การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ อินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี

นาย ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-53-2480-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF INTERFERON-ALPHA mRNA LEVEL IN DLE LESIONS WITH NORMAL SKIN IN HEALTHY DONORS AND NORMAL SKIN IN DLE PATIENTS

Mr Yuthana Onganantapong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
Acardemic year 2005

ISBN 974-53-2480-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ อินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี
โดย	นาย ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วัณณศรี สินธุภัค
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. จงกลนี วงศ์ปิยะบวร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วัณณศรี สินธุภัค)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. จงกลนี วงศ์ปิยะบวร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชุษณา สวนกระต่าย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์)

ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์ : การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ อินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี (COMPARISON OF INTERFERON-ALPHA mRNA LEVEL IN DLE LESIONS WITH NORMAL SKIN IN HEALTHY DONORS AND NORMAL SKIN IN DLE PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา รศ. พญ. วัณณศรี สินธุภัค, อ. ที่ปรึกษาร่วม ผศ. พญ. ดร. จงกลนี วงศ์ปิยะบวร : 78 หน้า. ISBN 974-53-2480-9.

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย : การศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่าอินเตอร์เฟียรอนแอลฟามีบทบาทในกระบวนการเกิดผื่นแอลอี. อินเตอร์เฟียรอนแอลฟาเป็นสารเคมีในร่างกายตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับภูมิต้านทาน. เซลล์พลาสมาไซตอยด์เด็นไดร์ติคสะสมอยู่ในผื่นแอลอี สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเซลล์ที่กระตุ้นการสร้างอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาในผื่นแอลอี

วัตถุประสงค์ในการวิจัย : ศึกษาระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี

วิธีการทำวิจัย : วิเคราะห์ปริมาณ เอ็มอาร์เอ็นเอจากการตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคดีแอลอีจำนวน 15 คน(เพศหญิง 13 คน, เพศชาย 2 คน)และคนผิวหนังปกติซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 12 คน (เพศหญิงทั้งหมด)

โดยเปลี่ยนเอ็มอาร์เอ็นเอไปเป็นซีดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณโดยใช้วิธีของ ไซเบอร์กรีน และ แทคแมน

ผลวิจัย : ระดับอินเตอร์เฟียรอนแอลฟามีความสัมพันธ์กับผื่นดีแอลอี ผลการศึกษาวิจัยนี้พบว่าระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาของผื่นดีแอลอีมีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.04) ซึ่งพบว่าระหว่างผื่นดีแอลอีกับผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี และ ผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอีกับผิวหนังปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.30 และ P=0.39 ตามลำดับ)

สรุปผลการวิจัย : จากผลการศึกษาวิจัยนี้บ่งชี้ว่าระดับอินเตอร์เฟียรอนแอลฟาเป็นสารเคมีในร่างกายตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคดีแอลอี และอาจนำไปสู่การรักษาโรคดีแอลอีในอนาคตได้

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์
สาขาวิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จงกลนี วงศ์ปิยะบวร

4774765430 : MAJOR MEDICINE (DERMATOLOGY)
KEY WORDS : DLE, INTERFERON ALPHA, mRNA, NORMAL SKIN

YUTHANA ONGANANTAPONG: COMPARISON OF INTERFERON-ALPHA mRNA LEVEL IN DLE LESIONS WITH NORMAL SKIN IN HEALTHY DONORS AND NORMAL SKIN IN DLE PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WANNASRI SINTUPAK, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. JONGKONNEE WONGPIYABOVORN, M.D. 78 pp. ISBN 974-53-2480-9.

Background : Recent studies have suggested that Interferon alpha plays a role in the pathogenesis of lupus erythematosus (LE). Interferon alpha is immunoregulatory cytokines that promote both innate and adaptive immune responses. Plasmacytiod dendritic cells (PDC) accumulates in cutaneous LE, and characterized as immune complexes. They were considered a likely reason for the activated Interferon alpha production in cutaneous LE.

Objective : To study mRNA level of Interferon alpha in DLE lesion; comparison with normal skin from healthy and normal skin from DLE patients.

Methods : messenger RNA was extracted from punch biopsy specimens from 15 DLE patients (13 female and 2 male) and from 12 healthy control subjects (12 female). RNA was reverse transcribed into complementary DNA and amplified with polymerase chain reaction (PCR) primers specific for interferon alpha. PCR products were detected by quantitative real-time PCR using SYBR® green probe and Tagman® probe.

Results : Our study demonstrated that the mRNA level of Interferon alpha was a statistically significant increase in DLE lesion compared to normal skin from healthy donor (P=0.04). However , there was no correlation were found between DLE and normal skin in DLE patients, normal skin in DLE patients and healthy controls (P=0.30 and P=0.39, respectively). This result suggests that an imbalance in local cytokine expression may play a role in the pathogenesis of DLE.

Conclusion : This result indicate that interferon alpha is pivotal role cytokines in the pathogenesis of DLE. Our finding may lead to new therapeutic approach for DLE in future.

Department	Medicine	Student's signature	ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์
Field of study	Medicine	Advisor's signature	
Academic year	2005	Co-advisor's signature	Jongkonnee Wongpiyabovorn

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วัณณศรี สินธุภัค อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. จงกลนี วงศ์ปิยะบวร ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณวสันต์ ปัญญาแสง ที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้สถิติในการคำนวณขนาดตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูลแก่ผู้วิจัยเรื่องนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และพยาบาลแผนกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการช่วยคัดกรองผู้ป่วยที่มาทำการรักษา รวมทั้งพยาบาลแผนกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนังที่ได้ช่วยผู้วิจัยในการตัดชิ้นเนื้อและให้คำอธิบายแก่ผู้ป่วยในโครงการวิจัยนี้ทุกท่าน

ขอขอบคุณ คุณพรรณทิพา พรตเจริญ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการเลือกใช้เครื่องมือต่างๆในการทำวิจัยครั้งนี้ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยเมื่อเข้ามาใช้เครื่องมือมาตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนแพทย์ทุกท่านที่ได้กรุณาส่งและคัดเลือกผู้ป่วยมาเข้าการศึกษานี้ และขอขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ได้ร่วมมือเป็นอย่างดีจนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา ซึ่งให้การสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญแผนภูมิ..... ญ

สารบัญรูป..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

คำถามของการวิจัย..... 5

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 5

สมมุติฐาน..... 5

กรอบแนวความคิดในการวิจัย..... 6

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 9

3 Lupus erythematosus..... 11

พยาธิกำเนิดและกลไกการเกิดผื่น..... 11

อาการแสดงทางผิวหนัง..... 12

ลักษณะทางพยาธิสภาพ..... 16

4 อินเตอร์เฟียรอน..... 25

5 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ..... 29

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส(PCR)..... 29

องค์ประกอบของวิธีPCR..... 30

การป้องกันการปนเปื้อนใน PCR..... 33

6 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 43

ประชากรศึกษาและตัวอย่าง..... 43

การคำนวณขนาดตัวอย่าง..... 43

รูปแบบการวิจัย..... 44

หน้า

วิธีดำเนินการวิจัย..... 44
การเก็บรวบรวมข้อมูล..... 49
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 49
7. รายงานผลการวิจัย..... 50
8. การอภิปรายผลการวิจัย..... 59
9. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 62
รายการอ้างอิง..... 64
ภาคผนวก..... 71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตางรางที่ หน้า

1. แสดงการแบ่งความผิดปกติของผิวหนังใน LE ตาม “Gilliam Classification”.... 19
2. แสดงถึงคุณสมบัติของ Interferon……..... 26
3. แสดงจำนวนและร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคลและ ข้อมูลทั่วไป…….....……... 50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

กราฟที่ 1แสดง Interferon alpha ซึ่งถูกทำให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า..... 39
กราฟที่ 2 แสดงกราฟเส้นตรงของ Standard Interferon alpha..... 40
กราฟที่ 3 แสดง melting curve ของสารตัวอย่าง..... 40
กราฟที่ 4 แสดงกราฟแสดงค่า 18S ของสารตัวอย่าง..... 42
แผนภูมิวงกลมที่ 1 แสดงสัดส่วนของเพศชายและเพศหญิงโดยรวม..... 53
แผนภูมิแท่งที่ 1 แสดงกลุ่มอายุของประชากร 53
แผนภูมิวงกลมที่ 2 แสดงสัดส่วนเพศชายและเพศหญิงในผู้ป่วย DLE..... 54
แผนภูมิวงกลมที่ 3 แสดงสัดส่วนของระดับการศึกษา..... 54
แผนภูมิแท่งที่ 2 แสดงอาชีพของประชากร..... 55
แผนภูมิวงกลมที่ 4 แสดงสัดส่วนลักษณะงาน 55
แผนภูมิวงกลมที่ 5 แสดงสัดส่วนประวัติโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว..... 56
แผนภูมิวงกลมที่ 6 แสดงสัดส่วนของชนิดของผื่น DLE..... 56
แผนภูมิแท่งที่ 3 แสดงระยะเวลาที่ผื่นขึ้น..... 57
แผนภูมิ Boxplot ที่ 1แสดงระดับ mRNA ของ Interferon alpha..... 58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงบทบาทของ Interferon-α หรือ Type I Interferon ต่อการเกิดโรค LE.. 3
2. แสดงผื่น Classic DLE บริเวณใบหน้าของผู้ป่วยชาย..... 20
3. แสดงผื่น Classic DLE ด้านข้างของผู้ป่วยรายเดียวกับรูปที่ 1..... 20
4. แสดงผื่น Scalp DLE บริเวณหนังศีรษะ..... 21
5. แสดงผื่น Classic DLE ที่พบบริเวณแขนทั้งสองข้างพบใน Generalized DLE 21
6. แสดงผื่น Classic DLE บริเวณใบหน้าของผู้ป่วยหญิง..... 22
7. แสดงผื่น DLE พบ Carpet tacks sign..... 22
8. แสดงจุลพยาธิวิทยาของผื่น DLE..... 23
9. แสดงภาพขยายของรูปที่ 7..... 23
10. แสดงชั้น basal cell มีการเปลี่ยนแปลง..... 24
11. แสดง mucin ที่แทรกอยู่ในชั้น dermis ในผู้ป่วย DLE..... 24
12. แสดงถึงตำแหน่งของกลุ่มยีน type I interferon..... 28
13. แสดงการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส..... 30
14. แสดงหลักการและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส..... 33
15. แสดงอุปกรณ์ต่างๆ แยกเป็นสัดส่วน และใช้สำหรับ extract mRNA..... 34
16. แสดงการสร้าง cDNA เกลียวคู่จาก mRNA..... 36
17. แสดงเครื่อง Real Time PCR..... 38
18. แสดงหลักการของ SYBR Green..... 39
19. แสดงหลักการของ Hydrolysis หรือ Taqman probe..... 41
20. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วย..... 45
21. แสดง RNA later ที่อยู่ใน tube..... 46
22. แสดง hand homogenizer..... 47
23. แสดงเครื่อง centrifuge ที่ใช้ในการสกัด mRNA..... 48
24. แสดงเครื่องThermal cycle ที่ใช้ในการวิจัยนี้..... 48

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Backgroud)

ความสำคัญของLupus erythematosus (LE)

Lupus erythematosus จัดเป็นโรคภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง ความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปในผู้ป่วยแต่ละราย ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของโรคนี้ชัดเจน ซึ่งพบได้ในประชากรทั่วโลก พบความชุกในโรคสูงขึ้นในคนแอฟริกา, อเมริกา และคนเอเชีย ความรุนแรงของโรคมีรายงานที่พบว่ามีความรุนแรงในคนเชื้อชาติ Asia มากกว่า Caucasian รวมถึงอัตราตายที่สูงกว่า [1-6] การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรค เชื่อว่าการเกิดโรค LE ประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่างเช่นเดียวกับโรคอื่นๆ ในกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองคือมีความผิดปกติของยีนหลายตัวร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และหลายการศึกษาซึ่งรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคหลายยีนแต่ยังไม่เป็นที่สรุปแน่ชัดว่ายีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับโรคอย่างชัดเจน

ปัจจัยทางพันธุกรรมกับโรค LE

โรค LE เป็นโรคที่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย โดยมีปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่ง หลักฐานที่ช่วยสนับสนุนได้แก่ 1) อัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้นในเครือญาติของผู้ป่วย ค่าอัตราส่วนระหว่าง sibling risk ต่อ general population risk= 20 และ 2) อัตราการเกิดโรคพร้อมกันในคู่แฝดสูง 2-5%ในแฝดคล้าย และสูงถึง 24-58%ในแฝดเหมือน[7-9] มีการศึกษาเพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับโรคนี้อย่างมากมาย จากการทำ linkage analysis ที่ใช้ DNA marker ครอบคลุมทั้ง genome (whole genome scan) จากผู้ป่วย LE อย่างน้อย 7 กลุ่มการศึกษา[7,10-14] โดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในประชากรเชื้อชาติ Caucasian โดยในแต่ละการศึกษาได้ค้นพบตำแหน่งบนโครโมโซมที่สำคัญหลายตำแหน่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความแตกต่างของขนาดตัวอย่าง เชื้อชาติ และ วิธีการใช้ แต่สามารถสรุปตำแหน่งต่างๆที่น่าสนใจที่น่าจะมีความสำคัญต่อการเกิดโรค LE 18 ตำแหน่ง[9] คือ ตำแหน่งที่ significant linkage ได้แก่ 1q22-23, 1q41-42, 2q35-37, 4p16-15.2, 6q11-21, 16q12-13 และตำแหน่งที่ suggestive linkage ได้แก่ 1q31, 2q32-35, 4p13-15, 6q26-27, 9p24-21, 11q23, 13q31-32, 14q11-23, 15q26, 19q13, 20p12-13, 20q11-13

ความสำคัญของ Interferon-alpha ใน LE

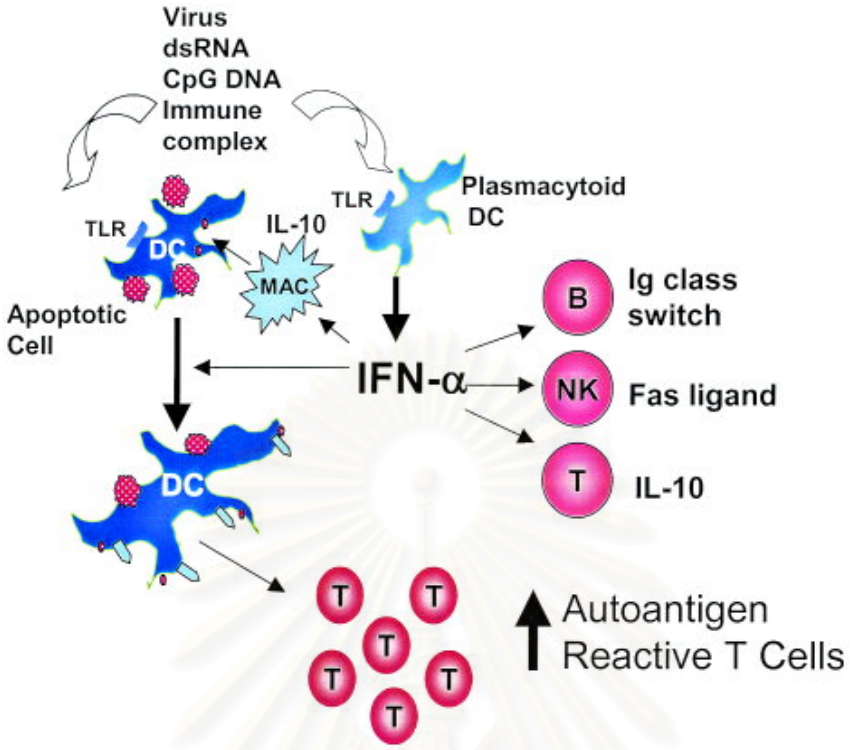
Interferon (IFN) เป็น cytokine ตัวแรกที่ถูกค้นพบเมื่อประมาณ 40 ปีก่อน ซึ่งถูกแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ Type I interferon ซึ่งประกอบด้วย IFN-α genes 12 ยีน และ IFN-β, IFN-ω, IFN-κ และ IFN-τ[15] คุณสมบัติร่วมของ Type I interferon ได้แก่ ยีนส่วนใหญ่มีเพียง 1 exon และมีsequence ที่คล้ายกันถึงร้อยละ 80 โดยที่ตำแหน่งของยีนรวมกลุ่มกันอยู่บน short arm chromosome ที่ 9 ส่วน Type II interferon ได้แก่ IFN-γ ซึ่งเป็น cytokine สำคัญในกลุ่ม T-helper type I และ cytotoxic T-lymphocyte

Type I interferon มีบทบาทสำคัญในขบวนการ innate immunity และเชื่อมต่อไปยังขบวนการ adaptive immunity Type I interferon มีบทบาทสำคัญในขบวนการต่อต้านไวรัส โดยการกระตุ้นคุณสมบัติ cytotoxicity ของ natural killer cell (NK cell) ต่อมาพบว่า Type I interferon มีบทบาททางด้าน immunoregulation[16] (ดังรูป) อื่นๆ ได้แก่

- กระตุ้น dendritic cell maturation และ function
- กระตุ้น B cell ในขบวนการ immunoglobulin class switching
- กระตุ้น MHC class I expression
- กระตุ้น macrophage ให้สร้าง interleukin-10 (T-helper 2 cytokine) และเปลี่ยนแปลง monocyte/macrophage ให้มีคุณสมบัติเป็น professional antigen presenting cell (APC)

เชื่อว่า Plasmacytoid dendritic cell ซึ่งเป็น professional antigen presenting cell มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น autoreactive T-cell และนำไปสู่การเกิดโรค LE นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าเลือดของผู้ป่วย LE สามารถเปลี่ยน monocyte cell ไปเป็น dendritic cell ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วย antibodyต่อ interferon-alpha[17-18]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงบทบาทของ Interferon-α หรือ Type I Interferon ต่อการเกิดโรค LE IFN-α ถูกสร้างขึ้นจาก plasmacytoid dendritic cell โดยถูกกระตุ้นได้ด้วยไวรัส, CpG DNA และ immune complex ซึ่งมีส่วนประกอบ apoptotic body IFN-α สามารถกระตุ้น DC maturation, เปลี่ยน Macrophage ให้มีคุณสมบัติเป็น antigen presenting cell, กระตุ้นการแบ่งตัวและ Ig class switch ของ B-cell รวมถึงกระตุ้นคุณสมบัติ cytotoxic ของ NK-cell[15]

ผลโดยรวมสรุปว่า Type I interferon มีผลเหมือนการติดเชื้อแบคทีเรีย/ไวรัสในเชิงที่สามารถกระตุ้น dendritic cell maturation โดยภายใต้การเพิ่มขึ้นของ self antigen ได้แก่ apoptotic bodies หรือ autoantibodies ของ DNA ซึ่งกระตุ้นให้ร่างกายเสีย self-tolerance ในภาวะปกติ และนำไปสู่ภาวะภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองหรือ autoimmunity

Type I interferon ได้รับความสนใจว่าอาจมีบทบาทในกลไกการเกิดโรค LE เนื่องจากมีรายงานพบการเพิ่มขึ้นของระดับ IFN-α ในเลือดของผู้ป่วย LE และมีรายงานว่าผู้ป่วยที่ใช้ recombinant IFN-α ในการรักษาโรคมะเร็งหรือไวรัสตับอักเสบ จะพบ autoantibodies ในเลือดหรือบางรายเกิดอาการของโรค LE ขึ้น Siegal และคณะ(คศ.1999) พบเซลล์ที่สร้าง IFN-α

(natural IFN-producing cell) หรือ plasmacytoid DC ซึ่งสามารถเพิ่มการสร้าง IFN-α มากขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วย immune complex หรือ apoptotic cells[19] ที่น่าสนใจมาก ได้แก่ การค้นพบว่าในเลือดของผู้ป่วย lupus สามารถกระตุ้น Plasmacytoid dendritic cells ให้หลั่ง IFN-α รวมทั้งกระตุ้น autoreactive T cell activity ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วยการให้ IFN-α antibody[18,20] การศึกษาที่ขยายผลต่อมาโดยเทคโนโลยี Global gene approach หรือ DNA microarray สนับสนุนความสำคัญของ IFN-α โดยพบว่าใน peripheral blood cells ของผู้ป่วยมีการเพิ่มขึ้นของ IFN-α associated genes และอาจสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค LE อีกด้วย [21-23]

ในปัจจุบันเรายังไม่ทราบถึงความแตกต่างของการทำงานและการแสดงออกของแต่ละ Interferon-alpha subtypes อย่างไรก็ตาม ทุก subtypes มีบทบาทในทางการต่อต้านไวรัสและกระตุ้นคุณสมบัติ cytotoxicity ของ NK cell ด้วย แต่มีคนพบว่า แต่ละ subtype มีความแตกต่างในเชิงประสิทธิภาพต่อการกระตุ้น NK cell และ B-cell นอกจากนั้นการแสดงออกของยีนถูกควบคุมโดย Interferon regulatory factors (IRF) ซึ่งมีความแตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิดหรือแล้วแต่ชนิดของสิ่งที่นำมากระตุ้น ในจำนวน 13 subtypes นั้น IFN-α subtype 1 และ 2 มีปริมาณมากที่สุด[24]โดยที่subtype 2 นั้นสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ interferon inducible protein 10 (IP-10) ซึ่งเป็น T-helper 1 cytokine ในขณะที่ interferon-alpha subtype1ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้อจำกัดของการศึกษา Interferon-alpha subtypes ที่สำคัญได้แก่ เทคโนโลยีที่ใช้ในอดีตยังขาดประสิทธิภาพ แต่ด้วยเทคโนโลยีในปัจจุบันการศึกษา Interferon-alpha subtypes ไม่เป็นปัญหาอีกต่อไป[24]

plasmacytoid DC เป็นแหล่งสร้าง IFN-α โดยทั่วไปถูกพบในเลือดโดยมีปริมาณร้อยละ 1 ของ peripheral blood cells ในผู้ป่วย LE มีปริมาณของ pDC ในเลือดลดลง แต่กลับไปสะสมที่ผิวหนังแทน เชื่อว่า pDC เป็นเซลล์มีบทบาทสำคัญในกลไกการเกิดโรค[25] การศึกษานี้สนใจศึกษาผื่น DLE เนื่องจากเป็นผื่นที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม Chronic cutaneous lupus erythematosus พบผื่น DLEบ่อยในผู้ป่วยอายุประมาณ 20-40 ปี เป็นได้ทั้งเพศชายและเพศหญิง อัตราส่วนของหญิงต่อชายเท่ากับ 3:2 ถึง3:1 แล้วแต่รายงาน ผื่นDLEพบได้ทุกเชื้อชาติ ,ประมาณร้อยละ 55 ของผู้ป่วย DLE ตรวจพบความผิดปกติทางห้องปฏิบัติการได้[26] และประมาณร้อยละ 15-30 ของผู้ป่วย SLE มีผื่นชนิด DLE ขึ้นมาในช่วงใดของโรคก็ได้ ผู้ป่วยเหล่านี้มักมีอาการของโรค SLE รุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วย SLE ที่ไม่มีผื่น DLE

คำถามของการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary research question) ระดับ mRNA level ของ IFN-alphaในผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของคนปกติ(normal skin)

คำถามรอง (Secondary research question) ระดับ mRNA level ของ IFN-alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของคนปกติ(normal skin)

คำถามที่สาม (Third research question) ระดับ mRNA level ของ IFN-alpha ในผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. ศึกษาระดับ mRNA level ของ IFN-alpha เปรียบเทียบระหว่างผื่น DLE กับผิวหนังปกติของคนปกติ(normal skin)

2. ศึกษาระดับ mRNA level ของ IFN-alpha เปรียบเทียบระหว่างผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE กับผิวหนังปกติของคนปกติ(normal skin)

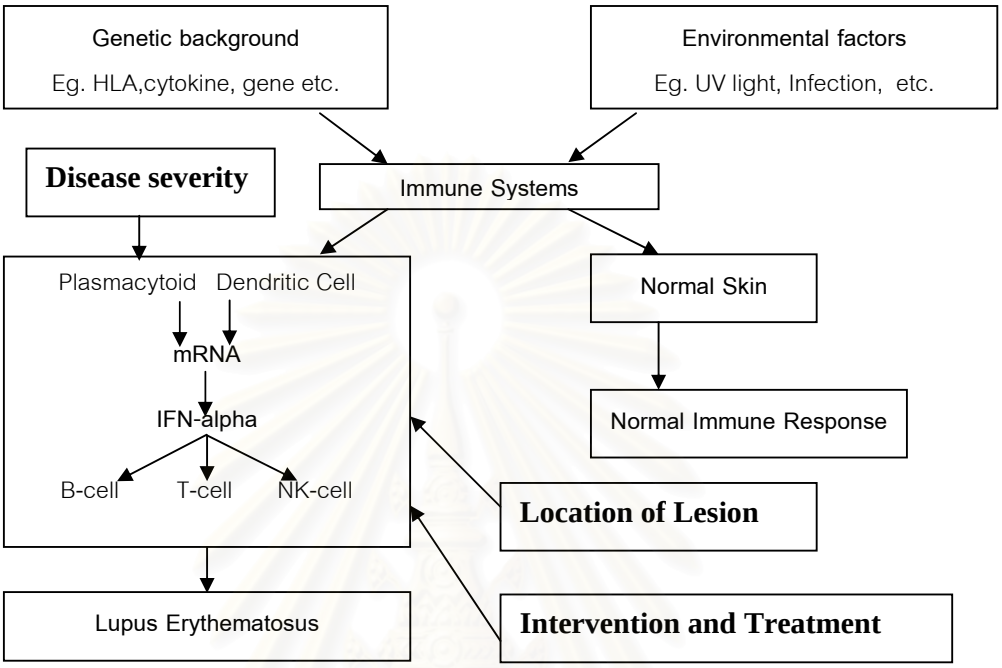
3. ศึกษาระดับ mRNA level ของ IFN-alpha เปรียบเทียบระหว่างผื่น DLE กับผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE

สมมุติฐาน (Hypothesis)

ระดับ mRNA level ของ IFN-alpha ในผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของคนปกติ(normal skin)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ทำการศึกษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น DLE โดยการตัดชิ้นเนื้อที่มารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

คำสำคัญ (Key words)

DLE

Normal skin

Interferon-alpha

mRNA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย(Operational Definitions)

1. การวินิจฉัยผื่น DLE จากHistopathologyของชิ้นเนื้อที่ตัด

2. Classical discoid lupus erythematosus (DLE) คือ ผื่นแดงราบหรือนูนเล็กน้อย ขอบเขตมักชัดเจนตอนเกิดขึ้นใหม่ๆมีลักษณะเป็นตุ่มแดง มีสะเก็ดแล้วลามขยายตัวออกเป็นวงกลม ตรงกลางผื่นเริ่มมี atrophy มี Telangiectasia พบได้ทั้งแถวขอบผื่นและตรงกลางผื่น และมี follicular plugging คือมีสะเก็ดติดแน่นเห็นเป็นตุ่มดำอุดตันรูขนอยู่ ลักษณะนี้เป็นลักษณะเด่นของ DLE ถ้าลอกเอาสะเก็ดผื่น DLE ออกจะเห็นเป็นตุ่มนูนของรูขนมีลักษณะเหมือนขนพรมที่ติดอยู่กับพื้นพรม(Carpet tacks sign) เมื่อผื่น DLE หายแล้วเหลือเป็นแผลเป็น สี hypo หรือ hyperpigmentation ร่วมกับ telangiectasia พบผื่น DLE ได้บ่อยในบริเวณที่ถูกแสง นอกจากนี้ยังมีผื่น DLE หลายชนิดที่พบได้ ได้แก่ Hypertrophic/verrucous DLE, Mucosal DLE, Lichenoid DLE (LE/lichen planus overlap ,lupus planus) เป็นต้น

3. ผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE คือ ผิวหนังปกติบริเวณ inner aspect of forearms

ปัญหาทางจริยธรรม(Ethical considerations)

ไม่มี เนื่องจากการตัดชิ้นเนื้อบริเวณ ผิวหนังปกติของคนเป็นโรค DLE จะใช้ส่ง Lupus band test ผู้ดำเนินการวิจัย ได้แบ่งครึ่ง เพื่อส่ง extract RNA และ ชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังที่เป็นโรค DLE จะใช้ส่งเพื่ออ่านผลทาง Histopathology ผู้ดำเนินการวิจัย ได้แบ่งครึ่งเพื่อส่ง extract RNA เช่นกัน ส่วนผิวหนังปกติของคนปกติ ผู้ดำเนินการวิจัย ได้นำชิ้นเนื้อปกติ จากแพทย์ศัลยกรรมตกแต่งและแพทย์หูคอจมูกที่ผ่าตัดหนังตา และดึงหน้า จากห้องผ่าตัด ซึ่งได้ขออนุญาตจากผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดแล้ว

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation) : ปัจจัยบางอย่างซึ่งอาจจะส่งผลต่อผลการวิจัย เช่น ปริมาณแสงแดดที่ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับมีความแตกต่างกัน

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits & Application)

1. ทราบว่า Interferon-alpha ใน ผื่น DLE สูงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่
2. ทราบ pathogenesis ของโรคและปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรค
3. ช่วยพัฒนาในการรักษาโรค DLE ในอนาคต (การใช้ Interferon-alpha ในการรักษา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)

การขอความร่วมมือจากผู้ป่วย โดยอธิบายผู้ป่วยเกี่ยวกับโรค และความจำเป็นในการตัดชิ้นเนื้อให้ผู้ป่วยทราบก่อนที่จะให้ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยนี้

การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

การดำเนินการ	2547			2548												2549			
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. การศึกษาเตรียมงาน	*	*	*																
2. ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
3. การวิเคราะห์ข้อมูล												*	*	*	*				
4. การเขียนรายงานและรายงานผล																*	*	*	*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures)

บทบาทของ IFN-alpha ในโรค LE เป็นสิ่งที่นักวิจัยที่มุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับโรค LE ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะว่ามีรายงานการวิจัยหลายรายงานที่สนับสนุนว่า IFN-alpha เกี่ยวข้องกับ pathogenesis ของโรค LE ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องโดยตรง หรือโดยอ้อมกับกลไกการเกิดโรค LE จึงนับว่าเป็นการเปิดมุมมองใหม่ของการศึกษาหาสาเหตุของกลไกการเกิดโรค LE โดยพบว่า ผู้ป่วยที่เป็นโรค Lupus จะมีปริมาณของ endogenous IFN-alpha ใน serum ในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal control[27-28] มีรายงานการวิจัยใน animal models ว่า เมื่อให้ IFN-alpha เกิด autoimmune disease ขึ้น ขณะที่ animal models ที่ไม่ได้รับ IFN-alpha จะเป็นปกติ แต่การเกิด autoimmune disease นี้ สามารถป้องกันได้โดยการฉีด IFN-specific monoclonal antibodies เข้าไปในสัตว์ที่ได้รับ IFN-alpha[29] มีการทดลองโดยการสร้าง NZB murine ที่ไม่มี IFN-alpha/beta receptor พบว่าหนูจะลดการสร้าง autoantibodiesลงส่งผลให้ลดการเกิดanti-erythrocyteantibodies, erythroblastosis, hemolytics anemia, anti-DNA autoantibodies, kidney disease และหนูที่สร้างขึ้นมานี้จะไม่มีการพัฒนาเป็นโรค lupus เลย[30] และมีรายงานการวิจัยที่กล่าวว่าผู้ป่วยใช้ recombinant IFN-alpha ในการรักษาโรค malignancies และโรคตับอักเสบจากไวรัสตับอักเสบชนิดซี มีการพัฒนาการสร้าง autoantibodies ขึ้น โดยที่บางรายมีอาการคล้ายโรค SLE(SLE-like syndrome) เกิดขึ้น[31] และพบว่าผู้ป่วยโรค lupus จะมีความสามารถในการกด B-lymphocyte ไม่ให้มีการ proliferate และการสร้าง antibody ได้ไม่ดี คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจาก IFN-alpha ที่เพิ่มสูงขึ้น เพราะ IFN-alpha มีคุณสมบัติที่จะไปกระตุ้น B-lymphocyte ได้ จึงทำให้ B-lymphocyte สร้าง autoantibodies ขึ้นมา[32] รายงานการวิจัยรายงานหนึ่งกล่าวว่า IFN-alpha ใน serum ของผู้ป่วย LE สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ monocyte ของคนปกติให้กลายเป็น dendritic cell ได้[33]รายงานการวิจัยอีกฉบับกล่าวว่าสามารถที่จะตรวจพบ IFN-alpha producing cell ในเลือดและเนื้อเยื่อของผู้ป่วย LE แต่จะพบปริมาณของ plasmacytoid dendritic cell (เป็น dendritic cell ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิต type 1 interferon ได้อย่างมาก โดยสามารถผลิตได้มากถึง 10 picogram/cell) ในเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพมากกว่าที่จะพบในเลือด เชื่อว่า plasmacytoid มีการ migrate ไปในบริเวณที่เกิด inflammation (พบ plasmacytiod dendritic cell สะสมอยู่เป็นจำนวนมากใน cutaneous LE lesions)[34-38]

แม้ว่าข้อมูลจำนวนมากสนับสนุนบทบาทของ IFN type I ต่อการเกิดโรค LE แต่ยังมีข้อสงสัยหลายประการได้แก่ แหล่งที่มาของ IFN การไม่พบการเพิ่มขึ้นของ IFN type I transcript ใน peripheral blood cell แต่กลับพบ interferon-inducible หรือ interferon-associated signature[21] มีรายงานว่า plasmacytoid DC ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ IFN-α นั้น ถูกพบได้น้อยลงในเลือดของผู้ป่วย SLE แต่กลับถูกสะสมอยู่ในชั้นผิวหนังของผู้ป่วย[25]

แม้มีรายงานว่า IFN-α สำคัญ แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่วัดระดับของ IFN-α ที่ผื่น DLE โดยตรง เคยมีเพียงรายงานศึกษาด้วย Immunohistochemistry พบว่าระดับ MxA protein สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจาก Type I Interferon สูงขึ้น งานวิจัยนี้เน้นศึกษาเกี่ยวกับระดับ mRNA ของ IFN-α เนื่องจาก IFN-α น่าจะมีบทบาทสำคัญที่สุดใน type I Interferon และ ระดับ cytokine ที่ผิวหนัง หากวัดระดับ protein ทำได้ยุ่งยากกว่าการวัดระดับ mRNA และค่าระดับ mRNA ที่วัดได้จะมีค่า sensitivity สูงกว่าด้วย โดยวิธี real time PCR ซึ่งระดับ mRNA ที่วัดได้นี้สามารถบ่งบอกถึงระดับโปรตีน (IFN-α) ได้ดีด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

Lupus erythematosus(LE)

LE เป็นโรคอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่งซึ่งทำให้เกิดโรคในอวัยวะหลายระบบ ผิวหนังเป็นอวัยวะหนึ่งซึ่งมักปรากฏอาการของโรคให้เห็น พบประมาณร้อยละ 70-80 ของผู้ป่วย LE ทั้งหมด [39] โรค LE อาจเป็นเฉพาะที่ผิวหนังเท่านั้น ไม่แพร่กระจายไประบบอื่น(Discoid LE) หรือเป็นเพียงส่วนหนึ่งของโรคซึ่งแพร่กระจายไปในหลายระบบ(Systemic LE ,SLE) ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 20 มีผื่นผิวหนังนำมาก่อนที่จะแสดงอาการทางระบบอื่น[40] ฉะนั้นเวลาตรวจร่างกายผู้ป่วยที่มีผื่นแบบ LE จึงจำเป็นต้องตรวจทุกระบบอย่างละเอียด เพื่อค้นดูว่าโรคได้แพร่กระจายไปยังอวัยวะใดในร่างกายแล้วบ้าง

พยาธิกำเนิดและกลไกการเกิดผื่น LE

ผู้ป่วย LE เป็นผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีนอยู่แล้ว จึงทำให้ผู้ป่วยเป็นโรคนี้ได้ง่ายกว่าคนธรรมดา พบว่าในเด็กแฝดชนิด monozygote ถ้าเด็กคนหนึ่งเป็นโรค LE เด็กแฝดอีกคนมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้สูงถึงร้อยละ 30-65[41]

สิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยหลักอีกประการหนึ่งซึ่งทำให้ผู้ป่วย LE มีอาการแสดงทางผิวหนังโดยเฉพาะแสงแดด ผื่นชนิด LE-specific นั้นถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นหรือเห่อขึ้นหลังจากถูกแสงแดด [42] โดยเฉพาะแสงในช่วง ultraviolet(UV) ปกติแบ่งแสงในช่วงนี้ออกเป็น 3 ชนิดคือ คือ

-UVA

-UVB

-UVC

แสง UVสามารถทำให้ผิวหนังเกิดอักเสบได้โดยไปกระตุ้น keratinocyte ให้หลั่งสารพวก primary cytokine ออกมา เช่น Interleukin 1 (IL1)และ tumor necrosis factor(TNF)-alpha[43] พบว่า primary cytokine เหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine อื่นๆออกมาจาก keratinocyte อีก เช่น Interleukin 6(IL-6), Interleukin 8(IL8), Interleukin 10(IL10), granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), transforming growth factor-alpha(TGF-alpha) และสารกลุ่ม eicosanoids เช่น prostaglandin เป็นต้น สารเหล่านี้ทำให้เกิดเส้นเลือดขยายตัว และเรียกให้ inflammatory cell ออกจากหลอดเลือดเข้ามาสู่บริเวณที่อักเสบได้

แสง UVB สามารถกระตุ้นให้ antibodies บางชนิดโดยเฉพาะพวก Antibody ต่อ extractable nuclear antigens เช่น Ro, La, RNP และ Sm จับกับ keratinocyte[44] ได้ ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการทำลายเซลล์ โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเมื่อ keratinocyte ถูกกับแสง UVB แสงจะกระตุ้นให้มีการเคลื่อนย้ายพวก nuclear antigens บางชนิด เช่น Ro, La, RNP และ Sm ให้มาที่ cell membrane ของ keratinocyte ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ autoantibodies ในเลือดที่ซึมผ่านจากกระแสเลือดเข้ามาสู่ผิวหนังในตอนแรก antibodies เหล่านี้จะจับกับ nuclear antigens บนผิวเซลล์และถูก keratinocyte จับเอา complex นี้เข้าไปใน cytoplasm โดยขบวนการinternalization จากนั้น ก็จะเข้าใน nucleus เกิดขบวนการ apoptosis เกิดขึ้น[45] นอกจากนั้นยังเชื่อว่าแสง UVB สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการ antibody-dependent cellular cytotoxicity(ADCC) ต่อ extractable nucleoprotein antigens ที่อยู่บนผิว keratinocyte แล้วทำให้เกิด cell lysis ได้[46]

ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดในการเกิดผื่นผิวหนังของโรค LE แต่เข้าใจว่าน่าจะเกิดจากหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน เช่น ความผิดปกติของยีน แสง UV กลไกทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น mediators และcytokines ร่วมกับ inflammatory cells โดยเฉพาะ lymphocyte ที่อยู่ในชั้นผิวหนังแท้ ทำให้เกิดการอักเสบและมีผลทำให้ผิวหนังกำพร้ามี cytotoxicity เกิดเป็นผื่นขึ้น[47] การที่แสง UV ทำให้เกิด apoptosis ของ epidermis ทำให้เกิดมี nucleoprotein ที่อยู่ข้างในออกมาข้างนอกและกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง auto-antibody ต่อ nucleoprotein เหล่านั้นขึ้นมา นอกจากนี้แสง UV ยังกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของสาร proinflammatory ทำให้เกิดมีการหลั่ง cytokines และ mediators อื่นๆ เช่น prostaglandins, leukotrienes และพวก adhesive molecules ทำให้มี inflammatory cells หลั่งไหลเข้ามาสู่ผิวหนัง ส่งผลทำให้เกิดขบวนการทำลายเซลล์โดยวิธีการต่างๆ เช่น ADCC, cytotoxicity จาก complement หรือ จาก cytokines ต่างๆ ที่หลั่งออกมา

อาการแสดงทางผิวหนัง

ผู้ป่วยจะมีอาการแสดงทางผิวหนังมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของ LE ว่าเป็นชนิดใด การแบ่งชนิดของผื่น LE มีหลายแบบในที่นี้จะแบ่งตาม James N. Gilliam ซึ่งแบ่งผื่น LE ออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ LE-specific skin disease และ LE-nonspecific skin disease[48] (ตารางที่ 1)

LE-specific skin disease แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ

1. Acute cutaneous LE(ACLE)

2. Subacute cutaneous (SCLE)

3. Chronic cutaneous (CCLE)

ทั้ง 3 ชนิดมีผื่นลักษณะจำเพาะและมีความสำคัญในการพยากรณ์โรค

Acute cutaneous lupus erythematosus (ACLE)

แบ่งผื่นชนิดนี้ออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1) localized ACLE มีผื่นที่บริเวณใบหน้า บางทีเรียกว่า Malar rash หรือ butterfly rash

2) generalized ACLE มีผื่นกระจายทั่วตัว

Subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE)

ผู้ป่วย LE ที่มีผื่นชนิด SCLE นี้เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิก serology และการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่นของผู้ป่วย LE พบได้ประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วย LE ทั้งหมด[49] แบ่งลักษณะผื่นออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ annular polycyclic lesion และ papulosquamous lesion

Chronic cutaneous lupus erythematosus (CCLE)

Classical discoid LE (DLE)

เมื่อก่อนถือว่า chronic cutaneous LE และ discoid LE ใช้แทนกันได้ แต่เดี๋ยวนี้คำว่า chronic cutaneous LE มีความหมายกว้างกว่าเดิมคือ นอกจาก classic DLE แล้วยังรวมถึงผื่นชนิดอื่นด้วย เช่น lupus profundus , lupus tumidus เป็นต้น

Classic DLE เป็นลักษณะผื่นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม CCLE พบผื่น DLE บ่อยในผู้ป่วยอายุประมาณ 20-40 ปี เป็นได้ทั้งเพศชายและเพศหญิง อัตราส่วนของหญิง:ชาย เท่ากับ 3:2 ถึง 3:1 แล้วแต่รายงาน แสดงว่าเพศชายมีโอกาสเป็นโรค DLE ได้มากกว่า SLE เนื่องจากอัตราส่วนของหญิง : ชาย ใน SLE เท่ากับ 9:1 เพศหญิงมีโอกาสเป็นโรคสูงกว่าเพศชายมาก พบผื่น DLE ได้ทุกเชื้อชาติ ลักษณะผื่นของ DLE เป็นผื่นแดงราบหรือนูนเล็กน้อย ขอบเขตมักชัดเจน ตอนเกิดขึ้นใหม่ๆ มีลักษณะเป็นตุ่มแดง มีสะเก็ดแล้วลามขยายตัวออกเป็นวงกลม ตรงกลางผื่นเริ่มมี atrophy มี telangiectasis พบได้ทั้งแถวขอบผื่นและตรงกลางผื่น และมี follicular plugging

คือมีสะเก็ดติดแน่นเห็นเป็นตุ่มดำอุดตันรูขนอยู่ ลักษณะนี้เป็นลักษณะเด่นของ DLE ถ้าลอกเอาสะเก็ดผื่น DLE ออกจะเห็นเป็นตุ่มนูนของรูขนมีลักษณะเหมือนขนพรมที่ติดอยู่กับพื้นพรม (Carpet tacks sign) เมื่อผื่น DLE หายแล้วเหลือเป็นแผลเป็น สี hypo หรือ hyperpigmentation ร่วมกับ telangiectasia พบผื่น DLE ได้บ่อยในบริเวณที่ถูกแสง เช่น หน้าแถวโหนกคิ้ว จมูก โหนกแก้ม ริมฝีปาก นอกจากนี้ยังพบได้แถว หนังศีรษะ หู หน้าอกส่วนบนและบริเวณด้านนอกของแขน ที่หูมีลักษณะสำคัญคือเห็นเป็น atrophy และ scarring รูขนเปิดกว้างร่วมกับมีการอุดตันของรูขน พบบ่อยแถว concha(Concha sign) เรียกผื่นDLE(รูปที่1-6) ผื่นที่เกิดเฉพาะบริเวณหน้าและคอว่า Localized DLE ถ้าผู้ป่วยมีผื่นต่ำกว่าคอลงมาโดยเฉพาะแถวแขนและหน้าอกส่วนบนหรือเป็นทั่วตัวก็เรียกว่า Generalized DLE ถ้าผื่น DLE เป็นแถวรูเปิดของขนเห็นเป็นผื่นเล็กๆ เรียกว่า follicular DLE มักพบบริเวณข้อศอก โดยเฉพาะในชนชาติเอเชีย[50] ที่หนังศีรษะเป็นผื่นแดงมีสะเก็ด ตรงกลางมี atrophy ผื่นคล้ายที่พบที่หน้าร่วมกับผมร่วงบริเวณผื่น เมื่อหายแล้วเกิดเป็นแผลเป็น ผมไม่ขึ้นใหม่ ฉะนั้นควรรีบรักษาผื่น DLE บนหนังศีรษะตั้งแต่แรกเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียง คือผมไม่ขึ้นใหม่บนบริเวณนั้น พบผื่นบนหนังศีรษะได้ประมาณร้อยละ 60 ของผู้ป่วย DLE และประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยมีผื่นเฉพาะที่หนังศีรษะเท่านั้น[51] อาจจะพบว่าผู้ป่วย DLE มีเล็บเสียได้ แต่พบน้อยมาก ที่พบคือ nail-plate dystrophy ผื่น DLE ถูกกระตุ้นด้วยแสงแดดพบว่า ประมาณร้อยละ 68 ของผู้ป่วย ผื่นเห่อขึ้นหลังจากถูกแสงแดด แสงที่สามารถกระตุ้นผื่นได้นั้นมีความยาวคลื่นตั้งแต่ช่วง UVB, UVA จนถึง visible light ผื่น DLE ยังอาจเกิดขึ้นบริเวณที่ถูกกระทบกระแทกหรือมีผิวหนังอักเสบนำมาก่อน (Koebner or isomorphic response) เช่น ตามหลัง trama ร้อยละ 11 , sunburn ร้อยละ 5, infection ร้อยละ 3, exposure to cold ร้อยละ 2 และ pregnancy ร้อยละ1[49] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายาบางชนิด สามารถกรุต้นให้เกิดผื่น DLE ได้เช่น Isoniacid, penicillamine, griseofulvin และ dapsone[49]

ประมาณร้อยละ 55 ของผู้ป่วย DLE มีความผิดปกติของเลือดหรือ serology ได้ แต่ก็มักไม่กลายเป็น SLE[52] ผู้ป่วย generalized DLE มีความผิดปกติของ serology มีโอกาสกลายเป็น SLE ได้มากกว่าผู้ป่วย localized DLE และเมื่อกลายเป็น SLE แล้วก็มักจะเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่าพวก localized DLE ที่กลายเป็น SLE สิ่งที่บ่งชี้ว่าผู้ป่วย DLE มีโอกาสเสี่ยงสูงในการเป็น SLE คือการมีผมร่วงชนิดทั่วๆไปไม่มีแผลเป็น ต่อมน้ำเหลืองโตทั่วๆ ไป periungual nail fold telangiectasia, Raynoud's phenomenon

Hypertrophic DLE(Hyperkeratotic DLE, verrucous DLE)

พบได้น้อยมีลักษณะเป็นผื่นนูนหนา คล้ายหูดหรือ Lichen simplex chronicus บางผื่นอาจมีลักษณะของทั้ง lichen planus และ hypertrophic DLE พบผื่น hypertrophic DLE บ่อยแถวแขน หลังส่วนบนและหน้า ผื่นมักดื้อต่อการรักษา ผู้ป่วยที่มีผื่น hypertrophic DLE ไม่ได้กลายเป็น SLE มากไปกว่าผู้ป่วยที่มีผื่น classic DLE[48]

LE Profundus/LE Panniculitis(Kaposi-Irgang disease)

บางคนใช้ 2 คำนี้แทนกัน ซึ่ง Lupus Profundus หมายถึงผู้ป่วยที่มีผื่น DLE อยู่ข้างบนและมีชั้นไขมันข้างล่างอักเสบร่วมไปด้วย แต่ LE Panniculitis หมายถึงการที่มีชั้นไขมันข้างใต้อักเสบเพียงอย่างเดียว โดยที่ผิวหนังชั้นบนไม่มีผื่น DLE ร่วมด้วย ลักษณะผื่นเป็นก้อนอยู่ในชั้นไขมันใต้ผิวหนังมีขนาดกว้างประมาณ 1-3 ซม. ส่วนใหญ่ไม่มีอาการแต่บางรายจะเจ็บเมื่อกดถูกตุ่มผิวหนังข้างบนอาจมีผื่น classic DLE อยู่หรืออาจแตกเป็นแผลก็ได้ พบบ่อยแถวที่มีไขมันมากๆ เช่น แถวก้น ขาอ่อน ต้นแขน หน้าท้อง ถ้าพบที่เต้านมโดยที่ไม่มีผื่น DLE ร่วมด้วยเรียกว่า Lupus mastitis ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย Lupus panniculitis/profundus มีหลักฐานยืนยันว่าเป็น SLE ซึ่งผู้ป่วย SLE ประเภทนี้มีอาการของโรคไม่รุนแรง[48]

Mucosal DLE

พบได้ประมาณร้อยละ 25 ของผู้ป่วย CCLE[53] มักพบผื่นในปากแถวเพดานปาก กระพุ้งแก้ม และเหงือก บริเวณอื่นก็พบได้แต่พบน้อย ผื่นมีลักษณะเป็นผื่นแดงหรือผื่นถลอกตื้นไม่เจ็บ ถ้าเป็นนานจะนูนขึ้นเล็กน้อย ตรงกลางผื่นอาจมี atrophy ที่ขอบเป็นทางสีขาวแพร่ออกไปจากผื่นหรือเห็นเป็นร่างแหสีขาวคล้ายๆ กับผื่นในปากของโรค lichen planus ในผู้ป่วยบางรายอาจพบเป็นแผลเจ็บได้ เมื่อผื่นหายแล้วอาจกลายเป็นแผลเป็นได้อีกบริเวณที่พบบ่อยคือ แถวริมฝีปากโดยเฉพาะริมฝีปากล่างที่ถูกแสงแดดเป็นประจำ ผื่นมีลักษณะเป็นผื่นแดง ลอกมีสะเก็ด เป็นแผลตื้นๆ และมีน้ำเหลืองแห้งกรังติดอยู่ หรือพบเป็นผื่น Classic DLE บนริมฝีปากเลยก็ได้ แผลในปากและริมฝีปากถ้าเป็นนานๆ อาจกลายเป็นมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma ได้[54] แผลในปากของโรค CCLE นั้นไม่สัมพันธ์กับ activity ของโรค LE

Lupus tumidus

บางรายงานเรียกผื่นนี้ว่า Urticarial plaque of LE พบผื่นชนิด Lupus tumidus น้อยมาก ได้รับรายงานครั้งแรกโดย Gougerot and Bournier[55] ว่าเป็นผื่นที่มีลักษณะเป็นผื่นนูนหนาสีแดงอมม่วง ผิวเรียบมัน บางรายอาจมีสะเก็ดบางๆ อยู่บ้าง อาจมีอาการคันร่วมด้วยได้ เกิดบริเวณ

ตั้งแต่คอขึ้นไป ผื่นหายได้เองโดยไม่เกิดแผลเป็น และเกิดผื่นเห่อขึ้นบริเวณเดิมได้ ผลชิ้นเนื้อพบว่ามี lymphohistiocyte อยู่รอบๆ เส้นเลือดทั้งบริเวณส่วนบนและส่วนล่างของผิวหนังและที่สำคัญคือมี mucin จำนวนมากอยู่ในชั้น reticular dermis ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ dermoepidermal junction ซึ่งเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงอย่างหนึ่งของ LE นั้น อาจพบหรือไม่พบก็ได้ ลักษณะที่ต่างจาก Classic DLE คือ ไม่พบ follicular plugging เมื่อหายแล้วไม่เกิดแผลเป็น และมักเกิดซ้ำที่เดิม[48]

Chilblains LE(Chilblains lupus)

พบมากในผู้ป่วย LE ในเมืองหนาวแต่ยังไม่มีรายงานว่าพบผื่นชนิดนี้ในประเทศไทย

Lichenoid DLE(LE/Lichen planus overlap)

ยังไม่แน่นอนนักว่าโรคนี้หมายถึงอะไร บางรายงานพบว่ามีผู้ป่วยบางกลุ่มที่มีลักษณะทางคลินิกพยาธิสภาพของผิวหนังและ immunofluorescent ก้ำกึ่งกันระหว่างโรค LE และ Lichen planus(LP) ซึ่งไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นโรคอะไรแน่ แต่บางรายงานก็เป็นผู้ป่วยที่เป็นผื่น LP ที่เกิดในผู้ป่วย LE หรือผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเหมือนโรคหนึ่งแต่ลักษณะทางพยาธิสภาพเหมือนอีกโรคหนึ่ง ส่วนมากผื่นของ LE/LP overlap มักมีลักษณะเหมือน lupus hypertrophicus[56] พบว่าพยาธิสภาพของผิวหนังมี band like infiltration ของ lymphohistiocytes

ลักษณะทางพยาธิสภาพของผื่น LE

จุลพยาธิวิทยา(Light Microscopy)

ผื่นผิวหนังชนิด LE-specific skin lesion มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะสามารถให้การวินิจฉัยจากพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อได้ว่าเป็น LE การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญประกอบด้วย มี atrophy ของชั้น epidermis , vacuolar basal cell degeneration คือการที่เห็น basal cell เป็นเซลล์ใสๆ หรือแตกออกเป็นเศษ เซลล์มี basement membrane ที่อยู่ตรงรอยต่อของ epidermis และ dermis หนาขึ้น มีบวมในชั้น dermis และมีเซลล์ชนิด mononuclear cell เข้าไปใน epidermis อยู่ระหว่างรอยต่อของ epidermis กับ dermis อยู่รอบเส้นเลือดและ skin appendage (เช่น ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมันและผม)[57] เห็นลักษณะทั้งหมดนี้แตกต่างกันในแต่ละชนิดของผื่น LE (รูปที่ 7- 10)

ACLE การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพมักไม่เด่นชัดเหมือนใน SCLE หรือ DLE โดยเฉพาะ liquefaction ของ basal cell และ mononuclear celll เห็นไม่เด่นชัดนัก

SCLE การเปลี่ยนแปลงก็เห็นไม่เด่นชัดเท่าใน DLE ใน dermis พบว่ามีการบวม และ mononuclear cell อยู่จำนวนน้อย และมักอยู่เฉพาะชั้นบนๆ ของผิวหนังเท่านั้น[58]

CCLE ผื่นชนิด DLE มีการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของผิวหนังที่เด่นชัด[59] พบว่ามี hyperkeratosis ของ stratum corneum, epidermal atrophy, epidermal basement membrane หนามากเห็นเป็นแถบสีชมพูหนาใน dermis มี mononuclear cell อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะรอย ๆ เส้นเลือดและรอบ appendage มี macrophage อยู่ในชั้น dermis ส่วนบน และมี mucin แทรกอยู่ในชั้น dermis นอกจากนี้ยังเห็นว่าบริเวณรูเปิดของผมกว้างมี plugging ของ keratin อยู่ข้างใน

สำหรับ Lupus panniculitis [60] พบว่ามี lymphocyte, histiocyte และ plasma cell เกาะอยู่ในชั้น dermis ส่วนล่างและชั้น subcutaneous fat โดยเฉพาะบริเวณ lobule ของ fat ตัว fat cell เองมี hyalinization และ necrosis อาจพบ fibrinoid degeneration ของ collagen และมี calcium ไปเกาะที่ fat lobule ได้

Immunohistopathology

คือการศึกษาหา antigen หรือ antibody ที่อยู่ในผิวหนัง โดยใช้วิธีการทาง Immunology โดยปกติมีวิธีการศึกษา Immunopathology ทางผิวหนังคือ

Immunofluorescence technique[61] คือ การหา antigen หรือ antibody ในชิ้นเนื้อโดยย้อมด้วยสาร antibody ซึ่งจับกับ fluorescein เรืองแสงได้เมื่อถูกกับแสงความยาวคลื่น 490-495 นาโนเมตร ที่ใช้บ่อยทางผิวหนัง เรียกว่า Direct immunofluorescence คือการตัดชิ้นเนื้อผิวหนังแล้วแช่ใน liquid nitrogen หรือ dye ice ทันที นำเข้าห้องปฏิบัติการ ตัดชิ้นเนื้อหนาประมาณ 4 ไมครอน แล้วนำไปย้อยด้วย antibody ที่จับกับ fluorescein เสร็จแล้วนำไปอ่านด้วยกล้อง fluorescence ถ้าชิ้นเนื้อนั้นมี antigen ที่จำเพาะก็จะจับกับ antibody ที่ใส่เข้าไปเห็นเรืองแสงเป็นแสงสีเขียวออกมา

การพยากรณ์โรค

ACLE ผื่นชนิดทั้ง localized และ generalized form ของ ACLE มักเห่อเป็นครั้งคราว ขึ้นอยู่กับ disease activity ของ SLE ของผู้ป่วย ฉะนั้นการพยากรณ์โรคของ ACLE จึงขึ้นอยู่กับโรค SLE พื้นฐานผู้ป่วย

SLCE ผื่นมักขึ้นๆ หายๆ เป็นช่วง โดยอาจไม่มีอาการทาง systemic ก็ได้ ส่วนใหญ่การพยากรณ์โรคมักจะดี ยกเว้นในรายที่มี SLE ร่วมด้วย การพยากรณ์โรคก็จะขึ้นอยู่กับอวัยวะภายในที่เป็นโรค SLE เช่น ไต ระบบเลือด เป็นต้น

CCLE มักเป็นเฉพาะที่ผิวหนัง prognosis ดี ผู้ป่วยไม่ตายจากโรคแต่ผื่นก็อาจลุกลามมากขึ้นเรื่อยๆ เกิดเป็นแผลเป็นถ้าผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งความผิดปกติของผิวหนังใน LE ตาม “Gilliam Classification”

I. LE-specific skin disease (cutnaeous LE [CLE])
- A. Acute cutaneous LE [ACLE]
  - 1 Localized ACLE (malar rash: butterfly rash)
  - 2. Generalized ACLE (lupus maculopapular lupus rash. SLE rash. rash. photosensitive lupus dermatitis B. Subacute cutaneous LE [SCLE]
  - 1 Annular SCLE (lupus marginatus. symmetric erythema centrifugum, autoimmune annular erythema lupus erythematosus gyratus repens)
  - 2. Papulosquamous SCLE (disseminated OLE, subacute disseminated LE, superficial disseminated LE psoriasiform LE. pityriasiform LE. and maculopapular photosensitive LE)
- C. Chronic cutaneous LE [CCLE]
  - 1. Classic discoid LE (OLE)
    - a. Localized OLE
    - b. Generalized OLE
  - 2. Hypertrophic/verrucous OLE
  - 3. Lupus profundus/lupus panniculitis
  - 4. Mucosal OLE
    - a. Oral OLE
    - b. Conjunctival OLE
  - 5. Lupus tumidus (urticarial plaque of LE)
  - 6. Chiblains LE (chilblains lupus)
  - 7. Lichenoid OLE (LE/lichen planus overlap. lupus planus)

II. LE-nonspecific skin disease
- A. Cutaneous vascular disease
  - 1. Vasculitis
    - a. Leukocytoclastic
      - (1) Palpable purpura
      - (2) Urticarial vasculitis
    - b. Periarteritis nodosa-like cutaneuous lesions
  - 2. Vasculopathy
    - a. Oegos. disease-like lesions
    - b. Secondary atrophie blanche (livedoid vasculitis. livedo vasculitis)
  - 3. Periungual telangiectasia
  - 4. Livedo reticularis
  - 5. Thrombophlebitis
  - 6. Raynaud's phenomenon
  - 7 Erythromelalgia (erythermalgia)
- B. Nonscarring alopecia
  - 1. "Lupus hair"
  - 2. Telogen effluvium
  - 3. Alopecia areata
- C. Sclerodactly
- D. Rheumatoid nodules
- E. Calcinosis cutis
- F. LE-nonspecific bullous lesions
- G. Urticaria
- H. Papulonodular mucinosis
- I. Cutis laxa/anetoderma
- J. Acanthosis nigricans (type B insulin resistance)
- K. Erythema multiforme
- L. Leg ulcers

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงผื่น Classic DLE บริเวณใบหน้าของผู้ป่วยชาย

รูปที่ 3 แสดงผื่น Classic DLE ด้านข้างของผู้ป่วยรายเดียวกับรูปที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงผื่น Scalp DLE บริเวณหนังศีรษะ

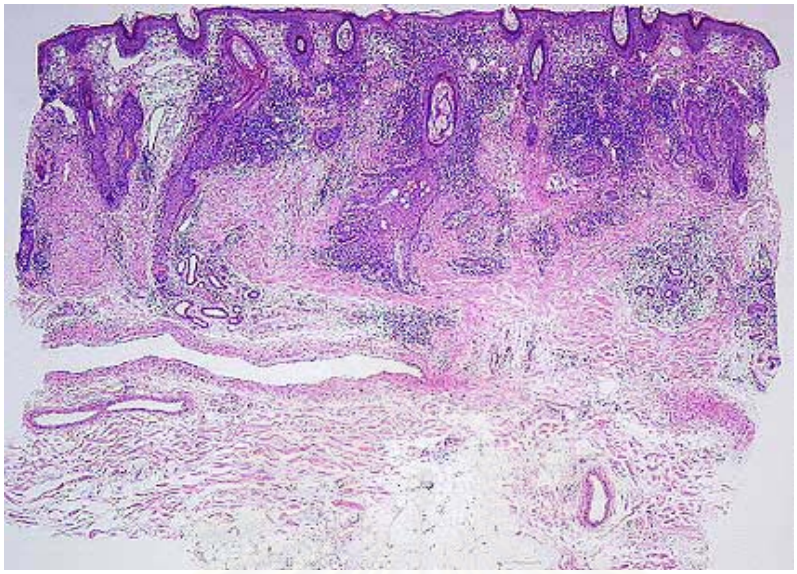
รูปที่ 5 แสดงผื่น Classic DLE ที่พบบริเวณแขนทั้งสองข้าง พบใน Generalized DLE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

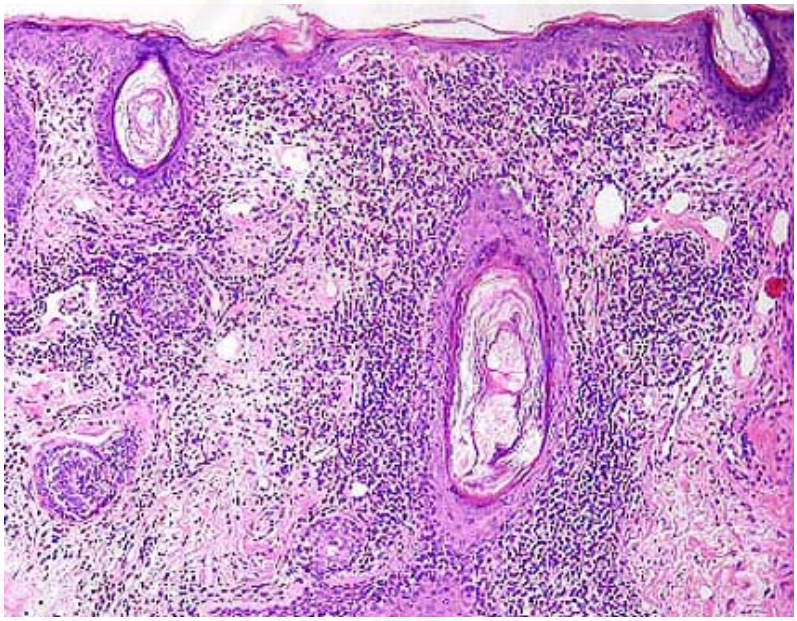
รูปที่ 6 แสดงผื่น Classic DLE บริเวณใบหน้าของผู้ป่วยหญิง

รูปที่ 7 แสดงผื่น DLE พบ Carpet tacks sign บนแก้มผู้ป่วยหญิงรายนี้

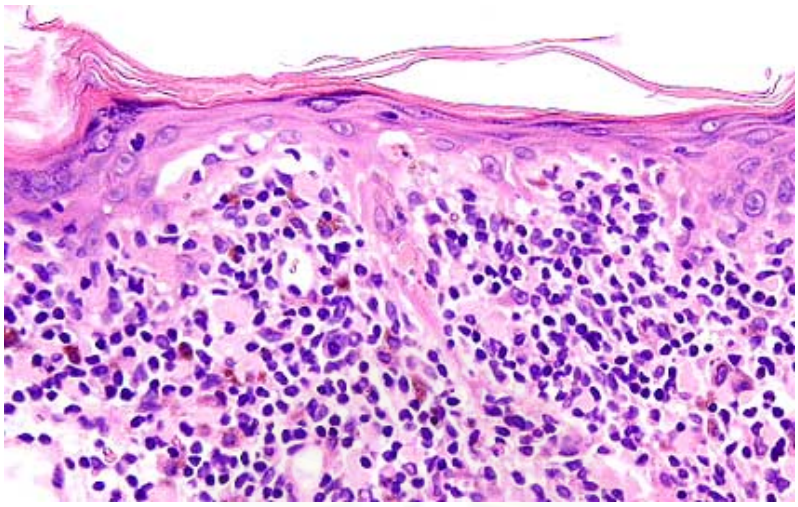
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



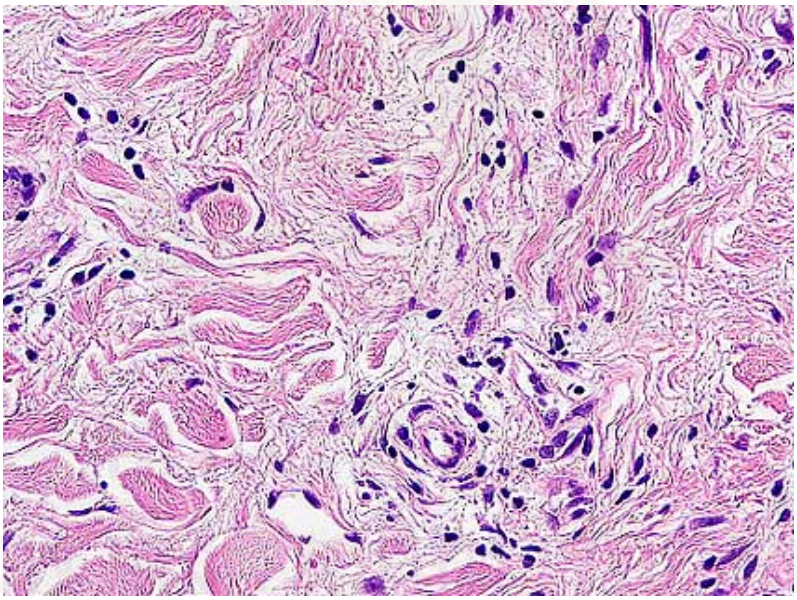
รูปที่ 8 แสดงจุลพยาธิวิทยาของผื่น DLE พบว่าเม็ดเลือดขาวกระจายตัวบริเวณด้านบนของ superficial และ deep dermis รอบบริเวณหลอดเลือด ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน และขน



รูปที่ 9 แสดงภาพขยายของรูปที่ 7 ว่า เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells อยู่รอบเส้นผม



รูปที่ 10 แสดงชั้น basal cell มีการเปลี่ยนแปลง พบว่ามี vacuolar change ของ basal cell และมี melanophage ตกลงมาอยู่ในบริเวณ superficial dermis



รูปที่ 11 แสดง mucin ที่แทรกอยู่ในชั้น dermis ในผู้ป่วย DLE

บทที่ 4

อินเตอร์เฟียรอน (Interferon)

อินเตอร์เฟียรอน(Interferon หรือ IFN) เป็น cytokine ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ทนต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสได้ ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1957 โดย Isaacs และ Lindenmann ในระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องการรบกวนและขัดขวางกันเองระหว่างไวรัส(virus interference)[62]

คุณสมบัติของอินเตอร์เฟียรอน คือ

1. เป็น glycoprotein
2. สร้างโดยสัตว์มีกระดูกสันหลัง(verteberate)หลายชนิด
3. มีโครงสร้างไม่เหมือนกัน ถ้าถูกสร้างในสัตว์ต่างชนิดกัน ดังนั้น IFN ของสัตว์ชนิดหนึ่งจึงไม่มีผลต่อสัตว์ชนิดอื่น (species specific)
4. ออกฤทธิ์ไม่จำเพาะต่อชนิดของไวรัส(no viral specificity)

ชนิดของอินเตอร์เฟียรอน(Type of interferon)

สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามคุณสมบัติทางเคมี และตามลักษณะของแอนติเจนที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง IFN คือ แบ่งเป็น Interferon ชนิด alpha, beta และ gamma คุณสมบัติของ human interferon มีดังแสดงในตาราง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงถึงคุณสมบัติของ Interferon

คุณสมบัติ	ALPHA	BETA	GAMMA
ชื่อเดิม	Le-IFN	F-IFN	Immune IFN
	Type I	Type I	Type II
subtypes	13	1	1
จำนวน amino acid	166,monomer	166,monomer	143,homodimer
น้ำหนักโมเลกุล	16-23KD	23 KD	20-25 KD
Glycosylation	ไม่มี	มี	มี
ความคงทนที่pH2	คงทน	คงทน	ไม่คงทน
เซลล์ที่สร้าง	leukocytes	fibroblasts	T-cell, NK-cell
การชักนำโดย	ไวรัส	ไวรัส	Mitogens, antigen
receptor	CD118,IFNAR2	CD118,IFNAR2	CD119,IFNGR2

ฤทธิ์ต้านไวรัสของอินเตอร์เฟียรอน (antiviral action of IFN)

อินเตอร์เฟียรอนไม่ได้ออกฤทธิ์โดยตรงต่อตัวไวรัส แต่มีผลทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์เฟียรอนอยู่ในสภาพต้านไวรัส (antiviral state) โดยยอมให้มีการติดเชื้อแต่จะยับยั้งการ replicate และการ assembly ของไวรัส ตัวอย่างเช่นยับยั้งการ budding ที่ผิวเซลล์ของ retrovirus และห้ามการสร้าง structural protein การออกฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral action) ของ IFN มีผลทำให้มีการย่อย massenger RNA และห้ามการสร้างโปรตีนของเซลล์ การทำงานในขั้นแรกของอินเตอร์เฟียรอน เริ่มโดย IFN จะเข้าไปเกาะบนตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์ปกติแล้วกระตุ้นให้เซลล์สร้างเอ็นซัยม์ 3 ชนิด คือ

1. 2-5 Asynthetase
2. RNase L หรือ RNase F หรือ endoribonuclease
3. Protein kinase เมื่อมีไวรัสหรือตัวชักนำ IFN (IFN inducer) เข้ามาในเซลล์ จะกระตุ้นให้เอ็นซัยม์ทั้งสามชนิดทำงาน

สารชักนำการสร้างอินเตอร์เฟียรอน (IFN inducer) มีหลายชนิด คือ

1. กรดนิวคลิอิก ในรูป double stranded RNA (dsRNA) จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IFN ได้ดีที่สุดและกรดนิวคลิอิกในรูป ssRNA, DNA หรือสารโพลีเมอร์ เช่น Poly (I) . Poly (C) ก็เป็นตัวกระตุ้นได้

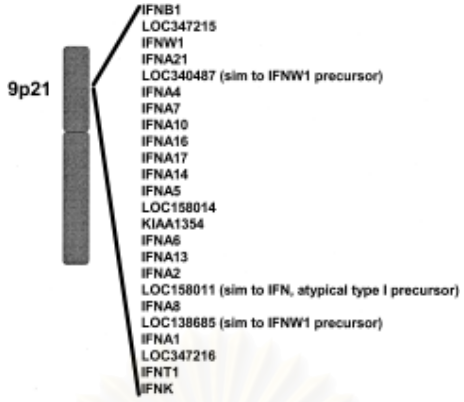
2. สารชีวภาพ (Biological inducer) เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดคือ ไวรัส, คลามัยเดีย (chlamydia), ริคเกตเซีย (rickettsia), โปรโตซัว และสารพิษ เช่น endotoxin สามารถกระตุ้นการสร้างอินเตอร์เฟียรอนได้ นอกจากอินเตอร์เฟียรอนมีฤทธิ์ต้านไวรัสได้แล้วยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ อีก เช่น สามารถ ห้ามการแบ่งตัวของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งเช่นยับยั้งการงอกใหม่ (regeneration) ของเซลล์ตับ,ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไขกระดูก (bone marrow cells) การยับยั้งเซลล์มะเร็งของ IFN ทำโดยการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเช่น Natural Killer cells, Macrophage, Cytotoxic T-cells (ชื่อเดิมของ IFN-gamma คือ macrophage activating factor, MAF) พบว่าถ้าให้ IFN-gamma ก่อนการให้แอนติเจนจะมีการสร้างแอนติบอดีย์และ delayed type hypersensitivity แต่ถ้าให้ IFN-gamma ภายหลังให้แอนติเจนแล้วจะมีการกระตุ้นทั้ง Humoral Immunity และ Cell mediated Immunity.

การควบคุมการสร้างอินเตอร์เฟียรอน

ใน มนุษย์พบว่ายีนส์ที่ควบคุมการสร้างอินเตอร์เฟียรอน (structural gene) มีดังนี้ IFN-alpha โครโมโซมที่ 9 (2,5)สำหรับยีนส์ที่ควบคุมการสร้าง interferon receptor อยู่ที่โครโมโซมที่ 21

Type 1 interferon (IFN)

ยีนใน type I interferon ตั้งอยู่บนโครโมโซม 9p21 ซึ่งควบคุมการสร้างtype interferon หลายชนิด ประกอบด้วย IFN-alpha จำนวน 13 genes คือ IFN-alpha21, IFN-alpha4, IFN-alpha7, IFN-alpha10, IFN-alpha16, IFN-alpha17, IFN-alpha14, IFN-alpha5, IFN-alpha6, IFN-alpha13, IFN-alpha2, IFN-alpha8, และ IFN-alpha1 รวมทั้ง IFN-beta1, IFN-gamma



รูปที่ 12 แสดงถึงตำแหน่งของกลุ่มยีน type I interferon ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ของมนุษย์

ถึงแม้ว่า interferon-alpha จะมีถึง 13 subtypes แต่มีคุณสมบัติหลายประการที่ไม่แตกต่างกัน เช่น การมี gene ที่เหมือนกัน(share identity)มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถจับกับ common cellular surface receptor เดียวกันได้ คือ IFN-alpha/beta receptor ทุก subtypes สามารถที่จะเป็น antivial ได้ ความแตกต่างของแต่ละ subtypes อยู่ที่จำนวนปริมาณของแต่ละ subtypes และความแตกต่างทางคุณภาพ(qualitative differences) ของแต่ละ subtypes

Type I interferon เป็น cytokine ที่สำคัญในการเชื่อมระหว่าง innate และ adaptive immune response จะมีปริมาณที่สูงเมื่ออยู่ระหว่างการติดเชื้อไวรัส และสามารถถูกสร้างจากการติดเชื้อบางชนิดได้ เช่น Gram-negative bacteria และ Protozoa (เช่น *Escherichia coli, Leishmania major*) เป็น cytokine ที่ส่งเสริมการแสดงออกของ MHC class I แต่เป็น poor inducers สำหรับ MHC class II สามารถเหนี่ยวนำให้ dendritic cell มีการแสดงออกของ costimulatory molecules มากขึ้น เช่น CD80, CD83, CD83 และ CD40 กระตุ้น monocytes และ T cells ให้สร้าง interleukin-10 (IL-10) และกระตุ้น B-cell ให้เกิด Ig class Switching

บทที่ 5

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ
(Real Time PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส(PCR)[63-64]

Polymerase chain reaction (PCR) หรือ ปฏิกิริยาลูกโซ่ เป็นวิธีทางอณูชีววิทยา ทางห้องปฏิบัติการที่ง่าย รวดเร็ว ที่จะเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอใดๆ หรืออาจเรียกว่า "molecular photocopying" ซึ่งเป็นวิธีทางที่ "revolutionary" and "breakthrough."ทำให้เกิดการพัฒนาต่างๆขึ้นอย่างมาก ผู้ที่คิดวิธี PCR คือ Kary Mullis ในปีค.ศ. 1983 เขาได้รับรางวัลสูงสุดทางวิทยาศาสตร์คือ Nobel Prize ในปีค.ศ. 1993 ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ทำให้สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ แม้จะมีปริมาณแค่หนึ่งชิ้นท่ามกลางดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีมากถึง 10^5 เซลล์ และทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนั้นมีมากถึง N0 x 2n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (2,3,4) N0 คือปริมาณดีเอ็นเอที่ตั้งต้น วิธี PCR จึงเป็นขบวนการที่ใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอณูชีววิทยา (molecular diagnostics)

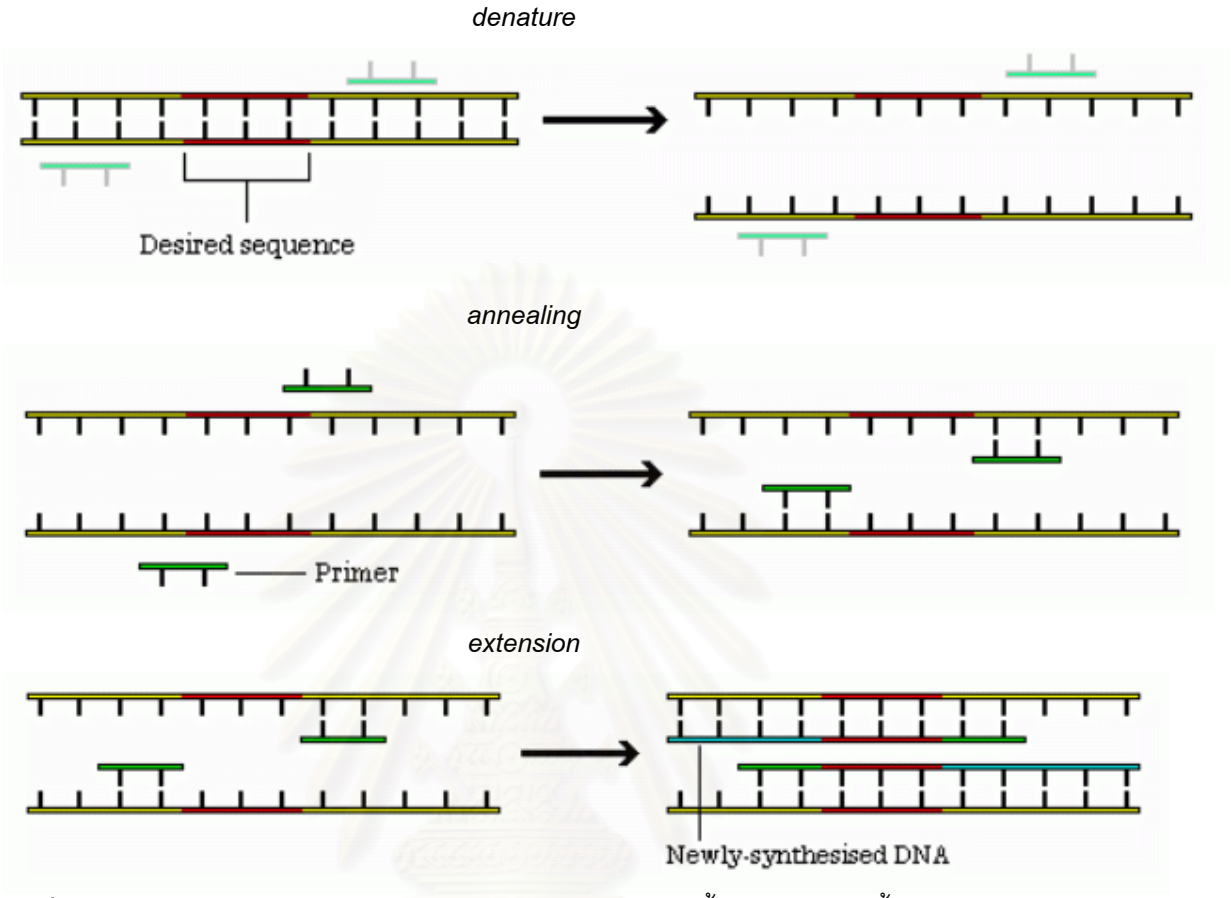
ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โมเลกุลต้นแบบ (template molecule) ซึ่งอาจเป็น DNA หรือ RNA ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ สายนิวคลิโอไทด์เส้นเดี่ยวสั้นๆที่มีลำดับเบสจำเพาะคู่สมกับ template (primer molecules) เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณ template DNA

ขั้นตอนของ PCR ประกอบด้วย

1) denatured การทำให้สายคู่ของดีเอ็นเอแยกจากกันด้วยความร้อน 90-96 C

2) hybridization หรือ annealing เป็นขั้นตอนที่ primers ไปจับกับสายเดี่ยวดีเอ็นเอที่แยกจากกันในข้อ 1 เกิดที่อุณหภูมิ 50-60 C

3) ดีเอ็นเอสายใหม่ถูกสร้างด้วยเอนไซม์ polymerase ที่ทนต่อความร้อน คือ *Taq polymerase* เกิดที่อุณหภูมิ 72 C ทำให้ได้สายใหม่ของดีเอ็นเอจับคู่กับ template DNA เป็นสองคู่ ขั้นตอนที่ 1-3 รวมเรียกว่า 1 cycle การทำซ้ำขั้นตอน 1-3 หลายๆครั้ง (หลาย cycle) ทำให้ได้ปริมาณ DNA ที่ขยายเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามลำดับเป็นแบบ exponential คือเป็นสองเท่าในแต่ละครั้งของ cycle แต่ละ cycle ใช้เวลา 1-3 นาที ดังนั้นในเวลาเพียง 45 นาที ปริมาณ DNA จะเพิ่มเป็นล้านเท่า



รูปที่ 13 แสดงการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การแยกคู่สายดีเอ็นเอต้นแบบจากกัน(denaturing) ที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. การจับคู่สมระหว่าง primer กับดีเอ็นเอต้นแบบ(annealing) ที่อุณหภูมิประมาณ 40-60องศาเซลเซียส

3. การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ(DNA synthesis หรือ extension) โดยการนำเบส A, G, T และ C มาต่อส่วน primer ในทิศทาง 5’ ไป 3’ ที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบของวิธี PCR[65-69]

PCR เป็นวิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนในหลอดทดลองที่มี deoxy nucleotide triphosphate(dNTP) ในส่วนประกอบสารละลายที่เหมาะสม โดยแต่ละลำดับของปฏิกิริยา PCR จะถูกควบคุมโดยเครื่อง Thermal cycler ปฏิกิริยา PCR จะทำการสังเคราะห์ดีเอ็น

เอ บริเวณที่อยู่ระหว่าง oligonucleotide primer 2 สาย (รูปที่ 14) ซึ่งเรียกว่า forward primer และ reverse primer

องค์ประกอบในการทำ PCR มีดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือ ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยส่วนของยีนหรือดีเอ็นเอที่เราต้องการสังเคราะห์โดยอาจสกัดได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ หรือได้จากวิธีการทางอณูชีววิทยาอื่น

2. Oligonucleotide primer เป็น nucleotide สายสั้นๆ ซึ่งเริ่มต้นจับกับยีนหรือดีเอ็นเอต้นแบบสายตรงข้ามซึ่งเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยทั่วไป primer นี้ ได้จากการออกแบบโดยดูลำดับเบสที่เหมาะสมซึ่งอาจใช้ซอฟท์แวร์ได้ และ primer นี้จะถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยเครื่อง Oligonucleotide synthesizer ซึ่งปัจจุบันมีบริษัทและองค์กรซึ่งรับสั่งผลิตในประเทศไทย

3. Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) คือเบสที่จะถูกนำเข้าไปต่อจากสาย primer ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ dNTP ที่ใช้จะประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น 20-200 ไมโครลิตร

4. Buffer เป็นสารละลายที่ทำให้ปฏิกิริยา PCR เป็นไปได้อย่างเหมาะสมซึ่งประกอบด้วย Tris HCl, KCl, และ $MgCl_2$ โดยที่ความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก กล่าวคือ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เปลี่ยนไปจะทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีปริมาณแตกต่างกัน โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR จะใช้ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.5-2.0 mM การเพิ่มหรือลดปริมาณ Mg^{2+} บางครั้งจะช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นได้ แต่หากความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไปจะทำให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการขึ้นได้ ในทางปฏิบัติควรมีการทดลองใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมที่สุด

5. เอ็นไซม์ DNA polymerase โดยทั่วไปที่ใช้ได้ผลดี คือ เอ็นไซม์ Tag polymerase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ทนความร้อนทำให้สามารถใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้หลายๆ รอบ ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 1-2.5 unit ต่อปฏิกิริยา ปัจจุบันมีการค้นพบ Scoffel fragment ของเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษสามารถทำงานได้ดีในช่วงกว้างของความเข้มข้น Mg2+ ตั้งแต่ 2-10 mM และทนความร้อนได้ดีกว่า ซึ่งมีประโยชน์ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบที่มี G-C มาก หรือมีโครงสร้างทุติยภูมิ สามารถเพิ่มอุณหภูมิได้สูงขึ้นในขั้นตอนแยกดีเอ็นเอให้กลายเป็นเส้นเดี่ยว(denaturation)

กุญแจสำคัญของ PCR คือ เอนไซม์ *Taq polymerase* โดยที่ *Taq* คือชื่อย่อของ *Thermus aquaticus* แบคทีเรียที่อาศัยและเพิ่มจำนวนในบ่อน้ำพุร้อน ทำให้สามารถทำงานได้ที่

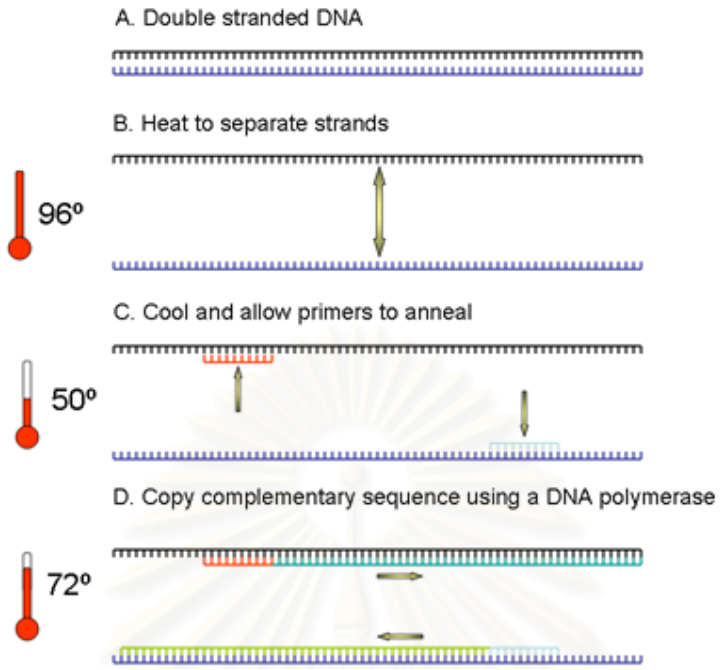
อุณหภูมิสูง PCR ถูกนำมาใช้ในวิทยาศาสตร์ทาการแพทย์ ด้านต่างๆ ได้แก่ การตรวจหาจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะจุลชีพที่มีการเพาะเลี้ยงยาก หรือมีปริมาณน้อยในสิ่งส่งตรวจ การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเฉพาะยีนมนุษย์

6. อุปกรณ์หลักที่สำคัญในการทำ PCR คือ เครื่อง thermal cycler (รูปที่ 24)ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถตั้งโปรแกรมให้เพิ่มลดอุณหภูมิเป็นรอบๆ ตลอดจนสามารถตั้งจำนวนรอบตามที่ผู้ปฏิบัติงานต้องการได้ นอกจากนี้ยังต้องการอุปกรณ์สำหรับทำagarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ PCR products ที่ได้ ส่วนวัสดุที่ใช้นั้นได้แก่ microtubes, micropipettes tips และ autopipette

การทำ PCR แต่ละครั้งจะ ทำในปริมาตรที่น้อยเพียง 50-100 ml ใน PCR tube ขนาด 500 ml ที่ทำด้วยพลาสติกบาง นำความร้อนได้ดี ซึ่งจะถูกนำไปวางในเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงต่อครั้ง อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาการทำ PCR ใน capillary tube ปริมาตรเพียง 1-2 ml ซึ่งทำให้ประหยัดค่าเอนไซม์ และทำได้ในเวลารวดเร็วประมาณ 30 นาที

ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ทำให้สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ แม้จะมีปริมาณแค่หนึ่งชิ้นท่ามกลางดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีมากถึง 10^5 เซลล์ และทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนั้นมีมากถึง N0 x 2n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ N0 คือปริมาณดีเอ็นเอที่ตั้งต้น วิธี PCR จึงเป็นขบวนการที่ใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอณูชีววิทยา (molecular diagnostics)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 หลักการและขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

1. แยกสาย DNA ออกเป็นสายเดี่ยวด้วยอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส และทำให้เย็นลงที่ 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ forward primer และ reverse Primer ไปเข้าคู่กับ DNA

2. DNA polymerase นำ dNTP ไปต่อสาย DNA ที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส และรอบต่อๆไป ก็เป็นเช่นนี้

การป้องกันการปนเปื้อนใน PCR[70]

การทำ PCR นั้นจำเป็นจะต้องมีความระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ดังนี้

1. สถานที่ : ในการทำ PCR ควรแยกบริเวณที่ทำ PCR เป็นสัดส่วน และความใช้เครื่องมือแยกชุดต่างหาก สำหรับทำ PCR โดยเฉพาะ(รูปที่ 15)

รูปที่ 15 อุปกรณ์ต่างๆ แยกเป็นสัดส่วน และใช้สำหรับ extract mRNA ในวิจัยนี้

2. การ autoclave : สำหรับ microtube และ pipett tips ควรมีการทำลาย DNA โดย autoclave ก่อนใช้ หรืออาจใช้ filter pipette tip

3. น้ำ : แหล่งปนเปื้อนที่สำคัญที่มักจะถูกละเลยคือ แหล่งน้ำที่ใช้ในการทำ PCR ซึ่งทำให้การทำ PCR ไม่ได้ผลตามที่ต้องการ ดังนั้นผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นจะต้องดูแล และคอยเปลี่ยนวัสดุกรองน้ำตามความจำเป็น

4. PCR reagent : สารที่ใช้สำหรับการทำ PCR (PCR reagent) ความแบ่งไว้เป็นหลอดเล็กๆ (aliquot) โดยแบ่งให้พอที่จะใช้ แล้วทิ้งหลอดเลยหลังใช้

5. ตัวควบคุม : ควรใช้ตัวควบคุมทั้ง positive control และ negative control เสมอ ทุกครั้งที่ทำ PCR เพื่อให้แน่ใจว่า ผลที่ได้น่าเชื่อถือ และมีการป้องกันไม่ให้ผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ไว้ก่อนกลับมาปนเปื้อนในปฏิกิริยาใหม่

การจัดแบ่งห้องสำหรับทำ PCR[71-73]

การจัดวางสถานที่ในห้องปฏิบัติการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากผลผลิต PCR ที่จะก่อให้เกิดผลบวกปลอมนั้น มีหลักการอยู่ 2 แบบ คือ

1) ป้องกันไม่ให้มี DNA ที่ไม่ต้องการ เช่น ผลผลิต PCR หรือ จากตัวอย่างตรวจอื่น ปนเข้าไปในตัวอย่างตรวจ ขณะเตรียม DNA lysate และ PCR reagent ทำได้ด้วยการแบ่งห้องออกเป็น 3 ห้องที่ชัดเจน ได้แก่ ห้อง pre-PCR เป็นห้องที่ใช้เตรียม PCR reagent และ DNA lysate ห้องนี้จะเป็นห้องแรก ห้องที่สอง ได้แก่ ห้อง PCR เป็นที่ตั้งของ DNA

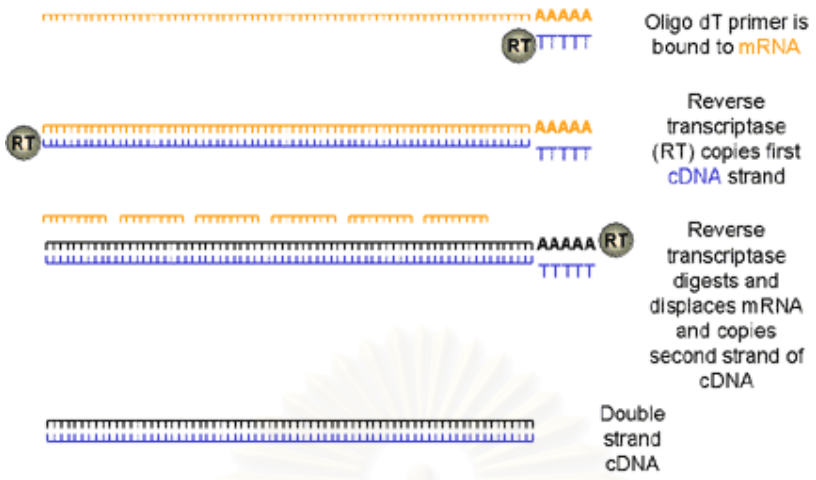
thermal cycler โดย PCR tube ที่มาจากห้อง 1 จะถูกนำมาใส่เครื่องนี้ ห้ามเปิดฝา PCR tubes ที่ทำเสร็จแล้ว และห้องที่สาม คือ ห้อง post-PCR เป็นห้องที่ใช้ตรวจหาผลผลิต PCR โดย PCR tubes จากห้องที่สองถูกนำมายังห้องที่สามนี้ และถูกทิ้งไว้ในห้องนี้ จะไม่มีการนำ PCR tubes หรือสิ่งที่อยู่ในห้อง post-PCR ย้อนกลับผ่านเข้าไปในห้อง pre-PCR และ post-PCR

2) เป็นการควบคุมไม่ให้ผลผลิต PCR ปนเปื้อนไปยังช่วงที่ทำ pre-PCR ทำได้ด้วยการรวมห้อง PCR และ post-PCR อยู่ด้วยกัน แยกออกมาจากห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ใช้เตรียม PCR reagent และ DNA lysate การผ่านเข้าออกห้องนี้ จะต้องมีการสวมเสื้อกาวน์ที่ใช้เฉพาะในห้องนั้น ใส่พลาสติกคลุมรองเท้า หรือเปลี่ยนรองเท้า ห้ามนำสิ่งของแม้แต่กระดาษออกจากห้องนี้ เพื่อกันไม่ให้มีการแพร่กระจายของผลผลิต PCR ออกไป ดังนั้นส่วนอื่นๆของห้องปฏิบัติการจะเป็นพื้นที่สะอาดปราศจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ของใช้ต่างๆสำหรับทำ PCR จะต้องแยกใช้ตามห้องที่แยกไว้ ไปเปตควรจะใช้แบบที่ผ่าน autoclaveได้ และควรฉายแสง UV เสมอ ขั้นตอนการแยก DNA หรือ RNA จากตัวอย่างตรวจ ควรเลือกแบบที่สั้นทำเสร็จเร็ว เพื่อลดโอกาสของการปนเปื้อน ห้องต่างๆที่ใช้ทำ PCR ควรจะเปิด UV light ทุกครั้งเมื่อไม่มีการใช้

การสร้าง cDNA (cDNA synthesis)

การสร้าง cDNA คือ สร้างจาก cDNA เกลียวคู่จาก mRNA ที่ต้องการศึกษา โดยการทำ reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) (รูปที่ 16)คือ การเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA ก่อนด้วยเอ็นไซม์ reverse transcriptase และใช้ oligo dT เป็น Primer หลังจากนั้นใช้สารละลายด่างหรือเอ็นไซม์ RNase H ย่อย mRNA ทิ้งไป ตามด้วยการทำ PCR ตามปกติ ทำให้ได้ cDNA เกลียวคู่ ซึ่งสามารถนำไปตรวจสอบยีนจำเพาะได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 การสร้าง cDNA เกลียวคู่จาก mRNA โดยการทำ reverse transcriptase Polymerase chain reaction(RT-PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ(Real Time PCR)

ในปีค.ศ. 1992 กลุ่มของ Russell Higushi ที่ Roche Molecular Systems ได้พัฒนาวิธีการวัดปริมาณ (quantitative) ผลผลิต PCR แบบ kinetic คือ ปฏิกิริยา PCR และการตรวจหาผลผลิต PCR จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ด้วยการใช้ ethidium bromide (EtBr) ที่จับกับดีเอ็นเอ ซึ่งจะให้ Fluoresces ออกมาวัดได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ultraviolet โดยเป็นการวัดขณะที่ผลผลิต PCR ยังอยู่ใน PCR tube

ต่อมาในปี ค.ศ. 1995-1996 มีการผลิตเครื่องมือสำหรับทำ real-time PCR ชนิดแรก ได้แก่ Perkin-Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detection System และตามมาด้วย LightCycler ของบริษัท Idaho Technology (ปัจจุบันผลิตและจำหน่ายโดย Roche Molecular Biochemicals) เครื่องมือทั้งสองชนิดใช้ Fluorogenic chemistry ในการวัดปริมาณผลผลิต PCR ดังนั้นเครื่องมือทั้งสองชนิดจึงเป็นทั้ง thermal cyclers และ optical detection systems ในเครื่องเดียวกัน

เป็นวิธีที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นทวีคูณ วิธี real time PCR ต่างจากวิธี PCR ทั่วไป โดย สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ ในทุกช่วงของปฏิกิริยา ขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมายที่วัดขึ้นอยู่กับปริมาณของสาร ฟลูออเรสเซนต์

(fluorescent reporter) โดยสัญญาณนี้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของผลิตผล PCR ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ ในขณะที่วิธี PCR ทั่วไปจะวัดปริมาณผลิตผลของ PCR ที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยการตรวจสอบด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจล(agarose gel electrophoresis) ซึ่งจะใช้เวลานานในการหาปริมาณดีเอ็นเอและผลที่ได้ขึ้นอยู่กับการแยกขนาดโดยเจล ซึ่งอาจมีความแม่นยำไม่เพียงพอ และมีความไวต่ำกว่า

เครื่องมือที่ใช้ทำ real-time PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ในปัจจุบัน ได้ก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้สามารถตรวจนับปริมาณผลผลิตของPCR ที่ได้ในแต่ละ cycle ไปพร้อมกับการทำการขยายเพิ่มจำนวน ในเวลาสั้น และทำได้ในปริมาณมาก (high throughput) ใช้น้ำยาในปริมาณลดลง เรียกว่า "kinetic" หรือ "real-time" PCR เครื่องมือที่ใช้เป็นระบบ Fluorescence-detecting thermocyclers โดยการใช้ Fluorecence dye ในขั้นตอน primer หรือ probe เพื่อให้ผลผลิตของ PCR ที่เป็น double strand DNA ถูกปิดฉลากด้วย Fluorescence เครื่องมือที่ใช้ทำ Real-time, quantitative PCR มี 1) Fiber-optic (Prism 7700) 2) Photo-diode/capillary (LightCycler) 3) CCD-camera (Geneamp 5700) ส่วนน้ำยา Fluorescence chemistry ได้แก่ 1) Probe (Taqman) 2) Dye-alone (SYBR Green I)

เครื่องมือ Fluorescence-detecting thermocycler ที่มีจำหน่ายเป็นเครื่องแรก คือ Prism 7700 (Perkin-Elmer/ABI) ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แสงเลเซอร์จับ Fluorescence ที่อยู่ในผลผลิต PCR ใน 96-well thermocycler block โดยที่สามารถทำ multiplex PCR ที่มีมากกว่าหนึ่ง target DNA ได้ด้วยการใช้ Fluorescence probe ที่ต่างกัน GeneAmp 5700 (Perkin-Elmer/ABI) เป็นเครื่องมือทำ PCR แบบ kinetic ที่ราคาถูกกว่ารุ่น 7700 เนื่องจากสามารถอ่านสัญญาณ Fluorescenceได้แค่คลื่นเดียว และใช้ CCD-camera สำหรับการจับและวัด Fluorecence

LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) (รูปที่ 17)นั้นเป็นเครื่องมือที่สามารถทำ PCR ได้ในปริมาตรน้อยมากใน glass capillary tubes ที่ถูกเสียบเข้าตามช่องใน carousel จำนวน 32 ช่อง ที่มี air stream ร้อนและเย็นผ่าน ทำให้เวลาที่ใช้ต่อหนึ่ง cycle ลดลงเหลือแค่เพียง 10 วินาที แต่ละรอบของ PCR สัญญาณ Fluorescence จะถูกอ่านจาก carousel ผ่าน light-emitting diode และ มี photo (detection) diode จำนวน 3 ตัว ทำให้สามารถอ่าน

Fluorescent probe ที่ให้สัญญาณคลื่นที่ต่างกันได้ เวลาที่ใช้ในการทำ PCr จะน้อยกว่า ABI 7700 3-5 เท่า

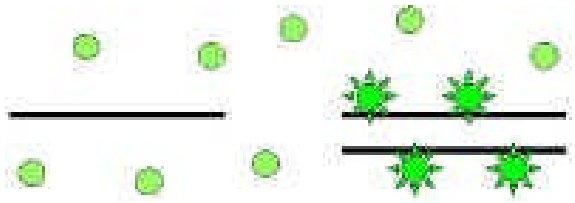
รูปที่ 17 แสดงเครื่อง Real Time PCR ที่ใช้ในการวิจัยนี้

หลักการของ Real Time PCR

เป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกช่วงของปฏิกิริยา ขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ โดยวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนผลิตผลของ PCR จากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลิตผลของ PCR

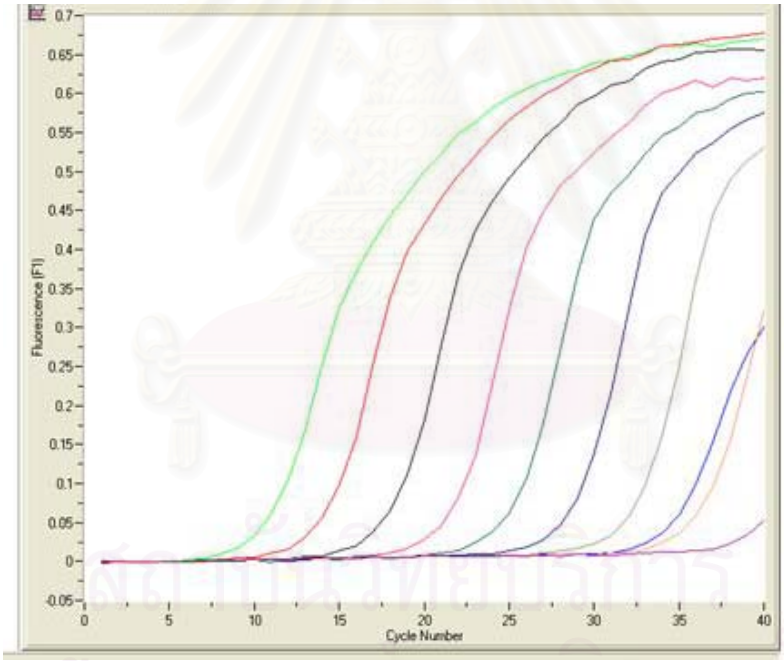
เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมาย ในวิจัยนี้ใช้ 2 แบบ คือ

1. **SYBR Green** เป็นสารเรืองแสงที่สามารถจับกับช่องระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า minor groove ความเข้มของสารเรืองสารที่ปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณผลิตผล PCR ที่เพิ่มขึ้น ในวิจัยนี้ใช้หา Interferon alpha



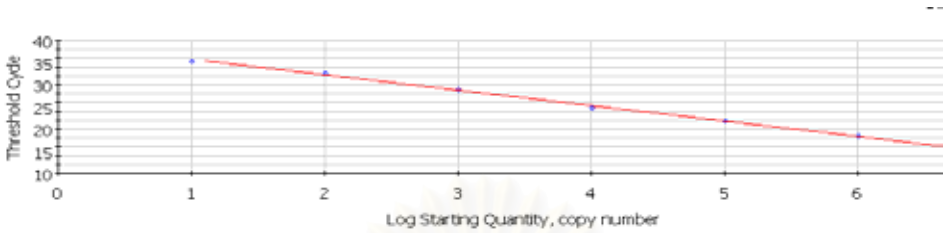
รูปที่ 18 แสดงหลักการของ SYBR Green คือ เมื่อมีการสร้างสายคู่ของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR สารเรืองแสง SYBR Green สามารถแทรกระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ และปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมา ทำให้สามารถวัดปริมาณผลิตผล PCR ได้

ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ใช้วิธี SYBR Green real time PCR ศึกษาระดับของ mRNA ของ Interferon alpha โดยเปลี่ยน mRNA ให้อยู่ในรูปของ cDNA ก่อน หลังจากนั้นก็นำไปเข้าเครื่อง real time PCR ก็จะได้ค่าออกมาในคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะมี กราฟที่สำคัญดังนี้ คือ

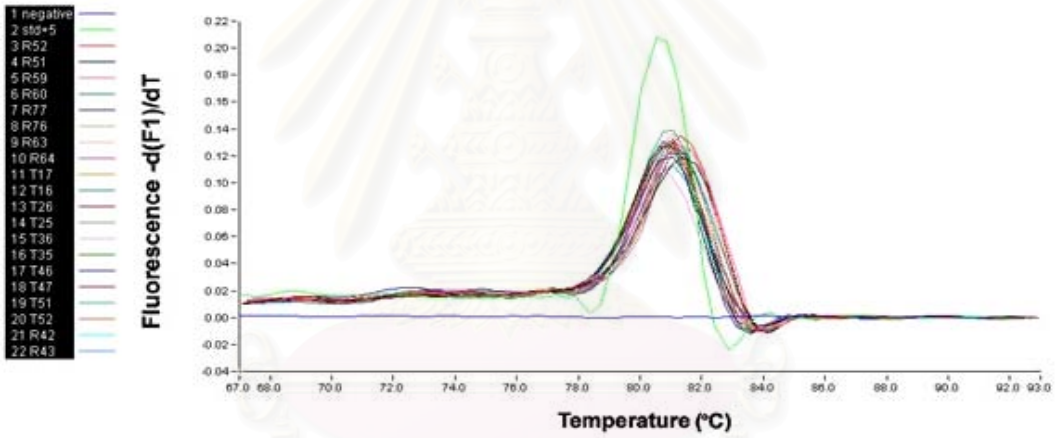


กราฟที่ 1 กราฟแสดง Interferon alpha ซึ่งถูกทำให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า โดยแต่ละสีที่แสดง คือ แต่ละความเข้มข้นของ interferon alpha

จากกราฟที่แสดงนี้เราจะต้องนำค่าที่ได้อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น มาทำเป็นกราฟเส้นตรง (standard curve) เพื่อที่จะใช้เปรียบเทียบหาจำนวน copy ของสารตัวอย่าง ดังรูป



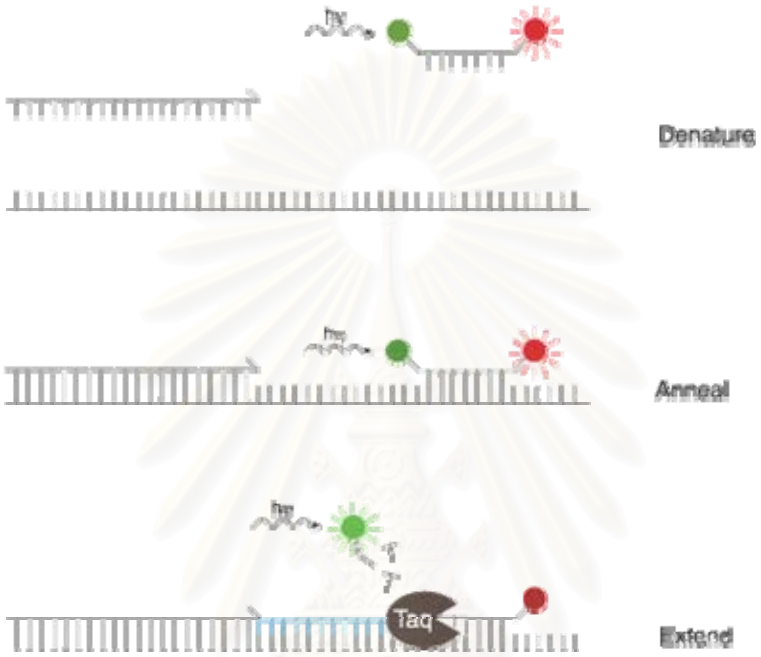
กราฟที่ 2 แสดงกราฟเส้นตรงของ Standard Interferon alpha



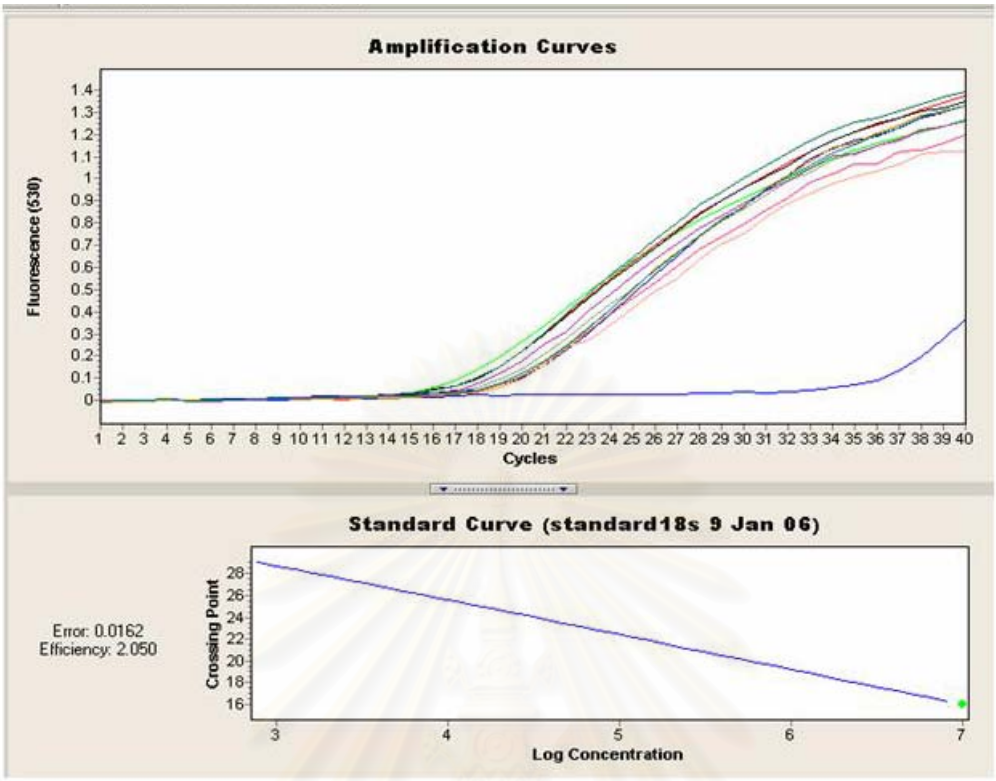
กราฟที่ 3 แสดง melting curve ของสารตัวอย่าง ซึ่งอุณหภูมินี้ขึ้นอยู่กับจำนวนเบสของสาย DNA ถ้าเป็นสารตัวอย่างชนิดเดียวกันก็ควรจะมี อุณหภูมิเดียวกัน จากรูปนี้แสดงให้เห็นว่า สารตัวอย่างที่เรานำมาหาระดับ Interferon alpha มีอุณหภูมิประมาณ 80-82 องศาเซลเซียส ซึ่งทุกสารตัวอย่างที่นำมาศึกษาอยู่ในช่วงอุณหภูมินี้

2. **Hydrolysis** หรือ **Taqman probe** เป็น oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งปลายด้าน 5’ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีพลังงานสูง เรียกว่า Reporter dye และทางด้านปลาย 3’ จะติดฉลากด้วยโมเลกุลที่มีพลังงานต่ำ เรียกว่า Quencher dye ถ้า probe นี้สมบูรณ์และถูกกระตุ้นด้วยแสง การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของ Reporter dye จะถูกกดด้วย Quencher dye เป็นผลจากการที่ dyes สองชนิดอยู่ใกล้กัน เมื่อ probe ถูกย่อยด้วย 5’ nuclease activity ของ Taq polymerase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสร้างสารดีเอ็นเอในปฏิกิริยา

PCR จะทำให้ Reporter กับ Quencher แยกออกจากกัน ทำให้การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของ Reporter จะเพิ่มขึ้น และผลของ Quencher จะลดลง ในการวิจัยนี้ใช้หา 18S ซึ่งเป็น Housekeeping gene



รูปที่ 19 แสดงหลักการของ Hydrolysis หรือ Taqman probe ซึ่งเป็น probe ที่มี ลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอแม่แบบ ปลายด้าน 5’ ติดฉลากด้วย Reporter dye(สีแดง)และทางด้านปลาย 3’จะติดฉลากด้วย Quencher Dye(สีเขียว) หลังจากขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ(denaturation) Primers และProbe จะจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอนการจับกันระหว่างสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน(annealing) จะไม่มี การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงบน probe ออกมา เนื่องจาก dyes สองชนิดอยู่ใกล้กัน เมื่อมีการสร้างสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ในขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอ(extension) probe จะถูกย่อยโดย5’ nucleaseActivity ของ Taq polymerase ทำให้reporter กับ quencher แยกออกจากกัน reporter จึงสามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้



กราฟที่ 4 กราฟแสดงค่า 18S ของสารตัวอย่าง(สีต่างกัน คือ สารตัวอย่างต่างชนิดกัน)และนำค่าที่ได้มา plot เป็น standard curve เส้นตรง เช่นเดียวกันกับของ SYBR green แต่ต่างกันที่ Taqman probe ไม่ต้องมีค่า melting curve

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรศึกษาและตัวอย่าง(Population and sample)

ประชากรเป้าหมาย (Population) คือ ผู้ป่วยไทยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 13 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผื่น DLE

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือ ผู้ป่วยไทยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 13 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผื่น DLE ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากไม่มีการศึกษาใดก่อนหน้านี้ที่ศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE ,ผิวหนังของคนปกติ และ ผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE มาก่อน

จากข้อมูลการศึกษาของ Lorant Farkas และคณะ[25] ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรค DLE และ SLE จำนวน 15 คน และคนปกติ จำนวน 7 คน พบว่ามี Plasmacytoid dendritic cells อยู่ในผื่นผิวหนัง LE หรือไม่ ผลการทดลองพบว่าการศึกษานี้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Plamacytoid dendritic cells กับ ผื่น LE โดยใช้สถิติแบบ Spearman 's rank correlation coefficient ซึ่งจากผลมีความสัมพันธ์กัน ค่า Rs=0.79 (P<0.0005) การทดลองนี้คล้ายกับการศึกษาของผู้วิจัยมากที่สุด แต่ใช้ สถิติที่แตกต่างกัน เนื่องจาก ใช้ตัวแปรที่วัดผลแตกต่างกัน จึงใช้ข้อมูลของการวิจัยนี้มาคิดคำนวณขนาดตัวอย่างไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยนี้ใช้จำนวน Sample 15 ราย เป็น Pilot Project ตามความเห็นของ expert opinion ถือว่าเพียงพอในการทำวิจัยนี้

<u>กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา(Inclusion criteria)</u>

1. ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว
2. อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 13 ปี
3. มีผื่น DLE โดยที่ผิวหนังบริเวณ inner aspect of forearms ปกติ

<u>กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา(Exclusion criteria)</u>

1. ผู้ที่เป็นโรค viral hepatitis หรือ viral infection อื่นๆ ในช่วงระยะเวลา 3 เดือน โดยการซักประวัติและการตรวจร่างกาย
2. ผู้ที่ได้รับยา Immunosuppressive เช่น endoxan ในช่วง 3 เดือน
3. ผู้ที่ได้รับยา Systemic steroid มากกว่า 20 mgในระยะเวลา 30 วัน
4. ผู้ที่ได้รับยา Immunomodulator เช่น ได้รับการฉีด IFN-alpha นาน 6 เดือน
5. ผู้ป่วยเป็นโรค AIDS หรือ ภูมิต้านทานบกพร่องอื่นๆ
6. ผู้หญิงซึ่งตั้งครรภ์หรือระหว่างให้นมบุตร
7. ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งชนิดต่างๆ
8. ผู้ป่วย autoimmune disease อื่นๆ

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sampling technique)

1. คัดผู้ป่วยทุกคนที่ตรงกับ Inclusion criteria และยินยอมเข้าร่วมการศึกษาทดลอง

2. ในการศึกษาทดลองนี้เมื่อตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยแล้ว จะเขียนตัวเลขเพื่อให้ทราบว่าเป็นชิ้นเนื้อชนิดใด โดยไม่ระบุว่าเป็นชิ้นเนื้อที่เป็นโรค หรือว่าชิ้นเนื้อที่ปกติ นำชิ้นเนื้อที่ได้ไป สกัด mRNA ของ Interferon alpha หลังจากได้ค่าของสารตัวอย่างทั้งหมดแล้ว จึงนำผลที่ได้มาดูว่าเป็นของชิ้นเนื้อชนิดใด

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยโดย Analytic study (Cross sectional study)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ชี้แจงวัตถุประสงค์ วิธีการและประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัยแก่ผู้ป่วยที่มีความประสงค์จะเข้าร่วมในการศึกษาทดลอง

2. ผู้ป่วยลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัยและอธิบายผู้ป่วย มีสิทธ์ถอนตัวออกจากการทดลองเมื่อใดก็ได้ โดยการถอนตัวนั้นจะไม่ก่อให้เกิดอคติในการได้รับการดูแลรักษาพยาบาลต่อไป ข้อมูลทั้งหลายจะถูกเก็บเป็นความลับ

3. การซักประวัติ

ก. บันทึกชื่อ นามสกุล ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ Hospital number(HN) วันเดือนปีที่เริ่มทำการวิจัย อายุ เพศ อาชีพ ลักษณะของงาน การศึกษา

ข. โรคประจำตัวต่างๆ

ค. ซักประวัติเรื่องยาต่างๆ ที่กินก่อนการวิจัย หรือ ขณะวิจัย รวมถึงประวัติการแพ้ยา

ง. อยู่ในระหว่างการตั้งครรภ์หรือให้นมบุตรหรือไม่

จ. ซักประวัติเรื่องโรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตัวเองในครอบครัว

4. การตรวจร่างกาย

ก. ตรวจร่างกายทั่วไป เพื่อดูว่าผู้ป่วยมีสุขภาพแข็งแรงหรือไม่ ไม่มีโรคประจำตัวเช่นโรคไต โรคเอดส์ โดยดูเชื้อราในปาก หรือ ผื่นผิวหนังตามตัว(PPE)

ข. ตรวจลักษณะผื่น ว่ามีลักษณะเข้าได้กับผื่น DLE ดังที่กล่าวไปแล้วในบท LE หลังจากนั้นถ่ายรูปผื่นผู้ป่วย

ค. ตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นผื่น โดยใช้อุปกรณ์(รูปที่ 20) เพื่อส่งทางพยาธิวิทยาว่าเป็นผื่น DLE โดยแบ่งชิ้นเนื้อที่เหลือ เพื่อส่งสกัดหา mRNA ของ Interferon alpha และตัดชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังปกติที่ใช้ส่ง Lupus band test โดยแบ่งชิ้นเนื้อที่เหลือมาสกัดหา mRNA ของ Interferon alpha เช่นกัน โดยชิ้นเนื้อที่ตัดมาแล้ว จะต้องใส่ใน RNA later ทันที(รูปที่ 21) และเก็บไว้ในตู้เย็น

รูปที่ 20 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วย

รูปที่ 21 แสดง RNA later ที่อยู่ใน tube

ง. ชิ้นเนื้อปกติของผู้ป่วย ผู้วิจัยได้ติดต่อกับแผนกหู คอ จมูก เพื่อขอชิ้นเนื้อบริเวณใบหน้าที่ผู้ป่วยมาทำการตัดหนังเปลือกตา หรือ ดึงหน้า เพื่อใช้เป็น control group โดยให้ผู้ป่วยลงนามยินยอมก่อนนำชิ้นเนื้อไปสกัดหา mRNA ของ Interferon alpha โดยชิ้นเนื้อที่ตัดมาแล้ว ต้องใส่ใน RNA later ทันทีและเก็บไว้ในตู้เย็น เช่นกัน

5. <u>วิธีการสกัด RNA(Extract RNA)</u>

นำชิ้นเนื้อผิวหนังมาแยก mRNA โดยวิธี conventional method

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>

1. หั่นชิ้นเนื้อผิวหนังที่ต้องการสกัด ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีด steriled แล้วใช้ forcep คีบใส่ใน hand Homogenizer(รูปที่22)
2. เติม liquid NO_2รีบบดทันที ถ้าชิ้นเนื้อผิวหนังเริ่มอ่อนตัวให้เติม liquid NO_2 ใหม่ แล้วบดต่อจนได้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติม Trizol 1 ml นำไปปั่น(Centrifuge) 10 นาที ที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 2-8^0
4. เก็บ supernatant ใส่ใน tube ใหม่(1.5 centrifuge tube)
5. นำไป incubate 5 นาทีที่ อุณหภูมิ15-30 ^{0}C หรือ อุณหภูมิห้อง โดย incubate ใน Homeginizer
6. เก็บสารใน 1.5 ml tube ใหม่(ถ้ายังมีชิ้นเนื้ออยู่ก็ให้ตักมา centrifuge ด้วย)
7. เติม chloroform 0.2 ml(200 microlit)(/ 1 ml of Trizol) เขย่าให้เข้ากัน 15 วินาที
8. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8^{0}C(รูปที่ 23)

9. ดูดของเหลวที่ได้ให้เกือบหมดใส่ใน 1.5 ml tube ใหม่
10. เติม isopropyl alcohol 0.5 ml(/ 1 ml of Trizol)
11. นำไป incubate 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15-30^{0}C หรือ อุณหภูมิห้อง
12. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8^{0}C
13. เก็บ supernatant ให้เหลือแต่ pellet และเติม75 หรือ 70 เปอร์เซ็นต์ ETOH(/ 1 ml of Trizol)
14. นำไปปั่นที่ 7,500 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8^{0}C
15. ดูด 75 หรือ 70 เปอร์เซ็นต์ ETOH ออก
16. นำ pellet ที่ได้ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง(เปิดฝา)
17. เติมDEPC-H_2O 15 microlit และนำสารที่ได้ไปวัดระดับ mRNA

รูปที่ 22 แสดง hand homogenizer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 แสดงเครื่อง centrifuge ที่ใช้ในการสกัด mRNA

สารที่สกัดได้ จะถูกเปลี่ยนจาก mRNA ไปเป็น cDNA โดยชุด kit ซึ่งใช้อุปกรณ์ Thermal cycle(รูปที่ 24) หลังจากที่ได้ cDNA แล้ว ก็นำมาหาปริมาณ Interferon alpha โดยใช้วิธี Real time PCR ดังที่กล่าวไปแล้ว

รูปที่ 24 แสดงเครื่องThermal cycle ที่ใช้ในการวิจัยนี้

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลของผู้ป่วยถูกรวบรวมในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล ที่บันทึกเกี่ยวกับชื่อ นามสกุล ที่อยู่ ผู้เข้าร่วมศึกษาวิจัย วันเดือนปี ที่เริ่มทำการศึกษาทดลอง อายุ, เพศ อาชีพ, ลักษณะงาน, สัญชาติ , เชื้อชาติ, ศาสนา, ระดับการศึกษาสูงสุด, โรคประจำตัว ,ประวัติโรค LEหรือโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว และข้อมูลชนิดของ LE โดยผู้วิจัยเป็นคนบันทึก

นัดผู้ป่วยมาดูแผลการตัดชิ้นเนื้อว่าหายสนิทหรือไม่ ในระยะ 7 วันหลังการตัดชิ้นเนื้อ

นอกจากนี้ข้อมูลทั้งหมดจะถูกบันทึกลงในโปรแกรม SPSS(โปรแกรมทางสถิติเพื่อใช้ในการวิจัย)โดยผู้วิจัย เพื่อที่จะนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. ข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่
เพศ, ระดับการศึกษา, อาชีพ, ลักษณะงาน, ประวัติโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว, ชนิดของผื่น DLE
2. ข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่
อายุ, ระยะเวลาที่ผื่นขึ้น
3. ศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติ
4. ศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วยDLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติ
5.ศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วยDLE โดยเปรียบเทียบกับผื่น DLE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

รายงานผลการวิจัย

คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

เมื่อพิจารณาข้อมูลทั่วไปของประชากรที่นำมาศึกษา พบว่าเป็นเพศชายร้อยละ 7.4 และเพศหญิงร้อยละ 92.6 ซึ่งประชากรผิวหนังปกติที่นำมาเป็นกลุ่มควบคุม เป็นเพศหญิง ร้อยละ 100 และประชากรที่มีผื่น DLE เป็นเพศชายร้อยละ 13.3 และเพศหญิงร้อยละ 86.7 โดยมีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 1:6.5 โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 44 มีอายุระหว่าง 36-45 ปี อายุเฉลี่ย 41.85 ปี อายุต่ำสุดเท่ากับ 19 ปี อายุสูงสุดเท่ากับ 71 ปี นับถือศาสนาพุทธ, สัญชาติไทย, เชื้อชาติไทย ร้อยละ 100 การศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรีร้อยละ 51.9 ประกอบอาชีพรับจ้างร้อยละ 70.4 ลักษณะงานอยู่ในที่ร่มร้อยละ 77.8 และไม่มีโรคภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัวร้อยละ 92.6

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนและร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคลและข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน(คน)	ร้อยละ
1.**เพศโดยรวม**		
เพศชาย	2	7.4
เพศหญิง	25	92.6
เพศชาย : เพศหญิง = 1 : 12.5		
2.**เพศในผู้ป่วย** DLE		
เพศชาย	2	13.3
เพศหญิง	13	86.7
เพศชาย : เพศหญิง = 1 : 6.5		
3. **อายุ**		
16-25 ปี	1	4
26-35 ปี	7	26

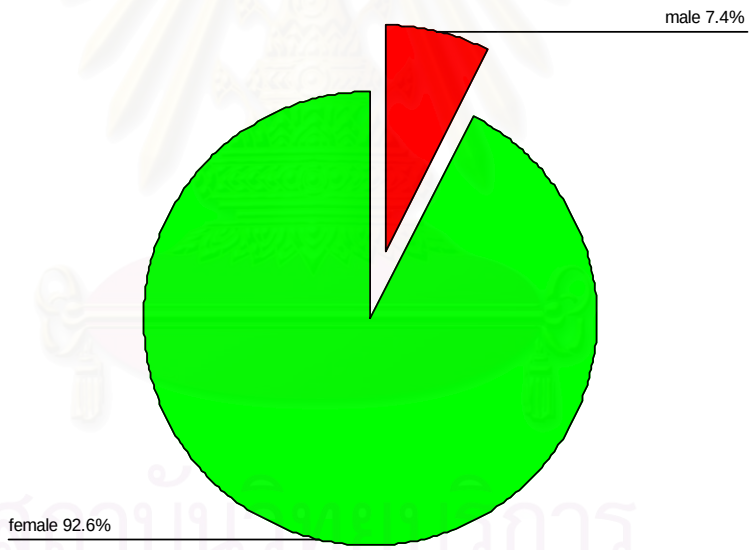
ตารางที่ 3 (ต่อ) แสดงจำนวนและร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคลและข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน(คน)	ร้อยละ
3.**อายุ(ต่อ)**		
36-45 ปี	12	44
46-55 ปี	4	15
56-65 ปี	2	7
66-75 ปี	1	4
Mean = 41.85, SD = 11.21, min = 19, max 71		
4.**ระดับการศึกษา**		
ต่ำกว่าปริญญาตรี	13	48.1
ปริญญาตรี	14	51.9
5.**อาชีพ**		
รับราชการ/รัฐวิสาหกิจ	4	14.8
รับจ้าง	19	70.4
ไม่ได้ประกอบอาชีพ	3	11.1
แม่บ้าน	1	3.7
6. **ลักษณะงาน**		
งานในที่ร่ม	21	77.8
งานในที่แจ้ง	6	22.2
7.**ประวัติโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว**		
ไม่มี	25	92.6
มี	2	7.4
8.**ชนิดของผื่นDLE**		
Localized DLE	11	73.3
Generalized DLE	4	26.7

ตารางที่ 3 (ต่อ) แสดงจำนวนและร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคลและข้อมูลทั่วไป

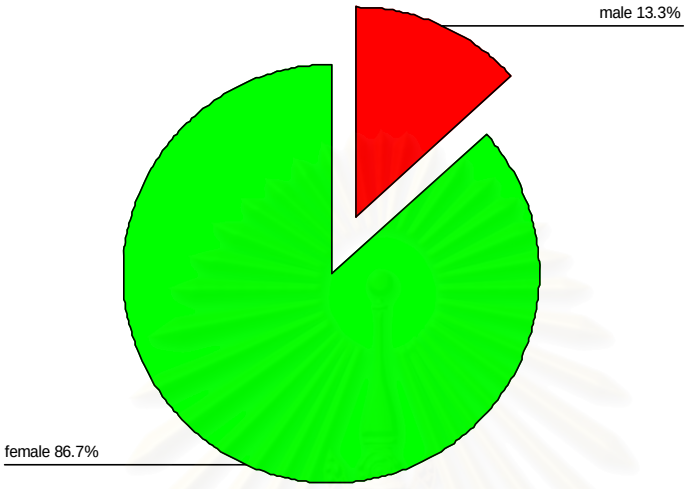
ข้อมูลทั่วไป	จำนวน(คน)	ร้อยละ
9. **ระยะเวลาที่ผื่นขึ้น**		
น้อยกว่า 30 วัน	10	67
31-60 วัน	2	13
มากกว่า 61 วัน	3	20
Mean = 38.33, SD = 28.28, min = 7, max = 90		

แผนภูมิวงกลมที่ 1 แสดงสัดส่วนของเพศชายและเพศหญิงโดยรวม

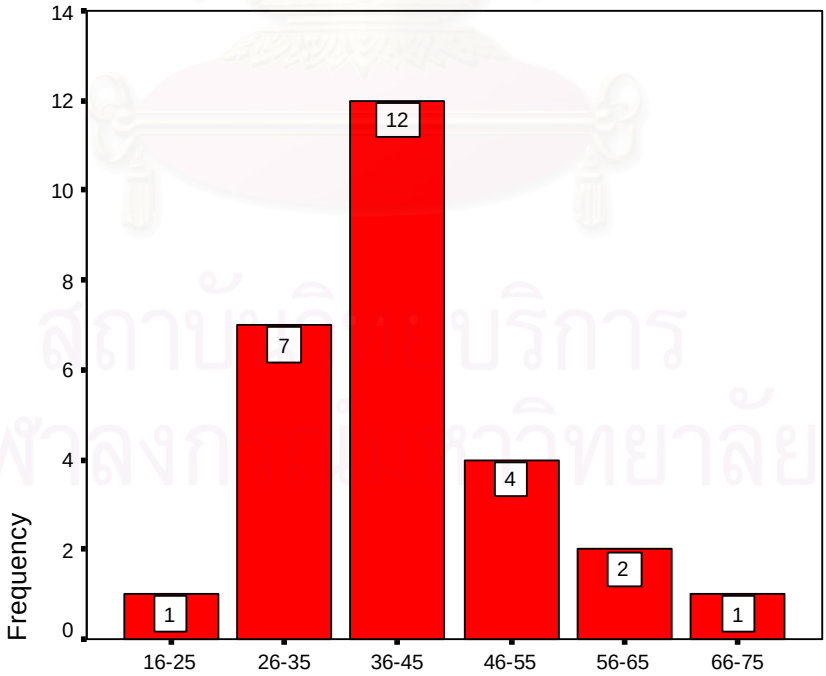


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

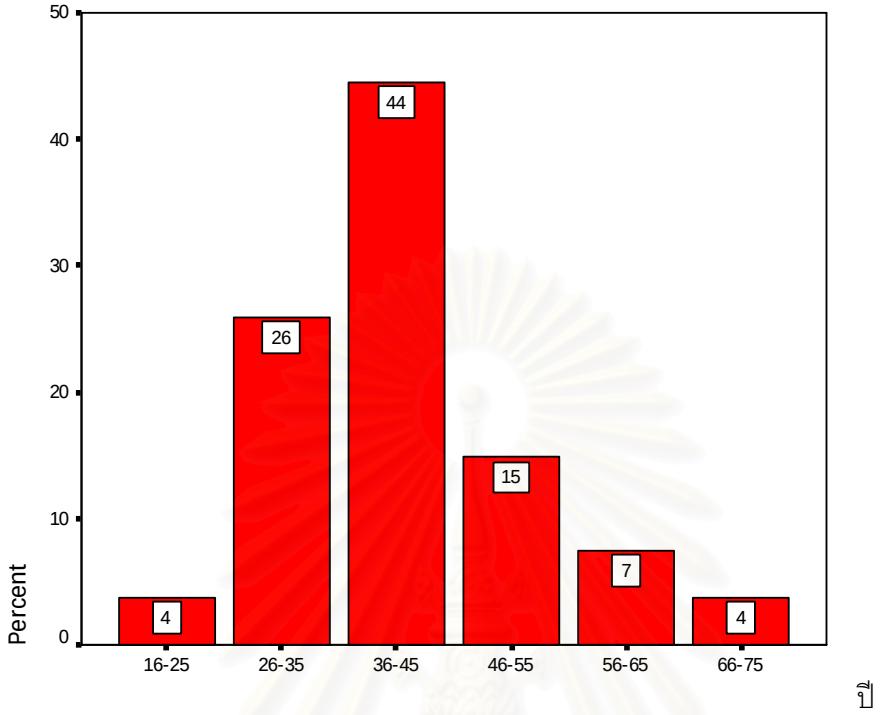
แผนภูมิวงกลมที่ 2 แสดงสัดส่วนเพศชายและเพศหญิงในผู้ป่วย DLE



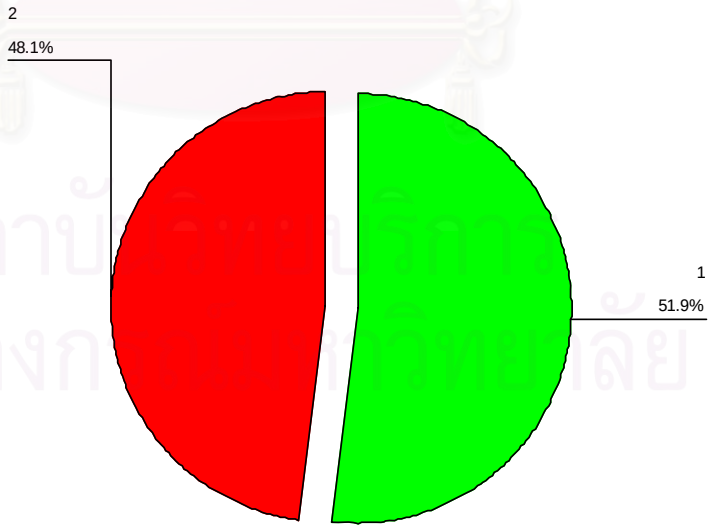
แผนภูมิแท่งที่ 1 แสดงกลุ่มอายุของ



ประชากร ปี

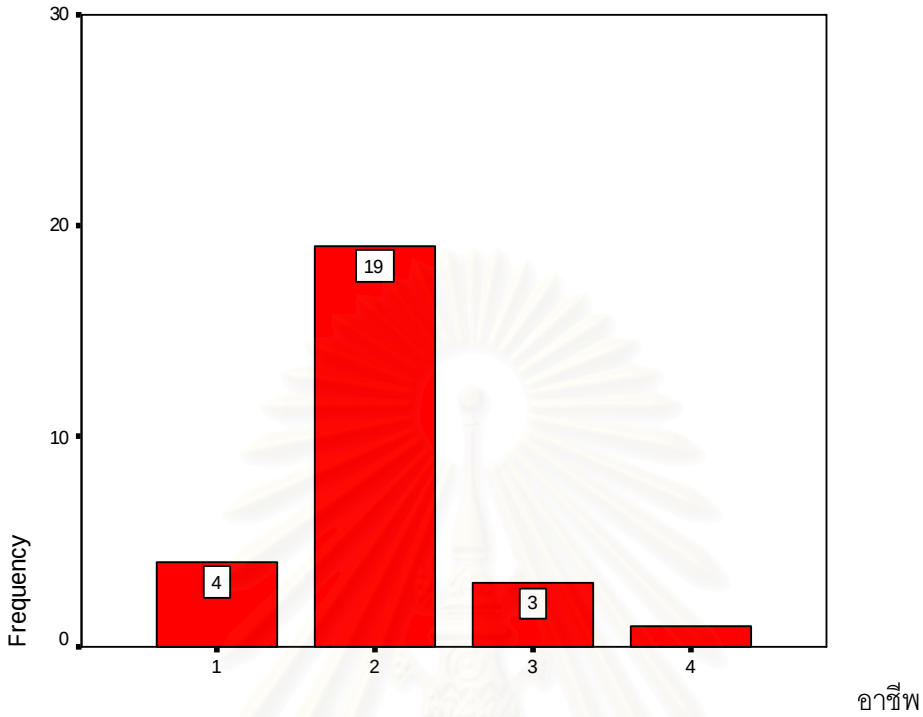


แผนภูมิวงกลมที่ 3 แสดงสัดส่วนของระดับการศึกษา



โดย 1 = ต่ำกว่าปริญญาตรี, 2= ปริญญาตรี

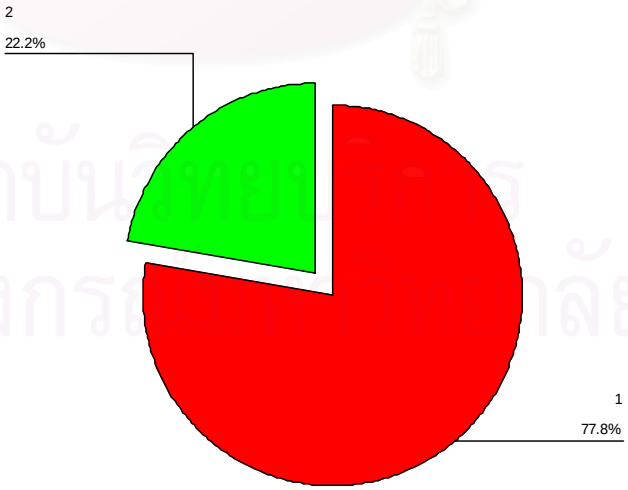
แผนภูมิแท่งที่ 2 แสดงอาชีพของประชากร



โดย 1 = รับราชการ/รัฐวิสาหกิจ , 2 = รับจ้าง

3 = ไม่ได้ประกอบอาชีพ 4 = แม่บ้าน

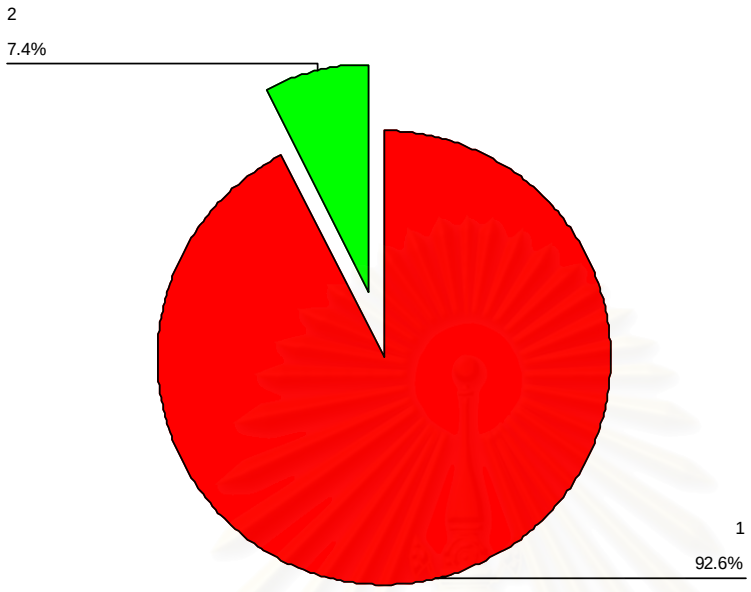
แผนภูมิวงกลมที่ 4 แสดงสัดส่วนลักษณะงาน



โดย 1 = งานในที่ร่ม

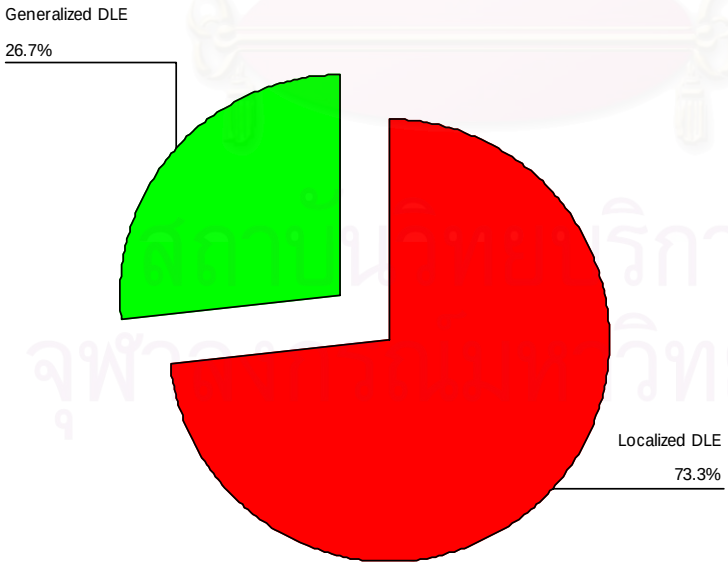
2 = งานกลางแจ้ง

แผนภูมิวงกลมที่ 5 แสดงสัดส่วนประวัติโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว

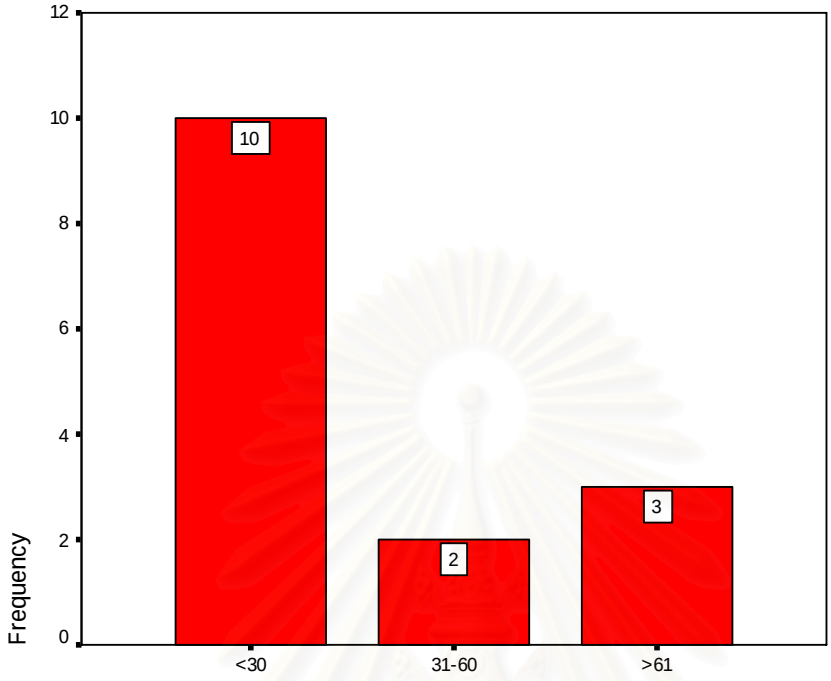


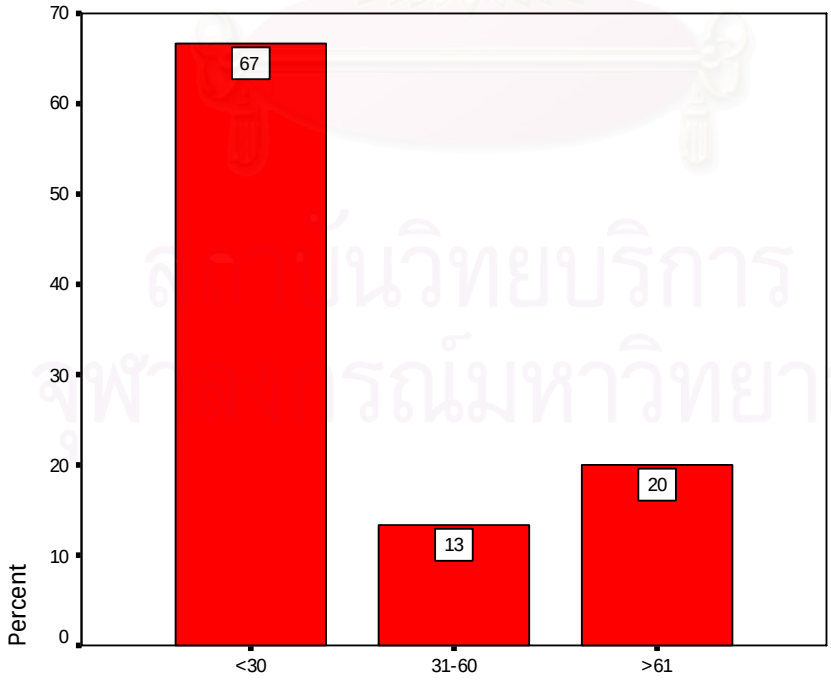
โดย 1 = ไม่มีประวัติ , 2 = มีประวัติในครอบครัวเป็น

แผนภูมิวงกลมที่ 6 แสดงสัดส่วนของชนิดของผื่น DLE

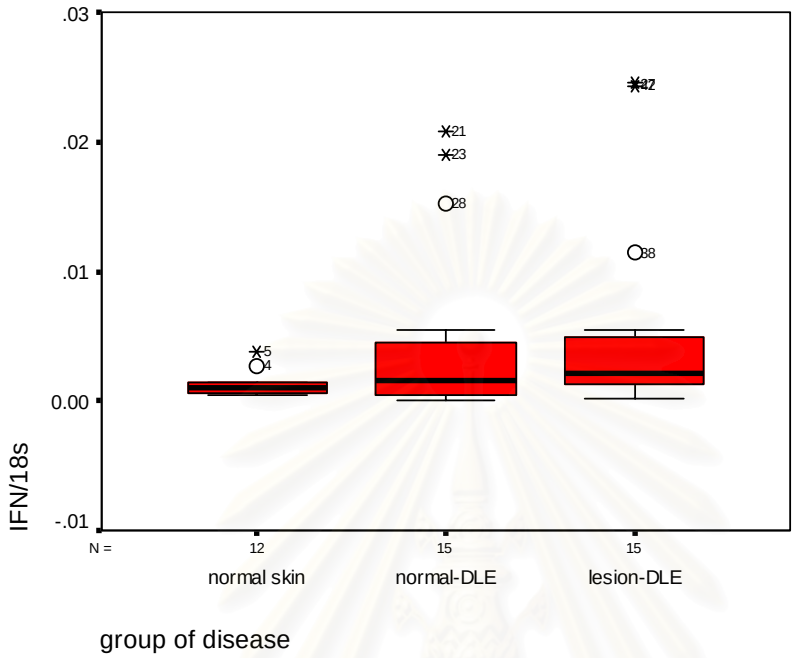


แผนภูมิแท่งที่ 3 แสดงระยะเวลาที่ผื่นขึ้น





แผนภูมิ Boxplot ที่ 1 แสดงระดับ mRNA ของ Interferon alpha โดยแยกตามชนิดของผื่น



เนื่องจากข้อมูลเป็นเชิงปริมาณ สามารถคำนวณว่าปริมาณmRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับ ผิวหนังปกติหรือไม่ โดยใช้วิธี Mann Withney U test พบว่า P value มีค่าเท่ากับ 0.04 หมายความว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE มีความแตกต่างกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่า เมื่อคำนวณว่าปริมาณ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติหรือไม่ โดยใช้วิธี Mann Withney U test พบว่า P value มีค่าเท่ากับ 0.30 หมายความว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE ไม่มีความแตกต่างกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ เมื่อคำนวณว่าปริมาณ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE ว่ามีความแตกต่างกันกับ ผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE โดยใช้วิธี Wilcoxon signed ranks test พบว่า P value มีค่าเท่ากับ 0.39 หมายความว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE ไม่มีความแตกต่างกับผื่น DLE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

การวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศ,อายุ, ระดับการศึกษา, อาชีพ, ลักษณะงาน, ประวัติโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว, ระยะเวลาที่ผื่นขึ้น และชนิดของผื่น DLE โดยพบว่า ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 8

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE โดยประเมินจากระดับ mRNA ที่สกัดออกมาได้จากชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากผู้ป่วยที่มีผื่น DLE ตามที่กล่าวข้างต้นแล้ว ซึ่งยืนยันผลโดยการอ่านชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาว่าเป็นผื่น DLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติ ซึ่งได้ชิ้นเนื้อส่วนใหญ่มาจากผู้ป่วยปกติที่มาเข้ารับการรักษาทางด้านความงามบริเวณใบหน้า เช่น การตัดหนังตาที่เกินทั้งหนังตาบนและหนังตาล่าง รวมถึงผู้ป่วยที่มาศัลยกรรมตกแต่งบนใบหน้า ชิ้นเนื้อที่ได้มานี้ ผู้ป่วยรับทราบและเซ็นต์ใบยินยอมก่อนนำมาศึกษาวิจัยนี้

จากการศึกษานี้ มีวิจัยอื่นที่คล้ายกัน แต่การวัดผลของการศึกษาแตกต่างกัน จึงไม่สามารถที่จะใช้ข้อมูลการศึกษาวิจัยอื่นมาคำนวณขนาดตัวอย่างได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาจากข้อมูลการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งปรึกษาผู้ที่มีความรู้ความชำนาญและเข้าใจเกี่ยวกับเรื่องโรคนี้เป็นอย่างดี จึงได้ทำเป็น Pilot project และได้ตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกและนำมาศึกษา โดยใช้ผู้ป่วยที่มีผื่น DLE ชนิดต่างๆ จำนวน 15 คน และใช้กลุ่มควบคุมคือ กลุ่มของผิวหนังคนปกติ จำนวน 12 คน เพื่อนำมาศึกษาวิจัย

เมื่อพิจารณาข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะของประชากรซึ่งมีทั้งหมด 27 คน พบว่าผู้ป่วยที่ศึกษาเป็นเพศชาย 2 คน คิดเป็นร้อยละ 7.4 และเพศหญิง 25 คน คิดเป็นร้อยละ 92.6 ซึ่งพบว่าเพศหญิงมากกว่าเพศชาย 12.5 เท่า แต่เมื่อมาแยกเป็นผู้ป่วยปกติที่เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเป็นเพศหญิงร้อยละ 100 และผู้ป่วยที่มีผื่น DLE เป็นเพศชาย 2 คน คิดเป็นร้อยละ 13.3 และเพศหญิง 13 คน คิดเป็นร้อยละ 86.7 ซึ่งพบว่าเพศหญิงมากกว่าเพศชาย 6.5 เท่า จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า ผื่น DLE พบได้ทั้งผู้ป่วยเพศหญิงและเพศชาย และ อัตราส่วนของหญิงต่อชายเท่ากับ 3:2 หรือ 3:1แล้วแต่รายงาน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลการวิจัยนี้พบแตกต่างกันอย่างน้อย 2 เท่า อาจเป็นเพราะว่าจำนวนขนาดตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยอาจจะน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการศึกษาวิจัยอื่นที่เก็บข้อมูลผู้ป่วยจำนวนมาก ทำให้ได้อัตราส่วนที่ใกล้กับความเป็นจริงมากที่สุด ประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยนี้มีอายุตั้งแต่ 19 ถึง 71 ปี โดยกลุ่มอายุที่มากที่สุดคือ 36 ถึง 45 ปี พบจำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 44 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิจัยอื่น พบว่าใกล้เคียงกัน

ในประชากรที่นำมาศึกษาพบว่าร้อยละ 100 นับถือศาสนาพุทธ, เชื้อชาติไทย และสัญชาติไทย โดย ประกอบอาชีพรับจ้างเป็นส่วนใหญ่ พบจำนวน 19 คน คิดเป็นร้อยละ 70.4 และส่วนใหญ่ทำงานในที่ร่ม จำนวน 21 คน คิดเป็นร้อยละ 77.8 โดยที่ไม่มีประวัติโรคภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว จำนวน 25 คน คิดเป็นร้อยละ 92.6 จากผลการวิจัยนี้ทำให้สนับสนุนสมมุติฐานว่าโรคนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน แต่เชื่อว่าเกิดจากหลายปัจจัยด้วยกัน ซึ่งมีทั้งปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ และปัจจัยทางด้านพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยนี้อาจจะมีน้อย จึงไม่สามารถที่จะใช้ค่าทางสถิติเป็นตัวแทนของประชากรทั้งประเทศ เพียงแต่อาจจะทำให้มองเห็นภาพคร่าวๆ ง่ายขึ้น

ผื่น DLE ที่ศึกษาในวิจัยนี้มี 2 แบบ คือ ชนิด Localized DLE และ Generalized DLE ผื่นสองชนิดนี้แตกต่างกันในแง่ของการกระจายของผื่น พบว่า ผื่นแบบ Generalized DLE กระจายเกือบทั้งร่างกาย พบต่ำว่าระดับคอลงไปได้ด้วย ซึ่งต่างจากผื่น Localized DLE ที่พบผื่นเฉพาะบริเวณใบหน้าและคอ เท่านั้น จากการศึกษาวิจัยนี้พบว่า ส่วนใหญ่เป็นผื่นชนิด Localized DLE พบจำนวน 11 คน คิดเป็นร้อยละ 73.3 (ดูรูปผื่น DLE บทที่ 3)

จากการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติ และผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE โดยใช้วิธีทางสถิติแบบ Mann Withney U test และ Wilcoxon Signed Ranks test เนื่องจากเมื่อนำข้อมูลที่วัดระดับ mRNA ของ Interferon alpha ทั้งหมดมาประเมินแล้วพบว่า ข้อมูลไม่ได้เรียงตัวเป็นแบบกราฟมาตรฐาน จึงควรใช้สถิติแบบ nonparametric test มาใช้ทดสอบ ซึ่งค่าที่ได้จะใช้ความน่าเชื่อถือมากกว่า โดยค่าที่ได้จะมีความน่าเชื่อถือใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากวิธี parametric test ซึ่งผลเมื่อเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติ กับผื่น DLE พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ mRNA ในผิวหนังปกติ เท่ากับ 0.0013 copy และในผื่น DLE เท่ากับ 0.0056 copy และค่าทางสถิติของ Mann Withney U test พบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.04 ซึ่งค่าที่ได้ <0.05 แสดงว่าระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติ กับผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ mRNA ในผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE เท่ากับ 0.0050 copy และค่าสถิติของ Mann Withney U test พบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.30 ซึ่งค่าที่ได้ >0.05 แสดงว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE ไม่มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยพบว่าเกือบใกล้เคียงกันกับค่าเฉลี่ยของผื่น DLE ซึ่งทางผู้วิจัยคิดว่าถ้าจำนวนขนาดตัวอย่างเพิ่มขึ้นจากเดิม

อาจจะทำให้ผลของระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE มีค่าที่แตกต่างจากผิวหนังปกติ มีแนวโน้มที่จะได้ผลทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ด้วย และสุดท้ายเมื่อพิจารณาค่าทางสถิติของ Wilcoxon Signed Ranks testพบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.39 ซึ่งค่าที่ได้ >0.05 แสดงว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผื่น DLE ไม่มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของผู้ป่วยDLE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากข้อมูลการศึกษาของ Lorant Farkas และคณะ[25] ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรค DLE และ SLE จำนวน 15 คน และคนปกติเป็นตัวควบคุม จำนวน 7 คน ว่ามี Plasmacytoid dendritic cells อยู่ในผื่นผิวหนัง LE หรือไม่ ผลการทดลองพบว่าการศึกษานี้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Plamacytoid dendritic cells กับ ผื่น LE โดยใช้สถิติแบบ Spearman ‘s rank correlation coefficient ซึ่งจากผลมีความสัมพันธ์กัน ค่า Rs=0.79 (P<0.0005) ซึ่งผลของการวิจัยนี้ก็พบว่าในผื่น LE มีเซลล์ที่สร้าง Interferon alpha มากกว่าที่ผื่นผิวหนังปกติเช่นกัน เมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับการศึกษาวิจัยนี้พบว่าผลที่ได้คล้ายคลึงกัน อีกทั้งมีหลายรายงานการวิจัยที่สนับสนุนว่า Interferon alpha น่าจะเกี่ยวข้องกันกับ pathogenesis ของการเกิดโรค LE เช่น การศึกษาพบว่า Plasmacytoid dendritic cell ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ Interferon alpha นั้น ถูกพบได้น้อยลงในเลือดของผู้ป่วย LE แต่กลับถูกสะสมมากอยู่ในชั้นผิวหนังของผู้ป่วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 9

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังของคนปกติ และผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE โดยใช้วิธีทางสถิติแบบ Mann Withney U test และ Wilcoxon Signed Ranks testพบว่าระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติ กับผื่น DLE ค่าทางสถิติของ Mann Withney U test พบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.04 ซึ่งค่าที่ได้ <0.05 แสดงว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติ กับผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE ค่าสถิติของ Mann Withney U test พบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.30 ซึ่งค่าที่ได้ >0.05 แสดงว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE ไม่มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ

เมื่อเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผื่น DLE กับผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE พิจารณาค่าทางสถิติของ Wilcoxon Signed Ranks testพบว่า ค่า P value เท่ากับ 0.39 ซึ่งค่าที่ได้ >0.05 แสดงว่า ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ของผื่น DLE ไม่มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติของผู้ป่วยDLE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แนวโน้มปัจจัยด้านเพศ อายุ ในการวิจัยนี้คล้ายกับการศึกษาวิจัยอื่นๆ ส่วนเรื่องปัจจัยด้านระดับการศึกษา, อาชีพ, ลักษณะงาน, ประวัติโรคภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว และชนิดของผื่น DLE นั้นอาจจำเป็นจะต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างมากขึ้น จะทำให้ผลที่ได้บอกแนวโน้มการเกิดโรค DLE ของประชากรไทยในอนาคตได้ดียิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. จากข้อมูลการศึกษาวิจัยนี้ ถือว่าเป็น Pilot Project พบว่าระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE มีความแตกต่างกันกับผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผิวหนังปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE และ ระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในผื่น DLE เมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของผู้ป่วย DLE พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนมโน้มว่าถ้าศึกษาเพิ่มโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้นผลที่ได้น่าจะเห็นความแตกต่างมากกว่าเดิม

2. จากข้อมูลกลุ่มที่นำมาเป็นกลุ่มควบคุม คือกลุ่มผิวหนังปกติ ทั้งหมดเป็นเพศหญิง และอายุเฉลี่ยมากกว่า กลุ่มที่มีผื่น DLE ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ผลการวิจัยคลาดเคลื่อนได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Kaslow RA. High rate of death caused by systemic lupus erythematosus among U. S. residents of Asian descent. Arthritis Rheum 1982;25(4):414-8.
2. Serdula MK, Rhoads GG. Frequency of systemic lupus erythematosus in different ethnic groups in Hawaii. Arthritis Rheum 1979;22(4):328-33.
3. Samanta A, Feehally J, Roy S, Nichol FE, Sheldon PJ, Walls J. High prevalence of systemic disease and mortality in Asian subjects with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1991;50(7):490-2.
4. Samanta A, Roy S, Feehally J, Symmons DP. The prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in whites and Indian Asian immigrants in Leicester city, UK. Br J Rheumatol 1992;31(10):679-82.
5. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. Br J Rheumatol 1993;32(2):110-5.
6. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. Arthritis Rheum 1995;38(4):551-8.
7. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. Trends Immunol 2003;24(11):595-602.
8. Kelly JA, Moser KL, Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. Genes Immun 2002;3 Suppl 1:S71-85.
9. Gaffney PM, Moser KL, Graham RR, Behrens TW. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2002;28(1):111-26.
10. Moser KL, Neas BR, Salmon JE, Yu H, Gray-McGuire C, Asundi N, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(25):14869-74.
11. Gaffney PM, Ortmann WA, Selby SA, Shark KB, Ockenden TC, Rohlf KE, et al. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from

a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. Am J Hum Genet 2000;66(2):547-56.

12. Gray-McGuire C, Moser KL, Gaffney PM, Kelly J, Yu H, Olson JM, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. Am J Hum Genet 2000;67(6):1460-9.
13. Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, Kristjansdottir H, Arnasson A, Grondal G, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. J Autoimmun 2000;14(2):169-78.
14. Shai R, Quismorio FP, Jr., Li L, Kwon OJ, Morrison J, Wallace DJ, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. Hum Mol Genet 1999;8(4):639-44.
15. Crow MK. Interferon-alpha: a new target for therapy in systemic lupus erythematosus?. Arthritis Rheum 2003;48(9):2396-401.
16. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. Immunity 2001;14(6):661-4.
17. Pascual V, Banchereau J, Palucka AK. The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. Curr Opin Rheumatol 2003;15(5):548-56.
18. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. Science 2001;294(5546):1540-3.
19. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. Science 1999;284(5421):1835-1837.
20. Ronnblom L, Alm GV. The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus. Hum Immunol 2002;63(12):1181-93.
21. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. Proc Natl Acad Sci U S A 003;100(5):2610-5.

22. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. J Exp Med 2003;197(6):711-23.

23. Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, Gu YY. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. Genes Immun 2003;4(3):177-86.

24. Loseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN-alpha subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. J Immunol Methods 2003;276(1-2):207-22.

25. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. Am J Pathol 2001;159(1):237-43.

26. Millard LG, Rowell NR. Abnormal laboratory test results and their relationship to prognosis in discoid lupus erythematosus. Arch Dermatol 1979; 115 :1055-8.

27. Preble OT, Black RJ; Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. Science 1982;216:429-31.

28. Yee AMF, Yip YK, Fischer HD, Buyon JP. Serum activity that confers acid lability to alpha-interferon in systemic lupus erythematosus: its association with disease activity and its independence from circulating alpha-interferon. Arthritis Rhueum 1990;33:563-8.

29. Pascual V, Banchereau J,Palucka AK. The centrol role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. Curr Opin Rheumatol 2003;15(5):548-56

30. Santiago-Raber ML, Baccala R, Haraldsson KM, Choubey D, Stewart TA, Kono DH, et al. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. J Exp Med 2003;197(6):777-88.

31. Loannou Y, Isenberg D.A. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. Arthritis Rheum 2000.43(7):1431

32. Goodborum S, Didcock L, Randall RE. Interferon: cell signaling,immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. Gen. virol 2000.81(Pt 10):2341-64.

33. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J,Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus.Science 2001;294:1540-3.

34. Siegal FP, Kadowaki N,Schdell M. Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The Nature of the principal type 1 interferon-producing cells in Human Blood.Science 1999;284(5421):1835-37

35. Vallin H, Blomberg S,Alm GV, Cederblad B, Ronnblom L.Patients with systemic lupus erythematosus(SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha production actig on leucocyte resembling immature dendritic cells. Clin Exp Immunol 1999;115:196-202.

36. Blomberg S, Eloranta M-L, Cederblad B, Nordlin K, Alm GV, Ronnblom L. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2001;10:484-90.

37. Luft T, Pang KC, Thonas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells.J Immunol 1998;161:1947-53

38. Lvashkiv LB. Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: Potential role of SLE pathogenesis. Autoimmunity 2003;36(8):473-9.

39. Hochberg MC,Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost TT. Systemic lupus erythematosus: a review of clinicolaboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. Medicine 1985;64:285-95.

40. Watson R. Cutaneous lesions in systemic lupus erythematosus. Med Clin North Amer 1989;73:1091-111.

41. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, et al. Studied of twins with systemic lupus erythematosus. Am J Med 1975;59:533-52.

42. Lee LA, Farris AD. Photosensitivity disease: Cutaneous lupus erythematosus. J Invest Dermatol 1999;4:73-8.

43. Ansel J, Perry P, Brown J, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. J Invest Dermatol 1990;94:101s-107s.

44. Furukawa F, Kashihara Sawami M. Lyons MB, et al. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light(UVL):implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. J invest Dermatol 1990;94:77-85.

45. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocyte. J Exp Med 1994;179:1317-30.

46. Norris PG, Ryan SR, Fritz KA, et al. The role of RNP, Sm and SS-A/Ro-specific antisera from patients with lupus erythematosus in inducing antibody dependent cellular cytotoxicity(ADCC) of targets coated with non histone nuclear antigens. Clin Immunol Immunopathol 1984;31:311-20.

47. Norris DA, Bennion SD, David-Bajor K. Pathomechanisms of cutaneous lupus erythematosus. In : Wallace DJ, Hahn BH eds. Dubois' Lupus Erythematosus, 5th ed. Chap 33, Baltimore, Williams Wilkins 1997:549-67.

48. Sontheimer RD. Lupus erythematosus. In : Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al, eds. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine 5th ed. New York, McGraw-Hill, 1999;1993-2009.

49. Rowell NR, Goodfield MJD. In : Champion RH, Burton JL, Burns DA et al, eds. Rook/Wilkinson/Ebling :Text Book of Dermatology 6th ed. Oxford, Blackwell Science Ltd.;1999;2437-501.

50. Wong KO. Systemic lupus erythematosus : a report of 45 cases with unusual clinical and immunological features. Br J Dermatol 1969;8:1186-90.

51. Wilson CL, Burge SM, Dean D, et al. Scarring alopecia in discoid lupus erythematosus. Br J Dermatol 1992;126:307-14.

52. Millard LG, Rowell NR. Abnormal laboratory test results and their relationship to prognosis in discoid lupus erythematosus. Arch Dermatol 1979:115 : 1055-8.

53. Burge SM, Frith PA, Juniper RP, et al. Mucosal involvement in systemic and chronic cutaneous lupus erythematosus. Br J Dermatol 1989;121:727-41.

54. Andreasen JO, Poulsen HE. Oral discoid and systemic lupus erythematosus. 1. Clinical investigation. Acta Odont Scan 1964;22:295-310.

55. Gougerot MH, Bournier. Lupus erythematodes tumidus. Bull Soc Fr Dum Syph 1930;1291-2.

56. Braverman IM. Skin signs of systemic disease 3rd ed. W.B. Philadelphia, Saunders,1998;198-277.

57. Jordan MS, Hood AF, Moore GW, et al. Histopathologic comparison of the subsets of lupus erythematosus. Arch Dermatol 1990;126:52-53.

58. David-Bajar KM, Bennion SD, De Spain JD, et al. Clinical, histological and immunofluorescent distinctions between subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus. J Invest Dermatol 1992;99:251-7.

59. Bielsa I, Herrero C, Collado A, et al. Histopathologic findings in cutaneous lupus erythematosus. Arch Dermatol 1994; 130:54-8.

60. Sanchez NP, Peters MS, Winkelmann RK. The histopathology of lupus erythematosus panniculitis. J am Acad Dermatol 1981;5:673-80.

61. Beutner EH, Chorzelski tp, Bean SF. Immunology of the skin, 2nd ed. Newyork, John Wiley&Sons.1979.

62. Isaacs A. and J. Lindenmann . Virus interference I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1957;927: 258-67.

63. Kary Mullis tells how the idea for PCR came to him out of the blue in "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction," Scientific American, April 1990;56-65.

64. Kwok S., Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature 339:237-238.

65. Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Method Enzymol 1987;155:335-50.

66. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific Am 1990;262:56-65.

67. Saiki K. Optimization of polymerase chain reaction. In : Earich HA, Gibbs R, Kazazian HH. Editiors Polymerase chain reaction. Current communication in molecular biology. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. 1989:25-30.

68. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by *thermos thermophilus* DNA polymerase. Biochemistry 1991;30:7661-6.

69. Erlich AA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. Nature 1988;331:461-2.

70. Longo MC, Berninger MS, Hartly JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry over contamination in polymerase chain reactions. Gene 1990;93:125-8.

71. Thornton CG, J.L. Hartley and A. Rashtakian. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: Characterization of residual activity following thermal cycling. BioTechniques 13 (1992): 80-82.

72. Sarkar G and S.S. Sommer. Shedding light on PCR Contamination. Nature 1990;343:27.

73. Fronthingham R, R.B. Blitchinton, D.H. Lee, R.C. Greene and K.H. Wilson. UV absorption complicates PCR decontamination. BioTechniques 13 1992; 208-210.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่------ID

1 3

แบบสอบถาม

เรื่อง การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรคดีแอลอี.

1. ข้อมูลส่วนตัว **เฉพาะเจ้าหน้าที่**

1. อายุ.....ปี ... ...AGE 4 5
2. เพศ.....1. ชาย .....2. หญิง ....SEX 6
3. สัญชาติ.....1. ไทย RACE1 7
   .....2. อื่นๆ(ระบุ)..... 7
4. เชื้อชาติ.....1. ไทย ...RACE2 8
   .....2. อื่นๆ(ระบุ)..... 8
5. ศาสนา.....1. พุทธ .....2. คริสต์ ...RELIGION 9
   .....3. อิสลาม .....4. อื่นๆ(ระบุ) 9
6. ระดับการศึกษาสูงสุด
   ....1. ต่ำกว่าปริญญาตรี
   ....2. ปริญญาตรี
   .....3. สูงกว่าปริญญาตรี
   .....4. อื่นๆ (ระบุ) ....EDUC 10
7. อาชีพ
   .....1. รับราชการ/รัฐวิสาหกิ จ
   .....2. รับจ้าง
   .....3. ไม่ได้ประกอบอาชีพ
   .....4. อื่นๆ (ระบุ)..... ...OCUPATION 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. ลักษณะงาน.....1. งานในที่ร่ม

.....2. งานกลางแจ้ง …JOB

12

9. อัตราเงินเดือนปัจจุบัน.....บาท … … … …

INCOME

13 17

10. สถานภาพสมรส

.....1. โสด

.....2. แต่งงาน

.....3. หย่า …MARITAL

18

11. จำนวนบุตร.....คน … ..CHILD

19-20

12. ท่านมีโรคประจำตัวหรือไม่

.....0. ไม่มี

.....1. มี (ระบุ)..... …DIS1

21

13. ประวัติโรค SLE หรือ โรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเองในครอบครัว

.....0. ไม่มี

.....1. มี (ระบุ)..... …DIS2

22

2. **ข้อมูลโรค** Cutaneous LE (เฉพาะเจ้าหน้าที่ กรอก) ☒ มีอาการ

☒ ไม่มีอาการ

☐ ไม่ได้ตรวจ

☐ ไม่ทราบ

☐ Localized DLE (head & neck only)

☐ Generalized DLE (below the neck)

☐ Hypertrophic DLE

☐ Lupus panniculitis (Lupus profundus)

☐ Oral lesion (DLE type)

☐ Scalp DLE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบยินยอมเข้ารับการตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ อินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี

คำชี้แจงเกี่ยวกับโรคที่อาสาสมัครได้รับการวินิจฉัย

โรค DLE เป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง และเป็นโรคที่พบในประชากรทั่วโลก ในประเทศไทยโรค DLE เป็นโรคผิวหนังชนิดไม่ติดเชื้อ อาการแสดงทางผิวหนังมีได้หลายแบบ โดยพบได้หลายระยะ สำหรับสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคนี้ยังไม่ปรากฏแน่ชัด แต่มีหลักฐานบ่งว่า น่าจะมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือ หลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่การติดเชื้อไวรัส, การได้รับยา, แสง UV แต่จากหลักฐานในปัจจุบัน เป็นที่ยอมรับว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมนั้นเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคนี้

คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน และวิธีการ ผลข้างเคียงและการปฏิบัติตัวก่อนและหลังการตัดชิ้นเนื้อเพื่อการศึกษาวิจัย

การเก็บชิ้นเนื้อจากผิวหนังปกติของคนเป็นโรค DLE และผื่น DLE : แพทย์จะเลือกตัดชิ้นเนื้อจากบริเวณที่มีผื่นของโรคนี้ และ ผิวหนังปกติบริเวณด้านในของแขน ข้างใดข้างหนึ่ง โดยจะทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อและฉีดยาชา (1 % xylocaine) ก่อนทุกครั้ง จากนั้นใช้เครื่องมือในการตัดชื้อเนื้อ(punch biopsy) ขนาดผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรทำการตัดชิ้นเนื้อ และเย็บปิดบาดแผลด้วย ไนลอนขนาด 5-0 และนัดท่านมาตัดไหมในอีก 7 วัน แผลจะหายสนิท โดยไม่มีแผลเป็นภายในเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์

ประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้รับจากการเข้าร่วมวิจัย

ภายหลังเสร็จสิ้นการวิจัย ท่านจะได้ทราบผลการศึกษาโดยรวม ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจของกลไกของโรคที่ดียิ่งขึ้น อาจนำไปช่วยในการพยากรณ์โรค และอาจนำไปใช้ในการรักษาต่อไปในอนาคต

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

เนื่องจากการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จะนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปทำสกัดหา mRNA ของ Interferon-alpha ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาทางคลินิก ภาควิชาจุลวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาสาสมัครจะไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆและท่านมีสิทธิที่จะปฏิเสธการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยครั้งนี้โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อท่าน หากท่านมีข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัย นายแพทย์ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์ ตึกจิระประวัติชั้น 2 หน่วยตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4253 ซึ่งยินดีให้คำตอบแก่ท่าน ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

คำยินยอมของอาสาสมัคร

ข้าพเจ้าได้ทราบจุดมุ่งหมายและทำความเข้าใจกับโครงการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon-alpha ในผื่นDLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติ และผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE เป็นอย่างดี และยินดีให้ความร่วมมือโดยสมัครใจ โดยผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลส่วนบุคคลของข้าพเจ้าไว้เป็นความลับ ข้าพเจ้าได้ลงนามไว้เป็นหลักฐานแสดงความสมัครใจในการเข้าร่วมโครงการไว้ ณ ที่นี้

วันที่ .....

ลงชื่อ ..... (ผู้ยินยอม)

(.....)

ลงชื่อ .....(ผู้ปกครอง)

(.....)(เฉพาะกรณีผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 18 ปี)

ลงชื่อ .....(พยาน)

(.....)

ลงชื่อ ..... (ผู้วิจัย)

(.....)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบยินยอมเข้ารับการตัดชิ้นเนื้อของอาสาสมัครปกติ

ชื่อโครงการ การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ อินเตอร์เฟียรอนแอลฟา ในผื่นดีแอลอี โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติและผิวหนังปกติของผู้ป่วยดีแอลอี

ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจให้คำยินยอมเข้าร่วมวิจัย ผู้วิจัยขอชี้แจงรายละเอียดของโครงการวิจัยดังนี้ โครงการวิจัยนี้จะศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรค DLE เปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งโรค DLE เป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง เป็นโรคที่พบในประชากรทั่วโลก ในประเทศไทยโรค DLE เป็นโรคผิวหนังชนิดไม่ติดเชื้อ อาการแสดงทางผิวหนังมีได้หลายแบบ โดยพบได้หลายระยะ สำหรับสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคนี้ยังไม่ปรากฏแน่ชัด แต่มีหลักฐานบ่งว่าน่าจะมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือ หลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่การติดเชื้อไวรัส, การได้รับยา, แสง UV แต่จากหลักฐานในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า ปัจจัยทางพันธุกรรมนั้นเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดโรค และความรุนแรงของโรคนี้

คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน และวิธีการการศึกษาวิจัย

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัยในกลุ่มที่เป็นอาสาสมัครที่เป็นคนปกติ ที่เข้ารับบริการคลินิกศัลยกรรมตกแต่งแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะอธิบายรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัยก่อนที่ท่านจะลงนามในใบยินยอมเพื่อเข้ารับการตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวิจัยก่อนการผ่าตัดผู้ทำการวิจัยจะขอแบ่งชิ้นเนื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรออกมาจากชิ้นเนื้อที่แพทย์ผู้ทำศัลยกรรมตกแต่งตัดออกมาตามปกติ โดยการเก็บชิ้นเนื้อจากท่านในครั้งนี้จะไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อการเข้ารับบริการศัลยกรรมตกแต่งตามปกติของท่าน

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมวิจัย แต่ผลการวิจัยนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้นเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรค และอาจจะนำไปใช้พัฒนาขบวนการรักษา หรือป้องกันโรคได้ ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ต่อบุตรหลานของท่านในอนาคต ทั้งนี้ท่านจะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆของการทำวิจัย ทั้งสิ้น

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

เนื่องจากการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จะนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปทำสกัดหา mRNA ของ Interferon-alpha ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาทางคลินิก ภาควิชาจุลวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาสาสมัครจะไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆและท่านมีสิทธิที่จะปฏิเสธการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยครั้งนี้โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อท่าน หากท่านมีข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัย นายแพทย์ยุทธนา อ่องอนันตพงศ์ ตึกจิระประวัติชั้น 2 หน่วยตจวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4253 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง และยินดีให้คำตอบแก่ท่าน

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

คำยินยอมของอาสาสมัคร

ข้าพเจ้าได้ทราบจุดมุ่งหมายและทำความเข้าใจกับโครงการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon-alpha ในผื่นDLE โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติ และผิวหนังปกติของผู้ป่วยโรค DLE เป็นอย่างดี และยินดีให้ความร่วมมือโดยสมัครใจ โดยผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลส่วนบุคคลของข้าพเจ้าไว้เป็นความลับ ข้าพเจ้าได้ลงนามไว้เป็นหลักฐานแสดงความสมัครใจในการเข้าร่วมโครงการไว้ ณ ที่นี้

วันที่ .....

ลงชื่อ ..... (ผู้ยินยอม)

(.....)

ลงชื่อ .....(ผู้ปกครอง)

(.....)(เฉพาะกรณีผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 18 ปี)

ลงชื่อ .....(พยาน)

(.....)

ลงชื่อ ..... (ผู้วิจัย)

(.....)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล	นายยุทธนา อ่องอนันตพงศ์
ประวัติส่วนตัว	เกิดวันที่ 26 เมษายน พ.ศ.2521 ที่จังหวัดภูเก็ต
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2544
ประวัติการทำงาน	- ได้รับการบรรจุเป็นพนักงานของรัฐตำแหน่งนายแพทย์ 4 ที่โรงพยาบาลตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ในปี พ.ศ.2545 - 1 ม.ค.-30 เม.ย. 2546 ย้ายไปโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช - 1 พ.ค.2546 -30 เม.ย. 2547 ย้ายไปโรงพยาบาลถลาง จังหวัดภูเก็ต ตำแหน่งนายแพทย์ 5 - ลาออกจากราชการเพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย