

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

We would like to thank the Chula Medical Research Center (Chula MRC), Chula Clinical Research Center (Chula CRC), and Research Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. We also gratitude to the following funding supports; the Post-Doctoral support from the Ratchadaphiseksomphot Fund Chulalongkorn University, and Research, Development and Engineering National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

We appreciate all staff members of 1) the Renal Unit, Department of Medicine, Department of Pathology, Chulalongkorn University, 2) Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kean University, 3) Department of Medicine, Nopparat Ratjathanee Hospital , 4) Department of Medicine, Khon Kean Hospital, and 5) Department of Medicine, Phramongkutklao Hospital. Like for their helpful hands.

Last but not least, the loyalty and patience of our beloved lupus patients that gave all their hope to the treatment and research. The SmiLE club and the nursing team that provide the best care to the lupus patients.

บทคัดย่อ (Abstract)

การวิจัยนี้เน้นเรื่องการติดตามผลการรักษาในโรคไตอักเสบเรื้อรัง เพื่อลดอัตราการเกิดไตวายเรื้อรัง ซึ่งพบว่าโรคไตเรื้อรังในประเทศไทยมีสาเหตุมาจากโรคไตอักเสบเรื้อรังเป็นลำดับต้นๆ และการป้องกันโรคนี้ น่าจะลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดทดแทนไตลงได้

วิธีการวินิจฉัยมาตรฐานของโรคไตอักเสบเรื้อรังคือ การเจาะชิ้นเนื้อไตซึ่งเป็นการตรวจที่มีความเสี่ยงให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและต้องเจ็บตัว การตรวจหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในเลือดหรือปัสสาวะ เป็นการตรวจที่ง่ายและไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัว ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปเพื่อทดสอบทั้งประสิทธิภาพของ ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ที่สามารถใช้ในการติดตามการรักษาและพยากรณ์โรคไตอักเสบเรื้อรังได้ โดยการศึกษาเป็น แบบสหสถาบัน ประกอบด้วย โรงพยาบาลระดับตติยภูมิ ๖ แห่งในประเทศไทย

การวิจัยค้นหา biomarker ในเลือดและในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรัง ส่วนใหญ่เป็น การศึกษาแบบ cross-sectional เพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับตัวบ่งชี้กับการกำเริบของโรคหรือระดับความ รุนแรงของพยาธิสภาพที่ไต แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ดีควรเป็นแบบ longitudinal ซึ่งเป็นการศึกษาถึง ประสิทธิภาพในการนำ biomarkers มาใช้ได้จริงทางคลินิก เพื่อติดตามการดำเนินโรค, การตอบสนองต่อการ รักษา, การทำนายพยากรณ์โรค ในปัจจุบันการนำ biomarker เพียงตัวเดียวมาใช้ในการติดตามการดำเนินโรค ไตอักเสบเรื้อรังพบว่ามีประสิทธิภาพที่ไม่ดีนัก จึงเริ่มมีความสนใจในการนำ biomarker หลายๆตัวร่วมกัน วิเคราะห์ เพื่อเพิ่มทั้งความไว, ความเฉพาะเจาะจงและประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจตัวบ่งชี้ 4 ตัว ที่ เป็นโปรตีนที่ผลิตในไตและมีบทบาทในการเกิดการอักเสบ และเป็นพยาธิกำเนิดที่สำคัญของโรคไตอักเสบเรื้อรัง

ผลการศึกษาโดยสรุปพบ ปริมาณของ TWEAK และ TWEAK normalized ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์ กับ eGFR โดยที่พบว่าถ้าปริมาณของ TWEAK ในปัสสาวะเพิ่มขึ้น 1 หน่วยจะทำให้ค่า eGFR ลดลงร้อยละ 6.5 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ APRIL ในเลือดมีความสัมพันธ์กับค่า eGFR โดยพบว่าถ้า APRIL ในเลือดเพิ่มขึ้น 1 หน่วยมีความสัมพันธ์กับค่า eGFR ลดลงร้อยละ 7 และในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (non-remission) หลังได้รับการรักษาเป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน จะมีปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะ ณ วันเริ่มต้น การรักษาส่งกว่าผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในอนาคตควรพัฒนาการใช้ตัวบ่งชี้หลายตัว (APRIL & TWEAK) ในเลือดหรือปัสสาวะในการ พยากรณ์การเสื่อมของไต (declined GFR) โดยอาศัยความเชื่อมโยงของแหล่งทุนวิจัยที่สนับสนุน โครงการตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคไต ให้สามารถบูรณาการตั้งแต่การค้นพบใหม่ การยืนยันการนำไปใช้ จริงทางคลินิก และการพัฒนาให้ใช้สะดวกและรวดเร็ว

ABSTRACT This study is to determine the use of therapeutic monitoring of biomarkers in lupus kidney disease. It is known that lupus is one of the leading causes of chronic kidney disease in Thailand. Prevention of CKD can reduce the burden of long-term renal replacement therapy.

Gold standard of diagnosis is kidney biopsy study which is invasive. The procedure may be harmful. Therefore, urine and blood samplings for biomarkers could be used. This was a multicenter study to evaluate the efficacy of 4 biomarkers in diagnosis/prognosis of lupus kidney disease.

Most studies were cross-sectional study to show an association between severity or activity of disease and the potential biomarker(s). However, a longitudinal study is required to demonstrate the clinical use as a prognostic index in a longer term follow-up. Moreover, multiple biomarkers rationally are better than single marker in terms of accuracy and reliability of test. This study used 4 markers with relevant functions in the progression of lupus kidney disease.

In brief, urine TWEAK and normalized TWEAK was associated with decreased kidney function (estimated GFR). One unit of urine TWEAK was determined a 6.5 % reduction of eGFR. Moreover, serum APRIL was associated with 7 % reduction of eGFR as well. Urine TWEAK was also associated with treatment response. Higher urine TWEAK was found in the non-responder group.

In the near future, the combined biomarkers (TWEAK and APRIL) should be useful in the therapeutic monitoring of lupus kidney disease. The integration of funding supports can support biomarker researches from the discovery, validation and development of point-of-care testing.

คำสำคัญ (Key words)

Biomarker,

Lupus nephritis,

Therapeutic monitoring

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
1. บทนำ	8
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	11
3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	15
4. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	16
5. ผลการวิจัย	20
6. สรุป, อภิปราย และวิจารณ์ผลการวิจัย	30
7. แผนงานในอนาคต	33
8. บรรณานุกรม (Bibliography)	35
ภาคผนวก 1 (Appendix I) : ข้อมูลหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัย	39
ภาคผนวก 2 (Appendix II) : ผลงานตีพิมพ์ (Manuscript)	44

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง Patient Characteristics	22
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) 3 และ 6 เดือนหลังการรักษาจำนวน 65 ราย	23
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง TWEAK กับ TWEAK normalized และ NGAL และ NGAL normalized กับความสัมพันธ์กับ eGFR	24
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) และระดับโปรตีนAPRIL และ S100A8/A9 complex ในปัสสาวะของผู้ป่วยเมื่อ เริ่มการรักษา, 3 และ 6 เดือนหลังการรักษาจำนวน 53 ราย	25
ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง APRIL และ S100A8/A9 complex กับความสัมพันธ์กับ eGFR	26
ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างปริมาณโปรตีนที่ศึกษากับการตอบสนอง ต่อการรักษา (Remission stage) ในผู้ป่วย LN	29
ตารางที่ 7 สรุปความสัมพันธ์ และค่าทางสถิติของโปรตีนที่ศึกษาในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา และไม่ตอบสนองต่อการรักษา	30
ตารางที่ 8 แสดงความเชื่อมโยงของแหล่งทุนวิจัยที่สนับสนุนโครงการตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ของโรคไต โดยมีจุดประสงค์และวิธีการวิจัยที่ครอบคลุมตั้งแต่การค้นพบใหม่ การยืนยันการนำไปใช้จริงทางคลินิก และการพัฒนาให้ใช้สะดวกและง่าย	34

สารบัญภาพ (List of Illustration)

	หน้า
รูปที่ 1 ระดับการแสดงออกของ S100A8 และ S100A9 mRNA ในชิ้นเนื้อไตของ ผู้ป่วย Active lupus nephritis ที่มีผลการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกัน ภายในระยะเวลา 6 เดือน	14
รูปที่ 2 เกณฑ์ของ active nephritis แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มการรักษา	16
รูปที่ 3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ได้จากโครงการวิจัยคลินิกสหสถาบัน 5 สถาบัน	18
รูปที่ 4 การวัดปริมาณโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	19
รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของค่า eGFR กับ โปรตีน APRIL	26

1. บทนำ

โรคไตอักเสบรูปีส (Lupus nephritis) เป็นรูปแบบของการแสดง (clinical manifestation) ที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคลูปีส (systemic lupus erythematosus) ที่ก่อให้เกิดทุพพลภาพและเพิ่มอัตราการเสียชีวิตต่อผู้ป่วย เนื่องจากโรคไตอักเสบรูปีสก่อให้เกิดการเสื่อมของการทำงานของไต จนอาจเกิดภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายได้ (end stage renal disease) การดำเนินของโรคไตอักเสบรูปีสเป็นได้ 2 แบบ ได้แก่ ไตวายรุนแรงฉับพลันแบบ Rapid Progressive Glomerulonephritis (RPGN) ซึ่งมักไม่ตอบสนองต่อการรักษาและนำไปสู่ไตวายระยะสุดท้ายภายในเวลาไม่กี่เดือน ในขณะที่ผู้ป่วยอีกจำนวนหนึ่งเป็นแบบที่สอง ซึ่งเกิดการกำเริบซ้ำๆ หลายครั้งแล้วมีการเสื่อมลงของไตซ้ำๆจนเข้าสู่ไตวายระยะสุดท้ายเช่นกัน ดังนั้นปัญหาที่สำคัญของโรคไตอักเสบรูปีสคือการกำเริบ (renal flare) ซึ่งเกิดได้บ่อยและสัมพันธ์กับอัตราการเป็นไตวายเรื้อรังและเสียชีวิต รวมถึงการติดตามการตอบสนองต่อการรักษายามาตรฐาน (therapeutic monitoring) ซึ่งเป็นตัวช่วยสำคัญให้แพทย์ทราบถึงพยากรณ์ของโรคได้อีกด้วย

การติดตามการตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยลูปีสจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากลักษณะการดำเนินโรคที่มีความเรื้อรัง ผู้ป่วยจำเป็นต้องติดตามการรักษากับแพทย์ไปตลอดชีวิต โดยต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดกำเริบของโรค (renal flare) จากผลสถิติพบว่าเกิดการเกิดไตวายเรื้อรังเพิ่มสูงขึ้นเป็นสัดส่วนตามจำนวนครั้งของการกำเริบของไตอักเสบ โดยที่การกำเริบนี้มักเกิดในช่วง 1-3 ปีแรกภายหลังไตอักเสบครั้งแรก และการกำเริบมักส่งผลให้การเกิดพังผืดในไต (scarring, fibrosis) เพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกๆ ครั้ง ยิ่งไปกว่านั้นการรักษาการกำเริบในแต่ละครั้งจำเป็นต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกัน Cyclophosphamide ร่วมกับยา Corticosteroids จากการศึกษาพบว่าการใช้ยา Cyclophosphamide ร่วมกับยา Corticosteroids นั้นสามารถทำให้โรคสงบได้ประมาณ 80 % แต่ยังมีผู้ป่วยถึง 20% ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาที่ให้ในครั้งแรก นอกจากนั้นในกลุ่มผู้ป่วยที่โรคสงบจากการให้ยาครั้งแรกมีโอกาสกลับเป็นซ้ำ (relapse) ได้ถึงหนึ่งในสาม แม้ว่าจะยังได้รับยากดภูมิต้านทานอยู่ ดังนั้นการติดตามผลการรักษาและการกำเริบของโรคจะช่วยให้แพทย์ผู้รักษาดูแลการเปลี่ยนแปลงการดำเนินโรคของผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องและตัดสินใจรักษาการกำเริบไตอักเสบรูปีสได้ทันที่และเหมาะสม ซึ่งเป็นการลดอัตราการเสื่อมของการทำงานของไต (renal failure) และลดผลข้างเคียงจากการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ภาวะติดเชื้อแทรกซ้อน (infection), กระดูกผุ (osteoporosis), ภาวะผิดปกติของระบบเจริญพันธุ์ (ovarian failure), รวมทั้งกระทบต่อรูปลักษณ์ของผู้ป่วย เช่น หน้าและลำตัวบวม (cushing syndrome)

ในปัจจุบันการศึกษามลของการรักษาสามารถจำแนกการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยออกเป็น complete remission, partial remission, และ non remission ซึ่งการตอบสนองต่อการรักษาแต่ละประเภทมีพยากรณ์โรคในระยะยาวที่แตกต่างกันออกไป เช่น complete remission มีอัตราการไม่เกิดไตวายระยะสุดท้ายถึงร้อยละ 94 ของผู้ป่วยที่เวลา 10 ปี ในขณะที่ผู้ป่วย non remission มีอัตราการไม่เกิดไตวายระยะสุดท้ายนี้เพียง ร้อยละ 13 เท่านั้น และอีกหนึ่งการศึกษาที่ติดตามผู้ป่วยนาน 10 ปี ยังพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาจนได้ complete remission มีพยากรณ์โรคดีที่สุด ได้แก่ ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 10 ปี

เท่ากับ ร้อยละ 95 และอัตราการรอดจากไตวายระยะสุดท้าย (renal survival) ที่ 10 ปีเท่ากับ ร้อยละ 94 ในขณะที่ผู้ป่วยที่ผลการรักษาได้เพียง partial remission นั้น มีอัตราการรอดชีวิตที่ 10 ปีเท่ากับ ร้อยละ 76 และอัตราการรอดจากไตวายระยะสุดท้าย (renal survival) ที่ 10 ปีเท่ากับ ร้อยละ 45 เท่านั้น ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยที่ไม่เคยได้ remission เลยนั้นมีพยากรณ์โรคที่เลวที่สุด คือ มีอัตราการรอดชีวิตที่ 10 ปีเพียง ร้อยละ 46 และอัตราการรอดจากไตวายระยะสุดท้าย (renal survival) ที่ 10 ปีเท่ากับ ร้อยละ 13 เท่านั้น

จากข้อมูลข้างต้นจึงทำให้เห็นถึงผลประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษา (therapeutic monitoring) โรคไตอักเสบเรื้อรัง เพื่อลดอัตราการเกิดไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย อันจะนำไปสู่คุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ลดอัตราการเกิดความพิการและทุพพลภาพ และลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการบำบัดทดแทนไตตลอดชีวิต

ในปัจจุบันวิธีการติดตามการดำเนินโรคและการรักษาที่ดีที่สุด (gold standard) ของโรคไตอักเสบเรื้อรังคือการเจาะชิ้นเนื้อไตซึ่งเป็นการตรวจที่มีความเสี่ยงและต้องเจ็บตัว (invasive procedure) และอาจก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนแก่ผู้ป่วยดังนั้นการตรวจหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ(Biomarker)ในปัสสาวะซึ่งเป็นการตรวจที่ง่ายและไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัว (non-invasive procedure) น่าจะเกิดประโยชน์อย่างสูง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปเพื่อทดสอบทั้งประสิทธิภาพและประสิทธิผลของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ(Biomarker) ที่สามารถใช้ในการติดตามการรักษาและพยากรณ์โรคไตอักเสบเรื้อรังได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและช่วยทำให้คุณภาพชีวิตผู้ป่วยดีขึ้น

การศึกษาจะถูกจัดทำในลักษณะแบบ multicenter ในกลุ่มผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังจากสถาบันประกอบด้วย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น และโรงพยาบาลนพรัตนราชธานี ซึ่งจะเป็นการศึกษาทั้ง cytokine และ chemokine ในปัสสาวะผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง ซึ่งการตรวจ cytokine และ chemokine ในปัสสาวะน่าจะเป็นตัวบ่งชี้การอักเสบของไตได้ดีกว่าในเลือด เพราะเป็นโปรตีนที่ผลิตในไต (intra-renal cytokine) ในภาวะที่ไตเกิดการอักเสบ

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยค้นหา biomarkers ของโรคไตอักเสบเรื้อรังทั้งในเลือดและในปัสสาวะมีเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยในระดับ cross-sectional study ที่พบความสัมพันธ์ของระดับ biomarkers กับ SLE renal disease activity หรือระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพที่ไต แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา biomarkers แบบ longitudinal cohort study ยังมีน้อย ซึ่งเป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการนำ biomarkers มาใช้ได้จริงทางคลินิกเพื่อติดตามการดำเนินของโรค, การตอบสนองต่อการรักษา, การทำนายพยากรณ์โรค ในปัจจุบันการนำ biomarker เพียงตัวเดียวมาใช้ในการติดตามการดำเนินโรคไตอักเสบเรื้อรังพบว่ามีประสิทธิภาพที่ไม่ดีนัก ดังนั้นจึงเริ่มมีความสนใจในการนำ biomarker หลายๆตัวร่วมกันวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มทั้งความไว, ความเฉพาะเจาะจง และประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจ biomarkers 4 ตัว คือ NGAL, TWEAK, APRIL และ S100A8/S100A9 complex (Calprotectin) เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ผลิตในไตและมีบทบาทในการเกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งเป็นพยาธิกำเนิดที่สำคัญของโรคไตอักเสบเรื้อรัง

2.1 NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)

NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) เป็น glycosylated protein ถูกพบทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil และในอวัยวะต่างๆ โดย NGAL เกี่ยวข้องในหลายบทบาทหน้าที่ เช่น iron transportation, apoptosis, bacteriostasis ในปัจจุบันพบปริมาณ NGAL มากขึ้นในเซลล์ไตที่มีภาวะ acute renal injury ทั้งจากสาเหตุ inflammation, ischemia และ infection (1-4) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ NGAL ในเลือดและในปัสสาวะสัมพันธ์กับอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate) ซึ่งเหนือกว่าค่า creatinine ในเลือด (5) จากการศึกษาใน in vitro model พบว่าเมื่อกระตุ้น kidney mesangial cell ของหนู lupus ด้วย Anti-ds DNA antibody แล้วพบว่าการผลิตของ NGAL จากเซลล์ไตสูงขึ้น (6)

การศึกษาในผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรังแบบ cross-sectional study (7, 8) พบว่าระดับ NGAL ในปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยเอสแอลอีที่ไม่มีภาวะไตอักเสบ, ผู้ป่วยโรค autoimmune อื่นและคนปกติ ยังพบอีกว่า urine NGAL มีความสัมพันธ์กับการทำงานของไต เช่น ค่า UPCI (urine protein to creatinine ratio) ในปัสสาวะ และค่า creatinine ในเลือด และยิ่งไปกว่านั้นค่า urine NGAL ยังสัมพันธ์กับค่า serology ของโรคเอสแอลอีอีกด้วย เช่น Anti-ds DNA, complement C3, C4

การศึกษา longitudinal-sectional study (9) โดยติดตามผู้ป่วยเด็กโรคไตอักเสบเรื้อรังจำนวน 111 คน ทุกๆ 3 เดือน พบว่าปริมาณ NGAL ในปัสสาวะสามารถทำนายการกำเริบของโรคได้ โดยค่า NGAL ในปัสสาวะจะมีค่าสูงขึ้น 104% ก่อนที่จะมีการกำเริบ 3 เดือน และอีกหนึ่งการศึกษา (10) ยืนยันผลการใช้

ปริมาณ NGAL ในปัสสาวะสามารถทำนายการกำเริบของโรคไตอักเสบรูมาตอยด์ด้วยค่า AUC เป็น 0.76 ซึ่งให้ค่าที่สูงกว่าค่า AUC ของ anti-ds DNA titer

2.2 TWEAK (Tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis)

TWEAK (Tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis) เป็น pro-inflammatory cytokine อยู่ในกลุ่มของ TNF-ligand superfamily ซึ่งพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและที่ไต ด้วยจากการศึกษาพบว่า TWEAK มีส่วนสำคัญในการเกิดโรคไตอักเสบรูมาตอยด์ โดย TWEAK สามารถกระตุ้นเซลล์ไต (mesangial cell) ทั้งของหนู lupus และของคน(11, 12)ให้ผลิต pro-inflammatory cytokine เช่น IP-10, MCP-1, RANTES ดังนั้น TWEAK เป็น primary mediator ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง cytokine ที่มีผลต่อการเกิดไตอักเสบรูมาตอยด์

การศึกษาในผู้ป่วยโรคไตอักเสบรูมาตอยด์แบบ cross-sectional study (13)พบว่าระดับ TWEAK ในปัสสาวะสามารถแยกผู้ป่วยที่มีภาวะไตอักเสบในระยะโรคกำเริบ (active flare) และ ระยะสงบ (inactive) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.029) และค่า AUC เป็น 0.724 รวมถึงระดับ TWEAK ในผู้ป่วยไตอักเสบรูมาตอยด์มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยโรค autoimmune อื่น เช่น โรค rheumatoid arthritis และคนปกติและยังพบว่าปริมาณ TWEAK ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของไตอักเสบ (renal SLE disease activity index score) ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย ส่วนการศึกษาแบบติดตามผู้ป่วย (longitudinal cohort study) จำนวน 45 คนทุกๆ 3 เดือนเป็นเวลา 1 ปี พบว่าปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงตาม renal disease activity โดยเริ่มมีค่าสูงขึ้นในช่วงกำเริบของโรคและค่าต่ำลงเมื่ออยู่ในช่วงตอบสนองต่อการรักษา(14)

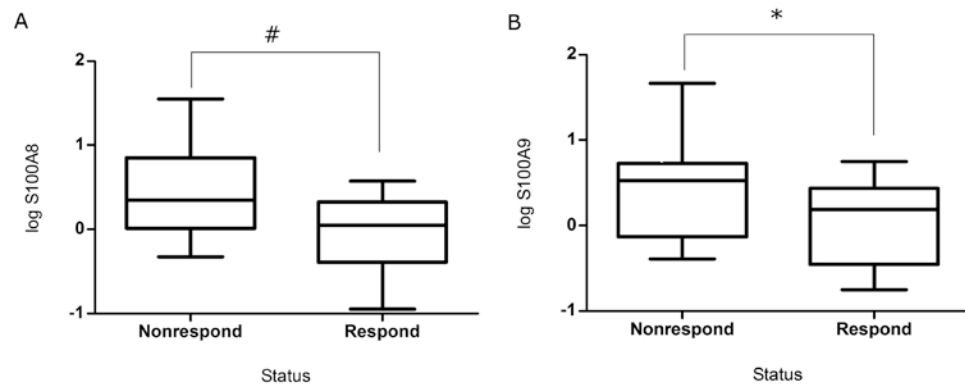
2.3 APRIL (A Proliferation-inducing Ligand)

APRIL (A Proliferation-inducing Ligand) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13 (TNFSF13) เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes/macrophages, dendritic cells, neutrophils, activated T cells, B cells และ non-hematopoietic cells(15)ซึ่ง APRIL จัดเป็น B-cells activating factor โปรตีนในกลุ่มของ TNF-ligand superfamily ทำหน้าที่เกี่ยวกับ B-cell survival โดยจะยับยั้ง B cell apoptosis และส่งเสริมการเกิด B-cell proliferation และ maturation รวมทั้งการสร้าง antibody และ IgG class switching(16-18) การศึกษาใน animal model พบว่าเมื่อทำการ Knockout gene APRIL ใน lupus-prone mice (NZM.April^{-/-}) จะทำให้หนูมีอาการกำเริบของโรคช้าลง และเมื่อทำการ Knockout gene APRIL และ BAFF (NZM.Baff^{-/-} April^{-/-}) พร้อมกันทั้งสอง genes หนูจะมีพยาธิสภาพในไตดีขึ้นกว่าหนู lupus-prone mice ปกติ(19)สำหรับการศึกษาในคนพบว่าผู้ป่วย autoimmune disease ได้แก่ SLE, primary Sjögren's syndrome และ rheumatoid arthritis จะมีปริมาณโปรตีน APRIL และ BAFF ใน serum สูงกว่าคนปกติในปี 2013 ที่ผ่านมา Petri MA. และคณะได้ทำการศึกษาแบบ multivariate analysis พบว่าปริมาณ BAFF ที่มีความเข้มข้นสูงใน serum ของผู้ป่วยไตอักเสบรูมาตอยด์สามารถทำนายความรุนแรงของโรค (moderate-to-

severe) ได้ โดยมีค่า cutoff ที่ความเข้มข้น ≥ 2 ng/ml (20) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองอื่นๆ ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของ serum BAFF สัมพันธ์กับ flare lupus nephritis แต่ทั้งนี้การศึกษาเกี่ยวกับ APRIL กับโรคไตอักเสบเรื้อรังยังมีอยู่น้อยมากและไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ APRIL กับความรุนแรงของโรค รวมทั้งการทํานายและติดตามผลการรักษาด้วย

2.4 S100A8/S100A9 complex(Calprotectin)

S100A8/S100A9 complex (Calprotectin) เป็นโปรตีนในกลุ่ม calcium-binding protein ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes/macrophages และ neutrophils ทำหน้าที่เป็น Pro-inflammatory protein ช่วยชักนำ inflammatory cells มายังบริเวณที่มีอาการอักเสบ(21) ในสภาวะปกติ จะพบ heterodimer ของ S100A8/S100A9 และเมื่อร่างกายมีปริมาณ calcium เพิ่มขึ้น S100A8/S100A9 จะสามารถจับกันได้เป็น tetramers ได้(22) ทั้งนี้หน้าที่ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของ S100A8 ใน innate immunity คือเป็น anti-oxidant โดยจากการศึกษาพบว่าทั้งโปรตีน S100A8 และ S100A9 จะถูกกระตุ้นผ่านทาง Toll-like receptor และ IL-1 pathway(23) ในผู้ป่วย Rheumatoid arthritis (RA) และ osteoarthritis (OA) พบการเพิ่มสูงขึ้นของปริมาณ S100A8 และ S100A9 ในน้ำไขข้อ (synovial fluid) ของผู้ป่วยเมื่อเทียบกับคนปกติ ทั้งนี้ในผู้ป่วย RA จะมีปริมาณดังกล่าวนี้มากกว่า OA ถึง 10 เท่า(24) ในผู้ป่วย SLE, Tydén H และคณะ พบปริมาณ S100A8/A9 ใน serum ของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ (1412 ± 664 ng/ml versus 339 ± 35 ng/ml, $p=0.004$) และพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญของปริมาณ S100A8/A9 ที่เพิ่มขึ้นกับค่า SLEDAI score ($r = 0.219$; $p = 0.015$)(25) ต่อมาการศึกษาของ Lood C และคณะสามารถวัดปริมาณการแสดงออกของ S100A8/A9 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย SLE ด้วยวิธี Flow cytometry โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการกำเริบของโรค (active) และเมื่อทำการแยก plasmacytoid dendritic cells จากผู้ป่วยมาศึกษา *in vitro* พบว่าเซลล์ดังกล่าวนี้จะสามารถสร้าง S100A8/A9 ได้เพิ่มขึ้นในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย immune complex(26) สำหรับการศึกษาใน kidney biopsy ของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังด้วยวิธี immunohistochemistry พบการแสดงออก S100A8/A9 เพิ่มขึ้นในบริเวณ glomeruli ที่มีพยาธิสภาพของโรค และจากการทำ double staining พบว่าบริเวณดังกล่าวเป็น infiltrating macrophage cells(27) ในปีที่ผ่านมาผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ทั้งหมดใน kidney biopsy ของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังด้วยวิธี whole genome expression microarray พบว่า S100A8 และ S100A9 mRNA มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นใน kidney biopsy ของผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (รูปที่ 1) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า S100A8/S100A9 เป็นโมเลกุลที่น่าสนใจและอาจจะสามารถนำมาใช้เป็น biomarker สำหรับติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังได้



รูปที่ 1 ระดับการแสดงออกของ S100A8 และ S100A9 mRNA ในชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วย active lupus nephritis ที่มีผลการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกันภายในระยะเวลา 6 เดือน (# $P = 0.007$, * $P = 0.02$)

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์หลัก (Primary objectives) ของแผนงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบการนำไปใช้จริง (biomarker validation) และศึกษาทั้งประสิทธิภาพ (efficiency) และประสิทธิผล (effectiveness) ของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สนใจในระดับสหสถาบัน ว่าสามารถใช้ในการติดตามการรักษาและการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง
2. เพื่อทดสอบความแม่นยำของbiomarker ในการทำนายการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของไต โดยติดตามจากค่า Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) ก่อนและหลังได้รับการรักษา

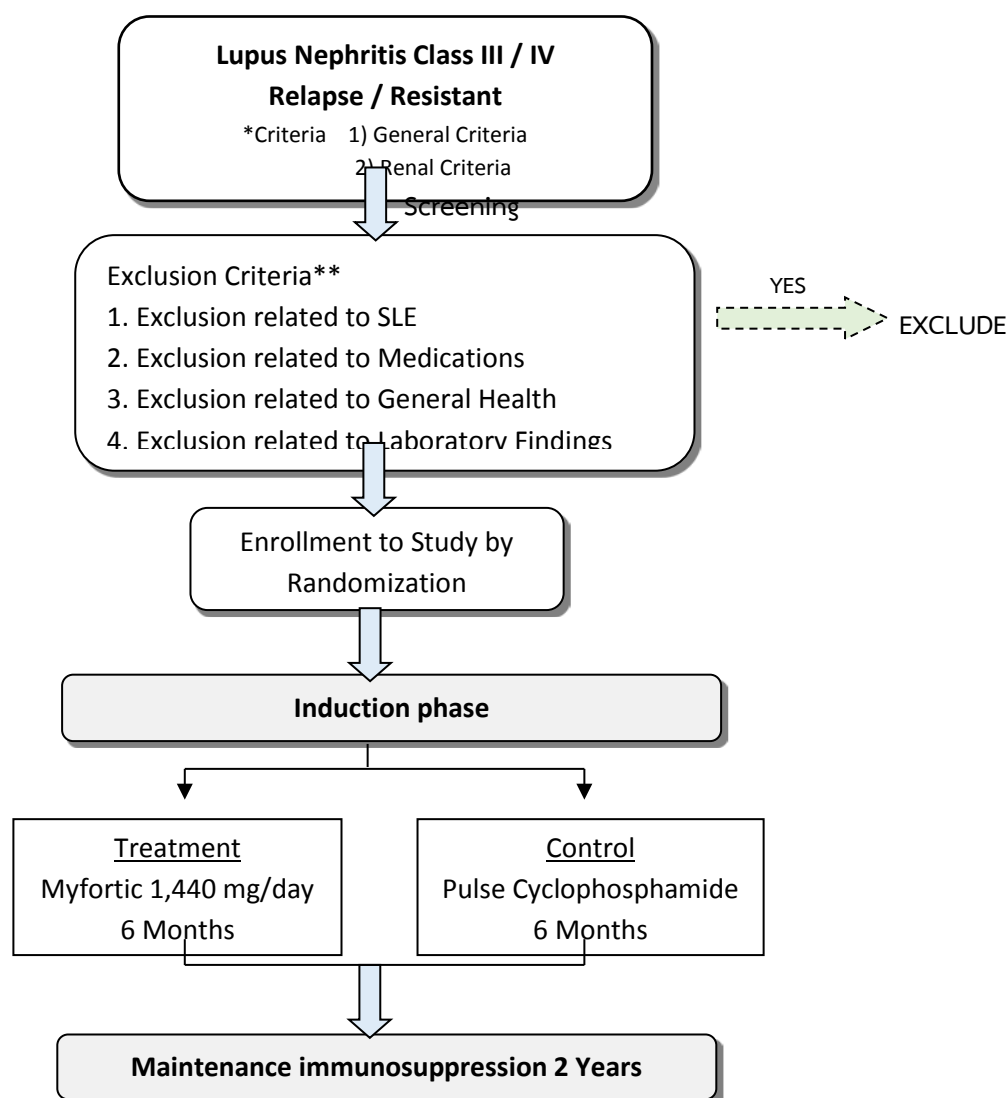
3.2 วัตถุประสงค์รอง (Secondary objectives) ของแผนงานวิจัย

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ biomarkers ที่สนใจกับความรุนแรงของพยาธิสภาพที่ไต (renal histology) เพื่อนำมาใช้สนับสนุนกับผลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อไต
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ biomarkers ที่สนใจกับการทำงานของไต, ระดับโปรตีนในปัสสาวะ, ระดับคอมพลีเมนต์ C3, C4 และ anti-ds DNA ที่ใช้ตรวจติดตามโรคในปัจจุบัน เพื่อนำมาใช้ในการทำนายการกำเริบของโรค

4. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 รูปแบบการศึกษา

โครงการนี้เป็นการศึกษาย่อย (substudy) ของการศึกษาแบบ multicenter (เอกสารแนบ) โดยติดตามเก็บปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตอักเสบรูมาตอยด์ biopsy-proven class III-IV ที่มีเกณฑ์ของ active nephritis แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มการรักษาได้แก่ intravenous cyclophosphamide หรือ mycophenolate sodium ตามแผนภูมิข้างล่าง



รูปที่ 2 เกณฑ์ของ active nephritis แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มการรักษา

4.2 สถานที่ที่จะทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

- สถาบันที่เข้าร่วมการศึกษา ได้แก่ รพ.นพรัตน์ราชธานี, รพ.ศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, รพ.ศูนย์ขอนแก่น, รพ.พระมงกุฎเกล้า

โดยตัวอย่างถูกส่งมายังส่วนกลาง (Central lab) ตาม protocol พร้อมกับปัสสาวะที่ใช้ตรวจหา UPCI และ renal function

- สถานที่เก็บตัวอย่างคนไข้

ศูนย์วิจัย ตึก อปร ชั้น 9 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

- การจัดการข้อมูลโดย

หน่วยบริหารจัดการข้อมูล เครือข่ายวิจัยทางคลินิกสหสถาบัน (Data Management Unit, Clinical Research Collaborating Network)

4.3 กลุ่มผู้ป่วยพร้อมเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วย (Inclusion / Exclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคไตอักเสบรูบัส (lupus nephritis) ที่ได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไต (biopsy-proven) ยืนยันผลการวินิจฉัย และได้รับการรักษามาตรฐานด้วยยา cyclophosphamide หรือ mycophenolate sodium ร่วมกับยา corticosteroid

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะโรคไตอักเสบรูบัสกำเริบ (active lupus nephritis patients), ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษา induction therapy ไปแล้ว 6 เดือน (response and non-response to treatment)

1) *active lupus nephritis patients* มีเกณฑ์ในการคัดเลือกดังนี้

- มีโปรตีนรั่วในปัสสาวะมากกว่า 0.5 กรัม หรือ
- มีเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะมากกว่า 5-10 cells per HPF หรือพบ urinary casts ในปัสสาวะ หรือ
- การทำงานของไตแย่งเห็นได้จากค่า serum creatinine เพิ่มขึ้น

2) *Responded and Non responded to treatment* ใช้เกณฑ์ตาม American College of Rheumatology (ACR) ดังนี้

2.1 Response to treatment

- ค่าการทำงานของไตดีขึ้น (ค่า serum creatinine หรือ GFR ลดลง 25%)
- พบเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 10 cells per HPF
- มีโปรตีนในปัสสาวะลดลง 50% เมื่อเทียบกับก่อนการรักษา

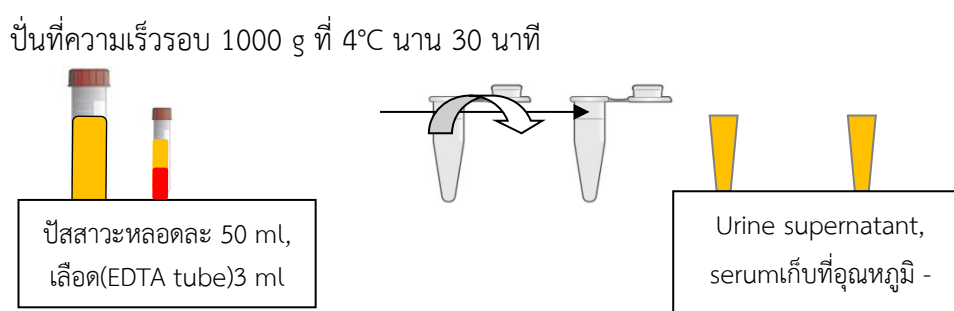
2.2 Non response to treatment

- ค่าการทำงานของไตที่แย่ง (ค่า serum creatinine หรือ GFR เพิ่มขึ้น 25%)
- มีโปรตีนในปัสสาวะเพิ่มขึ้น 2 เท่า จากก่อนการรักษา

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากโครงการ ใช้เกณฑ์ของโครงการหลักตามในเอกสารแนบ

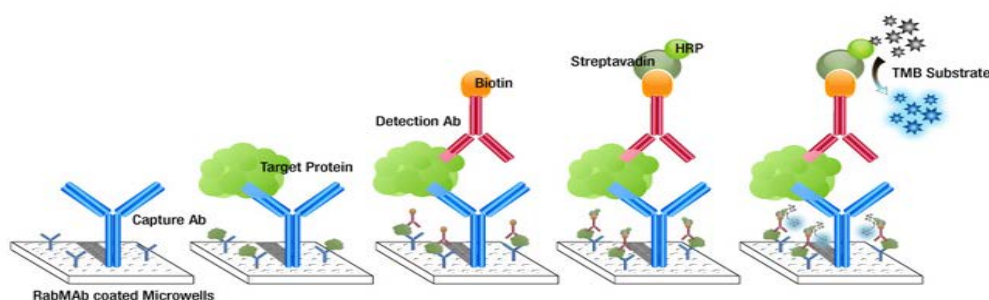
4.4 วิธีการวิจัย

1) ผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกจะถูกทำการเจาะเลือดและเก็บตัวอย่างปัสสาวะทุกๆ 1 เดือน ตั้งแต่ก่อนเริ่มเข้ารับการรักษา และตลอดระยะเวลาที่ได้รับการรักษาเป็นเวลา 6 เดือน และติดตามต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 6 เดือน (รวมทั้งสิ้น 12 เดือน) โดยตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยในแต่ละเดือนจะถูกปั่นที่ความเร็ว 1,000g เพื่อเก็บ serum และ urine supernatant หลังจากนั้นตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะรวบรวมคนไข้ได้ครบตามจำนวนและระยะเวลาการติดตามการรักษาที่กำหนดไว้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ได้จากโครงการวิจัยคลินิกสถาบัน 5 สถาบัน

2) ทำการวัดปริมาณโปรตีนที่สนใจศึกษา ได้แก่ NGAL, TWEAK APRIL และ S100A8/S100A9 complex (Calprotectin) ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การวัดปริมาณโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4.5 การรวบรวมและจำแนกกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูลทั่วไป, ข้อมูลทางคลินิก และผลทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรคไตอักเสบเรื้อรังที่เข้าร่วมโครงการทุกรายจะถูกเก็บรวบรวมในแต่ละครั้งที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ตลอดระยะเวลา 12 เดือน ทั้งนี้เมื่อสิ้นสุด

การรักษาที่ 6 เดือนผู้ป่วยจะถูกนิยามออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (response group) และไม่ตอบสนองการรักษา (nonresponse group) ตาม criteria ที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.3 ข้างต้น

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ใช้ ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และ ค่ากลาง (1st quartile, 3rd quartile) ในการอธิบายการกระจายและข้อมูลพื้นฐาน จากนั้นได้ทำการแปลงข้อมูลของ biomarkers ดังต่อไปนี้ให้อยู่ในรูปของ Log transformation คือ eGFR, NGAL, TWEAK, APRIL, S100A8/S100A9 complex (Calprotectin), NGAL normalized และ TWEAK normalized เมื่อได้ข้อมูลที่อยู่ในรูปของ log transformation แล้ว ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ biomarkers (NGAL, TWEAK, APRIL, S100A8/S100A9 complex (Calprotectin), NGAL normalized และ TWEAK normalized) กับ eGFR โดยใช้โมเดลทางสถิติคือ Mixed linear regression model ค่า coefficient และ 95% confidence interval ที่ได้จากโมเดลทางสถิติ จะถูกแปลงข้อมูลกลับให้อยู่ในรูปมาตรฐาน (antilog)

5. ผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยและคณะได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 Parts โดยแบ่งเป็น

- 1) Part 1: การศึกษาปริมาณโปรตีน NGAL และ TWEAK ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา
- 2) Part 2: การศึกษาปริมาณโปรตีน APRIL และ S100A8/S100A9 complex ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา
- 3) Part 3: การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีน APRIL และ TWEAK ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง กับผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยามาตรฐาน

จากการรวบรวมผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการทั้งหมดสามารถจำแนกตามสถาบันต่างๆได้ดังนี้

- 1) โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 16 ราย
- 2) โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 1 ราย
- 3) โรงพยาบาลนพรัตนราชธานี จำนวน 12 ราย
- 4) โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 10 ราย
- 5) โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จำนวน 10 ราย
- 6) โรงพยาบาลพระมงกุฎ จำนวน 2 ราย

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ และชนิดของตัวอย่าง(Biological sample) ที่นำมาใช้ทำการศึกษา ด้วยเหตุผลดังนี้คือ

- (1) ในช่วงเวลาที่เข้าร่วมโครงการผู้ป่วยบางรายมีเงื่อนไขที่ไม่เข้าเกณฑ์ของการรักษาจึงมีการคัดผู้ป่วยออกจากโครงการเป็นสาเหตุให้มีการลดลงของจำนวนตัวอย่าง อีกทั้งผู้วิจัยพบว่าโปรตีน NGAL และ TWEAK ในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บจากโรงพยาบาลนอกเขตกรุงเทพมหานครเช่นโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่นมีปริมาณต่ำผิดปกติซึ่งอาจเกิดจากการสลายไปของโปรตีนดังกล่าวนี้ในระหว่างการจัดส่งมายังศูนย์ฯ กรุงเทพมหานครทางคณะผู้วิจัยจึงตัดตัวอย่างจากโรงพยาบาลนอกเขตกรุงเทพมหานครออกซึ่งคงเหลือจำนวนตัวอย่าง 28 รายและคัดเลือกตัวอย่างของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 37 รายใส่เข้ามาแทนตัวอย่างที่คัดออกไป จึงนับรวมตัวอย่างเป็น 65 ราย
- (2) ผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับโปรตีนที่น่าสนใจที่อาจเป็น biomarker ที่ดีในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังซึ่งคณะผู้วิจัยได้เคยทำการศึกษาเบื้องต้นและมีผลการศึกษาที่น่าสนใจของโปรตีน S100A8/S100A9 (รูปที่1)

และ APRIL ในซีรัมของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ผู้ป่วยจึงได้ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้แทนตัวเดิม (IP-10 และ TGF-beta) ที่ได้เคยเสนอไปทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำ pilot study เพื่อหาปริมาณ IP-10 และ TGF-beta ในปัสสาวะของผู้ป่วยแล้วแต่ไม่สามารถวัดปริมาณได้ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสลายตัวของโปรตีนในปัสสาวะตามเหตุผลเช่นเดียวกับข้อ (1)

Part 1: การศึกษาปริมาณโปรตีน NGAL และ TWEAK ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง

ตามที่คุณวิจัยได้เคยรายงานไปในรายงานรอบ 2 เดือนแรกแล้วนั้น สำหรับการศึกษารวบรวมปริมาณโปรตีน NGAL และ TWEAK ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังทางผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยลดลงเหลือเพียง 60 รายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการ (100 ราย ใน 5 สถาบัน) เนื่องจากเหตุผลข้อที่ 1) ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

จากการคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยจากสหสถาบัน โดยเลือกใช้ตัวอย่างทั้งหมด 3 จุดเวลา ได้แก่ จุดเริ่มต้นของการเกิดโรค, 3 เดือน และ 6 เดือน รวมจำนวนผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งสิ้น 65 ราย แบ่งเป็นเพศหญิง 62 ราย เป็นเพศชาย 3 ราย ทางผู้วิจัยได้นำข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งหมดมาสรุปได้ดังตารางที่ 1 และจากการนำตัวอย่างของผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 65 ตัวอย่างมาทำการวัดระดับโปรตีน NGAL และ TWEAK ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดง Patient Characteristics

Patients Characteristic	IVCY	EC-MPS
	n = 32	n = 28
Female	90.6%	96.3%

Age (year)	29.5±6.0	35.8±12.7
Renal pathology		
- WHO class III	10%	4%
- WHO class IV	90%	96%
Serum creatinine (mg/dL)	0.8 (0.5-2.4)	0.9 (0.5-2.1)
Urine protein/Cr ratio	5.6 (0.4-20.3)	6.3 (2.1-22.3)
Nephrotic range proteinuria (>3.5 g/day)	67%	93%
MDRD eGFR (mL/min/1.73m ²)	91.5 (25.9-159.8)	84.0 (28.9-165.5)
Serum albumin	2.9±0.7	2.7±0.7

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) และระดับโปรตีน NGAL และ TWEAK ในปัสสาวะของผู้ป่วยเมื่อเริ่มการรักษา, 3 และ 6 เดือนหลังการรักษาจำนวน 65 ราย (shows descriptive statistics of urine biomarkers)

	Visit 1 (N=65) Mean (SD) Median (Q1,Q3)	Visit 5 (N=65) Mean (SD) Median (Q1,Q3)	Visit 8 (N=64) Mean (SD) Median (Q1,Q3)
Raw data			
eGFR	85.57 (36.59) 83.22 (56.97, 101.28)	89.9 (31.9) 86.94 (66.85, 120.42)	85.95 (36.76) 84.77 (56.44, 113.24)
NGAL	59247.62 (71708.67) 22236.60 (9105.7,	39784.16 (58712.92) 14791.32 (5782.68, 48484.24)	44579.02 (58281.23) 17825.08 (4423.93, 67498.62)

	90991.20)		
TWEAK	173.36 (386.81) 70.23 (16.45, 155.25)	103.4 (230.95) 43.15 (16.45, 97.75)	132.02 (312.47) 50.59 (16.27, 113.66)
NGAL normalized	834.75 (994.33) 357.94 (160.45, 1083.63)	707.6 (1119.28) 272.04 (69.53, 695.12)	698.65 (1331.08) 198.6 (55.49, 834.63)
TWEAK normalized	4.17 (17.39) 0.94 (0.25, 2.09)	2.23 (6.93) 0.61 (0.16, 1.7)	3.68 (12.41) 0.71 (0.18, 1.42)
Transformed data			
log eGFR	4.38 (0.42) 4.42 (4.07, 4.64)	4.46 (0.36) 4.47 (4.21, 4.79)	4.41 (0.41) 4.44 (4.14, 4.73)
log NGAL	10.20 (1.32) 10.01 (9.12, 11.42)	9.56 (1.85) 9.69 (8.69, 10.85)	9.78 (1.9) 10.1 (8.78, 11.17)
log TWEAK	4.18 (1.39) 4.37 (2.92, 5.05)	3.89 (1.15) 3.94 (2.92, 4.59)	4.15 (1.20) 4.22 (2.95, 4.80)
log NGAL normalized	6.01 (1.28) 5.88 (5.08, 6.99)	5.4 (1.96) 5.67 (4.25, 6.57)	5.36 (2.02) 5.40 (4.29, 6.80)
log TWEAK normalized	-0.05 (1.51) -0.02 (-0.67, 0.81)	-0.28 (1.4) -0.14 (-1.28, 0.58)	-0.06 (1.48) -0.13 (-1.19, 0.57)

Q1= 1st quartile; Q3= 3rd quartile

สรุปผลการวิจัย Part 1: ความสัมพันธ์ของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปัสสาวะของผู้ป่วย (NGAL และ TWEAK) กับการทำงานของไต (estimated GFR)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นแล้ว (ตารางที่ 3) พบว่า TWEAK และ TWEAK normalized มีความสัมพันธ์กับ eGFR โดยที่พบว่า ถ้า TWEAK เพิ่มขึ้น 1 หน่วยจะทำให้ค่า eGFR ลดลง 6.5 % (coefficient; 0.935; 95%CI: 0.906, 0.965) และพบว่า ถ้าค่า TWEAK normalized เพิ่มขึ้น 1 หน่วยจะทำให้ค่า eGFR ลดลง 6.0% (coefficient; 0.940; 95%CI: 0.908, 0.974) นอกจากนั้นแล้วผลการวิเคราะห์ข้อมูล ไม่พบความสัมพันธ์ของ NGAL และ NGAL normalized

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง TWEAK กับ TWEAK normalized และ NGAL และ NGAL normalized กับความสัมพันธ์กับ eGFR (shows the results from mixed linear regression model (random effects))

	Coefficient	95% Confidence Interval	p-value
NGAL	0.972	0.945, 1.001	0.057
TWEAK	0.935	0.906, 0.965	<0.001
NGAL normalized	0.997	0.967, 1.028	0.843

TWEAK normalized	0.940	0.908, 0.974	0.001
------------------	-------	--------------	-------

*All model were adjusted for visit

Part 2: การศึกษาปริมาณโปรตีนAPRIL และ S100A8/S100A9 complex ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยไต อวัยวะปลูก

จากการรายงานในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา ทางผู้วิจัยได้เสนอโปรตีน APRIL และ S100A8/A9 complex (Calprotectin)เพิ่มเติมจากโปรตีนNGAL และ TWEAKตามเหตุผลที่ชี้ข้างต้นในข้อ (2)จากการนำตัวอย่างของผู้ป่วยทั้งหมดมาทำการวัดระดับโปรตีน APRIL และ S100A8/A9 complexได้ผลดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) และระดับโปรตีน APRIL และ S100A8/A9 complex ในปัสสาวะของผู้ป่วยเมื่อเริ่มการรักษา, 3 และ 6 เดือนหลังการรักษา จำนวน 53 ราย (shows descriptive statistics of urine biomarkers)

	Visit 1 (N=53)		Visit 5 (N=47)		Visit (N=45)	
	Mean (SD)	Median (Q1,Q3)	Mean (SD)	Median (Q1,Q3)	Mean (SD)	Median (Q1,Q3)
Raw data						
eGFR	94.69 (31.08)	96.46 (70.49, 116.01)	95.31 (29.25)	88.99 (74.13, 120.42)	99.04 (32.35)	90.44 (79.57, 121.65)
APRIL	11.07 (29.56)	3.78 (2.54, 6.65)	6.57 (13.24)	3.69 (2.01, 5.79)	6.48 (12.56)	3.01 (1.19, 6.52)
S100A8/A9 complex	318.65 (131.87)	334.73 (199.7, 429.05)	316.3 (119.91)	302.43 (235.29, 413.25)	338.62 (147.17)	336.85 (236.05, 442.95)
Transformed data						
log eGFR	4.49 (0.38)	4.57 (4.25, 4.75)	4.51 (0.31)	4.49 (4.31, 4.79)	4.54 (0.34)	4.5 (4.38, 4.8)
log S100A8/A9 complex	1.46 (1.09)	1.33 (0.93, 1.89)	1.24 (0.98)	1.31 (0.7, 1.76)	1.13 (1.11)	1.1 (0.17, 1.87)
log APRIL	5.65 (0.53)	5.81 (5.3, 6.06)	5.67 (0.46)	5.71 (5.46, 6.02)	5.7 (0.56)	5.82 (5.46, 6.09)

Q1= 1st quartile; Q3= 3rd quartile

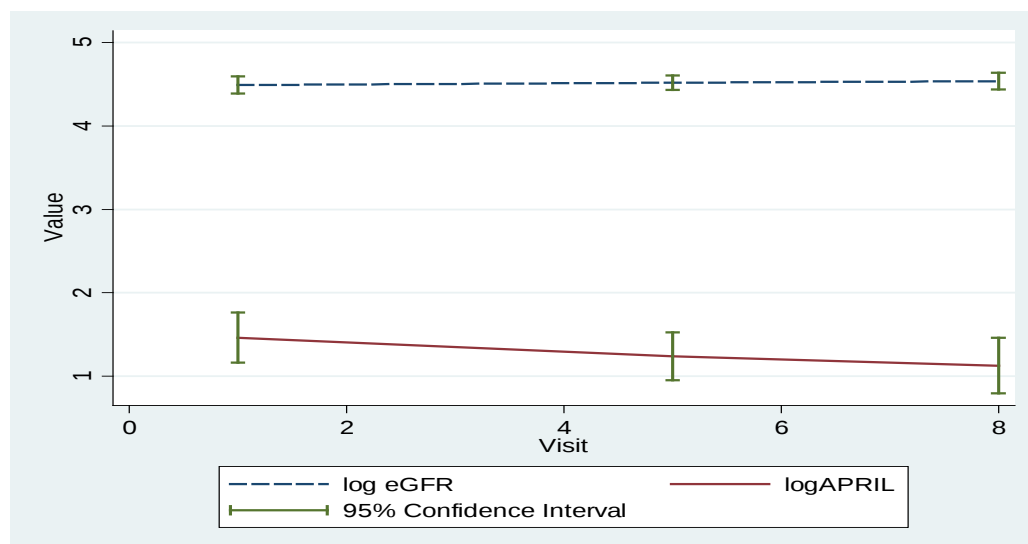
สรุปผลการวิจัย Part 2: ความสัมพันธ์ของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในพลาสมาของผู้ป่วย (APRILและ S100A8/A9 complex) กับการทำงานของไต (estimated GFR)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นแล้ว (ตารางที่ 5 และรูปที่ 5) การวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า APRIL มีความสัมพันธ์กับค่า eGFR โดยพบว่า ถ้า APRIL เพิ่มขึ้น 1 หน่วยทำให้ค่า eGFR ลดลง 7% (coefficient ; 0.93 และ 95% confidence interval:0.87,0.98)

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง APRIL และ S100A8/A9 complex กับความสัมพันธ์กับ eGFR (shows the results from mixed linear regression model (random effects))

	Coefficient	95% Confidence Interval	p-value
APRIL	0.930	0.870, 0.980	0.013
S100A8/A9 complex	0.980	0.910, 1.060	0.560

*All model were adjusted for visit



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของค่า eGFR กับ โปรตีน APRIL โดยพบว่า ถ้า APRIL เพิ่มขึ้น 1 หน่วยทำให้ค่า eGFR ลดลง 7% (coefficient ; 0.93 และ 95% confidence interval:0.87,0.98)

ทั้งนี้นอกจากผู้วิจัยจะทำการศึกษาโปรตีน S100A8/A9 ในพลาสมาของผู้ป่วยแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในชิ้นเนื้อไต และ mRNA ในเลือดของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังอีกด้วย โดยพบว่าระดับโปรตีน S100A8/A9 ในชิ้นเนื้อไตมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพภายในไตของผู้ป่วย และยังพบอีกว่าระดับ S100A8/A9 ในเลือดสัมพันธ์กับการกำเริบของโรค (ตาม manuscript เรื่อง “Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis” ที่แนบมาท้ายรายงานนี้ ซึ่งได้ submitted ไปที่ Lupus journal เรียบร้อยแล้ว)

Part 3: การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีน APRIL และ TWEAK ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง กับผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยามาตรฐาน

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีน APRIL และ TWEAK กับภาวะการสงบของโรค (remission) ในผู้ป่วย หลังจากติดตามผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการและได้รับการรักษาด้วยยาทั้ง 2 ชนิด และระยะเวลา 2 ปี ผู้วิจัยได้ทำการจำแนกผู้ป่วยทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการตามภาวะการสงบของโรค (remission) คือ ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลังจากได้รับ induction therapy ไปแล้ว 6 เดือน โดยใช้เกณฑ์ ดังนี้คือ ค่าการทำงานของไตที่ดีขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลงในทางที่แย่ลง (stabilization or improvement of renal function) , มีการหายไปของเม็ดเลือดแดงและ casts ในปัสสาวะ (resolution of urine sediment abnormalities ; RBC $\leq$ 5 /HPF or cellular casts), การลดลงของการรั่วของโปรตีนในปัสสาวะน้อยกว่า 1.5 กรัมต่อวัน หรือลดลงจากเดิมมากกว่าร้อยละ 50 โดยต้องมีค่าน้อยกว่า 3 กรัมต่อวัน ในกรณีนี้ค่าตั้งต้นมากกว่า 3.5 กรัมต่อวัน

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนที่ศึกษาเปรียบเทียบกับภาวะการสงบของโรคในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง โดยใช้ค่าปริมาณโปรตีนในซีรัมและปัสสาวะของผู้ป่วยแต่ละ visit คือ visit 1 (จุดเริ่มต้นของการเกิดโรค), visit 5 (3 เดือน) และ visit 8 (6 เดือน) มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ independent-sample *t*-test (compare mean two groups) และเปรียบเทียบ ค่า log mean ของโปรตีนแต่ละตัว โดยให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ พบว่าปริมาณการแสดงออกของโปรตีน TWEAK ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาดี (remission) จะมีปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะที่จุดเริ่มต้นของการเกิดโรค (visit 1) ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี (non-remission) (Log scale; Mean $\pm$ SD= 4.0 $\pm$ 0.6 และ 4.8 $\pm$ 0.6, ตามลำดับ) อีกทั้งทั้งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มที่ 6 เดือน (visit 8) ก็พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (Log scale; Mean $\pm$ SD= 4.0 $\pm$ 0.6 และ 4.4 $\pm$ 0.7, ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่ทั้งนี้ผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของปริมาณ APRIL ในซีรัมของผู้ป่วยที่สัมพันธ์กับผลการรักษาทั้งในจุดเวลาเริ่มต้นของโรค, 3 เดือน และ 6 เดือน

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนอื่นที่เหลือ พบว่าปริมาณ NGAL ในปัสสาวะที่จุดเวลา 6 เดือน (visit 8) ของผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ อีกด้วย (Log scale; Mean $\pm$ SD= 10.3 $\pm$ 1 และ 10.9 $\pm$ 1.1, ตามลำดับ)

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างปริมาณโปรตีนที่ศึกษากับการตอบสนองต่อการรักษา (Remission stage) ในผู้ป่วย LN

	Remission			Non-remission		
	Log transformed: Mean(SD) Median(Min,Max)			Log transformed: Mean(SD) Median(Min,Max)		
	Beginning (Visit 1)	M3 (Visit 5)	M6 (Visit 8)	Beginning (Visit 1)	M3 (Visit 5)	M6 (Visit 8)
GFR	4.4(0.4) 4.5 (3.4, 5)	4.4(0.4) 4.4 (3.7, 5)	4.5(0.3) 4.5 (3.6, 5.1)	4.3(0.5) 4.4 (3.5, 5.1)	4.4(0.4) 4.4 (3.6, 5.1)	4.3(0.5) 4.4 (3.2, 5.1)
NGAL	10.7(1.3) 10.5 (8.8, 14.2)	10.3(1) 10 (8.7, 12.6)	<u>10.3(1)</u> <u>10.1 (8.5, 12.3)</u>	10.9(1.1) 11.1 (8.6, 12.4)	10.8(1) 11 (8.8, 12.3)	<u>10.9(1.1)</u> <u>11.2 (8.8, 12.4)</u>
TWEAK	<u>4(0.6)</u> <u>4 (2.7, 5.2)</u>	4(0.6) 3.9 (3.1, 5.6)	<u>4(0.6)</u> <u>3.9 (2.6, 5.2)</u>	<u>4.8(0.6)</u> <u>4.6 (3.8, 5.8)</u>	4.4(0.8) 4.2 (3.1, 6.2)	<u>4.4(0.7)</u> <u>4.2 (3.4, 6.1)</u>
APRIL	1.2(0.7) 1.4 (0, 2.6)	1.1(0.7) 1.2 (-0.2, 2.5)	1(0.7) 1.1 (-0.2, 2.3)	1.5(1.3) 1.4 (-0.8, 4.6)	1.2(1.2) 1.1 (-0.3, 3.9)	1.2(1.4) 0.9 (-0.3, 4.2)
Ratio April /TWEAK	-2.7(0.6) -2.7 (-3.5, -1.4)	-2.9(1) -2.6 (-4.4, -1.6)	-2.6(0.9) -2.3 (-4.1, -1.2)	-3.1(1.4) -3.5 (-5.1, -0.6)	-2.8(1.7) -2.6 (-5.3, -0.5)	-2.8(1.3) -3.4 (-4.3, -0.7)
S100	5.7(0.5) 6 (4.1, 6.4)	5.7(0.4) 5.7 (4.8, 6.3)	5.6(0.6) 5.8 (3.9, 6.6)	5.7(0.5) 5.7 (4.5, 6.2)	5.7(0.5) 5.7 (4.3, 6.2)	5.7(0.5) 6 (4.6, 6.3)
NGAL Normalized	6.8(1.2) 6.9 (4.8, 9.7)	6.3(1) 6.3 (4.7, 8.4)	6.1(1.3) 6 (3.4, 9)	6.7(1.1) 7 (4.7, 8.4)	6.7(1.1) 6.5 (4.6, 8.5)	6.5(1.2) 6.5 (4.3, 8.2)
TWEAK Normalized	0.2(0.7) 0 (-0.8, 2.2)	0.2(0.7) 0 (-1, 1.8)	0.1(0.8) 0 (-1.5, 2)	0.6(0.5) 0.7 (-0.1, 1.4)	0.4(0.6) 0.7 (-0.8, 1.4)	0.2(0.3) 0 (-0.2, 0.7)

6. สรุป,อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปความสัมพันธ์ และค่าทางสถิติได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 7 สรุปความสัมพันธ์ และค่าทางสถิติของโปรตีนที่ศึกษาในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา และไม่ตอบสนองต่อการรักษา

	Coefficient	95% Confidence Interval	p-value
NGAL	0.972	0.945, 1.001	0.057
TWEAK	0.935	0.906, 0.965	<0.001
NGAL normalized	0.997	0.967, 1.028	0.843
TWEAK normalized	0.940	0.908, 0.974	0.001
APRIL	0.930	0.870, 0.980	0.013
S100A8/A9 complex	0.980	0.910, 1.060	0.560

- 1) TWEAK และ TWEAK normalized มีความสัมพันธ์กับ eGFR โดยที่พบว่าถ้า TWEAK เพิ่มขึ้น 1 หน่วยจะทำให้ค่า eGFR ลดลง 6.5 % (coefficient; 0.935; 95%CI: 0.906, 0.965) และพบว่า ถ้าค่า TWEAK normalized เพิ่มขึ้น 1 หน่วยจะทำให้ค่า eGFR ลดลง 6.0% (coefficient; 0.940; 95%CI: 0.908, 0.974)
- 2) การวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า APRIL มีความสัมพันธ์กับค่า eGFR โดยพบว่าถ้า APRIL เพิ่มขึ้น 1 หน่วย ทำให้ค่า eGFR ลดลง 7% (coefficient ; 0.93 และ 95% confidence interval: 0.870, 0.980)
- 3) ผลการวิเคราะห์ข้อมูล NGAL และ S100A8/S100A9 ในพลาสมา ไม่พบความสัมพันธ์ของโปรตีนกับค่าการทำงานของไต (estimated GFR)
- 4) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณโปรตีนที่จุดเริ่มต้นการรักษา, 3 เดือน และ 6 เดือน พบว่าปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะที่จุดเริ่มต้นการรักษามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา (Remission) หลังได้รับการรักษาเป็นเวลา 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value <0.05) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้กับโปรตีนอื่นๆ ที่ศึกษา
- 5) จะเห็นได้ว่าการวิจัยนี้สามารถพบความสัมพันธ์ของตัวแปรในระดับโปรตีนทั้งในปัสสาวะและซีรัม รวมทั้งชิ้นเนื้อไต ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคในอนาคตได้ ทั้งในแง่การดำเนินโรคและการตอบสนองต่อการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวัดปริมาณโปรตีน TWEAK ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นแหล่งตัวอย่างที่ไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัว (non-invasive) นอกจากนี้ตามที่ผู้วิจัยได้ชี้แจงไว้ข้างต้น ถึงปัญหาเรื่องการเก็บตัวอย่างจากสถาบันที่อยู่นอกเขตกรุงเทพฯ ที่อาจทำให้โปรตีนที่สนใจศึกษาเสียสภาพไป จึงต้องลดจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาลงนั้น หาก

มีการศึกษาวิจัยในตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้นและปรับเปลี่ยนวิธีในการขนส่งตัวอย่างให้เหมาะสมมากขึ้น อาจช่วยทำให้การศึกษามีข้อมูลที่น่าสนใจเพิ่มขึ้นด้วย

จากการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติมเกี่ยวกับโปรตีน TWEAK และ APRIL ผู้วิจัยพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีการทำงานร่วมกันและเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรค autoimmune เช่นกันซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าทั้ง TWEAK และ APRIL genes อยู่บนโครโมโซมที่ 17 และอยู่ในตำแหน่งที่ติดกัน(28) ในปี 2009 Schwartz N และคณะศึกษาปริมาณโปรตีน TWEAK ในปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วย SLE-LN จะมีปริมาณ TWEAK เพิ่มสูงขึ้นกว่าผู้ป่วย SLE-non LN และจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่ผู้ป่วย SLE-LN มีอาการกำเริบของโรค (flare) นอกจากนี้จากการทำ linear mixed-effects model พบความสัมพันธ์ของปริมาณ TWEAK และ disease activity ที่เปลี่ยนแปลง(29) ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่คณะผู้วิจัยพบ เนื่องจากผู้ป่วยที่ผู้วิจัยนำมาศึกษาทั้งหมดนั้น เป็นผู้ป่วยที่มีอาการกำเริบของโรค (flare) และผู้วิจัยศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ TWEAK ที่เปลี่ยนแปลงไปที่จุดเวลาต่างๆหลังการรักษาและได้พบความสัมพันธ์กับการทำงานของไตตามที่ได้รายงานข้างต้น

สำหรับการศึกษาปริมาณโปรตีน APRIL ผู้วิจัยมีผลการศึกษาที่น่าสนใจมาก่อนหน้านั้นในปี 2012 ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ APRIL mRNAและโปรตีนมีความสัมพันธ์กับผลการรักษาในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรัง (30) แต่ครั้งนั้นเป็นการศึกษาจากกลุ่มผู้ป่วยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพียง cohort เดียว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกที่จะศึกษาปริมาณโปรตีน APRIL ในกลุ่มตัวอย่าง Multi-center study และได้ผลการศึกษาที่น่าสนใจตามรายงานข้างต้น

นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติมพบว่าใน T-, B- cells line และ monocytic cell lines โปรตีน TWEAK และ APRIL สามารถแสดงออกร่วมกันเป็น fusion protein ได้อีกด้วย เนื่องจากทั้ง 2genes อยู่บนโครโมโซมเดียวกันในขณะที่เกิดขบวนการ intergenicsplicing ของ genes ทั้ง 2 เกิดเป็นโปรตีน TWE-PRIL ซึ่งมี cytoplasmic and transmembrane domains มาจาก TWEAK และ receptor-binding domain มาจาก APRIL (31) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการพบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังที่ผู้วิจัยศึกษา น่าจะเป็นโปรตีนที่สำคัญและอาจสามารถนำไปใช้เป็น biomarker ที่ดีในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังได้ต่อไปในอนาคต ดังแสดงไว้ในความสัมพันธ์ของโปรตีน TWEAK กับผลการรักษา โดยที่ ณ จุดเริ่มต้นของการรักษาผู้ป่วยในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา จะมีปริมาณ TWEAK ในปัสสาวะต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าปริมาณโปรตีน TWEAK ในปัสสาวะอาจสามารถนำมาใช้เป็นตัวทำนายการตอบสนองต่อการรักษา (Remission) ในผู้ป่วยไตอักเสบเรื้อรังได้

จากการวิจัยที่ผ่านมาทั้งหมดนี้สรุปประโยชน์ของ biomarker ได้ดังนี้

1. เป็นการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โรคโดยวิธีที่ไม่อันตราย, สามารถตรวจซ้ำได้, และส่งตรวจจากโรงพยาบาลทุกแห่งได้ทั่วไป โดยการเจาะเลือดหรือส่งปัสสาวะมายังห้องปฏิบัติการส่วนกลาง แต่ต้องมีการแช่แข็งส่งตรวจมาอย่างเหมาะสม

2. มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรค ได้แก่ remission หรือ estimated glomerular filtration rate (eGFR) ซึ่งใช้บ่งบอกพยากรณ์โรคได้

2.1 urine TWEAK สัมพันธ์กับ remission และ eGFR

2.2 serum APRIL โปรตีน และ blood S100 mRNA สัมพันธ์กับการกำเริบและพยาธิสภาพในไต

3. ผู้ป่วยสามารถได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิอย่างเหมาะสม ไม่มากและไม่น้อยจนเกินไป ไม่เกิดผลข้างเคียงของยาในขณะที่โรคไม่กำเริบ

4. เป็นต้นแบบการพัฒนา biomarkers สำหรับโรคไตเรื้อรังอื่นๆ (Chronic Kidney Diseases) ที่เป็นปัญหาสำคัญทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ

อย่างไรก็ตามการศึกษาแบบสหสถาบันนี้มีข้อจำกัดในบางส่วน ได้แก่

1. ระยะเวลาและกระบวนการในการจัดส่งตัวอย่างจากต่างจังหวัด หากใช้เวลาในการขนส่งนานจะมีผลต่อคุณภาพของตัวอย่าง ดังนั้นในการวิจัยนี้จำเป็นต้องปรับลดจำนวนตัวอย่างจากโรงพยาบาลต่างจังหวัดลง เนื่องจากตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างดังกล่าวได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ และแปลผล ดังนี้

ก. ผลทางสถิติ : อาจมีผลต่อการคำนวณนัยสำคัญอยู่บ้าง แต่ผู้วิจัยได้คำนึงถึงข้อนี้ จึงได้เพิ่มจำนวนตัวอย่างจาก รพ.จุฬาลงกรณ์ ให้มีขนาดตัวอย่างเท่าที่วางแผนไว้เดิม

ข. ผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ : น่าจะมีผลกระทบเนื่องจากโครงการเน้นการนำไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้นำบทเรียนจากการศึกษานี้ไปพัฒนาแนวทางการเก็บตัวอย่างของผู้ป่วย (common protocol for blood and urine collection) ร่วมกับสถาบันอื่นๆ ได้แก่ คณะแพทยศาสตร์ รพ.รามาธิบดี และวิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า แล้ว เชื่อว่าการเก็บตัวอย่างในความร่วมมือวิจัยสหสถาบันน่าจะเป็นผลสำเร็จในอนาคต ขณะนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สวทช. ให้ทำโครงการ Chronic Kidney Disease Biomarker ซึ่งใช้ข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ในการพัฒนาต่อไป

2. Biomarker บางตัวที่ได้เสนอไปในแบบเสนอโครงการวิจัยอาจมีความเสถียรต่ำ ทั้งนี้ได้แก่ IP-10 และ TGF-beta ทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณได้ เนื่องมาจากการสลายตัวของโปรตีนในปัสสาวะตามเหตุผลเช่นเดียวกับข้อ (1) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยน Biomarker ที่ศึกษา โดยการปรับเปลี่ยน Biomarker อยู่บนพื้นฐานของการทบทวนวรรณกรรม (Literature search) และข้อมูลในประสบการณ์ของคณะผู้วิจัย แต่เดิม TGF-beta และ IP-10 นั้น เป็น Biomarker ที่ถูกตีพิมพ์ในรายงานไปแล้ว (“Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: A noninvasive monitoring in lupus nephritis” Y Avihingsanon et al., Kidney International, 2006) ต่อมาผู้วิจัยพบว่าการตรวจหาโปรตีนทั้ง 2 ชนิดในปัสสาวะมีโอกาสน้อยสลายได้, ไม่คงทน ทั้งนี้ Biomarker ที่เลือกมาศึกษาใหม่นั้น มีข้อมูลในประสบการณ์ของผู้วิจัยในช่วงปี พศ.2555 ว่า S100A8/A9 และ APRIL เป็น marker ที่แสดงออกในเลือด ทำให้งานวิจัยนี้สามารถครอบคลุมตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีทั้งในปัสสาวะ (NGAL และ TWEAK) และในเลือด (S100A8/A9 และ APRIL) โดยข้อดีของ Biomarker ทั้ง 2 นี้ได้แก่ Non-invasiveness เพราะใช้เลือดเป็นตัวอย่าง, มีความคงทน (stable) เพราะสามารถใช้ตัวอย่างจากหลายสถาบันได้ และมีความสัมพันธ์กับกลไกของโรค (innate immunity) และใช้พยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาโรค

ทั้งนี้ดังแสดงให้เห็นจากผลงานตีพิมพ์ (manuscript) ที่ได้แนบมาด้วยนี้แล้ว (“Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14.” P Tantivitayakul et al. Accepted in Lupus. 2015)

7. แผนการในอนาคต

- 1) ตีพิมพ์บทความเรื่อง “urine and serum biomarkers of progression of chronic kidney disease from lupus nephritis” (กำลังเตรียมส่งไปวารสาร Arthritis Rheumatism ที่มีค่า Impact factor 7.5)
- 2) เขียนโครงการวิจัยแบบไปข้างหน้าเพื่อนำตัวบ่งชี้ในปัสสาวะและเลือดในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคไตกำเริบจากกลุ่มปัส(Biomarker-Guided Strategy Treatment and Evaluation Process of Lupus Patients: *BIGSTEP* study)
- 3) วิเคราะห์การใช้ combined biomarkers (serum APRIL & TWEAK) ในการพยากรณ์การเสื่อมของไต (declined GFR)
- 4) เชื่อมโยงผลงานการวิจัยจากแหล่งทุนต่างๆ (ในตารางที่ 8) เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ได้จริงในอนาคต ได้แก่ วิธีการตรวจวินิจฉัยใหม่เป็นต้น

ตารางที่ 8 แสดงความเชื่อมโยงของแหล่งทุนวิจัยที่สนับสนุนโครงการตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคไต โดยมีจุดประสงค์และวิธีการวิจัยที่ครอบคลุมตั้งแต่การค้นพบใหม่ การยืนยันการนำไปใช้จริงทางคลินิก และการพัฒนาให้ใช้สะดวกและง่าย

	Tools	Grant	Target
Discovery	Genome-wide	สวทช	10 targets chemokine, growth factor, immune response
Validation	Multi-center clinical trial / cohort	วช HITAP/ CRCN	NGAL/TWEAK APRIL
Point-of-care Testing	Bio-sensor Micro-fluidic	วช	NGAL

8. บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Trachtman H, Christen E, Cnaan A, Patrick J, Mai V, Mishra J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury. *Pediatr Nephrol.* 2006 Jul;21(7):989-94.
2. Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2008 Jan;7(3):229-34.
3. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2004 May-Jun;24(3):307-15.
4. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Oct;14(10):2534-43.
5. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis.* 2008 Sep;52(3):595-605.
6. Qing X, Zavadil J, Crosby MB, Hogarth MP, Hahn BH, Mohan C, et al. Nephritogenic anti-DNA antibodies regulate gene expression in MRL/lpr mouse glomerular mesangial cells. *Arthritis and rheumatism.* 2006 Jul;54(7):2198-210.
7. Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, Passo MH, Witte D, Grom A, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism.* 2006 Aug;54(8):2577-84.
8. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, Hojaili B, Aranow C, Mackay M, et al. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism.* 2007 Jun;56(6):1894-903.
9. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis and rheumatism.* 2009 Sep;60(9):2772-81.
10. Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, Schwartz N, Schwartzman J, Weinstein E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford).* 2010 May;49(5):960-71.
11. Campbell S, Burkly LC, Gao HX, Berman JW, Su L, Browning B, et al. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1889-98.

12. Gao HX, Campbell SR, Burkly LC, Jakubowski A, Jarchum I, Banas B, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells. *Cytokine*. 2009 Apr;46(1):24-35.
13. Schwartz N, Su L, Burkly LC, Mackay M, Aranow C, Kollaros M, et al. Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *J Autoimmun*. 2006 Dec;27(4):242-50.
14. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, Collins CE, Blanco I, Su L, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R143.
15. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunology letters*. 2008 Feb 15;116(1):1-6.
16. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Nov 20;192(10):1453-66.
17. Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Oct 2;192(7):953-64.
18. Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*. 2000 Apr 27;404(6781):995-9.
19. Huard B, Tran NL, Benkhoucha M, Manzin-Lorenzi C, Santiago-Raber ML. Selective APRIL blockade delays systemic lupus erythematosus in mouse. *PloS one*. 2012;7(2):e31837.
20. Petri MA, van Vollenhoven RF, Buyon J, Levy RA, Navarra SV, Cervera R, et al. Baseline predictors of systemic lupus erythematosus flares: data from the combined placebo groups in the phase III belimumab trials. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Aug;65(8):2143-53.
21. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology*. 2007 Jan;81(1):28-37.
22. Teigelkamp S, Bhardwaj RS, Roth J, Meinardus-Hager G, Karas M, Sorg C. Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Jul 15;266(20):13462-7.
23. Perera C, McNeil HP, Geczy CL. S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunology and cell biology*. 2010 Jan;88(1):41-9.
24. Baillet A, Trocme C, Berthier S, Arlotto M, Grange L, Chenau J, et al. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid

- arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Apr;49(4):671-82.
25. Soyfoo MS, Roth J, Vogl T, Pochet R, Decaux G. Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2009 Oct;36(10):2190-4.
 26. Lood C, Stenstrom M, Tyden H, Gullstrand B, Kallberg E, Leanderson T, et al. Protein synthesis of the pro-inflammatory S100A8/A9 complex in plasmacytoid dendritic cells and cell surface S100A8/A9 on leukocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):R60.
 27. Frosch M, Vogl T, Waldherr R, Sorg C, Sunderkotter C, Roth J. Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Feb;75(2):198-206.
 28. Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, et al. Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(5):776-82.
 29. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly L, Collins C, Blanco I, Su L, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Research & Therapy*. 2009;11(5):R143.
 30. Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiam-Ong S, et al. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R252.
 31. Kolfschoten GM, Pradet-Balade B, Hahne M, Medema JP. TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1427-32.