สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยเป็นผู้ป่วยนิ่วไตชายและหญิงที่เข้ารับการผ่าตัดรักษานิ่ว ณ แผนกศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลราชวิถี และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคนิ่วไต และมีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัดและเก็บก้อนนิ่วหลังการผ่าตัด และกลุ่มควบคุม (control) เป็นผู้ที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติการเป็นนิ่ว และความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ มีอายุและเพศที่ตรงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และมีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง รวมถึงสมัครใจเข้าร่วมโครงการ ลักษณะทั่วไปของประชากร กลุ่มประชากรตัวอย่างที่คัดผ่านการตรวจกรองมีทั้งหมดจำนวน 66 ราย แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 34 ราย เป็นชายจำนวน 14 ราย เป็นหญิงจำนวน 20 ราย และกลุ่มควบคุม (ผู้ที่มีสุขภาพดี) จำนวน 32 ราย เป็นชายจำนวน 10 ราย เป็นหญิงจำนวน 22 ราย กลุ่มประชากรตัวอย่างทุกคนได้ลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว

เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
24 Hr Urine Containers with small containers	-
8-OHdG Microtiter Plate	Japan Institute for the Control of Aging (JalCA), Fukuroi, Japan
8-Channel Micropipettor (50-200 µl) and Pipette Tips	BIOHIT Plc., Helsinki, Finland
Autopipette ขนาด 20, 200, 500 และ 1000 µl and Tips	NICHIRYO, Japan and Trefflab, Degersheim, Switzerland
Balance (Both Electrical and classical) BL 210S	Satorius, Germany
Compact Rocker CR 300	FINE PCR, Seoul, Korea
Cuvettes (Plastic and Quartz)	PLASTIBRAND
Deep freezer	-
Digital timer	-

Fourier Transform Infrared Spectrometer	PerkinElmer (1760 X and Spectrum One), U.S.A.
Gel Doc	BIO RAD, Philadelphia, U.S.A.
Heat box	TECHNE, Duxford, UK
Incubator	GFL, Germany
Light Microscope	Nikon, Japan
Microcentrifuge Tubes ขนาด 1.5 ml และ 0.5 ml	Trefflab, Degersheim, Switzerland
Microtiter Plate Reader (Multiskan EX)	Thermo Labsystems, China
Oak Ridge Centrifuge Tube ; PPCO ขนาด 50 ml และ 30 ml	NALGENE COMPANY, Rochester, New York
Orbital Shaker (SLOS- 20)	Kuhner, Switzerland
pH Meter ORION Research Expandible ion analyzer EA 290	ORION Research Incorporated, Cambridge, U.S.A.
Sonicator	Elma, Germany
Speed Vac Concentrator	Savant, Farmingdale, New York
TLC Plates, Silica Gel on Aluminium (ALUGRAM Nano-SIL G)	Macherey-Nagel GmbH & Co., Postfach, Germany
Ultracentrifuge (High speed 14,000 rpm) Z320K	BHG HERMLE, Germany
UV-Visible light spectrophotometer	Spectronic instrument, U.S.A.
VORTEX –GENIE 2	Scientific Industries, Bohemia, New York

2. สารเคมี

สารเคมี (Chemicals)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1,3 Diethylthiobarbituric acid	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	Japan institute for the control of aging (JAlCA) , Fukuroi, Japan
Acetone	Fisons Sciencetific Equipment, Loughborough, England
AMP buffer	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Anti 8-OHdG Monoclonal Antibody (Clone N45.1)	Japan institute for the control of aging (JAlCA) , Fukuroi, Japan

Activated Charcoal	Trinity biotech, St. Louis, U.S.A.
Bovine Serum Albumin	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Butyl Hydroxytoluene (BHT)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Calcium Chloride	MAY & BAKER LTD, Dagenham,England
Chloroform	MERCK, Darmstadt, Germany and BDH AnalaR, England
Citrate lyase enzyme	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Coomassie Brilliant Blue	EASTMAN KODAX CO., Rochester, New York
Diethyl Ether	MERCK, Darmstadt, Germany
3-(Dimethylamino) Benzoic Acid (DMAB)	Trinity biotech, St. Louis, U.S.A.
Ethylene Diaminetetra Acetate (EDTA)	Trinity biotech, St. Louis, U.S.A.
Ferric chloride	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Gangliosides from Bovine Brain	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Glacial Acetic acid	MERCK, Darmstadt, Germany
Glucocerebrosides Human (Gaucher's) Spleen	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Glycyl-Glycine Buffer	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Hexane	BDH AnalaR, England
HRP-Conjugated Anti Mouse Antibody	Japan institute for the control of aging (JAlCA), Fukuroi, Japan
Hydrogen Peroxide/Citrate-Phosphate Buffer Saline	Japan institute for the control of aging (JAlCA), Fukuroi, Japan
Hydrochloric Acid	MERCK, Darmstadt, Germany
Iodine Crystal	SEARLE Company, England
Laboratory Grade Ethanol (95%)	BDH AnalaR, England
Lactate Dehydrogenase (LDH)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Methanol	BDH AnalaR, England
3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH)	Trinity biotech, St. Louis, U.S.A.

N-Acetyl-Glucosaminidase Substrate	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form (NADH)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Oleic acid	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Orcinol	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Oxalate Oxidase	Trinity biotech, St. Louis, U.S.A.
Periodic Acid	HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India
Phosphoric acid	Japan institute for the control of aging (JAICA), Fukuroi, Japan
Resorcinol	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Schiff's reagent Fuchsin-sulfite reagent	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Sodium Chloride	ANALYTICAL REAGENT, Mallinckrodt, Paris
Sodium metabisulfite(Sodium disulfite)	MERCK, Darmstadt, Germany
Sodium Oxalate	AJAX Chemical, Sydney, Australia
Standard 8-OHdG solution (0.5, 2, 8, 20, 80, 200 ng/ml)	Japan institute for the control of aging (JAICA), Fukuroi, Japan
Standard lipids (Cholesterol, Cholesterol acetate, Phosphatidylcholine, Oleic acid)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
Sulphuric acid	MERCK, Darmstadt, Germany
Thymol Crystals	Asia Pacific Specialty Chemical Limited, Seven Hills, Australia
Tris HCl	Diagnostic Products Corporated, Los Angeles, Canada

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่มารับการผ่าตัดนิ่ว ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลราชวิถี และกลุ่มควบคุมเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติการเป็นนิ่วและความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆและมีอายุและเพศที่ตรงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยได้รับการอธิบายให้ทราบถึงวัตถุประสงค์รายละเอียดของโครงการศึกษาวิจัย พร้อมทั้งลงนามในใบยินยอมในการเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยตามความสมัครใจของผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย

2. ผู้ทำการวิจัยทำการซักประวัติและเก็บข้อมูลพื้นฐานผู้ร่วมโครงการวิจัย ได้แก่ ข้อมูลภูมิลำเนา อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเป็นโรคนิ่วและข้อมูลการเป็นนิ่วในหมู่เรือญาติ และประวัติการเป็นโรคอื่นๆ ในระบบทางเดินปัสสาวะ

3. เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนิ่วไต สำหรับกลุ่มควบคุมเก็บเฉพาะตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

<u>การเก็บสิ่งส่งตรวจ</u>

1. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

ทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยใช้ Thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย วัดปริมาตร และวัดค่าความเป็นกรดด่าง เก็บตัวอย่างปัสสาวะที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2. การเก็บตัวอย่างก้อนนิ่ว

ทำการเก็บก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่ได้จากการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ทางเดินปัสสาวะ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เก็บตัวอย่างผงนิ่วที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับรอการนำไปสกัดแยกไขมันในก้อนนิ่วต่อไป

<u>การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ</u>

1. การตรวจวัดสารเพื่อประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น, การทำลายเซลล์หลอดท่อไต, การทำงานของไต และสารอิเลคโตรลัยท์ในปัสสาวะ

1.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงมาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัด pH meter

T 247440 81

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีน

การวิเคราะห์ครีเอตินีนในพลาสมาและปัสสาวะใช้หลักการของ Jaffe (60) ซึ่งเป็น modified picric acid method โดยใช้ปัสสาวะเจือจาง 200 เท่า ทำปฏิกิริยากับ 1.4 N NaOH และ 0.04 M Picric acid นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 520 นาโนเมตร เทียบกับค่าครีเอตินีนมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ สามารถตรวจได้โดยวิธี Coomassie Brilliant Blue (CBB) เมื่อสี CBB จับกับโปรตีนแล้วจะเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงจาก 465 นาโนเมตร เป็น 595 นาโนเมตร เทียบกับโปรตีน (Bovine Serum Albumin, BSA) มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

1.4 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของเอนไซม์ N-acetyl glucosaminidase (NAG)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำการหาอันตรกิริยาของเอนไซม์โดยวิธีของ Horak และคณะ (61) โดยนำปัสสาวะมาทำปฏิกิริยากับ 0.9% NaCl และ NAG substrate นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

1.5 การวิเคราะห์ Malonaldehyde (MDA)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาตกตะกอนด้วยเอทานอล แล้วนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid, Buthylhydroxytoluene, Ferric Chloride ทำให้เกิดเป็นสี นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ตามวิธีของ Marshall และคณะ (62)

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

ปริมาณ Oxidative DNA adduct 8-OHdG ในปัสสาวะ สามารถตรวจได้โดยใช้ Competitive in vitro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Japan Institute For the Control of Aging (JalCA), Japan) วิธีการโดยย่อคือ นำปัสสาวะมาทำปฏิกิริยากับ Primary Antibody นำไป อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย Washing Solution 3 ครั้ง แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ Secondary Antibody นำไป อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย Washing Solution 3 ครั้ง แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ Chromatic Solution: Diluting Solution (1:100) ทิ้งไว้ในที่มืด ประมาณ 15 นาที จนเกิดเป็นสีฟ้าอ่อน จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Reaction Terminating Solution ทำให้เกิดสีเหลือง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader

1.7 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาเลต

ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะตรวจวัดโดยวิธี Enzymatic Reaction (Trinity Biotech kit) นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่วัดค่าความเป็นกรดด่างแล้ว อยู่ระหว่าง pH 5-7 ปริมาตร 2 ml

ไปเจือจางด้วย Sample Diluent 2 ml จากนั้นใส่ใน Sample Purifier Tube ที่มี Activated Charcoal ผสมให้เข้ากัน 5 นาที แล้วนำไป Centrifuge 2000 rpm (1500 x g) ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำ ส่วนใสที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ Oxalate Reagent A (DMAB, MBTH and Buffer pH 3.1 ± 0.1) และ Oxalate Reagent B (Oxalate Oxidase and Peroxidase) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที จนเกิดสี นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

1.8 การวิเคราะห์ซิเทรต

ปริมาณซิเทรตในปัสสาวะตรวจวัดโดยวิธี New Citrate Lyase (SIGMA kit) นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงมาทำปฏิกิริยากับ Glycyl-Glycine Buffer, Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form (NADH), Lactate Dehydrogenase (LDH) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (OD_1) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Citrate Lyase enzyme ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (OD_2) ปริมาณซิเทรตคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง

1.9 การวิเคราะห์สารอิเลคโตรลัยท์ในปัสสาวะ (แคลเซียม, ฟอสเฟต, โพแทสเซียม และแมกนีเซียม)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่แบ่งไว้มาส่งห้องปฏิบัติการ หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจหาสารอิเลคโตรลัยท์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

1.10 การวิเคราะห์กรดยูริกในปัสสาวะ

การตรวจวัดกรดยูริกในปัสสาวะ อาศัยวิธี Phosphotungstate ส่งตัวอย่างปัสสาวะสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริก ณ หน่วยโรคไตภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบของก้อนนิ่วด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

นำก้อนนิ่วมาบดให้ละเอียด แล้วนำส่งวิเคราะห์องค์ประกอบของก้อนนิ่ว ด้วยเครื่อง FT-IR ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การสกัดไขมันจากสารตัวอย่าง

2.1 การสกัดไขมันในปัสสาวะ (27)

นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงมาปั่นโดยเครื่อง high speed centrifuge ที่ 10,000 rpm 15°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสเติมด้วย chloroform: methanol (2:1, v/v) จากนั้นเขย่าที่ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (overnight) นำมาแยกส่วน organic phase (lower phase) จากนั้น นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง speed vac concentrator ชั่งน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ จากนั้น ละลายกลับด้วย 0.1% buthyl hydroxytoluene (BHT) ใน chloroform: methanol (2:1) เก็บ total lipids ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รอสำหรับการเคราะห์ลำดับต่อไป

2.2 การสกัดไขมันในก้อนนิ่ว (28)

ชั่งน้ำหนักผงนิ่วที่บดแล้ว 2 กรัม เติมด้วย ice-cold chloroform: methanol: 0.05 M Tris HCl, pH 7.4 (2:1:1) (extraction solvent) 40 มิลลิลิตร นำมา sonicate 20 นาที จากนั้นนำมา เขย่า ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (overnight) จากนั้นนำไป centrifuge เพื่อแยกชั้น ทำการเก็บส่วน organic phase (lower phase) ครั้งที่ 1 นำส่วน stone pellet มา extract อีกครั้ง ด้วย extraction solvent เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป centrifuge เพื่อแยกชั้น ทำการเก็บส่วน organic phase (lower phase) ครั้งที่ 2 นำส่วน stone pellet มา extract อีกครั้ง ด้วย extraction solvent เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge เพื่อแยกชั้น ทำการเก็บส่วน organic phase (lower phase) ครั้งที่ 3 จากนั้น pool ส่วน organic phase ทั้ง 3 ครั้งรวมกัน แล้วนำสารละลายที่ pool ได้ไปทำให้แห้ง ด้วย เครื่อง speed vac concentrator ชั่งน้ำหนัก แล้วละลายกลับ 0.1% BHT ใน chloroform: methanol (2:1) เก็บ total lipids ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รอสำหรับการเคราะห์ในลำดับต่อไป

3. การแยกชนิดของไขมันในปัสสาวะและก้อนนิ่วโดยวิธี multi-one-dimension –thin layer chromatography (MOD-TLC) (63, 64)

แยก total lipids ที่สกัดได้โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีแบบ MOD-TLC ขนาดของ TLC plate ขนาด 10x20 เซนติเมตร ซึ่งจะใช้ 4 solvent ในการแยก ซึ่งเรียงตามการมีขั้วมากไปจนถึงมีขั้วน้อย คือ 1) chloroform: methanol: acetic acid (90:10:1) ระยะทาง 2.5 เซนติเมตร ใช้เวลา 2 นาที 2) hexane: diethyl ether: acetone (60:40:5) ระยะทาง 8 เซนติเมตร ใช้เวลา 10 นาที 3) hexane: diethyl ether (97:3) ระยะทาง 9.5 เซนติเมตร ใช้เวลา 15 นาที 4) hexane (100)ระยะทาง 10 เซนติเมตร ใช้เวลา 30 นาที ถ้าย้อมสีด้วยผลึก iodine จะใช้ปริมาณของ total lipids ที่สกัดได้ 100 ไมโครกรัม ถ้าย้อมด้วย PAS จะใช้ปริมาณของ total lipids ที่สกัดได้ 200 ไมโครกรัม

4. การย้อมสี Periodic Acid Schiff (PAS staining) (65)

นำแผ่น TLC plate ที่ผ่านการทำ MOD-TLC แล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที หรือจนเปียกทั่วทั้งแผ่น จากนั้น incubate ด้วย oxidizing solution (1% (w/v) periodic acid 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 3% ((v/v) acetic acid 3 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั้น 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตามด้วย 0.1% (w/v) sodium

metabisulfite ใน 1 M HCl 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น TLC มา incubate ใน Schiff's Fuchsin-sulfite reagent ประมาณ 15-20 นาที จนกระทั่งเห็น band เป็นสีชมพู แล้วล้างด้วย sodium metabisulfite solution 1 ครั้ง 5 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาทำให้แห้ง โดยใช้ hair drier หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. การทดสอบบทบาทของไขมันแต่ละชนิดต่อการเกิดก้อนนิ่วในหลอดทดลอง (in vitro stone formation assay) (66)

5.1 การเตรียม extract จาก total lipids ที่สกัดได้

ทำการ Pool ไขมันที่สกัดได้โดยแยกออกเป็นปัสสาวะคนปกติ, ปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไต และก้อนนิ่ว รายละ 200 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Speed Vac Concentrator ชั่งน้ำหนัก ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) โดยไขมันที่สกัดได้จากปัสสาวะคนปกติและปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไต ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 1 มิลลิลิตร ส่วนไขมันที่สกัดได้จากก้อนนิ่ว ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 500 ไมโครลิตร จากนั้นแยกชนิดของไขมันในปัสสาวะและก้อนนิ่ว โดยวิธี MOD-TLC นำ TLC Plate ที่แยกไขมันได้โดยวิธี MOD-TLC มาขูดแต่ละ Band ของไขมันที่สนใจ (Phospholipids, Glycolpids 1, Cholesterol, Free fatty acid, Triacylglyceride, Glycolpids 2 และ Cholesterol ester) Pool แต่ละ Band รวม 7 Fraction จากนั้นสกัดไขมันออกจาก silica gel ด้วย chloroform: methanol (2:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 8,000 – 10,000 rpm 10 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ จากนั้นนำ Pellet ไปสกัดไขมันกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง นำไปปั่นที่ 8,000 – 10,000 rpm 10 นาที เก็บส่วนใสรวม 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Speed Vac Concentrator ชั่งน้ำหนัก แล้วละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 500 ไมโครลิตร เก็บไขมันที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.2 การทดสอบการก่อผลึกเกลือนิ่ว (crystallization assay)

วิธีการโดยย่อสำหรับการทดสอบการก่อผลึกเกลือนิ่ว คือ นำปัสสาวะคนปกติ (Pooled healthy urine) 2 มิลลิลิตร ไปปั่นที่ 10,000 rpm 10 นาทีใส่ในหลอดทดลองจำนวน 5 หลอด เติม total lipids ที่ต้องการทดสอบ (ละลายใน methanol) ณ ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 150 ไมโครกรัม) จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง โดย 1 หลอดเป็นหลอดควบคุม (ไม่มีไขมัน) จากนั้นเติม 0.1 โมล/ลิตร sodium oxalate จำนวน 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลอด แล้วนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร จากนั้นนำไปตรวจสอบผลึก

และนับผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) สำหรับการทดสอบการก่อผลึกเกลือนิ่วของ lipid extract ที่ได้จาก MOD-TLC จะทดสอบที่ 100 ไมโครกรัมของไขมันที่แยกได้ทั้ง 7 fractions

เปรียบเทียบการก่อผลึกเกลือนิ่วของไขมันที่สกัดได้จากปัสสาวะคนปกติ ปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไตและก้อนนิ่ว มีขั้นตอนดังนี้ ทำการ Pool ไขมันที่สกัดได้โดยแยกออกเป็นปัสสาวะคนปกติ, ปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไต และก้อนนิ่ว รายละ 200 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Speed Vac Concentrator ชั่งน้ำหนัก ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) โดยไขมันที่สกัดได้จากปัสสาวะคนปกติและปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไต ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 1 มิลลิลิตร ส่วนไขมันที่สกัดได้จากก้อนนิ่ว ละลายกลับด้วย chloroform: methanol (2:1) 500 ไมโครลิตร ดูดแบ่ง total lipids มาให้ได้ปริมาณเท่ากับ 200 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง heat box แล้วละลายกลับด้วยเอทานอล 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำปัสสาวะคนปกติ (Pooled healthy urine) 2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปั่นแล้ว เติมในหลอดทดลอง โดยหลอดควบคุมไม่มีไขมัน (เอทานอล 50 ไมโครลิตร) จากนั้นเติม 0.1 โมล/ลิตร sodium oxalate จำนวน 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลอด แล้วนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร จากนั้นนำไปตรวจสอบผลึกและนับผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)

5.3 การทดสอบการรวมกลุ่มผลึก (aggregation assay)

เตรียมผลึก Seed calcium oxalate monohydrate (COM) โดยผสม 100 มิลลิโมล/ลิตร calcium chloride และ 100 มิลลิโมล/ลิตร sodium oxalate (1:1) แล้วนำสารทั้งสองชนิดมาอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน และเก็บผลึกโดยการกรองด้วย 0.22 ไมครอน filter และทำให้ระเหยแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส ปรับใช้ COM ที่เตรียมได้โดยเจือจางให้เป็น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร Tris และ 0.15 โมล/ลิตร sodium chloride ที่ pH 6.5 นำไขมันที่เตรียมได้แต่ละ fraction (200 μg) ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง heat box แล้วละลายกลับด้วยเอทานอล 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 หลอดเป็นหลอดควบคุม จากนั้นเติม 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ Seed COM crystal จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ที่ 0 นาที (AT_0) แล้วนำไปตรวจสอบผลึกนำไปตรวจสอบผลึก จากนั้นนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ที่ 10 นาที (AT_{10}) แล้วนำไปตรวจสอบผลึกนำไปตรวจสอบผลึก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) การเกาะกลุ่มของผลึกที่มากขึ้นจะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสง (หรือ turbidity) ที่ลดลง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่ม (aggregation coefficient) จากสมการ

$$\text{Aggregation coefficient (AC)} = ((AT_0 - AT_{10})/10) \times 1000$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอและเปรียบเทียบข้อมูลตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) โดยใช้ค่าแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง (central tendency) ได้แก่ mean (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, SD) และ median (ค่าต่ำสุด (min) – ค่าสูงสุด (max)) และใช้ตารางแจกแจงความถี่และร้อยละ (percentage) สำหรับตัวแปรเป็นกลุ่มๆ (categorical variables) กราฟต่างๆ สร้างโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้สถิติ two-samples t-test และ ANOVA test สำหรับข้อมูลที่มากมากว่า 2 กลุ่มขึ้นไป Mann-Whitney Test และ Kruskal-Wallis test เป็น equivalent tests ของ two-samples t-test และ ANOVA tests ตามลำดับ non-parametric tests (Mann-Whitney Test และ Kruskal-Wallis test) จะเลือกใช้เมื่อข้อมูลไม่ผ่านข้อตกลงเบื้องต้นของ two-samples t-test และ ANOVA tests เช่น ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (skewed distribution data) ความสัมพันธ์ระหว่าง categorical variables ทดสอบโดย chi-square test สำหรับสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างตัวแปร 2 ตัวแปร คำนวณจาก Pearson's correlation test หรือ Spearman's rank correlation test ขึ้นกับชนิดของข้อมูล

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