รอบเนื่องจากถูกจำกัดด้วยความเข้ม CFSE ที่อาจจะลดลงเอง จากการทดลองจะได้ค่าดังนี้

- (A) ค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนครั้งการแบ่งตัว (event) CD4+ และ CD8+ T-cell แต่ละรอบ n (division)
- (B) ปริมาณทั้งหมดของ living CD4+ or CD8+ Tcell ณ. เวลาที่เก็บเซลล์ (harvest)
- (C) จำนวนทั้งหมดของเซลล์ลูก (daughter T cells) ในแต่ละเวลาของ n
- (D) ปริมาณคาดการณ์ของจำนวนเซลล์เริ่มต้น (original หรือ precursor T cells) โดยคาดการณ์จากจำนวนเซลล์ลูก โดยพิจารณาจากจำนวนรอบการแบ่งตัว (precursor T-cell 1 ตัวถ้าหากมีการแบ่งตัวจะมีจำนวน daughter T-cell เท่ากับ 2ⁿ)
- (E) ปริมาณที่แท้จริงของ precursor T-cell (C/D = E)
- (F) จำนวน proliferation events (C – E = F)

เนื่องจากค่า proliferation event จะขึ้นอยู่กับจำนวน T cells ที่นำเข้ามาวัด FCM ดังนั้น proliferation index จึงสามารถคำนวณจากจำนวน proliferation event ทั้งหมดหารด้วยจำนวน precursor T-cell (H/G)

Stimulation index = Alloreactive mitotic index/synreactive mitotic index
 โดยค่า Mitotic index = จำนวน mitotic events/จำนวน absolute precursors



รูปที่ 27 แสดงวิธีการคำนวณ T-cell proliferation ด้วยการตรวจ MLR-CFSE assay [57]

ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจด้วยวิธี MLR- [³H]-thymidine และ MLR-CFSE assay

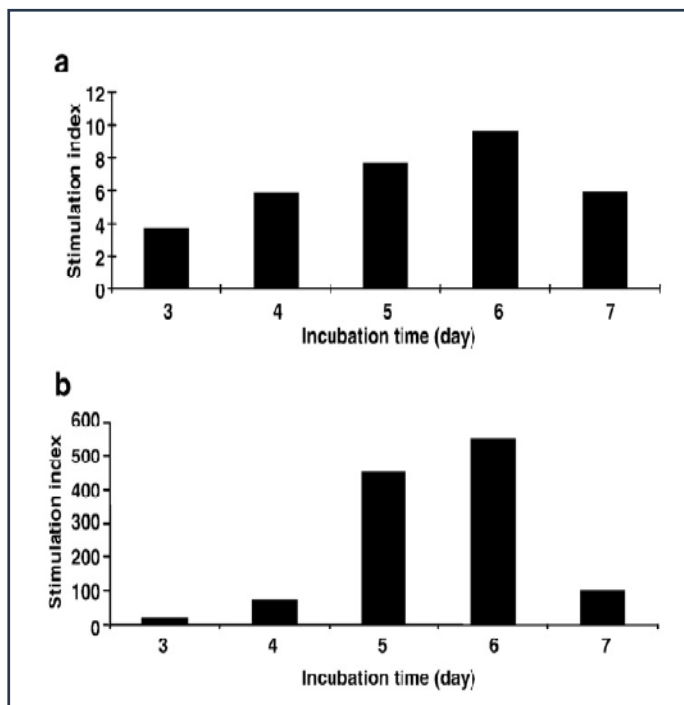
Fulcher และคณะ[56] ได้ศึกษาเปรียบเทียบการประเมิน T-cell function ด้วยวิธี CFSE- MLR assay เทียบกับ [³H]-Thymidine MLR assay ในผู้ป่วยที่มีปัญหา T-cell deficiency 2 ราย (lymphopenia) และในคนปกติ 10 ราย โดยวัดเป็นค่า blast transformation (% BT) และ division index (DI) ซึ่งทั้ง 2 ค่าจะสามารถบอกการแบ่งตัวของเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าให้เห็นว่าการตรวจทั้ง 2 วิธีให้ผลมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน แต่วิธี CFSE- MLR assay มีข้อดีกว่าวิธี [³H]-Thymidine -MLR assay ตรงที่สามารถแยกกลุ่ม responder กับ non responder ได้ชัดเจนมากกว่า นอกจากนี้ในกรณีที่จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณน้อย วิธี CFSE ก็สามารถบอกจำนวนการแบ่งตัวได้แม่นยำกว่าวิธี [³H]-Thymidine -MLR assay

Oku และคณะ[58] ได้ศึกษาใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของหมู (swine leucocyte antigen ; SLA) เปรียบเทียบ [³H]-Thymidine -MLR assay และ MLR-CFSE assay โดย [³H]-Thymidine -MLR assay จะเพาะเลี้ยงเซลล์ของ responder จำนวน 4×10^5 ตัวและเซลล์ของ stimulator จำนวน 4×10^5 ตัวที่ผ่านการฉายแสง 2,500 cGy นำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน โดย 6 ชั่วโมงสุดท้ายจะเติม [³H]-Thymidine แล้วเก็บนับเซลล์ ส่วนวิธี MLR-CFSE assay จะเพาะเลี้ยงเซลล์ของ responder จำนวน 2×10^5 ตัวและเซลล์ของ stimulator จำนวน 2×10^5 ตัว ที่ผ่านการฉายแสง 3,000 cGy นำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน แล้วเก็บนับเซลล์

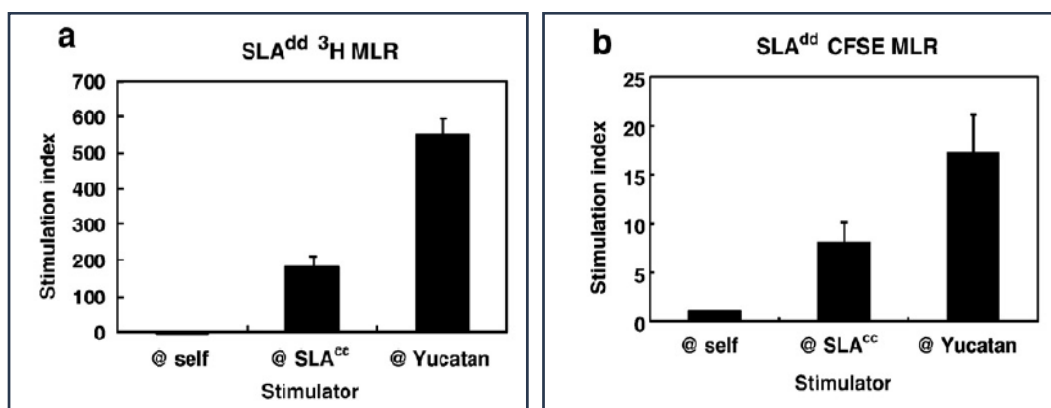
จากการศึกษาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน พบว่า stimulation index จะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 5 สูงสุดวันที่ 6 และ หลังจากนั้นจะเริ่มต่ำลง ซึ่งการตอบสนองคล้ายกันทั้ง 2 วิธี (รูปที่ 28)

เมื่อเปรียบเทียบค่า stimulation index ทั้ง 2 วิธีโดยดูทั้งการแบ่งเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น การกระตุ้นด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวของหมูชนิดเดียวกัน SLA และเซลล์เม็ดเลือดขาวของหมูต่างชนิดกัน (Yumata) พบว่าแม้ว่าค่า stimulation index จากวิธี MLR-CFSE assay (mean SI ด้วย SLA^{cc} 8.1 ± 4.1 และ Yucantan 17.2 ± 3.8) จะมีค่าต่ำกว่า [³H]-Thymidine -MLR assay (mean SI ด้วย SLA^{cc} 184 ± 44.6 และ Yucantan 551 ± 145.2) แต่ก็ยังมีแนวโน้มไปในแนวทางเดียวกัน (รูปที่ 29)

สรุปว่าการตรวจด้วยวิธี MLR- [³H]-thymidine และ MLR-CFSE assay มีผลการตรวจในการประเมินแบ่งเซลล์มีความสอดคล้องกัน



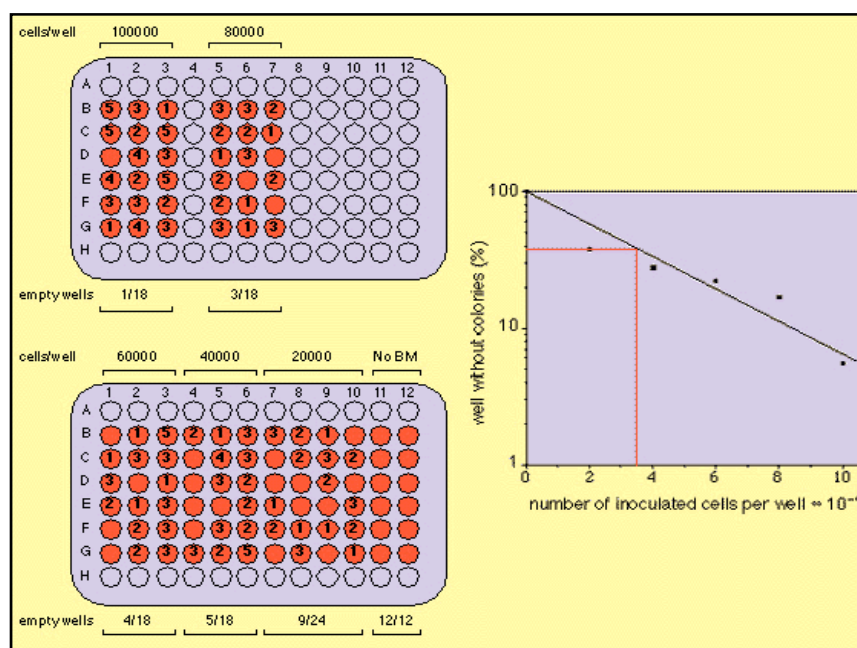
รูปที่ 28 แสดง Kinetic ของ MLR-CFSE (รูป a) และ $[^3\text{H}]$ -Thymidine-MLR assay (รูป b) โดยแกน x คือ stimulation index แกน y จำนวนวันในการ incubation



รูปที่ 29 แสดงการตรวจด้วยวิธี $[^3\text{H}]$ -Thymidine-MLR assay (รูป a) และ MLR-CFSE (รูป b) โดยแกน x คือ stimulation index แกน y คือชนิดเซลล์ที่ใช้กระตุ้นการแบ่งตัว

Limiting dilution assays (LDA)[48]

Lefkovits ได้กล่าวไว้ครั้งแรกตั้งแต่ พ.ศ.2515 วิธีการนี้เป็นวิธีแรกๆ ที่ใช้ตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อ antigen specific ในเชิงปริมาณ โดยขั้นตอนเริ่มจากการ dilute responder cell (recipient PBMC) ด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างแล้วเติมลงไปในภาชนะที่มี non-limiting stimulus (donor stimulator cell) การแปลผลต้องเปรียบเทียบกับหลุม negative control (หลุมที่ไม่มี responder cell) โดยที่จะแปลผลว่า positive เมื่อการตอบสนองมีค่าสูงกว่า negative control ประมาณ 3 เท่าขึ้นไป โดยจำนวนหลุม negative ในแต่ละความเข้มข้นของ responder cell จะถูกระบุซึ่งจำนวนของหลุมที่แปลผล negative จะแตกต่างกันไปขึ้นกับ dilution ของ responder cell คือ เมื่อความเข้มข้นของ responder cell มากจำนวนหลุมที่ negative จะน้อยลง หลังจากนั้นจะมีการวาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนหลุมที่ให้ผล negative กับค่าเฉลี่ยของจำนวน precursor cell (รูปที่ 30)



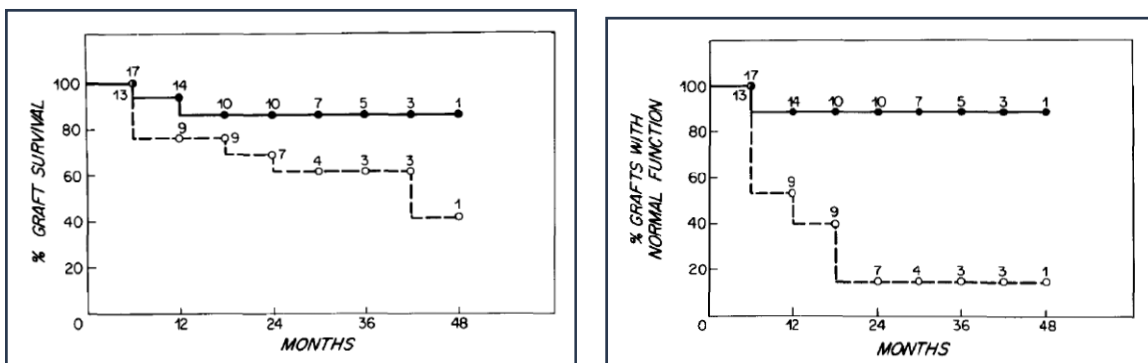
รูปที่ 30 แสดงการตรวจ limiting dilution assay (LDA) และกราฟระหว่างจำนวนหลุมที่ให้ผลลบกับจำนวนเซลล์ในหลุมนั้น

Cell-mediated lymphotoxicity (CML)[35]

เป็นการทดสอบความสามารถการทำงานของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย (targeted cell) การตรวจทำได้โดยนำลิ้มโฟไซต์ของผู้รับ (recipient) มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เป้าหมายที่ติดฉลากด้วย chromium-51 (⁵¹Cr-donor target cell) ใน microtiter plate เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเอาน้ำส่วนบน (supernatant) ซึ่งจะมี ⁵¹Cr ที่หลั่งออกมาจาก donor cell ที่ถูกทำลายโดย cytotoxic T cell เอา supernatant ที่ได้ไปวัดสารกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง gamma counter หน่วยเป็น count per minute (cpm) แสดงผลด้วยค่า % specific lysis ถ้าค่า % specific lysis สูงแสดงถึง CTL ของผู้รับมีความสามารถในการทำลาย donor cell สูง

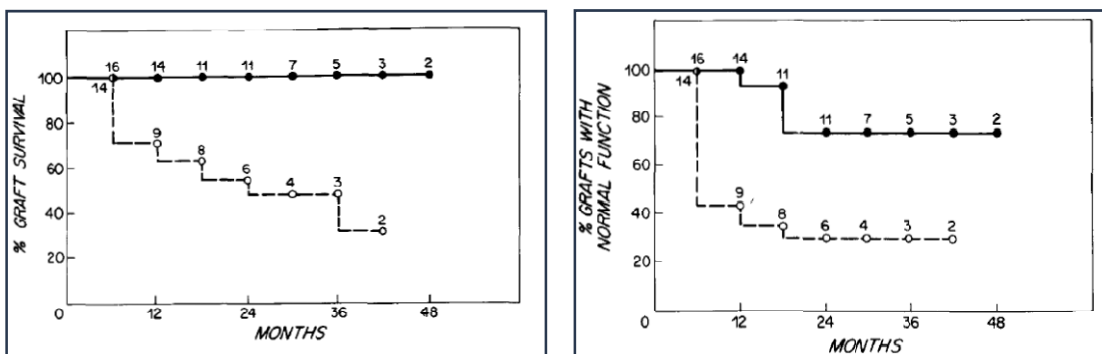
คศ. 1981 Goulmy และคณะ[59] ศึกษาใน cadaveric KT โดยใช้การตรวจด้วยวิธี CML เพื่อประเมิน alloresponse ต่อ donor พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย CML nonreactivity จะมีผลการปลูกถ่ายไตดีกว่ากลุ่มผู้ป่วย CML reactive นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยที่เกิด rejection จะมี CML reactive ทุกราย ในขณะที่ร้อยละ 70 ผู้ที่ไม่เกิด rejection จะมีผลการตรวจจัดเป็น CML nonreactivity

คศ. 1982 Harmon และคณะ[60] ศึกษาเปรียบเทียบ CTL assay และ MLR ในการประเมิน immune ของผู้ป่วยก่อนปลูกถ่ายไตจำนวน 33 รายเพื่อหาความสัมพันธ์กับ renal outcome พบว่าทั้ง 2 วิธีถือว่ามี ความสามารถทำนาย renal outcome ทั้งการเกิดภาวะไตปฏิเสธ renal function และ graft survival ได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 31และ32)



รูปที่ 31 (ซ้าย) แสดง graft survival เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี CTL assay โดยวงกลมสีดำ คือ CTL negative และ วงกลมสีขาวคือ CTL positive (p<0.07)

(ขวา) แสดง renal function เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี CTL assay โดยวงกลมสีดำ คือค่า serum creatinine < 1.5 มล/dl และ วงกลมสีขาวคือ ค่า serum creatinine >1.5 มล/dl (p<0.001)



รูปที่ 32 (ซ้าย) แสดง graft survival เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี MLR assay โดยวงกลมสีดำ คือ CTL negative และวงกลมสีขาวคือ CTL positive ($p < 0.01$)

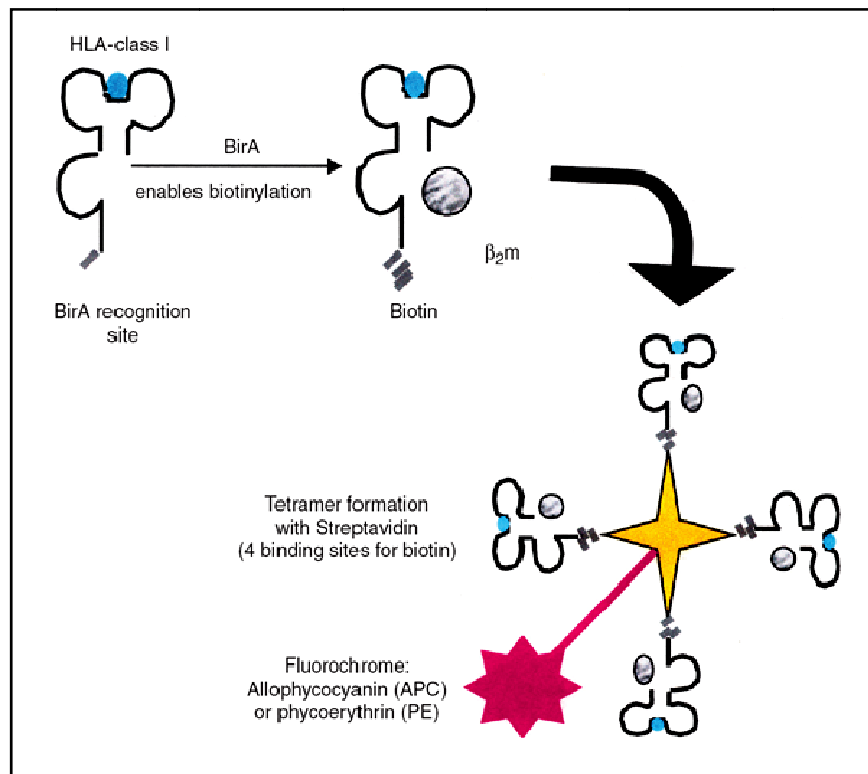
(ขวา) แสดง renal function เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี MLR assay โดยวงกลมสีดำ คือค่า serum creatinine < 1.5 มล/dl และ วงกลมสีขาวคือ ค่า serum creatinine > 1.5 มล/dl ($p < 0.001$)

Weimer และคณะ[61] ศึกษาบทบาทของ CTL assay ต่อการลดยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยจำนวน 81 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตมาเป็นระยะเวลา 2 ปี พบว่ามีผู้ป่วยทั้งสิ้น 50 ราย ที่ตรวจไม่พบ donor specific CTL (hypo-responsive) และหลังจาก inform consent ได้มีการลดขนาดยากดภูมิคุ้มกันลงครึ่งหนึ่ง และติดตามต่อ 12 เดือน พบว่ามีเพียง 1 รายที่เกิดการปฏิเสธไต

จากการศึกษาที่ผ่านมาสรุปได้ว่าการตรวจด้วยวิธี CTL assay บ่งชี้ donor specific cytotoxic T-cell หลังปลูกถ่ายไตในกลุ่มที่มี hypo-responsive สามารถช่วยประกอบการตัดสินใจในการปรับลดยากดภูมิคุ้มกัน และช่วยระบุผู้ป่วยที่มีภาวะ tolerance ได้ อย่างไรก็ตาม CTL assay เป็นการตรวจการทำงานของ CD8+ T cell เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้เพื่อประเมินภาพรวม T-cell alloreactivity ได้

Tetramer technology [46, 48]

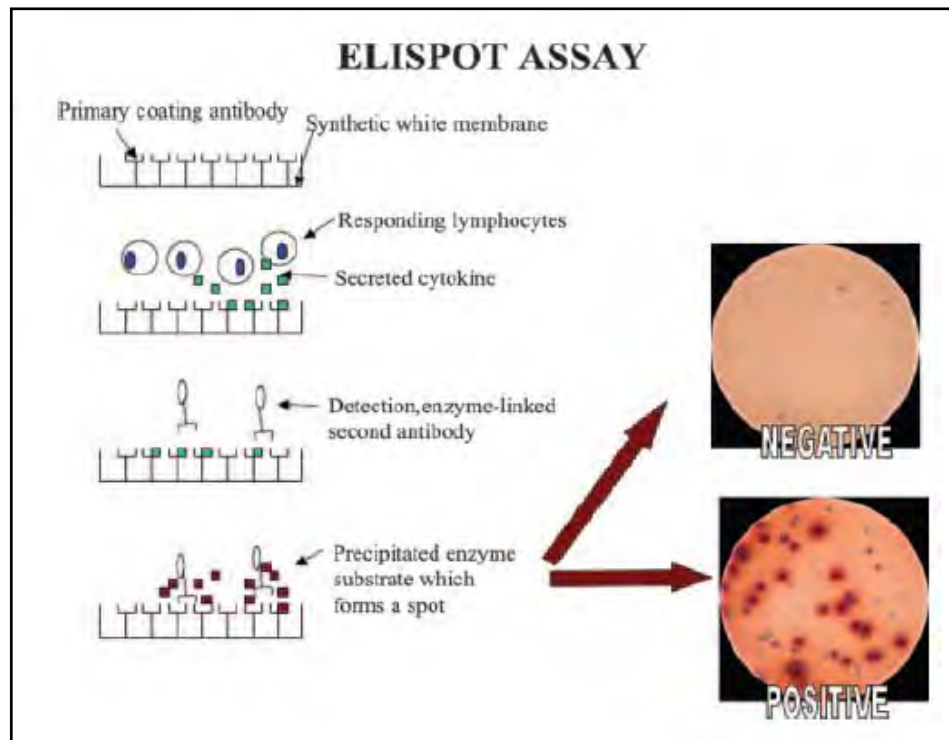
เป็นการศึกษา T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ antigen โดยการย้อมเซลล์ด้วย MHC tetramer ซึ่งประกอบด้วย MHC class I-peptide complex 4 โมเลกุลที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วนำไปนับจำนวนด้วยเครื่อง flow cytometry ดังรูปที่ 17 โดยสังเคราะห์ peptide ใส่ลงบนร่องของ MHC class I molecule แล้วนำมา conjugate กับ biotin ได้เป็น biotinylated MHC class I-peptide complexes นำมาเชื่อมต่อกัน 4 โมเลกุลโดยผสมกับ streptavidin แล้วติดฉลากกับสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) นำ MHC tetramer ไปย้อมเซลล์ เติมน้ำ anti-CD8 ลงไปแล้วนับด้วยเครื่อง flow cytometer ทำให้ทราบจำนวนของ cytotoxic T lymphocyte ที่มี T cell receptor จำเพาะกับ peptide บน MHC tetramer ปกติการจับกันระหว่าง MHC-peptide กับ T cell receptor ค้นข้างอ่อนจึงต้องใช้วิธีการเพิ่ม avidity โดยการใส่ MHC-peptide ถึง 4 โมเลกุล เป็นวิธีที่มีความไวค่อนข้างสูงในการ



รูปที่ 33 แสดงการใช้ MHC tetramer ในการตรวจหา specific T cells ด้วย flow cytometry[48]

Enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT) assay [46, 48]

ELISPOT assay เป็นการตรวจที่อาศัยเทคนิคการตรวจร่วมกัน (hybrid) ระหว่าง MLR และ ELISA ELISPOT assay เป็นการทดสอบ alloreactivity T-cell โดยใช้วิธี sandwich ELISA เพื่อวัดจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ วิธีการตรวจเริ่มเติมเซลล์ที่ต้องการตรวจลงใน plate ที่เคลือบด้วย antibody ที่ต้องการศึกษา ซึ่งส่วนใหญ่ antibody ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ IFN- γ , IL2, IL4, IL5 และ IL10 หลังจากนั้นกระตุ้นด้วยเต็มแอนติเจน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์มีการตอบสนองต่อแอนติเจนก็จะสร้างและหลั่งไซโตไคน์ออกมา ซึ่งไซโตไคน์ดังกล่าวจะจับกับ antibody จำเพาะที่เคลือบไว้ใน plate ไว้ในขั้นตอนแรก เมื่อนำเซลล์ไปล้างแล้วเติม anti cytokine antibody ที่ติดฉลากด้วย enzyme และเติม substrate ก็สามารถนับจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ได้ (รูปที่ 34) [46]

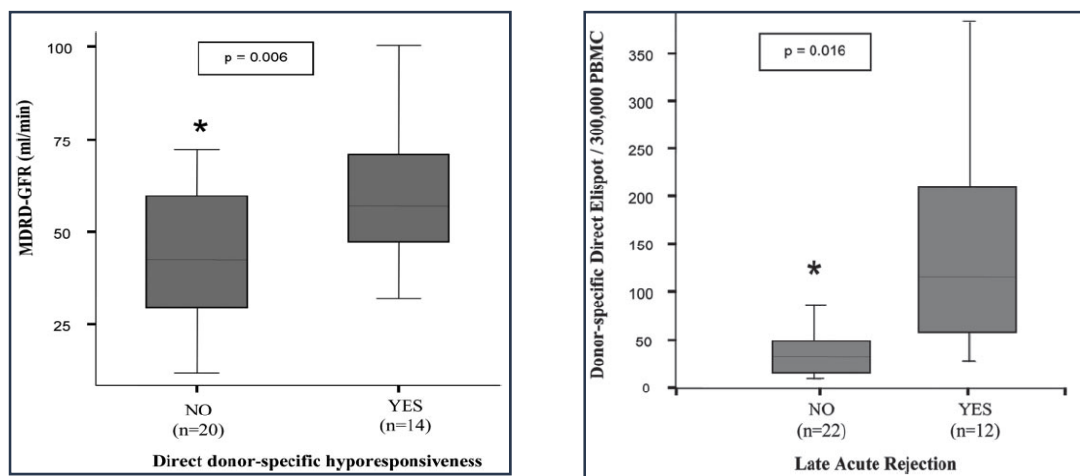


รูปที่ 34 แสดงวิธีการตรวจ Enzyme-linked immunosorbent spots (ELISPOT) assay [46]

การตรวจด้วยวิธี ELISPOT assay มีข้อดีคือ sensitivity สูง ใช้เวลาน้อย ทำได้ง่าย สามารถใช้ frozen cell ได้ แต่มีข้อเสียคือ การตรวจนับเซลล์ที่อาจคลาดเคลื่อนได้ การหลังไซโตไคน์ที่วัดได้นั้นอาจเป็นการสร้างในช่วงเวลาสั้นๆ (snapshot event) ทำให้ไม่สามารถบอก T-cell alloresponse เนื่องจากการตอบสนองนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic) นอกจากนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี tolerance ได้

Poggio และคณะ[62] ศึกษาแบบ cross-sectional ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตที่ได้รับการวินิจฉัย CAN ทั้งที่การทำงานยังดีและการทำงานที่ลดลงโดยการ IFN- γ ELISPOT assay เพื่อประเมิน immune response ซึ่งใช้ตรวจทั้ง direct pathway (จากการใช้ 6 MM third stimulator) และ indirect pathway (โดยใช้เปปไทด์สังเคราะห์จาก HLA ของ donor) หลังจากนั้นจะตรวจ Anti-HLA antibodies โดยการวัด flow cytometry ที่ใช้ HLA-coated beads ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่เกิด CAN การตอบสนองต่อ donor เซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่เกิด CAN ($p < 0.02$) เมื่อคำนวณสัดส่วนการตอบสนองของ donor/third สูงกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่มเกิด CAN 2.61 ± 3.0 , กลุ่มที่ไม่เกิด CAN $0.50-0.72 \pm 0.42$; $p < 0.001$) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผู้ป่วยที่เกิด CAN จะมี donor-specific cellular immunity เกิดขึ้น

Bestard และคณะ[63] ได้ศึกษาผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต (living KT) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปี (24 ถึง 114 เดือน) จำนวน 34 ราย โดยใช้การตรวจวิธี IFN- γ Elispot assay เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง allogenic response กับระดับ GFR-MDRD และ renal rejection ผลการศึกษาพบว่าค่า GFR-MDRD ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจเป็นลบและบวกมีความแตกต่างของระดับ GFR อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.006$) และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับการเกิด rejection ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจเป็นลบและบวกมีความแตกต่างของระดับ GFR อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p=0.016$) (รูปที่ 35)



รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ผลการตรวจ IFN- γ Elispot assay และค่า GFR-MDRD และการเกิด rejection[63]

Yes คือ มีการตอบสนองมากกว่า 20 จุด ต่อการกระตุ้นด้วยเซลล์ peripheral blood mononuclear (PBMCs) จำนวน 3×10^5 ตัว

No คือ มีการตอบสนองน้อยกว่า 20 จุด ต่อการกระตุ้นด้วยเซลล์ peripheral blood mononuclear (PBMCs) จำนวน 3×10^5 ตัว และถือว่าเป็นกลุ่ม donor hyposponse

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าจะมีการปลูกถ่ายไตเป็นเวลานานการกระตุ้น Alloresponse ของ T-cell ยังคงมีอยู่ตลอด และเชื่อว่าการทดสอบที่ดีเพื่อตรวจติดตาม (immune monitoring) น่าจะเป็นเครื่องมือที่ช่วยให้แพทย์ผู้รักษาตัดสินใจในการใช้ยากดภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งผู้วิจัยก็ได้เสนอการตรวจวิธี IFN- γ Elispot assay ว่าให้ทางเลือกหนึ่งในการตรวจ

การศึกษาในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไต แสดงให้เห็นว่า ELISPOT assay สามารถใช้ประเมิน T-cell alloreactivity ทั้ง direct และ indirect pathway โดยค่าที่สูงมีความสัมพันธ์กับ poor renal outcome [62, 64]

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียในการตรวจแต่ละวิธีในการตรวจ [46]

Assay	Technique	Advantages	Disadvantages
ELISPOT	Frequency of effector/memory T cells measured by detection of cytokine production using two high-affinity antibodies against the cytokine	<ul style="list-style-type: none"> •High sensitivity •Measures both frequency & phenotype of cells •Short <i>in vitro</i> culture •Direct & indirect alloreactivity measured •Uncover regulation •Use of frozen cells possible •Relatively easy to perform 	<ul style="list-style-type: none"> •Frequency measured on the basis of the cytokine production of cells •Snapshot of events •Counting of cells/spots somewhat subjective •Not yet used to study tolerant patients
Transvivo DTH	Index of reactivity of T cells to antigens measured by quantification of resultant swelling in mouse footpad	<ul style="list-style-type: none"> •Direct a & indirect alloreactivity •Uncover regulation •Only assay used to study tolerant patients 	<ul style="list-style-type: none"> •Requires mice •Cumbersome •Larger number of cells required •Measurement of swelling subjective
Tetramers	Frequency of T cells measured by their binding to specific peptide- MHC complexes using flow cytometry	<ul style="list-style-type: none"> •Direct visualization of T cells regardless of their function •No activation or expansion needed •Easy to perform •Requirement for cell numbers low •Could be combined with other flow cytometric assays to evaluate cytokines/functional status of cells 	<ul style="list-style-type: none"> •Need for large numbers of MHC/peptide tetramers to study multiple antigens •Not well established for class II •Not yet studied in clinical transplantation

ตารางที่ 5 (ต่อ)เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียในการตรวจแต่ละวิธีในการตรวจ [46]

Assay	Technique	Advantages	Disadvantages
CFSE	Measurement of proliferation by dilution of the dye in dividing cells using flow cytometry	<ul style="list-style-type: none"> •Ability to distinguish dividing/ nondividing cells •Proliferation of cells followed over time •Characterization of the phenotype/ activation/death of the dividing cells using multicolor flow cytometric techniques 	<ul style="list-style-type: none"> •Requires optimization for human cells •Lack of sensitivity •Toxicity of the dye •Studied only in a single clinical liver transplantation trial
Intracellular staining	Frequency of cytokine-producing T-cells by flow cytometry	<ul style="list-style-type: none"> •Measures frequency and phenotype of cells •Easy to perform •Requires very few cells •Multiparametric staining possible 	<ul style="list-style-type: none"> •Requires specific activation procedures/inhibitors of intracellular transport •Toxic to cells •Limited sensitivity •Not yet studied in clinical transplant

2.8 Immunologic monitoring หลังการปลูกถ่ายไต [45, 47, 65, 66]

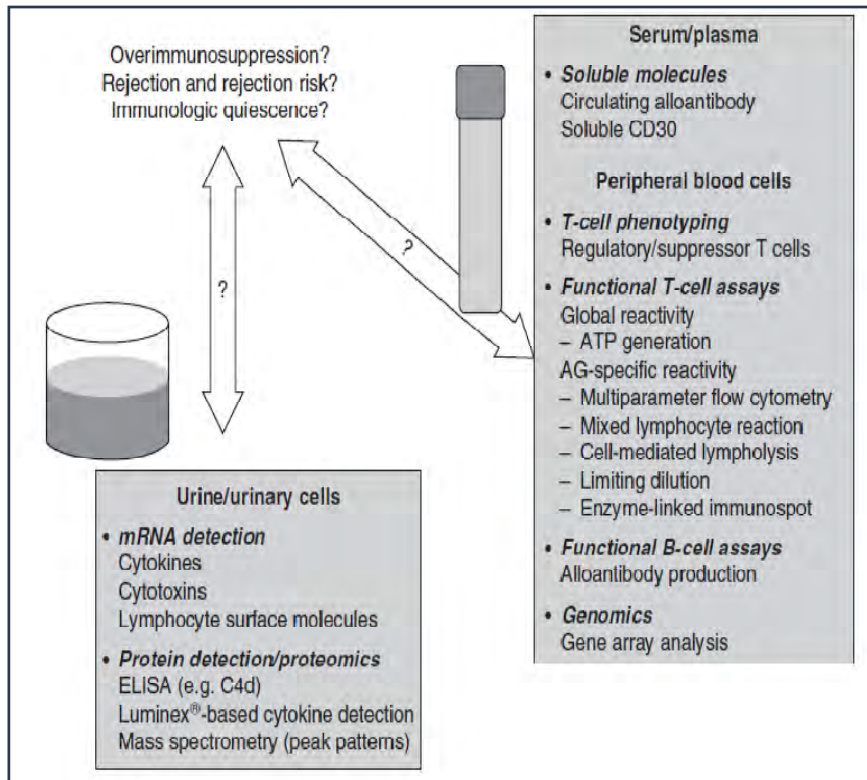
หลังการปลูกถ่ายไต ผู้ป่วยมีความจำเป็นที่ต้องได้ยากดภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเกิด rejection การให้ยาเพื่อกดภูมิคุ้มกัน จะต้องให้สมดุลกับผลเสียจากยา โดยเฉพาะการเกิดมะเร็ง และ การติดเชื้อ เป็นที่ทราบกันว่า หากเกิด acute rejection จะมีผลทำให้ graft survival ลดลง ซึ่งการวินิจฉัย rejection การเจาะชิ้นเนื้อไต (kidney biopsy) ยังคง gold standard เพื่อที่จะแยกหาสาเหตุว่าเกิดจาก acute หรือ chronic rejection กับสาเหตุที่เกิดจาก non-alloimmune injury เช่น acute tubular injury, medication toxicity, recurrence disease หรือ de-novo glomerulonephritis และ infection แต่การทำ allograft biopsy นี้ถือเป็นหัตถการที่มีความเสี่ยงสูง อาจเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ โดยทั่วไปในทางปฏิบัติการเจาะตรวจชิ้นเนื้อไตนั้น มักจะทำเมื่อระดับ creatinine เพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 15 ถึงกระนั้นบางครั้งก็ยังไม่สามารถวินิจฉัยภาวะนี้ได้

อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยประมาณ 1 ใน 3 ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา โดยที่ค่าการทำงานของไต หรือ ระดับ creatinine ปกติ เรียกว่า subclinical rejection ซึ่งหากไม่มีการรักษาที่เหมาะสมก็จะทำให้ graft survival ลดลงได้เช่นกัน ภาวะดังกล่าวนี้หากมีการทำ protocol biopsy ก็จะสามารถวินิจฉัยตั้งแต่แรกได้ แต่

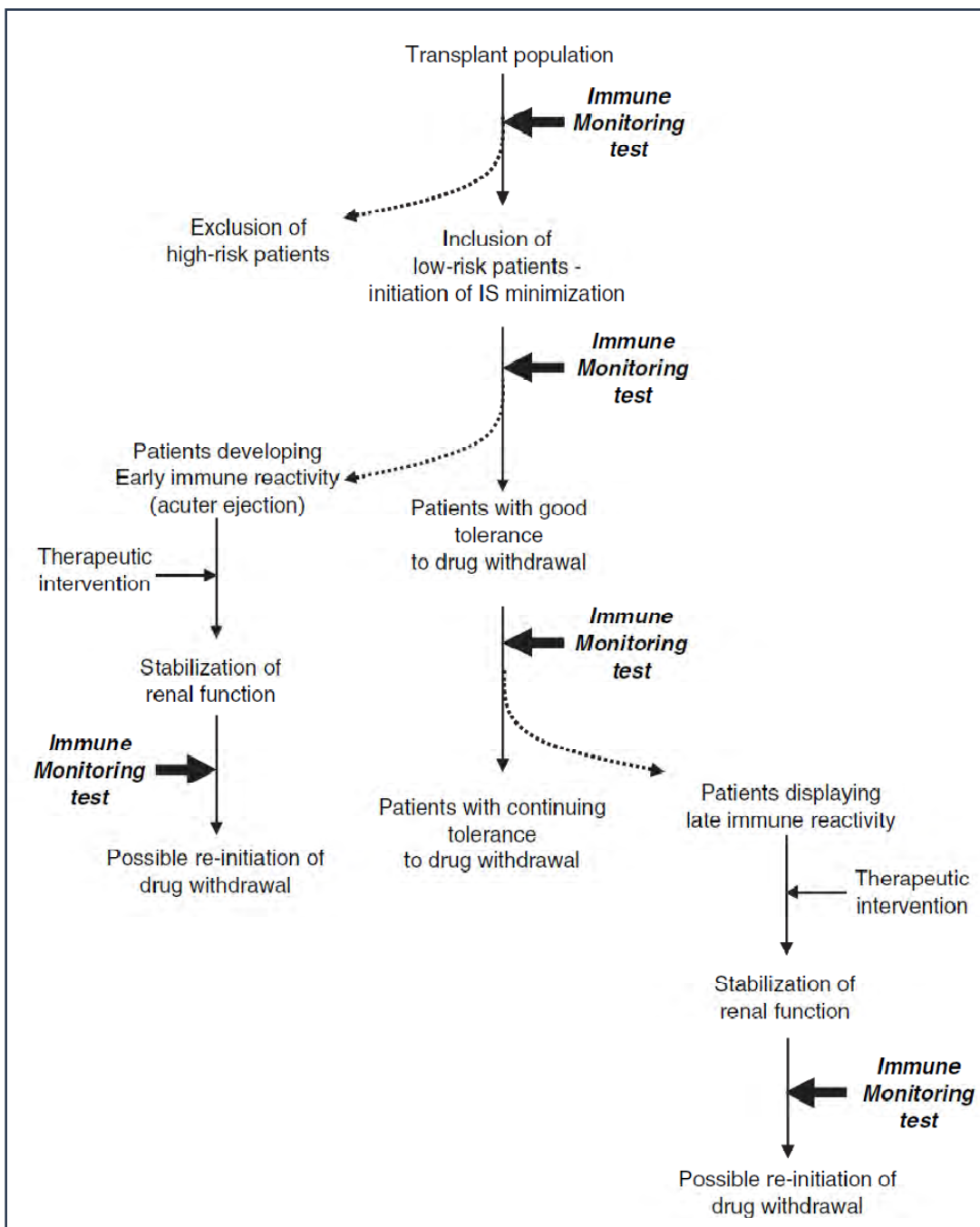
ดังนั้นประเด็นหลักในการวิจัยเกี่ยวกับการปลูกถ่ายในปัจจุบันจึงพยายามหาตัวบ่งชี้ (biomarker) ที่สามารถบอกถึง immune reactivity ซึ่งมีลักษณะบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้ และบอกถึงการตอบสนองต่อการรักษา มีความสัมพันธ์กับ rejection สามารถวินิจฉัยก่อนที่จะมีการทำงานที่ผิดปกติ จึงมีความพยายามที่จะศึกษาและพัฒนาการถึงวิธีตรวจที่สามารถทำได้ง่าย มีความเสี่ยงน้อย (รูปที่ 36) เช่น การเจาะเลือด หรือการตรวจปัสสาวะด้วยวิธีต่างๆ เพื่อที่จะใช้ในการวินิจฉัย หรือทำนายการเกิด allograft rejection แล้วรีบให้การรักษา ก่อนที่จะมีปัญหา allograft dysfunction เกิดขึ้น

ในปัจจุบันมีความสนใจเกี่ยวกับ immunosuppressive minimization กันมาก การลดยาเป็นจุดที่สำคัญ หากมีเครื่องมือตรวจ immune monitoring ที่ดีมาเป็นตัวช่วยตัดสินใจ แยกผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด rejection และความเสี่ยงต่ำ หรือ tolerance ในการปรับใช้ยาจะเป็นทางเลือกที่ดี (รูปที่ 37)

Immune monitoring ส่วนใหญ่จะต้องการประเมิน T-cell reactivity ซึ่งมี 2 วิธีหลักดังกล่าวมาข้างต้น ปัจจุบันยังไม่มี การทดสอบใดที่ทำเพียงอย่างเดียวแล้วสามารถบอกสถานะ immune reactivity ของผู้ป่วยได้ทั้งหมด ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลอาจต้องให้การตรวจหลายวิธีร่วมกัน



รูปที่ 36 แสดงวิธีการตรวจที่ non invasive เพื่อวินิจฉัย allograft rejection[65]



รูปที่ 37 แสดงประโยชน์การใช้ immune monitoring มาใช้ในการปรับใช้ยากดภูมิคุ้มกัน [66]

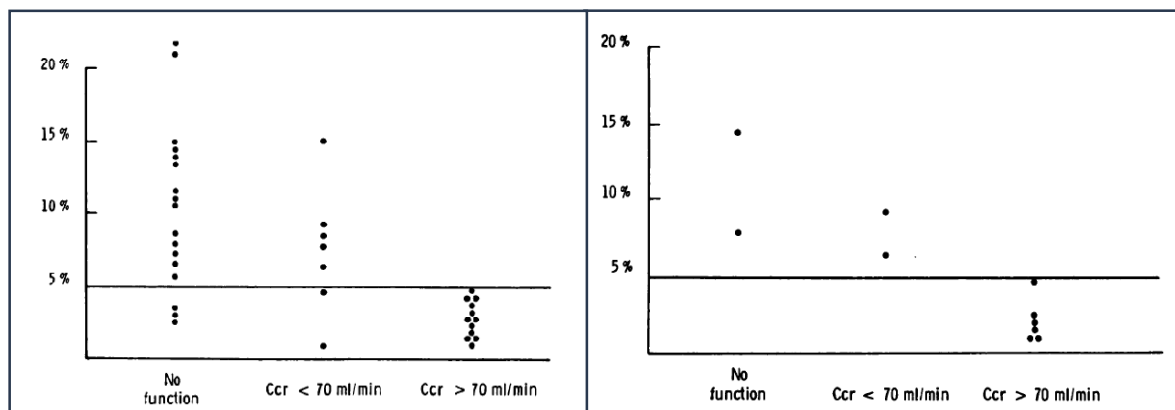
2.9. ทบทวนบทความที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.9.1 การศึกษา mixed lymphocyte culture (MLC) และ mixed lymphocyte reaction โดย [³H]-thymidine

ปี คศ. 1965 Bain และคณะ เป็นผู้เสนอการใช้ MLC ครั้งแรกในการพิจารณาคัดเลือกผู้บริจาคไต (graft donor) โดย MLC เป็นการตรวจปฏิกิริยาของลิมโฟไซต์ในหลอดทดลอง in vitro เพื่อประเมิน histocompatibility ของ 2 คน ซึ่งในเวลานั้นการตรวจประเมินยังไม่มีแนวทางการปฏิบัติที่แน่นอน มีการศึกษาข้อมูล MLC แต่จำนวนผู้ป่วยก็ไม่เพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติหาความสัมพันธ์ของ MLC

คศ.1965 Nelson และคณะ[67] รายงานผลการศึกษา MLC ในผู้ป่วยก่อนการปลูกถ่ายไตจำนวน 11 ราย เพื่อดูความสัมพันธ์การเกิด rejection พบว่าค่า MLC มี correlation กับการเกิด rejection แต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ (Spearman rank correlation coefficient; rS = 0.36; p>0.05)

คศ.1970 Bach และคณะ[68] ศึกษา MLC ในผู้ป่วยก่อนการปลูกถ่ายไตจำนวน 36 ราย แล้วติดตามดูเปรียบเทียบกับ creatinine clearance ที่ 1 และ 2 ปี และการเกิดภาวะ rejection โดยรายงานผล MLC เป็น % transformation หากค่า MLC มากกว่า 5 ถือว่าผลเป็น positive แต่หากค่ามีน้อยกว่า 5 ถือว่าเป็น negative ผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลา 1 และ 2 ปี ค่า MLC มีความสัมพันธ์กับ CCr อย่างเห็นได้ชัด (p<0.001) และที่สำคัญคือผู้ป่วยที่มี CCr มากกว่า 70 ทั้งที่ 1 และ 2 ปี ไม่ผู้ป่วยรายใดที่มีการตอบสนองของ MLC มากกว่า 5 (รูปที่ 38)



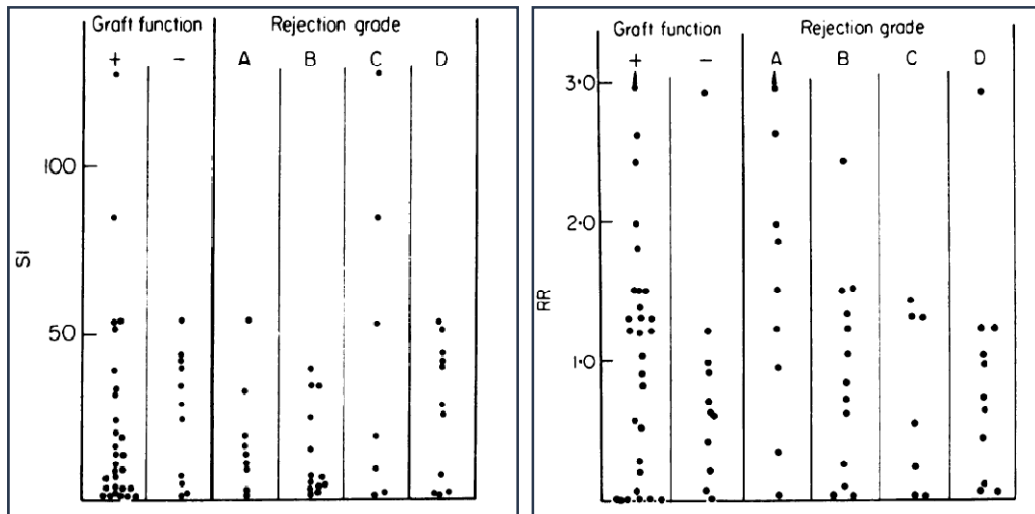
รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MLC และ creatinine clearance (Ccr) ที่เวลา 1 ปี (รูปซ้าย) และ 2 ปี (รูปขวา) หลังการปลูกถ่ายไต [68]

เมื่อวิเคราะห์การใช้ MLC กับการเกิดภาวะ rejection ที่แบ่งการเกิดเป็น 2 ช่วงคือ early และ late โดยการวิเคราะห์จะถือผลการตอบสนอง MLC เป็น positive และ negative ดังกล่าวข้างต้น พบว่า MLC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่เกิด rejection และไม่เกิดทั้งระยะ early และ late (ตารางที่ 6) **ตารางที่ 6** แสดงความสัมพันธ์ของ MLC และการเกิดภาวะไตปฏิเสธ

		MLC test		
		Negative (5%)	Positive (5%)	
Early crises	No crisis	14	5	} $P < 0.001$
	Crisis	2	10	
Late crises	No crisis	11	0	} $P < 0.001$
	Crisis	4	11	

คศ. 1974 Cochrum และคณะ[69] ศึกษาต่อ T-cell function ด้วยวิธีการตรวจ mixed lymphocyte culture (two-way) ในผู้ป่วยก่อนปลูกถ่ายไตทั้ง living และ cadaveric KT จำนวน 211 ราย โดยหาความสัมพันธ์ระหว่าง MLR และ renal allograft outcome พบว่าผู้ป่วยที่ค่า MLR ต่ำ (Stimulation Index <8) จะมี graft survival ที่สูงกว่ากลุ่มที่ค่า MLR สูง (Stimulation Index >8) ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปว่า MLR สามารถทำนาย renal allograft outcome ได้

คศ. 1977 Cullen และคณะ[49] ศึกษาผู้ป่วย cadaveric KT จำนวน 40 ราย ใช้ MLR ในการประเมิน graft function ที่เวลา 3 และ 6 เดือนหลังปลูกถ่ายไต โดยการประเมินจะดูความสัมพันธ์ทั้ง one way และ two way รายงานผลเป็น stimulation index และ relative response ผลการศึกษาพบว่า MLR ไม่มีความสัมพันธ์กับ renal function และภาวะ rejection (รูปที่ 39)



(สัญลักษณ์ : + = functioning graft, - = failed graft)

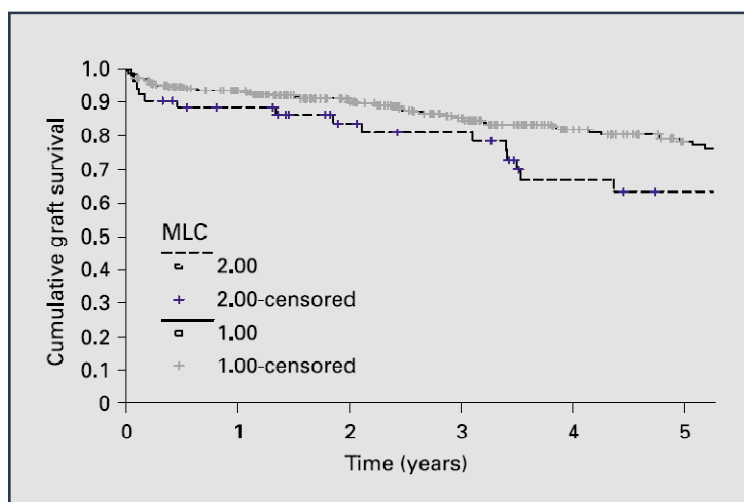
(rejection grade: A = ไม่มีภาวะไตปฏิเสธใน 3 เดือน; B = มีภาวะไตปฏิเสธเกิดขึ้น 1 ครั้งใน 3 เดือน;
C = มีภาวะไตปฏิเสธเกิดขึ้น 2 ครั้งใน 3 เดือน; D = มีภาวะไตปฏิเสธเกิดขึ้นมากกว่า 2 ครั้งใน 3 เดือน)

รูปที่ 39 (ซ้าย) แสดงความสัมพันธ์ของ MLR โดยดูจาก stimulation index (SI) กับ graft function และ rejection (ขวา) แสดงความสัมพันธ์ของ MLR โดยดู relative response (RR) กับ graft function และ rejection

คศ.1997 Kerman และคณะ[70] ศึกษาในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต (living-related) จำนวน 95 ราย โดยมี HLA-identical จำนวน 20 ราย และมี HLA-haptoidental 75 ราย ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับยากดภูมิคุ้มกันคือ cyclosporine และ prednisolone การศึกษาที่ใช้ MLR response เป็นตัวบ่งชี้การหยุด steroid แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ hypo-MLR responder หมายถึงผู้ป่วยที่มีค่า stimulation index (SI) น้อยกว่า 10 และ hyper-MLR responder หมายถึงผู้ป่วยที่มีค่า stimulation index (SI) มากกว่า 10 และหากผู้ป่วยที่จัดอยู่ในกลุ่ม hypo-MLR responder ก็จะหยุดให้ steroid ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วย HLA-identical ทั้งหมดมี MLR-hyporesponsiveness และหลังหยุด steroid เกิด rejection 5 ราย เมื่อติดตาม 10 ปีพบว่า graft และ patient survival เท่ากับร้อยละ 90 ส่วนผู้ป่วย HLA-haptoidental มีทั้งจัดอยู่ใน MLR-hyporesponsive และ hyperresponsiveness พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม MLR-hyporesponsiveness จะเกิด rejection น้อยกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 32 Vs ร้อยละ 68; $p < 0.05$) เมื่อติดตาม 10 ปีทั้ง graft และ patient survival ในกลุ่ม MLR-hyporesponsiveness สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 80 Vs ร้อยละ 60; ร้อยละ 91 Vs ร้อยละ 85 ตามลำดับ; $p < 0.01$)

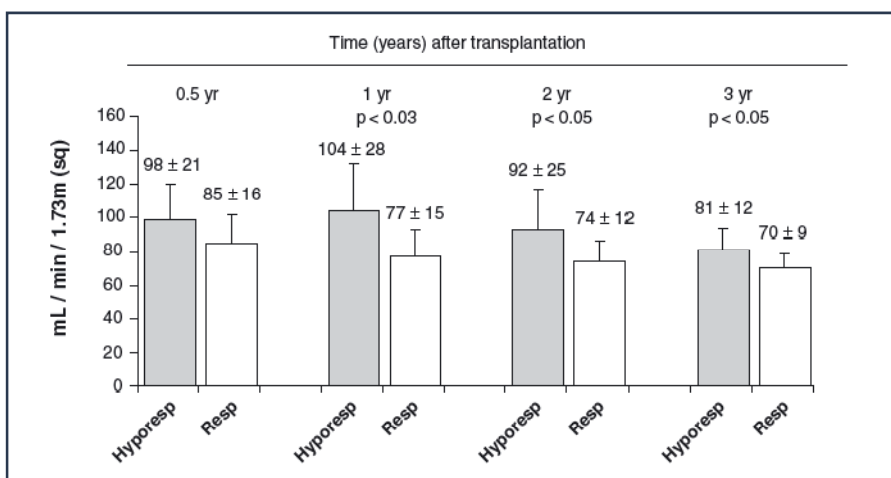
คศ. 1997 Creemers P และคณะ[71] ศึกษาโดยใช้วิธี one-way MLC ติดตาม donor-specific hyporesponse ใน cadaveric kidney transplantation หลังการปลูกถ่ายไตจำนวน 37 ราย โดยการตรวจจะทำต่อเนื่อง (sequential MLC) ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 18 และ 24 เดือนหลังการปลูกถ่ายไต พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม functioning graft มีการตอบสนองแบบ hyporesponse ร้อยละ 66 และมีแนวโน้มว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีการ rejection น้อยกว่า การศึกษานี้สรุปว่าการตรวจแบบ sequential MLC เพื่อระบุผู้ป่วยที่มีการตอบสนองอาจจะช่วยบอกว่า tolerance และสามารถลดยากดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ต่ำลง

คศ. 2004 El Agroudy AE และคณะ[72] ได้ศึกษาผู้ป่วย living kidney transplantation จำนวน 477 ราย เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง mixed lymphocyte culture (MLC) ก่อนการปลูกถ่ายไตกับ renal outcome โดยการนำเซลล์ลิมโฟไซต์จาก recipient มาเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟไซต์จาก donor (stimulator ซึ่งได้รับ 5 % mitomycin เพื่อป้องกันเซลล์ของ donor แบ่งตัว) แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน ในการเก็บนับเซลล์จะเติม [³H]-thymidine จากนั้นนับจำนวนการแบ่งตัวโดยใช้ liquid scintillation counter ผลการตอบสนองจะรายงานเป็น relative response ซึ่งแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม hypo-responder จำนวน 406 ราย ซึ่งผู้ป่วยจะมีค่า relative response (RR) ≤ 4 และกลุ่ม hyper-responder จำนวน 71 ราย ซึ่งมีค่า RR > 4 พบว่ากลุ่ม hyper-responder มีอุบัติการณ์ acute rejection สูงกว่ากลุ่ม hypo-responder (ร้อยละ 46.5 Vs ร้อยละ 44.8; $p < 0.05$) และเกิด chronic allograft nephropathy สูงกว่ากลุ่ม hypo-responder (ร้อยละ 27.3 Vs ร้อยละ 14.5, $p = 0.01$) นอกจากนี้พบว่ากลุ่ม hyper-responder มี 1 yr และ 5 yr graft survival ต่ำกว่ากลุ่ม hypo-responder (ร้อยละ 89 และ 66 Vs ร้อยละ 94 และ 79, $p = 0.03$) (รูปที่ 40) การศึกษานี้สรุปว่า MLC สามารถ predict high immunologic risk ได้ และเสนอว่าหากมี MLC ที่สูง ควรได้รับยากดภูมิที่รุนแรง

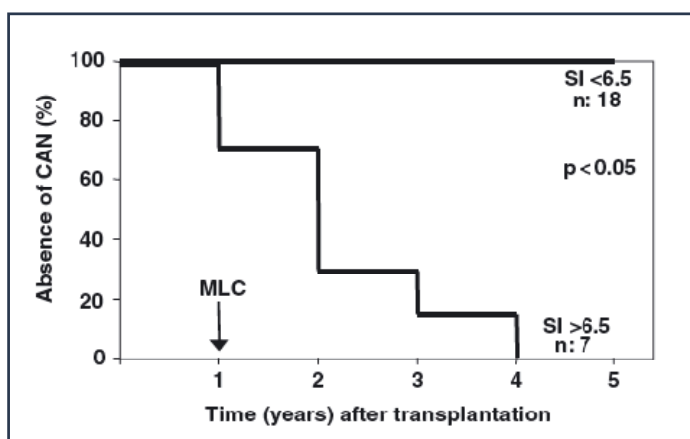


รูปที่ 40 แสดง graft survival แยกตามกลุ่ม hypo-responder (เส้นบน) กลุ่ม hyper-responder (เส้นล่าง) ที่เวลา 1 และ 5 ปี [72]

คศ. 2007 Ferraris JR และคณะ[73] ได้รายงานการศึกษา [³H]-thymidine -MLR ในผู้ป่วยเด็กที่ได้รับ การปลูกถ่ายไตจำนวน 22 ราย โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ recipient และ donor ที่ผ่านการฉายรังสี 1200 rad เป็นเวลา 6 วัน รายงานผลการแบ่งตัวเป็น SI หากค่า SI น้อยกว่า 6.5 ถือว่าเป็นกลุ่ม hyporesponse แต่ถ้า SI มากกว่า 6.5 ถือว่าเป็นกลุ่ม response การวิเคราะห์จะหาความสัมพันธ์ของ [³H]-thymidine -MLR กับการ เกิด rejection และ ค่า GFR หลังปลูกถ่ายไต พบว่ากลุ่ม hyporesponse มีค่า GFR ที่ดีกว่ากลุ่ม response อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 41) การศึกษานี้ไม่มีผู้ป่วยเกิดภาวะ rejection แต่เมื่อเทียบโอกาสการเกิด chronic allograft nephropathy นั้นกลุ่ม hyporesponse มีน้อยกว่ากลุ่ม response อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 42)



รูปที่ 41 แสดงเปรียบเทียบค่า GFR ในผู้ป่วยกลุ่ม hyporesponse และกลุ่ม response จาก การตรวจด้วยวิธี [³H]-thymidine -MLR ในช่วงเวลาหลังปลูกถ่ายไต [73]



รูปที่ 42 เปรียบเทียบการเกิด chronic allograft nephropathy ในผู้ป่วยกลุ่ม hyporesponse (SI < 6.5) และกลุ่ม response (SI > 6.5) จากการตรวจด้วยวิธี [³H]-thymidine -MLR [73]

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่รวบรวมการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวกับ MLR ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

ผู้ศึกษา (ปีที่ได้รับการ)	ประชากร	จำนวน	MLR (pre/post)	ตัวชี้วัด	Outcome	ผล
Nelson (1965)[67]	NA	11	pre	Reactivity ไม่บอกไว้	Rejection	correlated
Bach(1970)[68]	cadaveric	36	pre	%Transformation	CCr ที่ 1, 2 ปี	correlated
Cochrum KC (1974)[69]	Living และ cadaveric	211	pre	SI : hyper > 8 ,hypo < 8	Graft survival	correlated
Jone (1976)[74]	cadaveric	76	pre	RR	Rejection	Slight diff.
Ringden (1976)[75]	Living	45	post	RR	Rejection Graft survival	correlated
Thomsen (1977)[76]	Cadaveric	11	pre	RR : high > 50 RR : low	Rejection Graft loss	correlated
Cullen(1977) [49]	Cadaveric	40	pre	SI และ RR	Graft function	Not correlated
Cerilli J. (1980)[77]	Cadaveric และliving	81	Pre	SI: high Vs low	Rejection	Correlated
Hajek-Rosen (1984)[78]	Living และ cadaveric	21	pre	RR > 10% , RR< 10%	Rejection Function graft	correlated
Jeffery JR (1984)[79]	Cadaveric	95	Post	SI, absolute count, RR	Graft survial	Not correlated
Ghobrial II (1994)[80]	Cadaveric	19	Pre/post 3, 6 และ 12 เดือน	Donor-specific hyporesponsive และ persistent anti-donor response	SCr และ rejection ที่ 1 ปีหลังปลูก ถ่าย	Correlated
Kerman (1997)[70]	Cadaveric	115	Pre/serial post	SI : hyper>10, hypo<10	Graft survival 5 และ 10 ปี, graft rejection	Correlated
Kerman(1997) [81]	Living	95	Post	SI : hyper>10, hypo<10	Rejection graft survival	Correlated

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงข้อมูลที่รวบรวมการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวกับ MLR ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

ผู้ศึกษา (ปีที่ได้รับการ)	ประชากร	จำนวน	MLR (pre/post)	ตัวชี้วัด	Outcome	ผล
Creemers (1997)[71]	Cadaveric	37	Post ; sequential 0,1,3,6,12, 18 และ 24 mo	Hyporesponse หรือ hyperresponse	Rejection/ Functioning graft	correlated
EI Agroudy AE(2004)[72])	Living	477	Pre	RR > 4 RR < 4	Rejection Graft survival	correlated
Ferraris JR[73]	Living (เด็ก)	22	Post	SI < 6.5 SI > 6.5	GFR Rejection	correlated

คำย่อ RR = relative response, SI = stimulation index

เนื่องจากการศึกษาข้อมูล [³H]-Thymidine MLR เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง MLR กับ renal allograft rejection หรือ survival ทั้งใน cadaveric และ living kidney transplantation ที่ผ่านมามีความหลากหลาย และผลการศึกษาพบว่า MLR มีทั้งที่ความสัมพันธ์กับ renal outcome และ ไม่มีความสัมพันธ์กัน (ตารางที่7) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า MLR และ renal outcome มีความสัมพันธ์หรือไม่

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่แตกต่างกันก็มีผู้ที่จะอธิบายว่า วิธีการศึกษาที่ทำนั้นมีความแตกต่างกันเช่น ประชากรที่ศึกษา วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (จำนวนวัน จำนวนเซลล์ที่ใช้) วิธีการแปลและวิเคราะห์ข้อมูล ค่าที่ใช้ในการประเมิน เช่น Stimulation index, relative response รวมทั้งการแบ่งกลุ่มว่ากลุ่มใดเป็น hypo-responder หรือ hyper-responder นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจเพื่อวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ แต่เดิมใช้วิธี [³H]-Thymidine MLR ซึ่งมีผลเสียดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.9.2 การศึกษา mixed lymphocyte reaction-CFSE assay

ยังไม่มีการศึกษา MLR -CFSE assay ในผู้ป่วยที่ได้รับปลูกถ่ายไต แต่มีการศึกษาเฉพาะในกรณีของการปลูกถ่ายตับและการปลูกถ่ายลำไส้เล็กดังนี้

ศศ. 2005 Tanaka Y และคณะ [82] ได้ศึกษาผู้ป่วย 29 รายที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 12 รายที่มีการทำงานของตับแย่มากใน 6 เดือนภายหลังผ่าตัด ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการทำ liver biopsy และตรวจ MLR โดย CFSE assay ผลทางพยาธิวิทยารายงานว่าเกิดภาวะ acute rejection 8 ราย แต่กลับพบว่าผล stimulation index ของ CD8+ T cell ที่ได้จาก MLR โดย CFSE assay สูงเพียง 4 รายนั้น ซึ่งภายหลังได้มีการตรวจเพิ่มเติมกลับพบว่า ผู้ป่วย 8 ราย ที่วินิจฉัยว่าเกิดการปฏิเสธตับในตอนแรกนั้นมีการปฏิเสธตับจริงเพียง

ศศ. 2009 Ashokkumar และคณะ[83] ได้ศึกษาในผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการปลูกถ่ายตับจำนวน 77 ราย โดยผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการ induction ด้วย rabbit anti-human thymocyte globulin (rATG) และ ยาควบคุม steroid- free tacrolimus การศึกษานี้จะเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง MLR-CFSE ของ T-cell ทั้ง T-cytotoxic (Tc), T-helper (Th) และการเกิด acute cellular rejection โดยมีการศึกษาตั้งสมมุติฐานการทดลองว่า immunoreactivity index (IR) คือสัดส่วนการของเซลล์ที่แบ่งตัวเมื่อได้รับการกระตุ้น donor ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย third party หากค่า IR มากกว่า 1 แสดงว่า donor-specific alloreactivity ซึ่งน่าจะมีผลเพิ่มการเกิด rejection และหากค่า IR น้อยกว่า 1 แสดงว่า donor-specific hypoalloreactivity การเกิด rejection น่าจะน้อยในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยเกิด rejection 33 ราย และเมื่อเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่มี rejection และ ไม่มี rejection พบว่ากลุ่มที่ rejection จะมี IR ของ Tc และ Th ที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มี rejection อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8)

นอกจากนี้เมื่อนำเอาค่า IR ที่ได้ไปสร้างและวิเคราะห์ Receiver operating characteristic (ROC) พบว่า ROC IR ของ T-cell ที่ค่า 0.914 จะมีความไวในการวินิจฉัยโรค (sensitivity) ร้อยละ 75 ความจำเพาะในการวินิจฉัยโรค (specificity) ร้อยละ 88 ส่วน IR ของ Th จะไม่สามารถแยกโรคได้

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจวิธี MLR-CFSE ในผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการปลูกถ่ายตับหลังเพาะเลี้ยงเซลล์ 3- 4 วัน

T-helper cell				
	Alone	SD	TD	IR
Non rejectors N= 45	6 ± 117	193 ± 326	601 ± 390	0.484 ± 0.122
Rejectors N= 32	12±15	640 ± 235	463 ± 230	1.436 ± 0.654
p-value	NS	NS	NS	0.003
T-cytotoxic cell				
	Alone	SD	TD	IR
Non rejectors N= 45	25 ± 503	220 ± 384	561 ± 586	0.536 ± 0.105
Rejectors N= 32	25 ± 15	449 ± 182	256 ± 188	1.294 ± 0.244
p-value	NS	NS	NS	0.001

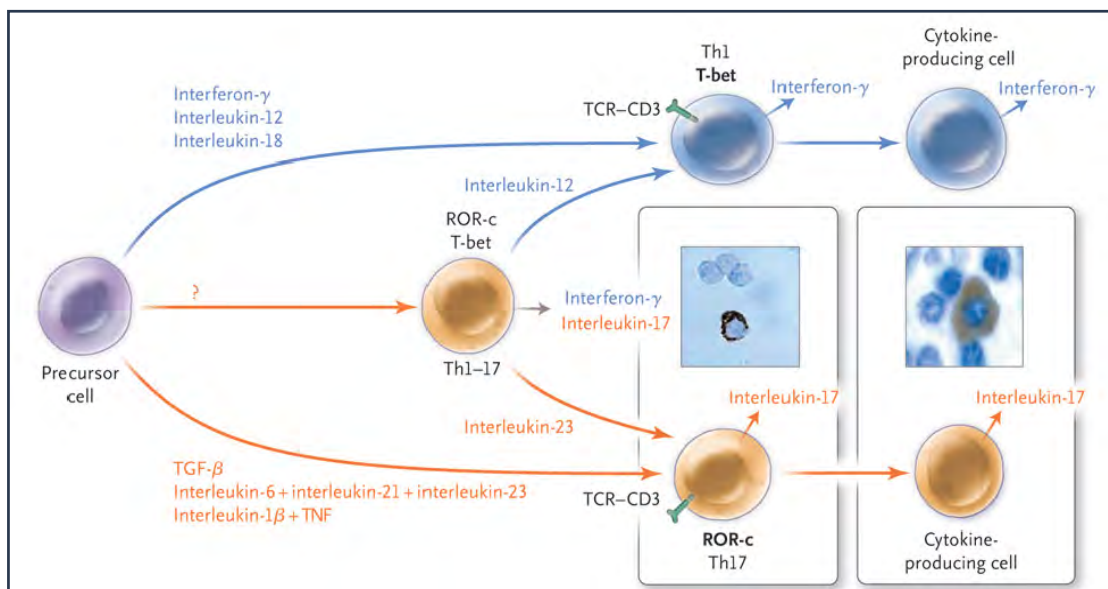
คำย่อ : Alone คือการแบ่งตัวของเซลล์ recipient, SD คือการแบ่งตัวของเซลล์ recipient ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย donor, TD คือการแบ่งตัวของเซลล์ recipient ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย third party, IR คือ immunoreactivity index (IR เท่ากับสัดส่วนของ SDหารด้วย TD)

คศ. 2010 Ashokkumar และคณะ[84] ได้ศึกษา MLR-CFSE เพิ่มเติมในผู้ป่วยเด็กที่ทำการปลูกถ่ายลำไส้เล็ก จำนวน 28 ราย โดยมีเทคนิคและสมมุติฐานเหมือนกับการศึกษาที่กล่าวมา พบว่าผู้ป่วยที่มี rejection จะมีค่าแบ่งตัวของเซลล์ หรือ IR ที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มี rejection อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำเอาค่า IR ที่ได้ไปสร้างและวิเคราะห์ receiver operating characteristic (ROC) พบว่า ROC IR ของ Tc ที่ค่า 1.026 จะมีความไวในการวินิจฉัยโรค (sensitivity) มากกว่าร้อยละ 87.5 ความจำเพาะในการวินิจฉัยโรค (specificity) มากกว่าร้อยละ 83.3

จากทั้ง 2 การศึกษานี้ สรุปว่าการตรวจวิธี MLR-CFSE เพื่อประเมิน alloresponse ของ T-cell น่าจะเป็นเครื่องมือที่ช่วยบ่งชี้การเกิด rejection ทั้งในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนตับและลำไส้เล็กได้

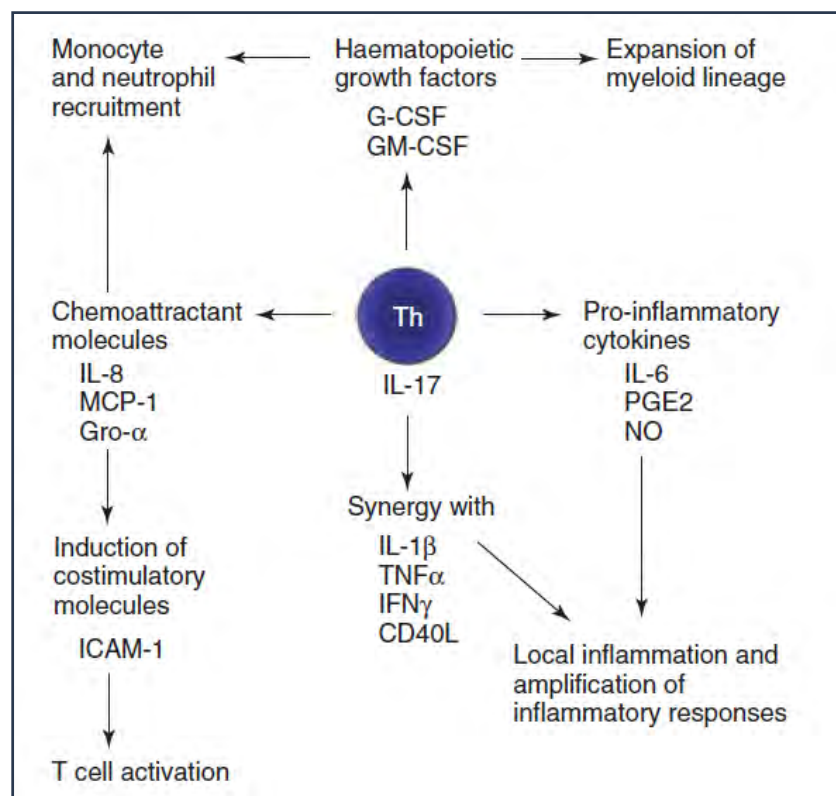
2.9.3 การศึกษาเกี่ยวกับ IL-17 และการปลูกถ่ายไต [85]

Interleukin 17 จัดว่าเป็น pro-inflammatory mediator เป็นสมาชิก IL-17 family ถูกกล่าวถึงในครั้งแรกว่าถูกสร้างจาก activated และ memory CD4+ T cells พบว่า receptor ของ IL-17 มีอยู่ในหลายอวัยวะ นอกจาก CD4 T-cell แล้ว CD8+ memory T cells, eosinophils, neutrophils และ monocytes ยังสามารถสร้าง IL-17 ได้ แต่อย่างไรก็ตาม CD4 T-cell (Th1-17) ยังเป็นตัวหลักในการสร้าง IL-17 โดย Key cytokine ที่ใช้ในการพัฒนาเป็น Th17 คือ transforming growth factor β (TGF- β), IL-6, IL-21 และ inflammatory cytokine เช่น IL-1, IL-23 (รูปที่ 43)



รูปที่ 43 แสดงการ differentiation of human Th17 cells[86].

พบว่า IL-17 ออกฤทธิ์หลายกลไก (รูปที่ 44) กระตุ้นการสร้าง IL-6, nitric oxide (NO) และ prostaglandin E2 (PGE2) นอกจากนี้ยังทำงานร่วมกับ inflammatory marker อื่นๆ เช่น IL-1b, tumour necrosis factor (TNF)-alpha และ IFN-gamma มีผลทำให้ neutrophil และ monocytes เข้ามาบริเวณทำให้เกิดขบวนการอักเสบเกิดขึ้น จากการข้อมูลในมนุษย์พบว่า IL-17 มีความสำคัญที่เป็นส่วนในการเกิดขบวนการ inflammation และโรค autoimmune



รูปที่ 44 แสดงบทบาทการทำงานของ pro-inflammatory ;IL-17

Loong และคณะ [87] ทำการศึกษาในหนู (acute rat rejection model) ว่าการ expression ของ IL-17 ของ mononuclear cell มีความสัมพันธ์ (correlation) กับภาวะ acute rejection หรือไม่ โดยทำ serial biopsy และตรวจดู expression ของ IL-17 ใน mononuclear cell พบว่าการเพิ่ม expression ของ IL-17 มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาตาม Banff classification ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวเห็นตั้งแต่วันที่ 2 นอกจากนี้ยังศึกษาในคนโดยการวัดปริมาณ IL-17 ในปัสสาวะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มี Subclinical rejection และผู้ป่วยที่ไม่มี rejection พบว่าผู้ป่วยที่มี subclinical rejection มีการเพิ่มขึ้นของ IL-17 ในปัสสาวะทุกราย ซึ่งการศึกษานี้สรุปว่า IL-17 น่าจะเป็น early inflammatory cytokine ที่อาจจะช่วยให้คิดถึงภาวะ rejection

Vanaudenaerde BM และคณะ [88] ได้ศึกษาในผู้ป่วย lung transplantation โดยพบว่าผู้ป่วยจำนวน 9 ใน 26 รายที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจาก transbronchial biopsy ผู้ป่วยทุกรายที่มี acute rejection จะมีการเพิ่มขึ้นของ IL-17 mRNA และ protein ใน bronchoalveolar lavage (BAL) และเมื่อติดตามไปที่เวลา 90 วันหลังการผ่าตัด lung transplantation แม้ว่าจะยังมี neutrophil และ monocyte ใน BAL แต่ปริมาณ IL-17 mRNA และ protein น้อยมาก จากการศึกษาข้างนี้บ่งชี้ว่าการเพิ่มขึ้นของ IL-17 mRNA และ protein เกิดขึ้นในช่วงเวลาการเกิด rejection เท่านั้น

Emilio Fabrega และคณะ [89] ได้ศึกษาในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายตับโดยวัดระดับ IL-17 และ IL23 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยที่มี acute hepatic rejection จำนวน 50 ราย และไม่มี rejection จำนวน 50 ราย พบว่าระดับ IL-17 และ IL-23 มีค่าสูงกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้สรุปว่า Th17 น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกิด liver rejection

J.C.O. Crispim และคณะ [90] ได้ศึกษาในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตจำนวน 19 ราย โดยมีผู้ป่วยที่มีภาวะ acute allograft rejection จากผลพยาธิวิทยา 9 ราย และไม่มี allograft rejection 10 ราย เปรียบเทียบกับคนปกติ (healthy) พบว่าในผู้ป่วยที่มี acute allograft rejection มีปริมาณความเข้มข้นของ IL-17 ในเลือดสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี allograft rejection อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าในกลุ่มคนปกติ (healthy) จะไม่สามารถตรวจพบ IL-17 ในเลือด

จากการทบทวนข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สรุปได้ว่าการประเมินด้าน immune response ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตมีความสำคัญ โดยมีประโยชน์ในการบ่งชี้โอกาสการเกิดและวินิจฉัยการเกิด rejection ซึ่งนำไปสู่การปรับยาตามภูมิคุ้มกันให้เหมาะสม ไม่มากจนเกิดผลข้างเคียง หรือไม่น้อยไปจนเกิดภาวะ rejection การประเมิน immune นั้นมีหลายวิธี แต่ไม่มีการตรวจด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งที่จะสามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่า T-cell เป็นเหมือนจุดศูนย์กลางของกลไกการเกิด rejection ดังนั้นการทดสอบการทำงานของ T-cell น่าจะมีเครื่องมือที่ดีที่จะบอกภาวะ immune ได้ การทดสอบการทำงานของ T-cell ต้องคำนึงถึงสิ่งที่สำคัญว่า T-cell จะมีการทำงานในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน ผ่าน 2 กลไกคือ direct และ indirect pathway นอกจากการประเมิน T-cell function แล้วการประเมินการวัดไซโตไคน์ก็มีความสำคัญ โดยเฉพาะ IL-17 ที่ปัจจุบันได้รับความสนใจที่ศึกษาบทบาทและหน้าที่ต่อการเกิด rejection

การตรวจ MLR เพื่อประเมิน immune response ในอดีตมีการศึกษามากมาย แต่ผลที่ได้มีความแตกต่างกันดังที่กล่าวมา บางการศึกษาพบว่า MLR ที่สูง จะส่งผลต่อการเกิด rejection และทำให้การทำงานของไตที่แย่งลง แต่บางการศึกษาก็ไม่พบความสัมพันธ์นี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการศึกษาแต่เดิมใช้โดย ³H-thymidine-MLR ซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ จนกระทั่งมีการตรวจ MLR -CFSE assay ทำให้ผลมีความแม่นยำขึ้น และเมื่อศึกษาวิธี MLR-CFSE ที่ทำศึกษาในผู้ป่วยปลูกถ่ายตับและลำไส้เล็ก ผลพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างดี

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง CFSE- MLR assay และ supernatant IL-17 กับ renal allograft outcome จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ MLR-CFSE assay และ supernatant IL-17 ในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตและ renal allograft outcome

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (research design)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ Descriptive, retrospective study

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (research methodology)

3.2.1) ประชากรที่ศึกษา

ประชากร (population) คือผู้ป่วยไทยอายุมากกว่า 18 ปีที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือผู้ป่วยไทย อายุมากกว่า 18 ปี ที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิต (living kidney transplantation) ที่แผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.2.2) กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา

1. ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่มีอายุมากกว่า 18 ปี
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตชนิด living kidney transplantation ที่แผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. ตรวจติดตามการรักษาที่แผนกโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
4. มีแฟ้มประวัติการผ่าตัดและข้อมูลการตรวจรักษาที่สามารถค้นได้
5. สามารถติดต่อให้ผู้บริจาคไตมาตรวจเลือดพร้อมกับผู้ป่วย

3.2.3) กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากศึกษา

1. มีประวัติการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุการลดลงของการทำงานของไต เช่น การติดเชื้อไวรัส CMV หรือ BK การติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นๆหายๆ
2. มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไตและอวัยวะที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีผลลดการทำงานของไต ของ เช่น การตีบของหลอดเลือดแดงของไต (renal artery stenosis) หรือ การตีบของหลอดไต (ureteric sticture)
3. มีการเกิด recurrent หรือ De-novo glomerular disease ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการลดลงของการทำงานของไต

3.3) คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย

Proliferation index (%) คือปริมาณการแบ่งตัวของ T-cell lymphocyte ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้การวิเคราะห์ข้อมูลจากโปรแกรม FLOWJO

Stimulation index (SI) เป็นการคำนวณโดยนำค่าเปอร์เซ็นต์ proliferation index ของ lymphocyte ผู้ป่วยซึ่งได้รับกระตุ้นด้วย donor lymphocyte ที่ผ่านการฉายแสงแล้วหารด้วย % proliferation index ของ lymphocyte ผู้ป่วยที่ไม่ได้ใส่ donor lymphocyte ไปกระตุ้น (ดังสมการ)

$$SI = \frac{\% \text{ Proliferation index ของ recipient PBMCs ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย donor cell}}{\% \text{ Proliferation index ของ recipient PBMCs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น}}$$

3.4) การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size determination)

ยังไม่มีการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อน เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของ GFR และค่า stimulation index ดังนั้นจึงคำนวณจำนวนขนาดตัวอย่างจากการหาค่าความสัมพันธ์ค่าเดียว (A single correlation) สามารถคำนวณจากสมการ $N = [(Z\alpha + Z\beta) / C(r)]^2 + 3$

กำหนดให้ N = ขนาดตัวอย่าง

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

$Z\beta$ = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดให้ type II

error = 10% หรือ power เท่ากับ 90 %, จะได้ค่า $Z\beta$ มีค่าเท่ากับ 1.28

ทางผู้วิจัยได้กำหนดค่าความสัมพันธ์ $r = 0.7$ ถือว่าเป็นค่าที่มีความสำคัญทางคลินิก,

จากสมการดังกล่าว N จากการคำนวณจะได้ = 17

ดังนั้นต้องใช้จำนวนผู้ป่วยในการศึกษาเท่ากับ 20 ราย

3.5) การสังเกตและการวัด

3.5.1) ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ สาเหตุของไตวายเรื้อรัง โรคที่พบร่วม ผลการตรวจ HLA mismatch, ค่าเปอร์เซ็นต์ panel reactive antibody (PRA), donor specific antibody (DSA) ระยะเวลาที่ทำกรปลูกถ่ายไต ผลตรวจชิ้นเนื้อ และชนิดของยากดภูมิคุ้มกัน

3.5.2) ข้อมูลที่ศึกษา ได้แก่

ค่าเปอร์เซ็นต์ Proliferation จากการตรวจวัดวิธี flow cytometry

ปริมาณเปอร์เซ็นต์ CD4 และ CD8, อัตราส่วน CD4/CD8

ปริมาณความเข้มข้นของ supernatant interleukin 17 จาก MLR-CFSE จากการด้วยวิธี ELISA (R&D Systems Europe, DY317, Abingdon, United Kingdom)

Serum creatinine

Estimate GFR ด้วยการคำนวณจาก MDRD equation

สมการที่ใช้คำนวณ Estimated glomerular filtration rate (eGFR) (หน่วย mL/min/1.73 m²)

$$\begin{aligned} & \text{วิธี re-express MDRD equation}^{(13)} \text{ (สำหรับค่า creatinine จากวิธี Enzymatic assay)} \\ & = 175 \times (0.95 \times S.Cr)^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (for woman)} \times 1.212 \text{ (if black)} \end{aligned}$$

3.6) การดำเนินงานวิจัย

3.6.1) ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

ก. ทำการค้นหารายชื่อผู้ป่วยที่มีทำการผ่าตัดปลูกถ่ายไตชนิดผู้บริจาคมีชีวิต ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และปัจจุบันยังคงติดตามการรักษา ตั้งแต่ 1 มกราคม พศ.2529 จนถึง 31 ธันวาคม พศ.2553 รวมเป็นระยะเวลา 25 ปี

ข. จากนั้นจึงนำรายชื่อดังกล่าวมาทำการค้นหาแฟ้มประวัติผู้ป่วยจากหน่วยไตเพื่อนำมาศึกษาข้อมูลและเก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยแต่ละคนในรูปแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลโดยผู้ป่วยที่จะได้รับพิจารณาให้เข้าการวิจัยนี้จะต้องมีคุณสมบัติตาม กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา

ค. ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตจะได้รับข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยเพื่อเข้าร่วมโครงการ โดยผู้วิจัยจะโทรศัพท์ไปติดต่อผู้ป่วยและผู้บริจาคไตถึงรายละเอียดและวิธีการตรวจ หรือคุยกับผู้ป่วยเกี่ยวกับงานวิจัยในช่วงที่มาติดตามการรักษาไว้ก่อน ซึ่งหากผู้ป่วยและผู้บริจาคไตมีความประสงค์ที่จะเข้าร่วมโครงการ ทางผู้วิจัยจะนัดหมายวันและเวลาไปที่หน่วยไต ตึกกสิกร รพ.จุฬาลงกรณ์ แล้วให้รายละเอียดข้อมูล ตอบคำถามที่สงสัยอีกครั้ง ถ้าผู้ป่วยผู้บริจาคไตยินยอมเข้าร่วมโครงการก็จะมีกรลงชื่อในเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ง. ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ จะได้รับการเจาะเลือดประมาณ 40 ซีซี แบ่งใส่หลอด ACD ทั้งหมด 4 หลอด แล้วนำไปปั่นเพื่อแยก PBMC ต่อไป

3.6.2) เครื่องมือที่ใช้ในการวัด เป็นการตรวจวิธี MLR โดยวิธีการดังนี้

ขั้นตอนการแยกเซลล์ Peripheral blood mononuclear cell (PBMCs)

- ก. ปั่นเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคจากเลือดตั้งต้น 40 มล. (ACD blood) ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 5 นาที ที่อุณหภูมิ 22 °C
- ข. ดูดชั้น buffy coat มาเจือจางด้วย RPMI1640 (RPMI1640+Antibiotics+HEPES 5 ml) ให้ได้อัตราส่วน buffy coat ต่อ RPMI1640 ประมาณ 1:2 ถึง 1:3 จนได้ปริมาตรรวม 40 มล.
- ค. นำ buffy coat ที่เจือจางด้วย RPMI 1640 แล้วมา overlayer บน isoprep 3 มล ที่เทใส่เตรียมไว้ในหลอด ปริมาตร 15 มล โดยเติมหลอดละ 10 มล ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 13 มล จากนั้นนำไปปั่น 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที brake 0 ที่อุณหภูมิ 22 °C
- ง. เมื่อครบเวลาแล้วจะได้ชั้นของ PBMC ที่มีลักษณะสีขาวขุ่นซึ่งลอยอยู่บนชั้นของ Isoprep

- จ. จากนั้นดูดชั้นของ PBMC ที่แยกได้ใส่ลงในหลอดปริมาตร 15 มล แล้วเจือจางด้วย RPMI 1640 ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 13 มล นำไปปั่น 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 5 ที่อุณหภูมิ 22°C
- ฉ. เมื่อครบเวลาแล้วจะได้ PBMC เกาะติดที่ก้นหลอด ให้เททิ้งส่วนของ supernatant ไปแล้วเติม 10% RPMI1640 (Antibiotics+HEPES 5mL+FBS 10mL) 10 มล แล้วนับเซลล์ทั้งหมด
- ช. นำเซลล์ของผู้บริจาคที่ได้ไปฉายแสงที่ความยาวคลื่น 3,000 rad

หมายเหตุ เซลล์ของผู้ป่วยไม่ต้องนำไปฉายแสง

วิธีการเตรียม PHA/Ionomycin เตรียม PHA/I ใน 10% RPMI1640 ปริมาณ 3 มล

- PHA 15 ไมโครลิตร
- Ionomycin 120 ไมโครลิตร
- 10%RPMI1640 3 มล

วิธีการเตรียม CFSE dye

- ก. นำ CFSE stock 10 nM มาทำให้เจือจางโดยใช้ DMSO 90 µl จะได้ความเข้มข้นที่ 20,000x
- ข. จากนั้นแบ่งเก็บไว้สำหรับการย้อมเซลล์ (working concentration) หลอดละ 5 ไมโครลิตร
- ค. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เก็บได้นาน 6 เดือน

วิธีการเตรียม CD4/CD8 monoclonal antibody ใช้สำหรับตรวจแยก T-cell

(ได้ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร)

- ผสมสาร PBS 420 ไมโครลิตร
- CD4 APC 20 ไมโครลิตร
- CD8 Percp 60 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการแยกเซลล์เตรียม pool donor ในการทำ mixed lymphocyte culture

ก. นำเลือดของผู้บริจาครวมได้จากอาสาสมัครจำนวน 10 คน คนละประมาณ 40 มล แบ่งเป็น 4 หลอด (ACD blood) –ขั้นตอนการแยกเซลล์จะเหมือนกับดังที่กล่าวข้างต้น แต่ขั้นตอนสุดท้ายจะเติม 10%RPMI1640 หลอดละ 2 มล/1คน

ข. นำเซลล์ไปฉายแสงที่ 2000 rad เนื่องจากได้มีการทดสอบก่อนที่จะทำ MLR ในงานวิจัย พบว่าที่ความเข้มแสง 2000 rad มีการแบ่งตัวมากกว่าที่ความเข้ม 3000 rad และเนื่องจาก pool donor จะเป็นเซลล์ที่ต้องเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว หากจะนำเซลล์มาใช้จะต้องมีการเตรียมอีกครั้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกฉายแสง pool donor ที่ความเข้ม 2000 rad (เป็นค่าที่ต่ำกว่าที่ฉายแสงใน specific donor ที่ฉายแสง 3000 rad)

- ค. รวมเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอด 50 มล ซึ่งจะได้ปริมาตรรวม 20 มล

ง. นำไปปั่นตก 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 9 อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลาเท supernatant ที่

จ. เติม 10%RPMI1640 20 มล แล้วแบ่งมานับโดยวิธีการนับเซลล์จะใช้ trypanblue 190 μ l ผสมกับ เซลล์ 10 ไมโครลิตร แล้ว นำไปปั่นตก 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 9 อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบ เวลาเท supernatant ที่

ฉ. เติม FCS 20 มล แล้วแช่ในน้ำแข็งเพื่อเตรียมผสม cryopreserve

ช. วิธีการเตรียม Cryopreserve จะใช้ DMSO 1 มล ผสมกับ FCS 4 มล (ได้ความเข้มข้น 20 % DMSO) จากนั้นนำไปผสมกับเซลล์ในข้อ 4 ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน (สุดท้ายจะได้ความเข้มข้นเป็น 10 % DMSO)

ซ. แบ่งเก็บเซลล์ใน Cryotube หลอดละ (1.5 มล ต่อ 5 ล้านเซลล์) แล้วนำไปแช่แข็งในตู้ - 80 °C ซักมคืน แล้วนำไปเก็บในตู้ไนโตรเจนเหลว รอการใช้งาน

เมื่อจะใช้เซลล์ pool donor ในการทำ MLR มีขั้นตอนเตรียมดังนี้

- ให้นำเอา cryotube ที่แช่แข็งไว้ เก็บในกล่องน้ำแข็งในระหว่างการ transfer
- นำมาแช่ใน water bath 37 °C จนเห็นเป็นวุ้น
- นำเซลล์ที่ได้ใส่ใน sterile tube 50 มล
- เติม 10%RPMI1640 ให้ได้ปริมาตรรวม 30 มล
- นำไปปั่นตก 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 9 อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลาเท ส่วน supernatant ที่
- เติม 10%RPMI1640 2 มล แล้วนำไปเก็บที่ตู้ incubator 37 °C, 5%CO₂ เป็นเวลา 1 ชม
- นำมานับเซลล์ แล้วแบ่งมา 1 ล้านเซลล์ dilute ด้วย 10%RPMI 1640 1 มล.เพื่อใช้เติมใน การทำ MLR 100 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วย CFSE และขั้นตอนการทำ mixed lymphocyte culture

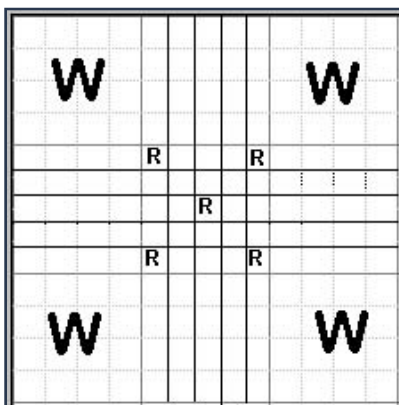
ก. นำ PBMCs ของผู้ป่วยและผู้บริจาคที่ผ่านการฉายแสง 3,000rad ที่เตรียมไว้ไปปั่นตกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที brake 9 เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C ครั้งที่ 1 เมื่อครบเวลาเท supernatant ที่

ข. เติม 10% RPMI1640 (Antibiotics+HEPES 5 ml+FBS 10 ml) ปริมาตร 2 มล แล้วแบ่งมา10 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการนับเซลล์ทั้งหมดใน 4 ช่องของ WBC (รูปที่ 43)

วิธีการนับเซลล์ใช้ trypanblue 190 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ 10 ไมโครลิตร

สูตรคำนวณเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \frac{\text{เซลล์ที่นับได้} \times \text{dilution factor } (20) \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับเซลล์ } (4)}$$



รูปที่ 45 แสดงตำแหน่งการนับเซลล์ในช่องของred blood cell บน hemocytometer

- ค. แบ่งเซลล์ของผู้บริจาคจำนวน 2×10^6 เซลล์ โดยการคำนวณจากปริมาณที่นับได้ เก็บรอไว้ที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\%\text{CO}_2$ ใน $10\%\text{RPMI } 1640$ เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับเซลล์ของผู้ป่วย (MLR) ที่ถูกยับยั้งด้วยสีย้อม CFSE ต่อไป
- ง. นำเซลล์ที่เหลือ นำไปปั่นตก 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 9 อุณหภูมิ 4°C ครั้งที่ 2 เมื่อครบเวลาเท supernatant ทิ้ง แล้วทำให้เซลล์กระจายออก
- จ. เติมน้ำ PBS 5 มล นำไปปั่นตก 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที brake 9 อุณหภูมิ 4°C ครั้งที่ 3 เมื่อครบเวลาเท supernatant ทิ้ง
- ฉ. เติมน้ำ PBS ให้มีปริมาณที่ dilute เซลล์ 1 มล. ต่อ 5×10^6 เซลล์
- ช. นำเซลล์ของผู้ป่วยและเซลล์ของผู้บริจาคผ่านการฉายแสง ที่ละลายด้วย PBS 1 มล. มาย้อมด้วยสีย้อม CFSE โดยใช้สีย้อม CFSE 10 ไมโครลิตร (ตั้งวิธีเตรียมข้างต้น)
- ซ. นำเซลล์ไป vortex เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วก็หยุดปฏิกิริยากับการเติม FCS 200 ไมโครลิตร
- ฅ. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C
- ญ. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติมน้ำ PBS 1 มล. นำไปปั่นล้างที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C
- ฎ. ทิ้ง supernatant จากทำให้เซลล์กระจายออกพร้อมทั้งเติม $10\%\text{ RPMI } 1640$ 1 มล.

- ฎ. นับเซลล์ทั้งหมดหลังจากการย้อม CFSE แบ่งมา 10 ไมโครลิตร เพื่อใช้นับใน 4 ช่องของ WBC (ดังรูป43) จากนั้นคำนวณเซลล์ทั้งหมดที่นับได้
- ฐ. แบ่งเซลล์ผู้ป่วยและเซลล์ของผู้บริจาคผ่านการฉายแสงมา 2×10^6 เซลล์แล้วเจือจางด้วย 10% RPMI1640 2 มล. ที่เตรียมไว้ (1 ล้านเซลล์/มล) เพื่อใช้ในการตรวจ control และ MLR โดยแบ่งกลุ่มการตรวจดังนี้

กลุ่มเปรียบเทียบมี 4 กลุ่มย่อย

- | | | |
|------|---|--------|
| I. | Recipient PBMCs ^{CFSE} 10^5 cell in 100 uL | 3 หลุม |
| II. | Donor PBMCs ^{irradiate} 10^5 cell in 100 uL | 3 หลุม |
| III. | Recipient PBMCs ^{CFSE} 10^5 cell in 100 uL+ PHA/I 100 uL | 3 หลุม |
| IV. | Donor PBMCs ^{irradiate} 10^5 cell in 100 uL + PHA/I 100 uL | 3 หลุม |

กลุ่ม MLR มี 2 กลุ่มย่อย

- | | | |
|-----|--|--------|
| I. | Recipient PBMCs 10^5 cell in 100 uL+ | |
| | Donor PBMCs ^{irradiate} 10^5 cell in 100 uL | 3 หลุม |
| II. | Recipient PBMCs 10^5 cell in 100 uL+ | |
| | Pool donor cell ^{irradiate} 10^5 cell in 100 uL | 3 หลุม |

- ฑ. จากนั้นนำเซลล์ที่เตรียมได้มาเติมลงใน 96 well -U plate จำนวน 2 plate ดังรายละเอียดดังนี้

Plate 1 เป็นเซลล์สำหรับ control ของผู้ป่วยและผู้บริจาคโดยการ 10^5 เซลล์ (100 ไมโครลิตร) รวมกับไม่ได้เติมสารกระตุ้น โดยเติม 10% RPMI1640 100 ไมโครลิตร และที่เติมสารกระตุ้นโดยการเติม PHA/I 100 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร/หลุม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน control plate













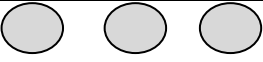
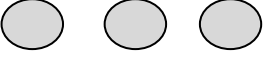
Control plate	Day4		
Recipient PBMCs			
Donor irradiated PBMCs			
Recipient PBMCs with PHA/I (stimulant agent ; positive control)			
Donor irradiated PBMCs + PHA/I (stimulant agent ; positive control)			

Plate 2 เป็นเซลล์ที่นำมาทำปฏิกิริยา MLR โดยจะใช้เซลล์ของผู้ป่วย 10^5 เซลล์ร่วมกับเซลล์ของผู้บริจาคที่ถูกฉายแสง 10^5 เซลล์ และใช้เซลล์ของผู้ป่วย 10^5 เซลล์ร่วมกับเซลล์ของ pool donor ที่เตรียมไว้ 10^5 เซลล์ (อัตราส่วน 1:1) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C และมี $5\%\text{CO}_2$ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน MLR plate

MLR plate	Day 4
Co-culture : Recipient PBMCs with specific donor irradiated PBMCs	
Co-culture : Recipient PBMCs with pool donor irradiated PBMCs	

ค. เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 วันแล้ว ก็ทำงานเก็บแยกเซลล์ (harvest)

ขั้นตอนการเก็บเซลล์ที่ทำปฏิกิริยา MLR

Plate 1 : Control

- Mixed cell ใน 96 U-plate แล้วดูดเซลล์ทั้งหมดจาก 3 หลุมที่ได้ นำมารวมกัน 1 หลอด แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C เก็บ supernatant ไปวัดความเข้มข้นของ IL17 โดย ELISA test
- นำส่วนที่เหลือเติม PBS ประมาณ 1-1.5 มล แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C เท supernatant ทิ้ง
- เติม 1%PFA 50 ไมโครลิตร แล้วห่อฟอลซ์ออลูมิเนียม แล้วนำไปวัด T-cell proliferation ด้วยเครื่อง multicolor flow cytometry

Plate 2 : MLR

- Mixed cell ดูดเซลล์จาก 96 U bottom-plate ทั้ง 3 หลุม มาลงใน 96 V bottom-plate แล้วนำไปปั่น 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลา นำไปเก็บ supernatant ไปวัดความเข้มข้นของ IL17 โดย ELISA test
- นำส่วนที่เหลือจากข้อ 1 นำไปปั่น 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลา เติมน้ำ supernatant ทิ้ง นำ plate ไป vortex จนไม่เห็นตะกอนสีขาวที่ก้นหลุม แล้วดูดเซลล์มารวมกันใน 1 หลุม
- นำไปย้อมด้วยการเติม CD4/CD8 ที่ผสมไว้ลงในหลุมลง 50 ไมโครลิตร ห่อฟอลซ์ออลูมิเนียม แล้วนำไปเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

4. เมื่อครบเวลาเติม FACS 150 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม แล้วนำไปปั่น 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลานำไปเคาะทิ้งส่วน supernatant
5. นำ plate ไป vortex จนไม่เห็นตะกอนสีขาวที่ก้นหลุม
6. เติม 1% PFA 100 ไมโครลิตร จากนั้นเปลี่ยนไปใส่หลอดขนาด 2 มล แล้วห่อฟอลด์ออลูมิเนียมแล้วนำไปวัด T-cell proliferation ด้วยเครื่อง multicolor flow cytometry
7. นำผลที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FLOWJO ซึ่งผลจะแสดงเป็นค่า proliferation index แล้วจะนำไปคำนวณค่า stimulation index (SI)

3.7) การเก็บรวบรวมข้อมูล (data collection)

ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูล ตามแบบฟอร์มการบันทึกข้อมูล และตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูลเพื่อให้ได้ครบถ้วนตามจำนวนที่ต้องการและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.8) การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม software SPSS version 16

ข้อมูลที่มีลักษณะการกระจายของข้อมูลแบบ normal distribution จะถูกแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบน (standard deviation) และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้ student T-tests ค่า p value <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติข้อมูลที่ต้องการดูความสัมพันธ์จะแสดงเป็น pearson's correlation

ส่วนข้อมูลที่มีลักษณะเป็น quantitative variables ที่มีการกระจายของข้อมูลแบบ non-normal distribution จะถูกแสดงในรูปของค่ากลาง (median) และช่วงระหว่าง (range) และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้ Mann-Whitney U test ค่า p value <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติข้อมูลที่ต้องการดูความสัมพันธ์จะแสดงเป็น spearman's correlation

ข้อมูลที่มีลักษณะเป็น qualitative variables จะถูกแสดงในรูปของความถี่ (frequency) และสัดส่วน (percentage) และนำมาเปรียบเทียบโดยใช้ Pearson chi-square test หรือ Fisher exact test ตามความเหมาะสม ค่า p value <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติข้อมูล

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลพื้นฐาน

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมงานวิจัยมีจำนวนทั้งหมด 22 ราย มีเพศชายจำนวน 10 ราย (ร้อยละ 45.5) และเพศหญิงจำนวน 12 ราย (ร้อยละ 54.5) ผู้ป่วยมีอายุระหว่าง 21.8 ปี ถึง 70 ปี โดยอายุเฉลี่ยเท่ากับ 52.9 ± 12.4 ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่ 19 ราย (ร้อยละ 86.4) ได้รับการบริจาคไตจากญาติ (living related donor) และผู้ป่วย 3 ราย (ร้อยละ 13.4) ที่ได้รับไตจากคู่สามีภรรยา ข้อมูล HLA mismatch พบว่าร้อยละ 22.7 มี HLA mismatch เท่ากับศูนย์ (0 MM), ร้อยละ 36.4 มี 3 HLA mismatch, ร้อยละ 13.6 มี HLA mismatch เท่ากับ 5 พบว่าระยะเวลาหลังการปลูกถ่ายไตเฉลี่ยทั้งหมด 7.46 ± 3.75 ปี (ตารางที่ 1)

สาเหตุของการเกิดโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ที่พบมากที่สุดคือ diabetic nephropathy ร้อยละ 18.2, รองลงมาได้แก่ IgA nephropathy ร้อยละ 9.1 นอกจากนี้ยังพบสาเหตุ ESRD จากโรคความดันโลหิตสูง, primary FSGS, ADPKD, chronic glomerulonephritis โดยแต่ละสาเหตุพบร้อยละ 4.5 และมีผู้ป่วยจำนวนร้อยละ 54.5 ที่ไม่ทราบสาเหตุของ ESRD

จากผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 22 ราย มีผู้ป่วยจำนวน 15 รายไม่เคยมีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไต (เนื่องจากผู้ป่วยในกลุ่มนี้ไม่ได้รับการทำ protocol biopsy อย่างไรก็ตามผู้ป่วยทั้ง 15 รายในการศึกษานี้ไม่มีอาการแสดงทางคลินิกที่บ่งชี้ถึงภาวะปฏิเสธไตในระหว่างการตรวจติดตาม) และมีผู้ป่วยจำนวน 7 รายที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไต (รายละเอียดตารางที่ 12) ผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตทุกรายมีผลการตรวจทางพยาธิวิทยา ยืนยันทั้ง acute allograft rejection และ chronic allograft rejection มีผู้ป่วยจำนวน 5 รายที่เกิดภาวะปฏิเสธไต 1 ครั้ง และผู้ป่วย 2 รายที่เกิดภาวะปฏิเสธไต 2 ครั้ง ผู้ป่วยจำนวน 3 รายที่เกิดปฏิเสธไตแบบ antibody-mediated rejection (AbMR) และมีผู้ป่วยจำนวน 3 รายที่เกิดปฏิเสธไตแบบ acute cellular rejection โดยมีจำนวน 1 รายที่เกิด antibody-mediated rejection ร่วมกับ acute cellular rejection ระยะเวลาที่เกิดภาวะปฏิเสธไตจนถึงเข้าร่วมงานวิจัยอยู่ระหว่าง 0 หรือ เกิดภาวะปฏิเสธไตในช่วงเวลาที่เข้าร่วมงานวิจัยถึง 120 เดือน โดยระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ (mean \pm SD) 23.9 ± 43.4 ปี ผู้ป่วย 1 รายมีภาวะ acute allograft rejection ระหว่างเข้าร่วมการศึกษา (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยที่เข้าการศึกษา

Patient demographic	results
Age (yrs): mean \pm SD	52.9 \pm 12.4
Sex: male/female	10/12
Mean of HLA MM: mean \pm SD	2.3 \pm 1.5
Number of HLA MM: case (%)	
• 0	5 (22.7)
• 1	0
• 2	6(27.3)
• 3	8(36.4)
• 4	0
• 5	3(13.6)
Transplant vintage (yrs): mean \pm SD	7.4 \pm 3.7
History of biopsy proven rejection/non rejection:(case/case)	7/15
Casue of ESRD: case (%)	
• Diabetic nephropathy	4(18.2)
• IgA nephropathy	2(9.1)
• Hypertensive nephropathy	1(4.5)
• Primary FSGS	1(4.5)
• Presumptive CGN	1(4.5)
• ADPKD	1(4.5)
• Unknown cause	12(54.5)

ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดของการเกิดภาวะปฏิเสธไตในผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วยรายที่	Antibody-mediated rejection		Acute Cellular rejection	Time from rejection to MLR(months)
	Acute	Chronic		
1.	√			2.8
2.	√			22.9
3.	√	√		1.2 / 1.2 (combined)
4.			√	0.7
5.	√		√	0 / 0 (combined)
6.			√	19.8
7.			√	120.0

4.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยตามการเกิดภาวะปฏิเสธไต

พบว่าไม่มีความแตกต่างของอายุ, mean arterial blood pressure (MAP), HLA mismatch และระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไตระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต (ตารางที่ 13) พบความแตกต่างของระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไตโดยกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตมีระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไตนานกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (8.60 ± 2.22 ปี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไต, 4.98 ± 1.48 ปี ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.03$)

ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตทุกราย พบว่าผลการตรวจ DSA ใน HLA class I ด้วยวิธี tepnel ให้ผลลบ ในขณะที่การตรวจ DSA ใน HLA class II ในผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตมีผลบวกมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 28.6 ในผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต, ร้อยละ 10 ในผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, $p=0.12$) และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ pretransplant PRA พบว่าผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตมี PRA ชนิด T-cell ที่สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 21.3 ± 39.4 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต, ร้อยละ 0 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.02$) ส่วน PRA ชนิด B-cell พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ร้อยละ 18.5 ± 28.7 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต, ร้อยละ 5.2 ± 10.4 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.54$)

ยากดภูมิคุ้มกันที่ได้รับในผู้ป่วยมี 2 ช่วงคือก่อนผ่าตัดปลูกถ่ายไต (induction) พบว่าการได้รับยา induction ด้วย anti-IL2 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน (ร้อยละ 66.7 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, ร้อยละ 85.7 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต; $p=0.36$) กลุ่มของผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต (non rejection) ผู้ป่วยร้อยละ 33.3 ได้รับ cyclosporine อย่างเดียว, ร้อยละ 33.3 ได้รับ cyclosporine ร่วมกับ mycophenolate mofetil , ร้อยละ 20 ได้รับ cyclosporine ร่วมกับ azathioprine และร้อยละ 13.3 ได้รับ rapamune ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตร้อยละ 71.4 จะได้รับยา tacrolimus ร่วมกับ และ mycophenolate mofetil, ร้อยละ 28.6 ได้รับยา cyclosporine ร่วมกับ mycophenolate mofetil จะเห็นได้ว่าไม่มีผู้ป่วยรายใดในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตได้รับ tacrolimus ร่วมกับ mycophenolate mofetil และไม่มีผู้ป่วยรายใดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตจะได้รับ rapamicin หรือ cyclosporin อย่างเดียว

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ cyclosporin ที่ใช้ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (112.5 ± 17.7 มก/วัน ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต, 105.8 ± 27.3 มก/วัน ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.64$) อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตได้รับขนาด mycophenolate mofetil สูงกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1285.7 ± 267 มก/วัน ในกลุ่ม

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

Characteristic	Patient with no history of rejection n=15 (%)	Patient with history of biopsy proven rejection=7(%)	p-value
Age (yrs): mean \pm SD	56.8 \pm 7.4	44.8 \pm 17.3	p= 0.21
Sex: male/female	5/10	5/2	NA
MAP (mmHg): mean \pm SD	93.8 \pm 9.7	91.0 \pm 11.6	p= 0.94
Number of HLA MM: mean \pm SD	1.9 \pm 1.6	3.1 \pm 1.3	p= 0.18
Number of HLA MM:			
• 0	5 (33.3)	-	
• 1	-	-	
• 2	3(20.0)	3(42.9)	
• 3	6(40.0)	2(28.6)	
• 4	-	-	
• 5	1(6.7)	2(28.6)	
Post transplant duration (yrs): Mean \pm SD	8.6 \pm 3.2	4.9 \pm 3.9	p=0.03
Pre-transplant screening PRA (%): mean \pm SD			
• B-cell	5.2 \pm 10.4	18.5 \pm 28.7	p=0.54
• T-cell	0	21.3 \pm 39.4	p=0.02
DSA วิธี Tepnel:(n)			
Class I- Positive	0	0	
Class II-Positive	1(9) ¹	2	

ตารางที่ 13 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มโดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

Characteristic	Patient with no history of rejection n=15 (%)	Patient with history of biopsy proven rejection=7(%)	p-value
Casue of ESRD: (n)			
• Diabetic nephropathy	2(13.3)	2(28.6)	NA
• IgA nephropathy	1(6.7)	1(14.3)	NA
• Hypertensive nephropathy	1(6.7)	-	NA
• Primary FSGS	-	1(14.3)	NA
• Presumptive CGN	-	1(14.3)	NA
• ADPKD	1(6.7)	-	NA
• Unknown cause	10(66.7)	2(28.6)	NA
Anti-IL2-Induction: n (%)	10(66.7)	6 (85.7)	p=0.36
Current immunosuppressive agent			NA
• TAC+ MMF	-	5(71.4)	
• CSA + MMF	5(33.3)	2(28.6)	
• Rapamune alone or minimized CSA+ rapamune	2(13.3)	-	
• CSA+ AZA	3(20)	-	
• CSA alone	5(33.3)	-	
Dose of cyclosporine(mg/day): mean±SD	105.8 ± 27.3	112.5 ± 17.7	p=0.64
Dose of MMF(mg/day): mean±SD	850.0 ± 223.6	1285.7 ± 267.3	p=0.02

หมายเหตุ : ¹ missing data: จำนวนผู้ป่วยที่นำมาวิเคราะห์ 9/15 ราย

ตัวย่อ: HLA-human leukocyte antigen, DSA-donor specific antibody, PRA-panel reactive activity, FSGS-focal segmental glomerulosclerosis, CGN-chronic glomerulonephritis, ADPKD-autosomal dominant polycystic kidney disease, TAC-tacrolimus, CSA-cyclosporine, MMF-mycophenolate mofetil

4.3 ข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

กลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตมีระดับ BUN และ creatinine สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อคำนวณค่าการทำงานของไตโดย estimated GFR (eGFR) ด้วยสมการ MDRD ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม (80.6 ± 19.08 มล/นาที/1.73 เมตร² ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, 41.71 ± 11.26 มล/นาที/1.73 เมตร² ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไต; $p < 0.001$) ส่วนผลการตรวจอื่นๆ พบว่าในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

Character	Patient with no history of rejection n=15 (%)	Patient with history of biopsy proven rejection=7 (%)	p-value
BUN (mg/dl): mean \pm SD	17.6 \pm 5.1	28.5 \pm 11.1	$p=0.01$
Cr (mg/dl): mean \pm SD	0.89 \pm 0.20	1.87 \pm 0.48	$p < 0.001$
eGFR (ml/min/1.73m ²): mean \pm SD	80.6 \pm 19.1	41.7 \pm 11.3	$p < 0.001$
Sodium (mEq/L): mean \pm SD	138.0 \pm 1.9	137 \pm 1.2	$p=0.27$
Potassium (mEq/L): mean \pm SD	4.1 \pm 0.4	4.4 \pm 0.4	$p=0.32$
Bicarbonate (mEq/L): mean \pm SD	25 \pm 2.7	23.4 \pm 1.71	$p=0.10$
Chloride (mEq/L): mean \pm SD	104 \pm 2.9	105 \pm 2.3	$p=0.30$
Calcium(mg/dl): mean \pm SD	9.5 \pm 0.7	8.7 \pm 0.6	$p=0.08$
Phosphate (mg/dl): mean \pm SD	3.1 \pm 0.5	3.6 \pm 0.8	$p=0.16$
Uric acid (mg/dl): mean \pm SD	7.3 \pm 1.9	8.0 \pm 0.9	$p=0.23$
Hb (g/dl): mean \pm SD	12.9 \pm 1.4	11.1 \pm 2.5	$p=0.08$
White blood cell (cell /mm ³): mean \pm SD	7,607 \pm 2,290	6,331 \pm 1,567	$p=0.17$
Platelet *10 ³ (cell /mm ³):mean \pm SD	294.0 \pm 70.1	235.0 \pm 108.4	$p=0.11$
Cholesterol(mg/dl): mean \pm SD	186.0 \pm 33.4	185.0 \pm 44.1	$p=0.67$

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

Character	Patient with no history of rejection n=15 (%)	Patient with history of biopsy proven rejection=7 (%)	p-value
Tiglyceride (mg/dl): mean \pm SD	140.0 \pm 48.0	105.3 \pm 43.0	p=0.31
HDL-cholesterol(mg/dl): mean \pm SD	50.7 \pm 11.4	54.6 \pm 11.0	p=0.55
LDL-cholesterol(mg/dl): mean \pm SD	113.4 \pm 32.9	129.2 \pm 59.3	p=0.89
Urine 24 hr: TP(g/day) : mean \pm SD	0.50 \pm 0.62	0.41 \pm 0.47	p=0.97
DPI: mean \pm SD	0.80 \pm 0.22	0.73 \pm 0.29	p=0.92

ตัวย่อ: BUN –blood urea nitrogen, Cr-creatinine, Hb-hemoglobin, DPI-dietary protein intake, eGFR-estimated glomerular filtration rate

4.4 ผลการวัด proliferation index ของ T lymphocyte โดย flow cytometry ในการทดสอบ MLR-CFSE

วิธีการทำ MLR ในงานวิจัยครั้งนี้อ้างอิงจากผลการศึกษานานาชาติ MLR-CFSE ในกลุ่มผู้ป่วยก่อนการปลูกถ่ายไต [91] และจากการที่ผู้วิจัยได้ทดลองเพื่อเลือกขนาดที่ใช้ในการฉายแสงที่ 2500, 3000 และ 3500 rad ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้สามารถกำหนดขนาดใช้การฉายรังสีของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เหมาะสมที่สุด (ถือเป็น stimulator) เท่ากับ 3000 rad และกำหนดเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 วัน

แบ่งผล proliferation index (PI) ในงานวิจัยนี้ โดยเป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้

4.4.1 กลุ่มเปรียบเทียบ 4 กลุ่ม ได้แก่

Autologous หรือ baseline recipient PBMCs (Auto-R) เป็นการทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ผู้รับที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

Recipient PBMCs กระตุ้นด้วย stimulating agent (Stim-R) เป็นการทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ผู้รับเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย PHA (ซึ่งถือว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์การแบ่งตัวของเซลล์หรือ positive control)

Donor PBMCs ที่ได้รับการฉายรังสีที่ 3000 rad (irradiatedD3000) เป็นการทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ผู้บริจาค ที่ได้รับการฉายรังสี 3000 rad เพื่อให้เซลล์ดังกล่าวไม่มีการแบ่งตัว แต่ยังสามารถทำหน้าที่เป็นเซลล์นำเสนอได้ (antigen presenting cell)

DonorPBMCs ได้รับการฉายรังสีที่กระตุ้นด้วยstimulating agent (Stim-irradiatedD3000)เป็นการทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ผู้บริจาคที่ได้รับการฉายรังสี 3000 rad เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย PHA (ซึ่งถือว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์การแบ่งตัวของเซลล์หรือ positive control)

4.4.2 กลุ่มทดลองมี 2 กลุ่ม ได้แก่

Recipient PBMCs กระตุ้นด้วย irradiate 3000 rad specific donor cells (R+irradiatedD3000) เป็นการทดสอบการแบ่งตัวพื้นฐานของเซลล์ PBMCs ผู้รับ ที่ได้รับกระตุ้นด้วยเซลล์ PBMCs ของผู้บริจาคใดที่ได้รับ การฉายรังสี 3000 rad

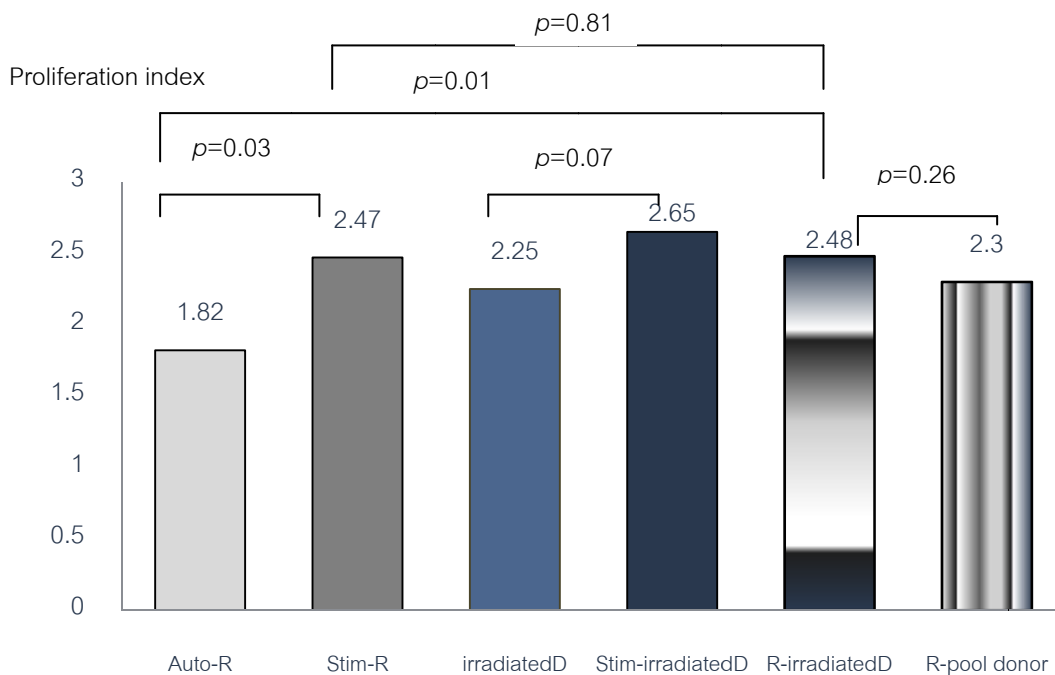
Recipient PBMCs กระตุ้นด้วย Irradiate 2000 rad pool donor cells(R+pool donor) เป็นการทดสอบ การแบ่งตัวพื้นฐานของเซลล์ PBMCs ผู้รับ ที่ได้รับกระตุ้นด้วยเซลล์ PBMCs ของผู้อื่น (pool donor ที่ได้จากอาสาสมัคร 10 รายดังกล่าวในรายละเอียดข้างต้น) ที่ได้รับการฉายรังสี 2000 rad

เมื่อมีการพิจารณาผลการตรวจวัด proliferation index การทดสอบ MLR ในผู้ป่วยทั้งหมด 22 ราย พบว่ามีผู้ป่วยบางรายผลการตรวจมีปัญหา คือเมื่อเปรียบเทียบผล PI ใน Autologous recipient PBMCs มีค่ามากกว่า Recipient PBMCs กระตุ้นด้วย stimulating agent (PHA) ซึ่งเป็น positive control ดังนั้นงานวิจัยนี้จึง ตัดกลุ่มผู้ป่วยในกลุ่มดังกล่าวออกไป แล้ววิเคราะห์ข้อมูลในผู้ป่วยทั้งหมด 12 ราย (ตารางที่ 15 และแผนภูมิที่ 1)

ตารางที่ 15 แสดงผล proliferation index ในการทดสอบ MLR

การทดสอบ MLR	Proliferation index
Autologous recipient PBMCs (Auto-R): mean \pm SD	1.82 \pm 0.73
Recipient PBMCs with stimulating agent (Stim-R): mean \pm SD	2.47 \pm 1.07
Irradiate 3000 rad Donor PBMCs (irradiatedD): mean \pm SD	2.25 \pm 0.73
Irradiate 3000 rad Donor PBMCs with stimulating agent (Stim-irradiatedD): mean \pm SD	2.65 \pm 0.62
Recipient PBMCs with Irradiate 3000 rad donor cell stimulator (R-irradiatedD): mean \pm SD	2.48 \pm 0.45
Recipient PBMsC with pool donor cell stimulator (R-Pool donor): mean \pm SD	2.30 \pm 0.58

ตัวย่อ : PBMCs-peripheral blood mononuclear cells



แผนภูมิที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่า proliferation index ในการทดสอบ MLR

ตัวย่อ : Auto-R = Autologous recipient PBMCs, Stim-R = Recipient PBMCs with stimulating agent, irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs, Stim-irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs with stimulating agent, R-irradiated = Recipient PBMCs with Irradiate 3000 rad donor cell stimulator,)R-Pool donor = Recipient PBMCs with pool donor cell stimulator

ผลการศึกษาพบว่า Autologous recipient PBMCs (ดูการแบ่งตัวพื้นฐานของเซลล์ผู้รับ) มีค่า proliferation index (mean±SD) เท่ากับ 1.82 ± 0.73 , Recipient PBMCs with stimulating agent (ดูการแบ่งตัวเซลล์ผู้รับเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย PHA) ซึ่งมีค่า proliferation index (mean±SD) เท่ากับ 2.47 ± 1.07 เมื่อเปรียบเทียบค่า proliferation index ของ Autologous recipient PBMCs และ Recipient PBMCs with stimulating agent พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.03$)

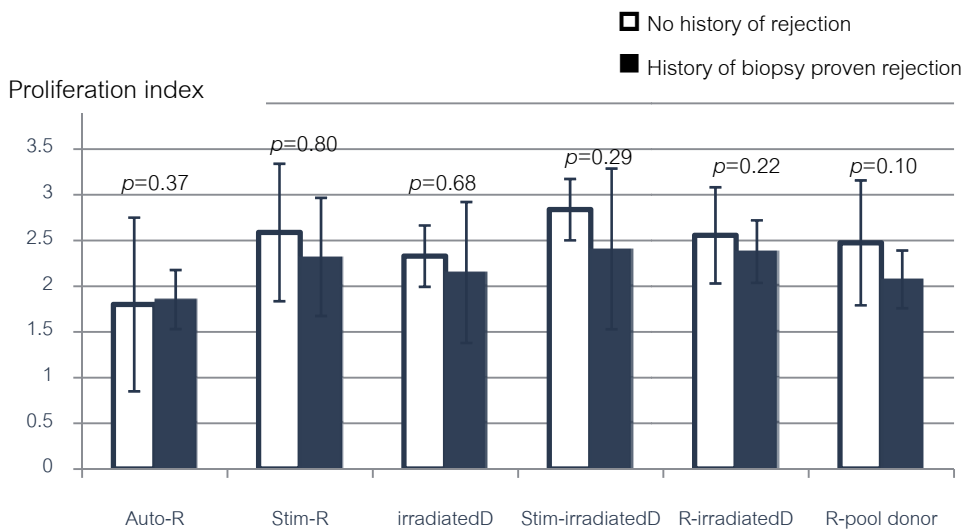
PI ของ donor PBMCs ที่ได้รับการฉายรังสีที่ 3000 rad (ดูการแบ่งตัวพื้นฐานของเซลล์ผู้บริจาคที่ได้รับการฉายรังสี 3000 rad) มีค่าเท่ากับ (mean±SD) 2.25 ± 0.73 , PI ของ donorPBMCs ได้รับการฉายรังสีที่กระตุ้นด้วยstimulating agent (ดูการแบ่งตัวเซลล์ผู้บริจาคที่ได้รับการฉายรังสี 3000 rad เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย PHA/I) มีค่าเท่ากับ (mean±SD) 2.65 ± 0.62 เมื่อเปรียบเทียบ proliferation index ของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.07$)

PI ของ recipient PBMCs กระตุ้นด้วย irradiate 3000 rad specific donor cells (ดูการแบ่งตัวพื้นฐานของเซลล์ผู้รับที่ได้รับความกระตุ้นด้วยเซลล์ของผู้บริจาคใดที่ได้รับการฉายรังสี) มีค่าเท่ากับ(mean±SD) 2.48 ± 0.45 ,

เมื่อเปรียบเทียบค่า proliferation index ใน Autologous recipient PBMCs และ Recipient PBMCs ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Irradiate 3000 rad donor cells พบว่าค่า proliferation index มีความแตกต่างกัน ($p=0.01$) แต่เมื่อเทียบการแบ่งตัวของ recipient PBMCs ระหว่างการกระตุ้นด้วย PHA, irradiatedD หรือ pool donor พบว่าค่า proliferation index ไม่มีความแตกต่างกัน ($p=0.81, p=0.84$ ตามลำดับ)(แผนภูมิที่ 1)

4.5 ผลการวัด proliferation index (PI) ในการทดสอบ MLR ด้วยวิธี CFSE assay โดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ PI ในการทดสอบ MLR-CFSE ระหว่างทั้ง 2 กลุ่มผู้ป่วย ทั้งใน MLR ของ recipient PBMCs กระตุ้นด้วย irradiate specific donor cells (2.83 ± 0.33 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, 2.40 ± 0.87 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต; $p=0.29$) และ MLR ของ recipient PBMCs ที่กระตุ้นด้วย pool donor cells (2.55 ± 0.52 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไต, 2.37 ± 0.34 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต; $p=0.22$) (ตารางที่ 16 และแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่า proliferation index ระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม

ตัวย่อ : Auto-R = Autologous recipient PBMCs, Stim-R = Recipient PBMCs with stimulating agent, irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs, Stim-irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs

ตารางที่ 16 แสดงค่า proliferation index ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม

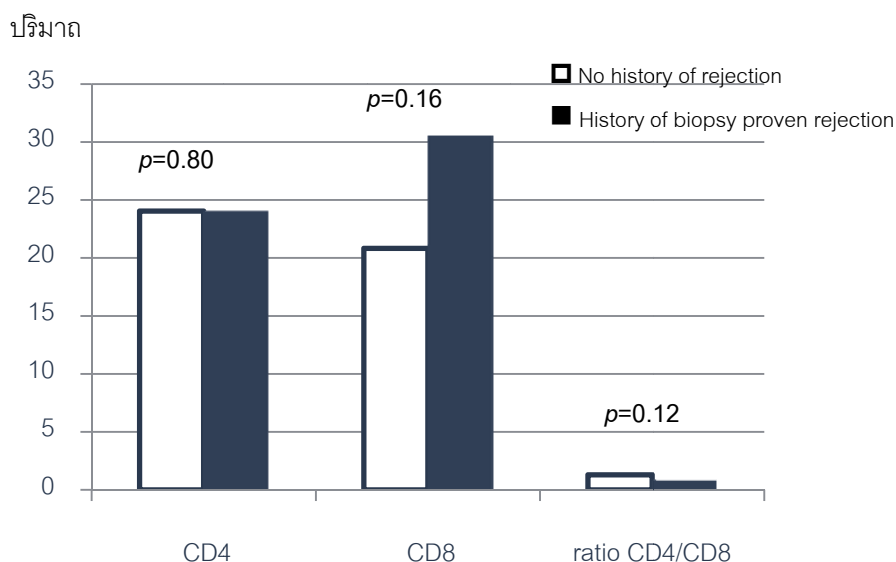
Proliferative index	Patient with no history of rejection n=15 (%)	Patient with history of biopsy proven rejection=7(%)	p-value =
Autologous recipient PBMCs (Auto-R): mean ±SD	1.80±0.95	1.85±0.32	0.37
Recipient PBMCs with stimulating agent (Stim-R): mean±SD	2.58±1.33	2.32±0.64	0.80
Irradiate 3000 rad Donor PBMCs (irradiatedD):mean ±SD	2.32±0.75	2.15±0.77	0.68
Irradiate 3000 rad Donor PBMCs with stimulating agent (Stim-irradiatedD):mean±SD	2.83±0.33	2.40±0.87	0.29
Recipient PBMCs with Irradiate 3000 rad donor cell stimulator (R-irradiatedD):mean±SD	2.55±0.52	2.37±0.34	0.22
CD4:mean±SD	3.32±1.11	2.33±0.78	0.08
CD8:mean±SD	2.93±1.36	2.43±0.85	0.50
Recipient PBMCs with pool donor cells stimulator (R-Pool donor):mean ±SD	2.47±0.68	2.07±0.32	0.10

ตัวย่อ : PBMCs-peripheral blood mononuclear cells

4.6 ผลการวัด proliferation index และปริมาณ CD4 และ CD8 ในการทดสอบ MLR ด้วยวิธี CFSE assay โดยเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไต ของ proliferation index ของ CD4 (3.32 ± 1.11 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไต, 2.33 ± 0.78 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.08$) และ proliferation index ของ CD8 (2.93 ± 1.36 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, 2.43 ± 0.85 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.50$) (ตารางที่ 16)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ T-cell subset ในการตรวจ MLR-CFSE พบว่าผู้ป่วยกลุ่มทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยของ CD4 ที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 24.04 ± 12.31 ในกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธ, ร้อยละ 23.99 ± 13.63 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.80$) ส่วนปริมาณของ CD8 ในกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธจะสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 30.49 ± 11.04 ในกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธ, ร้อยละ 20.8 ± 9.88 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.16$) และเมื่อเทียบอัตราส่วนของปริมาณ CD4/CD8 พบว่าทั้งที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไต (1.3 ± 0.52 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต, 0.79 ± 0.33 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.12$) (แผนภูมิที่ 3)



แผนภูมิที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ CD4, CD8 และอัตราส่วน CD4/CD8 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย

4.7 ผลการวัดปริมาณ interleukin-17 (IL-17) ในการทดสอบ MLR ด้วยวิธี CFSE assay

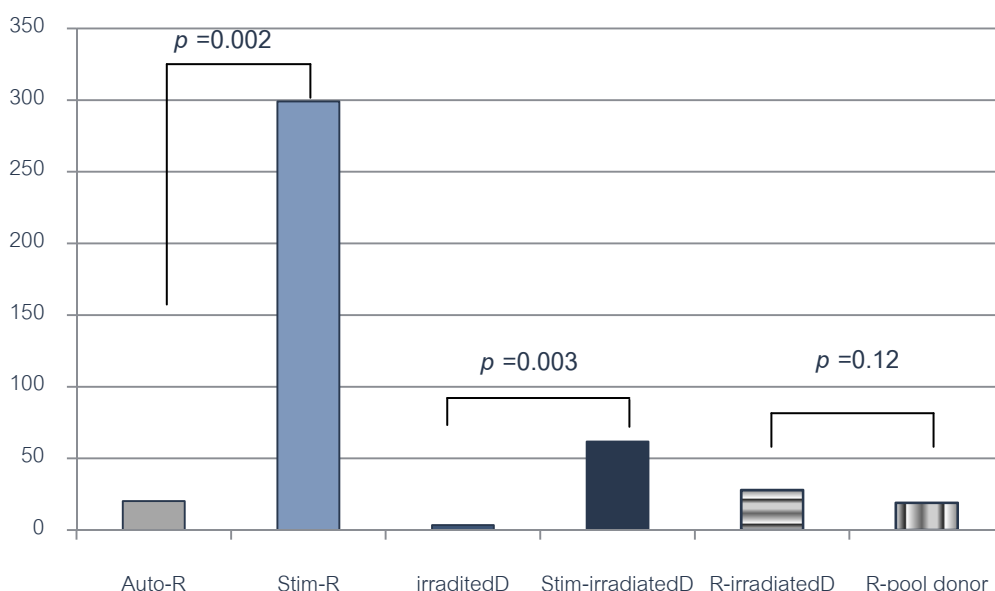
4.7.1 การเปรียบเทียบปริมาณ interleukin 17 ในการทดสอบ MLR-CFSE แต่ละวิธี

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ IL17 จาก supernatant MLR-CFSE เป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ PBMCs ของ recipient ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 20.29 ± 35.5 pg/ml และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PHA/I (สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์) มีค่า IL 17 เพิ่มขึ้นเท่ากับ 299.0 ± 455.5 pg/ml เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IL17 ของ recipient ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นและได้รับการกระตุ้นจาก PHA/I พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$)

เซลล์ PBMCs ของ donor ผ่านการฉายแสง(3000 rad) ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 3.50 ± 3.56 pg/ml และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PHA/I มีค่า IL 17 เท่ากับ 61.8 ± 118.6 pg/ml เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IL17 ของ donor ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นและได้รับการกระตุ้นจาก PHA/I พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.003$)

เซลล์ PBMCs ของ recipient ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย specific donor PBMCs มีค่า IL17 เท่ากับ 27.9 ± 36.3 pg/ml และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย pool donor PBMCs มีค่า IL 17 เท่ากับ 19.0 ± 24.0 pg/ml เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IL17 ของ donor ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย specific donor และได้รับการกระตุ้นด้วย pool donor พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.12$) (แผนภูมิที่ 4)

ปริมาณความเข้มข้น IL17 (pg/ml)

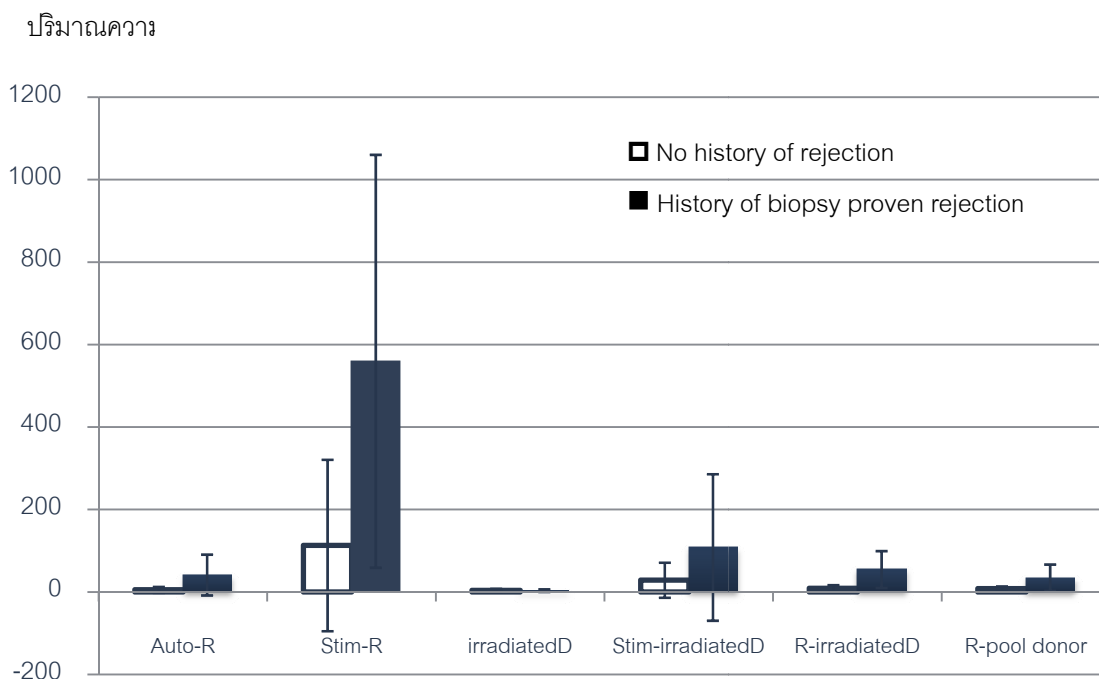


แผนภูมิที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ interleukin 17 ในการทดสอบ MLR-CFSE แต่ละวิธี

ตัวย่อ : Auto-R = Autologous recipient PBMCs, Stim-R = Recipient PBMCs with stimulating agent, irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs, Stim-irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs with stimulating agent, R-irradiatedD = Recipient PBMCs with Irradiate 3000 rad donor cell stimulator, R-Pool donor = Recipient PBMCs with pool donor cell stimulator

4.7.2 เปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มข้น interleukin-17 ในการทดสอบ MLR-CFSE ของเซลล์ PBMCs ของ recipient ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย specific donor PBMCs ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติเกิดภาวะปฏิเสธไตมีความเข้มข้นของ IL17 แนวนอนสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (54.77 ± 44.62 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ภาวะปฏิเสธไต, 8.75 ± 8.05 กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต; $p=0.16$) และผลการตรวจวัดในทุกกลุ่ม พบว่าปริมาณ IL-17 ที่วัดได้ให้ผลไปในแนวทางเดียวกันคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ภาวะปฏิเสธไตจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (แผนภูมิที่ 5)

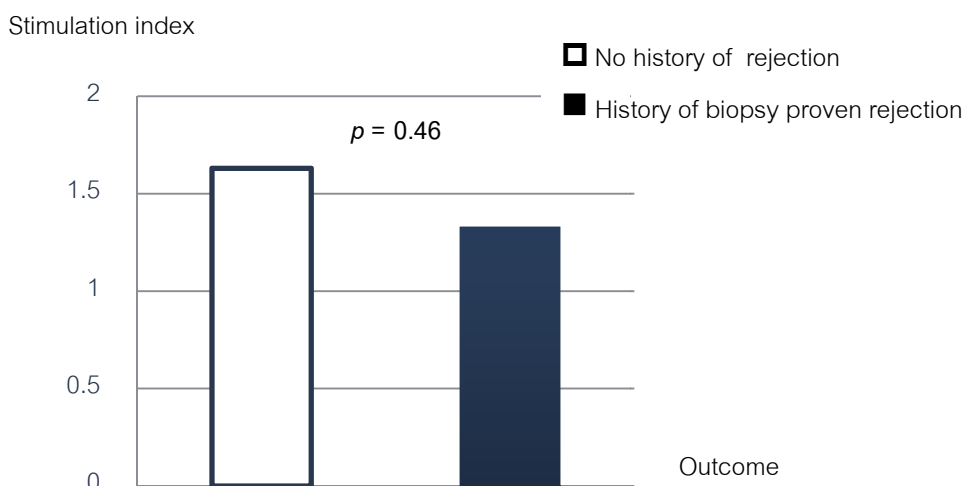


แผนภูมิที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ interleukin 17 ในการทดสอบ MLR แต่ละชนิดระหว่างกลุ่มผู้ป่วย

ตัวย่อ : Auto-R = Autologous recipient PBMCs, Stim-R = Recipient PBMCs with stimulating agent, irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs, Stim-irradiatedD = Irradiate 3000 rad Donor PBMCs

4.8 เปรียบเทียบผล stimulation index (SI) ของการตรวจ mixed lymphocyte reaction ด้วยวิธี CFSE assay กับผลลัพธ์การปลูกถ่ายไต

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต และกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธ พบว่าค่า stimulation index ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (mean±SD: 1.64 ± 0.64 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไต, 1.32 ± 0.37 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธไต; $p=0.46$) (แผนภูมิที่ 6)



แผนภูมิที่ 6 แสดงความแตกต่างของค่า stimulation index ระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม

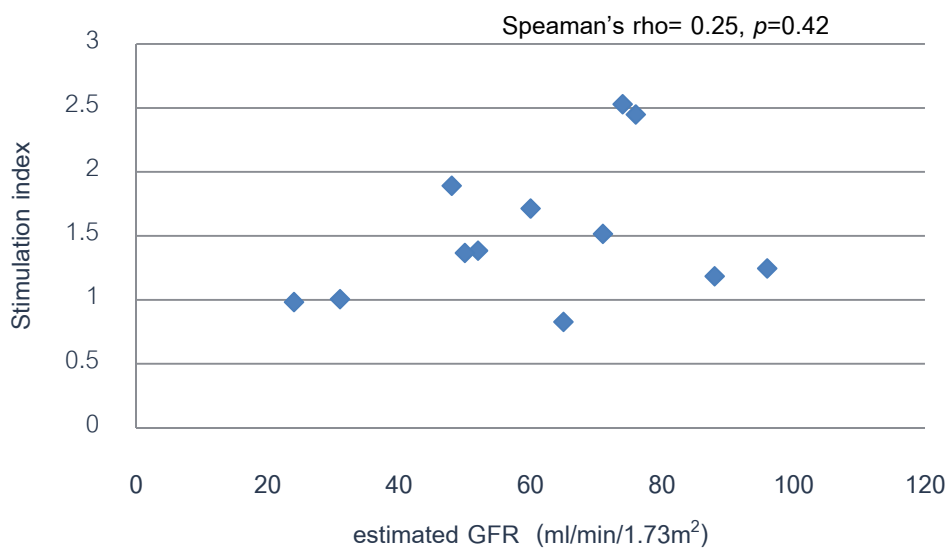
4.9 หาความสัมพันธ์ของ eGFR และผลการตรวจ mixed lymphocyte reaction ด้วยวิธี CFSE assay

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (Spearman's rho) ระหว่างค่า eGFR กับผลการทดสอบ MLR-CFSE พบว่าค่า eGFR มีความสัมพันธ์แบบบวก (positive correlation) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับค่า proliferation index (Spearman's rho = 0.24, $p=0.45$) ของ เซลล์ PBMCs ของ recipient ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย specific donor PBMCs(R+irradiated), stimulation index (Spearman's rho = 0.25, $p=0.42$), ปริมาณ CD4 (Spearman's rho = 0.28, $p=0.38$) และอัตราส่วนของปริมาณ CD4/CD8 (Spearman's rho = 0.42, $p=0.17$) นอกจากนี้ eGFR มีความสัมพันธ์แบบลบกับ eGFR (negative correlation) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติของ ปริมาณ CD8 (Spearman's rho = -0.26, $p=0.40$) และความเข้มข้นของ IL1-17 ใน MLR-supernatant (Spearman's rho = -0.36, $p=0.24$) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ estimated GFR และผลการตรวจ MLR-CFSE assay

Factors correlated with eGFR	Spearman's rho	p-value
Proliferation index of R+irradiatedD	0.24	p= 0.45
Percentage of CD4	0.28	p= 0.38
Percentage of CD8	-0.26	p= 0.40
Ratio of CD4/CD8	0.42	p= 0.17
Supernatant interleukin-17 level of R+irradiatedD	-0.36	p= 0.24
Stimulation index	0.25	p= 0.42

ตัวย่อ : R-irradiatedD = Recipient PBMCs with Irradiate 3000 rad donor cell stimulator

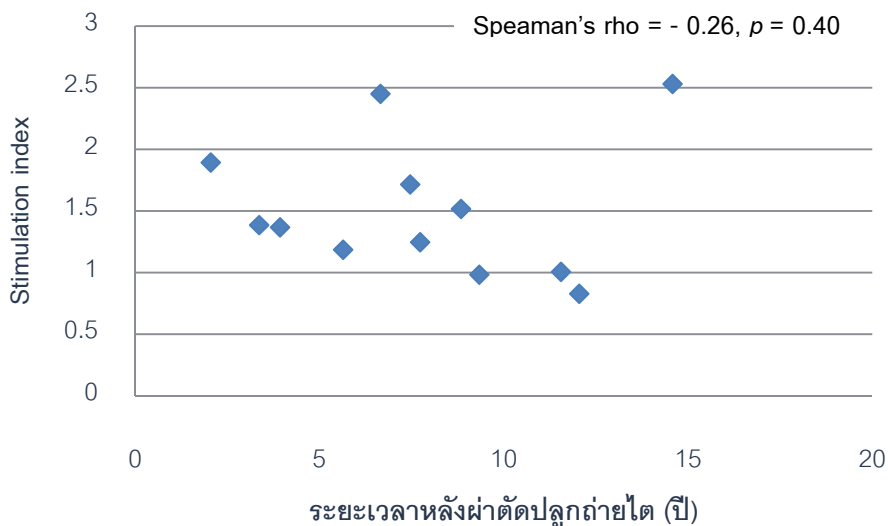


แผนภูมิรูปภาพที่ 1 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และ eGFR MDRD

4.10 หาความสัมพันธ์ของผลการตรวจ mixed lymphocyte reaction ด้วยวิธีCFSE assayและปัจจัยต่างๆ

1). ความสัมพันธ์ระหว่าง SI และ ระยะเวลาหลังผ่าตัดปลูกถ่ายไต

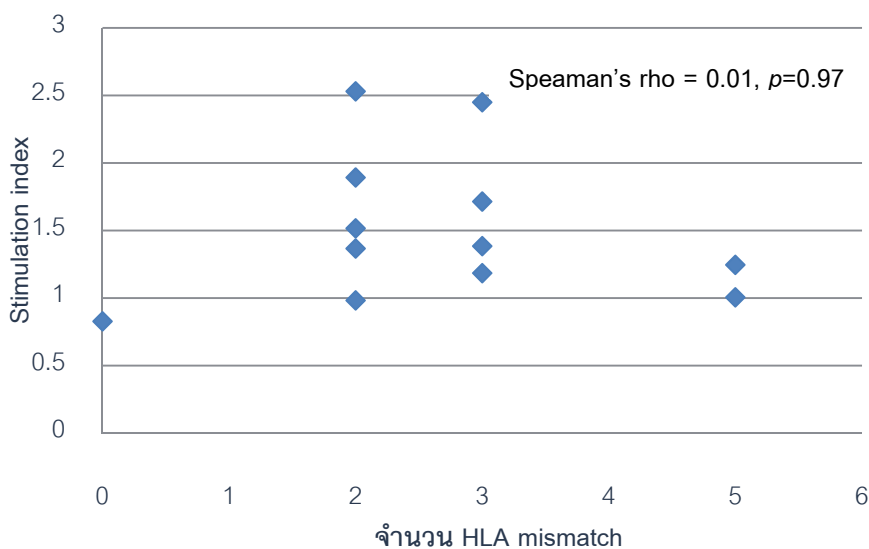
พบว่าหากระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไตยิ่งนานขึ้น ค่า stimulation index มีแนวโน้มจะลดลง Spearman's rho = -0.26 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (แผนภูมิรูปภาพที่ 2)



แผนภูมิรูปภาพที่ 2 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และ ระยะเวลาหลังผ่าตัดปลูกถ่ายไต

2). ความสัมพันธ์ระหว่างค่า SI และจำนวน HLA mismatch

พบว่าจำนวน HLA mismatch ไม่มีความสัมพันธ์กับค่า stimulation index (แผนภูมิรูปภาพที่ 3)



แผนภูมิรูปภาพที่ 3 แสดงค่าความสัมพันธ์ของ stimulation index และ จำนวน HLA mismatch

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สาเหตุของ ESRD พบมากที่สุดของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา คือ diabetic nephropathy รองลงมา คือ IgA nephropathy อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยประมาณ 1 ใน 3 ที่ไม่ทราบสาเหตุของภาวะ ESRD
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธจะมีค่า pre-transplant PRA ที่สูงกว่า, ระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไต (transplant vintage) สั้นกว่า, ได้รับปริมาณ mycophenolate mofetil ที่สูงกว่า, และมี estimated GFR ด้วยสมการ MDRD ที่ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. อายุ mean arterial blood pressure และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไปของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
4. จากการศึกษาไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า stimulation index ที่ได้จากในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตกับจำนวน HLA mismatch และระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไต (transplant vintage)
5. จากการศึกษาไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า stimulation index ที่ได้จากในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต ด้วยวิธี MLR-CFSE assay กับ estimated glomerular filtration rate ที่คำนวณด้วยสมการ MDRD,
6. เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตและกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต พบว่าการวัดผลของการแบ่งตัว ได้แก่ proliferation index และ stimulation index ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FLOWJO ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
7. พบว่าปริมาณ CD8 T-cell ที่มีการแบ่งตัวดูเหมือนว่าจะสูงมากกว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณ CD4 T-cell และอัตราส่วน CD4/CD8 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน
8. ค่าปริมาณเข้มข้นของ IL 17 ใน supernatant MLR-CFSE ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต มีค่าสูงมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 ข้อมูลพื้นฐานและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

จากข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยทั้งหมดพบว่าโรคที่เป็นสาเหตุของ ESRD พบมากที่สุดคือ diabetic nephropathy อย่างไรก็ตามพบว่ามีผู้ป่วยส่วนหนึ่งของ ESRD ที่ไม่ทราบสาเหตุ เนื่องจากขาดผลการตรวจ และการตัดชิ้นเนื้อที่ช่วยวินิจฉัยยืนยันสาเหตุ

เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตจะมีค่า pre-transplant PRA ที่สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า pre transplant PRA ที่สูงเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด rejection และหากเมื่อเกิดภาวะปฏิเสธไตก็จะมีผลทำให้ การทำงานของไตลดลง และเมื่อนำระดับ creatinine มาคำนวณด้วยสมการ MDRD หาค่า estimated GFR พบว่าต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะไตปฏิเสธ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการรักษาคือการเปลี่ยนยากกดภูมิให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือปรับขนาดให้สูงขึ้น ดังนั้นจึงทำให้ผู้ป่วยที่มีภาวะปฏิเสธไตส่วนใหญ่จะได้รับยากกดภูมิสูตร tacrolimus ร่วมกับ mycophenolate mofetil และขนาด mycophenolate mofetil ที่ได้สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต

ในผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไต จะมีระยะเวลาหลังปลูกถ่ายไต (transplant vintage) สั้นกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตเนื่องจากผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตบางส่วนที่มีการทำงานของ allograft ที่แย่งลง จะต้องกลับไปทำการฟอกเลือดอีกครั้ง ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะปฏิเสธไตก็จะตรวจติดตามที่หน่วยโรคไตตลอดทำให้ค่าเฉลี่ยระยะเวลานานกว่า

5.2.2 ผลการตรวจ post transplant MLR-CFSE assay

Mixed lymphocyte reaction เป็นวิธีการตรวจ T-cell function โดยตรง ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่า T-cell เป็น central role ของการเกิดภาวะ rejection[46] ในอดีตแม้จะมีการศึกษาต่างๆ เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ MLR ด้วยวิธี [³H]-thymidine และ renal allograft rejection หรือ function อย่างไรก็ตามก็ยังไม่ได้ข้อสรุปชัดเจน [49, 70, 72, 79, 81, 92] เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดดังที่กล่าวข้างต้น ปัจจุบันมีวิธีใหม่คือ MLR-CFSE assay [56]ที่นำมาใช้ทดแทนวิธี [³H]-thymidine Tanaka และคณะ[82] ได้นำวิธีนี้ ศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายตับ พบว่าผู้ป่วยที่มี acute liver allograft rejection จะมีค่า stimulation index ที่สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะ rejection Tanaka และคณะ สรุปว่าใช้ MLR-CFSE สามารถช่วยในการวินิจฉัยภาวะ acute liver rejection ได้

การศึกษานี้พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะไตปฏิเสธและกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธมีค่า proliferation index และค่า stimulation index ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดได้จากสาเหตุดังนี้

ก. ปัจจัยด้านประชากรตัวอย่างที่เข้าการศึกษา

1. ความแตกต่างชนิดการเกิด rejection โดยผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธที่เข้าร่วมในการศึกษามีทั้ง acute cellular rejection, acute และ chronic antibody mediated rejection แม้ว่าความเชื่อ T-cell มีบทบาทหลักของการเกิด rejection แต่ในการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับ MLR-CFSE ในการปลูกถ่ายตับและลำไส้เล็กเป็นชนิด acute cellular rejection ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่เกิด antibody mediated rejection การตรวจ MLR-CFSE มีค่า alloimmune reactivity ที่น้อยกว่า cellular rejection

2. ระยะเวลาตั้งแต่ที่เกิดภาวะไตปฏิเสธ จนถึงเวลาที่ผู้ป่วยเข้าร่วมงานวิจัย ก็อาจมีเกี่ยวข้องโดยผู้ป่วยจะผ่านการเกิดภาวะ rejection มาช่วงเวลาหนึ่ง ซึ่งแตกต่างกันตั้งแต่มีภาวะปฏิเสธไตในช่วงเวลาที่เข้าร่วมการศึกษา และบางรายนาน 10 ปี เป็นที่ทราบว่าย่ immune response มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ดังนั้นการตรวจ MLR-CFSE ในแต่ละบุคคลจึงมีความแตกต่างกัน หากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ทำโดย Tanaka และคณะ แล้วพบว่ามีความแตกต่างกันของช่วงเวลาวิธีการเก็บเลือดเพื่อตรวจ MLR-CFSE โดย Tanaka จะเก็บเลือดตรวจ MLR ในช่วงเวลาที่มีอาการและอาการแสดงของการเกิด rejection ทำให้การตรวจ MLR-CFSE assay สามารถช่วยในการวินิจฉัยภาวะ liver rejection ได้

3. ผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะไตปฏิเสธจะได้รับยากกดภูมิ (immunosuppressive agent) ในปริมาณที่สูงขึ้นหรือเปลี่ยนชนิดยากกดภูมิที่แรงมากขึ้น ทำให้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน ทำให้ความสามารถในการแบ่งตัวและการตอบสนองของ T-cell อาจจะน้อยกว่าปกติ ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไตเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาในขนาดโดยเฉพาะยาในกลุ่ม CNI แพทย์ผู้รักษาจึงพยายามที่จะลดปริมาณยาหรือเปลี่ยนชนิดยาที่กดภูมิคุ้มกันน้อยกว่า ทำให้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน ก็อาจจะมีผลทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เข้าการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตบางรายได้รับการรักษาเช่น การทำ plasmapheresis, IVIG เป็นไปได้ว่ายาที่รักษาไปมีผลต่อ T-cell function การตอบสนองของ T-cell ไม่ดี ทำให้ค่า proliferation index และ stimulation index ด้วยการตรวจวิธี flow cytometry มีการเปลี่ยนแปลง

ข. ปัจจัยด้านการตรวจเพาะเลี้ยงเซลล์

1. งานวิจัยนี้ผู้วิจัยเป็นผู้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ แม้ว่าได้รับการฝึกก่อนการทำงานวิจัยจริงเป็นเวลาประมาณ 3 เดือน แต่ผลการเพาะเลี้ยงอาจมีบางส่วนคาดเคลื่อนได้

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้มีเฉพาะ Positive control แต่ไม่มี Negative control ทำให้การแปลผลความถูกต้องของการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นอาจไม่สมบูรณ์

ค. ปัจจัยการวัด flow cytometry

การวัด flow cytometry เพื่อประเมินการแบ่งตัวของเซลล์ จะต้องอาศัยผู้ชำนาญในการคัดเลือกบริเวณตำแหน่งของ histogram ของ T-cell ที่จะตรวจวัด (จากเครื่องจะรายงานเป็น 2 histogram) นอกจากนี้ยังมีการแบ่งตัด peak ของการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้การวัดอาจมีความแตกต่างทั้งภายในบุคคล และระหว่างบุคคล

เดิมเชื่อว่า CD4 เป็น effector ที่หลักสำคัญในการเกิด rejection ในขณะที่ CD8 เป็น effector รอง และตั้งอาศัยการทำงานของ CD4 ร่วมในการเกิด rejection อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเมื่อพบว่า CD4 และ CD8 T-cell subset ต่างมีความสำคัญในการเกิดภาวะ rejection [93-95] แต่ความสัมพันธ์หรือสัดส่วนของปริมาณ CD4 และ CD8 ยังไม่ทราบชัดเจน การศึกษานี้ได้ตรวจวัด T-cell subset ของ MLR-CFSE ในผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตพบว่าปริมาณ CD4 และ CD8 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเป็นไปได้อาสาพาทของ CD4 และ CD8 มีความสำคัญในแง่ cellular mechanism ที่ใกล้เคียงกัน

แม้ว่าผลที่ได้จากการศึกษานี้จะไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของ stimulation index และ proliferation index และการเกิดภาวะ renal allograft rejection และผลของ renal function อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ก็มีข้อจำกัดที่อาจเป็นปัจจัยที่ต่อผลการศึกษาได้ เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ descriptive, cross-sectional ซึ่งการตรวจวัดค่า proliferation index และ stimulation index ในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตเพียงครั้งเดียวอาจจะไม่สามารถบอก alloreactivity ของผู้ป่วยทั้งหมด เนื่องจากผู้ป่วยจะมี T-cell alloreactivity ที่มีเกิดการเปลี่ยนแปลง (dynamic change) ในแต่ละช่วงเวลา ทำให้เมื่อตรวจที่ ณ เวลานั้นจึงไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ได้ ดังนั้นหากมีการตรวจที่ติดตามต่อไป (prospective follow up) เป็นช่วงเวลาอาจจะสามารถบอกแนวโน้มและให้ข้อมูลภาวะ immune reactivity ของผู้ป่วยแต่ละรายได้ดีกว่าการตรวจเพียงครั้งเดียว

5.2.3 ผลการตรวจปริมาณความเข้มข้นของ IL-17 ใน MLR-CFSE supernatant

การศึกษานี้ได้ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ IL-17 ใน MLR-CFSE supernatant ในทุกแบบของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ autologous หรือ baseline ของ recipient PBMCs, recipient PBMCs ที่กระตุ้นด้วย PHA/I, recipient ที่กระตุ้นด้วย specific donor PBMCs และ recipient PBMCs ที่กระตุ้นด้วย pool donor พบว่าให้ผลแนวทางเดียวกันคือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะไตปฏิเสธจะมีปริมาณ IL-17 ที่สูงกว่าอีกกลุ่ม แม้ว่าจะไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม แต่ข้อมูลที่ได้นี้หากมีการศึกษาต่อไป ก็อาจจะเป็นไปได้ว่า supernatant IL-17 จาก MLR-CFSE สามารถช่วยแยกผู้ป่วยที่มีภาวะไตปฏิเสธและไม่มีภาวะปฏิเสธไตได้ ซึ่งปัจจุบันดังที่กล่าวข้างต้นว่า IL-17 ได้รับความสนใจและทำการศึกษาใน clinical organ transplantation ซึ่งได้แสดงถึงบทบาทความสำคัญและเป็นช่วยการวินิจฉัยการเกิดภาวะ allograft rejection [32, 87-90] อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยคิดว่าปัจจัยหนึ่งที่น่าจะมีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ IL-17 คือเทคนิคการตรวจซึ่งจะเห็นได้ว่า SD ของค่าดังกล่าว เนื่องจากการตรวจนี้ยังไม่ได้มีการตรวจกันแพร่หลาย แต่จะตรวจเฉพาะในงานวิจัยเท่านั้น ทำให้ความชำนาญในการตรวจไม่มาก แม้ว่าการตรวจจะต้องมีการเทียบกับมาตรฐาน (standardized) การตรวจก่อนทุกครั้งก็ตาม

ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิจัยนี้มีขนาดจำนวนตัวอย่างน้อย (เนื่องจากผู้วิจัยได้กำหนดค่า r ในการคำนวณขนาดประชากรค่อนข้างสูง) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ MLR โดย CFSE assay ในกลุ่มตัวแปรต่างๆ ระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ผลที่ได้จึงไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นถ้าเก็บจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้น ผลที่ได้อาจจะทำให้เห็นความแตกต่างทางสถิติก็ได้ (ทางผู้วิจัยได้นำค่าความสัมพันธ์ (correlation) ที่ได้จากการวิจัยเท่ากับ 0.25 นำไปแทนค่าในสมการเดิม และกำหนด power เท่ากับ 90 พบว่า ขนาดจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 113 ราย)
2. งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไต ซึ่งผลลัพธ์การปลูกถ่ายไตนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างดังที่กล่าวไว้ตอนต้น นอกจากนี้ยังมีผลจากยากดภูมิคุ้มกันที่ผู้ป่วยต้องได้รับ แม้ว่าทางผู้วิจัยจะพยายามตัดปัจจัยอื่นที่อาจจะมีผลต่อผลการศึกษาแล้วก็ตาม ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของค่า stimulation index หรือ proliferation index กับ eGFR ด้วยวิธี MDRD หรือผลลัพธ์การปลูกถ่ายไตจึงไม่มีความแตกต่างกัน หากเป็นการตรวจ MLR โดย CFSE assay ที่ทำในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต (post transplant-MLR-CFSE) ทางผู้วิจัยขอเสนอวิธีการดังนี้
 - เพื่อให้ได้ผลที่ดีควรเก็บเลือดตัวอย่างที่ใช้ตรวจในช่วงเวลาใกล้เคียงกับการเกิดภาวะไตปฏิเสธ และเป็นเลือดที่เจาะก่อนที่จะได้รับการรักษา หรือมีการปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณยากดภูมิคุ้มกัน แต่ในความเป็นจริงอาจจะทำได้ลำบากเนื่องจากนี่เป็นการตรวจที่ต้องใช้เลือดทั้งผู้รับไตและผู้บริจาคไต และเมื่อเจาะแล้วได้นำเลือดไปทดสอบทันทีหรือใช้เป็นการตรวจติดตาม (follow up) ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต
3. การวัดปริมาณความเข้มข้นของ interleukin-17 ในผู้ป่วยดูแลแนวโน้มว่าผู้ป่วยที่มีประวัติการเกิดภาวะปฏิเสธไตจะมีค่าสูงกว่าถ่ายกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติภาวะปฏิเสธไต แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หากมีการเก็บข้อมูลเพื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้น อาจทำให้ค่าดังกล่าวมีความแตกต่างก็ได้

การนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (Implication for practice)

เนื่องจากการศึกษานี้ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ stimulation index ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตกับการเกิดภาวะปฏิเสธไต แต่จากความรู้ที่ว่า การเกิด rejection นั้น T cell มีบทบาทสำคัญ (control role) ดังนั้นการตรวจ T-cell function ก็น่าจะเป็นการทดสอบที่ดีอย่างหนึ่ง ที่จะบอกภาวะ alloimmune response ปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่นำมาวัดเพื่อบอก immune status ทั้งหมดของผู้ป่วยได้ ทางผู้วิจัยคิดว่าคงต้องมีการศึกษาถึงวิธีการนำ MLR-CFSE และ supernatant IL-17 เพื่อไปประยุกต์ใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตในอนาคต เช่น

1. การนำมาใช้เพื่อใช้ช่วยวินิจฉัยภาวะ early renal allograft rejection เพื่อให้ได้การรักษาที่เหมาะสมก่อนที่จะมีปัญหา renal allograft dysfunction
2. ใช้ในการตรวจติดตามภาวะ alloimmune response ในผู้ป่วยที่มีภาวะปฏิเสธไตหลังได้รับการรักษา หรือมีการปรับยากดภูมิ หากยังมี high alloimmune response ก็อาจจำเป็นต้องปรับปริมาณยาเพิ่ม หรือหากผลหลังการรักษาภาวะปฏิเสธไตแล้วพบว่า low immune response ก็อาจเป็นตัวชี้วัดว่าการรักษาน่าจะเพียงพอ ในทางตรงข้ามหากผู้ป่วยไม่มีประวัติภาวะไตปฏิเสธ หากผลการตรวจ MLR-CFSE เป็นภาวะ low immune response ผู้ป่วยก็น่าจะปรับลดปริมาณของยากดภูมิเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยา และในขณะเดียวกันการตรวจติดตามหลังลดยากดภูมิ ประเมินภาวะ alloimmune response เพื่อเฝ้าระวังการเกิดภาวะไตปฏิเสธก็เป็นสิ่งสำคัญ

การนำไปใช้ในเชิงงานวิจัยในอนาคต (Implication for further research)

1. ทำการศึกษา MLR-CFSE ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตในช่วงเวลาที่เกิดภาวะปฏิเสธไต ร่วมกับตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลง MLR-CFSE ในผู้ป่วยแต่ละราย เพื่อดูแนวโน้มและติดตามอาการผู้ป่วยไปพร้อมกัน
2. การใช้ MLR-CFSE ในการประเมินการปรับเพิ่มหรือลดยากดภูมิร่วมกับอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้น
3. ทำการศึกษาโดยใช้ post transplant MLR-CFSE ร่วมกับการทำ post transplant protocol biopsy เพื่อดูความสัมพันธ์และ ใช้ในการวินิจฉัย early allograft rejection
4. หากทำการศึกษาคงต้องมีการจำกัด inclusion criteria rejection ให้ชัดเจนเพื่อไม่มีความแตกต่างของเวลามากเกินไป เช่น กำหนดว่าระยะเวลาการเกิด renal allograft rejection ไม่เกิน 6 เดือนก่อนที่จะเข้าการศึกษา
5. ในปัจจุบันมีการศึกษา IL-17 ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตมากขึ้น ในอนาคตอาจจะมีการศึกษาถึงบทบาทของ IL-17 ในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต เช่น การใช้ความเข้มข้นของ supernatant IL-17 มาช่วยในการวินิจฉัยการเกิด allograft rejection ระยะแรก หรือใช้ตรวจติดตามการรักษา (follow up) ในผู้ป่วยที่มี renal rejection หลังได้รับการรักษาทั้งอาการและอาการแสดงทางคลินิก การตรวจระดับ creatinine และการทำ biopsy

สมมุติฐานที่ได้จากการวิจัย

1. ค่า stimulation index จาก MLR-CFSE ในผู้ป่วยที่มีภาวะไตปฏิเสธชนิด antibody mediated rejection และ cellular rejection มีความแตกต่างกัน
2. ปริมาณความเข้มข้นของ IL-17 ใน MLR-CFSE supernatant หลังการปลูกถ่ายไตมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยที่มีภาวะไตปฏิเสธและผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะไตปฏิเสธ

รายการอ้างอิง (references)

- [1]. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolckoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. **N Engl J Med** 2002;346:580-90.
- [2]. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. **N Engl J Med** 2000;342:605-12.
- [3]. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. **Nephrol Dial Transplant** 2009;24:1039-47.
- [4]. Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. **Nephrol Dial Transplant** 2006;21:1689-96.
- [5]. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. **N Engl J Med** 2007;357:2562-75.
- [6]. Starzl TE, Eliasziw M, Gjertson D, Terasaki PI, Fung JJ, Trucco M, et al. HLA and cross-reactive antigen group matching for cadaver kidney allocation. **Transplantation** 1997;64:983-91.
- [7]. Shrestha BM. Strategies for reducing the renal transplant waiting list: a review. **Exp Clin Transplant** 2009;7:173-9.
- [8]. Woo YM, Gill JS, Johnson N, Pereira BJ, Hariharan S. The advanced age deceased kidney donor: current outcomes and future opportunities. **Kidney Int** 2005;67:2407-14.
- [9]. Khalkhali HR, Ghafari A, Hajizadeh E, Kazemnejad A. Risk factors of long-term graft loss in renal transplant recipients with chronic allograft dysfunction. **Exp Clin Transplant** 2010;8:277-82.
- [10]. Premasathian N, Avihingsanon Y, Ingsathit A, Pongskul C, Jittiganont S, Sumethkul V. Risk factors and outcome of delayed graft function after cadaveric kidney transplantation: a report from the Thai Transplant Registry. **Transplant Proc** 2010;42:4017-20.
- [11]. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang AD, et al. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. **Transplantation** 2008;85:S3-9.
- [12]. Audard V, Maignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview. **Transpl Int** 2008;21:11-7.
- [13]. Hajeer AH. Panel Reactive Antibody test (PRA) in renal transplantation. **Saudi J Kidney Dis Transpl** 2006;17:1-4.

- [14]. Barama A, Oza U, Panek R, Belitsky P, MacDonald AS, Lawen J, et al. Effect of recipient sensitization (peak PRA) on graft outcome in haploidentical living related kidney transplants. *Clin Transplant* 2000;14:212-7.
- [15]. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu YR, Bresnahan BA, Cohen EP. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005;68:1834-9.
- [16]. Einollahi B, Jalalzadeh M, Taheri S, Nafar M, Simforoosh N. Outcome of kidney transplantation in type 1 and type 2 diabetic patients and recipients with posttransplant diabetes mellitus. *Urol J* 2008;5:248-54.
- [17]. U.S. Renal Data System, **USRDS 2008 Annual Data Report**, Two: Incidence & prevalence, Available at: URL: <http://www.usrds.org>. Accessed August 20 , 2009
- [18]. Kearnkiat P. **Thailand renal replacement therapy 2007**. Available at: URL: <http://nephrothai.org>.
- [19]. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725-30.
- [20]. Schwarz A, Mengel M, Gwinner W, Radermacher J, Hiss M, Kreipe H, et al. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney Int* 2005;67:341-8.
- [21]. Arias M, Fernandez-Fresnedo G, Rodrigo E, Ruiz JC, Gonzalez-Cotorruelo J, Gomez-Alamillo C. Non-immunologic intervention in chronic allograft nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2005:S118-23.
- [22]. Danovitch GM. Handbook of kidney transplantation. 5th ed. Philadelphia: USA; 2010.
- [23]. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.
- [24]. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-500.
- [25]. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4:438-43.
- [26]. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C, et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 2007;7:864-71.
- [27]. Iacomini J, Sayegh MH. Measuring T cell alloreactivity to predict kidney transplant outcomes: are we there yet? *J Am Soc Nephrol* 2006;17:328-30.

- [28]. Rodrigo E, Arias M. A practical approach to immune monitoring in kidney transplantation. **Minerva Urol Nefrol** 2007;59:337-52.
- [29]. Nickel P, Bestard O, Volk HD, Reinke P. Diagnostic value of T-cell monitoring assays in kidney transplantation. **Curr Opin Organ Transplant** 2009;14:426-31.
- [30]. Nickerson P. Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? **Curr Opin Immunol** 2009;21:563-8.
- [31]. Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H. Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. **J Immunol** 1995;155:5249-56.
- [32]. Gorbacheva V, Fan R, Li X, Valujskikh A. Interleukin-17 promotes early allograft inflammation. **Am J Pathol** 2010;177:1265-73.
- [33]. Vokaer B, Van Rompaey N, Lemaitre PH, Lhomme F, Kubjak C, Benghiat FS, et al. Critical role of regulatory T cells in Th17-mediated minor antigen-disparate rejection. **J Immunol** 2010;185:3417-25.
- [34]. Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. **Curr Opin Organ Transplant** 2010;15:411-5.
- [35]. อรวดี ชาญวิวัฒน์วงศ์. **วิทยานิพนธ์. วิทยานิพนธ์คัมภีร์พื้นฐานและคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ภาพพิมพ์; 2551.**
- [36]. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. **N Engl J Med** 2000;343:338-44.
- [37]. Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. **Kidney Int** 2002;61:1935-46.
- [38]. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. **N Engl J Med** 2010;363:1451-62.
- [39]. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. **N Engl J Med** 1998;338:1813-21.
- [40]. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. **N Engl J Med** 2003;349:2326-33.
- [41]. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. **Transplantation** 2005;80:1194-7.
- [42]. Lee PC, Zhu L, Terasaki PI, Everly MJ. HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. **Transplantation** 2009;88:568-74.
- [43]. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. **Am J Transplant** 2008;8:324-31.

- [44]. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. **Transplantation** 2005;79:591-8.
- [45]. Truong DQ, Bourdeaux C, Wieers G, Saussoy P, Latinne D, Reding R. The immunological monitoring of kidney and liver transplants in adult and pediatric recipients. **Transpl Immunol** 2009;22:18-27.
- [46]. Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? **J Am Soc Nephrol** 2006;17:2652-63.
- [47]. Cravedi P, Mannon RB. Noninvasive methods to assess the risk of kidney transplant rejection. **Expert Rev Clin Immunol** 2009;5:535-46.
- [48]. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. **Immunol Rev** 2003;196:247-64.
- [49]. Cullen PR, Lester S, Rouch J, Morris PJ. Mixed lymphocyte reaction and graft survival in forty cadaveric renal transplants. **Clin Exp Immunol** 1977;28:218-22.
- [50]. Nakagawa K, Matsuno T, Iwagaki H, Fujiwara T, Tanaka N. Analysis of the immune status in the recipients with long-term well-functioning kidneys allografts. **Acta Med Okayama** 2001;55:31-9.
- [51]. Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. **FASEB J** 2002;16:1456-7.
- [52]. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. **Immunol Cell Biol** 1999;77:499-508.
- [53]. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **J Immunol Methods** 2000;243:147-54.
- [54]. Hasbold J, Gett AV, Rush JS, Deenick E, Avery D, Jun J, et al. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Immunol Cell Biol** 1999;77:516-22.
- [55]. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J Immunol Methods** 1994;171:131-7.
- [56]. Fulcher D, Wong S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. **Immunol Cell Biol** 1999;77:559-64.
- [57]. Ohdan H. Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. **Clin Pharmacol Ther** 2010;87:23-6.

- [58]. Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD, et al. Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. **Transpl Immunol** 2008;20:78-82.
- [59]. Goulmy E, Persijn G, Blokland E, D'Amaro J, van Rood JJ. Cell-mediated lympholysis studies in renal allograft recipients. **Transplantation** 1981;31:210-7.
- [60]. Harmon WE, Parkman R, Lavin PT, Grupe WE, Ingelfinger JR, Yunis EJ, et al. Comparison of cell-mediated lympholysis and mixed lymphocyte culture in the immunologic evaluation for renal transplantation. **J Immunol** 1982;129:1573-7.
- [61]. Weimar W, Rischen-Vos J, de Kuiper P, Gregoor PJ, JN IJ, van Besouw NM, et al. Tapering immunosuppression in recipients of living donor kidney transplants. **Nephrol Dial Transplant** 2004;19 Suppl 4:iv61-3.
- [62]. Poggio ED, Clemente M, Riley J, Roddy M, Greenspan NS, DeJelo C, et al. Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. **J Am Soc Nephrol** 2004;15:1952-60.
- [63]. Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. **J Am Soc Nephrol** 2008;19:1419-29.
- [64]. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. **J Am Soc Nephrol** 2002;13:252-9.
- [65]. Bohmig GA, Wahrmann M, Saemann MD. Detecting adaptive immunity: applications in transplantation monitoring. **Mol Diagn Ther** 2010;14:1-11.
- [66]. Joanna Ashton-Chess, Magali Giral, Jean-Paul Soulillou, Brouard S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? **Transplant International** 2009:110-19.
- [67]. Nelson SD, Russell PS, McGeown MG. The lymphocyte transfer test and mixed cultures in kidney donor selection. **Proc Europ Dialysis and Transplant Ass** 1967;4:189-92.
- [68]. Bach JF, Debray-Sachs M, Crosnier J, Kreis H, Dormont J. Correlation between mixed lymphocyte culture performed before renal transplantation and kidney function. **Clin Exp Immunol** 1970;6:821-7.
- [69]. Cochrum KC, Salvatierra O, Belzer FO. Correlation between MLC stimulation and graft survival in living related and cadaver transplants. **Ann Surg** 1974;180:617-22.

- [70]. Kerman RH, Katz SM, Schoenberg L, Baraket O, Van Buren CT, Kahan BD. Ten-year follow-up of mixed lymphocyte reaction-hyporesponsive living related cyclosporine monotherapy-treated renal allograft recipients. **Transplant Proc** 1997;29:198-9.
- [71]. Creemers P, Du Toit E, Cassidy MJ, Kahn D. Sequential mixed lymphocyte culture after kidney transplantation: induction of tolerance or sensitization. **Nephron** 1997;75:166-70.
- [72]. El-Agroudy AE, Ismail AM, El-Chenawy FA, Shehab El-Din AB, Ghoneim MA. Pretransplant mixed lymphocyte culture still has an impact on graft survival. **Am J Nephrol** 2004;24:296-300.
- [73]. Ferraris JR, Tambutti M, Prigoshin N. Improved long-term graft function in kidney transplant recipients with donor antigen-specific hyporeactivity. **Pediatr Transplant** 2007;11:139-44.
- [74]. Jones AR, Bewick M, Vaughan RW, Batchelor JR. Transformation of lymphocytes from patients awaiting cadaver renal transplants. **Lancet** 1976;2:529-31.
- [75]. Ringden O, Moller E, Lundgren G, Groth CG. Role of MLC compatibility in intrafamilial kidney transplantation. **Transplantation** 1976;22:9-17.
- [76]. Thomsen M, Dickmeiss E. Correlation between mixed lymphocyte culture in compatibility and cadaver kidney graft rejection. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 1977:40-3.
- [77]. Cerilli J, Newhouse YG, Fesperman DP, Brasile L. The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation. **Surgery** 1980;88:631-5.
- [78]. Hajek-Rosenmayr A, Wolf A. [The significance of mixed lymphocyte culture and mitogen-stimulated culture for kidney transplantation (author's transl)]. **Wien Klin Wochenschr** 1981;93:457-60.
- [79]. Jeffery JR, Cheung K, Masniuk J, Taylor D. Mixed lymphocyte culture responses. Lack of correlation with cadaveric renal allograft survival and blood transfusions. **Transplantation** 1984;38:42-5.
- [80]. Ghobrial, II, Morris AG, Booth LJ. Clinical significance of in vitro donor-specific hyporesponsiveness in renal allograft recipients as demonstrated by the MLR. **Transpl Int** 1994;7:420-7.
- [81]. Kerman RH, Susskind B, Katz SM, Van Buren CT, Kahan BD. Postrenal transplant MLR hyporesponders have fewer rejections and better graft survival than MLR hyper-responders. **Transplant Proc** 1997;29:1410-1.
- [82]. Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Mitsuta H, Tashiro H, Itamoto T, et al. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. **Transplantation** 2005;79:1262-7.

- [83]. Ashokkumar C, Sun Q, Gupta A, Higgs BW, Fazzolare T, Remaley L, et al. Proliferative alloresponse of T-cytotoxic cells identifies rejection-prone children with steroid-free liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15:978-85.
- [84]. Ashokkumar C, Gupta A, Sun Q, Higgs BW, Ningappa M, Snyder S, et al. Proliferative alloresponse of T cytotoxic cells identifies rejection-prone children with small bowel transplantation. *Transplantation* 2010;89:1371-7.
- [85]. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148:32-46.
- [86]. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.
- [87]. Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002;197:322-32.
- [88]. Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, Verbeken EK, Meyts I, Bullens DM, et al. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2006;27:779-87.
- [89]. Fabrega E, Lopez-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15:629-33.
- [90]. Crispim JC, Grespan R, Martelli-Palomino G, Rassi DM, Costa RS, Saber LT, et al. Interleukin-17 and kidney allograft outcome. *Transplant Proc* 2009;41:1562-4.
- [91]. อรุณา สุขลิม. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาภูมิโชนิต์ก่อนการปลูกถ่ายไตกับผลลัพธ์ที่ได้หลังการปลูกถ่ายไต. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท** ภาควิชาอายุรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552
- [92]. Rashid A, Sengar DP, Harris JE. Relationship of donor-specific mixed lymphocyte culture reactivity to graft function in recipients of cadaveric renal allografts. *Clin Exp Immunol* 1979;36:521-7.
- [93]. Bueno V, Pestana JO. The role of CD8+ T cells during allograft rejection. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1247-58.
- [94]. Ehst BD, Ingulli E, Jenkins MK. Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *Am J Transplant* 2003;3:1355-62.

- [95]. Porrett PM, Lee MKt, Lian MM, Wang J, Caton AJ, Deng S, et al. A direct comparison of rejection by CD8 and CD4 T cells in a transgenic model of allotransplantation. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 2008;56:193-200.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย: การศึกษาปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิตด้วยการวิเคราะห์วิธีคาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนซ์ ไคโอะซีเตท-ซัลฟอนิไมด์ิล- เอสเทอร์

ชื่อ แพทย์หญิง พรรณทิพา ต้นสุวรรณค์

ที่อยู่: หน่วยไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail: tonpantipa@hotmail.com

เบอร์โทรศัพท์ (ที่ทำงานและมือถือ): 085-0075754 หรือ 02-2564000 ต่อ 101-102

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิตและติดตามการรักษาที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ ไม่มีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการทำงานของไต ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคไตวายเรื้อรังเป็นโรคที่พบบ่อยมากขึ้น การรักษาที่ดีที่สุดคือการปลูกถ่ายไต อย่างไรก็ตามผลลัพธ์หลังการปลูกถ่ายไตจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน ได้แก่ ปัจจัยผู้บริจาค ปัจจัยผู้รับไต เทคนิคการผ่าตัดและความเข้ากันได้ของผู้บริจาคและผู้รับ (สามารถประเมินได้ทั้งก่อนผ่าตัดและหลังผ่าตัดปลูกถ่ายไต) การตรวจติดตามผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตที่สำคัญคือ ค่าครีเอตินีน การเจาะชิ้นเนื้อไต การดู (ค่าการทำงานของไต) นกมิกซ์กันต่อไตผู้บริจาค เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ของไตผู้บริจาคและผู้รับ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ได้จากเลือดผู้บริจาคและผู้รับบริจาค นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน แล้วประเมินดูความสัมพันธ์ค่าผลตรวจดังกล่าว กับผลการรักษา ซึ่งอาจจะนำไปใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตในอนาคต เช่น ใช้เป็นแนวทางในการปรับยาเคมีคุ้มกันให้เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละคน และเป็นตัวชี้วัด เพื่อ

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะนัดหมายท่านและผู้บริจาคไต มาเพื่อเจาะตรวจเลือดพร้อมกัน การเจาะเลือดทำโดยพยาบาลหน่วยไต ปริมาณเลือดที่ใช้ตรวจประมาณ 60 ซีซี (4 ซ่อนโตะ) จากนั้นจะนำเลือด (ผู้ป่วยและผู้บริจาค) ที่ได้มาปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงร่วมกันโดยใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน หลังจากนั้นก็นับแยกเซลล์ที่มีการแบ่งตัว ถ้าเซลล์ผู้บริจาคและผู้รับมีความแตกต่างกันจะมีการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่า ในกรณีที่เซลล์ผู้บริจาคและผู้รับมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งค่าที่วัดได้จะนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยหากผลการตรวจเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมีความผิดพลาด ซึ่งอาจจะเกิดจากเทคนิคการตรวจเลี้ยงเซลล์ มีผลทำให้การนับแยกเซลล์ไม่ได้ ทางผู้วิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน ในการเจาะตรวจเลือดซ้ำ 1 ครั้งในปริมาณเท่าเดิม

ระยะเวลาที่อาสาสมัครแต่ละคนต้องอยู่ในโครงการ

ประมาณ 1 ปีเริ่มตั้งแต่เข้าร่วมโครงการ – พ.ศ. 2554

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด (โดยทั่วไปการเสียเลือดปริมาณ 60 ซีซี หรือประมาณ 4 ซ่อนโตะ ที่ใช้ตรวจในการวิจัยเป็นปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับในร่างกาย จึงไม่มีผลต่อระบบไหลเวียนเลือด) และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านอาจไม่ได้รับประโยชน์โดยตรง แต่หากผลการศึกษาพบความสัมพันธ์ของการตรวจปฏิกิริยาภูมิแพ้ ไซโตของผู้บริจาค และผลการปลูกถ่ายไตและการปฏิเสธไต อาจสามารถนำค่าที่ได้ไปใช้ทำนายผลลัพธ์การปลูกถ่ายไต และปรับเปลี่ยนยากดภูมิคุ้มกันให้กับผู้ป่วยที่เหมาะสมในอนาคต

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทางผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลหรือหากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ

แพทย์หญิง พรรณนิภา ต้นสุวรรณค์ ได้ตลอด 24 ชั่วโมง เบอร์โทรศัพท์ 085-0075754

ทางผู้วิจัยจะมีเงินค่าชดเชยค่าเดินทางและค่าเสียเวลาให้แก่ท่าน ในกรณีที่นัดมาเพื่อทำวิจัย นอกเหนือจากการนัดปกติ ท่านละ 200 บาท

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ค่าใช้จ่ายในการเจาะเลือดและการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

การเก็บข้อมูลต่างๆในการวิจัยจะไม่มีกระบวนการหรือข้อมูลที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วยและผู้บริจาคไต และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับ มีเพียงผู้วิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษาเท่านั้นที่ทราบข้อมูล

ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน การนำเสนอผลการวิจัยจะเป็นภาพรวมของการศึกษาทั้งหมด ไม่ได้ระบุรายบุคคล

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

ภาคผนวก ข

หนังสือยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

การวิจัยเรื่อง: การศึกษาปฏิกริยาเคมีไฟฟ้าในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิตด้วยการวิเคราะห์วิธีคาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนซ์อินโดอะซีเตท-ซัลฟิโนมิดิล-เอสเธอร์

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่

อยู่.....ได้อ่าน

รายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และ

ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ค
แบบเก็บข้อมูลงานวิจัย

เลขที่แบบสอบถามหมายเลขID

แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูล

ชื่อโครงการ: การศึกษาปฏิกิริยาภูมิแพ้ไตในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคมีชีวิตด้วยการวิเคราะห์วิธีคาร์บอกซี-ฟลูออเรสเซนซ์ ไดอะซีเตท- ซัลฟิไนไมดิล- เอสเทอร์

I. ข้อมูลส่วนตัวผู้รับบริจาคไต

- | | | |
|---------------------------------|---|----------------|
| 1. อายุ | R-AGE | |
| 2. เพศ (1) ชาย (2) หญิง | R-SEX | |
| 3. น้ำหนัก..... | Wt | |
| 3. วันที่ผ่าตัดปลูกถ่ายไต | S-DATE | |
| 4. สาเหตุของโรคไตวายเรื้อรัง | CAUSE | |
| 1. Diabetic neuropathy | 2. Presumed of chronic glomerulonephritis | |
| 3. Hypertensive glomerulopathy | 4. IgA nephropathy | |
| 5. primary FSGS | 6. Obstructive uropathy | |
| 7. ADPKD | 8. Unknown cause | |
| 9. Other: (ระบุ) | | |
| 5. โรคประจำตัวที่พบร่วม | Co-morbid | |
| 1.DM | 2.Post transplant DM | 3.Hypertension |
| 4.HCV/HBV infection | 5.Autoimmune disease | 6.Gout |
| 7.Dyslipidemia | 8. Other : (ระบุ) | |

II. การประเมินทาง Immune(Immunological assessment)

- | | |
|--|-----|
| 6. HLA mismatch.....ตำแหน่ง (.A...B....DR...) | HLA |
| 7. Pre-transplantation Panel-reactive antibody.....% | PRA |
| 8. Pre-transplant. Donor specific antibody | DSA |
| (1) Positive (2) Negative | |

III. การรักษาและผลการรักษาหลังผ่าตัดปลูกถ่ายไต

- | | |
|--------------------------------|--------|
| 9. Induction therapy | Induct |
| (1) yes = (2) no = | |

10. Maintenance Immunosuppressive drugs	MS
1. Azathioprine + Cyclosporine + Prednisolone	
2. Azathioprine + MMF+ Prednisolone	
3. Rapamune + minimized Cyclosporine + Prednisolone	
4. MMF+ Tacrolimus + Prednisolone	
11. Dose of CNI	CNI
12. Dose of MMF	MMF
14. Date of biopsy.....	Bx-DATE
15. Pathological findings & diagnosis	PATHO
.....	
.....	
16. Outcome(s):	
1. History of acute rejection	OUTCOME
2. History of chronic rejection	
3. History of acute & chronic rejection	
4. Long term graft function	
<u>IV.lab investigation</u>	LAB
17. Last serum creatinine:	R-Cr
18. Calculated GFR by MDRD.....	R-GFR
19. Urine 24 hour for total protein.....	U-protein
20. Hemoglobin.....	Hb
21. WBC.....	WBC
22. Platelet.....	Plt
23.Sodium	Na
24.Potassium.....	K
25.Bicarbonate.....	HCO ₃
24.Chloride.....	Cl
25.Calcium.....	Ca
26.Phosphate.....	PO ₄
27.Dietary protein intake (DPI).....	DPI

V. การประเมินความสัมพันธ์

28 .proliferation index: by FLOWJO software analysis	PI
Baseline recipient PBMCs	
Recipient PBMCs stimulate with PHA.....	
Baseline donor irradiated PBMCs.....	
Donor irradiated PBMCs stimulate with PHA.....	
Recipient PBMCs stimulate with specific donor.....	
Recipient PBMCs stimulate with pool donor	
29. Stimulation index	SI
30. ปริมาณ CD4.....	CD4
31. ปริมาณ CD8.....	CD8
32. Ratio of CD4/CD8.....	R-CD4/CD8
33. Concentration of IL-17	IL-17
Baseline recipient PBMCs	
Recipient PBMCs stimulate with PHA.....	
Baseline donor irradiated PBMCs.....	
Donor irradiated PBMCs stimulate with PHA.....	
Recipient PBMCs stimulate with specific donor.....	
Recipient PBMCs stimulate with pool donor	

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ. พรรณนิพา ต้นสุวรรณค์

วันเดือนปีเกิด 11 พฤศจิกายน พ.ศ.2523 จังหวัดนครพนม

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

- นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2542-2548
- แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2548-2549
- แพทย์ใช้ทุนสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2549-2552

ปริญญาและประกาศนียบัตร

- แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ2) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2548
- วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์ พ.ศ. 2552

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

- สมาชิกแพทยสภา
- สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย
- สมาชิกสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย
- สมาชิกสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย