


จุฬพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคนี้่วไต: ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การอักเสบ และการเกิดพังผืด



นางสาวอุไรวรรณ ไหววิจิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 1 7 4 8 5 5 0 3 0

Histopathology of nephrolithiasis patients: oxidative stress, inflammation and fibrosis



Miss Uraiwan Waiwijit

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

530426

หัวข้อวิทยานิพนธ์

จุลพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคนี้่วไต: ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืด

โดย

นางสาวอุไรวรรณ ไหววจิตร

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

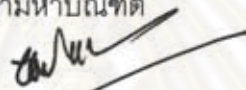
ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า

ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิชาวี กิตติโกวิท

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



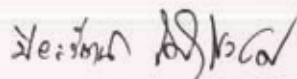
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิชาวี กิตติโกวิท)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วลัยยา ธเนศพงศ์ธรรม)

อุไรวรรณ ไหววจิตร : จุลพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคนิ่วไต : ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืด. (Histopathology of nephrolithiasis patients: oxidative stress, inflammation and fibrosis) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. ปิยะรัตน์ ไตรสุโขวงศ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิภาวี กิตติโกวิท , 80 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและหาความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไต รวบรวมกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 28 ราย และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 39 ราย เก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สำหรับผู้ป่วยโรคนิ่วไตเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตเพิ่มเติมเพื่อศึกษาพยาธิสภาพเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตบริเวณที่ไม่เกิดมะเร็งซึ่งได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งไต การศึกษานี้ใช้ค่าครีเอทีนินในเลือดและอัตราการกรองที่ไตเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต และตัวบ่งชี้การทำลายเซลล์บุท่อไตเป็น N-acetyl glucosaminidase (NAG) activity และโปรตีนในปัสสาวะ ประเมินภาวะการอักเสบและการเกิดพังผืดในเนื้อไตโดยวิธี hematoxylin and eosin และ masson-trichrome staining ตามลำดับ ศึกษาการแสดงออกของ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชันและ TGF- β 1 โดยวิธี immunohistochemistry วัดปริมาณ TGF- β 1 ในปัสสาวะโดยวิธี ELISA และศึกษาผลของผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) ต่อการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ใน HK-2 cells ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำกว่าและมีการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบการอักเสบและการเกิดพังผืด และระดับการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืด ผู้ป่วยที่มีการอักเสบและการเกิดพังผืดสูงสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง พบการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า HK-2 cells ที่ได้รับผลึก COM มีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงและมีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น ระดับ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงกว่าในกลุ่มคนปกติ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ สรุปในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืดเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง และผลึก COM ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบมากในผู้ป่วยโรคนิ่วไตสามารถทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันต่อเซลล์บุท่อไตได้

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....อุไรวรรณ ไหววจิตร.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....ปิยะรัตน์ ไตรสุโขวงศ์.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....ชาญชัย บุญหล้า.....

5174855030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : OXIDATIVE STRESS / RENAL INFLAMMATION / RENAL FIBROSIS / TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 / 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE / NEPHROLITHIASIS

URAIWAN WAIWIJIT: HISTOPATHOLOGY OF NEPHROLITHIASIS PATIENTS: OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND FIBROSIS. THESIS ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, THESIS CO-ADVISORS : ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, PH.D., ASST. PROF. DR. WIPAWEE KITTIKOWIT, 80 pp.

The present study aimed to investigate oxidative stress, inflammation and fibrosis in renal biopsies of nephrolithiasis patients and evaluate their correlation with renal function. Twenty-eight nephrolithiasis (NL) patients and 39 healthy controls were recruited for the study. Blood and urine (morning and 24-hr) samples collected from all subjects. Renal tissues were obtained from the patients. Control renal tissues were non-cancerous regions of nephrectomies of 3 kidney cancer patients. Plasma creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR) were used to assess glomerular function while urinary *N*-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity and proteins were tubular function indicators. Renal inflammation and fibrosis were assessed by hematoxylin and eosin and Masson-trichrome stainings, respectively. Renal expressions of 8- hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG : marker of oxidative DNA damage) and TGF- β 1 were investigated using immunohistochemistry. Urinary TGF- β 1 was determined by ELISA. Additionally, reactive oxygen species (ROS) production in renal tubular (HK-2) cells by calcium oxalate monohydrate (COM) crystals was explored. The results showed that NL patients had impaired renal function and enhanced renal tubular injury compared to healthy controls. Varied degrees of inflammation and fibrosis were found in NL renal tissues, and inflammation grading was correlated with fibrotic extent. High inflammation and fibrosis were associated with reduced renal function. 8-OHdG and TGF- β 1 were over-expressed in NL renal sections. No correlation between renal fibrosis and TGF- β 1 expression were observed. HK-2 cells exposed to COM caused decreased cell viability and increased ROS production. Significant difference between urinary TGF- β 1 in NL patients and healthy controls were not observed. In conclusion, increased oxidative stress, inflammation and fibrosis were found in the kidneys of NL patients, and the extents of these pathological changes were associated with impaired kidney function. COM crystals, as a principal lithogenic crystal in NL patients, at least in part initiated the oxidative damage of renal tubular cells.

Department : Biochemistry

Field of Study : Medical Biochemistry

Academic Year : 2010

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Piyaratana Tosukhowong
Chanchai Boonla

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โดสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิชาวี กิตติโกวิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำและคำสั่งสอน ตั้งแต่การทำการทดลอง รวบรวมข้อมูล การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ อีกทั้งยังให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานสอบ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วลัยยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้ต่างๆและอบรมสั่งสอนคุณธรรมจริยธรรมเพื่อนำมาใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ปรีชา เรืองเวชวรชัยและขอขอบพระคุณที่ๆภาคพยาธิวิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือในการย้อมชิ้นเนื้อ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิและ อ.ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง ELISA Plate reader และ Spectrofluorometer ขอขอบคุณที่ๆและเพื่อนๆ คณะสหเวชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่อง การออกจดหมาย การจัดทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ และการเบิกใช้สิ่งของต่างๆ

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระหว่างเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา พี่ น้อง อาจารย์และพี่ๆที่หอพักนิสิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาและให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
ประชากร.....	16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	18
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	20
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไตและภาวะการทำลายเซลล์เยื่อท่อไต... ..	31
การศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	33
การศึกษาผลของผลึก COM ต่อการมีชีวิต (cell viability) และปริมาณการผลิต ROS ของ HK-2 cells.....	35
การศึกษาภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	39

บทที่	หน้า
การศึกษาการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	41
การศึกษาแสดงของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	43
การศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต.....	44
การศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของ ผู้ป่วยโรคไต.....	45
การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการเกิดพังผืดกับ การอักเสบ ภาวะเครียดจาก ออกซิเดชัน และการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	48
สรุปผลการวิจัย.....	48
อภิปรายผลการวิจัย.....	49
ข้อเสนอแนะ.....	53
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก ก.....	63
ภาคผนวก ข.....	67
ภาคผนวก ค.....	75
ภาคผนวก ง.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	17
2	แสดง primer ที่ใช้ในการศึกษา.....	23
3	แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างประชากรผู้ป่วยโรคนิ้วไตและกลุ่มควบคุม.	28
4	แสดงข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ใช้ในการศึกษาพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไต.....	29
5	ระดับการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต.....	32
6	แสดงภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต.....	38
7	แสดงระดับการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต.....	43
8	แสดงความสัมพันธ์ของการเกิดพังผืดกับการอักเสบ การแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต.....	46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงกลไกการเกิด epithelial-mesenchymal transition (EMT).....	11
2	โครงสร้างของ TGF- β 1.....	13
3	โครงสร้างของ 8-OHdG.....	14
4	แสดงชนิดของนิวที่พบในผู้ป่วยโรคไต.....	30
5	แสดงอัตราการกรองที่ไต (eGFR), plasma creatinine, NAG activity และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับคนปกติ.....	31
6	การแสดงผลของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม.....	33
7	MTT assay ทดสอบ viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (dose-dependent experiment).....	35
8	MTT assay ทดสอบ viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (time-dependent experiment)	36
9	ผลของ COM ต่อการผลิต ROS ใน HK-2 cells ค่า fluorescence intensity....	37
10	แสดงภาวะการอักเสบในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต.....	39
11	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของไตกับระดับการเกิดการอักเสบในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่มีการอักเสบต่ำและกลุ่มที่มีการอักเสบสูง.....	40
12	แสดงการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม.....	41
13	แสดงค่า eGRF และ plasma creatinine ของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่มีปริมาณพังผืดในเนื้อไตต่ำและกลุ่มที่มีปริมาณพังผืดในเนื้อไตสูง.....	42
14	การแสดงผลของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม.....	43
15	แสดงระดับ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตเทียบกับคนปกติ.....	44
16	แสดง TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของผู้ป่วยโรคไตเทียบ	

กับคนปกติ..... 45



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine
COM	Calcium oxalate monohydrate
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DCFH	2',7'-dichloro-dihydrofluorescein
DCFH-DA	2',7'-dichloro-dihydrofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium diacetate
eGFR	estimate glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
H&E	Hematoxylin and eosin
HK-2 cell	Human kidney cell line
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAG	N-acetyl glucosaminidase
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TGF- β 1	transforming growth factor beta 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (nephrolithiasis) เป็นโรคระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้ทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในแต่ละปีประเทศต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยโรคนิ่วไตเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในการทำกิจวัตรประจำวันและการประกอบอาชีพ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องทราบสาเหตุ กลไกและพยาธิสภาพของการเกิดโรค เพื่อหาทางป้องกันและรักษาให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุดต่อผู้ป่วย การศึกษาในประเทศแถบตะวันตกพบความชุกของโรคนิ่วไตร้อยละ 10 (1, 2) ในประเทศไทยพบความชุกร้อยละ 2-17 (3) ซึ่งพบสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้โรคนิ่วไตมีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูง โดยในระยะเวลา 10 ปีพบ 26-53 % และภายใน 20 ปีพบ 75% (4, 5) ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรไทย

กลไกการเกิดนิ่วเกิดจากการตกผลึกของสารก่อนิ่วที่ละลายอยู่ในปัสสาวะในภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ซึ่งสารก่อนิ่วในปัสสาวะ (stone promoters) ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก ปกติแล้วในปัสสาวะจะมีสารยับยั้งการเกิดนิ่ว (stone inhibitors) ได้แก่ ซีเทรต แมกนีเซียม ไพรอพอตเฟต ไกลโคอะมิโนไกลแคน อัลบูมิน และ Tamm-Horsfall protein ทำหน้าที่ช่วยลดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของสารก่อนิ่วในปัสสาวะและลดการเกิดผลึกนิ่ว กระบวนการเกิดก้อนนิ่วเริ่มจากการตกผลึกของสารก่อนิ่ว (crystal nucleation/crystallization) ทำให้เกิดเป็นผลึกนิ่วเคลือบขนาดเล็กที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดนิ่ว ผลึกนิ่วเคลือบที่เกิดขึ้นอาจถูกขับออกมาในปัสสาวะเกิดภาวะ Crystalluria หรืออาจเคลื่อนที่ของผลึกจากด้าน luminal ไปยัง basement membrane ผ่านกระบวนการ endocytosis และฝังอยู่ที่ basement membrane ของ renal tubules เกิดเป็น Randall's plaques จากนั้นเคลื่อนที่ต่อไปยัง renal papillary surface ก่อตัวเป็น nidus (stone core) ซึ่งเป็นจุดศูนย์กลาง (core) สำหรับการรวมกลุ่มของผลึกและเจริญใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วในที่สุด (6, 7) การศึกษาพบว่าการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวท่อไต (renal epithelial tubular cell injury) จะช่วยส่งเสริมให้มีการติดค้างของผลึกใน renal tubules สูงขึ้น ซึ่งการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตถูกทำลายนี้ เนื่องมาจากสารก่อนิ่วและผลึกไปกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นจนทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) การศึกษาใน renal proximal

tubular cell lines (LLC-PK1 และ MDCK-II) เมื่อได้รับผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) เซลล์จะสร้างสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species : ROS) เพิ่มมากขึ้น และเมื่อได้รับผลึกปริมาณมากจะเกิด necrotic/apoptotic cell death ได้ (8, 9) การศึกษาของ Habibzadegah-Tari และคณะ ใน Human kidney cell lines (HK-2) พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM เซลล์จะสร้าง Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) มากขึ้นผ่านกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่ง MCP-1 เป็น chemokine ที่บ่งชี้ถึงการกระตุ้นการอักเสบ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลึกแคลเซียมออกซาเลตสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นและเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และยังกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ รายงานการวิจัยในผู้ป่วยโรคนี้ว่าพบว่ามีระดับ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG, oxidative DNA damage marker) ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติ แสดงว่าผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตมีภาวะเครียดออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ และยังพบว่าปริมาณ 8-OHdG ในปัสสาวะที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของท่อไตที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย (10) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตพบการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNAs ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้น โดยสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นในเนื้อไต และสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง (11) การศึกษาของ Evan และคณะในผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่เกิดจากการตัดต่อลำไส้เล็กซึ่งพบเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต ผู้ป่วยที่มีภาวะ distal renal tubular acidosis ซึ่งทำให้เกิดนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต และผู้ป่วยที่เป็นนิ่ว brushite (CaHPO_4) พบว่ามีการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตเกิดขึ้นบริเวณท่อไตส่วนที่มีผลึกนิ่วไปเกาะและพบการบาดเจ็บที่บริเวณเนื้อไตรอบๆผลึกนิ่วด้วย (12-14) โดยปกติเมื่อเซลล์ไตถูกทำลายและตายจากกระบวนการอักเสบ จะกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซม (wound-healing process) แต่ถ้าเกิดมากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมได้ จะทำให้เกิดการสะสมของ extracellular matrix จนเกิดพังผืดในเนื้อไต (renal fibrosis) ขึ้น โดยไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดพังผืดนี้คือ transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) โดยจะไปกระตุ้นให้มีการสร้าง myofibroblasts มากขึ้น ซึ่ง myofibroblasts เป็นเซลล์สำคัญที่สร้าง extracellular matrix proteins เช่น collagen และ fibronectin เป็นต้น การเกิดพังผืดในไตจะทำให้หน่วยไต (nephrons) ถูกทำลาย ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลง (impaired renal function) นำไปสู่การเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) และ โรคไตระยะสุดท้าย (end stage renal disease) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต การศึกษาของ Evan และคณะในผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตชนิด brushite พบผลึกนิ่วใน collecting duct เซลล์เยื่อบุผิวมีการบาดเจ็บและตาย ท่อไตในส่วน cortex ลีบลง (tubular atrophy)

glomerulosclerosis และพบการบาดเจ็บและการเกิดพังผืดบริเวณเนื้อไตรอบๆผลึก และผู้ป่วยที่เป็นนิ่วซีสทีนพบผลึกในท่อของ Bellini และท่อไตส่วน inner medullary collecting duct พบการบาดเจ็บของเซลล์รอบๆเนื้อไตที่มีการอักเสบ และพบพังผืดที่เนื้อไตปริมาณมาก (12, 15)

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าผลึกและก้อนนิ่วสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระและเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันขึ้น และยังกระตุ้นกระบวนการอักเสบในไตเมื่อเกิดการอักเสบเรื้อรัง จะทำให้เกิดพังผืดในไต ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ได้แก่ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืด และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิสภาพที่พบกับประสิทธิภาพการทำงานของไต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับการอักเสบและการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยประเมินจาก Hematoxylin and eosin staining (H&E) และ Masson-trichrome staining ตามลำดับ
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุมของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน กระบวนการอักเสบ และการเกิดพังผืดกับประสิทธิภาพการทำงานของไตในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมือต่างๆ
2. กลุ่มผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาคั้งนี้เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดขอนแก่น และกลุ่มคนปกติเป็นเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาริวิจัย และมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตที่ศึกษาได้มาจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่รักษาโดยการผ่าตัดเปิดเอาน้ำออก (open stone surgery) ผู้ป่วยที่รักษาด้วยวิธีอื่น เช่น สลายนิ่ว (shockwave lithotripsy) และ PCNL (Percutaneous nephrolithotripsy) ไม่สามารถเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อได้ ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจมีระดับของพยาธิสภาพในไตแตกต่างกับผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปิด

เนื้อเยื่อไตควบคุมที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากส่วนที่ไม่เป็นมะเร็ง (non-cancerous region) ของไตที่เป็นมะเร็ง จึงอาจไม่เป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อไตของคนปกติได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Nephrolithiasis หรือ Kidney stone หรือ Renal stone คือ โรคนิ่วในไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณตำแหน่งที่สูงกว่าหลอดกรวยไต (renal pelvis) ขึ้นไป
2. Oxidative Stress หรือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิกและคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา
3. Inflammation หรือภาวะการอักเสบ คือ ปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกที่มากระตุ้นด้วยระบบภูมิคุ้มกัน หรือเมื่อเนื้อเยื่อได้รับอันตราย (injury)
4. การเกิดพังผืด (fibrosis) เป็นภาวะที่มีการสร้าง fibrous connective tissue มากเกินไป มักเกิดภายหลังการอักเสบเรื้อรัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงพยาธิสภาพการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ และการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบ การเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตและประสิทธิภาพการทำงานของไตในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

3. เป็นข้อมูลวิจัยสำหรับใช้เป็นแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคนิ้วไตภายหลังการผ่าตัด โดยการให้ยาหรือวิธีใดๆ ที่สามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การอักเสบ และการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วย เพื่อชะลอการเสื่อมประสิทธิภาพการทำงานของไต และลดโอกาสการเกิดนิ้วซ้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตจำนวน 28 รายและกลุ่มคนปกติจำนวน 39 ราย เก็บสารตัวอย่างที่เป็นเลือด ปัสสาวะครั้งแรกตอนเช้า (first morning urine) ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนนึ่ง และชิ้นเนื้อไตในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไต สำหรับกลุ่มคนปกติเก็บสารตัวอย่างที่เป็นเลือด ปัสสาวะครั้งแรกตอนเช้า และปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การตรวจวัดระดับครีเอตินีนในเลือด การตรวจวัดระดับโปรตีน และ N-acetyl glucosaminidase (NAG) activity ในปัสสาวะ ตรวจหาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และตรวจปริมาณ TGF- β 1 ในปัสสาวะโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และตรวจสอบการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไตโดยวิธี immunohistochemistry และศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นใน HK-2 cells โดยเพาะเลี้ยง HK-2 cells จนเซลล์เจริญเติบโตเต็ม cell culture flask จากนั้นให้เซลล์ได้รับผลึกของ COM แล้วศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay และวัดปริมาณการสร้าง ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยวิธี 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence assay

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. เก็บสารตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง
2. จัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์และจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคนิ่วไต (kidney stone disease หรือ nephrolithiasis)

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาที่สำคัญในระบบทางเดินปัสสาวะซึ่งพบได้ทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ มีการศึกษาพบว่าประเทศในแถบยุโรปพบอุบัติการณ์เกิดโรคนิ่วไต 5-9% อเมริกาเหนือ 13% ประเทศแถบตะวันออกกลาง 20-25% เอเชีย 1-5% (16) และประเทศไทยพบ 2-17% (3) ซึ่งพบสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง โดยในระยะเวลา 10 ปีพบ 26-53% (4, 5, 17) และภายใน 20 ปีพบ 75% (17, 18) ซึ่งอัตราการกลับเป็นซ้ำนี้เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ อายุเริ่มต้นที่เป็นโรคนี้ การมีประวัติครอบครัวที่เป็นนิ่ว การเป็นนิ่วติดเชื้อ การดูแลตัวเองภายหลังจากการรักษาและวิธีการรักษาที่ไม่เหมาะสม (19)

สาเหตุของการเกิดนิ่วไต

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย (multifactorial disease) อาจเกิดจากความผิดปกติของปัจจัยภายใน (intrinsic factors) ได้แก่ พันธุกรรม เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย และเชื้อชาติ ความผิดปกติจากปัจจัยภายนอกและสิ่งแวดล้อม (extrinsic factors) ได้แก่ การบริโภคอาหารและน้ำ การรับประทานยาบางชนิด ภูมิอากาศ อาชีพ และความเครียด และความผิดปกติจากปัจจัยทางเมแทบอลิก (metabolic factors) เช่น ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (hyperuricosuria) ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (hyperphosphaturia) ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypomagnesiuria) ภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) และภาวะสมดุลของกรดด่างที่ผิดปกติ ความผิดปกติทางเมแทบอลิกเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากในการก่อนิ่ว ซึ่งอาจพบความผิดปกติจากภาวะเดียวหรือหลายภาวะร่วมกันก็ได้ (20)

กลไกการเกิดนิ่ว

นิ่วเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างสารก่อนิ่ว (เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ยูเรต และฟอสเฟต) และสารยับยั้งการเกิดนิ่ว (เช่น ซีเทรท โพแทสเซียม แมกนีเซียม และไกลโคอะมิโนไกลแคน) ทำให้เกิดภาวะอิ่มตัววดยิ่งของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ (supersaturation) และการตกผลึก (crystal nucleation)

ดังนั้นถ้าในปัสสาวะยังมีสารก่อนิ่วที่ละลายอยู่ในสภาวะอิ่มตัววดยิ่งอีกก็จะส่งผลให้เกิดการเติบโตของผลึก (crystal growth) แล้วรวมตัวกันเป็นกลุ่มของผลึกขึ้นมา (crystal aggregation) โดยปกติแล้วในแต่ละวันร่างกายจะมีการขับผลึกออกมาในปัสสาวะเป็นล้านๆ ผลึกโดยที่ไม่เกิดนิ่ว เนื่องจากระยะเวลาที่ปัสสาวะไหลผ่านท่อไตใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อไตประมาณ 15-60 ไมโครเมตร แต่อัตราการเติบโตของผลึกประมาณ 1-2 ไมโครเมตรต่อนาที ดังนั้นจึงเป็นช่วงเวลาสั้นๆ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะให้ผลึกโตพอที่จะติดในท่อไตได้ ผลึกจึงถูกขับออกมาในปัสสาวะ (crystalluria) แต่ในคนที่เป็นนี้นั้นจะมีการรวมกลุ่มกันของผลึกเป็นจำนวนมากโดยปฏิกิริยาจับกันของผลึกที่เป็นประจุบวกและประจุลบ และสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ที่ส่งผลให้เกิดการจับกันของผลึกมากขึ้น ทำให้เกิดเป็นก้อนนิ่วติดค้างภายในท่อไต (crystal retention) มีการศึกษาวิจัยพบว่าผลึกส่วนใหญ่อันเกิดขึ้นในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมออกซาเลต ผลึกของแคลเซียมฟอสเฟตมักจะสะสมในเนื้อไต (interstitium) บริเวณปลายของ papillary (papillary tip) เรียกว่า Randall's plaque ซึ่งเชื่อว่าเป็นบริเวณที่ให้ผลึกมีการเติบโตจนเกิดเป็นก้อนนิ่ว (stone nidus) อย่างไรก็ตาม Randall's plaques สามารถพบได้ในคนที่ไม่เป็นนี้อด้วย แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่าคนที่เป็นนิ่ว (13)

ชนิดของนิ่วไต

นิ่วไตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของก้อนนิ่ว คือ นิ่วชนิดที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งพบมากที่สุดประมาณร้อยละ 70-80 (21) ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟตหรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก นิ่วอีกชนิดคือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบพบประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก นิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือนิ่วจากการติดเชื้อ และนิ่วซีสทีน และถ้าพิจารณาตามองค์ประกอบทางเคมีของก้อนนิ่วสามารถแบ่งนิ่วออกเป็น 2 ชนิด คือ นิ่วที่มีองค์ประกอบทางเคมีเพียงชนิดเดียวจัดเป็นนิ่วบริสุทธิ์ (pure stone) และนิ่วที่มีองค์ประกอบทางเคมีมากกว่าสองชนิดจัดเป็นนิ่วเนื้อผสม (mixed stone)

จากการศึกษาระบาดวิทยาของชนิดของนิ่วที่พบในประเทศไทยของ Tosukhowong และคณะ พบนิ่วบริสุทธิ์ 40.23 % นิ่วเนื้อผสม 59.77 % ส่วนใหญ่เป็นนิ่วเนื้อผสมแคลเซียมออกซาเลตกับแคลเซียมฟอสเฟต ถ้าแบ่งตามแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักในก้อนนิ่วพบนิ่วแคลเซียมออกซาเลต

มากที่สุด (74%) นีวแคลเซียมฟอสเฟต 5 % นีวกรดยูริก 16 % และนีวแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต 5 % (22)

2.2 ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดการทำลาย โปรตีน ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอในเซลล์ เมื่อสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ถูกทำลายจะทำให้สูญเสียหน้าที่และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative damage ซึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage จะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะของเซลล์ชนิด และความรุนแรงของสภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้น

สารออกซิแดนซ์ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species : ROS) ได้แก่ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) hydroxy radical (OH^{\cdot}) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ROS ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆภายในเซลล์คือ OH^{\cdot} โดยสร้างมาจากหลายปฏิกิริยาในร่างกาย ในสภาวะปกติร่างกายมีการสร้าง ROS จากปฏิกิริยาชีวเคมีและกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ อยู่ตลอดเวลา แต่ร่างกายก็มีกลไกที่จะรักษาสมดุลของสารอนุมูลอิสระโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระและการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวนี้ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี กลูตาไทโอน และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น

จากการศึกษาการเกิดนิวไตพบว่าสารก่อเนื้องอกและผลึกของเนื้องอกสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อหน่วยไตสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น สารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์แล้วส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์สูญเสียรูปร่างและการทำงาน เซลล์ถูกทำลายและเกิดการบาดเจ็บจนทำให้เซลล์ตายในที่สุด สารก่อเนื้องอกและผลึกเนื้องอกที่มีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นจำนวนมาก ได้แก่ ออกซาเลต และแคลเซียมออกซาเลต เนื่องจากเป็นผลึกที่พบได้มากที่สุด ซึ่งรายงานการศึกษาวิจัยทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลองพบว่าทั้งออกซาเลตและแคลเซียมออกซาเลตส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ ได้แก่ superoxide, hydroxyl radicals และ hydrogen peroxide ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์สูญเสียหน้าที่ไป และส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ (23, 24) งานวิจัยของ Bhandari A และคณะ ใน HK-2 cells พบว่า

เมื่อเซลล์ได้รับออกซาลेटในปริมาณสูงจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์และมีผลทำให้เซลล์เกิด apoptosis (25) รายงานวิจัยของ Thamilselvan และ Khan ในหนู Sprague-Dawley rats และ เซลล์เพาะเลี้ยง MDCK (เซลล์จาก distal tubule ของไตสุนัข) และ LLC-PK1 cells (เซลล์เยื่อปิวท่อไตส่วน proximal จากไตหมู) โดยให้เซลล์ได้รับออกซาลेटและแคลเซียมออกซาลेटแล้ววัดการมีชีวิตของเซลล์พบว่าเซลล์มีชีวิตลดน้อยลง วัดเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของเซลล์ และ malondialdehyde (MDA) เป็นตัวบ่งชี้เมื่อมีการบาดเจ็บจากการสร้างสารอนุมูลอิสระ พบว่าทั้ง LDH และ MDA มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าทั้งผลึกของออกซาลेटและแคลเซียมออกซาลेटทำให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์เยื่อปิวท่อไต (26) การศึกษาวิจัยใน NRK52E cells (เซลล์จาก proximal tubule ของไตหมู) ที่ได้รับผลึก hydroxyapatite สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการกระตุ้นเซลล์ให้สร้าง ROS เกิดภาวะ lipid peroxidation เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และมีการสร้าง prostaglandin E2 และ MCP-1 เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะอักเสบที่ไต (26-28) ทำให้เซลล์เยื่อปิวท่อหน่วยไตเกิดการบาดเจ็บและเศษเซลล์ที่ถูกทำลายจะกลับไปส่งเสริมให้เกิดการรวมกลุ่มกันของผลึกทำให้การติดค้างของผลึกที่ท่อไตมากขึ้น (7) มีการศึกษาในหนูที่เป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลेटพบว่า มี 8-OHdG และ NAG ในปัสสาวะสูงกว่าหนูที่ไม่เป็นนิ่ว (29)

นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาระดับโมเลกุลในผู้ป่วยโรคไตพบว่า มีปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติและมีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของเซลล์ปิวท่อไตด้วย (30) โดยสรุป ผลึกนิ่วสามารถกระตุ้นการสร้าง ROS ในเซลล์ได้ หนูทดลองที่เป็นนิ่วเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในไต และผู้ป่วยมีภาวะเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในไตของผู้ป่วยโรคไตมาก่อน

2.3 การอักเสบในไต (renal inflammation)

การอักเสบในไต คือ ภาวะที่มีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (inflammatory cell) เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณเนื้อไต (renal interstitium) กลไกในการดึงดูดเม็ดเลือดขาวจากกระแสเลือดมายังเนื้อไตที่มีการบาดเจ็บนั้นเกี่ยวข้องกับหลายกลไก ได้แก่ การกระตุ้น adhesion molecules, chemoattractants, cytokines, proinflammatory mediators และ profibrotic mediators เป็นต้น โดยเมื่อมีการบาดเจ็บเซลล์ที่ท่อไตจะหลั่งไซโตไคน์ไปดึงดูดให้ inflammatory cells ชนิด mononuclear cell ให้เข้ามาบริเวณที่มีการบาดเจ็บและกระตุ้นกระบวนการอักเสบ การศึกษาพบว่า

inflammatory cell ที่มีบทบาทสำคัญเมื่อเกิดพยาธิสภาพเนื่องจากการอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ macrophage, monocyte และ lymphocyte (31, 32)

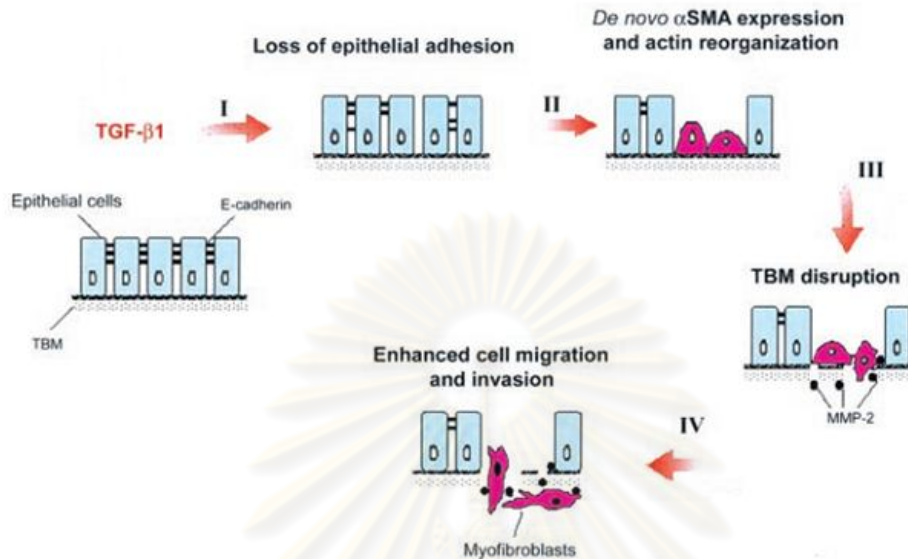
การศึกษากลไกการเกิดนี้เกี่ยวกับกระบวนการอักเสบพบว่าผลึกนิ้วสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระจึงเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันขึ้นส่งผลทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตและยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตสังเคราะห์สารตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพื่อไปดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มาเก็บกินผลึกที่ติดค้างในเนื้อไต จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์บุท่อไตด้วยแคลเซียมออกซาลาเลตโมโนไฮเดรต, ออกซาลาเลต, โฟแทสเซียมออกซาลาเลต จะทำให้เซลล์บุท่อไตบริเวณที่ผลึกนิ้วมาเกาะเกิดการบาดเจ็บ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและตายในที่สุด ทำให้มีการปล่อยเอนไซม์ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ MCP-1 mRNA และโปรตีนซึ่งเป็นเคโมไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้นด้วย (33-36) การศึกษาในหนูที่เป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลาเลตหรือมีภาวะ hyperoxaluria พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน่วยไตบริเวณที่มีผลึกนิ้วอยู่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างท่อไตลีบลง ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง มี N-acetylglucosaminidase (NAG), gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GT), alkaline phosphatase (ALP), cathepsin D, mucoproteins และ glycosaminoglycans (GAGs) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำลายเซลล์บุท่อไตในปัสสาวะสูงขึ้น และมีการสร้าง MDA ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดภาวะ lipid peroxidation เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้น และในเนื้อไตบริเวณรอบๆ ผลึกนิ้ว พบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ multinucleate giant cells และ macrophage นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะอิมมูนด้อยของผลึกแคลเซียมออกซาลาเลตมีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บบริเวณ tubulointerstitial ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย (37-41) การศึกษาวิจัยของ Boonla และคณะพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ NAG activity และ 8-OHdG ในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ แสดงว่ามีการทำลายเซลล์บุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้น นอกจากนี้ในเนื้อไตยังพบการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNAs ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้นโดยสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นในเนื้อไต และสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง (11) การศึกษาของ Evan และคณะในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เกิดจากการตัดต่อลำไส้เล็ก (intestinal bypass for obesity) พบผลึกนิ้วในท่อไตส่วน inner medullary collecting duct ซึ่งพบว่าการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตเกิดขึ้น และผู้ป่วยที่มีภาวะ distal renal tubular acidosis พบผลึกบริเวณท่อของ Bellini และ inner medullary collecting duct ซึ่งพบว่าการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตเช่นกัน

ส่วนผู้ป่วยที่เป็นนิ่ว brushite (CaHPO_4) พบการบาดเจ็บทั้งในส่วน cortex และ medulla โดยเฉพาะบริเวณที่เป็น Randall's plaque (12-14)

2.4 การเกิดพังผืดในไต (renal fibrosis)

การเกิดพังผืดในไตเกิดจากการสะสมของ extracellular matrix มากเกินไป ซึ่งพบได้บ่อยในโรคไตเรื้อรัง โดยเมื่อเกิดการบาดเจ็บที่เซลล์เยื่อบุผิวท่อไต (tubular epithelial cell injury) เซลล์จะถูกกระตุ้นให้หลั่งเคโมไคน์และไซโตไคน์ มีโปรตีนดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells เข้ามา แล้วเซลล์พวกนี้ก็จะไปกระตุ้นให้มีการหลั่ง transforming growth factor beta-1 ($\text{TGF-}\beta 1$) (42) ซึ่งจะไปกระตุ้น resident fibroblast และเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน่วยไตให้เปลี่ยนแปลงกลายเป็น myofibroblast (mesenchymal cell) โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า epithelial-mesenchymal transition (EMT) กลไก EMT นี้เริ่มจากเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน่วยไตที่ได้รับบาดเจ็บจะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ทำให้ E-cadherin ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์เยื่อบุผิวลดลง จากนั้นเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตจะเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblast (phenotype switching) โดยมีการสร้างโปรตีน alpha smooth muscle actin (α -SMA) เพิ่มมากขึ้น จากนั้นจะสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinases เพื่อย่อย tubular basement membrane ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ ไปสะสมที่บริเวณเนื้อไต (interstitium) เพื่อกลายเป็น myofibroblast โดยสมบูรณ์ ถ้ามีการสะสม myofibroblast ในปริมาณมากๆ ก็จะทำให้สังเคราะห์ matrix proteins มากขึ้น และเกิดเป็นพังผืดในที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 1 (43)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการเกิด epithelial-mesenchymal transition (EMT)

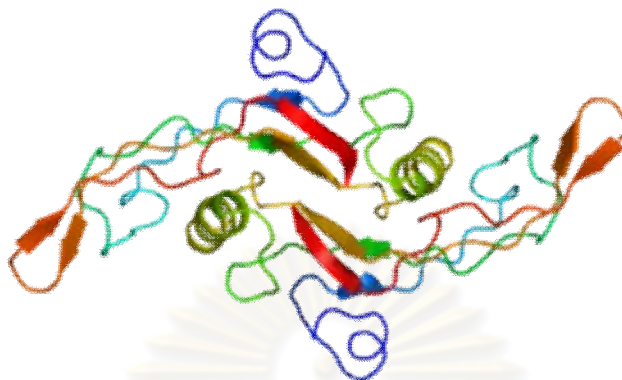
(ดัดแปลงมาจาก J Am Soc Nephrol 15:1–12,2004)

มีหลายการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า TGF-β1 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในโรคต่างๆ เช่น idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), โรคไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง, Progressive idiopathic membranous nephropathy (IMN), autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) และโรคหัวใจในถุงน้ำดี โดยจะพบการแสดงออกของ TGF-β1 สูงใน epithelial cells ของอวัยวะนั้นๆ นอกจากนี้ยังพบใน fibroblast และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cells) เช่น macrophages มากขึ้นด้วย การแสดงออกของ TGF-β1 มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ myofibroblast markers และสัมพันธ์กับระดับการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อ ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเนื้อเยื่อนั้นลดลง (44-47) การศึกษาในหนูที่มีภาวะ bladder outlet obstruction พบว่า TGF-β1 ในปัสสาวะสูงกว่าหนูในกลุ่มที่ไม่มี obstruction และนอกจากนี้มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคไตหลายชนิดซึ่งพบว่าการหลั่ง TGF-β1 ออกมาในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ เช่น ในผู้ป่วยที่เป็นโรค chronic glomerulonephritis, Type 1 diabetes mellitus, mesangial glomerulonephritis (IgAGN), progressive glomerulonephritis (RPGN), systemic lupus erythematosus (SLE) และ bladder outlet obstruction ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดพังผืดที่เนื้อไตได้ (48-51) การศึกษาในไตหนูข้างที่เกิด unilateral ureteral obstruction (UO) จะมีการแสดงออกของ TGF-β1 mRNA

และในเนื้อไต และมีปริมาณคอลลาเจนสูงขึ้น เมื่อเทียบกับไตข้างที่ไม่เกิด obstruction (52) และจากการศึกษาวิจัยในผู้ป่วยที่เป็นโรค IgA nephropathy พบเม็ดเลือดขาวเข้ามาบริเวณเนื้อไต พบการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA และการเกิดพังผืดในเนื้อไตสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มี glomerular sclerosis index ที่สูงด้วย (53) การศึกษาของ Evan และคณะในผู้ป่วยโรคนิ้วไตชนิด brushite พบผลึกนิ้วไตใน collecting duct เซลล์เยื่อบุผิวมีการบาดเจ็บและตาย ท่อไตในส่วน cortex ลีบลง (tubular atrophy) glomerulosclerosis และพบการบาดเจ็บและการเกิดพังผืดบริเวณเนื้อไตรอบๆผลึก และผู้ป่วยที่เป็นนิ่วซิสทีนพบผลึกในท่อของ Bellini, ท่อไตส่วน inner medullary collecting duct ทั้งบริเวณที่มีผลึกและไม่มีผลึกเกาะเกิดการขยายตัวส่งผลต่อการควบคุมสมดุลกรดต่างของของเหลวในเสียไป โกลเมอูลัสผิดปกติ พบการบาดเจ็บของเซลล์รอบๆเนื้อไตที่มีการอักเสบ และพบพังผืดที่เนื้อไตปริมาณมาก (12, 15)

2.5 Transforming growth factor beta -1(TGF- β 1)

TGF- β 1 เป็นโพลีเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นไซโตไคน์ ซึ่งมีหลากหลายหน้าที่ (multifunctional cytokine) เช่น ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ ควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ควบคุมการสร้าง extracellular matrix และควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis TGF- β 1 ถูกค้นพบครั้งแรกในเซลล์เกล็ดเลือดของมนุษย์ เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 2) สร้างมาจาก TGF- β 1 gene ในมนุษย์พบว่า มี 3 isoforms ได้แก่ TGF- β 1, TGF- β 2 และ TGF- β 3 โดย TGF- β 1 เป็น isoform ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดซึ่งมีบทบาทในกระบวนการ wound healing เมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อเกิดขึ้นร่างกาย จะมีกลไกกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมที่บริเวณนั้น แต่ถ้าหากมีการกระตุ้นมากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมได้ (excessive wound-healing) จะทำให้เกิดการสะสมของ extracellular matrix ซึ่งจะก่อให้เกิดพังผืดในเนื้อเยื่อในที่สุด นอกจากนี้ TGF- β 1 ยังมีบทบาทเป็น chemoattractant ในการดึงดูดโมโนไซต์และแมกโครฟาจเมื่อร่างกายมีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่สามารถหลั่ง TGF- β 1 ได้ (54) ศึกษาในหนูที่มีภาวะ hyperoxaluria พบการแสดงออกของ α -smooth muscle actin, collagen type III และ TGF- β 1 ใน tubulointerstitial (55) และยังไม่พบรายงานการศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคนิ้วไต

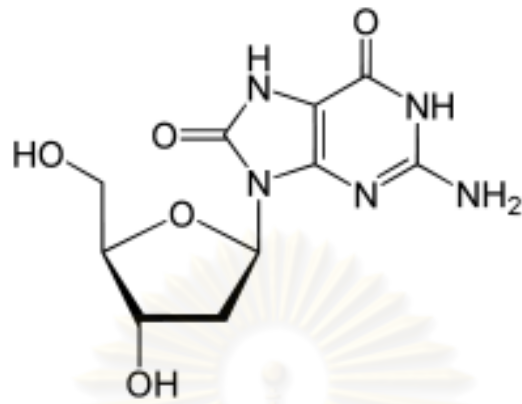


ภาพที่ 2 โครงสร้างของ TGF- β 1

2.6 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)

8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) เป็นตัวบ่งชี้ oxidative DNA damage product จากภาวะเครียดที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระ โดย ROS ทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 ของเบส deoxyguanosine บนสาย DNA จึงเกิดเป็น 8-OHdG (ภาพที่ 3) ซึ่งสามารถพบได้ในทุกเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ที่มีการสร้าง ROS จาก metabolism ของออกซิเจนภายในเซลล์ และจะถูกกำจัดก่อนที่จะมีกระบวนการ DNA replication โดยขับออกมาทางปัสสาวะ ในการสร้าง 8-OHdG สามารถทำให้เกิดกระบวนการ mutation ขึ้นได้ที่พบบ่อย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น T ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งด้วย ในสภาวะปกติ 8-OHdG เกิดจากทั้งปัจจัยภายในร่างกาย และภายนอกในร่างกาย ปัจจัยภายในร่างกายเกิดขึ้นจาก nuclear DNA และ mitochondrial DNA (mtDNA) ที่ถูกทำลายโดย ROS ที่เกิดขึ้นใน oxygen metabolism และ lipid radicals และปัจจัยภายนอกในร่างกายที่ส่งผลให้เกิด 8-OHdG มากขึ้น คือ สารกัมมันตภาพรังสี และรังสีอัลตราไวโอเล็ต พืชเคมีที่มีความเป็นพิษต่อยีน (genotoxic phytochemicals) การได้รับสารปนเปื้อนจากอาหาร อากาศและน้ำ โดยปกติร่างกายจะมีกลไกในการป้องกันตัวเองโดยมีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ ดังนั้นถ้าเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระก็จะทำให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกายได้ (56)

การศึกษาในหนูที่เป็นนิวเคลียสออกซาลิเดตพบว่าในเนื้อไตของหนูมีการแสดงออกของ 8-OHdG สูงกว่าหนูที่ไม่เป็นนิวไตแต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาในผู้ป่วยโรคไต(57)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ 8-OHdG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population)

งานวิจัยนี้ศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีก้อนนิ่วในไตจากข้อมูลภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์ (Plain KUB X-ray) เข้ารับการผ่าตัดเอานิ่วออก (open stone surgery) ณ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และ 2) กลุ่มควบคุมคนปกติ ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีสุขภาพดี โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง เป็นดังนี้

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Nephrolithiasis patients)

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

1. มีก้อนนิ่วในไตยืนยันการวินิจฉัยจากภาพถ่ายรังสีเอ็กซเรย์เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัดเอานิ่วออก
2. เพศชายหรือหญิงอายุ 18 ปีขึ้นไป

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไต และความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นๆ เช่น horseshoe kidneys, polycystic kidneys, ureteral/bladder calculi, neurogenic bladder, renal tubular acidosis และ any malignancies เป็นต้น

กลุ่มควบคุมคนปกติสุขภาพดี (Healthy controls)

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria)

1. มีอายุและเพศที่ตรงกับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไต (age- and sex-matched)
2. มีสุขภาพแข็งแรงไม่เป็นโรคใดๆ โดยประเมินจากการสัมภาษณ์ และผลการตรวจสุขภาพประจำปีของอาสาสมัคร

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria)

1. ไม่ป่วยเป็นโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น โรคนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะ โรคไต และโรคมะเร็งทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น
2. มีประวัติการเป็นนิ่วในเครือญาติ

ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

ตัวอย่างประชากรที่ใช้ศึกษาในแต่ละการทดลองเป็นดังนี้

1. การวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา

การศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG และการอักเสบโดยการย้อม Hematoxylin and eosin (H&E) staining ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตจำนวน 28 ราย เพศชาย 12 ราย (42.86 %) เพศหญิง 16 ราย (57.14%) อายุเฉลี่ย 53.67 ± 12.83 ปี

การศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 และการเกิดพังผืดในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตที่ย้อมด้วย Masson trichrome จำนวน 23 ราย เพศชาย 11 ราย (47.83%) เพศหญิง 12 ราย (52.17%) อายุเฉลี่ย 53.08 ± 13.52 ปี

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน TGF- β 1 ในปัสสาวะ โดยวิธี ELISA ศึกษาผู้ป่วยโรคไตจำนวน 24 ราย เพศชาย 8 ราย (33.33 %) เพศหญิง 16 ราย (66.66%) อายุเฉลี่ย 51.35 ± 11.68 ปี เทียบกับคนปกติจำนวน 19 ราย เป็นเพศหญิงทั้งหมด (100%) อายุเฉลี่ย 50.53 ± 7.33 ปี

3. ผลการวิเคราะห์หา TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของผู้ป่วยโรคไตจำนวน 8 ราย (%) เพศหญิง 16 ราย (66.66%) อายุเฉลี่ย 51.35 ± 1.68 ปี เทียบกับคนปกติจำนวน 19 ราย เป็นเพศหญิงทั้งหมด (100%) อายุเฉลี่ย 50.53 ± 7.33 ปี

4. กลุ่มควบคุมคนปกติสุขภาพดี (Healthy controls) จำนวน 39 ราย เพศชาย 9 ราย (23.08%) เพศหญิง 30 ราย (76.92 %) อายุเฉลี่ย 58.13 ± 11.61 ปี

ศูนย์วิทยุทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1) Autopipette 10, 100, 200, 1000 μ l และ tips	Biorad, California, USA
2) Microcentrifuge	Spectrafuge, LABNET, USA
3) pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
4) Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
5) Freezer (-80°C)	-
6) PCR machine	Biorad, California, USA
7) Tissue culture flasks 25 cm ²	Corning, New York, USA
Tissue culture flasks 75 cm ²	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
8) Pipette	Corning, New York, USA
9) Cryotube	Corning, New York, USA
10) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Scientific, Ohio, USA
11) CO ₂ Incubator	Thermo Scientific, Ohio, USA
12) Class II biohazard safety cabinet	Esco, Singapore
13) Tissue culture plates: 6-,24-,96-well	Nunclon, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA
14) Microplate reader	Biochrom anthos 2010, Cambridge, UK
15) Fluorescence plate reader	BioTek, Vermont, USA

สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1) Hematoxylin and eosin stain	C.V. laboratory,Thailand
2) Masson-trichrome stain	-
3) Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
4) 3% normal horse serum	-
5) Primary antibody -TGF- β 1 -8-OHdG	R&D system Inc., Minneapolis, USA Jaica, Shizuoka, Japan
6) Secondary antibody (peroxidase-conjugated anti-mouse antibody)	DAKO, Carpinteria, USA
7) DAB (3,3-diaminobensidine tetrahydrochloride anhydrouse)	Biocompare, South San Francisco, USA
8) Permout	Shandon consul-Mount,Thermo electron corporation, PA, USA
9) Protenase K	GE healthcare, Buckinghamshire, UK
10) Tris base	USB Ohio, USA
11) Agarose	Promega, Wisconsin, USA
12) Diethylene pyrocarbonate (DEPC)	-
13) RNA stabilizer	QIAGEN, Hilden, Germany
14) RNase-Free water	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
15) RNAspin mini RNA Isolation kit	GE healthcare, Buckinghamshire, UK Biomedical laboratory
16) Coomassie brilliant blue (CBB)	-
17) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
18) 6-carboxy-2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)	Molecular probes
19) DMSO (Dimethyl sulfoxide)	CARLO ERBA, Italy
20) Penicillin-Streptomycin solution	Hyclone Laboratories, Inc., Utah, USA
21) Trypsin/ EDTA	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การเก็บสารตัวอย่าง (Specimen collection)

1. การเก็บปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า (first morning urine)

วิธีการเก็บ คือ เมื่อมีการปวดปัสสาวะครั้งแรกหลังจากตื่นนอนในตอนเช้าให้ปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อนแล้วเก็บปัสสาวะช่วงกลางใสภาชนะปากกว้างที่ปราศจากเชื้อกับตัวอย่างปัสสาวะไว้ที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์

2. การเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (24-hr urine)

วิธีการเก็บ คือ ถ่ายปัสสาวะทิ้งไปก่อนในครั้งแรก เช่น ที่เวลา 7.00 น. (เวลาเริ่มเก็บ) แล้วเริ่มเก็บปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่จัดเตรียมไว้ให้โดยมี Thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เก็บปัสสาวะรวมกันจนครบ 24 ชั่วโมง คือ ถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นเป็นครั้งสุดท้าย ในระหว่างเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานอาหารและน้ำได้ตามปกติโดยผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เก็บตัวอย่างปัสสาวะไว้ที่ -20°C และ -80°C ก่อนการวิเคราะห์

3. การเก็บเลือด (heparinized blood)

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ plasma เก็บที่ -20°C ก่อนการวิเคราะห์

4. การเก็บเนื้อเยื่อไต (renal biopsy)

ขณะทำการผ่าตัดศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (wedge kidney biopsy) 2 ตำแหน่งคือ renal papilla บริเวณที่ใกล้กับก้อนนิ่วและ renal cortex เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อใส่ลงในหลอดที่มี 10% formalin buffer 15 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปตัดลงบนสไลด์

5. ตัวอย่างก้อนนิ่ว (kidney stone)

ภายหลังการผ่าตัดศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะเก็บตัวอย่างก้อนนิ่วได้ทั้งหมดใส่ในขวดเก็บก้อนนิ่วเก็บตัวอย่างปัสสาวะไว้ที่ 4°C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาชนิดของนิ่ว

2. วิธีวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินินในพลาสมาและปัสสาวะใช้หลักการของ Jaffe ซึ่งเป็น Modified picric acid method (58)

2. การคำนวณค่าอัตราการกรองที่ไต (estimate glomerular filtration rate : eGFR)

วิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีนในพลาสมา คำนวณค่า eGRF ตามสูตรของ Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) เสนอโดย Levey และคณะ สมการเป็นดังนี้ (59)

เพศ	Serum Creatinine $\mu\text{mol/L}$ (mg/dL)	สูตรคำนวณ
ชาย	≤ 62 (≤ 0.7)	$\text{GFR} = 144 \times (\text{Scr}/0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	> 62 (> 0.7)	$\text{GFR} = 144 \times (\text{Scr}/0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$
หญิง	≤ 80 (≤ 0.9)	$\text{GFR} = 141 \times (\text{Scr}/0.9)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{Age}}$
	> 80 (> 0.9)	$\text{GFR} = 141 \times (\text{Scr}/0.9)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}}$

Scr คือ serum creatinine (mg/dl)

Age คือ อายุ (ปี)

3. การวิเคราะห์อันตรกิริยาของเอนไซม์ NAG ในปัสสาวะ (urinary NAG activity) หลักการคือ substrate p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide ทำปฏิกิริยา hydrolysis กับ เอนไซม์ N-acetyl- β -D-glucosaminidase ที่ 37°C วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (60)

4. การวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะโดยใช้วิธี dye binding method หลักการคือ สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 dye ใน acidic solution ซึ่งปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max} อยู่ที่ 465 นาโนเมตรโดยเป็นสารสีแดงแต่เมื่อจับกับโปรตีนจะเปลี่ยน λ_{max} เป็น 595 นาโนเมตร ให้สารละลายเป็นสีฟ้า (61)

5. วิเคราะห์ชนิดของนิ่วโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared spectrometry (FTIR) แบ่งชนิดของนิ่วเป็น 3 กลุ่ม ตามแร่ธาตุส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ calcium oxalate (CaOx), calcium phosphate (CaP) และ uric acid (UA) stones

6. การวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (Histological stainings)

6.1 Hematoxylin and eosin (H&E) staining ใช้สำหรับประเมินระดับการอักเสบในเนื้อเยื่อไต

Deparaffinization โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อ แช่ใน xylene โถละ 3 นาทีจำนวน 3 โถ จากนั้นนำสไลด์ จุ่มใน 95 % alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 3 โถ แล้วล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที ขั้นตอนการย้อมสี แช่สไลด์ในโกสียีน hematoxylin 5 นาที แล้วล้างน้ำประปา 5 นาที แล้วแช่ใน 0.01% lithium carbonate 10 วินาที ล้างน้ำประปา 5 นาที แล้วจุ่มใน 95% alcohol 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีตามด้วยแช่ในโกสียีน eosin 5 นาที แล้วจุ่มใน 95% alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ แล้วตามด้วย absolute alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ จากนั้นจุ่มใน xylene โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ และ mount slide ด้วย per mount (Shandon consul-Mount, Thermo electron corporation, USA)

พยาธิแพทย์เป็นผู้ประเมินระดับการอักเสบในเนื้อเยื่อไต โดยใช้เกณฑ์ในการประเมินเป็นดังนี้
negative หรือ no inflammation: มี infiltrated cells 0-5 %, 1+: 6-25 %, 2+: 26-50 %, 3+: 51-75 % และ 4+: 76-100 % โดยคิดพื้นที่เนื้อไตทั้งหมดเป็น 100 %

6.2 ศึกษาการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไต

Deparaffinization โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ใน xylene โถละ 3 นาทีจำนวน 3 โถ จากนั้นนำสไลด์จุ่มใน 95 % alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 3 โถ แล้วล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที

ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที แล้วนำไปใส่ใน Bouin's solution จากนั้นนำไป incubate ในตู้อบ 56 °C 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ล้างน้ำประปา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปจุ่มใน Weigert's iron hematoxylin 10 นาที ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที จากนั้นนำไปย้อมใน Biebrich scarlet/ acid fuchsin 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที แล้วจุ่มในสารละลาย phosphotungstic phosphomolybdic acid 5 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น 30 วินาที counterstain ด้วย aniline blue 8 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น 30 วินาที ตามด้วยแช่ใน 1% acetic acid solution 1 ครั้งนาน 10 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที Dehydrate ด้วยการนำไปอบในตู้อบ 56 °C 5 นาที และ mount slide ด้วย per mount คำนวณร้อยละของพื้นที่ที่เกิดพังผืด (% fibrotic area) โดยการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณปริมาณการติดสีฟ้าของคอลลาเจนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ตามวิธีของ Zeisberg และคณะ (62)

การติดสี nucleus : ดำ, cytoplasm : ชมพู, muscle : แดง และ collagen : เขียวหรือน้ำเงิน

6.3 Immunohistochemical staining สำหรับตรวจการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไต โดยใช้ specific antibodies

Deparaffinization โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ใน xylene โถละ 3 นาทีจำนวน 3 โถ จากนั้นนำสไลด์จุ่มใน 95 % alcohol โถละ 10 ครั้งๆละ 1 วินาทีจำนวน 3 โถ แล้วล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จากนั้นทำ antigen retrieval แช่สไลด์ใน citrate buffer pH 6.0 แล้วนำไปใส่ใน microwave โดยใช้กำลังไฟสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 6 ครั้ง (ระวังอย่าให้เดือด) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำลาย endogenous peroxidase activity โดยแช่สไลด์ใน 3% H₂O₂ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย 3% normal horse serum (ละลายใน PBS) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด (200 ul) 1:200 8-OHdG antibody (Clone N45.1, JaiCA) ลงบนสไลด์ แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 °C หรือ 1:50 TGF- β 1 antibody (Clone 9016, R&D system, USA) incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 4 °C นำสไลด์มาล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วหยด secondary antibody (peroxidase- conjugated anti-mouse antibody) (DAKO, Carpinteria, USA) และ incubate เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ขั้นตอนการย้อมสี หยดสารละลาย DAB (ละลายใน Tris buffer pH 7.4) ลงไปแล้ว incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ขั้นตอนการย้อมสีของ TGF- β 1 ใช้ VECTOR SG substrate kit) ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที counterstain ด้วย Mayer's hematoxylin solution 4-5 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที แล้วจุ่มใน 95% alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ แล้วตามด้วย absolute alcohol โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ จากนั้นจุ่มใน xylene โถละ 10 ครั้งๆ ละ 1 วินาทีจำนวน 2 โถ และ mount slide ด้วย per mount

การแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไต พยาธิแพทย์เป็นผู้ประเมินการแสดงออกของ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อไต โดยใช้เกณฑ์ในการประเมินเป็นดังนี้ 0: ไม่มีการแสดงออกของ 8-OHdG 1+: มีการแสดงออกของ 8-OHdG 1-25 % 2+: มีการแสดงออกของ 8-OHdG 26-50% 3+: มีการแสดงออกของ 8-OHdG 51-75% และ 4+: มีการแสดงออกของ 8-OHdG 76-100 % โดยคิดพื้นที่เนื้อไตทั้งหมดเป็น 100% และการแสดงออกของ TGF- β 1 ในชิ้นเนื้อไต แบ่งระดับการแสดงออกของ TGF- β 1 เป็น negative, low expression (1+), moderate expression (2+) และ high expression (3+)

7. การตรวจสอบการแสดงออกของ TGF- β 1 ในปัสสาวะ

7.1 ตรวจสอบการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells

ศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ในปัสสาวะ เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 12 ชั่วโมงจากผู้ป่วยโรคนี้ไตที่มาสลายเนื้อที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 8 ราย และกลุ่มควบคุมคนปกติ จำนวน 11 ราย นำปัสสาวะ 12 ชั่วโมงมาสกัดแยกเอา total RNA โดยใช้ชุดสกัด RNASpin mini RNA Isolation kit (GE healthcare, UK) ตรวจสอบปริมาณ RNA ที่สกัดแยกได้โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร นำมาหาอัตราส่วนของทั้งสองค่าเปรียบเทียบกับปริมาณค่าอัตราส่วนที่ได้ โดยค่าอัตราส่วนที่ได้อาจอยู่ในช่วง 1.7-2.1

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR ขั้นตอน RT (cDNA synthesis) ใช้ Random Hexamer Primer โดย Denaturation ที่อุณหภูมิ 65°C, 10 นาที แล้วเติม Prime RT premix (2x) ลงไป 10 μ l ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 40°C, 60 นาที และ Inactivate Reverse Transcriptase ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที ขั้นตอน PCR ใช้ Primers ที่จำเพาะต่อ cDNA ของ TGF- β 1 และ GAPDH (ตารางที่ 2) ภายใต้สภาวะ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C, 4 นาที ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C, 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56°C, 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72°C, 30 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย Final Extension ที่อุณหภูมิ 72°C, 7 นาที และ Hold ที่อุณหภูมิ 4°C ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ว่าเป็นส่วนของยีน TGF- β 1 หรือไม่ โดยการทำให้ gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel เปรียบเทียบระดับการแสดงของ TGF- β 1 ในแต่ละตัวอย่าง โดย normalized ด้วย ระดับการแสดงของ GAPDH (semi-quantitative RT-PCR)

ตารางที่ 2 แสดง primers ที่ใช้ในการศึกษา

Targets	Forward primer	Reverse primer	Melting temperature (T _m) (°C)	Amplicon size (bp)
TGF- β 1	5'-TGGACATCAACGGGTTCCAC-3'	5'-TCTTCTCCGTGGAGCTGAAG-3'	60.37/60.67	174
GAPDH	5'-CCTCCTGTTCGACAGTCAGC-3'	5'-CTGGAAGATGGTATGGGAT-3'	61.02/59.74	300

8. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน TGF- β 1 ในปัสสาวะ โดยวิธี ELISA (Quantikine, R&D Systems, USA) กระตุ้น TGF- β 1 latent form โดย 1 N HCl แล้วทำให้เป็นกลางโดยเติม 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES แล้วเติม Assay Diluent ลงในหลุมที่มีสารตัวอย่างและ standard ที่ความเข้มข้น 0, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml incubate 2 ชั่วโมงที่

อุณหภูมิห้อง เติม Conjugate incubate 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เติม substrate solution incubate 30 นาทีในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม stop solution วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เทียบค่าความถูกต้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

9. การเพาะเลี้ยง HK-2 cells

เพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ (Human proximal tubular cell line, HK-2 cells) โดยนำ HK-2 cells มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/high glucose ที่มี 10% fetal bovine serum และ 0.1% streptomycin/penicillin ในตู้บัพ 37 °C, 5% CO₂ โดยต้องเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทุก 2 วัน

9.1 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธี MTT colorimetric assay

หลักการ คือ ในเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) เอนไซม์ reductase ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial reductases) จะเปลี่ยน MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง ให้เป็น formazan salt ซึ่งเป็นสารสีม่วง ขณะที่เซลล์ตายไม่สามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้ วิธีทำโดยย่อ คือ เพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้นที่ 10,000 เซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนเซลล์เจริญเต็มหลุม (80-90% confluence) จากนั้นเตรียมสารละลาย COM สำหรับใส่ในแต่ละหลุมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (serum-free condition) หลุมละ 300 ไมโครลิตร (dose-dependent experiment) แล้วนำไปบัพในตู้บัพที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเติม MTT 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายใน serum-free DMEM) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรและนำไปบัพในตู้บัพ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) (100%) ลงไป 100 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตกและละลายสาร formazan จากนั้นเขย่า 5-10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

สำหรับ time-dependent experiment เลี้ยงเซลล์ตามที่กล่าวข้างต้น เติมผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร แล้ว incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนที่กล่าวข้างต้น

การคำนวณหา % cell survival

$$\% \text{ cell survival} = (\text{OD}_{\text{test}} \times 100) / \text{OD}_{\text{control}}$$

OD_{test} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่ใส่ผลึก COM

OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ไม่ใส่ผลึก COM

9.2 การตรวจวัดระดับ ROS production ในเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DCFH-DA

วัดปริมาณการผลิต ROS โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดย ROS ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์จะเปลี่ยน DCFH-DA เป็น DCF ซึ่งเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ แสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นบ่งถึงปริมาณ ROS ในเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยง HK-2 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well black plate) โดยแต่ละหลุมมีเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ แล้วเติม DCFH-DA 0.1 มิลลิโมลาร์ (ละลายใน serum-free DMEM) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ผลึก COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร (serum-free condition) หลุมละ 300 ไมโครลิตร (dose-dependent experiment) แล้วนำไปอบในตู้อบ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นนำไปวัด fluorescent intensity โดยกำหนด excitation ที่ 485 นาโนเมตร และ emission ที่ 535 นาโนเมตร คำนวณค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU) จากการนำค่า fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ (t_x) หารด้วยค่า fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น (t_0)

การคำนวณหาค่า Arbitrary fluorescent unit (AFU)

$AFU = \text{fluorescent intensity ที่เวลาใดๆ } (t_x) / \text{fluorescent intensity ที่เวลาเริ่มต้น } (t_0)$

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) หรือ interquartile range (IQR) สำหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ความถี่และร้อยละสำหรับตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) โดยนำเสนอในรูปแบบของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

- Two-samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- ANOVA test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยหลายกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Chi-Square test ใช้สำหรับตรวจสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Spearman' s rank correlation test ใช้สำหรับหาสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions) ของ parametric tests ที่กล่าวมาข้างต้น จะใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ SPSS version 16.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษานี้มีประชากรเข้าร่วมโครงการทั้งหมด 67 ราย แบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 28 ราย และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 39 ราย ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Nephrolithiasis patients) ประกอบด้วยเพศชาย 12 ราย (42.86 %) เพศหญิง 16 ราย (57.14 %) อายุเฉลี่ยเท่ากับ 53.67 ± 12.83 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 24-73 ปี และกลุ่มควบคุมคนปกติสุขภาพดี (Healthy controls) เป็นเพศชาย 9 ราย (23.08%) เพศหญิง 30 ราย (76.92 %) อายุเฉลี่ย 58.13 ± 11.61 ปี ช่วงอายุระหว่าง 39-79 ปี ค่าเฉลี่ยของดัชนีมวลกาย (Body Mass Index : BMI) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมเท่ากับ 24.60 ± 5.23 และ $23.28 \pm 3.32 \text{ kg/m}^2$ ตามลำดับ จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าอายุ ($P = 0.334$) เพศ ($P = 0.085$) และ BMI ($P = 0.239$) ของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมเท่ากับ (median (IQR)) 1200.00 (200.00) และ 1380.00 (1091.50) ml ตามลำดับ จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของ 2 กลุ่มตัวอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.54$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมโดยมี เพศ อายุ ดัชนีมวลกายและปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

	กลุ่มตัวอย่าง		P value
	ผู้ป่วยโรคนิ่วไต	คนปกติ	
จำนวน (ราย)	28	39	
เพศ			0.085
- ชาย	12 (42.86%)	9 (23.08%)	
- หญิง	16 (57.14%)	30 (76.92%)	
อายุ (ปี)(mean \pm SD)	53.67 \pm 12.83	58.13 \pm 11.61	0.334
BMI (kg/m ²) (mean \pm SD)	24.60 \pm 5.23	23.28 \pm 3.32	0.239
ปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (ml) median(IQR)	1200.00 (200.00)	1380.00 (1091.50)	0.540

การศึกษาพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

การศึกษากการแสดงออกของ 8-OHdG และการอักเสบโดยการย้อม Hematoxylin and eosin (H&E) staining ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 28 รายเพศชาย 12 ราย (42.86 %) เพศหญิง 16 ราย (57.14 %) อายุเฉลี่ย 53.67 \pm 12.83 ปี BMI 24.60 \pm 5.23 kg/m² เนื้อเยื่อควบคุมได้มาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งไตบริเวณที่ไม่เกิดมะเร็งจำนวน 3 รายจากภาคพยาธิวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

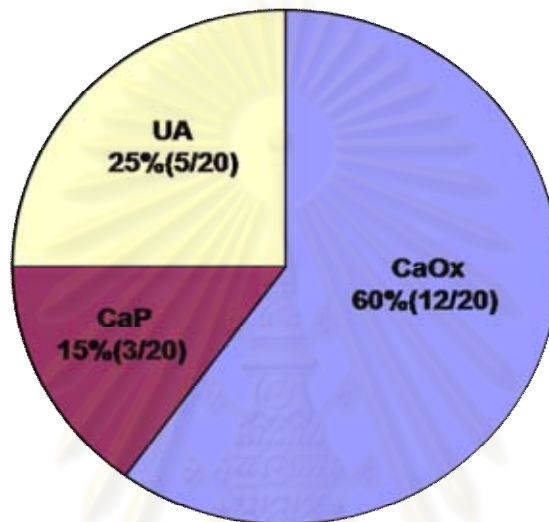
การศึกษากการแสดงออกของ TGF- β 1 และการเกิดพังผืดในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ย้อมด้วย Masson trichrome จำนวน 23 รายเพศชาย 11 ราย (47.83%) เพศหญิง 12 ราย (52.17%) อายุเฉลี่ย 53.08 \pm 13.52 ปี BMI 24.52 \pm 5.59 kg/m² (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ใช้ในการศึกษาพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไต

n	Code	age (years)	Gender	BMI (kg/m ²)	24-hr urine volume (ml)	Plasma creatinine (mg/dl)	eGFR (ml/min/1.73m ²)
1	RKT 116	71	1	20.45	600	1.23	58.7
2	RKT 117	73	1	24.97	1100	1.17	61.5
3	RKT 119	26	2	21.78	2100	1.03	75.2
4	RKT 121	67	1	23.88	600	1.05	73.1
5	RKT 124	65	1	28.96	1000	1.52	47.4
6	RKT 130	53	1	ND	900	0.80	102
7	RKT 131	37	2	17.93	1200	2.40	25
8	RKT 132	52	1	28.03	2200	1.15	72.8
9	RKT 133	63	2	20.89	1200	1.05	56.7
10	RKT 134	72	1	15.57	1500	1.07	69
11	RKT 148	49	2	21.30	1200	1.22	52.1
12	RKT 149	48	2	23.11	2200	0.92	73.9
13	RKT 154	56	1	ND	1000	0.82	98.9
14	RKT 155	52	1	19.14	1200	0.86	99.7
15	RKT 165	53	2	23.81	1100	1.14	55
16	RKT 166	47	2	24.44	3300	0.86	80.7
17	RKT 168	54	2	26.22	1200	1.60	36.3
18	RKT 172	24	1	23.61	1200	3.16	26.1
19	RKT 173	58	1	24.75	1300	0.88	94.7
20	RKT 174	49	2	38.81	1200	1.20	53.2
21	RKT 175	36	2	26.63	1200	1.26	54.9
22	RKT 176	63	2	21.76	1000	1.00	60.1
23	RKT 177	60	2	37.78	1200	1.02	59.9
24	RKT 181	42	2	22.31	1200	1.30	50.7
25	RKT 182	ND	2	ND	1200	ND	ND
26	RKT 187	53	2	27.56	1000	2.41	22.4
27	RKT 188	68	2	27.77	1000	1.51	35.3
28	RKT 190	58	1	23.44	1200	4.56	13.2

หมายเหตุ Gender 1 คือ เพศชาย, 2 คือ เพศหญิง, ND คือ ไม่มีข้อมูล

การศึกษานี้สามารถเก็บตัวอย่างก้อนนิ่วจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง วิเคราะห์ชนิดของนิ่วโดยวิธี FTIR พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ (60%, 12/20) เป็นนิ่วที่มีแคลเซียมออกซาลาเลต 15% (3/20) เป็นนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต และ 25% (5/20) เป็นนิ่วกรดยูริก (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 แสดงชนิดของนิ่วที่พบในผู้ป่วยโรคนี้ไว้ พบว่าผู้ป่วยโรคนี้ไว้เป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลาเลต 60% (12/20) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต 15% (3/20) และนิ่วกรดยูริก 25% (5/20)

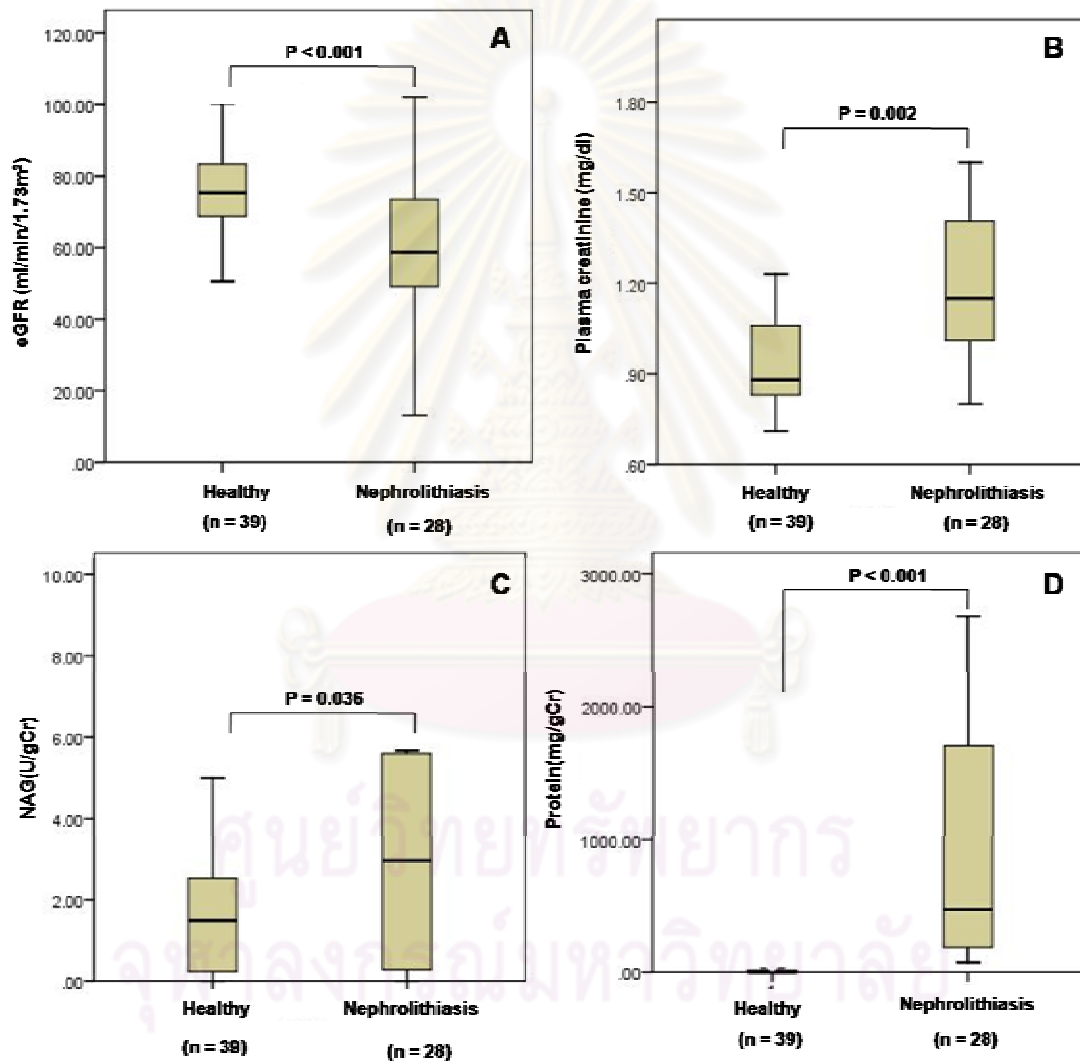
CaOx = แคลเซียมออกซาลาเลต CaP = แคลเซียมฟอสเฟต UA = กรดยูริก

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไตและภาวะการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไต

ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไตจากระดับครีเอทีนีนในเลือด (Plasma Creatinine : P-Cr) และอัตราการกรองที่ไต (estimate Glomerular Filtration Rate : eGFR) ผลการวิเคราะห์พบว่า Plasma Creatinine ของผู้ป่วยโรคนี้ไว้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.15 (0.51) vs. 0.88 (0.23) mg/dl, $P < 0.001$) และ eGFR ของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR) : 58.70 (31.65) vs. 75.30 (17.25) mg/dl, $P = 0.002$) (ภาพที่ 5)

การศึกษานี้ใช้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ N-acetyl glucosaminidase (NAG activity) และระดับโปรตีนในปัสสาวะเป็นตัวบ่งชี้การทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไต ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไว้มีค่า NAG activity ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median

(IQR) : 2.97 (5.43) vs. 1.49 (2.44) U/gCr ,P = 0.036) และระดับโปรตีนในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (median (IQR) : 471.66 (1542.55) vs. 22.96 (17.95) mg/gCr ,P < 0.001) (ภาพที่ 5) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำกว่า ขณะที่มีการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมคนปกติ



ภาพที่ 5 แสดงอัตราการกรองที่ไต (eGFR), plasma creatinine, NAG activity และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้วไตเปรียบเทียบกับคนปกติ ภาพ A eGFR ของผู้ป่วยโรคนี้วไตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพ B plasma creatinine ของผู้ป่วยโรคนี้วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพ C และ D ผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่า NAG activity และระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

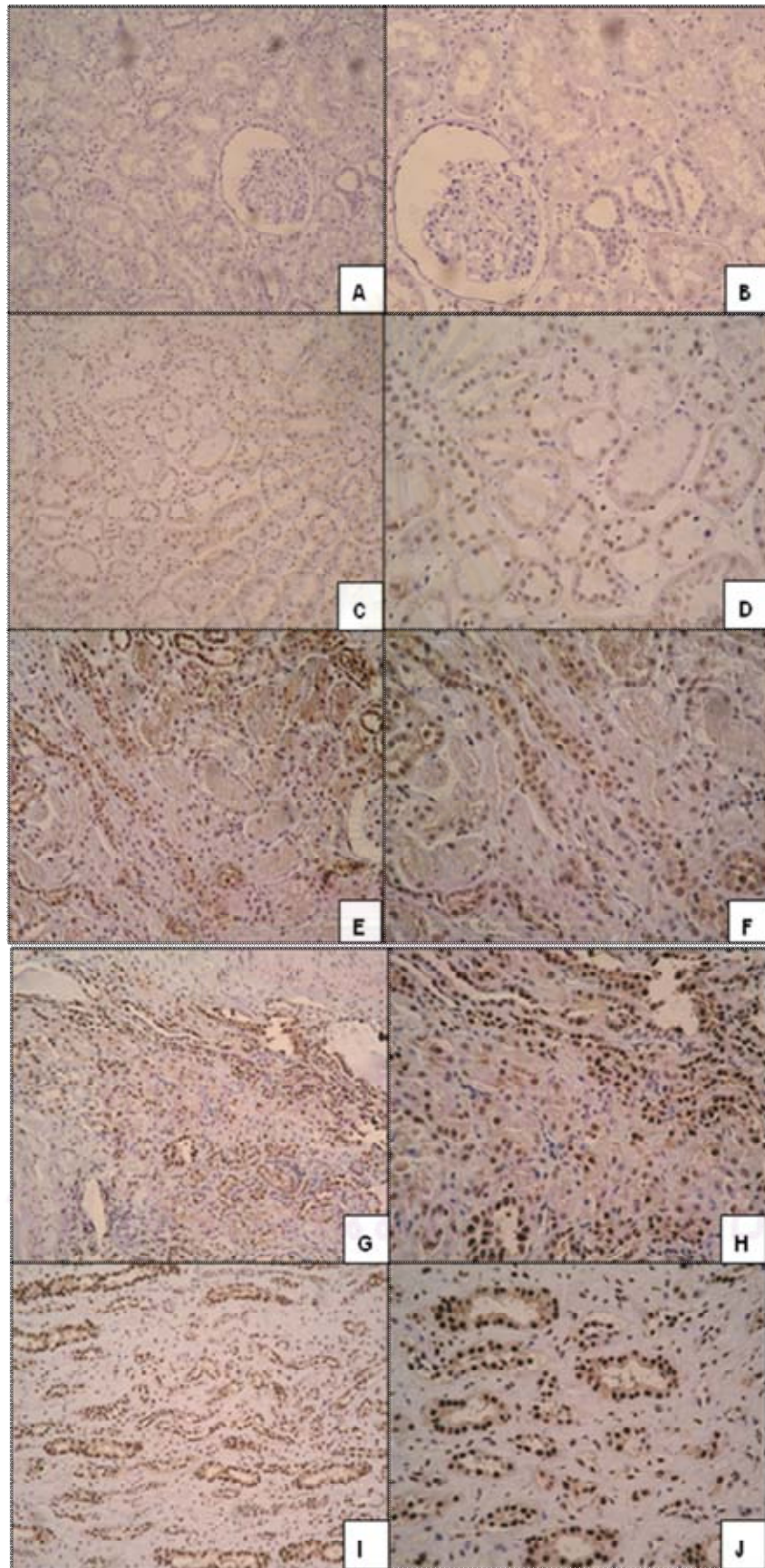
การศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

การศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต จำนวน 28 ราย โดยการย้อม immunohistochemistry ผลการวิเคราะห์ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกของ 8-OHdG เป็น 4+ (46.43%, 13/28) มีผู้ป่วยเพียงรายเดียว (3.57%, 1/28) ที่ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (ตารางที่ 5) เนื่องจาก 8-OHdG เป็น oxidative DNA damage product ดังนั้น ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

ตารางที่ 5 ระดับการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

จำนวนผู้ป่วยโรคไต (%) (n=28)	เกรด
1 (3.57)	0
4 (14.29)	1+
4 (14.29)	2+
6 (21.43)	3+
13 (46.43)	4+

ตำแหน่งแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไต คือ ในนิวเคลียสของเซลล์บุผิวท่อไตส่วนต้น (proximal tubular cells), ส่วนปลาย (distal tubular cells) และเซลล์บุผิวท่อไตรวม (collecting ducts) (ภาพที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG หรือมีการแสดงออกน้อยมาก (weak) ในเซลล์บุผิวท่อไตรวม ดังแสดงในภาพที่ 6

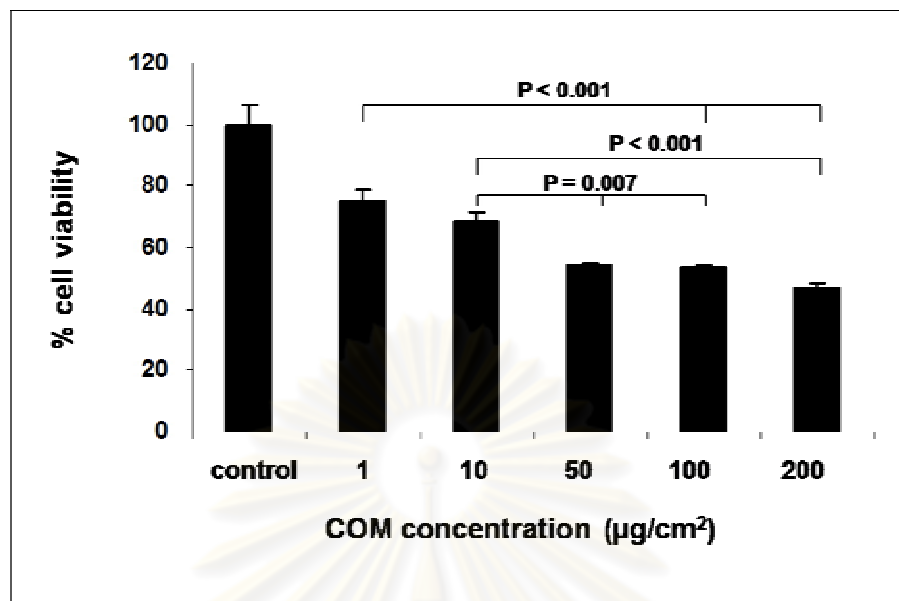


ภาพที่ 6 การแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม เนื้อเยื่อไตควบคุมได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerous region ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG หรือแสดงออกในระดับต่ำ (A, B) มีการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นตั้งแต่ระดับ 1+–4+ ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต (C, D: 1+, E, F: 2+, G, H: 3+, I, J: 4+) โดยพบตำแหน่งแสดงออกของ 8-OHdG ในนิวเคลียสของเซลล์บุผิวท่อไต ภาพ A, C, E, G, I กำลังขยาย 200x, ภาพ B, D, F, H, J กำลังขยาย 400x

การศึกษาผลของผลึก COM ต่อการมีชีวิต (cell viability) และปริมาณการผลิต ROS ของ HK-2 cells

เนื่องจากผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้นในเซลล์บุผิวท่อไตของผู้ป่วยโรคไต ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าผลึกนี้ในปัสสาวะโดยเฉพาะผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) สามารถกระตุ้นให้เซลล์บุผิวท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น reactive oxygen species (ROS) สูงขึ้น เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด

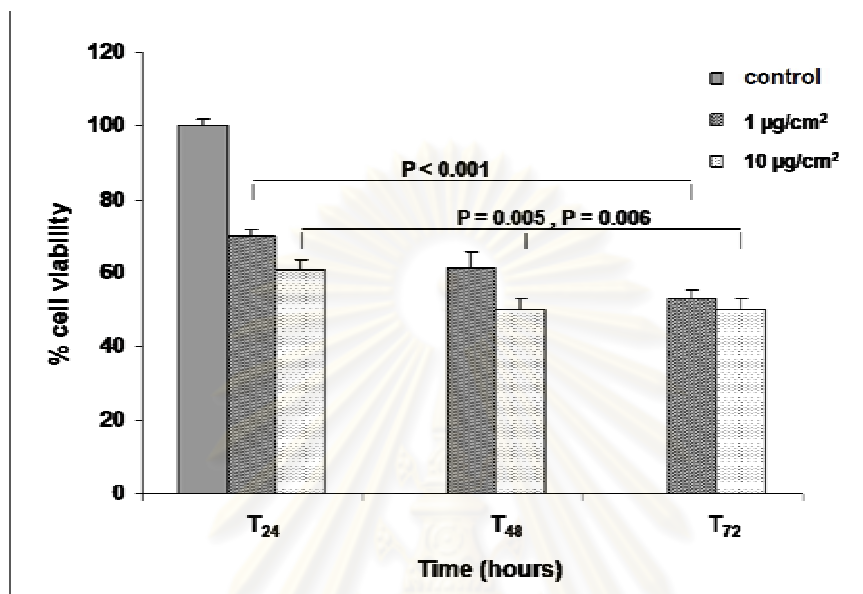
ผลการทดลอง cell viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเซลล์มีชีวิต (% cell viability) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ในทุกความเข้มข้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ COM (100% cell viability) (ภาพที่ 7) โดยมีค่า % cell viability เท่ากับ $75.47 \pm 3.34\%$ ($P < 0.001$), $69.02 \pm 2.27\%$ ($P < 0.001$), $54.00 \pm 0.86\%$ ($P < 0.001$), $53.46 \pm 0.74\%$ ($P < 0.001$) และ $47.31 \pm 1.48\%$ ($P < 0.001$) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าผลึก COM มีผลต่อการลดลงของเซลล์มีชีวิต (HK-2, renal proximal tubular cells) แบบ dose-dependent manner หรืออาจกล่าวได้ว่าผลึก COM มีผลทำให้ HK-2 cells ตายมากขึ้น (cytotoxic effect) ตามปริมาณความเข้มข้นของผลึก COM ที่ได้รับ



ภาพที่ 7 MTT assay เพื่อทดสอบ viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 µg/cm² เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (dose-dependent experiment) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ได้รับ COM พบว่า % cell viability ของ COM-treated HK-2 cells ในทุกความเข้มข้นของ COM ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

ผลการศึกษาผลของ COM ต่อ HK-2 cell viability แบบ time-dependent manner พบว่า ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง HK-2 cells ที่ได้รับ COM 1 µg/cm² มี % cell viability ลดลงเป็น $69.77 \pm 2.07\%$ ($P < 0.001$), $61.51 \pm 4.44\%$ ($P < 0.001$) และ $53.40 \pm 1.94\%$ ($P < 0.001$) ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (control, 100% cell viability) เช่นเดียวกันที่ความเข้มข้น 10 µg/cm² พบว่า % cell viability ลดลงเป็น $61.09 \pm 2.67\%$ ($P < 0.001$), $50.13 \pm 3.09\%$ ($P < 0.001$) และ $49.96 \pm 3.38\%$ ($P < 0.001$) ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม นอกจากนี้ความเข้มข้นของ COM ที่ 1 µg/cm² ณ เวลา 72 ชั่วโมง มี % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ COM ความเข้มข้นเดียวกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง ($P < 0.001$) และเมื่อเซลล์ได้รับ COM 10 µg/cm² เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มี % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ COM ความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งที่เวลา 24 ชั่วโมง ($P = 0.006$) และ 48 ชั่วโมง ($P = 0.005$) (ภาพที่ 8) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์สัมผัส COM เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงหรือเซลล์

ตายมากขึ้น เนื่องจากการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ ส่งผลโดยตรงต่อการตายของเซลล์ ผู้วิจัยต้องการพิสูจน์ต่อไปว่า COM ส่งผลต่อการสร้าง ROS ในเซลล์หรือไม่

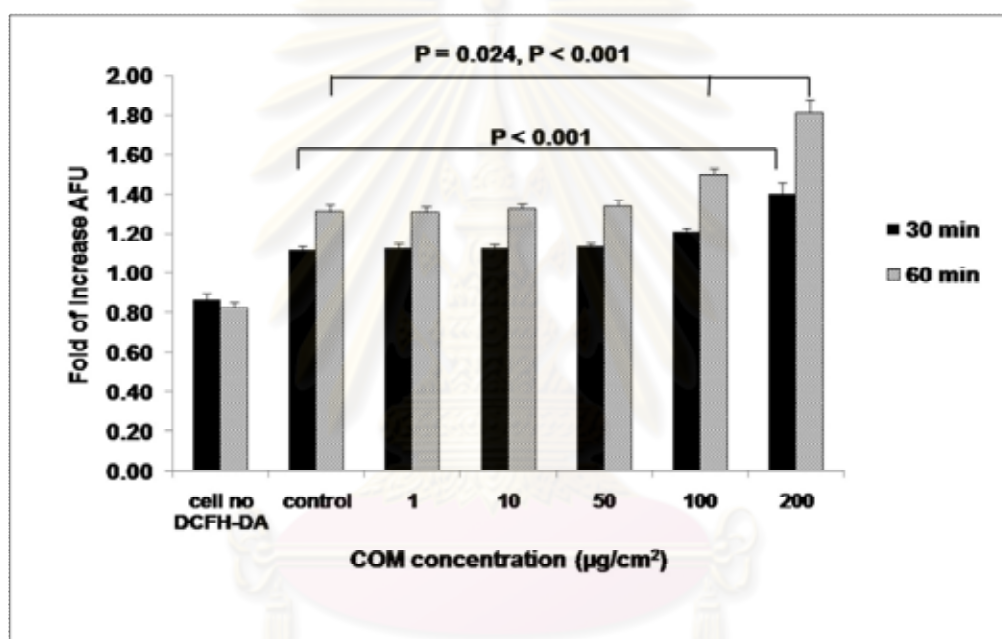


ภาพที่ 8 MTT assay ทดสอบ viability ของ HK-2 cells เมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/cm² ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (time-dependent experiment) เมื่อเทียบกับ control (100% cell viability) พบว่า % cell viability ของ COM-treated HK-2 cells ลดลงในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$) โดยที่ความเข้มข้น 1 µg/cm² ที่เวลา 72 ชั่วโมง % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่เวลา 24 ชั่วโมง ($P < 0.001$) และที่ความเข้มข้น 10 µg/cm² ที่เวลา 72 ชั่วโมง % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ($P = 0.005, P = 0.006$)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต ROS ใน HK-2 cells เมื่อเซลล์ได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 200 µg/cm² ณ เวลา 30 และ 60 นาที พบว่า HK-2 cells เมื่อได้รับผลึก COM ในปริมาณที่มากขึ้นจะให้ค่า Fluorescence intensity (บ่งชี้ถึงปริมาณการสร้าง ROS ภายในเซลล์) เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ control (เซลล์ไม่ได้รับ COM) แสดงว่า COM มีผลต่อการผลิต ROS ใน HK-2 cells ค่า AFU (Arbitrary fluorescent unit) ของ COM-treated HK-2 cells ณ เวลา 30 นาที เพิ่มขึ้นจาก 1.12±0.02 (ไม่มี COM) เป็น 1.13±0.02, 1.13±0.02, 1.14±0.02, 1.21±0.02 และ 1.40±0.06 AFU ตามลำดับความเข้มข้นของ COM และ ณ เวลา 60 นาที

เพิ่มขึ้นจาก 1.31 ± 0.04 (ไม่มี COM) เป็น 1.31 ± 0.03 , 1.33 ± 0.02 , 1.34 ± 0.03 , 1.50 ± 0.03 และ 1.81 ± 0.07 AFU ตามลำดับความเข้มข้นของ COM

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ณ เวลา 30 นาที ที่ความเข้มข้น $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ มีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control ($P < 0.001$) และ ณ เวลา 60 นาที ทั้งที่ความเข้มข้น 100 ($P = 0.024$) และ 200 ($P < 0.001$) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ มีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและเวลาที่ HK-2 cells ได้รับผลึก COM (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลของ COM ต่อการผลิต ROS ใน HK-2 cells ค่า fluorescence intensity (บ่งชี้ถึงปริมาณการสร้าง ROS ภายในเซลล์) เพิ่มขึ้นตามปริมาณ COM และตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดย ณ เวลา 30 นาที ความเข้มข้นของ COM ที่ $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ เพิ่มปริมาณการผลิต ROS สูงขึ้นจากเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับ COM (control) อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ ณ เวลา 60 นาที ความเข้มข้นของ COM ที่ 100 และ $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ เพิ่มปริมาณการผลิต ROS สูงขึ้นจาก control อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการผลิต ROS ใน COM-treated HK-2 cells เป็นทั้งแบบ dose- และ time-dependent manners

การศึกษาภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

ภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตตรวจสอบโดยวิธี H&E staining โดยประเมินจากปริมาณเม็ดเลือดขาวที่พบในท่อไตและบริเวณเนื้อไต (leukocyte infiltration) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคไตทั้งหมด 28 ราย พบ no inflammation จำนวน 9 ราย (32.14%) 1+ จำนวน 6 ราย (21.43 %) 2+ จำนวน 3 ราย (10.71 %) 3+ จำนวน 6 ราย (21.43 %) และ 4+ จำนวน 4 ราย (14.29 %) ดังแสดงในตารางที่ 6

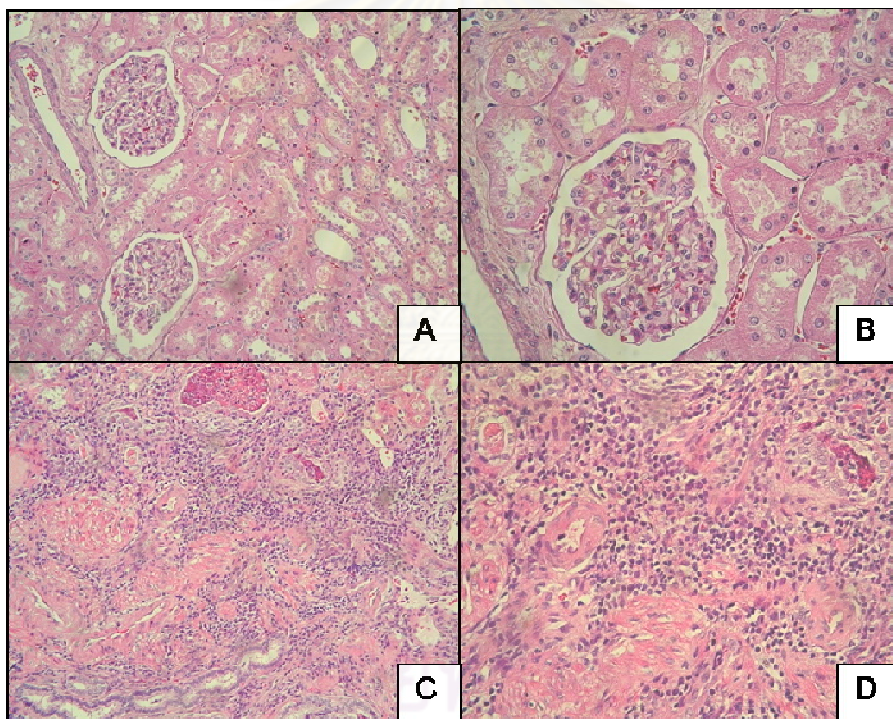
ตารางที่ 6 แสดงภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตจากการย้อม H&E พบว่าผู้ป่วยโรคไต 67.86 % (19/28) มีการอักเสบตั้งแต่ระดับ 1+-4+ และมีผู้ป่วย 32.14 % (9/28) ที่ไม่พบการอักเสบในเนื้อเยื่อไต (no inflammation)

จำนวนผู้ป่วยโรคไต (%) n = 28	Inflammation grading
9 (32.14)	No inflammation
6 (21.43)	1+
3 (10.71)	2+
6 (21.43)	3+
4 (14.29)	4+

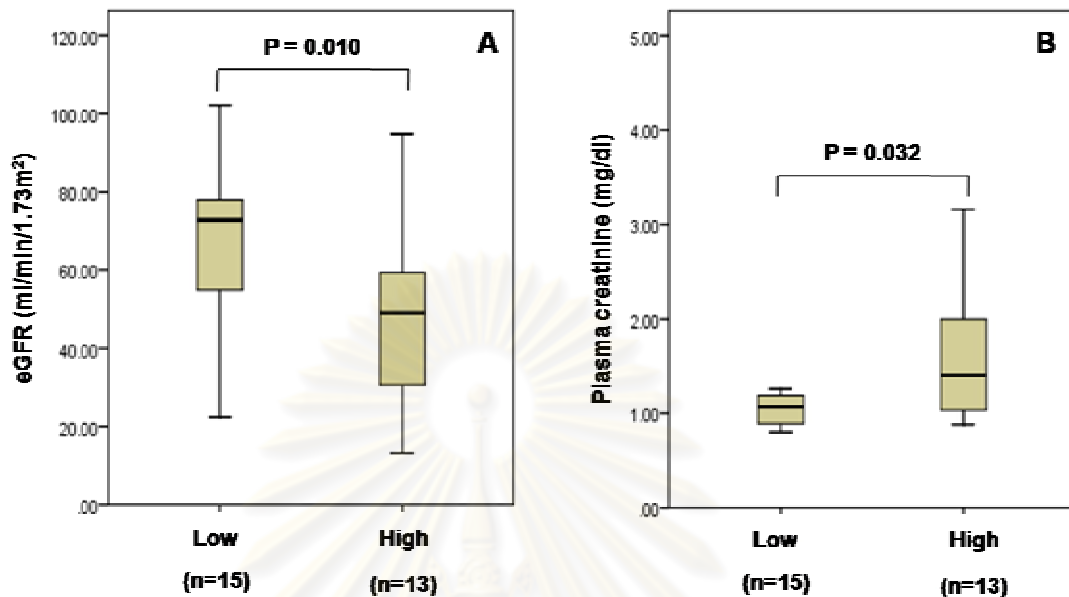
จากผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยทั้งหมดมีการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) และ mononuclear leukocytes ที่พบในเนื้อไตเป็นชนิด plasma cells, lymphocytes และ monocytes (ภาพที่ 10) และยังพบการเกิดพังผืดบริเวณเนื้อไต (interstitial fibrosis) อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยจำนวน 2 รายที่พบการอักเสบเป็นแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) ร่วมกับการอักเสบแบบเรื้อรัง ซึ่งลักษณะที่สำคัญของการอักเสบแบบเฉียบพลัน คือ พบเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในท่อไต

เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของไตกับระดับการเกิดการอักเสบในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไต การศึกษานี้แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไตออกเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับการอักเสบ คือ กลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ (low: 0, 1+) จำนวน 15 ราย และกลุ่มที่มีการอักเสบ

สูง (high: 2+, 3+, 4+) จำนวน 13 ราย และใช้ค่า eGFR และ plasma creatinine เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของไต ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ มีค่า eGFR สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการอักเสบสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR): 72.80 (25.80) vs. 49.05 (31.20) ml/min/1.73 m², P = 0.010) และค่า plasma creatinine ของกลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ ต่ำกว่ากลุ่มที่มีการอักเสบสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR): 1.07 (0.34) vs. 1.40 (1.17) mg/dl, P = 0.032) (ภาพที่ 11) ดังนั้น ในการศึกษานี้พบแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับการอักเสบในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตที่เพิ่มขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง



ภาพที่ 10 แสดงภาวะการอักเสบในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต ไม่พบการอักเสบในเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerous region (A, B) ขณะที่เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตของผู้ป่วยมีเม็ดเลือดขาว mononuclear cells แทรกเข้ามายังเนื้อไตปริมาณมากขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการอักเสบที่บริเวณเนื้อไต (C, D) ภาพ A, C กำลังขยาย 200x, ภาพ B, D กำลังขยาย 400x



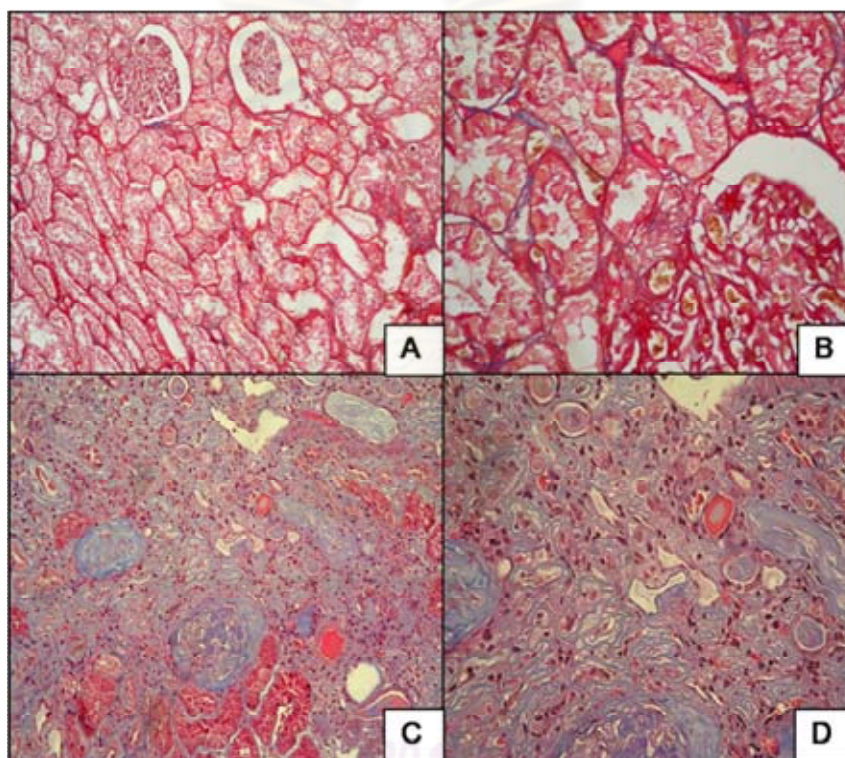
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของไตกับระดับการเกิดการอักเสบในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่มีการอักเสบต่ำและกลุ่มที่มีการอักเสบสูง ภาพ A กลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ มีค่า eGFR สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการอักเสบสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพ B และกลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ มีค่า plasma creatinine ต่ำกว่ากลุ่มที่มีการอักเสบสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

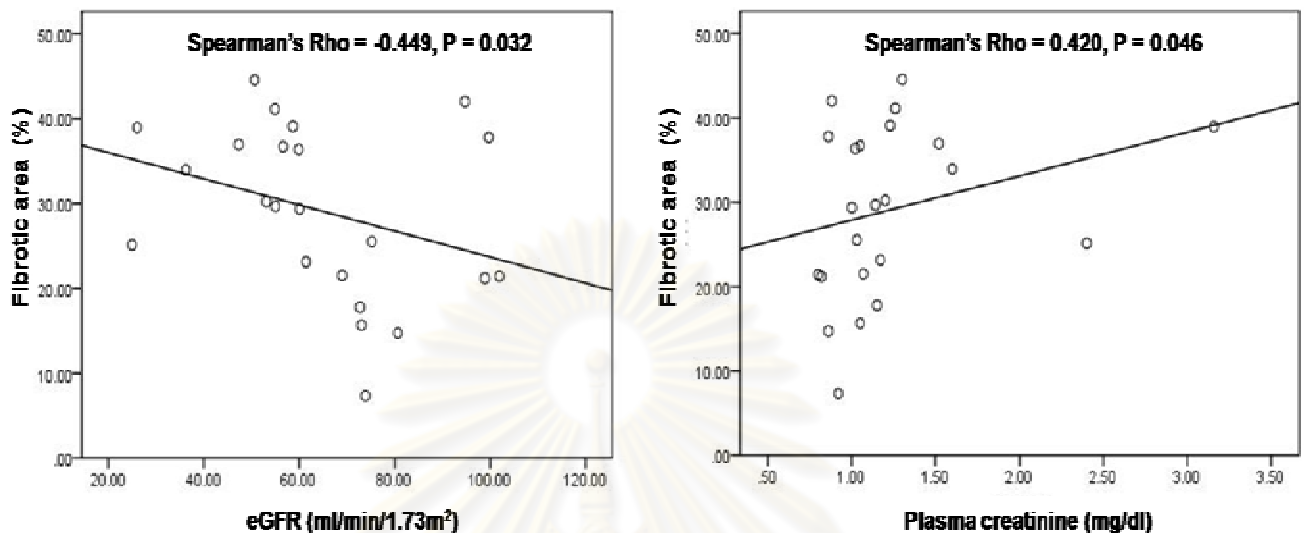
ศึกษาการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไต (renal fibrosis) ของผู้ป่วยโรคไตจากการย้อมสี Masson trichrome ซึ่งจะย้อมติดคอลลาเจนในเนื้อเยื่อ (collagen deposit) จำนวนตัวอย่างเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตที่ย้อมด้วย Masson trichrome เพื่อวิเคราะห์ระดับ renal fibrosis มีทั้งสิ้น 23 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคไตมีพังผืดเกิดขึ้นในเนื้อไต แต่ไม่พบหรือพบได้น้อยในตัวอย่างเนื้อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerouse region (ภาพที่ 12)

เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของไตกับระดับการเกิดพังผืดในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไต การศึกษานี้แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไตออกเป็น 2 กลุ่ม ตามระดับการเกิดพังผืด คือ กลุ่มที่มี renal fibrosis ต่ำ (มี % fibrotic area น้อยกว่าค่า median ซึ่งเท่ากับ 29.94%) จำนวน 12 คน และกลุ่มที่มีระดับ renal fibrosis สูง (มี % fibrotic area มากกว่าค่า 29.94%) จำนวน 11 คน eGFR ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มที่มี renal fibrosis ต่ำ มีค่า eGFR สูง

กว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ fibrosis สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR): 72.95 (18.88) vs. 54.50(12.50) ml/min/1.73 m² ,P < 0.001) และค่า plasma creatinine ของกลุ่มที่มี fibrosis ต่ำ ต่ำกว่ากลุ่มที่มี fibrosis สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR): 1.04 (0.27) vs. 1.23 (0.05) mg/dl, P = 0.046) (ภาพที่ 13) ดังนั้น ในการศึกษานี้พบแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิดพังผืดในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคไตที่เพิ่มขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่เสื่อมลง



ภาพที่ 12 แสดงการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม พบว่าผู้ป่วยโรคไตมีพังผืดในเนื้อไต (C, D) ซึ่งไม่พบหรือพบได้น้อยในเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerouse region (A, B) ภาพ A, C กำลังขยาย 200x, ภาพ B, D กำลังขยาย 400x



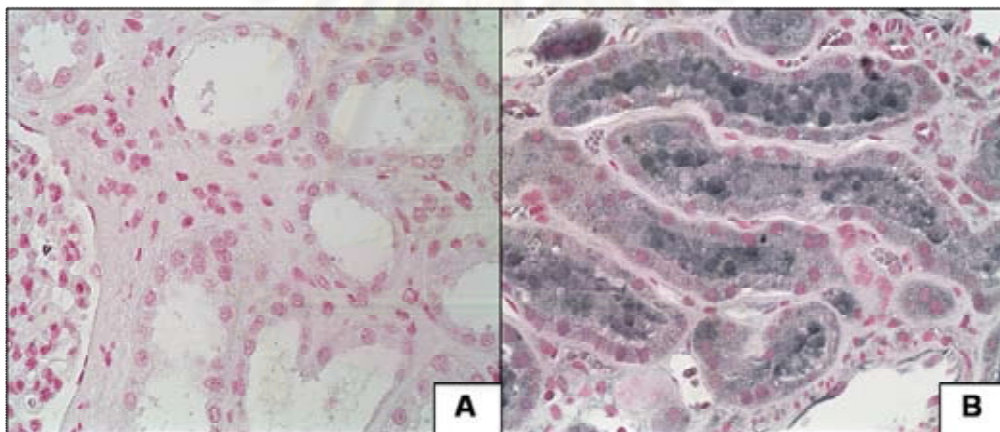
ภาพที่ 13 แสดงค่า eGFR และ plasma creatinine ของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่มีปริมาณพังผืดในเนื้อไตต่ำและกลุ่มที่มีปริมาณพังผืดในเนื้อไตสูง ภาพ A กลุ่มที่มี renal fibrosis ต่ำ มีค่า eGFR สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ fibrosis สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพ B กลุ่มที่มี fibrosis ต่ำ มีค่า plasma creatinine ต่ำกว่ากลุ่มที่มี fibrosis สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

การศึกษากการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตจากการย้อม immunohistochemistry พยาธิแพทย์จะเป็นผู้ประเมินการแสดงออกของ TGF- β 1 ในชิ้นเนื้อไต แบ่งระดับการแสดงออกของ TGF- β 1 เป็น negative, low expression (1+), moderate expression (2+) และ high expression (3+) ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคไตจำนวน 5 ราย เป็น negative (21.74%) จำนวน 9 รายที่เป็น 1+ (39.13%) จำนวน 7 รายเป็น 2+ (30.43%) จำนวน 2 รายเป็น 3+ (8.70%) ดังแสดงในตารางที่ 7 ตำแหน่งการแสดงออกของ TGF- β 1 พบในเซลล์บุผิวท่อไต ดังแสดงในภาพที่ 14

ตารางที่ 7 แสดงระดับการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต

จำนวนผู้ป่วยโรคไต(%) (n = 23)	Grading
5 (21.74)	negative
9 (39.13)	1+
7 (30.43)	2+
2 (8.70)	3+

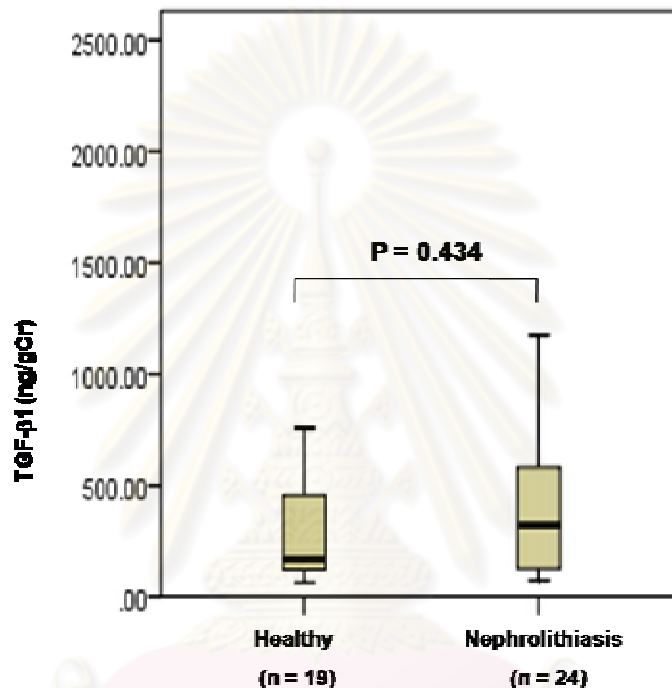


ภาพที่ 14 การแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุมได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerous region ไม่พบการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตควบคุม (A) แต่พบการแสดงออกของ TGF- β 1 สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต โดยเฉพาะในเซลล์บุผิวท่อไต (B) กำลังขยาย 400x

การศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต (n = 24) อายุเฉลี่ย 51.35 ± 11.68 ปี เป็นเพศชาย 8 ราย (33.33 %) เพศหญิง 16 ราย (66.66%) เทียบกับคนปกติ (n

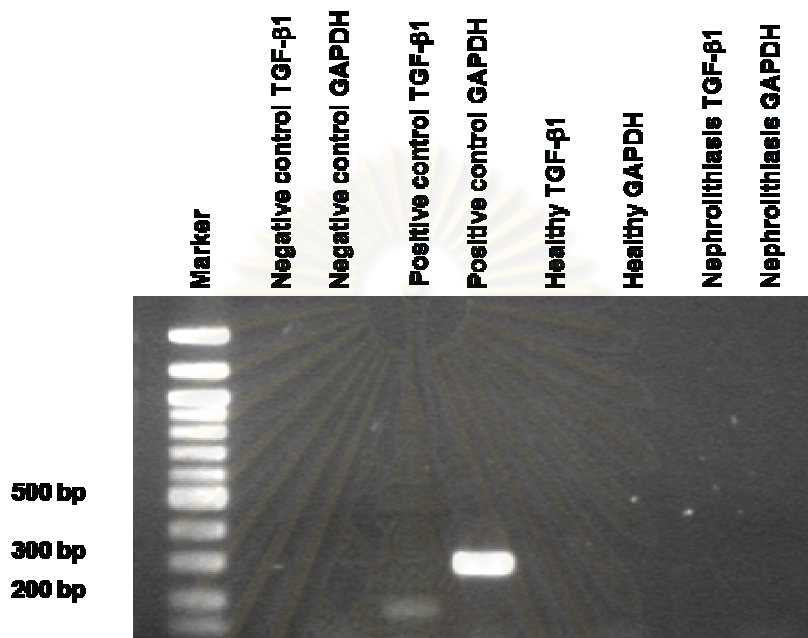
= 19) อายุเฉลี่ย 50.53 ± 7.33 . ปี เป็นเพศหญิง 19 ราย (100%) พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ TGF- β 1 ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม (median (IQR) : 321.60 (469.78) vs. 168.70 (346.50) ng/g Cr, $P = 0.434$) แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่15) เหตุที่ยังไม่พบนัยสำคัญอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างน้อย และไม่มีประชากรเพศชายในกลุ่มควบคุมที่นำมาใช้ศึกษา



ภาพที่ 15 แสดงระดับ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติ พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมคนปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.434$)

การศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหา TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ($n = 8$) เทียบกับคนปกติ ($n = 11$) ไม่พบการแสดงออกของ TGF- β 1 และ GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNAs ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการเก็บตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม ทำให้มี urinary exfoliated cells ไม่เพียงพอต่อการนำมาสกัด RNA หรือเซลล์แตกและมีการสลายของ RNA ก่อนการทำ RNA isolation (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แสดง TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเทียบกับคนปกติไม่พบการแสดงออกของทั้ง TGF- β 1 และ GAPDH mRNAs ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการเกิดพังผืดกับ การอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตตามระดับการเกิดพังผืดแบ่งกลุ่มตามค่า % fibrotic area ที่คำนวณจากการย้อม Masson trichrome และแบ่งระดับการแสดงออกของ TGF- β 1 ออกเป็น (low: 0, 1+) กับ high (2+,3+) การอักเสบในเนื้อไต (intrarenal inflammation) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการอักเสบต่ำ (low: 0, 1+) และสูง (high: 2+, 3+, 4+) ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามการแสดงออกของ 8-OHdG ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการแสดงออกต่ำ (low: 0, 1+) และสูง (high: 2+, 3+, 4+) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่พบเหล่านี้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณการเกิดพังผืดมีความสัมพันธ์กับปริมาณการอักเสบในเนื้อไตอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.007$) โดยผู้ป่วยที่มีระดับการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตมากจะพบการอักเสบมากเช่นกัน การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์

ระหว่างปริมาณการเกิดพังผืดกับระดับการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อไต (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของการเกิดพังผืดกับการอักเสบ การแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้

variables	Fibrosis (%)		P value
	Low	High	
Inflammation	12 (100)	11 (100)	0.007
Low	10 (88.33)	3 (27.27)	
High	2 (16.67)	8 (72.73)	
8-OHdG expression	12 (100)	11 (100)	0.590
Low	3 (25.00)	1 (9.09)	
High	9 (75.00)	10 (90.91)	
TGF-β1 expression	12 (100)	11 (100)	0.146
Low	4 (33.33)	7 (63.64)	
High	8 (66.67)	4 (36.36)	

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ พบว่า ระดับครีเอตินินในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่า และอัตราการงอกที่ไตต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนและ NAG activity ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการศึกษานี้สรุปว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ ขณะที่ภาวะการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่าระดับปกติ

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตบริเวณนิ่วเคลือบของเซลล์บุท่อไตเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุมที่ไม่พบการแสดงออกของ 8-OHdG หรือมีการแสดงออกน้อยมาก (weak expression) เซลล์บุท่อไตส่วน collecting ducts แสดงว่าในไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงขึ้น นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ใน HK-2 cells ยังพบว่าผลิตภัณฑ์ COM เป็นพิษต่อเซลล์บุท่อไต โดยกระตุ้นการสร้าง ROS ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์และทำให้เซลล์ตายมากขึ้น โดยความเป็นพิษจะแปรผันตามความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับผลิตภัณฑ์ แสดงว่าผลิตภัณฑ์นิ่วสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมดที่ศึกษาพบการอักเสบแบบเรื้อรังในเนื้อเยื่อไต โดยมีเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells แทรกเข้ามาในเนื้อไตปริมาณมากขึ้น และพบการเกิดพังผืดบริเวณเนื้อไตร่วมด้วย โดยผู้ป่วยกลุ่มที่มีการอักเสบและปริมาณพังผืดในเนื้อไตสูงจะมีค่าครีเอตินินในเลือดสูงกว่าและมีค่าอัตราการงอกที่ไตต่ำกว่ากลุ่มที่มีการอักเสบและปริมาณพังผืดในเนื้อไตต่ำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบการแสดงออกของ TGF- β 1 สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตบริเวณเซลล์บุท่อไตเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุม และเมื่อวัดปริมาณขับออกของ TGF- β 1 ในปัสสาวะพบแนวโน้มระดับของ TGF- β 1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มคนปกติ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระดับการแสดงออก TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells การศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากไม่สามารถวัดระดับ RNA จาก urinary exfoliated cells ทั้งในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการเกิดพังผืดกับการอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าการเกิดพังผืดใน

เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไตมีความสัมพันธ์กับการอักเสบ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ 8-OHdG และ TGF- β 1

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติสุขภาพดี (63) จากการจับกันระหว่างผลิตภัณฑ์กับเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตทำให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตเกิดการบาดเจ็บจึงมีการปล่อยเอนไซม์ต่างๆออกมาในปัสสาวะ ได้แก่ NAG, gamma-glutamyl transpeptidase และ alkaline phosphatase ท่อไตทำหน้าที่ในการดูดกลับหรือขับสารออกได้ลดลงส่งผลให้ปริมาณครีเอตินินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น สารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนสามารถหลุดออกมาในปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเกิดการบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มมากขึ้นก็จะทำให้เซลล์ตายในที่สุด ซึ่งถ้าเกิดเป็นระยะเวลาสั้นจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน่วยไต ประสิทธิภาพการทำงานของไตจึงลดลง (64) ผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับครีเอตินินในเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตรากรองที่ไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณโปรตีนและ NAG activity ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและมีภาวะการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นในการรักษาผู้ป่วยโรคนี้วไต ควรคำนึงถึงการฟื้นฟูประสิทธิภาพการทำงานของไตหรือชะลอความเสื่อมของไต เพื่อป้องกันการพัฒนาไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันเกิดเนื่องจากการสร้าง ROS ของเซลล์ในร่างกายนเพิ่มขึ้น และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ สารที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของดีเอ็นเอจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ 8-OHdG ซึ่งมีการศึกษาหลายงานวิจัยพบว่า 8-OHdG มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังในภาวะต่างๆ เช่น chronic viral hepatitis, alcoholic liver disease, acquire cystic kidney disease, *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (25, 65-67) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไต การศึกษาครั้งนี้พบการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้วไต โดยพบการแสดงออกของ 8-OHdG ในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวท่อไตส่วน proximal tubules, distal tubules และ collecting ducts ซึ่งไม่พบในเนื้อเยื่อไตควบคุม ประกอบกับผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรค

นิวไตมีปริมาณสูงกว่าคนปกติและสัมพันธ์กับระดับการทำลายเซลล์บุท่อไต (10) ดังนั้น งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงาน การแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิวไตบ่งชี้ว่าในไตของผู้ป่วยเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งน่าจะส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บที่เซลล์บุท่อไตและกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา

ผลการทดสอบผลของผลึก COM ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ viability ของ HK-2 cells พบว่า % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นของผลึก COM เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม แสดงให้เห็นว่าผลึก COM ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ LLC-PK1 และ MDCK เมื่อให้ไซเตียมออกซาเลตพบว่า % cell viability ลดลงตามความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น (68) และจากผลการทดสอบจำนวน HK-2 cells ที่มีชีวิตเมื่อได้รับ COM ที่ความเข้มข้น 1 และ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน % cell viability ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับผลึก COM นานขึ้น ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อได้รับผลึกของ COM ในช่วงเวลาที่นานขึ้นสามารถส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khaskhali และคณะ เมื่อให้ผลึก COM ต่อ HK-2 cells ที่ $133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ที่เวลา 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (34) จะเห็นได้ว่าทั้งปริมาณความเข้มข้นของ COM และเวลาที่ HK-2 cells ได้รับผลึก COM ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายว่าทำไมในผู้ป่วยโรคนิวไตพบระดับการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการผลิต ROS ใน COM-treated HK-2 cells ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเวลาต่างกัน พบว่าที่ความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้นมีการสร้าง ROS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (MDCK , LLC-PK1 และ HK-2 cells) ที่ได้รับผลึกแคลเซียมออกซาเลต ออกซาเลต COM หรือ Brushite พบว่ามีการสร้าง hydrogen peroxide ,superoxide anion และ 8-isoprostane สูงขึ้น และลดปริมาณการสร้างลงเมื่อมีเอนไซม์ catalase (69-71) และงานวิจัยของ Yao และ Zhong โดยศึกษาใน human hepatoma HepG2 cells โดยการให้สาร Perfluorooctanoic acid (PFOA) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งตับ พบว่า HepG2 cells มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PFOA (0-400 μM) ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย(72)

สรุปผลึกนิวไตสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์บุผิวท่อไตได้ ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่พบการแสดงออกของ 8-OHdG สูงขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคนิวไต

จากการศึกษากลไกการเกิดนิ่วไตพบว่าผลึกนิ่วสามารถทำให้เซลล์บุท่อไตเกิดการบาดเจ็บ และไปดึงดูดให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น monocyte, lymphocyte, macrophage เข้ามายังบริเวณเนื้อไต ซึ่งทั้งเซลล์บุท่อไตที่บาดเจ็บและ macrophage ที่เข้ามายังบริเวณเนื้อไต จะสร้างไซโตไคน์และโกรทแฟกเตอร์ไปกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและกระตุ้นให้เซลล์ท่อไตเกิดการตายแบบ apoptosis ถ้ามีการอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะแบบเรื้อรัง จะทำให้ท่อไตสูญเสียประสิทธิภาพการทำงาน เนื่องจากมีสะสมของ extracellular matrix ที่มากเกินไปจนเกิดเป็นพังผืดที่เนื้อไตขึ้นมา (31) และจากการศึกษาของ Tamura และคณะ โดยให้หนูได้รับ adenine แล้วพบว่าค่าครีเอตินีนในเลือดเพิ่มสูงขึ้น และในเนื้อไตมีการแสดงออกของ MCP-1, MIP-1 α , RANTES, IL-1 β , CCR2, TGF- β , α -smooth muscle actin และ collagen 1a1 mRNAs ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดพังผืด ทำให้มีการสะสมของ macrophage บริเวณรอบๆ ผลึกนิ่ว 2,8-dihydroxyadenine (DHA) ในท่อไต เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แบบ time-dependent manner และมีการสะสมของคอลลาเจนในเนื้อไตด้วย คณะวิจัยนี้ได้สรุปว่า macrophage infiltration เป็นตัวที่ไปกระตุ้น fibroblast แล้วทำให้เกิดการสะสมของ collagen ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลงในที่สุด (73) และจากการศึกษาของ de Water และคณะ พบว่าในเนื้อเยื่อไตของหนู และผู้ป่วยที่มีภาวะ oxalosis มี macrophage และ multinucleated cells เข้าไปเก็บกินผลึกก้อนนิ่วบริเวณเนื้อไต (interstitial crystals) (38) ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งหนึ่งที่พบว่าในเนื้อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมี mononuclear cells infiltration และผู้ป่วยทั้งหมดมีการอักเสบแบบเรื้อรังและพบการเกิดพังผืดบริเวณเนื้อไตด้วย มีผู้ป่วยจำนวน 2 ราย ที่พบการอักเสบเป็นแบบเฉียบพลันร่วมกับการอักเสบแบบเรื้อรัง โดยผู้ป่วยทั้ง 2 รายนี้มีการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ และจากผลการศึกษาการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีพังผืดในเนื้อไต ซึ่งไม่พบหรือพบได้น้อยมากในเนื้อไตควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตบริเวณ non-cancerouse region และปริมาณพังผืดในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังสัมพันธ์กับอัตราการกรองที่ไตและระดับครีเอตินีนในเลือด โดยที่ผู้ป่วยที่มีพังผืดปริมาณน้อยจะมีประสิทธิภาพการทำงานของไตดีกว่าผู้ป่วยที่มีปริมาณพังผืดสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาในหนูที่มีภาวะ hyperoxaluria พบว่ามีโปรตีนออกมาในปัสสาวะปริมาณและมี creatinine clearance ต่ำ พบ tubular atrophy, inflammatory infiltration (monocyte/macrophage) และพบการแสดงออกของ α -smooth muscle actin, collagen type III และ TGF- β 1 ในเนื้อไต (55) การศึกษาวิจัยของ Evan และคณะในผู้ป่วยที่เป็นนิ่ว brushite ซิสทีน ผู้ป่วยที่ผ่าตัดลำไส้หรือตัดต่อลำไส้ซึ่งส่วนมากเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต พบการเกิดพังผืดในเนื้อไตส่วน medulla และ cortex ทั้งบริเวณที่ใกล้กับท่อไตที่มีผลึกนิ่วไปเกาะและกระจายทั่วไปในเนื้อไต(12, 15, 74)

TGF- β 1 เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพและการเกิดพังผืด เมื่อมีการอุดกั้นในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคไตหลายชนิด ได้แก่ bladder outlet obstruction (BOO), mesangial glomerulonephritis (IgAGN), rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN), systemic lupus erythematosus (SLE) และ type1 (insulin-dependent)diabetes mellitus (49, 50) ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคดังกล่าวข้างต้นมีปริมาณ TGF- β 1 ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ TGF- β 1 เป็นตัวกลางที่สำคัญในกระบวนการเกิดพังผืดในไต (renal fibrogenesis) ทำให้เกิดการสะสมของ extracellular matrix ที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดไตวายเรื้อรังได้ การศึกษาของ Mezzano และคณะในผู้ป่วยที่เป็น progressive และ non-progressive IMN (idiopathic membranous nephropathy) พบการแสดงออกของ TGF- β 1 ในเนื้อไตของผู้ป่วยที่เป็น progressive IMN มากกว่า non-progressive IMN และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ myofibroblast (45) จากการศึกษาของ Prieto และคณะ โดยศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ในหนูที่เกิดภาวะ unilateral ureteral obstruction (UUO) ทำให้เกิดพังผืดบริเวณ tubulointerstitial และดูการแสดงออกของ type I และ IV collagens เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 1, 3, 10 และ 17 วัน หลังเกิด UUO พบว่าหลังวันที่ 17 type I และ type IV collagen เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในหนูที่เกิด UUO พบการแสดงออกของ TGF- β 1 บริเวณ renal interstitium ซึ่งไม่พบในหนูที่ไม่มีภาวะ UUO (52) จากการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็น Ig A nephropathy พบว่ามีการแสดงออกของ TGF- β 1 สูงขึ้นใน tubulointerstitium และ glomeruli (75) ในการวิจัยครั้งนี้พบ TGF- β 1 ที่บริเวณเซลล์นิวโทรฟิลท่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต ขณะที่ไม่พบในเนื้อเยื่อไตควบคุม แสดงว่า TGF- β 1 น่าจะมีบทบาทสำคัญใน renal fibrogenesis ของผู้ป่วยโรคนี้ไต

จากผลการศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ใน urinary exfoliated cells ไม่สามารถตรวจวัดระดับของ TGF- β 1 mRNA ได้ ทั้งในผู้ป่วยโรคนี้ไตและคนปกติอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ที่ได้จากปัสสาวะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หรือเวลาเก็บปัสสาวะของผู้ป่วยก่อนนำมาส่งวิเคราะห์ให้เวลานานมากเกินไปทำให้เซลล์ตายหรือเกิดการสลายของ RNA ก่อนการวิเคราะห์ ดังนั้นควรเก็บปัสสาวะช่วงเช้าและให้ได้ปริมาณมากพอต่อการเก็บเซลล์จากปัสสาวะ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของกระบวนการเกิดพังผืดกับกระบวนการอักเสบและภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคนี้ไตพบว่าการเกิดพังผืดมีความสัมพันธ์กับการอักเสบแต่ไม่พบความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ TGF- β 1 และ 8-OHdG แต่ผู้ป่วยกลุ่มที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงจะมีค่าครีเอทีนินในเลือดสูงกว่ากลุ่มที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และผู้ป่วยกลุ่ม

ที่มีการอักเสบและการเกิดพังผืดสูงจะมีค่าครีเอทีนีนในเลือดสูงและมีอัตราการกรองที่ไตต่ำกว่า กลุ่มที่มีการอักเสบและการเกิดพังผืดต่ำ แสดงให้เห็นว่าการมีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืดสูงน่าจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง การที่ไม่พบความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ TGF- β 1 และ 8-OHdG นั้นอาจเนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษาน้อยเกินไป

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าผู้ป่วยโรคไตมีพยาธิสภาพในเนื้อไตทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืด และพบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืดที่สูงขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง

ข้อเสนอแนะ

ศึกษาการแสดงออกของ TGF- β 1 mRNA ไม่สามารถตรวจวัดระดับของ TGF- β 1 mRNA ได้ทั้งในผู้ป่วยโรคไตและคนปกติอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ที่ได้จากปัสสาวะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หรือเวลาเก็บปัสสาวะของผู้ป่วยก่อนนำมาส่งวิเคราะห์ใช้เวลานานมากเกินไปทำให้เซลล์ตายหรือเกิดการสลายของ RNA ก่อนนำมาวิเคราะห์ ดังนั้นควรเก็บปัสสาวะช่วงเช้าและปริมาณมากพอต่อการเก็บเซลล์ก่อนการวิเคราะห์ควรนำเซลล์ไปย้อมสี Trypan blue เพื่อดูว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่หรือไม่และหลังจากสกัด mRNA แล้วควรนำไป run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามีปริมาณ RNA หรือไม่ และควรเพิ่มขนาดประชากรของกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ศึกษาให้มากขึ้น เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์หรือหาความแตกต่างทางสถิติได้เพิ่มขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Daudon M. Epidemiology of nephrolithiasis in France. Annales D Urologie.39,6(2005):209-231.
- [2] Indridason OS, Birgisson S, Edvardsson VO, Sigvaldason H, Sigfusson N, Palsson R. Epidemiology of kidney stones in Iceland: A population-based study. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. 40,3(2006):215-220.
- [3] Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. International Journal of Urology.4,6(1997):537-540.
- [4] Ljunghall S, Danielson BG. A prospective study of renal stone recurrences. British Journal of Urology. 56,2(1984):122-124.
- [5] Trinchieri A, Ostini F, Nespole R, Rovera F, Montanari E, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. Journal of Urology. 162,1(1999):27-30.
- [6] Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. Urological Research.23,2(1995):71-79.
- [7] Miller C, Kennington L, Cooney R, Kohjimoto Y, Cao LC, Honeyman T, et al. Oxalate toxicity in renal epithelial cells: Characteristics of apoptosis and necrosis. Toxicology and Applied Pharmacology.162,2(2000):132-141.
- [8] Schepers MSJ, Van Ballegooijen ES, Bangma CH, Verkoelen CF. Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. Kidney International. 68,4(2005):1543-1553.
- [9] 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. American Journal of Nephrology. 24,5(2004):557-568.

- [10] Boonla C, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. Urological Research.
- [11] Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. BJU International. 101,9(2008):1170-1177.
- [12] Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Shao Y, Parks JH, Bledsoe SB, et al. Crystal-associated nephropathy in patients with brushite nephrolithiasis. Kidney International. 67,2(2005):576-591.
- [13] Evan A, Lingeman J, Coe FL, Worcester E. Randall's plaque: Pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. Kidney International. 69,8(2006):1313-1318.
- [14] Evan AP, Lingeman J, Coe F, Shao Y, Miller N, Matlaga B, et al. Renal histopathology of stone-forming patients with distal renal tubular acidosis. Kidney International. 71,8(2007):795-801.
- [15] Evan AP, Coe FL, Lingeman JE, Shao Y, Matlaga BR, Kim SC, et al. Renal crystal deposits and histopathology in patients with cystine stones. Kidney International. 69,12(2006):2227-2235.
- [16] Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. Journal of Nephrology. 13,SUPPL(2000):S45-S50.
- [17] Ahlstrand C, Tiselius HG. Recurrences during a 10-year follow-up after first renal stone episode. Urological Research. 18,6(1990):397-399.
- [18] Sutherland JW, Parks JH, Coe FL. Recurrence after a single renal stone in a community practice. Mineral and Electrolyte Metabolism. 11,4(1985):267-269.
- [19] Moe OW. Kidney stones: Pathophysiology and medical management. Lancet. 367,9507(2006):333-344.
- [20] พจน์ ศรีบุญลือ , ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ , วิฑูรย์ ประสงค์วัฒนา ,เกรียง ตั้งสง่า . โรคนี้ว่าได้ : ความรู้พื้นฐาน,สาเหตุ,การวินิจฉัย,การป้องกันรักษา.ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2543.

- [21] Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. Journal of Clinical Investigation. 115,10(2005):2598-2608..
- [22] Piyaratana Tosukhowong CB, Supoj Ratchanon , Monthira Tanthanuch,, Kanitta Poonpirome PS, Thasinas Dissayabutra, Kriang Tungsanga. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand : update 2007. Asian Biomedicine. 1,1(2007):87-95.
- [23] Troyer DA, Kreisberg JI, Venkatachalam MA. Lipid alterations in LLC-PK1 cells exposed to mercuric chloride. Kidney International. 29,2(1986):530-538.
- [24] Scheid C, Koul H, Hill WA, Lubner-Narod J, Kennington L, Honeyman T, et al. Oxalate toxicity in LLC-PK1 cells: Role of free radicals. Kidney International. 49,2(1996):413-419.
- [25] Bhandari A, Koul S, Sekhon A, Pramanik SK, Chaturvedi LS, Huang M, et al. Effects of oxalate on HK-2 cells, a line of proximal tubular epithelial cells from normal human kidney. Journal of Urology. 168,1(2002):243-259.
- [26] Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: Results of in vivo and in vitro studies. Journal of Nephrology. 11,SUPPL.1(1998):66-69.
- [27] Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: Results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. Clinical and Experimental Nephrology. 8,2(2004):75-88.
- [28] Escobar C, Byer KJ, Khaskheli H, Khan SR. Apatite Induced Renal Epithelial Injury: Insight Into the Pathogenesis of Kidney Stones. Journal of Urology. 180,1(2008):379-387.
- [29] Tsujihata M, Momohara C, Yoshioka I, Tsujimura A, Nonomura N, Okuyama A. Atorvastatin Inhibits Renal Crystal Retention in a Rat Stone Forming Model. Journal of Urology. 180,5(2008):2212-2217.
- [30] Marshall PJ, Warso MA, Lands WEM. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. Analytical Biochemistry. 145,1(1985):192-199.

- [31] Grande MT, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. Role of inflammation in tubulointerstitial damage associated to obstructive nephropathy. Journal of Inflammation.7(2010):19.
- [32] Strutz F, Neilson EG. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. Springer Seminars in Immunopathology.24,4(2003):459-476.
- [33] Hackett RL, Shevock PN, Khan SR. Madin-Darby canine kidney cells are injured by exposure to oxalate and to calcium oxalate crystals. Urological Research. 22,4(1994):197-204.
- [34] Verkoelen CF, Van Der Boom BG, Houtsmuller AB, Schröder FH, Romijn JC. Increased calcium oxalate monohydrate crystal binding to injured renal tubular epithelial cells in culture. American Journal of Physiology - Renal Physiology. 274,5-43-5(1998):F958-F965.
- [35] Umekawa T, Chegini N, Khan SR. Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. Kidney Int. 61,1(2002):105-112.
- [36] Habibzadegah-Tari P, Byer K, Khan SR. Oxalate induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in HK-2 cells involves reactive oxygen species. Urological Research. 33,6(2005):440-447.
- [37] Muthukumar A, Selvam R. Renal injury mediated calcium oxalate nephrolithiasis: Role of lipid peroxidation. Renal Failure. 19,3(1997):401-408.
- [38] De Water R, Noordermeer C, Van der Kwast TH, Nizze H, Boeve ER, Kok DJ, et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: Effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. American Journal of Kidney Diseases.33,4(1999):761-771.
- [39] De Water R, Noordermeer C, Houtsmuller AB, Nigg AL, Stijnen T, Schröder FH, et al. Role of macrophages in nephrolithiasis in rats: An analysis of the renal interstitium. American Journal of Kidney Diseases. 36,3(2000):615-625.
- [40] Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS, Mandel NS. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe

- renal damage in selected conditions. International Journal of Urology. 12,3(2005):290-298.
- [41] Hirose M, Tozawa K, Okada A, Hamamoto S, Shimizu H, Kubota Y, et al. Glyoxylate induces renal tubular cell injury and microstructural changes in experimental mouse. Urological Research. 36,3-4(2008):139-147.
- [42] Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors. Kidney International. 75,5(2009):475-481.
- [43] Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. Journal of the American Society of Nephrology. 15,1(2004):1-12.
- [44] Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, et al. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. American journal of respiratory cell and molecular biology. 5,2(1991):155-162.
- [45] Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. Kidney International. 57,1(2000):147-158.
- [46] Köninger J, di Mola FF, Di Sebastiano P, Gardini A, Brigstock DR, Innocenti P, et al. Transforming growth factor-beta pathway is activated in cholecystolithiasis. Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 390,1(2005):21-28.
- [47] Chea SW, Lee KB. TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in autosomal dominant polycystic kidney disease. Yonsei Medical Journal. 50,1(2009):105-111.
- [48] Monga M, Gabal-Shehab LL, Stein P. Urinary transforming growth factor- β 1 levels correlate with bladder outlet obstruction. International Journal of Urology. 8,9(2001):487-489.

- [49] Flores L, Näf S, Hernáez, R, Conget I, Gomis R, Esmatjes E. Transforming growth factor β 1 at clinical onset of Type 1 diabetes mellitus. A pilot study. Diabetic Medicine. 21,8(2004):818-822.
- [50] De Muro P, Faedda R, Fresu P, Masala A, Cigni A, Concas G, et al. Urinary transforming growth factor- β 1 in various types of nephropathy. Pharmacological Research. 49,3(2004):293-298.
- [51] Bobkova IN, Chebotareva NV, Kozlovskaya LV, Varshavsky VA, Golitsyna EP. Urine excretion of a monocytic chemotaxic protein-1 and a transforming growth factor beta1 as an indicator of chronic glomerulonephritis progression. Terapevticheskii Arkhiv. 78,5(2006):9-14.
- [52] Prieto M, Rodríguez-Peña AB, Düwel A, Rivas JV, Docherty N, Pérez-Barriocanal F, et al. Temporal changes in renal endoglin and TGF- β 1 expression following ureteral obstruction in rats. Journal of Physiology and Biochemistry. 61,3(2005):457-467.
- [53] Chihara Y, Ono H, Ishimitsu T, Ono Y, Ishikawa K, Rakugi H, et al. Roles of TGF- β 1 and apoptosis in the progression of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy. Clinical Nephrology. 65,6(2006):385-392.
- [54] Böttinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. Journal of the American Society of Nephrology. 13,10(2002):2600-2610.
- [55] Toblli JE, Angerosa M, Stella I, Ferder L, Inserra F. Urinary calcium oxalate supersaturation beyond nephrolithiasis. Relationship with tubulointerstitial damage. Medicina. 63,2(2003):97-104.
- [56] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews. 27,2(2009):120-139.
- [57] Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. Orthosiphon grandiflorum has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. Urological Research. 38,2(2010):89-96.

- [58] Kushiro H, Fujimoto E, Soyama K, Fukui I, Niki I. [Evaluation of serum creatinine measurement by the Jaffe reaction]. Rinsho Byori. 16,9(1968):701-706.
- [59] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro Iii AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Annals of Internal Medicine. 150,9(2009):604-612.
- [60] Horak E, Hopfer SM, Sunderman Jr FW. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. Clinical Chemistry. 27,7(1981):1180-1185.
- [61] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72,1-2(1976):248-254.
- [62] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. Journal of the American Society of Nephrology. 19,12(2008):2282-2287.
- [63] Worcester EM, Parks JH, Evan AP, Coe FL. Renal Function in Patients With Nephrolithiasis. Journal of Urology. 176,2(2006):600-603.
- [64] Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: Key to the formation of kidney stones. Urological Research. 34,2(2006):86-91.
- [65] Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. Cancer Research. 54,12(1994):3171-3172.
- [66] Kitada T, Seki S, Iwai S, Yamada T, Sakaguchi H, Wakasa K. In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. Journal of Hepatology. 35,5(2001):613-618.
- [67] Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). Respiratory Research. 6,1(2005):56.

- [68] Knoll T, Steidler A, Trojan L, Sagi S, Schaaf A, Yard B, et al. The influence of oxalate on renal epithelial and interstitial cells. Urological Research. 32,4(2004):304-309.
- [69] Aihara K, Byer KJ, Khan SR. Calcium phosphate-induced renal epithelial injury and stone formation: Involvement of reactive oxygen species. Kidney International. 64,4(2003):1283-1291.
- [70] Borges FT, Garofalo AS, Dalboni MA, Abreu NP, Michelacci YM, Schor N. The effects of lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species were blunted by calcium oxalate in renal tubular epithelial cells. Nephron - Experimental Nephrology. 108,2(2008):c35-c44.
- [71] Khaskhali MH, Byer KJ, Khan SR. The effect of calcium on calcium oxalate monohydrate crystal-induced renal epithelial injury. Urological Research. 37,1(2009):1-6.
- [72] Yao X, Zhong L. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 587,1-2(2005):38-44.
- [73] Tamura M, Aizawa R, Hori M, Ozaki H. Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. Histochemistry and Cell Biology. 131,4(2009):483-490.
- [74] Evan AP, Lingeman JE, Worcester EM, Bledsoe SB, Sommer AJ, Williams JC, Jr., et al. Renal histopathology and crystal deposits in patients with small bowel resection and calcium oxalate stone disease. Kidney Int. 78,3(2010):310-317.
- [75] Mattii L, Segnani C, Cupisti A, D'Alessandro D, Moscato S, Meola M, et al. Kidney expression of RhoA, TGF- β 1, and fibronectin in human IgA nephropathy. Nephron - Experimental Nephrology. 101,1(2005):c16-c23.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของครีเอตินีนในปัสสาวะ

1.1 0.04 M picric acid

- ชั่ง picric acid (MW=229.10) 9.164 g
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L

1.2 1.4 N NaOH

- ชั่ง NaOH (MW=39.99711) 5.6 g
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml

2. การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะ

CBB reagent

- CBB stain : acid reagent = 3:2
- ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรอง 2 รอบก่อนใช้

3. การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ N-acetyl glucosaminidase (NAG) ในปัสสาวะ

3.1 citrate buffer 0.1 mM pH 4.15

- ชั่ง 0.045 M sodium citrate 13.23 g/L
- ชั่ง 0.055 M citric acid 11.55 g/L
- ปรับ pH ให้ได้ 4.15 และละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml

3.2 NAG substrate (10 mM pH 4.15)

- ชั่ง 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine 171.1 mg
- ละลายใน citrate buffer 50 ml และปรับ pH ให้ได้ 4.15

3.3 AMP buffer (0.75 M pH 10.2)

- ชั่ง 2-amino-2-methyl-propanol 9.42 g
- ปรับ pH ให้ได้ 10.2 และละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 50 ml

3.4 0.9% NaCl (0.15 M NaCl)

- ชั่ง NaCl 8.766 g

- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L

4 การเตรียมสารเคมีในการย้อม immunohistochemistry

4.1 citrate buffer pH 6.0

- ชั่ง citric acid (MW=294.1) 10.5 g
- ปิเปตต์ 2N NaOH 65 ml
- ละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 5 L

4.2 M Phosphate Buffer Saline (20X PBS), pH 7.2

- ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.48 g
- ชั่ง NaCl (MW=58.44) 7.2 g
- ชั่ง KH_2PO_4 (MW=136.09) 0.43 g
- ปรับ pH ให้เป็น 7.2 แล้วละลายในน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 L

4.3 Tris buffer pH 7.4

- เตรียมเป็น Tris stock solution โดยชั่ง Tris 2.42 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
- เตรียมเป็น HCl stock solution โดยปิเปตต์ 12 N HCl 1.7 ml ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
- เวลาใช้นำ Tris stock solution 2.5 ml ผสมกับ HCl stock solution 2.05 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 ml

4.4 4-(Dimethylamino)-benzaldehyde (DAB) in Tris buffer pH 7.4

- ชั่ง DAB 0.5 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml แล้วนำไป aliquot เก็บใน -20°C tube ละ 100 μl
- นำ DAB 100 μl มาละลายใน Tris buffer 10 ml , 30% H_2O_2 10 μl , 1M Dasele 100 μl

5 การเตรียมสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HK-2 cell

5.1 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)

- DMEM 900 ml
- ใส fetal bovine serum (FBS) ลงไป 100 ml (10% FBS)
- ใส 100U/ml penicillin/streptomycin ลงไป 10 ml (1% penicillin/streptomycin)

5.2 Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))

- ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g
- ชั่ง NaCl (MW=58.44) 8.18 g

- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml

6 การเตรียมสารเคมีในการทดสอบการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) ของซีรัม โดยวิธี

MTT colorimetric assay

6.1 MTT solution

เตรียม stock solution 5 mg/ml MTT solution

- ชั่ง MTT 50 mg แล้วละลายใน PBS 10 ml
- แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่ 4°C ได้นาน 1 เดือน

เตรียม working solution 0.5 mg/ml MTT solution

- นำ stock solution 5 mg/ml MTT solution ที่ 4°C มา 1 ml แล้วใส่ในหลอดที่มี serum free medium อยู่ 9 ml ผสมให้เข้ากัน

7 การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ ROS Production ในเซลล์

7.1 Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic

(Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))

- ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g
- ชั่ง NaCl (MW=58.44) 8.18 g
- ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
- ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml

7.2 6-carboxy-2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) solution

เตรียม stock solution 1 M DCFH-DA

- ชั่ง DCFH-DA (MW: 675.43) 5 mg
- เติม DMSO 7.4 ml ละลายให้เข้ากัน
- แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่ -20°C

เตรียม working solution 0.1 M DCFH-DA

- นำ stock solution 1 M DCFH-DA ที่เก็บไว้ที่ -20°C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย
- เติม stock solution 1 M DCFH-DA ลงในหลอดที่มี complete medium อยู่ 9 ml แล้วผสมให้เข้ากัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
 (Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย จุลพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคนี้่วไต: ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การ
 อักเสบ และการเกิดพังผืด

(Histopathology of nephrolithiasis patients: oxidative stress, inflammation
 and fibrosis)

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาวอุไรวรรณ ไหววิจิตร
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-9689-8235

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-1518-7618

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-1320-6627

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ.วิภาวี กิตติโกวิท
 ที่อยู่ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4235 มือถือ 08-1344-7477

ชื่อ นพ.อนุเทพ บูรมิ
 ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4117 มือถือ 08-9666-0100

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยโรคนิวไตที่จะเข้ารับ การผ่าตัดเอาเนื้องอกก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่าน เอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้ง นี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วม ทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมาของโครงการวิจัย

โรคนิวไตเป็นโรคที่มีความชุกสูงในประเทศไทย และยังเป็นโรคที่มีอัตราการเป็นซ้ำหลัง การรักษาสูงมาก ผู้ป่วยและครอบครัวต้องสูญเสียทั้งเวลาและทุนทรัพย์เมื่อเข้ารับการรักษา และ ในแต่ละปีโรงพยาบาลภาครัฐต้องใช้จ่ายเงินสนับสนุนเพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคนิวไตเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโรคนิวไตจึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญที่บั่นทอนคุณภาพชีวิตของประชากรไทย จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยให้ทราบถึงกลไกและพยาธิกำเนิดของโรคนิวไตเพื่อหาทาง ป้องกันและรักษาโรคนิวไตที่มีประสิทธิภาพ

ในปัจจุบันองค์ความรู้เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดและการดำเนินโรคของโรคนิวไตยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในคนโดยตรง หลักฐานจากการศึกษาในสัตว์ทดลองชี้ ่ว่านิวไตเกิดจากการเกิดผลึกจำนวนมากอย่างรวดเร็วในท่อไต ส่วนใหญ่เป็นผลึกชนิดแคลเซียมออก ซาลेट ผลึกเหล่านี้จะเป็นพิษต่อไต ทำลายเซลล์ไต และเกาะติดในเนื้อไต เมื่อสะสมมากขึ้น ก้อน ผลึกเหล่านี้จะรวมตัวกันและโตจนกลายเป็นก้อนนิวไตที่ใหญ่ที่สุด

พยาธิสภาพในไตของหนูทดลองที่เป็นนิวไตพบว่าการอักเสบสูงและพบการเกิดพังผืดหรือ แผลเป็นขึ้น รายงานผลการศึกษาในคนมีน้อยชิ้นมาก อย่างไรก็ตามมีหลักฐานวิจัยพบว่าไตของ ผู้ป่วยโรคนิวไตมีการเกาะติดของผลึกจำนวนมากในท่อไตและใต้ท่อไต และพบการเกิดพังผืดรอบ ท่อไตและบริเวณรอบๆ ก้อนผลึกในเนื้อไต คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าผลึกและก้อนนิวไตจะกระตุ้น ให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน มีการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยโรคนิวไตมีปริมาณของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีน (8-Hydroxydeoxyguanosine) ใน ปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติซึ่งแสดงถึงการบาดเจ็บของดีเอ็นเอ(DNA) จากภาวะเครียด ออกซิเดชันส่งผลให้เซลล์เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย นอกจากนี้ผลึกและก้อนนิวไตสามารถกระตุ้นให้เซลล์

บุพอโตสร้างและหลังสารตัวกลางการอักเสบ เช่น โมโนไซต์เคโมแอตแทรกแทนท์โปรตีน-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) ซึ่งมีบทบาทในการดึงดูดเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และแมกโครฟาจมาเก็บกินผลึกนิ้วที่ติดค้างในเนื้อไต ส่งผลให้เกิดการอักเสบ ซึ่งถ้ามีการอักเสบอย่างเรื้อรังจะทำให้เนื้อไตถูกทำลายมากขึ้นและกระตุ้นให้มีการซ่อมแซมเนื้อไตมากเกินไปจนควบคุมไม่ได้ ทำให้เกิดพังผืดหรือแผลเป็นในไตตามมา เมื่อเกิดพังผืดปริมาณมากในไตจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลง ซึ่งกลไกการเกิดพังผืดในไตนี้น่าจะมาจากการสร้างโปรตีนทรานสฟอร์มมิงโกรสแฟกเตอร์-เบต้า1 (Transforming growth factor-beta1) มากเกินไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ ศึกษาพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคไตในด้านการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น การอักเสบ และการเกิดพังผืดโดยดูการแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีน โมโนไซต์เคโมแอตแทรกแทนท์โปรตีน-1 และโปรตีนทรานสฟอร์มมิงโกรสแฟกเตอร์-เบต้า1 ในเนื้อเยื่อไตเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไตและในปัสสาวะเปรียบเทียบกับคนปกติ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไต จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย คือ 110 คน แบ่งเป็นคนปกติ 40 คน ผู้ป่วยโรคไต 65 คน (ผู้ป่วยโรคไตโรงพยาบาลขอนแก่น 35 คน ผู้ป่วยโรคไตโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 30 คน) และผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไต 5 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ผู้ป่วยโรคไตโรงพยาบาลขอนแก่น

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านจะได้รับการตรวจร่างกายว่าเป็นโรคไตโดยภาพถ่ายรังสีเอ็กซ์ (X-ray film) เพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่แพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะผ่าตัดเพื่อเอานิ้วออก โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 1 ปีและมาพบผู้วิจัยหรือผู้ร่วมทำวิจัยทั้งสิ้น 1 ครั้ง

และผู้ทำวิจัยจะทำการเก็บสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือสารตัวอย่างเนื้อเยื่อไต ก้อนนิ้ว เลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ท่านจะได้รับการแนะนำจากแพทย์หรือคณะวิจัยเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้อง จากนั้นท่านจะได้รับแจกอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อ

เก็บสารตัวอย่างด้วยตัวท่านเอง สำหรับตัวอย่างเลือดแพทย์หรือพยาบาลจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณท้องแขน ปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร

การเก็บสารตัวอย่างก่อนนิ้วและเนื้อเยื่อไตจะกระทำโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ ผู้ทำการผ่าตัดรักษา การเก็บตัวอย่างจะเก็บด้วยวิธีที่เป็นมาตรฐานสากล ซึ่งไม่เกิดอันตรายใดๆ หรือมีผลกระทบต่อผู้ป่วยโรคนี้ไต ขึ้นเนื้อไตที่จะเก็บจะมีขนาดประมาณครึ่งเซนติเมตร หลังจากการผ่าตัดและเก็บตัวอย่างเนื้อไต ผู้ป่วยสามารถฟื้นตัวได้ตามปกติโดยไม่มีอาการแทรกซ้อนใดๆ

เมื่อเก็บสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จะนำไปยังห้องปฏิบัติการวิจัย และทำการตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างตามที่วางแผนไว้ในโครงการวิจัย โดยตัวอย่างปัสสาวะจะวัดปริมาณครีเอตินีนซึ่งเป็นสารที่บ่งชี้การทำงานของไต วัดตัวบ่งชี้การทำลายเซลล์ท่อไต วัดตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชัน วัดปริมาณโปรตีนเพื่อบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการกรองที่ไตและวัดปริมาณโปรตีนทรานสเฟอร์ริงโกลบูลินแฟกเตอร์-เบต้า1 ตัวอย่างเลือดจะวัดปริมาณสารครีเอตินีน ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจะตรวจสอบการแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีน โมโนไฮดรอกซีเคโมแอตแทรกแตนท์โปรตีน-1 และโปรตีนทรานสเฟอร์ริงโกลบูลินแฟกเตอร์-เบต้า1 เพื่อใช้บ่งบอกถึงการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและการเกิดพังผืดที่เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตตามลำดับ สารตัวอย่างก่อนนิ้วจะนำมาวิเคราะห์ชนิดของแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในก่อนนิ้ว

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ซึ่งจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต

ระหว่างการเก็บตัวอย่างโดยตัดชิ้นเนื้อไตขนาดเล็ก ท่านมีโอกาสเลือดออกได้ อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างนี้กระทำโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะที่มีความชำนาญสูง โอกาสเกิดเลือดออกหรือภาวะแทรกซ้อนอื่นเกิดขึ้นได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งแพทย์ผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ผู้ป่วยโรคนิ้วไตจะทราบภาวะการอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับการเกิดผังผืดในไตที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไต ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพให้ดีขึ้นต่อไป

ผู้ป่วยโรคนิ้วไตจะทราบชนิดของนิ้วไตที่ตนเองเป็นอยู่ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการป้องกันรักษาเพื่อไม่ให้เกิดการกลับเป็นซ้ำ

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นางสาวอุไรวรรณ ไหววจิตร ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าชดเชยสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

อาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยจะได้รับค่าเดินทางและค่าชดเชยเสียเวลาในการเข้าร่วมโครงการวิจัย รายละ 500 บาท

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

การจัดการกับสารตัวอย่างของอาสาสมัคร

กรณีสารตัวอย่างที่เหลือจากการวิจัยผู้วิจัยจะเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ปี เก็บโดยใช้รหัสไม่เชื่อมโยงถึงข้อมูลของผู้ป่วยและหลังจากนั้นจะทำลายในช่วงระยะ 1 ปี ถ้ามีการนำสารตัวอย่างที่เหลือมาใช้ในโครงการวิจัยอื่นจะมีการขอความยินยอมจากผู้ร่วมโครงการวิจัยอีกครั้ง และสารตัวอย่างของอาสาสมัครที่ถอนตัวออกจากโครงการวิจัยผู้วิจัยจะทำลายทิ้งทันทีด้วยกระบวนการที่ถูกต้องและไม่ก่อให้เกิดอันตรายทั้งกับสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชนโดยข้อมูลจะถูกเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับการวิจัยเท่านั้น กรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัย มีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้ตลอดเวลาแม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตรสุขโขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลเสียใด ๆ ทั้งสิ้น
7. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นหรือลายนิ้วมือและวันที่
8. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันท์มหิตลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent form)

การวิจัยเรื่อง จุลพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคนิ่วไต: ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การอักเสบและ การเกิดพังผืด (Histopathology of nephrolithiasis patients: oxidative stress, inflammation and fibrosis)

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

ข้าพเจ้า

นาย/นาง/นางสาว

.....ได้อ่านรายละเอียดจาก เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาแล้วและข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วม โครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลง นามและวันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะ เกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางการรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอ ในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็ม ใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้ง เหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้า จะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำ ยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอ ยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ ทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและ สามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การ วิเคราะห์ และการรายงาน เพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ และการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ใน อนาคต เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัว

บรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้ข้าพเจ้าฟัง จนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วย ความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัว

บรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ผลงานวิทยานิพนธ์ส่วนหนึ่งได้นำไปตีพิมพ์เป็นบทความในวารสารยูโร ฉบับปีที่ 31 เล่มที่ 2 ธันวาคม 2553 เรื่อง การแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีนในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต และความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์แคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อเซลล์บุผิวท่อไต



สำนักงานวารสารยูโร
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ยูโรวิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
ตึกสยามินทร์ ชั้น 12 แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทร. 02-419-8010 โทรสาร 02-411-2011

วันที่ 12 เมษายน 2553

เรื่อง ตอบรับบทความเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารยูโร

เรียน นางสาวอุไรวรรณ ไหววิจิตร

ตามที่ท่านได้ส่งบทความเรื่อง "การแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีนในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต และความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์แคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อเซลล์บุผิวท่อไต" เพื่อให้สมาคมสัตวแพทย์ระบบบัสตาวะแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์พิจารณาลงตีพิมพ์ในวารสารยูโร นั้น

บรรณาธิการได้พิจารณาบทความบทความดังกล่าวแล้ว เมื่อวันที่ 12 มีนาคม 2553

ขณะนี้อยู่ระหว่าง

- พิจารณาเบื้องต้น ก่อนส่งกองบรรณาธิการทบทวน (Peer Review)
- ทำ Peer Review
- ทำ Peer Review แล้วรอการแก้ไขจากผู้นิพนธ์
- กำหนดลงบทความในวารสารยูโร ฉบับปีที่ 31...เล่มที่ 2...ธันวาคม 2553....

สมาคมขอขอบคุณที่ท่านให้การสนับสนุนวารสารยูโร หากมีข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อที่ คุณจันทนา ไทรย์อ้อย สาขาวิชาสัตวศาสตร์ยูโรวิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โทร.02-419-8010

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์สิทธิพร ศรีนวลนัต)
บรรณาธิการวารสารยูโร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอุไรวรรณ ไหววิจิตร
วัน เดือน ปีเกิด	15 สิงหาคม พ.ศ.2528
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เทคนิคการแพทย์)(เกียรตินิยม อันดับสอง) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2547
ประสบการณ์การทำงาน	-
ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์	ชื่อเรื่อง การแสดงออกของ 8-ไฮดรอกซีดีออกซีกวานอซินใน เนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต และความเป็นพิษของผลึก แคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตต่อเซลล์บุผิวท่อไต กำหนดลง บทความในวารสารยูโร ฉบับปีที่ 31 เล่มที่ 2 ธันวาคม 2553

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย