

การแสดงออกของยีนโมโนไซต์เคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1, อินเทอร์ลิวคิน-6 และ
ทรานสเฟอร์มีนิงโกรสแฟคเตอร์-บีต้า ในผู้ป่วยโรคนี้วัวไต



นางสาวชนุตรา หุณาปเทศ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, INTERLEUKIN-6 AND
TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA GENE IN NEPHROLITHIASIS



Miss Chanutra Hunapathed

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

ชุนตรา หุนาประเทศ : การแสดงออกของยีนโมโนไซต์เคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1,อินเทอร์ลิวคิน-6 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-บีต้า ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต. (EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, INTERLEUKIN-6 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA GENE IN NEPHROLITHIASIS)
 อ.ที่ปรึกษา: ดร.ชาญชัย บุญหล้า, อ.ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ 78 หน้า.

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการอักเสบมีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคนิ่วไต การศึกษาในหนูที่เป็นนิ่วพบว่าผลึกนิ่วเป็นสาเหตุของเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุท่อไต และการอักเสบในไต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับการแสดงออกของ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL- 6) และ transforming growth factor-beta (TGF-β) ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนดังกล่าว กับประสิทธิภาพการทำงานของไต และระดับความเครียดจากออกซิเดชั่น เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เลือด และเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการผ่าตัดเอานิ่วออก จำนวน 29 ราย ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตควบคุมคือเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งจากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการผ่าตัดเอาไตออก จำนวน 6 ราย และเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี จำนวน 35 ราย ตรวจวัด N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG) activity, proteins, malondialdehyde และ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ในตัวอย่างปัสสาวะ วัดค่า corrected creatinine clearance (CCr) และค่าการขับออกของแมกนีเซียมเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไต ตรวจวัดการแสดงออกของ MCP-1, IL- 6 และ TGF-β mRNA ในเนื้อเยื่อไตโดยวิธี real-time RT-PCR ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุท่อไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ TGF-β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่า IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ การแสดงออกของ MCP-1 และ IL- 6 ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งสูงกว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าการแสดงออกของ TGF-β ในเนื้อเยื่อไตทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบแนวโน้มการแสดงออกของ TGF-β สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง การแสดงออกของ MCP-1 และ IL- 6 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า corrected CCr ขณะที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ NAG activity และ proteins ในปัสสาวะ โดยสรุป ระดับการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง แนวโน้มการแสดงออกของ TGF-β ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาจจะบ่งชี้การเกิด renal fibrosis ขึ้นในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL- 6 ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคนิ่วไตสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง และภาวะการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตที่สูงขึ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการอักเสบและภาวะ renal fibrosis ในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีส่วนส่งผลกระทบต่อระดับความรุนแรงและการดำเนินของโรคนิ่วไต

ภาควิชา ชีวเคมี
 สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์
 ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ชุนตรา หุนาประเทศ.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4874720230 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: INFLAMMATION/ NEPHROLITHIASIS/ RENAL IMPAIRMENT / MCP-1 / IL-6 / TGF- β / 8-OHdG

CHANUTRA HUNAPATHED : EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, INTERLEUKIN-6 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA GENE IN NEPHROLITHIASIS. THESIS ADVISOR : CAHNCHAI BOONLA, Ph.D.
 THESIS COADVISOR : PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG. 78 pp.

Oxidative stress and inflammation have been considered to play important roles in the development of nephrolithiasis. Lithogenic crystals formed in persistently supersaturated urine cause oxidative damage, tubular injury and inflammation in the kidney of nephrolithic rats. The present study aimed to investigate the intrarenal gene expressions of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor-beta (TGF- β) in nephrolithiasis patients and to evaluate whether their expression levels were associated with renal impairment and oxidative stress status. Twenty-nine patients with nephrolithiasis who underwent surgical removal of stone were recruited and renal biopsy, blood and 24-hrs urine specimens were collected. Control renal tissues were taken from non-cancerous and cancerous portions of nephrectomy specimens from patients with renal cancers (n=6). Control 24-hrs urine samples were obtained from 35 health subjects. N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity, proteins, malondialdehyde and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine were measured in the urine specimens. Corrected creatinine clearance (CCr) and fractional excretion of magnesium were also determined. The mRNA expressions of MCP-1, IL-6 and TGF- β in renal tissue were measured by real time RT-PCR. The result showed that nephrolithiasis patients had renal tubular damage and oxidative stress significantly higher than healthy controls. In stone-adjacent renal tissues, mRNA levels of MCP-1 and TGF- β were significantly higher than IL-6. Expressions of MCP-1 and IL-6 in cancerous renal tissues were significantly higher than in non-cancerous renal tissues and stone-adjacent renal tissues. Although there was no significant difference of TGF- β expression compared between the three sources of renal tissues, the TGF- β mRNA level in stone-adjacent renal tissues trended to be higher than in non-cancerous renal tissues. Expressions of MCP-1 and IL-6 inversely related to corrected CCr, but positively correlated to urinary NAG activity and proteins. In conclusion, degree of inflammation in stone-containing kidney was lower than in the kidney with cancers suggesting a low inflammatory response in kidney stone patients. A trend of high expression of TGF- β in stone-containing kidney may indicate an ongoing renal fibrosis. Increased MCP-1 and IL-6 expressions in the kidney of nephrolithiasis patients associated with decreased kidney function and increased renal tubular damage. The present findings suggested that inflammatory response and renal fibrosis partly involved in the progressiveness of nephrolithiasis.

Department Biochemistry

Field of study Medical Biochemistry

Academic year 2006

Student's signature..... Chanutra Hunapathed

Advisor's signature..... Cahnchai Boonla

Co-advisor's signature..... Piyaratana Tosukhowong

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขวงษ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท ตลอดจนให้ความรู้คำแนะนำตลอดการทำวิจัย และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนายแพทย์สมบัติ บวรผดุงกิตติ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และแพทย์หญิงอุมาพร นวลไธสง และพยาบาล ตึกจงกลณี 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมากในการทำวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยทางชีวเคมีและโรคทางเมแทบอลิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน่วยภาวะการมีบุตรยาก ตึกนวมินทราชินี ชั้น 11 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์ CHULA-MRC ตึก อปร. ชั้น 10 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ขอขอบคุณนักเทคนิคการแพทย์พงษ์ศักดิ์ พันธุ์สิน หน่วยโรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ นางสาวปรารถนา เวสภัก นางสาวชนิษฐา พูนภิรมย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท ให้ความรักและกำลังใจ จนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์(ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
แนวคิดและทฤษฎี.....	8
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	26
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	29
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	37
ผลการวิเคราะห์.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	56
สรุปผลการวิจัย.....	56
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	61
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	68
ภาคผนวก ก.....	69
ภาคผนวก ข.....	73
ภาคผนวก ค.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1	แสดงสารก่อนิว และสารยับยั้งนิวในปัสสาวะ.....10
2	แสดงกลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย.....26
3	สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอ (Total RNA) ให้เป็น Complementary DNA (cDNA).....33
4	แสดงข้อมูลของ primer ที่ใช้ในการศึกษา.....34
5	สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำหรับ real-time PCR.....34
6	แสดงการตั้งค่าในโปรแกรมสำหรับ real-time PCR.....35
7	แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรศึกษา38
8	แสดงข้อมูลพื้นฐานและการวินิจฉัยของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Renal cancer group).....39
9	แสดงระดับของตัวบ่งชี้ของภาวะการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไตและ ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคไต.....40
10	แสดงค่า Cp และค่า Normalized ratio (NR) ของการแสดงออกของ B2M, MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....42
11	แสดงค่าCp และค่า Normalized ratio (NR) ของการแสดงออกของ B2M, MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (Non-cancerous tissue) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (Cancerous tissue) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต.....43
12	แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต.....50
13	แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน.....53
14	ระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของ ผู้ป่วยโรคไต แบ่งเป็นกลุ่มตามระดับความเสื่อมของไต ภาวะการทำลายท่อไต และระดับความเครียดจากออกซิเดชัน.....55

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงแผนผังการทำวิจัยและการนำเสนอผลงาน.....	7
2 แสดง Putative pathway ของการเกิดโรค End stage renal disease ในผู้ป่วยโรคไต.....	17
3 โครงสร้างสามมิติของเคโมไคน์.....	20
4 โครงสร้างและการแบ่งกลุ่มของเคโมไคน์.....	20
5 แสดง putative pathway ของการเกิดการอักเสบและ renal fibrosis ในผู้ป่วยโรคไต.....	24
6 แสดงระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตและผู้ป่วยโรคมะเร็งไต.....	44
7 แสดงค่า Crossing point (Cp) เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของMCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	45
8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	46
9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะกับการแสดง ออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	47
10 แสดงการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วย โรคไต เปรียบเทียบระหว่างชนิดของก้อนนิ่ว.....	48
11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการระดับแสดงออกของ MCP-1 mRNA กับปริมาณ การขับออกของโปรตีนและระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ	51
12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการระดับแสดงออกของ IL-6 mRNA กับปริมาณ การขับออกของโปรตีนและระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ	52

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่พบบานานตั้งแต่สมัยดึกดำบรรพ์ ปัจจุบันโรคนิ่วไตยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้แพร่หลายทั่วโลก และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ รายงานความชุกของโรคนิ่วไตตั้งแต่ร้อยละ 4 ถึงร้อยละ 20 อัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 50 ในระยะ 5 - 10 ปี และสูงขึ้นถึงร้อยละ 75 ในระยะเวลา 15 ปี ซึ่งอาจส่งผลร้ายแรงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ปัญหาทางด้านสุขภาพที่ทรุดโทรมลงแล้ว ผู้ป่วยอาจมีปัญหาด้านเศรษฐกิจ เช่น ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงขึ้น ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงจัดเป็นโรคที่คุกคามคุณภาพชีวิตของประชากรโลก รวมทั้งประชากรไทย

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่เกิดจากสาเหตุหลายปัจจัย (multifactorial disease) (1,2) ได้แก่ ความเสี่ยงทางพันธุกรรม (genetic susceptibility), ความผิดปกติทางกายวิภาคของไต (anatomical abnormality), ความผิดปกติทางเมตาบอลิก (metabolic abnormality) เช่น hyperoxaluria, hypercalciuria, hypocitraturia, hypokaliuria, การติดเชื้ระบบทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น พฤติกรรมการรับประทานอาหาร (dietary habit) การดำเนินชีวิต (lifestyle) ความเครียด ภูมิอากาศ และสภาพภูมิประเทศ เป็นต้น ชนิดของก้อนนิ่วร้อยละ 75 เป็นนิ่วแคลเซียม (calcium stone) มีองค์ประกอบหลักเป็นแคลเซียมออกซาเลต ร้อยละ 25-30 จะเป็นนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (non-calcium stone) ได้แก่ นิ่วกรดยูริก นิ่วติดเชื้อหรือนิ่วสตรูไวท์ และนิ่วซีสทีน เป็นต้น (3-5)

กลไกการเกิดนิ่วในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามเชื่อว่าเกิดจากภาวะความอิ่มตัวยวดยิ่ง (supersaturation) ของเกลือหรือแร่ธาตุที่เป็นสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกนิ่วขึ้นในปัสสาวะ ในสภาวะปกติผลึกที่เกิดขึ้นสามารถที่จะถูกขับออกไปพร้อมกับการไหลของปัสสาวะได้ แต่เมื่อปัสสาวะอยู่ในภาวะ chronic supersaturation ในปัสสาวะจะมีสารก่อนิ่วและผลึกปริมาณมาก สารก่อนิ่วและผลึกเหล่านี้จะกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการบาดเจ็บและถูกทำลาย มีการขับของสารพวก oxidatively modified biomolecules ต่างๆ ออกมาในปัสสาวะมากขึ้น (6) นอกจากนี้สารก่อนิ่วและผลึกยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างและหลั่งสารไซโตไคน์และเคโมไคน์ เพื่อดึงดูดเซลล์

macrophages และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ให้มากำจัดผลึกนิ้ว และเซลล์ที่บาดเจ็บ (injured cells) ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น

เมื่อท่อไตเกิดการอักเสบ เซลล์บุท่อไตจะตายและหลุดลอกออกมามากขึ้น จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต อย่างไรก็ตามเซลล์มีกลไกในการป้องกันตัวเอง (defensive mechanism) และการปรับตัว (adaptive mechanism) เพื่อให้สามารถคงอยู่ได้ในภาวะคุกคามจากก้อนนิ้วและผลึกนิ้ว โดยเซลล์จะสร้างโปรตีนที่เกี่ยวกับการป้องกันเซลล์จากผลึกนิ้ว เช่น stone modulators และ defensive proteins ต่างๆ รวมทั้งโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนและซ่อมแซมเซลล์ที่ตายไป (wound healing) ที่สำคัญคือ Transforming growth factors- β (TGF- β) ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์สร้าง extracellular matrix มากขึ้น เพื่อการซ่อมแซมบาดแผล โดยในที่สุดจะเกิด scar หรือ fibrosis ตามมา (5)

การศึกษาใน cell culture model พบว่าออกซาเลตไอออนและผลึกนิ้วสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างเคโมไคน์ Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (7) และ Interleukin-6 (IL-6) มากขึ้น และมีรายงานการแสดงออกของ MCP-1 สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ทำให้เกิดนิ้ว (experimental nephrolithiasis) นอกจากนี้หลายการศึกษาพบว่าในหนูที่เป็นนิ้วมีการเกิด fibrosis ในเนื้อเยื่อไต อย่างไรก็ตามผลการศึกษาเหล่านี้ยังไม่ได้รับการยืนยันใน human tissue

จากผลการศึกษาข้างต้นผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า MCP-1 และ IL-6 น่าจะเป็นสารตัวกลางที่มีบทบาทมากในกระบวนการอักเสบในผู้ป่วยโรคนิ้วไต และ TGF- β น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด fibrous tissue ในเนื้อเยื่อไตที่เกิดนิ้ว ซึ่งระดับการอักเสบและภาวะ fibrosis ในไตน่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของสารตัวกลางการอักเสบเหล่านี้กับประสิทธิภาพการทำงานของไต และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ผลการศึกษาจะทำให้ทราบกลไกการก่อนิ้วในระดับโมเลกุลมากขึ้น โดยเฉพาะความสัมพันธ์ของการอักเสบและการเกิดนิ้ว ซึ่งข้อมูลนี้อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวัดปริมาณการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในระดับ mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β และตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต

3. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β และภาวะเครียดออกซิเดชัน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แนวทางปฏิบัติต่อผู้ร่วมโครงการศึกษาวิจัย

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาנית โดยการผ่าตัดเอานิ่วออก หรือโดยวิธี percutaneous nephrolithotomy (PCNL) ซึ่งแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดให้ผู้ป่วยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (kidney biopsy) ขณะทำการผ่าตัด

2. วิธีเก็บตัวอย่าง

2.1. การเก็บปัสสาวะ

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนเข้ารับการรักษาנית ใช้ thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แบ่งตัวอย่างปัสสาวะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.1 วิธีเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

ปัสสาวะทิ้งก่อนเป็นเวลา 7.00 น. (เวลาเริ่มเก็บ) แล้วเริ่มเก็บปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่จัดเตรียมไว้ให้ รวมกันจนครบ 24 ชั่วโมง คือ ถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นเป็นครั้งสุดท้าย ในระหว่างเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานอาหารตามปกติ

2.2. การเก็บเลือด

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือด ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ plasma เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์ต่อไป

2.3. การเก็บเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษาניתโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urologist) บริเวณที่เก็บคือตำแหน่งที่ติดกับก้อนนิ่ว (stone-adjacent renal tissues)

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดรักษานิว เนื้องอก โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคนิวโต โดยมีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์จะเก็บอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด
2. กลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อไต (renal tissue control) เป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (renal cancers) ที่ไม่มีประวัติการเป็นนิว เนื้องอก เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากเนื้อเยื่อไตบริเวณที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissue) และบริเวณที่ไม่เป็นมะเร็ง (non-cancerous renal tissue)
3. กลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบตัวบ่งชี้ในปัสสาวะ (healthy control) เป็นผู้มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติการเป็นนิว เนื้องอก และความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ
4. ผู้เข้าร่วมโครงการยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยโดยสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรง และความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบของเครื่องมือชิ้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจ ภายหลังได้รับการชี้แจงรายละเอียดของโครงการวิจัยให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดในการวิจัย

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยต้องเป็นผู้ที่มารับการผ่าตัดนิว เนื้องอก เนื่องจากหากเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษานิว เนื้องอกโดยวิธีสลายนิว เนื้องอก (SWL) จะไม่สามารถเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตได้
2. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ถ้าไม่ได้เก็บปัสสาวะในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล จะทำให้มีการย่อยสลายของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญบางตัว เช่น มีโอกาสทำให้โปรตีนบางตัวสลายไป
3. ในการเก็บเนื้อเยื่อไต ถ้าไม่ได้เก็บในภาชนะและอุณหภูมิที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำมาทำการวิเคราะห์หาสารชีวโมเลกุล จะทำให้ปริมาณสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น กรดนิวคลีอิก มีปริมาณลดลง

คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

1. Nephrolithiasis หรือ kidney stone หรือ renal stone คือ โรคนิ่วในไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งที่สูงกว่าหลอดกรวยไต (renal pelvis) ขึ้นไป
2. Oxidative stress คือภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เป็นภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา
3. Inflammation คือภาวะการอักเสบ เป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่มีกระตุ้นด้วยระบบภูมิคุ้มกัน
4. Cytokine เป็นโปรตีน หรือ glycoprotein ขนาดเล็ก ประมาณ 8-40 kDa ที่หลั่งจากเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการกระตุ้นอย่างเหมาะสม เพื่อเป็นสัญญาณติดต่อกันระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกัน หรือ เซลล์ประเภทอื่นๆ และเพื่อควบคุมปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
5. Chemokine เป็นกลุ่มของโปรตีน ที่มีขนาดเล็กมาก (8-16 kDa) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันใน conserved cysteine motif ทำหน้าที่เป็น chemo attractant factor ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเคลื่อนตัวและการเคลื่อนที่อย่างมีทิศทางของเม็ดเลือดขาว
6. Biopsy คือการเจาะดูดด้วยเข็มขนาดต่างๆ เพื่อนำเอาเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (tissue) ของสิ่งมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่มาตรวจวิเคราะห์

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

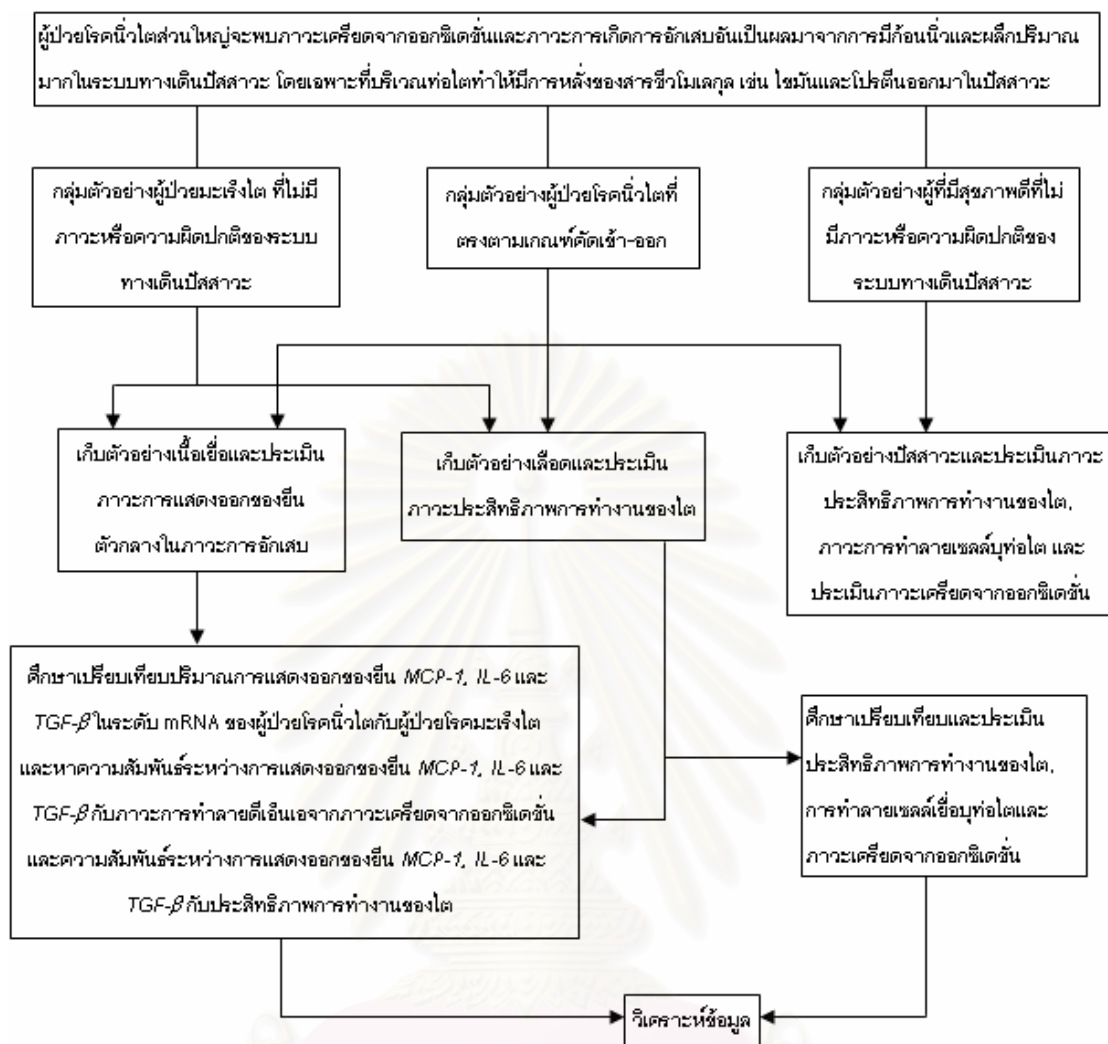
1. ทราบปริมาณการแสดงออกของ MCP-1, IL-6, TGF- β ในระดับ mRNA ของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1, IL-6, TGF- β กับประสิทธิภาพการทำงานของไต
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1, IL-6, TGF- β กับภาวะการทำลายดีเอ็นเอจากสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน
4. เข้าใจกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคนิ่วไตมากขึ้น ทำให้ทราบกลไกในการก่อโรคนิ่วในระดับโมเลกุลมากยิ่งขึ้น

- ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้ทางคลินิกในอนาคต เช่น ประเมินภาวะอักเสบในผู้ป่วยโรคหัวใจ ประเมินผลการรักษาและประเมินความเสี่ยงต่อการเป็นหัวใจ

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย

กลุ่มผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง นำมาหาปริมาณและวิเคราะห์ไอทีนีน, แมกนีเซียม, อันตรกิริยาของเอนไซม์ N-acetyl glucosaminidase (NAG), total proteins, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), malonaldehyde (MDA) และระดับซีเทรต

กลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจและกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ตัวอย่างปัสสาวะนำมาวิเคราะห์ปริมาณและครีเอทีนีน และแมกนีเซียม ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อไตนำมาสกัดแยก total RNA โดยใช้ชุดสกัด SV Total RNA Isolation kit (Promega, USA) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน MCP-1, IL-6 และ TGF- β โดยวิธี real-time RT-PCR การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมทางสถิติ Stata/SE 8.0 (College station, TX) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงแผนผังการทำวิจัยและการนำเสนอผลงาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคไตพบได้บ่อยทั่วโลก มีสาเหตุจากหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยภายใน (intrinsic risk factors) เช่น พันธุกรรม เพศ อายุ เชื้อชาติ และดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI) เป็นต้น ปัจจัยภายนอก (extrinsic risk factors) ได้แก่ อาหาร ภูมิอากาศ อาชีพ การรับประทานยาบางชนิด และความเครียด เป็นต้น และปัจจัยทางเมตาบอลิก (metabolic risk factors) ได้แก่ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (16-17) ซึ่งปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้มีผลต่ออุบัติการณ์การเกิดโรคไตด้วย

กลไกการเกิดโรคที่ชัดเจนยังไม่ทราบแน่ชัด มีหลักฐานว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและกระบวนการอักเสบมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรค เมื่อมีสารก่อโรคและผลึก (crystals) เกิดขึ้นที่บริเวณที่เป็นทางเดินปัสสาวะ ผลึกเหล่านี้จะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงาน โดยเซลล์เยื่อบุท่อไตจะสร้างและหลั่งสารตัวกลางการอักเสบ ได้แก่ MCP-1 และ IL-6 ซึ่งได้รับการพิสูจน์ในหลอดทดลอง (in vitro cell culture model) แล้วว่ามีการแสดงออกมากขึ้นในภาวะที่มีผลึกนิ่วสูง (5) และจากผลการศึกษาในตัวอย่างเนื้อไต (renal biopsy) ของผู้ป่วยโรคไตพบว่าผลึกนิ่วที่เกาะติด (crystalline deposit) ใน renal interstitium สัมพันธ์กับการเกิด interstitial fibrosis ซึ่งคาดว่า profibrogenic cytokines เช่น TGF- β น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด fibrous tissue ในเนื้อเยื่อไตที่เกิดโรค

ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าในผู้ป่วยโรคไต ที่มีผลึกปริมาณมากและมีสารก่อโรคสูงจะกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไตสร้างและหลั่งสารตัวกลางควบคุมการอักเสบ MCP-1 และ IL-6 เพื่อไปกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน โดยจะไปดึงดูดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage, monocyte และ polymorphonuclear leukocytes เข้ามาช่วยกำจัดผลึกนิ่วมากขึ้น ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น สารไซโตไคน์และเคโมไคน์ที่สร้างและหลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้ จะกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไต และ fibroblast cells สร้าง TGF- β มากขึ้น เพื่อกระตุ้นการซ่อมแซม (wound healing) ท่อไตที่ถูกทำลาย ทำให้มีการสร้างสารจำพวก extracellular matrix proteins มากขึ้น ส่งผลให้เกิด fibrosis หรือแผลเป็น (scar formation) ซึ่งในที่สุดไตจะสูญเสียเนฟรอน (nephron loss) และส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทางการแพทย์รู้จักโรคนิวไตในชื่อ urolithiasis โดยเกิดขึ้นได้ทุกตำแหน่งในระบบทางเดินปัสสาวะ ตั้งแต่ที่ไต กระเพาะปัสสาวะ จนถึงท่อปัสสาวะ โรคนิวไต หรือ nephrolithiasis หรือชื่ออื่นๆ ที่รู้จักกัน ได้แก่ kidney stone, renal calculus และ renal stone เป็นนิ่วที่เกิดในไตตั้งแต่ตำแหน่งกรวยไต (renal pelvis) ขึ้นมาถึงส่วนของเนฟรอน

โรคนิวไตพบในอัตราตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 20 ของประชากรโลก (18) และเป็นปัญหาที่พบไม่เพียงแต่ในประเทศในแถบโลกที่สามแถบเอเชียและแอฟริกาเหนือเท่านั้น แต่รวมถึงประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหราชอาณาจักร ประเทศในแถบยุโรปและคาบสมุทรสแกนดิเนเวีย และสหรัฐอเมริกา ด้วย ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบผู้ป่วยที่เป็นโรคนิวไตโรคมามากถึงร้อยละ 5 ของประชากร (52) ประมาณร้อยละ 5 ในเพศหญิง และร้อยละ 12 ในเพศชาย อัตราการเกิดนิ่วซ้ำประมาณร้อยละ 50 ภายใน 10 ปี และสูงถึงร้อยละ 75 ภายใน 20 ปี (52) ความแตกต่างของอุบัติการณ์การเกิดโรคนิวไตในแต่ละภูมิภาค มีผลมาจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การเปลี่ยนแปลงทางสังคม ความหลากหลายทางภูมิศาสตร์และวัฒนธรรม พฤติกรรมรับประทานอาหาร และสภาพภูมิอากาศ เป็นต้น

การศึกษาของ Trinchieri และคณะ สรุปว่า ในประเทศแถบยุโรปในช่วงศตวรรษที่ 19 โรคนิวไตโดยเฉพาะ bladder stone พบสูงถึงร้อยละ 20-30 (3) ในกลุ่มวัยกลางคน ร้อยละ 50 เป็นนิ่วชนิดแอมโมเนียมยูเรต (ammonium urate) และที่เหลือเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลเลต ในช่วงปี 1829 - 1839 สหราชอาณาจักรมีผู้ป่วยโรคนิวไตเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.009 (3) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางสังคม สภาพแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงลักษณะการกิน เช่น ภาวะการที่รีบเร่งทำให้อัตลักษณ์ทางการบริโภคเป็นอาหารที่เร่งด่วนและขาดคุณค่าทางโภชนาการ ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงระหว่าง ค.ศ. 1948 - 1952 พบผู้ป่วยโรคนิวไตเพียงร้อยละ 0.10 และอีก 20 ปีต่อมาพบว่าเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.16 และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 0.27 - ร้อยละ 0.33 (19) มีรายงานในปี 1985 ในประเทศสหรัฐอเมริกา ว่าค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคนิวไตประมาณ 2,000 เหรียญดอลลาร์ต่อคน และจะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดนิ่วซ้ำ รายงานในปี 1993 ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคนิวไตเพิ่มขึ้นเป็น 1.83 พันล้านเหรียญดอลลาร์ต่อปี (19) ค่าใช้จ่ายโดยเฉลี่ยในการรักษาผู้ป่วยโรคนิวไตด้วยวิธี Shock wave lithotripsy (SWL) และ Ureterorenoscopy (URS) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 360 - 2740 เหรียญสหรัฐ และ 160 - 1900 เหรียญสหรัฐตามลำดับ

กลไกการเกิดนิ่ว

เมื่อสารก่อนิ่ว (lithogenic ions) ในปัสสาวะอยู่ในภาวะอิ่มตัวยวดยิ่ง (supersaturation) จะเกิดผลึกขนาดเล็กๆ (nucleation/ crystallization) ขึ้น ในคนปกติผลึกที่เกิดขึ้นนี้จะไม่เกิดการเกาะกลุ่ม เนื่องจากมีสารยับยั้งนิ่ว (stone inhibitors) อยู่ในปัสสาวะมากพอ ดังนั้นผลึกจะไม่ติดค้างในท่อไต ผลึกจะถูกขับออกมากับปัสสาวะ (crystalluria) ในผู้ป่วยโรคนี้ไตมีภาวะอิ่มตัวยวดยิ่งของเกลือหรือแร่ธาตุที่เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดผลึกนิ่ว ร่วมกับมีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะต่ำ เมื่อเกิดผลึกนิ่ว ผลึกบางส่วนจะถูกขับออกมาในปัสสาวะ บางส่วนจะรวมกลุ่มกันแล้วเกาะติดอยู่กับเนื้อเยื่อไต โดยส่วนใหญ่มักเกาะติดที่ renal papilla ตำแหน่งที่มีผลึกเกาะติดอยู่เรียกว่า Randall's plaques ซึ่งมีองค์ประกอบของแคลเซียมฟอสเฟตหรือแคลเซียมคาร์บอเนต หากเกิดที่ papillary surface เรียกว่า type I lesion หากพบที่ collecting duct จะเรียกว่า type II lesion Randall's plaques นี้เชื่อว่าเป็นตำแหน่งเริ่มต้นหรือเป็นฐานรากสำหรับการเกิดนิ่ว (stone nidus) เมื่อความเข้มข้นของสารก่อนิ่วในภาวะอิ่มตัวยวดยิ่งอย่างต่อเนื่อง สารเหล่านี้จะไปทำให้ผลึกมีขนาดโตขึ้น (crystal growth) และรวมตัวกันเป็นกลุ่มของผลึก (crystal aggregation) ซึ่งกลุ่มผลึกเหล่านี้จะเกาะติดและคงค้างอยู่ในท่อไต (crystal retention) มากขึ้น (19,22-23,32)

สารต่างๆ ในปัสสาวะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารก่อนิ่ว (stone promoters) และสารยับยั้งนิ่ว (stone inhibitors) ซึ่งจากรายงานของ Barbas และคณะ ได้กำหนดสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว (20) ดังตารางที่ 1

สารก่อนิ่ว (Stone Promoters)	สารยับยั้งนิ่ว (Stone Inhibitors)
<ul style="list-style-type: none"> ● Calcium ● Sodium ● Oxalate ● Phosphosphate ● Urate ● Cystine ● Bacterial Products ● Tamm-Horsfall Protein 	Inorganic substances <ul style="list-style-type: none"> ● Magnesium ● Pyrophosphate ● Citrate Organic substances <ul style="list-style-type: none"> ● Nephrocalcin ● Tamm-Horsfall protein ● Urinary Prothrombin Fragment 1 ● Protease Inhibitor ● Glycosaminoglycan

ตารางที่ 1 แสดงสารก่อนิ่ว และสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ

จากตารางที่ 1 ในปัสสาวะมีสารประกอบอินทรีย์ทั้งประจุบวกและลบ และสารอินทรีย์ ทั้งที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใหญ่ สารก่อนิ่วที่สำคัญ คือ แคลเซียม ออกซาเลต และกรดยูริก ส่วน สารยับยั้งนิ่วที่สำคัญ ได้แก่ ซีเทรต แมกนีเซียม และโพแทสเซียม นอกจากนี้ยังมีสารมหโมเลกุล (macromolecules) อื่นๆ ที่มีบทบาทในการยับยั้งการเกิดนิ่วได้ด้วย ดังนั้นโรคนิ่วไตเกิดจากความ ไม่สมดุลของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว ซึ่งถ้าในปัสสาวะมีองค์ประกอบเป็นสารก่อนิ่วมากจนอยู่ใน ภาวะที่อิ่มตัวยิ่งยวด จะส่งผลให้เกิดนิ่ว อย่างไรก็ตามหากองค์ประกอบในปัสสาวะเป็นสาร ยับยั้งนิ่วมาก ก็ส่งผลให้ลดโอกาสการเกิดเป็นผลึกของนิ่วได้ (20)

นิ่วไตมีหลายชนิด เช่น แคลเซียมออกซาเลต นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต แคลเซียมยูเรต บริซโซลีน นิ่วซิสทีน นิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต นิ่วโปรตีนและแมกนีเซียม นิ่วแชนทีน นิ่วซิลิกา นิ่วไทโรแอมเทอริน เป็นต้น Wesson J และคณะ รายงานว่าร้อยละ 75 ของนิ่วไตทั้งหมด เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (21) ออกซาเลตไอออนและผลึกออกซาเลตมีคุณสมบัติเป็นพิษ ต่อเซลล์เยื่อบุท่อไตและเนื้อไต พบว่าแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (calcium oxalate monohydrate, COM) จะเป็นพิษในการทำละลายไต้มากกว่า แคลเซียมออกซาเลตไดไฮเดรตหรือ ไตรไฮเดรต (21)

นิ่วแคลเซียมออกซาเลตประกอบด้วยผลึกแคลเซียมออกซาเลตเป็นองค์ประกอบหลักซึ่ง สามารถจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ COM, COD (calcium oxalate dihydrate) และ COT (calcium oxalate trihydrate) นิ่วแคลเซียมออกซาเลตส่วนใหญ่เป็น COM และ COD นิ่ว COM เป็นนิ่วมีเนื้อแข็งมีลักษณะภายนอกเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาลดำ ลักษณะรูปร่างคล้าย ผลมัลเบอร์รี่ (mulberry) และโดยทั่วไปมีขนาดเล็กและกลม ส่วนนิ่ว COD เป็นนิ่วที่มีลักษณะ เล็กกลมมีสีเหลืองอ่อนหรือน้ำตาลอ่อน ผิวจะไม่เรียบ (23,61)

นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต มีองค์ประกอบหลักเป็นแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งผลึกที่พบบ่อยในก้อน นิ่วชนิดนี้ ได้แก่ เบสิคแคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (basic calcium hydrogen phosphate) ซึ่งมีชื่อทางธรณีวิทยาว่า apatite นิ่วแคลเซียมฟอสเฟตส่วนใหญ่เป็นนิ่วเนื้อผสมมักจะมีแคลเซียม ออกซาเลตเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย นิ่วชนิดที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเพียงองค์ประกอบเดียวจะ มีขนาดเล็ก มีสีขาวเป็นส่วนใหญ่หรือน้ำตาลอ่อน ผิวขรุขระไม่เรียบเนื้อภายในอ่อนคล้ายผง ซอล์ก หากมีแคลเซียมออกซาเลตผสมอยู่ด้วยจะทำให้สีเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลอ่อน ผิวขรุขระ เล็กน้อย ลักษณะภายนอกค่อนข้างกลม (23,61)

นิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) เป็นนิ่วที่มักพบร่วมกับการ อักเสบเรื้อรังของระบบทางเดินปัสสาวะ จึงเรียกอีกอย่างว่านิ่วติดเชื้อ (infection stone) หรือ สตรูไวท์ (struvite) แบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะจะสร้าง urea-splitting enzyme urease ส่งผลให้มีปริมาณ ammonia สูงขึ้นในปัสสาวะ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกนิ่วแมกนีเซียม

แอมโมเนียมฟอสเฟต นิวชนิดนี้จะเจริญเร็วมาก แต่พบไม่มาก ก้อนนี้มีลักษณะภายนอกเป็นสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน ผิวไม่เกลี้ยง เมื่อตัดก้อนนี้ตามขวางจะพบว่ามีวงแหวนหลายชั้น ซึ่งจะพบลักษณะพิเศษคือ เป็นลักษณะเหมือนซากงวง (staghorn stone) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกกับ (metabolic abnormalities) นิวแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (23,61)

นิวกรดยูริกและนิวยูเรต เป็นนิวที่พบเมื่อค่า pH ของปัสสาวะค่อนข้างไปทางกรด คือค่า pH ต่ำกว่า 5.35 ซึ่งเป็นค่า pKa ของกรดยูริก ทำให้เกิดการตกผลึกของกรดยูริก นิวกรดยูริกจะมีองค์ประกอบเป็นผลึกของกรดยูริกเพียงชนิดเดียวไม่มีผลึกอย่างอื่นร่วมด้วย มีลักษณะเป็นเม็ดทราย อาจมีขนาดใหญ่เท่าขนาดกรวยไตหรือกระเพาะปัสสาวะ รูปร่างค่อนข้างกลมเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งเนื้อนิวจะไม่แข็ง นิวกรดยูริกมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน การรับประทานอาหารที่มีโปรตีนสูง ท้องเสียเรื้อรัง (chronic diarrhea) โรค gout และปัจจัยทางพันธุกรรม (23,61)

อาการทางคลินิก

อาการสำคัญที่มักเกิดในผู้ป่วยโรคนี้คือ ที่เห็นอย่างชัดเจน เมื่อมีการเสียดสีของก้อนผลึกกับเนื้อเยื่อรอบๆ จะทำให้มีอาการปวดหลังบริเวณเอว หรือปวดร้าวลงไปถึงขาหนีบ หรือการปวดกระดูกสันหลังบริเวณเอว (ตำแหน่งที่ปวดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เป็นนิวที่บริเวณทางเดินปัสสาวะ)(19) ปัสสาวะอาจมีสีแดงเนื่องจากมีเลือดปน ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง เช่น มีการอุดตันทางเดินปัสสาวะอย่างสิ้นเชิงจะทำให้ไม่มีปัสสาวะเลย หรือทำให้ไตเสื่อมสภาพ อาการแสดงของโรคนี้ที่อาจพบร่วมกับการปวด คือ ปัสสาวะขัด มีอาการปวดขัดเวลาปัสสาวะ คลื่นไส้ อาเจียน มีอาการไข้ หนาวสั่น (24)

ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิก

ดังที่กล่าวไว้ในกลไกการเกิดโรคนี้ไว้ว่า โรคนี้เกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างสารก่อนนิวและสารยับยั้งนิว ซึ่งความไม่สมดุลดังกล่าวมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ อาทิ เช่น ภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึม ภาวะทุพโภชนาการ หรือจากปัจจัยอื่นๆ การศึกษาของ Luis และคณะ ได้ทำการวิจัยภาวะภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกของคนในภาคตะวันตกของประเทศบราซิล พบว่าผู้ป่วยโรคนี้ที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกมากถึงร้อยละ 96.5 โดยพบผู้ป่วยโรคนี้ที่มีปริมาณแคลเซียมในปัสสาวะสูงร้อยละ 38.8 ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำร้อยละ 29.6 และภาวะยูริกในปัสสาวะสูงร้อยละ 21.6 (23, 61)

ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง

ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะ (hypercalciuria) เป็นภาวะที่มีแคลเซียมในปัสสาวะมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมต่อวัน หรือมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน ภาวะนี้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดนิ่ว สาเหตุของการเกิดภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะที่สำคัญมี 3 กลไก ได้แก่ ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะจากการดูดซึมที่ลำไส้ (absorptive hypercalciuria) ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะจากการสลายกระดูก (resorptive hypercalciuria) และภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะจากการขับทิ้งทางไต (renal hypercalciuria) การมีระดับของแคลเซียมในปัสสาวะสูง และมีปริมาตรของปัสสาวะต่ำเป็นปัจจัยเสี่ยงสำหรับการโตของผลึกนิ่ว (crystal growth) ผลึกจะปรากฏอยู่เริ่มแรกภายใน basement membrane ของ loops of Henle จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ของ papillary tip เพื่อเจริญเป็น stone nidus (20)

ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง

ออกซาเลต (oxalate, Ox) เป็นเกลือของกรดอินทรีย์ขนาดเล็กที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group, -COOH) 2 หมู่เชื่อมติดกัน เรียกว่ากรดออกซาลิก (oxalic acid, HOOC-COOH) ซึ่งเป็นกรดแก่ที่แตกตัวให้ประจุลบ และมีค่าคงที่ของการแตกตัว 2 ค่า คือ $pK_{a1} = 1.23$ และ $pK_{a2} = 3.8$ ดังนั้นที่ $pH > 4$ ออกซาเลตจะอยู่ในรูปของไดออกซาเลต (Ox^{2-}) ในพืชผักและผลไม้พบออกซาเลตในรูปอิสระเป็นกรดออกซาลิกหรือในรูปของเกลือโซเดียมออกซาเลต (sodium oxalate) หรือ โพแทสเซียมออกซาเลต (potassium oxalate) ที่มีสมบัติละลายน้ำได้ สำหรับเกลือแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) พบตามเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย และในระบบทางเดินปัสสาวะ มีสมบัติละลายน้ำได้ยาก เนื่องจากในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ไม่มีเอนไซม์ย่อยสลายออกซาเลต จึงถือได้ว่า สารออกซาเลตเป็นผลิตภัณฑ์ท้ายของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ไม่มีความจำเป็นต่อร่างกาย ต้องกำจัดทิ้งหรือขับออกทางปัสสาวะ คล้ายกับกรดยูริกที่เป็นผลิตภัณฑ์ท้ายของการสลายเบสพิวรีน (purine catabolism) ปริมาณออกซาเลตที่ขับออกมาในปัสสาวะมากกว่า 45 มิลลิกรัมต่อวัน(39,40) เป็นภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากร่างกายมีการสังเคราะห์ออกซาเลตภายในร่างกายมากเกินไป มากกว่าได้รับจากอาหารมีออกซาเลตสูง

ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงแบ่งได้ 2 แบบ ตามสาเหตุการเกิด คือ ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงจากสาเหตุปฐมภูมิ (primary hyperoxaluria) เนื่องจากขาดเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมของออกซาเลต ทำให้มีการสร้างของออกซาเลตมากผิดปกติ และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงจากสาเหตุทุติยภูมิ (secondary hyperoxaluria) เกิดขึ้นจากได้รับออกซาเลตเข้าสู่ร่างกายหรือได้รับสารต้นกำเนิดของออกซาเลตบางชนิดมากเกินไป (20,23-24)

ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง

กรดยูริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการสลายของเบสพิวรีน(purine metabolism) ทั้งที่ได้รับมาจากอาหารและสร้างขึ้นเองภายในเซลล์ (40) สารพิวรีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ร้อยละ 80 มีแหล่งกำเนิดมาจากภายในร่างกาย (endogenous source) ส่วนน้อยรับมาจากอาหาร ซึ่งอาหารที่มีสารพิวรีนสูง ได้แก่ กลุ่มอาหารที่มีจำนวนเซลล์มาก เช่น เครื่องในสัตว์ เลือดไก่ ไช้ปลา ปลาซาดีน ยีสต์ ถั่วงอก ยอดอ่อนของผักต่างๆ เป็นต้น

ภาวะปัสสาวะมีกรดยูริกสูง คือปัสสาวะที่มีระดับของกรดยูริกมากกว่า 800 และ 750 มิลลิกรัมต่อวันในเพศชายและเพศหญิงตามลำดับ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความผิดปกติทางพันธุกรรม และการได้รับสารอาหารที่เป็นต้นกำเนิดการสังเคราะห์ยูริกมากเกินไป รวมทั้งการมีความผิดปกติของการทำงานของไต กรดยูริกมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สามารถละลายได้น้อยในภาวะปัสสาวะเป็นกรด โดยเฉพาะเมื่อมีค่าความเป็นกรดต่ำกว่า pH 5.5 ดังนั้นแม้จะมีกรดยูริกในระดับปกติแต่หากปัสสาวะเป็นกรด ก็สามารถที่จะเกิดนิ่วกรดยูริกได้ ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูงพบประมาณร้อยละ 10 ในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียม ซึ่งผลึกของกรดยูริกจะเป็น nidus สำหรับผลึกแคลเซียมออกซาลेट (24)

ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง

ในผู้ใหญ่ปกติจะขับถ่ายฟอสเฟตทางปัสสาวะประมาณ 0.31 – 1.3 กรัมต่อวัน หากมีค่าสูงกว่า 0.9 กรัมต่อวัน จัดเป็นภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง เป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งในการเพิ่มความอึดด้วยด่างในปัสสาวะ ซึ่งทำให้เกิดผลึกแคลเซียมฟอสเฟตและนิ่วฟอสเฟตต่อไป นอกจากนี้ การเกิดภาวะฟอสเฟตสูงในปัสสาวะยังเป็นปัจจัยเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกันของเกลือแคลเซียมออกซาลेटได้อีกด้วย ซึ่งจะเกิดเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลेटได้ อย่างไรก็ตามการเพิ่มของฟอสเฟตในปัสสาวะจะไม่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดนิ่วหากระดับของ pH ในปัสสาวะยังคงอยู่ในสภาวะที่ไม่เป็นด่างมาก เนื่องจากผลึกแคลเซียมฟอสเฟตจะเกิดได้ดีในภาวะที่เป็นด่าง

ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

ซีเทรต หรือกรดซีทริก เป็นสารสำคัญในการผลิตพลังงาน (ATP) จากสารอาหารต่างๆ โดยเป็นสารตัวแรกที่สร้างขึ้นในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก(24) ซีเทรตที่ถูกขับออกมาในปัสสาวะมีค่าอย่างน้อย 320 มิลลิกรัมต่อวัน หากมีระดับที่ต่ำกว่านี้ จัดว่ามีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ ซีเทรตมีบทบาทเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่สำคัญ โดยจะจับกับแคลเซียม ทำให้ยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेट และยังยับยั้งการเจริญของผลึกแคลเซียมออกซาลेटด้วย (23)

ปัจจัยที่ทำให้ซีเทรตในปัสสาวะต่ำมีหลายประการ ได้แก่ ภาวะร่างกายมีกรดเพิ่ม การรับประทานอาหาร (โปรตีนจากเนื้อสัตว์) ที่ทำให้เกิดการสร้างกรดขึ้นในร่างกาย ภาวะอดอาหาร และพร่องโพแทสเซียม (24) และการได้รับยาบางชนิด เช่น ยาขับปัสสาวะ

acetazolamide ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carbonic anhydrase เป็นต้น ส่วนปัจจัยที่เพิ่มซีเทรตในปัสสาวะได้ คือ ภาวะมีด่างเพิ่ม การได้รับวิตามินดีหรือสารไดคาร์บอกซีเลตที่เป็นสารตัวกลางของวัฏจักรเครบส์เพิ่มขึ้น รวมทั้งการได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมของซีเทรตในไมโทคอนเดรีย เช่น fluorocitate และ melanoate เป็นต้น (19)

ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ

ภาวะโพแทสเซียมต่ำในปัสสาวะทำให้ซีเทรตในปัสสาวะต่ำลง เนื่องจากภาวะขาดโพแทสเซียมทำให้ pH ของ tubular epithelial cells (TEC) ลดลง กระตุ้นให้ TEC ดูซีเทรตกลับ นอกจากนี้การขาดโพแทสเซียมยังเพิ่มการเปลี่ยนแปลงซีเทรตไปเป็นไขมันมากขึ้นด้วย ความต้องการโพแทสเซียมของร่างกายอยู่ระหว่าง 1875-5625 มิลลิกรัมต่อวัน (23)

ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ

คนปกติได้รับแมกนีเซียมจากอาหารประมาณ 140-180 มิลลิกรัมต่อวัน และขับออกมาในปัสสาวะ 48-170 มิลลิกรัมต่อวัน หรือ 2-7 มิลลิโมลต่อวัน ในการวิจัยที่ผ่านมา ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ไม่พบภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ แต่พบภาวะที่มีแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesuria) (23) กรณีที่มีภาวะขาดแมกนีเซียมที่พบร่วมกันกับภาวะขาดโพแทสเซียมจะส่งเสริมให้เกิดความผิดปกติรุนแรงขึ้น เนื่องจากแมกนีเซียมสามารถจับกับออกซาเลตซึ่งเป็นสารก่อนิ่วที่ละลายน้ำได้ และขับถ่ายออกมาในปัสสาวะ ทำให้ลดการเกิดนิ่วได้โดยตรง

การรักษาโรคนิ่ว

การรักษาโรคนิ่วด้วยวิธีทางศัลยกรรม

1. Extracorporeal shock wave lithotripsy (SWL) เป็นวิธีการรักษาโรคนิ่วที่นิยมมากถึงร้อยละ 80-90 หลักการคือใช้คลื่นเสียงที่มีพลังงานสูงยิงไปที่ตำแหน่งของก้อนนิ่วที่มีขนาดเล็กกว่า 1.5 cm และตำแหน่งของก้อนนิ่วไม่ต่ำกว่าช่วงที่ 3 ของท่อปัสสาวะ คลื่นที่ใช้จะมีความดันสูงสามารถวิ่งผ่านของเหลว และมีพลังงานสูงในการทำให้ก้อนนิ่วแตกได้ (19,25)

2. Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) วิธีการนี้ใช้ในการกำจัดผลึกก้อนนิ่วที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 cm ศัลยแพทย์จะทำลายผลึกก้อนนิ่วออกเป็นชิ้นเล็กๆ และกำจัดออกโดยใช้ nephroscope บางครั้งอาจจะมีการใช้ ultrasonic probe หรือ laser ยิงผ่านเข้าไปทาง nephroscope เพื่อทำลายก้อนนิ่ว (19,25)

3. Ureterorenoscopic stone removal (URS) คือการใช้กล้อง ureteroscope ขนาดเล็กส่องผ่านทางกระเพาะปัสสาวะเข้าสู่ท่อไต และใช้เครื่องมือคล้องนิ่ว (basket, forceps) หรือกรอให้นิ่วแตกโดยใช้ laser หรือ ballistic lithotripsy (19,25)

4. Open stone surgery (OSS) เป็นการเปิดผ่าตัด ซึ่งมีหลายวิธีโดยขึ้นกับตำแหน่งและขนาดของนิ่ว เช่น anatomic nephrolithotomy (ANL), pyelolithotomy, ureterolithotomy
5. Laparoscopic ureterolithotomy เป็นการใช้กล้องส่องเข้าไปผ่าเอานิ่วในท่อไตออก โดยการเจาะแผลข้างท้องเล็กๆ ประมาณ 3 แผล

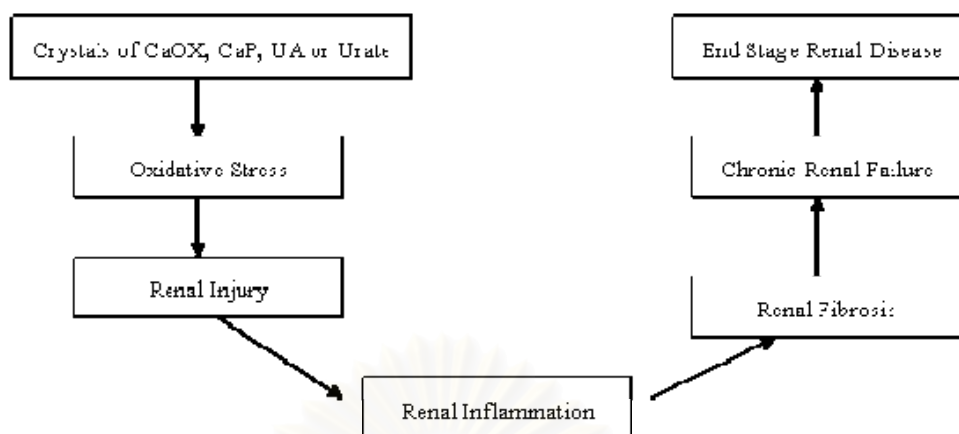
ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ ภาวะที่มีสารออกซิแดนท์ (oxidants) มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) สารออกซิแดนท์ที่เกิดขึ้นซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) จะไปทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้สูญเสียหน้าที่ไป ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายหรือบาดเจ็บ (cell injury) ขึ้น

สารออกซิแดนท์ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), hydroxy radical (OH^\cdot) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ในสภาวะปกติร่างกายมีกระบวนการที่จะทำลายหรือยับยั้งความเป็นพิษของสารออกซิเดนท์เหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) หรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavengers) ซึ่งมีอยู่ภายในร่างกาย เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) และ antioxidant enzymes เป็นต้น หรือได้รับมาจากอาหาร เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน เป็นต้น ในภาวะที่เซลล์มีสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอจะทำให้ สารออกซิเดนท์ทำลายสารชีวโมเลกุลของเซลล์มากขึ้น นำไปสู่การเสียหายที่และการทำลายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเรียกว่า “Oxidative damage” (27-28)

ในปี 2005 Tungsanga และคณะ ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยโรคไตไตกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่าในผู้ป่วยโรคไตไตนั้นมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติและสัมพันธ์กับการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไต (28) เมื่อเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation มากขึ้น และมีการหลั่งของเอ็นไซม์ไนโซโตพลาสซึมและสารต่างๆ ออกมาในปัสสาวะมากขึ้น

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าผลึกนิ่วทุกชนิด สามารถทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ทั้งโดยกระตุ้นให้เซลล์ที่เยื่อบุท่อไตสร้าง ROS มากขึ้นจนเกิดภาวะ oxidative stress และการกระตุ้นให้มีการรวบรวม monocytes, macrophages และเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ มาเพื่อกำจัดผลึกนิ่ว ทำยที่สุดเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบขึ้น หากผู้ป่วยโรคไตไตไม่ได้รับการรักษาหรือเกิดนิ่วซ้ำหลายครั้ง ไตจะอักเสบและมี renal fibrosis มากขึ้น จนในที่สุดเกิดภาวะไตวายและโรคไตระยะสุดท้ายได้ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดง putative pathway ของการเกิดโรค end stage renal disease ในผู้ป่วยโรคนี้ไต

ภาวะการอักเสบและการเกิดนี้ไต

เมื่อปัสสาวะมีสารก่อนี้ไตและผลึกปริมาณมาก ผลึกบางส่วนไม่สามารถขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะได้ ผลึกจะนำเข้าไปยังบริเวณ renal interstitium โดยผ่านเซลล์ด้วยวิธี endocytosis ที่บริเวณ luminal surface และด้วยวิธี exocytosis ที่บริเวณด้าน basolateral membrane (5) หรือบางครั้งผลึกอาจเคลื่อนที่ผ่านบริเวณที่เป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular spaces) ร่างกายมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยรวบรวมของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น monocyte, macrophages, lymphocytes และ neutrophil เป็นต้น มายังบริเวณ renal interstitium ที่มีผลึกและก้อนนี้ไวอยู่ เพื่อทำหน้าที่เก็บกินและกำจัดผลึกและก้อนนี้ไว (5) ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า เซลล์บุท่อไตและเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันจะสร้างและปล่อยโปรตีนที่ควบคุมการอักเสบ ได้แก่ **ไซโตไคน์** และ **เคโมไคน์** ต่างๆ เช่น MCP-1, tumor necrosis factor และ Interleukins ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังสร้าง growth factors (GF) อีกหลายชนิด ซึ่ง GFs จะกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เพื่อทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลายไป และยังกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblast ด้วย โดยเซลล์ fibroblast เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมแผล ซึ่งหนึ่งในกลไกซ่อมแซมคือการสร้าง TGF- β โดย TGF- β เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์สร้าง extracellular matrix (ECM) proteins เพิ่มมากขึ้น และนำไปสู่ภาวะ fibrosis หากมี fibrous tissue ปริมาณมากในไตจะทำให้สูญเสียเนฟรอนและอาจทำให้เกิดภาวะไตวายได้ในที่สุด(รูปที่ 2)

ไซโตไคน์ และ เคโมไคน์

ไซโตไคน์ (cytokines) และ เคโมไคน์ (chemokines) จัดเป็นโปรตีนที่ถูกปล่อยออกมาในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต (proliferation) และมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) โดยมีหน้าที่เป็นตัวควบคุมและเป็นตัวกำหนดการทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และยังคงควบคุมการเกิด trafficking ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (29)

ไซโตไคน์ เป็นกลุ่มของโปรตีนหรือเปปไทด์ ที่ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของการส่งสัญญาณ ซึ่งการส่งสัญญาณทางเคมีของไซโตไคน์จะคล้ายคลึงกับกลุ่มของฮอร์โมนและสารสื่อประสาท (neurotransmitters) เซลล์ใช้สำหรับการติดต่อสื่อสารกับเซลล์อื่นๆ สมาชิกของไซโตไคน์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ (water-soluble protein) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไซโตไคน์มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8-30 kDa ถูกสร้างและปล่อยจากเซลล์หลากหลายประเภท มีความสำคัญในกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งแบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่แล้วตั้งแต่เกิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้ามา (acquired immunity) เนื่องจากไซโตไคน์มีบทบาทหลักในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นไซโตไคน์จึงมีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบและภาวะติดเชื้อ นอกจากนี้ไซโตไคน์ยังมีความสัมพันธ์ในกระบวนการพัฒนาระบบต่างๆ เช่น ระหว่างที่มีการพัฒนาของตัวอ่อน (embryogenesis) การทำงานของไซโตไคน์จะจับกับตัวรับที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific cell-surface receptor) แล้วส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์

เคโมไคน์ เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8-10 kDa ทำหน้าที่ไปดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว ให้เข้ามา ณ บริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บหรือติดเชื้อ โครงสร้างที่สำคัญของเคโมไคน์คือมีกรดอะมิโน cysteine ที่เป็นตำแหน่งสำหรับเกิด disulfide bonds เคโมไคน์ถูกสังเคราะห์ขึ้นตอนแรกในรูปของ pro-peptides ซึ่ง signal peptide มีกรดอะมิโนประมาณ 20 ตัว ในสายโปรตีนเคโมไคน์จะมี conserved cysteine residues จำนวน 4 ตัว (รูปที่ 3) กรดอะมิโน cysteine 2 ตัวแรกจะอยู่ในตำแหน่งใกล้กับปลายด้าน N-terminal ส่วน cysteine ตัวที่ 3 จะอยู่ตรงกลางของสาย และ cysteine ตัวสุดท้ายจะอยู่ใกล้กับปลายด้าน C-terminal ทำให้เกิดการม้วนเป็น loop ของสายโปรตีนขึ้น โดย 1 loop จะมีกรดอะมิโนอยู่ประมาณ 10 ตัวนับตั้งแต่ cysteines 2 ตัวแรก เรียกบริเวณนี้ว่า N-loop ตำแหน่งของส่วนที่เป็น conserved cysteine residues ที่ปลาย N-terminal จะเป็นตัวกำหนดความแตกต่างกันของแต่ละกลุ่มของเคโมไคน์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 4) ได้แก่

1. CC chemokines หรือ β -chemokines ในกลุ่มนี้จะมี cysteines 2 ตัวติดกันที่บริเวณปลาย ด้าน N-terminal มีสมาชิกในกลุ่มอย่างน้อย 27 ชนิด เรียกชื่อว่า CC chemokine ligands (CCL)-1 ถึง -28 (CCL10 และ CCL9 เป็นตัวเดียวกัน) CC chemokines จะเหนี่ยวนำ

ให้เกิดการเคลื่อนที่ของ monocytes และเซลล์จำพวก NK cells และ dendritic cells ตัวอย่างของเซลล์ในกลุ่ม CC chemokines เช่น monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 หรือ CCL2) ที่ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ monocytes ออกจากกระแสเลือดและเข้าสู่เนื้อเยื่อรอบๆ เพื่อเปลี่ยนเป็น macrophages กลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่จะผ่านการจับกันระหว่าง CC-chemokines และ CC chemokine receptors ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ receptor ที่อยู่บนผิวของเซลล์นั้นๆ

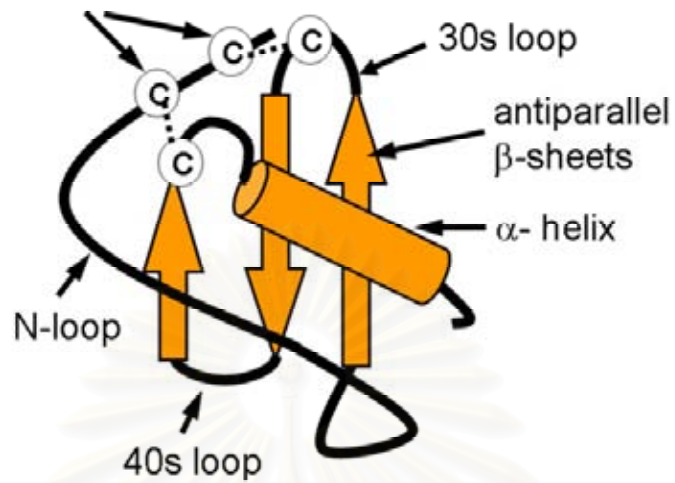
2. CXC chemokines หรือ α -chemokines ลักษณะเด่นของกลุ่มนี้คือ ที่บริเวณปลาย N-terminal ที่มี cysteines อยู่ 2 ตัว แยกออกจากกัน มีกรดอะมิโน 1 ตัว คั่นอยู่ตรงกลางแทนโดยสัญลักษณ์ "X" ในกลุ่มนี้มีสมาชิก 17 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มที่มีลำดับของกรดอะมิโน Glutamic acid–Leucine–Arginine หรือ ELR positive ซึ่งจะพบอยู่ก่อนหน้า cysteine ตัวแรก อีกกลุ่มหนึ่งคือ ELR negative คือจะไม่มี ELR motif ในสายโปรตีน กลุ่ม ELR-positive CXC chemokines จะเหนี่ยวนำแบบเฉพาะเจาะจงให้มีการเคลื่อนที่ของ neutrophils ตัวอย่างของกลุ่มนี้ ได้แก่ interleukin-8 (IL-8 หรือ CXCL8) มีหน้าที่เหนี่ยวนำให้ neutrophils ออกจากกระแสเลือด และเข้าสู่เนื้อเยื่อรอบๆ ส่วนกลุ่ม ELR negative นั้นจะทำหน้าที่เป็น chemoattractant สำหรับ lymphocytes

3. C chemokines หรือ γ -chemokines ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน cysteine อยู่เพียง 2 ตัว ตัวแรกอยู่ที่ปลาย N-terminal และอีกตัวอยู่ปลาย C-terminal เคโมไคน์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ดึงดูดเซลล์จำพวก T cell precursors ไปยังต่อมไทมัส

4. CX₃C chemokines หรือ δ -chemokines สมาชิกในกลุ่มจะมีกรดอะมิโน 3 ตัว คั่นระหว่าง cysteines 2 ตัวแรก สมาชิกในกลุ่มนี้ ได้แก่ fractalkine มีทั้งแบบขับออกนอกเซลล์ (secreted form) และเชื่อมติดกับผิวของเซลล์ (cell-tethered form) ดังนั้นเคโมไคน์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ทั้งเป็น chemoattractant และ adhesion molecule

Three dimensional structure of chemokines

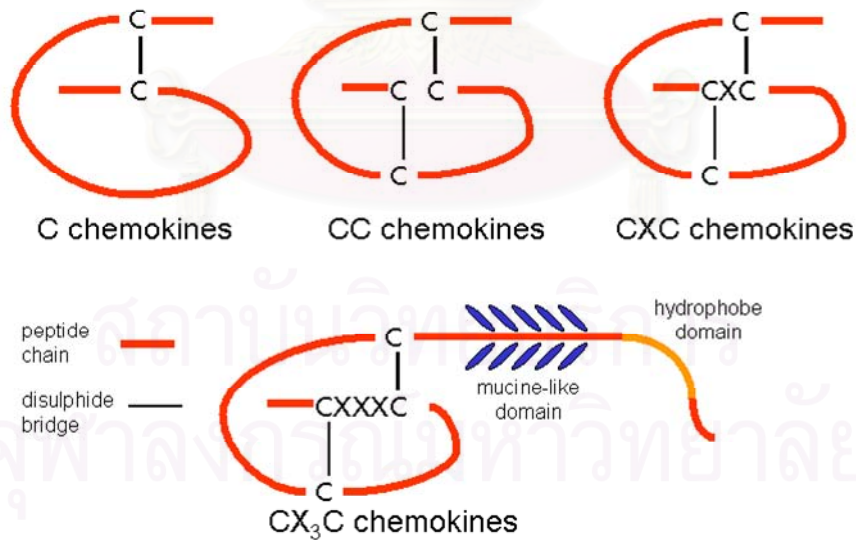
disulphide bridges of Cys-Cys



© Kohidai, L.

รูปที่ 3 โครงสร้างสามมิติของเคโมไคน์

Structure of chemokine classes



© Kohidai, L.

รูปที่ 4 โครงสร้างและการแบ่งกลุ่มของเคโมไคน์

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

MCP-1 เป็นสมาชิกในกลุ่มของ proinflammatory CC chemokines โดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ monocytes และ lymphocytes ในขณะที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ โปรตีน MCP-1 จะถูกสร้างขึ้นจาก *JE* gene ที่มี exons อยู่ 3 exons อยู่บนโครโมโซมที่ 17q11.2 – q12 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 76 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8.7 kDa โปรตีน MCP-1 ถูกสร้างขึ้นจากการเหนี่ยวนำของสารจำพวก ROS รวมทั้ง $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} และ NO_3^- (peroxynitrate) นอกจากนี้ MCP-1 ยังถูกสร้างได้โดย fibroblasts และ endothelial cells ที่ถูกกระตุ้น (30,59)

ในปี 2002 Umekawa และคณะ ทำการศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 ในเซลล์เยื่ออุทไธ (NRK52E cell) พบว่ามีการแสดงออกของ MCP-1 สูงขึ้นในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลิตภัณฑ์ COM และ Ox^{2-} (10) และพบว่า catalase สามารถลดการแสดงออกของ MCP-1 ได้ แสดงว่าอนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์ของ MCP-1 ในเซลล์เยื่ออุทไธ

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 เป็นสมาชิกตัวหนึ่งของกลุ่มไซโตไคน์ เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 185 ตัว และมี O- และ N-glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 73 และ 172 ตามลำดับ กระบวนการ post-translational modifications เช่น glycosylation และ phosphorylation เป็นตัวกำหนดรูปแบบของ IL-6 ที่จะสร้างขึ้นให้มีความหลากหลาย (various isoforms) น้ำหนักโมเลกุลของ IL-6 อยู่ระหว่าง 21.5-28 kDa ในมนุษย์ยีน *IL-6* จะมีความยาวประมาณ 5 kb และมี exons อยู่ 5 exons อยู่บนโครโมโซมที่ 7p21-p14

เซลล์หลายชนิดสามารถสังเคราะห์ IL-6 ได้ แหล่งสังเคราะห์ IL-6 หลักในร่างกาย คือ monocytes และ macrophages รวมทั้ง T-cells, B-cells, fibroblasts, keratinocytes, endothelial cell, mesangial cell, astrocytes, bonemarrow stroma cells และ tumor cells สารกระตุ้นการสร้าง IL-6 ได้แก่ IL-1, bacterial endotoxins, TNF และ platelet-derived growth factor (PDGF) เป็นต้น IL-6 ทำหน้าที่เป็น proinflammatory cytokine มีบทบาทสำคัญในภาวะที่มีอาการไข้และภาวะการตอบสนองแบบเฉียบพลันในระบบภูมิคุ้มกัน (acute phase response) สำหรับในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน IL-6 จะกระตุ้นให้มีการสร้างพลังงานทำให้ร่างกายมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น เซลล์ macrophages สามารถสร้าง IL-6 จากการกระตุ้นของแบคทีเรียหรือ pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ซึ่งถือเป็น innate defense ที่สำคัญของร่างกายในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) PAMPs บนแบคทีเรียจะจับกับโมเลกุลที่มีความสำคัญในการกระตุ้นภาวะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate ที่เรียกว่า Toll-like

receptors (TLRs) ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการส่งสัญญาณแบบ cascade ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มมากขึ้น (31)

IL-6 ยังควบคุมการเจริญและกระบวนการ differentiation ของเซลล์หลายชนิด (31) IL-6 จะเป็นตัวร่วมในการกระตุ้นการเจริญของ T-cell และ differentiation ของ cytotoxic T-cell นอกจากนี้จะช่วยในการกระตุ้นให้เกิด development ของ megakaryocyte และออกฤทธิ์ร่วมกับไซโตไคน์อื่นๆ ในการกระตุ้น multipotent hematopoietic progenitors การทำงานร่วมกันของ IL-6 และ TNF จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ acute phase protein ในการตอบสนองต่อการอักเสบหรือการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (31)

Transforming Growth Factor beta (TGF- β)

TGF- β เป็นโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญแบ่งตัวของเซลล์สามารถทำหน้าที่ได้ทั้งเป็นตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งเซลล์ ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์นั้นๆ TGF- β ส่วนใหญ่สร้างจาก chondocyte, osteocyte, fibroblasts, platelets, monocytes และ T-cell บางชนิด ตัวกระตุ้นการสร้าง TGF- β เช่น steroids, retinoids และ lymphocyte เป็นต้น TGF- β มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล (32,58) โดย TGF- β จะถูกกระตุ้นให้ปล่อยออกมาโดยเกล็ดเลือด (platelets) หลังจากที่มีการบาดเจ็บที่บริเวณเนื้อเยื่อและเกิดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเพื่อทำหน้าที่ซ่อมแซมบาดแผลต่อไป TGF- β จะกระตุ้นให้มีการสร้าง ECM proteins เช่น collagen, fibronectin, laminin และ proteoglycans มากขึ้นส่งเสริมกระบวนการ wound healing และการเกิดเป็นแผลเป็น (scar formation/ fibrosis) TGF- β มีผลยับยั้งการ degradation ของ ECM โดยยับยั้งการสร้าง collagenase, transin และ thiol proteinase ขณะที่ จะกระตุ้นการสร้าง integrins และ proteins ที่ทำหน้าที่เป็น adhesion receptors สำหรับ ECM proteins ดังนั้น TGF- β จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของการเกิด fibrosis (32,58) นอกจากนี้ TGF- β ยังทำหน้าที่เหนี่ยวนำกระบวนการ cell death หรือ apoptosis ในเซลล์หลายชนิด (32,58)

TGF- β มี 5 isoforms ได้แก่ TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 และ TGF- β 5 โดย TGF- β 1 หรือที่รู้จักกันในนามของ TGF- β นั้นจะเป็นรูปแบบที่พบได้ทั่วไปและพบได้มากในทุกเซลล์ ในขณะที่รูปแบบอื่นพบได้เฉพาะบางเซลล์และบางเนื้อเยื่อเท่านั้น (32) ยีน TGF- β ในมนุษย์นั้นจะอยู่บนโครโมโซมที่ 19q13 ขนาดของยีนมีความยาวมากกว่า 100 kb และมีทั้งหมด 7 exons โปรตีน TGF- β จะพบอยู่ในรูปของ disulfide-linked homodimers โดยการสร้าง TGF- β นั้นสร้างมาจากปฏิกิริยา proteolysis ของสารตั้งต้นที่มีความยาวมาก แต่ละ isoform จะประกอบด้วยจำนวนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน อย่างเช่น TGF- β 1 หรือ TGF- β ประกอบด้วยกรดอะมิโน 390 ตัว ขนาดของโมเลกุลประมาณ 25 kDa ประกอบด้วย disulfide

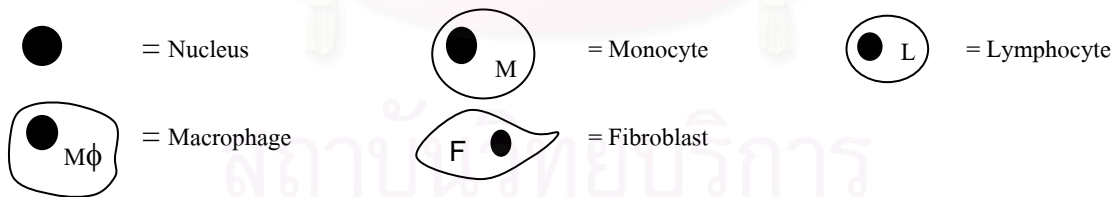
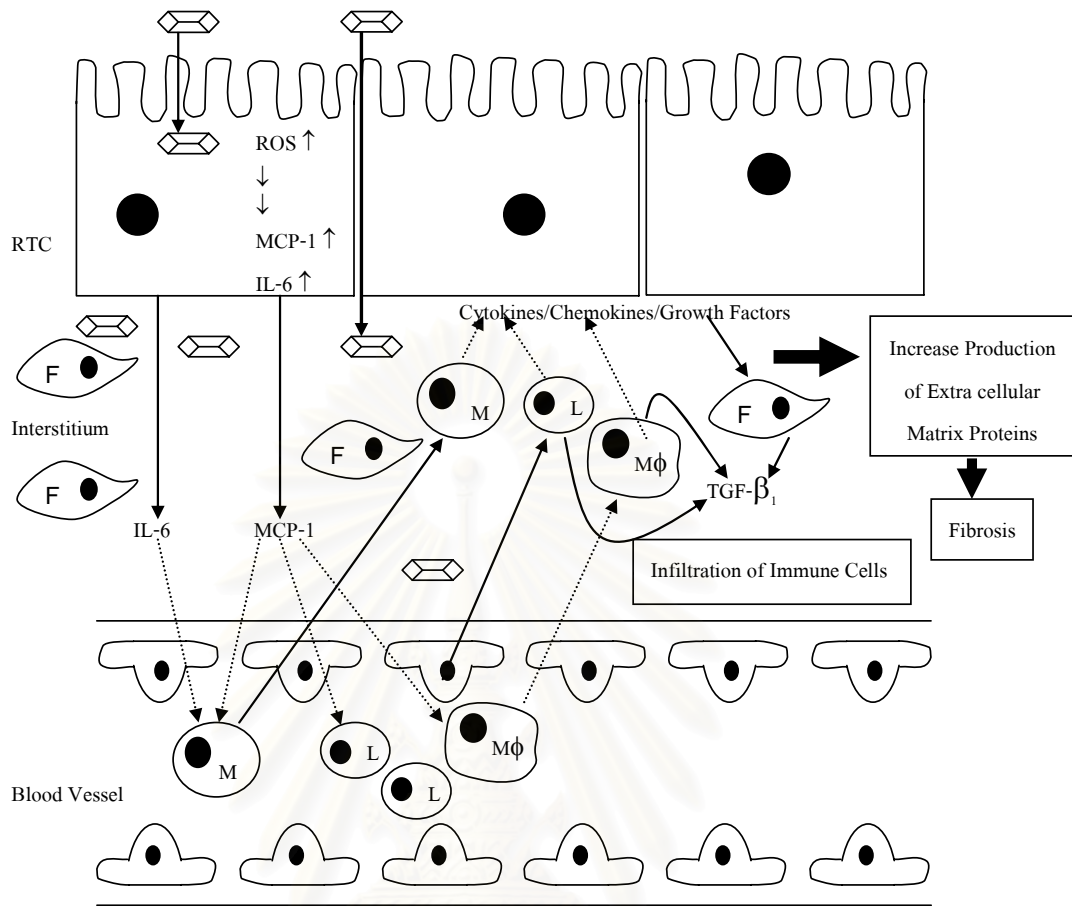
linked 2 สายที่หนักประมาณ 12.5 kDa การทำงานของ TGF- β นั้นจะไม่มีควมเฉพาะเจาะจง และจะแตกต่างกันตามแต่ละ isoform ความแตกต่างกันที่เห็นได้ชัดในแต่ละ isoform ของ TGF- β คือการแสดงออกและความเสถียรของ mRNA และโปรตีน

บทบาทของการอักเสบในกระบวนการเกิดนิ่ว

Thamilselvan และคณะได้สรุปบทบาทของออกซาเลตและผลึกออกซาเลตว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต (14) โดยออกซาเลตและผลึกนิ่วเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยการผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น การศึกษาของ Huang และคณะ สรุปความเป็นพิษจากออกซาเลต (Oxalate toxicity) ต่อเยื่อบุท่อไตโดยเฉพาะ proximal tubules ว่าในผู้ป่วยโรคไตที่มีความเข้มข้นของออกซาเลตในปัสสาวะสูง จะเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในไต และอนุมูลอิสระทำให้เกิด Lipid peroxidation เซลล์จึงถูกทำลาย (63) มีรายงานการศึกษาพบว่าผลึกนิ่วสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสร้างและหลั่ง MCP-1 ได้ (15) นอกจากนี้ยังพบว่าออกซาเลตสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสร้าง IL-6 ได้โดยตรง (7)

การศึกษาของ Umekawa และคณะสรุปผลของการแสดงออกของ MCP-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย oxalate ion และผลึกแคลเซียมออกซาเลตใน cell culture model ว่าผลึก COM และ Oxalate ion จะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน MCP-1 เพิ่มขึ้นทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าอนุมูลอิสระมีผลต่อการสังเคราะห์ MCP-1 ของเซลล์เยื่อบุท่อไต เมื่อใส่เอนไซม์ catalase เพื่อยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ สามารถที่จะลดการสังเคราะห์ MCP-1 ได้ (6) จึงสรุปได้ว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่มีการสร้างสารจำพวกอนุมูลอิสระมากขึ้นจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างและหลั่ง MCP-1

ผู้วิจัยสรุปกลไกการเกิด renal fibrosis ในผู้ป่วยโรคไตไว้ในรูปที่ 5 ผลึกนิ่วจะถูกสร้างมากขึ้นในปัสสาวะที่มีภาวะอิมิตัววยอดยั้งของออกซาเลต จะกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตปล่อยสารตัวกลางควบคุมการอักเสบ เช่น MCP-1, IL-6 เพื่อไปกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน โดยจะไปกระตุ้นให้มีการดึงดูดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophages, monocytes ให้มาที่ renal interstitium เพื่อกำจัดและเก็บกินผลึกนิ่วและเซลล์ที่ถูกทำลาย มีการสร้าง IL-6 และ inflammation mediators อื่นๆ รวมทั้ง growth factors เช่น TGF- β มากขึ้น ส่งผลให้มีการสร้างเซลล์ใหม่มาทดแทนเซลล์ที่ตายไป TGF- β ยังมีบทบาทในการกระตุ้นให้มีการสร้างสารจำพวก extracellular matrix proteins เพื่อใช้ในการซ่อมแซมบริเวณที่เกิดบาดแผล (wound healing) ส่งผลให้เกิดแผลเป็น (scar formation) หรือเกิดภาวะ fibrosis ได้ในที่สุด (รูปที่ 5)



ROS = Reaction Oxygen Species

IL-6 = Interleukine-6

TGF-β = Transforming Growth Factor-Beta

RTC = Renal Tubular Cells

MCP-1 = Monocyte Chemoattract Protein-1

รูปที่ 5 แสดง putative pathway ของการเกิดการอักเสบและ renal fibrosis ในผู้ป่วยโรคไต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคเนื้องอกไตชายและหญิงในประเทศไทยที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์ไตเทียม แผนกศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากข้อมูลภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์ (KUB x-ray film) ยืนยันว่าเป็นโรคเนื้องอกไต

กลุ่มควบคุม (Control group) สำหรับตรวจวัดการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อไตเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (renal cancers) ที่ไม่มีประวัติการเป็นเนื้องอกในระบบทางเดินปัสสาวะ

กลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบ urine biochemistry กับกลุ่มผู้ป่วยโรคเนื้องอกไต เป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติการเป็นเนื้องอกและความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ ยินยอมและสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่คัดผ่านการตรวจกรองมีทั้งหมด 70 ราย แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคเนื้องอกไต จำนวน 29 ราย กลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต จำนวน 6 ราย และกลุ่มควบคุมผู้ที่มีสุขภาพดี จำนวน 35 ราย ดังตารางที่ 2 กลุ่มประชากรตัวอย่างทุกคนได้ลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคเนื้องอกไตที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไต และความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นนอกเหนือจากโรคเนื้องอกไต เช่น polycystic kidney, persistent ureteric obstruction, neurogenic bladder, urinary tract malignancy, urinary tract infection และ renal tubular acidosis จะถูกคัดออกจากโครงการศึกษาวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Subject groups	n (total = 70)	Specimen collection
กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Nephrolithiasis patients)	29 (M 9 : F 20)	Urine, blood, renal biopsy
กลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Renal cancer patients)	6 (M 2 : F 4)	Urine, blood, renal biopsy
กลุ่มควบคุมผู้ที่มีสุขภาพดี (Healthy controls)	35 (M14 : F21)	Urine

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย (M = เพศชาย, F=เพศหญิง)

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
8 Channel Micropipettor 50-200 µl and tips	BIOHIT Plc., Helsinki, Finland
8-OHdG Micrometer plate	Japan Institute for the Control of Aging (JalCA), Japan
Autoclave (HVE-25)	HIRAYAMA, Japan
Autopipette 20, 200, 500 and 1000 µl and tips	NICHIRYO, Japan and Trefflab, Switzerland
Capillary block	Roche, USA
Class II Biohazard Safety cabinet	ESCO
Deep freezer	REVCO
Distilled water maker (GFL 2012)	GFL, Germany
Electrical balance (BL 210S)	Satorius, Germany
ELISA plate reader (Multiskan Ex)	Thermo Lab System, China
HEAT block (Dri-block DB-2A)	THECHNE, UK
High speed centrifuge(Spectrafuge 7M)	Labnet, USA
Incubator	memmert, Germany

LightCycler realtime PCR	Roche, USA
Low speed centrifuges	KOKUSAN, Japan
Magnetic sterier heat block	IKA-Labortechnik, Germany
Mini-centrifuge	TOMOS,
Orbital Shaker (SLOS-20)	Kuhner, Switzerland
Quartz cuvette spectrophotometer cells	Biorad, USA
Spectrophotometer (Smart Spec 3000)	Biorad, USA
Spectrophotometer UV-1301 PC	SHIMADZU, Japan
Vortex mixers (Genie 2 and VX 100)	Scientific Industries, USA
Water Baths	GFL, Germany

2. สารเคมี

สารเคมี (Chemicals)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
2 amino-2-methyl-1,3-propanediol	Sigma-Aldrich, USA
2-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
2-Thiobabituric acid	Sigma-Aldrich, USA
4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide	Sigma-Aldrich, USA
85 % phosphoric acid	Mallinckrodt chemical, USA
95% ethanol	Sigma-Aldrich, USA
Absolute ethanol	Sigma-Aldrich, USA
Butylated hydroxy toluene(BHT)	Sigma-Aldrich, USA
Citrate lyase enzyme	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue G 250	EASTMAN KODAK COMPANY USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich, USA
Lactic dehydrogenase	Sigma-Aldrich, USA
LightCycler Capillaries (20 ul)	Roche, USA
NADH	Sigma-Aldrich, USA

New 8-OHdG check ELISA kit	Japan institute for the control of aging (JalCA), Japan
Nuclease-free water	Promega, USA
Periodic	Sigma-Aldrich, USA
Picric acid	Mallinckrodt Chemical, USA
QuantiTect SYBR Green PCR kit	Qiagen, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium citrate	Mallinckrodt Chemical, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid	Sigma-Aldrich, USA
SV Total RNA Isolation System	Promega, USA
Trichloroacetic acid	Sigma-Aldrich, USA

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยกลุ่มผู้ป่วยโรคไตได้รับการเจาะเลือดและเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด ศัลยแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่มีก้อนนิ่ว (stone-adjacent area) ขณะทำการผ่าตัด ในกลุ่มควบคุมที่เป็นผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งไตที่เข้ารับการรักษาตัดไตออก (nephrectomy) เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงและเจาะเลือดก่อนการผ่าตัด ศัลยแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตบริเวณที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissue) และบริเวณที่ไม่เป็นมะเร็ง (non-cancerous renal tissue) สำหรับกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
2. ผู้วิจัยซักประวัติและเก็บข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ได้แก่ ชื่อ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ภูมิลำเนา ประวัติการเป็นนิ่วและข้อมูลการเป็นนิ่วในหมู่เครือญาติและประวัติการเป็นโรคอื่นๆ ในระบบทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อประกอบการพิจารณา
3. ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยได้รับการอธิบายให้ทราบถึงวัตถุประสงค์ และรายละเอียดในทุกๆ ด้านของโครงการศึกษาวิจัย รวมทั้งความเสี่ยงและผลตอบแทนที่จะได้รับ พร้อมทั้งลงลายมือชื่อเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ

วิธีการเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยใช้ thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย วัดปริมาณ แบ่งตัวอย่างปัสสาวะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

ปัสสาวะทิ้งก่อนเวลา 7.00 น. (เวลาเริ่มเก็บ) แล้วเริ่มเก็บปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่เตรียมไว้ รวมกันจนครบ 24 ชั่วโมง คือถึงเวลา 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นเป็นครั้งสุดท้าย ในระหว่างเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานอาหารได้ตามปกติ ตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าครีเอตินีน < 0.5 mg/day ถือว่าเก็บปัสสาวะไม่ครบ 24 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือด เก็บบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นตัวอย่างเลือดที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ plasma (ส่วนใส) เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เก็บเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่เข้ารับการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ทางเดินปัสสาวะ (Urologist) เนื้อเยื่อไตที่ได้เก็บไว้ในสารละลาย RNA later (Promega, USA) ทันที เพื่อรักษาคุณภาพและป้องกันการสลายของ RNA ที่อยู่ในเนื้อเยื่อไต เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช้ามคืน แล้วจึงย้ายนำมาเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อบรรจุวิเคราะห์ต่อไป

การเก็บตัวอย่างก้อนนิ่ว

เก็บก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้จากการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ทางเดินปัสสาวะ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เก็บตัวอย่างผงนิ่วที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบรรจุวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวัดสารเพื่อประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การทำลายเซลล์หลอดท่อไต การทำงานของไต และวัดระดับสารอิเลคโตรลิต์ทีในปัสสาวะและในพลาสมา

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีน

การวิเคราะห์ครีเอตินีนในพลาสมาและปัสสาวะใช้หลักการของ Jaffe (48) ซึ่งเป็น Modified picric acid method โดยใช้ปัสสาวะเจือจาง 200 เท่า ทำปฏิกิริยากับ 1.4 N NaOH

และ 0.04 M Picric acid นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เทียบกับค่าครีเอตินีนมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

ค่าดัชนีการขับถ่ายครีเอตินีน (Creatinine clearance, CCr) หรือ Uncorrected CCr สำหรับบ่งชี้การทำงานของไต คำนวณตามสมการด้านล่าง

$$\text{Creatinine Clearance} = \frac{U_{Cr}}{P_{Cr}} \times \frac{\text{Vol}}{24 \times 60} \text{ ml / min}$$

โดยที่ ปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ = U_{Cr} และในเลือด = P_{Cr} และปริมาตรปัสสาวะ = Vol
ค่า Corrected CCr (ml/min/1.73 m²) คือค่า CCr เมื่อปรับขนาดของพื้นที่ผิวร่างกาย (body surface area) ให้เป็นมาตรฐาน คือ เท่ากับ 1.73 m² คำนวณจากสูตรข้างล่าง

$$\text{Body surface area} = \frac{(\text{Body weight (kg)} \times 4) + 7}{90 + \text{Body weight (kg)}}$$

$$\text{Corrected CCr} = \frac{\text{CCr} \times 1.73}{\text{Body surface area}}$$

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะสามารถตรวจได้โดยวิธี Bradford assay โดยอาศัยหลักการ Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) เข้าจับกับโปรตีนที่ตำแหน่งอาร์จินีน (Arginine), Tryptophan, Tyrosine, Histidine และ Phenylalanine แล้วจะเพิ่มค่าการดูดกลืนคลื่นแสงจาก 465 นาโนเมตร เป็น 595 นาโนเมตร เทียบกับโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ทราบค่าความเข้มข้น

1.3 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของเอนไซม์ N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำการหาอันตรกิริยาของเอนไซม์โดยวิธีของ Horak และคณะ โดยนำปัสสาวะมาทำปฏิกิริยากับ 0.9% NaCl และ NAG Substrate นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

1.4 การวิเคราะห์ Malonaldehyde (MDA)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาตกตะกอนด้วยเอทานอล แล้วนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid, Butylhydroxytoluene และ Ferric chloride ทำให้เกิดเป็นสี นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ตามวิธีของ Marshall และคณะ (64)

1.5 การวิเคราะห์ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

ปริมาณ oxidative DNA adduct 8-OHdG ในปัสสาวะ ตรวจวัดโดย competitive in vitro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Japan Institute for the Control of Aging (JalCA), Japan) วิธีการโดยย่อคือ นำปัสสาวะ 50 ไมโครลิตรมาทำปฏิกิริยากับ primary antibody นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ secondary antibody นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ Chromatic Solution: Diluting Solution (1:100) ทิ้งไว้ในที่มืด ประมาณ 15 นาที จนเกิดเป็นสีฟ้าอ่อน จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Reaction Terminating Solution เพื่อหยุดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีเหลือง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader นำค่าที่ได้มาเทียบกับค่า 8-OHdG ที่ใช้เป็นมาตรฐานที่ทราบค่า

1.6 การวิเคราะห์ซีเทรต

ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะตรวจวัดโดยวิธี New Citrate Lyase (SIGMA Kit) นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำปฏิกิริยากับ nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH), Lactate Dehydrogenase (LDH) และ Glycyl-Glycine Buffer ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (OD_1) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Citrate Lyase Enzyme ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (OD_2)

1.7 การวิเคราะห์สารอิเล็กโตรไลต์ที่ในปัสสาวะ (แคลเซียม, ฟอสเฟต, โพแทสเซียม และ แมกนีเซียม)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่แบ่งไว้มาส่งห้องปฏิบัติการ หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจหาสารอิเล็กโตรไลต์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

การคำนวณค่าการขับแมกนีเซียม

ค่าการขับแมกนีเซียมหรือ Fractional excretion of magnesium (%FE-Mg) คำนวณได้โดยสมการด้านล่าง โดย P_{mg} คือปริมาณแมกนีเซียมในพลาสมา P_{Cr} คือปริมาณครีเอตินีนในพลาสมา U_{mg} คือปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และ U_{Cr} คือปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

$$\%FE - Mg = \frac{U_{Mg} / P_{Mg}}{U_{Cr} / P_{Cr}} \times 100\%$$

การวัดระดับ MCP-1, IL-6, และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตโดยวิธี real-time RT-PCR การสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ในเนื้อเยื่อไต

นำเนื้อเยื่อไตของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคนี้ไต และกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไตทั้งสองส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อปกติ (non-cancerous region) และเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous region) ตัดและชั่งเนื้อเยื่อไตประมาณ 20 ไมโครกรัม มาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป SV Total RNA Isolation System Kit (Promega, USA) วิธีการโดยย่อคือ นำชิ้นเนื้อเยื่อไตใส่ลงใน RNA Isolation Buffer (RLB) บดชิ้นเนื้อเยื่อไตให้ละเอียดภายใต้ไนโตรเจนเหลวจนได้สารละลายเนื้อเดียว (homogeneous solution) หลังจากนั้นใส่ RNA Dilution Buffer (RDB) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาส่วนใส่ออกใส่ในหลอดคอลัมน์สำหรับแยกอาร์เอ็นเอ ล้างส่วนใสด้วย 95% ethanol ผสมให้เข้ากันโดยใช้ autopipette ดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย RNA Washer Solution (RWS) แล้วเติม DNase Incubation Mix ลงในคอลัมน์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย DNase Stop Solution ล้างด้วย Wash Solution 2 ครั้ง และขั้นตอนสุดท้ายใช้ Nuclease-free water ชะล้าง (elute) total RNA ออกมาจากคอลัมน์ นำ total RNA ที่ได้มาวัดค่าความเข้มข้นของ RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหาปริมาณอาร์เอ็นเอ ตามสูตรข้างล่าง

$$RNA \text{ concentration } (\mu g / ml) = 40 \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตรควรมีค่ามากกว่า 0.050 และ ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตรควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.7-2.2 นำ total RNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอแม่แบบ (Total RNA template) หรือขั้นตอน Reverse transcription

การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA ใช้ชุดสำเร็จรูป ImProm-IITM-Reverse Transcription System (Promega, USA) วิธีการโดยย่อมีดังนี้ คำนวณค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ตามตารางที่ 3 ขั้นตอนแรกนำ Random Primer ที่มีความเข้มข้น 0.5 μg ผสมกับ Total RNA (100 ng) (ปริมาตรรวม 3 μl) แล้วนำไป denature ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง (chilling)

เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม master mix (17 μ l) การสังเคราะห์ cDNA ใช้สภาวะดังนี้ Annealing ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ Enzyme inactivation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น Hold ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ cDNA ที่ได้มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รอวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

Components	Stock Concentration	Final Concentration/ 1 Reaction
Template and primer mix (3 μ l)		
- Total RNA template		100 ng
- Random Primer	50 μ g	0.5 μ g
Master mix (17 μ l)		
- 5X Reaction Buffer	5X	1X
- MgCl ₂	25 mM	3 mM
- dNTP Mix	10 mM	0.5 mM
- Recombinant RNASin Ribonuclease Inhibitor	20-40 U/ μ l	20 U/ μ l
- Reverse Transcriptase	0.5 μ g/ μ l	0.5 μ g/ μ l
- Nuclease-Free Water		ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 17 μ l
Total volume		20 μ l

ตารางที่ 3. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอ (total RNA) ให้เป็น complementary DNA (cDNA)

การวัดระดับการแสดงออกของยีน MCP-1, IL-6 และ TGF- β โดย real time PCR

นำ cDNA มาทำการตรวจวัดระดับ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA โดย Real time polymerase chain reaction (Real-time PCR) โดยใช้ QIAGEN QuantiTect SYBR Green

PCR Kit (Qiagen, Germany) ซึ่งตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของ PCR โดยใช้หลักการของ Fluorescent Dye SYBR Green ชุด Primers ที่ใช้แสดงในตารางที่ 4

คำนวณค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ตามตารางที่ 5 ในการทำปฏิกิริยาทุกครั้งจะต้องมี negative control เป็นตัวควบคุมความคงที่และแสดงถึงความเชื่อถือในการทำปฏิกิริยาโดยจะใช้ RNase-free water แทน cDNA template ผลการวิเคราะห์ของ negative control ต้องแสดงผลเป็น negative ทุกครั้ง

ขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ PCR โดยใช้เครื่อง Real Time PCR Light Cyclers 2.0 System โดยตั้งโปรแกรมตามตารางที่ 6

Target	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature	Amplicon size
MCP-1	TCAGCCAGATGCAATCAATG	GCTTCTTTGGGACACTTGCT	55°C	120
IL-6	TTCTCCACAAGCGCCTTC	GAAGGCAGCAGGCAACAC	55°C	69
TGF- β	TGGACATCAACGGGTTCAC	GGCCATGAGAAGCAGGAA	55°C	86
B2M	AGGCTATCCAGCGTACTCCA	TCAATGTCGGATGGATGAAA	55°C	112

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลของ primer ที่ใช้ในการศึกษา

Complement Reagent	Volume / 1 Reaction	Final Concentration/ 1 Reaction
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l	1x
cDNA template	2 μ l	
Specific Primer Mix	1 μ l	0.5 nM
RNase-free water	7 μ l	
Total volume	20 μ l	

ตารางที่ 5 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำหรับ real-time PCR

Step	Time	Temperature	Ramp
- PCR Initial activation PCR	15 (min)	65 °C	20 °C/s
Cycling step			
- Denaturation	15 (sec)	94 °C	20 °C/s
- Annealing	20 (sec)	55 °C	20 °C/s
- Extension	25 (sec)	72 °C	2 °C/s
- Detection	5 (sec)	76°C for MCP-1 78 °C for IL-6 78°C for TGF- β 76 °C for B2M	20 °C/s
Melting Curves			
- Denaturation	0 (sec)	95 °C	20 °C/s
- Annealing	15 (sec)	65 °C	2 °C/s
- Melting	0 (sec)	95 °C	0.1 °C/s
Cooling	30 (sec)	40 °C	20 °C/s

ตารางที่ 6 แสดงการตั้งค่าในโปรแกรมสำหรับ real-time PCR

การวิเคราะห์ระดับ mRNA ของ MCP-1, IL-6 และ TGF-β ใช้วิธี relative quantification เป็นการคำนวณอัตราส่วนระหว่างปริมาณของ target molecule กับ reference molecule ภายในสารตัวอย่างเดียวกัน โดย target molecule เป็นการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา คือ MCP-1, IL-6 และ TGF-β และ reference molecule คือ β-2 microglobulin (B2M) ซึ่งระดับของการแสดงออกของ reference molecule จะคงที่แม้จะอยู่ในสภาวะที่แตกต่างกัน

ระดับ relative gene expression แสดงค่าเป็น normalized ratio (NR) โดยค่า NR คำนวณจากสูตร $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (62) การศึกษานี้ใช้ calibrator เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง ค่า Ct (threshold cycle) หรือ Cp (crossing point) ในการศึกษานี้ คือจำนวนรอบที่น้อยที่สุดของ PCR ที่ให้สัญญาณของ SYBR green fluorescence ที่เท่ากัน นั่นคือค่า Cp ต่ำแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนหรือมีระดับ mRNA สูง คำนวณค่า ΔCp และ $\Delta\Delta Cp$ จากสมการ

$$\Delta Cp_{\text{target or calibrator}} = (Cp_{\text{target or calibrator}} - Cp_{\text{reference}})$$

$$\Delta\Delta Cp_{\text{target or calibrator}} = (\Delta Cp_{\text{target or calibrator}} - \Delta Cp_{\text{calibrator}})$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอและเปรียบเทียบข้อมูลตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) โดยใช้ค่าแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง (central tendency) ได้แก่ mean, standard deviation (SD), median, min (ค่าต่ำสุด) และ max (ค่าสูงสุด) และใช้ตารางแจกแจงความถี่และร้อยละ (percentage) สำหรับตัวแปรเป็นกลุ่มๆ (categorical variables) กราฟต่างๆ สร้างโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้สถิติ two-samples t-test และใช้ anova test สำหรับข้อมูลที่มีมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป Mann-Whitney Test และ Kruskal-Wallis test เป็น equivalent tests ของ two-samples t-test และ anova tests ตามลำดับ ซึ่งจะเลือกใช้เมื่อข้อมูลไม่ผ่านข้อตกลงเบื้องต้นของ two-samples t-test และ anova tests เช่น ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (skewed distribution) ความสัมพันธ์ระหว่าง categorical variables ทดสอบโดย chi-square test สำหรับสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างตัวแปร 2 ตัวแปร คำนวณจาก Pearson's correlation test หรือ Spearman's rank correlation test ขึ้นกับการกระจายตัวของข้อมูล

กำหนดระดับมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลคือ Stata/SE 8.0 (College station, TX)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

กลุ่มประชากร

ในการศึกษานี้มีประชากรเข้าร่วมโครงการทั้งหมด 70 ราย (ตารางที่ 7) แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis group) จำนวน 29 ราย กลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี ที่ไม่มีประวัติการเป็นนิ่วและความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ (healthy group) จำนวน 35 ราย และกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ที่ไม่มีประวัติการเป็นนิ่วและความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ (renal cancers group) จำนวน 6 ราย ข้อมูลพื้นฐานและการวินิจฉัยของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต แสดงในตารางที่ 8

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเป็นเพศชาย 9 ราย (ร้อยละ 31.03) เพศหญิง 20 ราย (ร้อยละ 68.97) ค่าเฉลี่ยของอายุเท่ากับ 50.86 ปี มีช่วงอายุตั้งแต่ 31-68 ปี (ตารางที่ 7) กลุ่มผู้มีสุขภาพดีแบ่งเป็นเพศชาย 14 ราย (ร้อยละ 40) เพศหญิง 21 ราย (ร้อยละ 60) ค่าเฉลี่ยของอายุเท่ากับ 38.60 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 21-59 ปี และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไตแบ่งเป็นเพศชาย 2 ราย (ร้อยละ 33.33) เพศหญิง 4 ราย (ร้อยละ 66.67) ค่าเฉลี่ยของอายุเท่ากับ 64.50 ปี มีช่วงอายุตั้งแต่ 48-97 ปี ค่าเฉลี่ยของดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มผู้มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต เท่ากับ 23.30, 23.08 และ 21.28 kg/m² ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มผู้มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต เท่ากับ 2114, 1931 และ 1490 มิลลิลิตร ตามลำดับ ระดับของครีเอตินีนในปัสสาวะของ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มผู้มีสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.009) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.96, 1.11 และ 0.56 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มผู้มีสุขภาพดี (Healthy)	กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Nephrolithiasis)	กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Renal cancers)	P value
จำนวนประชากรศึกษา (n)	35	29	6	
เพศ (ชาย : หญิง)	14 : 21	9 : 20	2 : 4	
อายุ (Mean : SD) (Median : Min-Max)	38.60 : 11.44 40 : 21-59	50.86 : 11.20 51 : 31-68	64.5 : 18.26 60 : 48-97	0.0001*
BMI (Mean : SD) (Median : Min-Max)	23.30 : 3.03 21.88 : 18.26-31.11	23.08 : 2.54 23.32 : 16.82-26.84	21.28 : 4.92 21.28 : 16.23-28.89	0.318
24-hr urine volume (ml) Mean : SD (Median : Min-Max)	1931 : 740 1840 : 720-3870	2114 : 869 2050 : 600-4200	1490 : 388 1365 : 1060-2200	0.457
Creatinine (g/day) Mean : SD (Median : Min-Max)	1.11 : 0.40 1.03 : 0.59-1.89	0.96 : 0.27 0.95 : 0.46-1.43	0.56 : 0.30 0.69 : 0.09-0.85	0.009*

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรศึกษา (* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ Kruskal-Wallis, $P < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Code	Age	Sex	Diagnosis & Pathology	Stage	Operation	Co-morbidity
NKT-09	48	Female	Renal cell carcinoma, except renal pelvis Rt. RCC, Malignant neoplasm of kidney except renal pelvis, free margin, ureter invasion	3	Right radical Nephroureterectomy	Hypoosmolality Hyponatremia
NKT-05	97	Female	TCC at lower pole Rt. kidney Low-grade papillary urothelial carcinoma of renal pelvis Presense of tumor invading renal parenchyma. Free ureteric and vascular resected margins chronic pyelonephritis	2	Cystoscope and Bilateral RP and Laparoscopic nephrectomy	Hypertension Hyponatremia
NKT-06	64	Male	High grade urothelial cell carcinoma with squamous differentiation. Invade perinphric soft tissue & renal parenchyma. Malignant neoplasma of kidney bone matastasis	5	Lt nephroureterectomy LN dissection	Secondary malignant neoplasm of other and unspecified respiratory
NKT-07	72	Male	Malignant neoplasm of kidney except renal pelvis, unclassified renal cell carcinoma versus collecting duct type renal cell carcinoma sarcomatoid change renal capsule. Renal cell carcinoma with multiple matastasis	2	Transfusion of packed computerized axial tomographyl of head	Secondary malignant neoplasm of lung / brain and cerebral meninges
NKT-08	50	Female	Mucinus Adeno carcinoma at Renal Pelvis	2	Left nephrectomy	
NKT-04	56	Female	Renal cyst (Lower pole Rt. kidney)	2	Right nephrectomy	

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลพื้นฐานและการวินิจฉัยของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (renal cancer group)

การศึกษาภาวะการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น

การศึกษานี้ใช้ตัวบ่งชี้ (marker) สำหรับภาวะการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไต คือ N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity และโปรตีนไนปีสสาวะ และตัวบ่งชี้สำหรับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นคือ malondialdehyde (MDA) และ 8'-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

ผลการศึกษา พบว่าระดับของ NAG activity ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.003$) สอดคล้องกับระดับโปรตีนในปัสสาวะที่พบสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี ($P<0.001$) (ตารางที่ 9) ระดับผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation product, MDA) ในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) เช่นเดียวกับระดับผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ (oxidative DNA damage product, 8-OHdG) ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) (ตารางที่ 9) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติ

Urinary markers	Disease status		P value
	Healthy (n = 35)	Nephrolithiasis (n = 29)	
NAG activity (U/g Cr)			0.003*
Mean : SD	3.23 : 1.71	8.19 : 6.52	
Median : Min-Max	3.02 : 0.59 - 8.81	5.32 : 0 - 23.83	
Proteins (g/day)			<0.001*
Mean : SD	0.10 : 0.04	0.29 : 0.21	
Median : Min-Max	0.08 : 0.05-0.20	0.28 : 0.01-0.87	
MDA ($\mu\text{mol/g Cr}$)			<0.001*
Mean : SD	3.83 : 3.64	6.23 : 1.37	
Median : Min-Max	3.72 : 0.15 – 20.69	3.23 : 4.15 – 9.73	
8-OHdG ($\mu\text{g/g Cr}$)			<0.001*
Mean : SD	6.06 : 3.94	29.25 : 25.92	
Median : Min-Max	4.56 : 1.56 - 21.67	23.53 : 3.02 - 137.21	

ตารางที่ 9 แสดงระดับของตัวบ่งชี้ของภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชันเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (*=มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test, $P<0.05$)

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต และผู้ป่วยโรคมะเร็งไต

การศึกษานี้วัดปริมาณ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไต โดยวิธี real time RT-PCR โดยใช้ B2M เป็น internal control หรือ internal reference ค่า Cp และ normalized ratio (NR) ของระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต และผู้ป่วยโรคมะเร็งไต แสดงในตารางที่ 10 และตารางที่ 11 ตามลำดับ

ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต ค่า median Cp ของ MCP-1 เท่ากับ 23.07 มี range ตั้งแต่ 20.56 – 27.02 ค่า median normalized ratio ของ MCP-1 เท่ากับ 0.30 โดยมี range ตั้งแต่ 0.05 – 1.65 ค่า median Cp ของ IL-6 เท่ากับ 28.46 โดยมี range ตั้งแต่ 22.04 – 33.63 ค่า median normalized ratio ของ IL-6 เท่ากับ 0.1 มี range ตั้งแต่ 0.01 – 24.49 สำหรับ TGF- β มี median Cp เท่ากับ 22.90 โดยมี range ตั้งแต่ 22.10 – 27.75 และมีค่า median normalized ratio เท่ากับ 1.74 โดยมี range ตั้งแต่ 0.01 – 5.88 (ตารางที่ 10)

ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต วัดปริมาณการแสดงออกของยีนทั้งในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissue) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissue) พบว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง ค่า median Cp ของ MCP-1 เท่ากับ 22.12 โดยมี range ตั้งแต่ 20.24 – 23.93 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 0.68 มี range ตั้งแต่ 0.24 – 1.78 ค่า median Cp ของ IL-6 เท่ากับ 25.55 โดยมี range ตั้งแต่ 24.90 – 28.90 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 1.54 มี range ตั้งแต่ 0.31 – 5.10 และค่า median Cp ของ TGF- β เท่ากับ 22.52 มี range ระหว่าง 22.12 – 23.93 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 1.67 โดยมี range อยู่ระหว่าง 1.00 – 2.63 (ตารางที่ 11)

ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง ค่า median Cp ของ MCP-1 เท่ากับ 20.90 โดยมี range ตั้งแต่ 9.21 – 32.47 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 0.91 มี range อยู่ระหว่าง 0.35 – 1.54 ค่า median Cp ของ IL-6 เท่ากับ 23.47 โดยมี range ตั้งแต่ 21.57 – 33.04 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 7.89 โดยมี range ตั้งแต่ 0.68 – 33.52 สำหรับค่า median Cp ของ TGF- β เท่ากับ 22.52 โดยมี range ตั้งแต่ 22.12 – 23.93 ค่า median normalized ratio เท่ากับ 1.67 มี range ตั้งแต่ 1.00 – 2.63 (ตารางที่ 11)

Case	B2M	MCP-1		IL-6		TGF- β	
	Cp	Cp	NR	Cp	NR	Cp	NR
RKT-01	21.71	27.02	0.98	29.49	7.30	26.89	5.88
RKT-02	16.70	23.57	0.47	30.98	0.11	27.75	0.15
RKT-03	15.50	23.50	0.21	32.65	0.01	23.51	1.23
RKT-04	15.58	21.85	0.89	25.03	2.28	22.70	1.53
RKT-05	15.46	22.38	1.00	27.83	0.30	22.10	2.13
RKT-07	15.98	24.74	0.13	31.32	0.05	23.49	1.75
RKT-08	16.87	23.92	0.29	27.63	0.92	23.36	2.37
RKT-09	15.19	21.91	0.52	27.66	0.38	22.96	1.46
RKT-10	16.74	23.07	0.48	25.07	4.97	22.20	4.82
RKT-11	17.29	25.73	0.16	31.08	0.15	24.24	2.56
RKT-12	16.01	20.56	1.65	22.04	24.49	22.65	2.15
RKT-13	16.02	23.53	0.30	30.92	0.07	23.03	2.47
RKT-14	16.03	22.77	0.51	28.46	0.39	22.66	0.01
RKT-15	15.96	22.83	0.47	30.33	0.10	22.68	3.00
RKT-16	16.89	22.78	0.66	25.10	5.42	22.18	5.47
RKT-17	16.27	22.27	0.63	24.83	3.23	22.90	2.16
RKT-18	15.93	23.53	0.21	31.18	0.03	23.04	1.54
RKT-19	16.98	23.60	0.41	26.97	1.20	24.52	1.15
RKT-20	15.27	24.82	0.05	31.00	0.02	22.38	1.55
RKT-21	17.18	25.17	0.16	33.63	0.01	24.22	1.63
RKT-22	17.34	25.81	0.11	33.33	0.02	24.29	1.74
RKT-23	15.87	23.57	0.19	29.84	0.08	22.72	1.86
RKT-24	17.00	24.99	0.16	32.58	0.02	23.53	2.32
RKT-25	16.67	23.17	0.44	31.41	0.04	23.13	2.43
RKT-26	15.08	22.86	0.18	30.84	0.02	23.42	0.66
RKT-27	16.58	21.57	1.26	27.09	0.84	22.18	4.4
RKT-28	16.25	22.97	0.38	25.34	2.24	23.24	1.68
RKT-30	15.33	23.73	0.12	29.97	0.05	22.7	1.29
RKT-31	16.48	23.02	0.43	26.93	0.88	22.36	3.64
Mean	16.25	23.49	0.46	28.98	1.92	23.35	2.24
SD	1.21	1.39	0.38	2.98	4.73	1.29	1.42
Median	16.25	23.07	0.30	28.46	0.1	22.90	1.74
Min-Max	15.08-21.71	20.56-27.02	0.05-1.65	22.04-33.63	0.01-24.49	22.10-27.75	0.01-5.88

ตารางที่ 10 แสดงค่า Cp และค่า Normalized ratio (NR) ของระดับการแสดงออกของ B2M, MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (stone-adjacent renal tissues)

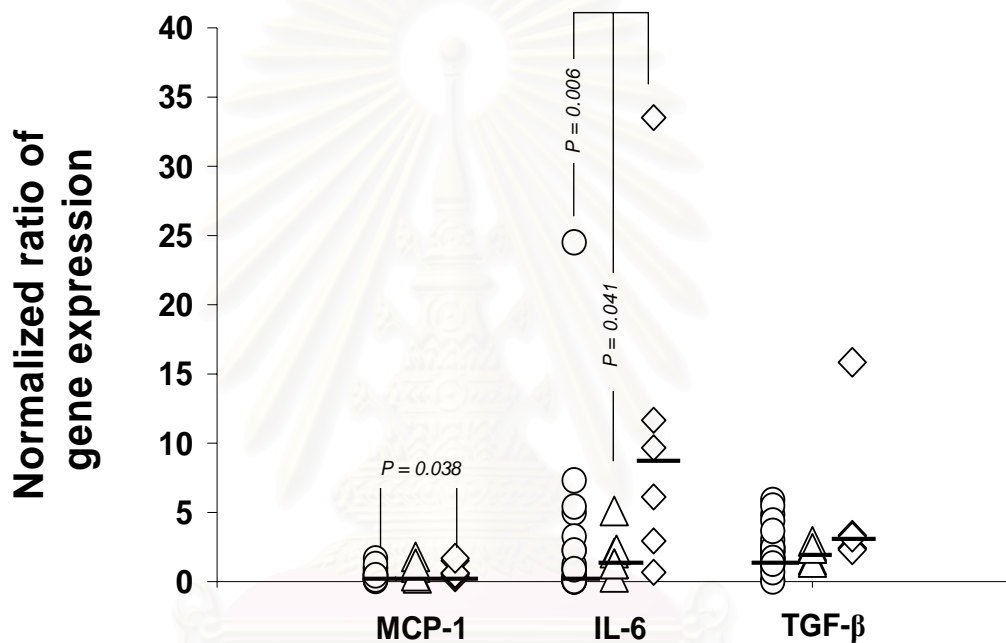
Case	B2M		MCP-1		IL-6		TGF- β	
	Cp	Cp	NR	Cp	NR	Cp	NR	
<u>Non-cancerous renal tissues</u>								
NKT-04	16.61	23.93	0.24	24.90	5.10	23.69	1.57	
NKT-05	15.30	20.24	1.78	25.34	2.07	22.25	2.57	
NKT-06	16.31	21.85	0.83	25.75	2.29	22.65	2.63	
NKT-07	14.41	22.38	1.00	25.24	1.00	22.38	1.00	
NKT-08	15.10	21.29	0.53	26.56	0.57	22.12	1.64	
NKT-09	16.57	23.22	0.39	28.90	0.31	23.55	1.70	
Mean	15.72	22.15	0.79	26.12	1.89	22.77	1.85	
SD	0.91	1.33	0.56	1.48	1.76	0.68	0.63	
Median	15.81	22.12	0.68	25.55	1.54	22.52	1.67	
Min-Max	14.41-16.61	20.24-23.93	0.24-1.78	24.90-28.90	0.31-5.10	22.12-23.93	1.00-2.63	
<u>Cancerous renal tissues</u>								
NKT-04	25.66	32.47	0.35	33.04	9.65	31.66	3.34	
NKT-05	13.58	18.73	1.54	23.11	2.95	20.61	2.43	
NKT-06	15.79	20.97	1.06	23.82	6.12	22.49	2.05	
NKT-07	14.03	9.21	1.50	21.57	11.67	21.09	2.37	
NKT-08	14.71	20.82	0.56	25.92	0.68	20.88	2.95	
NKT-09	16.95	22.63	0.75	22.53	33.52	20.70	15.84	
Mean	16.79	20.81	0.96	25.00	10.77	22.91	4.83	
SD	4.52	7.46	0.49	4.20	11.87	4.34	5.41	
Median	15.25	20.90	0.91	23.47	7.89	20.99	2.69	
Min-Max	13.58-25.66	9.21-32.47	0.35-1.54	21.57-33.04	0.68-33.52	20.61-31.66	2.05-15.84	

ตารางที่ 11 แสดงค่า Cp และค่า Normalized ratio (NR) ของระดับการแสดงออกของ B2M, MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissue) และ เนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissue) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ระหว่างในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตและผู้ป่วยโรคมะเร็งไต

เปรียบเทียบระดับของ MCP-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไต พบว่าค่า normalized ratio ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (median (min:max): 0.91(0.35:1.54)) สูงกว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต (median(min:max): 0.30(0.05:1.65)) อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.038) (รูปที่ 6) เช่นเดียวกับระดับของ IL-6 mRNA ค่า normalized ratio ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (median(min:max): 7.89(0.68:33.52)) สูงกว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง

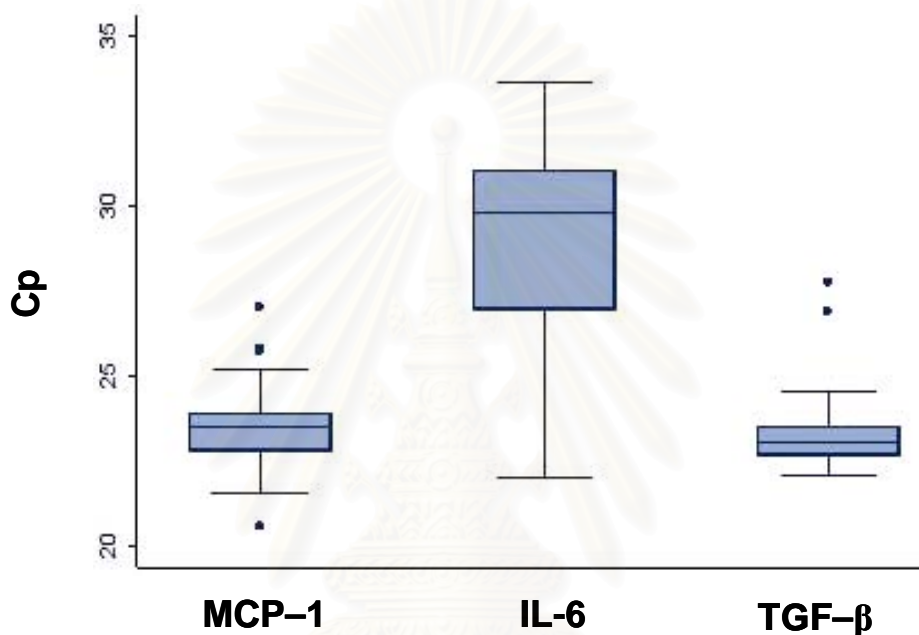
(median(min:max): 1.54(0.31:5.10)) ($P=0.041$) และสูงกว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต (median(min:max): 0.10(0.01:24.49)) อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.006$) สำหรับระดับของ TGF- β mRNA ค่า normalized ratio ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (median(min:max): 2.69(2.05:15.84)) มีการแสดงออกสูงกว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต (median(min:max): 1.74(0.01:5.88)) และในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (median(min:max): 1.67(1.00:2.63)) ตามลำดับ แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไตและผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (○ : เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต, △ : เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง, ◇ : เนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง, — : แสดงค่า median, ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ Bonferroni test)

ผลการวิเคราะห์ความสำคัญทางคลินิกของการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

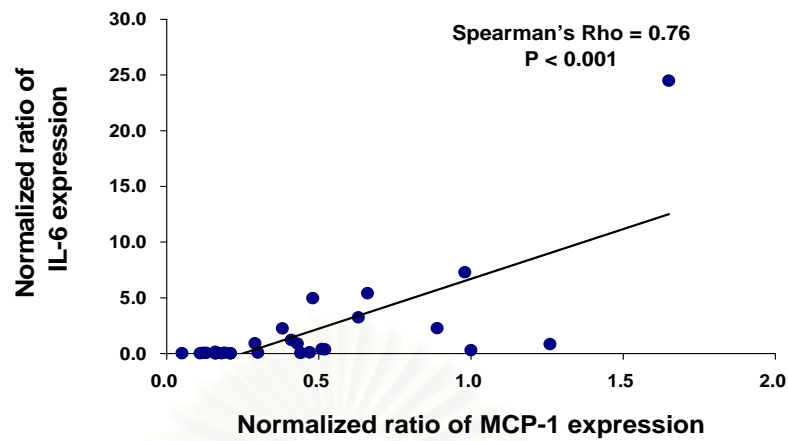
เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต พบว่า ค่า Crossing point (Cp) ของ IL-6 (median=28.46) สูงกว่าค่า Cp ของ MCP-1 (median=23.07) และ TGF- β (median=22.90) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ดังรูปที่ 7



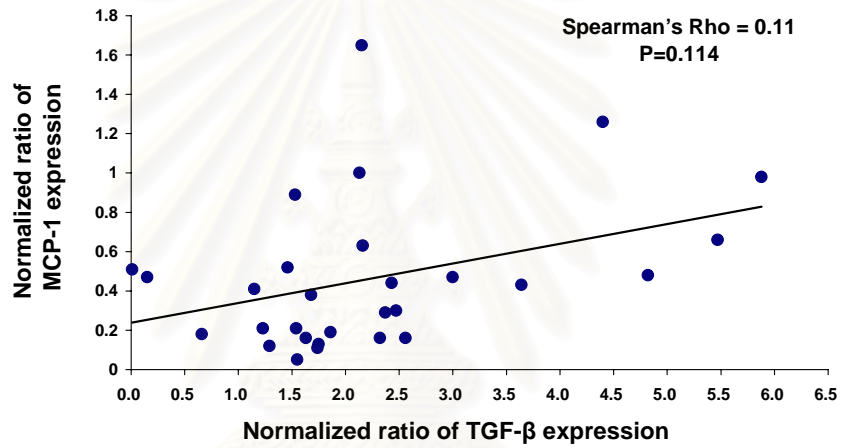
รูปที่ 7 กราฟแสดงค่า Crossing point (Cp) เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1 กับ IL-6 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตพบว่าระดับของ MCP-1 mRNA มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับของ IL-6 mRNA อย่างมีนัยสำคัญ (Spearman's Rho = 0.76, $P < 0.001$) (รูปที่ 8ก) พบแนวโน้มการแสดงออกของ MCP-1 สัมพันธ์กับ TGF- β ในเนื้อเยื่อไต แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ (Spearman's Rho = 0.113, $P = 0.114$) (รูปที่ 8ข) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ IL-6 และ TGF- β พบว่า ระดับของ IL-6 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับของ TGF- β mRNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Spearman's Rho = 0.39, $P = 0.033$) (รูปที่ 8ค)

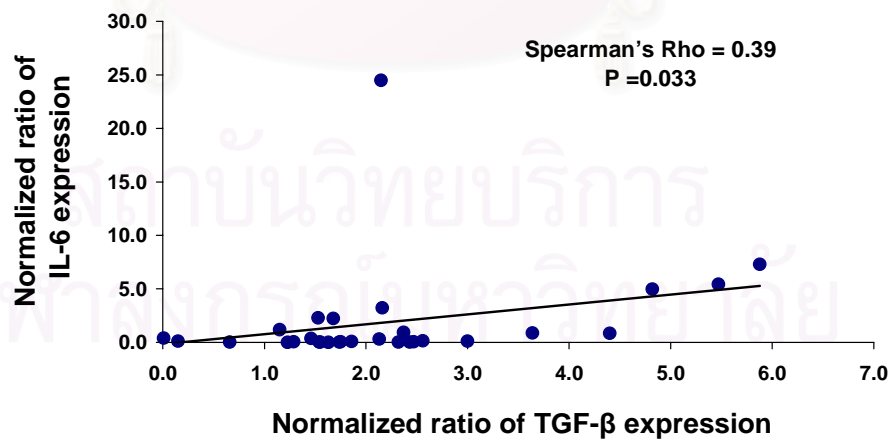
ก



ข



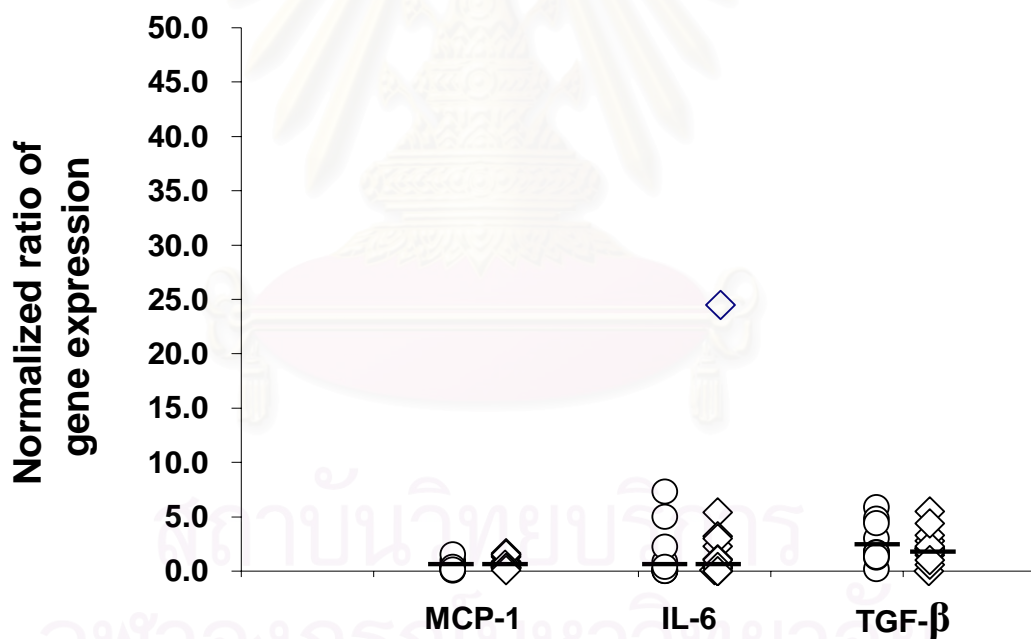
ค



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF-β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตไต ก: MCP-1 vs. IL-6, ข: MCP-1 vs. TGF-β , ค: IL-6 vs. TGF-β

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะกับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

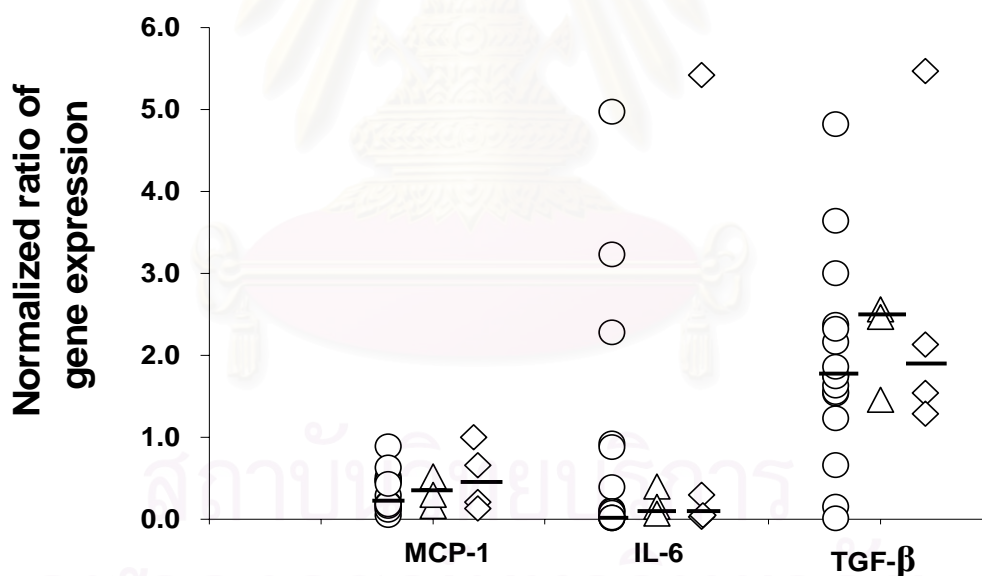
แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไต (n=29) ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่พบสัญญาณการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (infection group) จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 62.07) และกลุ่มที่ไม่พบสัญญาณการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (non-infection group) จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 37.93) กลุ่ม infection มีค่า median NR (min:max) ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β เท่ากับ 0.42 (0.16:1.65), 0.34 (0.01:24.49) และ 2.14 (0.01:5.47) ตามลำดับ สำหรับกลุ่ม non-infection ค่า median NR (min:max) ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β เท่ากับ 0.38 (0.05:1.26), 0.10 (0.01:7.3) และ 1.74 (0.15:5.88) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตระหว่างกลุ่ม infection และ non-infection พบว่า ระดับ mRNA ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P_{MCP-1} = 0.380$, $P_{IL-6} = 0.233$, $P_{TGF-\beta} = 0.893$) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะกับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต (○ : non-infection group, ◇ : infection group, — : แสดงค่า median, ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney test)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของนิ่วและการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ผลการวิเคราะห์ชนิดของนิ่ว ที่เก็บจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมด 23 ราย พบว่าเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลेट (CaOx) จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 69.57) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 13.04) และนิ่วกรดยูริก (UA) จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 17.39) นิ่วแคลเซียมออกซาลेट มีค่า median NR (min:max) ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β เท่ากับ 0.25(0.05:0.89), 0.09(0.01:4.97) และ 1.75(0.01:4.82) ตามลำดับ นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต มีค่า median NR (min:max) ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β เท่ากับ 0.30(0.16:0.52), 0.15(0.07:0.38) และ 2.47(1.46:2.56) ตามลำดับ และนิ่วกรดยูริก มีค่า median NR (min:max) ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β 0.44(0.12:1.00), 0.18(0.03:5.42) และ 1.84(1.29:5.47) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตระหว่างกลุ่มนิ่วแต่ละชนิด พบว่า ระดับ mRNA ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P_{MCP-1} = 0.531$, $P_{IL-6} = 0.603$, $P_{TGF-\beta} = 0.627$ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟแสดงการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เปรียบเทียบระหว่างชนิดของก้อนนิ่ว (○ : นิ่วแคลเซียมออกซาลेट, △ : นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต, ◇ : นิ่วกรดยูริก, — : แสดงค่า median)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β กับประสิทธิภาพการทำงานของไตและภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มไตในผู้ป่วยโรคไต

การศึกษานี้ใช้ตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต 2 กลุ่มคือ ตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไตของโกลเมอรูลัส (glomerular function) หรือบ่งบอกปริมาณเลือดที่ไหลผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular filtration rate) ได้แก่ uncorrected creatinine clearance (CCr) และ corrected CCr และตัวบ่งชี้การทำงานของท่อไต (renal tubular function) ได้แก่ urinary NAG activity, urinary proteins และค่าการขับออกของแมกนีเซียม (fraction excretion of magnesium, %FE-Mg) ตารางที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต โดยใช้ Spearman's rank correlation test

พบแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ MCP-1 mRNA กับค่า Uncorrected CCr (Spearman's Rho = -0.27, P = 0.15) และค่า Corrected CCr (Spearman's Rho = -0.33, P = 0.083) ในทำนองเดียวกันพบแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ IL-6 mRNA กับ ค่า Uncorrected CCr (Spearman's Rho = -0.32, P = 0.09) และค่า Corrected CCr (Spearman's Rho = -0.33, P = 0.09) สำหรับระดับ TGF- β mRNA ไม่พบความสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไตใด ๆ

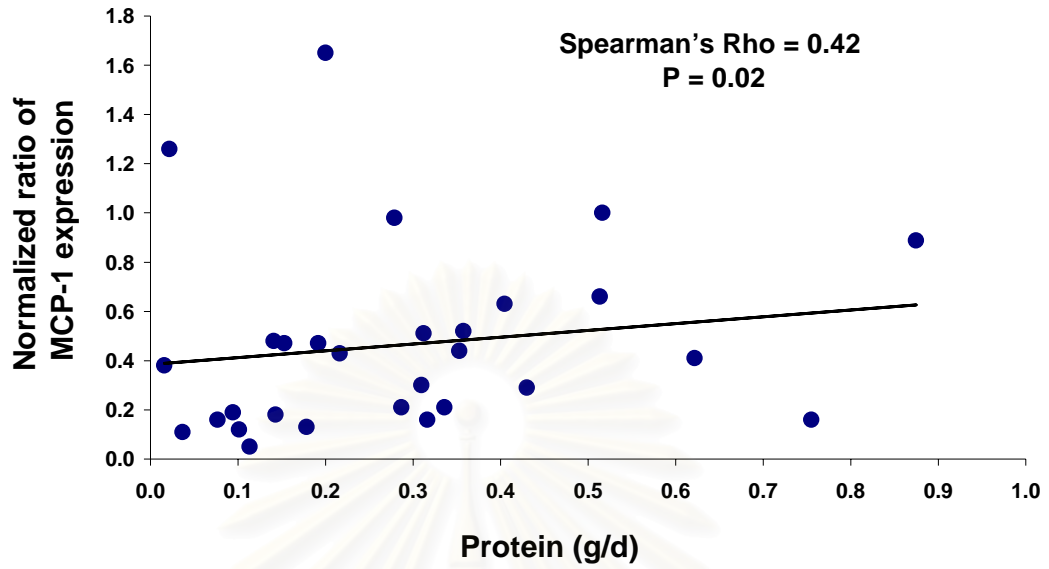
ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ mRNA ของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β กับภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มไตในผู้ป่วยโรคไต พบว่า การแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตนั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (Spearman's Rho = 0.42, P = 0.02) (รูปที่ 11ก) และระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ (Spearman's Rho = 0.37, P = 0.04) (รูปที่ 11ข) อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของ IL-6 mRNA ในเนื้อเยื่อไตมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (Spearman's Rho = 0.42, P = 0.02) (รูปที่ 12ก) และระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ (Spearman's Rho = 0.45, P = 0.01) (รูปที่ 12ข) อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตกับภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มไตอย่างมีนัยสำคัญ

Renal function indicators	Spearman's Rho		
	MCP-1	IL-6	TGF- β
Uncorrected CCr (ml/min)	-0.27	-0.32	-0.08
Corrected CCr (ml/mim/1.73 m ²)	-0.33	-0.33	-0.03
Urinary NAG activity (U/day)	0.37*	0.45*	0.31
Urinary proteins (g/day)	0.42*	0.42*	0.16
%FE-Mg	0.012	0.012	0.13

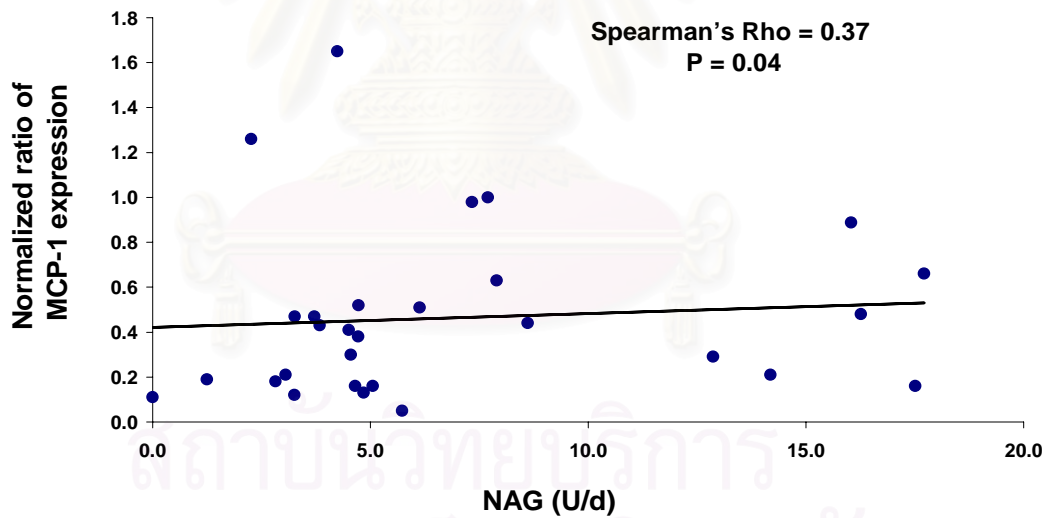
ตารางที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต (Spearman's rank correlation test, *: P < 0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการระดับแสดงออกของ MCP-1 mRNA กับปริมาณการขับออกของโปรตีนและระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ ก: MCP-1 mRNA vs. urinary proteins, ข: MCP-1 mRNA vs. urinary NAG activity

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มผู้ป่วยโรคไต

ตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ MDA และ 8-OHdG ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน แสดงในตารางที่ 15 ซึ่งการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA กับปริมาณการขับออกของ MDA และ 8-OHdG ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต

Oxidative stress markers	Spearman's Rho		
	MCP-1	IL-6	TGF- β
Urinary MDA (U/day)	-0.10	0.04	0.06
Urinary 8-OHdG (μ g/g Cr)	-0.06	0.18	0.14

ตารางที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Spearman's rank correlation test, $P > 0.05$)

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไตตามระดับความเสื่อมของไต ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีค่า corrected CCr > 50 ml/min/1.73m² (preserved renal function group) จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 62.07) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีค่า corrected CCr ≤ 50 ml/min/1.73m² (compromised renal function group) จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 37.93) พบว่าระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ในกลุ่ม preserved renal function ต่ำกว่ากลุ่ม compromised renal function อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การแสดงออกของ TGF- β ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P_{MCP-1} = 0.023$, $P_{IL-6} = 0.041$ และ $P_{TGF-\beta} = 0.369$) ดังแสดงในตารางที่ 14

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามระดับการทำลายเซลล์บุท่อไต ออกเป็น กลุ่มที่มีระดับ urinary NAG activity > 5.23 U/day จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 48.28) และกลุ่มที่มีระดับ urinary NAG activity ≤ 5.23 U/day จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 51.72) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ urinary NAG activity สูงมีการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ urinary NAG activity ต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การแสดงออกของ TGF- β ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($P_{MCP-1} = 0.005$, $P_{IL-6} = 0.012$ และ $P_{TGF-\beta} = 0.190$) และไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β อย่างมีนัยสำคัญเมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามค่า %FE-Mg ($P_{MCP-1} = 0.312$, $P_{IL-6} = 0.236$ และ $P_{TGF-\beta} = 0.603$) (ตารางที่ 14)

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตตามระดับความเครียดจากออกซิเดชั่นออกเป็น กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูง (urinary 8-OHdG > 23.53) จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 48.28) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นต่ำ (urinary 8-OHdG \leq 23.53) จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 51.72) พบว่าระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($P_{MCP-1} = 0.983$, $P_{IL-6} = 0.189$ และ $P_{TGF-\beta} = 0.694$) (ตารางที่ 14)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Patient's category	Number (n = 29)	Normalized ratio of gene expression median (min:max)		
		MCP-1	IL-6	TGF- β
Renal dysfunction				
- Preserved renal function (corrected CCr > 50 ml/min/1.73m ²)	18(62.07%)	0.25(0.05:1.26)*	0.09(0.01:5.42)*	1.75(0.01:5.47)
- Compromised renal function (corrected CCr \leq 50 ml/min/1.73m ²)	11(37.93%)	0.48(0.18:1.65)	2.24(0.02:24.49)	2.15(0.66:5.88)
Renal tubular injury				
- Low (urinary NAG activity \leq 5.23)	15(51.72%)	0.19(0.05:1.26)*	0.07(0.01:2.24)*	1.68(0.66:4.40)
- High (urinary NAG activity >5.23)	14(48.27%)	0.49(0.16:1.65)	0.90(0.02:24.49)	2.24(0.01:5.88)
- Normal %FE-Mg (\leq 2.2%)	5(17.24%)	0.48(0.21:0.98)	1.20(0.01:7.30)	1.23(0.01:5.88)
- Abnormal %FE-Mg (> 2.2%)	24(82.76%)	0.34(0.05:1.65)	0.11(0.01:24.49)	1.99(0.15:5.47)
Oxidative stress status				
- Low (8-OHdG \leq 23.53)	15(51.71%)	0.44(0.11:1.26)	0.1(0.01:7.30)	1.74(0.15:5.88)
- High (8-OHdG >23.53)	14(48.28%)	0.36(0.05:1.65)	0.64(0.02:24.49)	2.16(0.01:5.47)

ตารางที่ 14 ระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต แบ่งกลุ่มตามระดับความเสื่อมของไต ภาวะการทำลายท่อไต และระดับความเครียดจากออกซิเดชั่น (Mann-Whitney test, *: P < 0.05)

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์ที่สามารถสรุปได้ว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณการขับออกของโปรตีนและ NAG activity ในปัสสาวะสูงกว่าในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มไต และภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่ากลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี

จากการศึกษาการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต (stone-adjacent renal tissue) เปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissue) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissues) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตพบว่าการแสดงออกของ MCP-1 ใน cancerous renal tissues สูงกว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ระดับการแสดงออกของ IL-6 ใน cancerous renal tissues สูงกว่าทั้งใน non-cancerous renal tissue และในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับ TGF- β ไม่พบความแตกต่างของระดับ TGF- β mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตทั้ง 3 กลุ่ม ระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตสูงกว่า IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ

ระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง และภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มไตที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคไต โดยพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่มี preserved renal function (corrected CCr > 50 ml/min/1.73m²) มีระดับของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ต่ำกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่มี compromised renal function (corrected CCr \leq 50 ml/min/1.73m²) อย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่มีระดับ urinary NAG activity สูง (> 5.23 U/day) มีระดับของ MCP-1 และ IL-6 mRNA สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่มีระดับ urinary NAG activity ต่ำ (\leq 5.23 U/day) อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มผู้ป่วยโรคไต และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของทั้ง 3 ยีน กับชนิดของนิ่วและภาวะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

อภิปรายผลการวิจัย

ภาวะการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

มีหลายรายงานการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับของเอ็นไซม์ N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG), lactate dehydrogenase (LDH) และ malondialdehyde (MDA) ในปีสภาวะสูงกว่าคนปกติ ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีภาวะการทำลายของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง และจากการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ชนิดแคลเซียมออกซาลาเลตกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า ผลิตภัณฑ์สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสารที่เป็นอนุมูลเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้เซลล์เยื่อหุ้มท่อไตเกิดการบาดเจ็บและถูกทำลาย (7) เป็นผลให้มีการหลั่งเอ็นไซม์ในไซโตพลาสซึมและสารต่างๆ ที่อยู่ในเซลล์ออกมาในปีสภาวะมากขึ้น

ภาวะการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตที่เกิดจากการเสียดสีระหว่างก้อนนิ่วกับเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต ทำให้เซลล์เกิดการหลุดลอก (33-34) และเซลล์ที่หลุดลอกออกมาจะทำให้เกิดการเกาะกันของผลิตภัณฑ์มากขึ้น ในงานวิจัยนี้พบว่าระดับโปรตีนและ NAG activity ที่ขับออกมาในปีสภาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตเกิดภาวะการบาดเจ็บที่เซลล์เยื่อหุ้มท่อไตมากกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดี ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (12,14, 35)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) หมายถึงภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ เซลล์มีสารอนุมูลอิสระมากขึ้นนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ในการศึกษานี้ได้ทำการวัดปริมาณตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation และ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของดีเอ็นเอ พบว่าระดับของ MDA และ 8-OHdG ที่ขับออกมาในปีสภาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตสูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (33-34)

การแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ระดับการแสดงออกของ TGF- β กับ MCP-1 มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่า IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่าไนไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตน่าจะเกิดกระบวนการอักเสบและมีการซ่อมแซมบาดแผลขึ้น อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ยีน ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (stone-adjacent renal tissue) ใกล้เคียงกับการแสดงออกใน non-cancerous renal tissue แต่ต่ำกว่าใน cancerous renal tissue ของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต แสดงว่าใน stone-adjacent renal tissue ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับการอักเสบต่ำกว่าใน cancerous renal tissue ของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต

การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นนิ่ว (experimental nephrolithiasis) พบการติดค้าง (deposit) ของผลึกนิ่วใน renal interstitium ซึ่งถูกห้อมล้อมด้วยเม็ดเลือดขาวทั้ง monocytes, macrophages และ polymorphonuclear leukocytes ปริมาณมาก (36) Khan และคณะ เสนอว่า inflammatory response เป็นการตอบสนองที่มีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการเกิดนิ่วไต การศึกษาใน cell culture model พบว่า ทั้ง oxalate ions และผลึกของ CaOx, CaP และ UA สามารถกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไต (renal epithelial cells) สร้าง MCP-1 เพิ่มขึ้นได้ โดย MCP-1 น่าจะมีบทบาทในการชักนำ (attract) เซลล์จำพวก monocytes และ macrophages เข้ามาช่วยเก็บกินและกำจัดผลึกนิ่วที่อยู่ใน renal interstitium เนื่องจากมีหลักฐานว่าเซลล์ macrophages สามารถจับกินและย่อยผลึก calcium oxalate ได้ (37)

มีรายงานว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ IL-6 ในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ โดยที่ปริมาณ IL-6 ที่สูงขึ้นไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (38) สอดคล้องกับผลการศึกษาในที่นี้ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β กับภาวะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (รูปที่ 8)

การศึกษาใน experimental hyperoxaluria โดยเลี้ยงหนูด้วย ethylene-glycol พบมี crystal deposit ใน renal interstitium มี infiltration ของ ED1 positive cells (monocytes/macrophages) ปริมาณมากในบริเวณที่พบก้อนผลึก และพบการแสดงออกของ IL-6, MCP-1 และ RANTES เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาใน cell culture model พบว่า เซลล์เยื่อบุท่อไตของมนุษย์ (HK-2 cell) สังเคราะห์ IL-6 มากขึ้นทั้งระดับ mRNA และระดับโปรตีน เมื่อถูกกระตุ้นด้วย oxalate หลักฐานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า MCP-1 และ IL-6 มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารตัวกลางของการอักเสบในพยาธิกำเนิดของโรคนิ่วไต ผลการศึกษานี้ยืนยันใน human tissue ว่า MCP-1 และ IL-6 ถูกสังเคราะห์ขึ้นในไตที่มีก้อนนิ่วอยู่ (stone-containing kidney) อย่างไรก็ตามพบว่าในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีการแสดงออกของ MCP-1 สูงกว่า IL-6

อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า IL-6 น่าจะมีบทบาทในกระบวนการอักเสบในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้น้อยกว่า MCP-1

การศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 mRNA ใน renal cell carcinoma (RCC) tissue เปรียบเทียบกับ tumor-free tissue ที่ได้จากตัวอย่าง nephrectomy specimen เดียวกัน พบว่าระดับของ MCP-1 mRNA ใน carcinoma tissue เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ tumor-free tissue (59) โดยพบ MCP-1 mRNA ได้ใน tumor cells, microvessel endothelia และ tumor-associated macrophages ดังนั้น MCP-1 มีหน้าที่สำคัญสำหรับการเหนี่ยวนำกระบวนการ immune response ใน RCC ในการศึกษานี้ได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น โดยพบการแสดงออกของ MCP-1 ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งไตสูงกว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง

ในปี 2001 Colin และคณะทำการศึกษาการแสดงออกของ IL-6 ใน primary renal cell carcinoma พบว่ามีการแสดงออกของ IL-6 มากขึ้นในผู้ป่วย RCC (39) และการศึกษาใน cell line พบว่า IL-6 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเพิ่มปริมาณเซลล์ (cell proliferation) ของ RCC cell line (39) ดังนั้นเชื่อว่าหน้าที่ของ IL-6 ใน RCC คือเป็น autocrine growth factor โดยกระตุ้น cell proliferation อาจเป็นไปได้ว่า IL-6 ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้น่าจะมีบทบาทในการกระตุ้น renal cell proliferation เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายและหลุดลอกไป ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

มีรายงานศึกษาบทบาทของ TGF- β ในกระบวนการซ่อมแซมในไต พบว่าในสภาวะปกติมีการแสดงออกของ TGF- β ใน glomeruli และ renal tubules โดยสร้างจากเซลล์จำพวก mesangial cells และ visceral epithelial cells เป็นต้น (55-56,58,60) TGF- β มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ renal fibrogenesis เนื่องจากมีความสามารถที่จะกระตุ้นให้เกิด matrix accumulation และ sclerosis ขึ้นที่ไต การศึกษาในหนูที่ทำการ transfection ด้วยยีน TGF- β ซึ่งทำให้หนูสร้าง TGF- β เพิ่มมากขึ้นใน glomeruli สามารถกระตุ้นให้หนูเกิด glomerulosclerosis ได้เร็วขึ้น (60) TGF- β จะกระตุ้นการสร้างสารจำพวก extracellular matrix (ECM) proteins ลดการสร้างเอนไซม์จำพวก ECM degrading-proteinases และกระตุ้นการสังเคราะห์ proteinases inhibitors ส่งผลให้เกิดการสะสมของ ECM proteins เช่น collagens, fibronectin และ proteoglycans มากขึ้น ในปี 2003 Aljun และคณะ เสนอว่า TGF- β ที่พบในไตเป็นโปรตีนสำคัญในกระบวนการพัฒนาของภาวะ glomerulosclerosis และ tubulointerstitial fibrosis และการแสดงออกของ profibrogenic cytokine เช่น TGF- β มีความสำคัญในการชะลอการเสื่อมประสิทธิภาพในการทำงานของเนื้อเยื่อไต (51) ดังนั้น ในการศึกษาพบการแสดงออกของ TGF- β ใน stone-adjacent renal tissue น่าจะบ่งชี้ว่าเกิดกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล และมี renal fibrosis เกิดขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไว้น่าจะได้รับการเสียดสีจากก้อนนิ่วอย่างเร็วรั้ง

การแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β และประสิทธิภาพการทำงานของไต

การศึกษาทั้งใน animal model พบว่า การแสดงออกของ MCP-1 สัมพันธ์กับการเกิด tubulointerstitial และ glomerular damage นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วย glomerulonephritis พบการแสดงออกของ MCP-1 ที่บริเวณ tubular epithelial cells และบริเวณ parietal epithelium และมี infiltration ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ tubulointerstitium โดย MCP-1 ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางในการกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบ ส่งผลให้เกิดการทำลายของ tubulointerstitium และ glomerulus มากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง และนำไปสู่การเกิดภาวะไตล้มเหลว (59) MCP-1 ยังมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-6 และการแสดงออกของ IL-6 มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคไต (59) ระดับการแสดงออกของ IL-6 ในไตสามารถเป็นตัวบ่งบอกการเกิด cell infiltration ในผู้ป่วยโรค glomerulonephritis และ tubulointerstitial nephritis (59) ดังนั้นการปริมาณสร้างของ IL-6 สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตและภาวะการติดเชื้อที่บริเวณไตได้

ในการศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคไตที่มีค่า coorrected CCr ต่ำกว่า 50 ml/min/1.73m² เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคไตที่มีค่า corrected CCr สูงกว่า 50 ml/min/1.73m² แสดงว่าผู้ป่วยโรคไตที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง น่าจะเป็นผลมาจากระดับการอักเสบในไตที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคไตที่มีภาวะการบาดเจ็บที่เซลล์เยื่อหุ้มท่อไตสูง บ่งชี้ว่าระดับการอักเสบในไตที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคไตทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตมากขึ้น

สรุป ผู้ป่วยโรคไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และภาวะการบาดเจ็บเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต (renal tubular injury) สูงกว่าคนปกติ ในเนื้อเยื่อไตที่สัมผัสกับก้อนนิ่ว (stone-adjacent tissue) มีการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ซึ่งน่าจะมีบทบาทเกี่ยวกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การซ่อมแซมเนื้อเยื่อไตที่ถูกทำลายและการเกิด renal fibrosis ระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับภาวะการบาดเจ็บเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตที่สูงขึ้น และประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง การตรวจวัดระดับของ MCP-1 และ IL-6 ในปัสสาวะหรือเลือดของผู้ป่วยโรคไต อาจมีประโยชน์ทางคลินิกในการช่วยประเมินภาวะอักเสบในไต หรืออาจช่วยติดตามผลการรักษาได้

ข้อจำกัดในงานวิจัยนี้

งานวิจัยครั้งนี้ มีจำนวนประชากรตัวอย่างน้อย โดยเฉพาะกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต การเพิ่มจำนวนประชากรที่ศึกษา จะทำให้สามารถยืนยันผลการศึกษาที่ไม่พบนัยสำคัญในการศึกษานี้ได้ และทำให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือมากขึ้น

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนกับเนื้อเยื่อไตปกติ (normal renal tissue) ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งไต (non-cancerous renal tissue) ซึ่ง ศัลยแพทย์เก็บตัวอย่างโดยอาศัยการตัดสินใจด้วยตาเปล่าว่าเป็นส่วนของเนื้อไตที่ปกติ โดยไม่ได้ทำการพิสูจน์ระดับย้อมชิ้นเนื้อ (histological proof) เนื้อเยื่อไตควบคุมที่ใช้นี้อาจมีพยาธิสภาพบางส่วนคล้ายกับมะเร็งหรือไม่ใช่เนื้อเยื่อไตปกติจริง ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- (1) Wong SY, Slater SR, Evans RA, Mason R, Lancaster EK, Acland SM, et al. Metabolic studies in kidney stone disease. Q J Med. 1992 Mar;82: 247-58.
- (2) Trinchieri A, Castelnovo C, Lizzano R, Zanetti G. Calcium stone disease: a multiform reality. Urol Res. 2005 Jun;33: 194-8.
- (3) Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis. Arch Ital Urol Androl. 1996 Sep;68: 203-49.
- (4) Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. J Clin Invest. 2005 Oct;115: 2598-608.
- (5) Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human, animal models, and tissue-culture studies. Clin Exp Nephrol. 2004 Jun;8: 75-88.
- (6) Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cells in culture on to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. Nephrol Dial Transplant. 2003 Apr;18: 664-9.
- (7) Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. J Nephrol. 1998 Mar-Apr;11: 66-9.
- (8) Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. Urol Res. Mar;31: 3-9.
- (9) Thamilselvan S, Menon M. Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. BJU Int. 2005 Jul;96: 117-26.
- (10) Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. Kidney Int. 2002 Jan;61: 105-12.

- (11) Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. J Nephrol 1998;1: 66-9.
- (12) Rashed T, Menon M, Thamilselvan S. Molecular mechanism of oxalate-induced free radical production and glutathione redox imbalance in renal epithelial cells: effect of antioxidants. Am J Nephrol 2004 Sep;24: 557-68.
- (13) Knoll T, Trojan L, Steidler A, Michel MS, Alken P. The influence of oxalate on renal epithelial and interstitial cells. Urol Res 2004;32: 304-9.
- (14) Huang HS, Ma MC, Chen CF, Chen J. Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones. Urology 2003;62: 1123-8.
- (15) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย. ชีวเคมีเพื่อการส่งเสริมสุขภาพ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
- (16) Khan SR. Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. Am J Kidney Dis. 1991 Apr;17(4): 398-401.
- (17) Marickar YMF CJ. Change in demography of stone disease over four decades. In: Gohel MDI, Au DWT. Proceedings of the 10th International Symposium on Urolithiasis; 2004 May 24-28: Hongkong, Republic of China. International Urolithiasis Society. International Urolithiasis Society 2004 May 24-28: 386-93.
- (18) Yagisawa T, Chandhoke PS, Fan J. Metabolic risk factors in patients with first-time and recurrent stone formations as determined by comprehensive metabolic evaluation. Urology. 1998 Nov;52(5): 750-5.
- (19) Orson WM. Kidney stone: pathophysiology and medical management. Lancet 2006;367: 333-44.
- (20) Barbas C, Garcia A, Saavedra L, Muros M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers. Journal of Chromatography B. 2002;781: 433-55.
- (21) Trinchieri A. Epidemiological trends in urolithiasis: impact on our health care systems. Urol Res. 2006 Apr;34(2): 151-6.

- (22) Fredric LC, Andrew E, Elaine W. Kidney stone disease. J Clin Invest 2005;115: 2598-2608.
- (23) พจน์ ศรีบุญลือ, ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์, วิฑูรย์ ประสงค์วัฒนา, เกียรติยง ตั้งสง่า. โรคนี้ไม่ได้: ความรู้พื้นฐาน.สาเหตุ.การวินิจฉัย.การป้องกันรักษา. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2543.
- (24) Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. Front Biosci 2004;9: 1450-82.
- (25) Malvinder SP. Kidney stones. BMJ 2004;328: 1420-24.
- (26) Heilberg IP, Schor N. Renal Stone Disease: Causes, Evaluation and Medical Treatment. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50: 823-831.
- (27) Thamilselvan S, Rashed T, Menon M. Molecular Mechanism of Oxalate-Induced Free Radical Production and Glutathione Redox Effect of Antioxidants. AM J Nephrol 2004;24: 557-568.
- (28) Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. Urol Res 2005;33(1): 65-9.
- (29) Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003 Feb;111(2 Suppl): 460-75.
- (30) Penny LA. Monocyte chemoattractant protein-1 in luteolysis. Rev Reprod. 2000;5(2): 63-6.
- (31) Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: structure-function relationships. Protein Sci. 1997 May;6(5): 929-55.
- (32) Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. Exp Biol Med (Maywood). 2002 Dec;227(11): 943-56.
- (33) Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. J Am Soc Nephrol. 2003 Jan;14(1): 139-47.
- (34) Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. Urol Res 2002 Mar;30(1): 35-47.

- (35) Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. J Urol 1997 Mar;157(3): 1059-63.
- (36) Khan SR. Tubular surface events during nephrolithiasis. Curr Opin Urol. 1997;7: 240-247.
- (37) Water R, Leenen PJ, Noordermeer C, et al. Cytokine production induced by binding and processing calcium oxalate crystals in culture macrophages. Am J Kidney Dis. 2001;38: 331-338.
- (38) Hemmerlein B, Johanns U, Kugler A. Quantification and in situ localization of MCP-1 mRNA its relatio to the immune response of renal cell carcanomar. 2002 Mar.
- (39) Colin H. Downs G. Victory G. et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipiprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. Nephrology Dialysis Transplantation. 2001 June;16: 1189-1197.
- (40) Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. Front Biosci. 2004 May 1;9: 1450-82.
- (41) Minevich E. Pediatric urolithiasis. Pediatr Clin North Am. 2001 Dec;48(6): 1571-85.
- (42) Jonassen JA, Cao LC, Honeyman T, Scheid CR. Mechanisms mediating oxalate-induced alterations in renal cell functions. Crit Rev Eukaryot GeneExpr. 2003 Jan;13(1): 55-72.
- (43) Byer K, Khan SR. Citrate provides protection against oxalate and calcium oxalate crystal induced oxidative damage to renal epithelium. J Urol 2005 Feb;173(2): 640-6.
- (44) Aihara K, Byer KJ, Khan SR. Calcium phosphate-induced renal epithelial injury and stone formation: involvement of reactive oxygen species. Kidney Int 2003 Oct;64(4): 1283-91.
- (45) Khan SR, Glenton PA. Increased urinary excretion of lipids by patients with kidney stones. Br J Urol 1996;77(4): 506-11.

- (46) Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. Kidney Int 2002;62(6): 2062-72.
- (47) Khan SR SP, Hackett RL. Presence of lipids in urinary stones: results of preliminary studies. Calcif Tissue Int 1988;42(2): 91-6.
- (48) Jaffe M. Uber den Niederschlag welchen Pikrinsaure in normalen Harn erzeugt und uber eineneue Reaction des kreatinins. Physiol Chem 1986;10: 319-400.
- (49) Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stone. Urol Res 2006;34: 86-91.
- (50) Mori T, Fujita H, Narita T. Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nepropathy. J of Diabetes and its complications. 2993: 11-15.
- (51) Algun E, Suleyman A, Cevat T, et al. Coexistence of subacute thyroiditis and renal cell carcinoma: a paraneoplastic syndrome. CAMJ. 2003 Apr;15: 985-6.
- (52) Ferra C, Sanjose S, Gallardo D, et al. IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. Haematologica. 1998 Dec;83(12): 1082-7.
- (53) Marieke S.J, Schepers S, Van B, et al. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. Kidney International. 2005;68: 1543-1553.
- (54) Martin L, Michael P, Alan W, et al. Role of MAP kinase pathway in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells. Kidney International. 1999;59: 1366-1377.
- (55) Gagliardini E and Ariela B. Role of anti-TGF- β antibodies in the treatment of renal injury. Cytokine Growth Factor Reviews. 2006: 89-96.
- (56) Erwin P and Markus B. TGF- β signaling in renal disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13 : 2600-2610.

- (57) Allison A. Eddy. Molecular basis of renal fibrosis. IPNA. 2000;15 :290-301.
- (58) Josep M, Pablo I, Sergio L, et al. Role of transforming growth factor- β 1 in the progression of chronic allograft nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2001;16(Suppl 1): 114-116.
- (59) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: dose it more than simply attract monocytes?. Nephrol Dial Transplant. 2002;17: 2043-2047.
- (60) Pribylova P, Kotsch K, Lodererova A, et al. TGF- β 1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. Kidney International. 2006;69 :1872-1879.
- (61) สมนึก ดำรงกิจชัยพร. นิวโรในทางเดินปัสสาวะ สถานการณ์ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล , 2545.
- (62) Kenneth J. and Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. METHOD. 2001;25 :402-408.
- (63) Huang HS, Ma MC, Chen CF, Chen J. Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones. Urology 2003;62(6): 1123-8.
- (64) Marshall PJ, Warso MA , Lands WE. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. AnalBiochem 1985 Feb;145(1): 192-9.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
(Patient Information Sheet)

ชื่อโครงการ การแสดงออกของยีนโมโนไซต์เคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1, อินเตอร์ลิวคิน-6 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรสแฟคเตอร์-บีต้า ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, INTERLEUKIN-6 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β GENES IN NEPHROLITHIASIS

ชื่อผู้วิจัย	นางสาวชนุตรา หุนาปเทศ อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์	ผู้วิจัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยร่วม
---------------------	----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------

ผู้ดูแลที่ติดต่อได้

1. อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)
2. ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)
3. นางสาวชนุตรา หุนาปเทศ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)

สถานที่วิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นมาของโครงการ

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะซึ่งเป็นโรคที่มีความเก่าแก่และมีมาตั้งแต่สมัยดึกดำบรรพ์ ปัจจุบันโรคนิ่วไตเป็นปัญหาที่พบได้แพร่หลายทั่วโลก และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ มีรายงานความชุกของโรคนิ่วไตตั้งแต่ร้อยละ 4 ถึงร้อยละ 20 และผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องพบว่ามีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูงถึงร้อยละ 50 ในระยะ 5 - 10 ปี และสูงขึ้นถึงร้อยละ 75 ในระยะเวลา 15 ปี ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะไต

วายเป็นหรืออาจส่งผลร้ายแรงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ปัญหาทางด้านสุขภาพที่ทรุดโทรมลงแล้วผู้ป่วยอาจมีปัญหาทางด้านจิตใจและปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ เช่น ผู้ป่วยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงขึ้น ดังนั้นโรคนี้จึงจัดเป็นโรคที่คุกคามคุณภาพชีวิตของประชากรโลก รวมทั้งประชากรไทย ซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขอย่างยิ่ง

สาเหตุของการเกิดโรค เมื่อปัสสาวะมีสารก่อเนื้องอกและผลึกปริมาณมาก ผลึกบางส่วนไม่สามารถขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะได้ ทำให้สารก่อเนื้องอกและผลึกเหล่านี้มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เยื่อหุ้มไต กระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อหุ้มไตเกิดการบาดเจ็บและถูกทำลาย มีการขับสารพวก oxidatively modified biomolecules และเอ็นไซม์ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic enzymes) ออกมาในปัสสาวะมากขึ้น นอกจากนี้สารก่อเนื้องอกและผลึกยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อหุ้มไตหลังสารตัวกลางควบคุมการอักเสบ เพื่อดึงดูดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาทำลาย และจับกินผลึกเนื้องอกทั้งเซลล์ที่บาดเจ็บส่งผลให้เกิดภาวะการอักเสบขึ้น เมื่อเซลล์เยื่อหุ้มไตอักเสบ มีการตายและหลุดลอกออกมามากขึ้นจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต เซลล์จะสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์จากผลึกเนื้องอก รวมทั้งโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายไป ที่สำคัญจะกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารที่ใช้ในการซ่อมแซมบาดแผลมากขึ้นเพื่อการซ่อมแซมบาดแผล และส่งผลให้เกิดแผลเป็นตามมา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการอักเสบได้แก่ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีน รวมทั้งวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนเหล่านี้กับทำงานของไต และภาวะการรณทำลายดีเอ็นเอ จากภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคนี้ไต โดยผู้วิจัยจะเห็นว่าผลที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการแพทย์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อวัดปริมาณการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β ในระดับ mRNA และระดับโปรตีนในตัวอย่างเนื้อเยื่อไต
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการถูกทำลายของเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันกับระดับของการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β
3. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MCP-1, IL-6 และ TGF- β และตัวบ่งชี้การทำงานของไต
4. เพื่อประเมินความสามารถในการเป็นตัวบ่งชี้การอักเสบของ IL-6 และ TGF- β

รายละเอียดที่จะปฏิบัติต่อผู้เข้าร่วมโครงการ

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเนื้องอก โดยการผ่าตัดเอาเนื้องอก หรือโดยวิธี Percutaneous nephrolithotomy (PCNL) ซึ่งแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะให้ ผู้ป่วยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงและเลือด ก่อนการผ่าตัดและศัลยแพทย์จะเก็บตัวอย่าง เนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษามะเร็งโดยการผ่าตัด ซึ่งแพทย์ ผู้ทำการผ่าตัดจะให้ผู้ป่วยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงและเลือด ก่อนการผ่าตัดและศัลยแพทย์ จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป
3. ท่านจะได้รับการวิเคราะห์และวัดปริมาณการแสดงออกของตัวบ่งชี้กับภาวะการอักเสบ และการทำงานของไต
4. ท่านจะได้รับค่าตอบแทนและค่าเดินทางในการเข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีเก็บตัวอย่าง

1.1. การเก็บปัสสาวะ ทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัดเนื้องอก

วิธีเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ปัสสาวะทิ้งก่อนเป็นเวลา 7.00 น. (เวลาเริ่มเก็บ) แล้วเริ่มเก็บ ปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่จัดเตรียมไว้ให้ รวมกันจนครบ 24 ชั่วโมง คือ ถึง 7.00 น. ของ วันรุ่งขึ้นเป็นครั้งสุดท้าย เก็บตัวอย่างปัสสาวะไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์ในระหว่าง เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานอาหารตามปกติ

1.2. การเก็บเลือด

ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือด ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นแยกส่วนของ plasma เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์

1.3. การเก็บเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรคเนื้องอกไตและผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยศัลยแพทย์ระบบ ทางเดินปัสสาวะ

2. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างที่ได้จะนำมาหาปริมาณและวิเคราะห์หาสารที่มีความสำคัญที่เป็นตัวบ่งชี้ ภาวะอักเสบและการทำงานของไตของผู้ป่วย ตัวอย่างเช่น ครีเอตินีน, ซีเทรต, แมกนีเซียม, อนุมูล อิศระ เป็นต้น รวมทั้งวิเคราะห์และหาปริมาณการแสดงออกของสารตัวกลางการอักเสบทั้งใน

ระดับ mRNA และระดับโปรตีน รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการถูกทำลายของเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันกับระดับของการแสดงออกของสารตัวกลางการอักเสบ

ประโยชน์และผลข้างเคียงที่จะเกิดแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ

1. ท่านจะได้ทราบและเข้าใจในกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะการอักเสบที่มีสาเหตุเกิดจากการที่มีผลึกก้อนนิ่วอยู่ใต้
2. ท่านจะได้ทราบปริมาณการแสดงออกของสารตัวกลางที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะการอักเสบและตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต
3. ท่านจะได้รับการวิเคราะห์การแสดงออกของสารตัวกลางที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะการอักเสบและตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต
4. ท่านจะได้ทราบถึงแนวทางในการเกิดโรคนิ่วไตและโอกาสในการเกิดนิ่วซ้ำรวมทั้งวิธีการในการรักษาโรคนิ่วไตและวิธีการป้องกันการเกิดนิ่วจากผู้เชี่ยวชาญ
5. ผู้วิจัยรับรองว่าหากท่านได้รับอันตรายใดๆ อันเป็นผลโดยตรงจากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยยินดีรับผิดชอบการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า และท่านจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลตามความเหมาะสม

การเก็บข้อมูลเป็นความลับ

ผู้วิจัยขอยืนยันว่า ข้อมูลเกี่ยวกับตัวท่านจะถูกเก็บไว้เป็นความลับและจะใช้สำหรับการทำวิจัยเท่านั้น และชื่อของท่านจะไม่ปรากฏในแบบฟอร์มการเก็บข้อมูลและในฐานข้อมูลทั่วไป ผู้วิจัยจะใช้ฐานข้อมูลลับที่มีชื่อของท่านไว้ต่างหากโดยที่ผู้วิจัยเพียงท่านเดียวเท่านั้นที่ทราบรายละเอียดของข้อมูลนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านที่ให้ความร่วมมือมาเข้าโครงการวิจัยและขอให้ท่านตระหนักว่าไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมโครงการนี้หรือไม่ก็ตาม จะไม่มีผลต่อการรักษาพยาบาลที่ได้รับจากโรงพยาบาลนี้ และเมื่อท่านเข้าร่วมโครงการนี้แล้ว ท่านสามารถออกจากโครงการได้ตลอดเวลา โดยไม่กระทบต่อการดูแลรักษาที่ท่านจะได้รับจากแพทย์ เมื่อท่านต้องการโดยแจ้งให้ผู้ทำการวิจัยทราบก่อน หากท่านมีข้อสงสัยประการใดเกี่ยวกับการวิจัยนี้กรุณาติดต่อมาที่ นางสาวชุนตรา หุณาปเทศ ภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 081-381-7409 (มือถือ), 0-2252-4986 (ที่ทำงาน) หรือ อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า ภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2252-4986 (ที่ทำงาน) หากท่านมีข้อสงสัยหรือมีปัญหาเกี่ยวกับสิทธิของท่านสามารถติดต่อ สำนักงานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2256-4455 ต่อ 14,15

ภาคผนวก ข

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form)

การวิจัยเรื่อง การแสดงออกของยีนโมโนไซต์เคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1, อินเทอร์ลิวคิน-6 และ ทรานสฟอร์มมิงโกรสแฟคเตอร์-บีต้า ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
(EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, INTERLEUKIN-6 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β GENES IN NEPHROLITHIASIS)

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

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงจุดประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าพึงจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลข้อมูลเกี่ยวกับตัวของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจะกระทำได้ในกรณีที่เป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่คิดมูลค่า และจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นตามความเหมาะสม

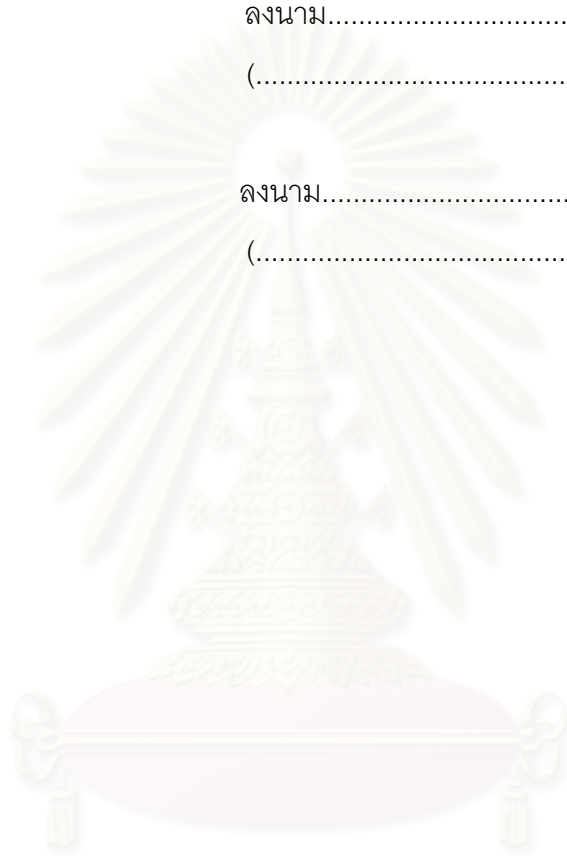
ผู้วิจัยรับรองว่าจะใช้ตัวอย่างเลือด, เนื้อเยื่อไต และปัสสาวะ ของข้าพเจ้าอย่างเป็นประโยชน์ที่สุด และใช้เฉพาะในโครงการวิจัยนี้เท่านั้น กรณีมีตัวอย่าง อาร์เอ็นเอ (RNA) เหลือจากการวิจัยและต้องการใช้ในการวิจัยอื่นผู้วิจัยจะต้องแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบพร้อมทั้งได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าก่อนจึงจะใช้ตัวอย่างเลือดในโครงการวิจัยอื่นได้

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วและมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบ
ยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม
(.....)

ลงนาม.....พยาน
(.....)

ลงนาม.....ผู้ทำวิจัย
(.....)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย Case Record Form (CRF)

ข้อมูลทั่วไป

Code.....บันทึกวันที่.....

เพศ () ชาย () หญิง อายุ.....ปี น้ำหนัก.....กก. ส่วนสูง.....ซม.

อาชีพ.....ภูมิลำเนาจังหวัด.....

เกณฑ์การรับเข้าในโครงการ

- มีภาพถ่ายรังสียืนยันการวินิจฉัยว่าเป็นนิ่วไต () yes () no

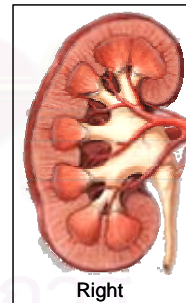
เกณฑ์การปฏิเสธการเข้าในโครงการ

มีความผิดปกติทางกายวิภาคหรือเกิดพยาธิสภาพของระบบปัสสาวะอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

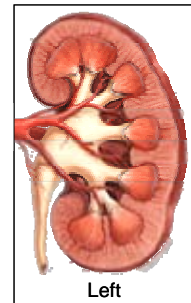
- Horseshoe kidney () yes () no
- Polycystic kidney () yes () no
- congenital VU reflux () yes () no
- Persistent ureteric obstruction () yes () no
- Neurogenic bladder () yes () no
- Urinary tract infection (UTI) () yes () no
- Malignancy () yes () no

ข้อมูลทางคลินิก

1. อาการที่มาพบแพทย์ () Back pain () groin pain () bloody urine () ปัสสาวะขัด/บ่อย () อื่นๆ.....
2. จำนวนครั้งที่ เป็นนิ่ว () ครั้งแรก () ครั้งที่ 2 () ครั้งที่ 3 () มากกว่า 3 ครั้ง
3. (สำหรับผู้ป่วยที่เป็นนิ่วซ้ำ) มีระยะปลอดนิ่ว (stone-free period)เดือน
4. Fever: () no () yes
5. KUB x-ray: () negative () positive
6. IVP (intravenous pyelogram): () negative () positive
7. Affected kidney: () right () left () both
8. Stone type: () opaque () non-opaque
9. Stone quantity: () single () multiple
10. Stone location: () Pelvis () Upper calyx () Middle calyx () Lower calyx
11. Surgical approach: () Open surgery () Percutaneous nephrolithotomy () ESWL
12. Kidney biopsy (*contact with stone*): () Septum (R1) () Cortex (R2) () other.....
13. Urinary analysis:
 - Red blood cells:...../HP
 - White blood cells:...../HP
 - Bacteria: () occasional () few () moderate () numerous () other.....
14. Urine culture:



Right



Left

Please illustrate:
- Stone location
- Biopsy location

ลงชื่อ.....ผู้บันทึก

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. Acidic ferric chloride reagent
 - Citric acid 4.2 g
 - Glacial acetic acid 0.5 ml
 - Conc. Sulphuric acid 0.5 ml
 - เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 ml
 - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. N-acetyl glucosamine (NAG) substrate (10 mmol / L)
 - 4-Nitrophenyl-N -acetyl – B – D – glucosaminide (MW =342.3) 342.3 g
 - เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 ml
 - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. AMP buffer, (pH 10.25, 0.75 mol / L)
 - 2 amino – 2 – methyl – 1,3 – propanediol (MW 105.1) 15.765 g
 - ปรับ pH ให้ได้ 10.25 โดยใช้ 6 mol ของ NaOH
 - เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 200 ml
4. Bradford reagent
 - Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg
 - 95% ethanol 50 ml
 - 85% phosphoric acid 100 ml
 - เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 ml (1L)
 - กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 กรอง 2 รอบ
 - เก็บไว้ได้นาน 2 อาทิตย์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. 0.1% Butyl hydroxytoluene (BHT) in chloroform : Methanol (2:1)
 - Butyl hydroxytoluene (BHT) 0.1 g
 - Chloroform : Methanol (2:1) 100 ml
 - เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Citrate buffer (PH 4.4,0.2M)

- Sodium citrate (MW = 294.11) 14.705 g
- เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 500 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 4.4 โดยใช้ HCl
- เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. 0.01 M citrate buffer pH 6.0

- Citric acid 4.2 g
- ปรับ PH ให้ได้ 6.0 โดยใช้ NaOH
- เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 2000 ml (2L)
- เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Chloroform : Methanol (2:1)

- Chloroform 1000 ml
- Methanol 50 ml
- ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. DEPC – treated water

- DEPC solution 2 ml
- เติม deionized water จนมีปริมาตรครบ 2000 ml (2L)
- Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 C เป็นเวลา 45 นาที

10. 0.9% Sodium Chloride

- Sodium chloride (NaCl) 9 g
- เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 ml (1L)

11. 0.53% Thiobarbitri acid (0.53% TBA)

- 2 – Thiobarbituric acid (MW = 144.70) 0.53 g
- เติมน้ำกลั่น จนมีปริมาตรครบ 50 ml
- เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 100 ml

12. 20% Trichloroacetic acid (TCA) in 0.6 N HCl

- Trichloroacetic Acid (TCA) 100 g
- เติม 0.6 N HCl จนมีปริมาตรครบ 500 ml
- เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) นางสาวชนุตรา หุนาปเทศ
 ตำแหน่งทางวิชาการ ไม่มี
 (ภาษาอังกฤษ) Ms. Chanutra Hunapathed

วัน เดือน ปีเกิด 23 เมษายน พ.ศ. 2526 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ตำแหน่ง นิติวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตหลักสูตร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 081-381-7409, 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)

ที่อยู่ปัจจุบัน 582/339 หมู่บ้านอยู่เจริญ ซ. 17 ถ. อโศก-ดินแดง กรุงเทพฯ 10400

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่สำเร็จการศึกษา
มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์	วิทยาศาสตร บัณฑิต (วท.บ.)	ชีวเคมี	2548

ผลงานวิจัยในอดีต (ในระยะเวลา 3 ปี)

ไม่มี

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย