

ผลกระทบของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิวไตต่อการเกิดโรคนิวแคลเซียมออกซา
เลตในทางเดินปัสสาวะของหนู



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of fecal microbiota transplantation from urolithiasis patients on the risk of
calcium oxalate urinary stone formation in rats



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

Department of Biochemistry

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนี้วัดต่อ
โดย	การเกิดโรคนี้ในเซลล์เยื่อเมือกในทางเดินปัสสาวะของหนู
สาขาวิชา	นายสิทธิพงษ์ หุ่นไทย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์รัฐสิทธิ์ ดิษยบุตร
	อาจารย์ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ
	ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารษาเวก)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์รัฐสิทธิ์ ดิษยบุตร)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตน์กุล)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ศวรรณี สุธีร์วรพงศ์)	

สิทธิพงษ์ หุ่นไทย : ผลกระทบของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่อการเกิดโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในทางเดินปัสสาวะของหนู. (Effects of fecal microbiota transplantaion from urolithiasis patients on the risk of calcium oxalate urinary stone formation in rats) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร. นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ, ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์

โรคนิ่วไตพบมากในคนไทยโดยเฉพาะผู้ที่อาศัยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ มีปัจจัยเสี่ยงคือ ภาวะซีดเรื้อรังในปัสสาวะต่ำ แคลเซียมและออกซาเลตในปัสสาวะสูง โดยพบมากในผู้ที่มีอายุ 40 ปีขึ้นไป จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตจากคนสุขภาพดี จึงเชื่อว่าความแตกต่างของจุลินทรีย์ลำไส้ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไต เพื่อศึกษาความผิดปกตินี้ ผู้วิจัยจึงศึกษาความแตกต่างของจุลินทรีย์ในลำไส้เปรียบเทียบระหว่างอาสาสมัครคนปกติและผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าจุลินทรีย์ phylum *Bacteroidata* ในอุจจาระของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่าคนสุขภาพดี และพบ genus *Bifidobacterium* ต่ำกว่าคนสุขภาพดี จากนั้นนำจุลินทรีย์จากอุจจาระของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม ปลูกถ่ายลงในหนู Wistar เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์จากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะมีแนวโน้มสูงขึ้น ปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะลดลง รวมทั้ง pH ในปัสสาวะเป็นด่างมากขึ้น และพบดัชนีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว (Tiselius's supersaturation index) เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังพบ จุลินทรีย์ genus *Muribaculaceae* สูงขึ้นในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต และ genus *Roseburia* มีจำนวนลดลง รวมถึงการแสดงออกของ tight junction (Zonula occluden-1 หรือ ZO-1) ที่ลดลง และพบการแสดงออกของ oxalate transporter มีแนวโน้มสูงขึ้น สรุปได้ว่าหนูที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วสูงขึ้น โดยมีกลไกจากการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ลดลง และเพิ่ม oxalate transporter ที่ลำไส้ ทำให้ร่างกายได้รับออกซาเลตจากอาหารในลำไส้เพิ่มขึ้น และขับออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น เป็นหลักฐานยืนยันว่าความผิดปกติของสมดุลเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วไต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6370056530 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORD: Urolithiasis Gut microbiota Fecal microbiota transplantation Oxalate Urinary supersaturation index

Sittiphong Hunthai : Effects of fecal microbiota transplantation from urolithiasis patients on the risk of calcium oxalate urinary stone formation in rats. Advisor: Assoc. Prof. Thasinas Dissayabutr, M.D., Ph.D. Co-advisor: NATTHAYA CHUAYPEN, Ph.D., Prof. PIYARATANA TOSUKHOWONG

Urolithiasis is a common disease among the Thai population, especially among those living in the northeastern and northern regions. Risk factors include hypocitraturia, hypercalciuria, hyperoxaluria, and age above 40. A previous study found differences in gut microbiota between urolithiasis patients and healthy populations, suggesting that these differences may contribute to the development of stone disease. To investigate the gut microbiota of healthy controls compared to urolithiasis patients, we analyzed the composition of their fecal microbiota and found that the phylum Bacteroidetes was higher in urolithiasis patients, while the genus Bifidobacterium was lower. We then transplanted the fecal microbiota of both groups into Wistar rats and observed that the rats receiving the transplant from urolithiasis patients had higher levels of urinary oxalate and a higher Tiselius's supersaturation index, indicating a higher risk of urolithiasis. Furthermore, we found higher levels of the genus Muribaculaceae and lower levels of the genus Roseburia in these rats, as well as a decrease in the expression of tight junctions (ZO-1) and an increase in the expression of the oxalate transporter. These findings suggest that the gut microbiota of patients with urolithiasis may contribute to the development of kidney stone disease through various mechanisms.

Field of Study: Medical Biochemistry

Academic Year: 2022

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษานี้สำเร็จลุล่วงได้นั้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ฐิติณัฐ ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์เพื่อการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษานี้ให้เหมาะสม มีความถูกต้องสมบูรณ์ ตลอดจนสนับสนุนวิจัยและคอยเป็นกำลังใจอยู่เสมอมา

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อบรมและให้ความรู้ พร้อมทั้งคำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่อง และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์เพื่อการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษานี้ให้เหมาะสม รวมทั้งสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์มานะ ทวีวิศิษฐ์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อบรมให้ความรู้ในด้านพยาธิวิทยาของไต และลำไส้ รวมทั้งแนวทางในการเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์(พิเศษ) นายแพทย์มินิธ อัศวจินตจิตร ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อบรมให้ความรู้ในด้านศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งติดต่อผู้ป่วยโรคนี้ไว้

ขอขอบพระคุณ ดร.นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตน์กุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฯ ที่อบรมให้ความรู้ในด้านการเตรียมจุลินทรีย์ในอุจจาระจากอาสาสมัคร

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อบรมและให้ความรู้ พร้อมทั้งคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางคลินิก รวมทั้งสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโท และปริญญาเอก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรหน่วยวิจัย Metabolic disease in gastrointestinal and urinary system research unit และ Center of excellence in hepatitis and liver cancer ที่ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้ทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์ดาภิเชกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อทุนทรัพย์สำหรับการศึกษา วิจัย จนวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษานี้สำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

สิทธิพงษ์ หนูไทย

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
สมมติฐาน.....	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	3
คำสำคัญ.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคนี้วัด.....	6
ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง.....	10
ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง.....	13
ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ.....	15
ความอึดตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ.....	17

นิ้วไต และ Tight junction ที่ลำไส้	18
จุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคผิวหนังเดินปัสสาวะ	21
การปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 รูปแบบการวิจัย	26
3.2 จริยธรรมการวิจัย	26
3.3 กลุ่มประชากรเป้าหมาย	26
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	28
3.5 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	29
3.5.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	29
3.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ	30
3.6 วิธีการดำเนินการวิจัย	32
3.6.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะของอาสาสมัคร	32
3.6.2 การเตรียมจุลินทรีย์จากอุจจาระของอาสาสมัครเพื่อนำไปปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง	34
3.6.3 การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์สำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง	34
3.6.4 การวิจัยในสัตว์ทดลอง	35
3.6.5 การเก็บอุจจาระ ปัสสาวะ และเลือดในสัตว์ทดลอง	35
3.6.6 การวัดออกซาลेटและซีเตรทในปัสสาวะ	36
3.6.7 การวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะ	37
3.6.8 การวัดครีอะทีนินในปัสสาวะ	37
3.6.9 การวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมในเซรัมของสัตว์ทดลอง	38
3.6.10 การวัดออกซาลेटในอุจจาระของสัตว์ทดลอง	38
3.6.11 การการุณยฆาต เก็บตัวอย่างอวัยวะของสัตว์ทดลอง	38
3.6.12 การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับส่งตรวจพยาธิสภาพ	39

3.6.13 การสกัด DNA จุลินทรีย์จากอุจจาระ.....	39
3.6.14 การวัดคุณภาพ DNA.....	40
3.6.15 การตรวจยีน <i>Oxc</i> และ <i>Frc</i> ใน DNA ของจุลินทรีย์จากอุจจาระ.....	40
3.6.16 การสกัด RNA จากอวัยวะของสัตว์ทดลอง.....	41
3.6.17 การวัดคุณภาพ RNA.....	42
3.6.18 การทำ DNase treatment ในตัวอย่าง RNA.....	42
3.6.19 การสังเคราะห์ cDNA.....	43
3.6.20 การวัดการแสดงออกของยีน.....	43
3.6.21 การคำนวณการแสดงออกของยีน.....	45
3.6.22 การคำนวณดัชนีความอึดตัวของยิวต์ของปีศาจ.....	45
3.6.23 การคำนวณสัดส่วนการกรอง electrolyte ผ่านไต.....	46
3.6.24 เกณฑ์ในการประเมินพยาธิสภาพของอวัยวะในสัตว์ทดลอง.....	46
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	47
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	51
4.1 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมวิจัย.....	51
4.2 น้ำหนักของสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการวิจัย.....	52
4.3 ผลการศึกษาจุลินทรีย์ในอุจจาระ.....	53
4.3.1 ผลการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์สำหรับการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง.....	53
4.3.2 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระ.....	54
4.3.2.1 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์.....	55
4.3.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง.....	61
4.4 สารก่อนวัยและสารยับยั้งในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง.....	69
4.4.1 อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะ.....	69

4.4.2 อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ.....	71
4.4.3 อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะ	74
4.4.4 อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะ	76
4.4.5 ผล pH ในปัสสาวะ	79
4.4.6 ผลดัชนีความอึดตัวยังยวดยในปัสสาวะ	81
4.5 ผลพารามิเตอร์ในซีรัมของสัตว์ทดลอง.....	84
4.5.1 ผลแคลเซียมในซีรัม	84
4.5.2 ผลแมกนีเซียมในซีรัม.....	85
4.6 ผล Fractional excretion ของสัตว์ทดลอง	87
4.6.1 ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในสัตว์ทดลอง	87
4.6.2 ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียมในสัตว์ทดลอง	88
4.7 ผลออกซาเลตในอุจจาระของสัตว์ทดลอง	89
4.8 ผลพยาธิสภาพไต และลำไส้ของสัตว์ทดลอง.....	91
4.8.1 ผลพยาธิสภาพไตของสัตว์ทดลอง	91
4.8.2 ผลพยาธิสภาพลำไส้ของสัตว์ทดลอง	92
4.9 ผลการแสดงของยีน <i>NF-kB</i> <i>SLC26A6</i> <i>ZO1</i> และ <i>OCN</i> ในสัตว์ทดลอง.....	94
4.9.1 ผลการแสดงออกของยีน <i>NF-kB</i> ในไตของสัตว์ทดลอง.....	94
4.9.2 ผลการแสดงออกของยีน <i>SLC26A6</i> ในลำไส้สัตว์ทดลอง	95
4.9.3 ผลการแสดงออกของยีน <i>OCN</i> และ <i>ZO1</i> ในลำไส้สัตว์ทดลอง.....	96
4.10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ	97
4.10.1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง	97
4.10.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าการแสดงผลออกของยีน <i>SLC26A6</i> ในสัตว์ทดลอง	99

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล.....	101
บรรณานุกรม.....	109
ประวัติผู้เขียน.....	120



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 แสดงแนวทางการรักษาโรคนิวเปื้องต้น	7
Table 2 รายงานที่พบยีนสลายออกซาเลตของจุลินทรีย์ในลำไส้.....	15
Table 3 Primer ที่ใช้ในการตรวจยีน Oxc และ Frc ใน DNA ของจุลินทรีย์จากอุจจาระ	41
Table 4 Primer ที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน	44
Table 5 เกณฑ์ที่ใช้ประเมิน crystal deposit ในไต	47
Table 6 เกณฑ์ที่ใช้ประเมินการย้อมติด ZO-1 ในลำไส้ส่วน Jejunum.....	47
Table 7 ข้อมูลของอาสาสมัครแบ่งตามกลุ่มการศึกษา	52
Table 8 ผลตรวจ electrolytes ในปัสสาวะของอาสาสมัคร.....	52
Table 9 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในอาสาสมัคร	60
Table 10 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในสัตว์ทดลอง.....	67
Table 11 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในสัตว์ทดลอง (ต่อ)	68
Table 12 ผลตรวจ electrolytes ในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง.....	84
Table 13 แสดงผลการประเมินการย้อมติด ZO-1 content ที่ลำไส้ส่วน jejunum ของสัตว์ทดลอง	93

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
Figure 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
Figure 2 ขั้นตอนการดำเนินงานในงานวิจัย.....	4
Figure 3 การกระจายตัวของจำนวนผู้ป่วยเป็นโรคนี้ชาวไทยตามช่วงอายุ.....	6
Figure 4 สารสำคัญในการเกิดนี้ว	8
Figure 5 ปริมาณของ CaOx dihydrate หรือ COD ในปัสสาวะที่ pH ต่างกัน	9
Figure 6 กลไกการควบคุมแคลเซียมของวิตามินดี พาราไทรอยด์ และแคลซิโทนิน.....	11
Figure 7 กลไกแคลเซียม Absorptive	11
Figure 8 กลไก Renal leak of calcium	12
Figure 9 กลไก Overproduction of calcitriol.....	13
Figure 10 เมทาบอลิซึมของ Glyoxylate ในตับ และการสร้างแคลเซียมออกซาเลต	14
Figure 11 การดูดซึม และเมทาบอลิซึมของซิเตรต บริเวณ proximal tubule.....	16
Figure 12 ความอึดตัวของปัสสาวะ และการก่ตัวของพลีกันี้ว	18
Figure 13 Apical และ basolateral side ถูกแยกโดย tight junction	18
Figure 14 แบบจำลองโครงสร้างของ Tight junction	19
Figure 15 แบบจำลองการส่งสัญญาณ ROS/Akt/p38 MAPK pathway ส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction.....	20
Figure 16 การกระจายตัวของ Altered taxa ในผู้ป่วยโรคนี้ว เทียบกับคนสุขภาพดี	21
Figure 17 สัดส่วนจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยนี้วทางเดินปัสสาวะ เทียบกับคนสุขภาพดี	22
Figure 18 ขั้นตอนทั่วไปสำหรับการเตรียมการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ.....	24
Figure 19 แสดงการคำนวณประชากรตัวอย่างโดยโปรแกรม G Power.....	28
Figure 20 แสดงการคำนวณประชากรหนูโดยโปรแกรม G Power	29

Figure 21 ชุดเก็บตัวอย่างแบบครั้งเดียว 33

Figure 22 คู่มือภาษาไทยแบบง่ายสำหรับชุดเก็บตัวอย่างแบบครั้งเดียว ประกอบด้วย แผ่นที่ 1
วิธีการเก็บอุจจาระ, แผ่นที่ 2 วิธีการเก็บปัสสาวะ 33

Figure 23 น้ำหนักของสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการวิจัย 53

Figure 24 ผลการตรวจสอบจำนวนของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ 54

Figure 25 แสดงผลจำนวน read ของ 16s rRNA ของตัวอย่าง DNA ในอุจจาระ 55

Figure 26 ผลการเปรียบเทียบ alpha diversity ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์ 56

Figure 27 ผลการวิเคราะห์ richness และ evenness ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์ 56

Figure 28 แสดง PCoA ของความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในมนุษย์ และสัตว์ทดลอง แบ่งตามประเภทของตัวอย่าง 57

Figure 29 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Phylum ใน
อาสาสมัคร 59

Figure 30 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Genus ใน
อาสาสมัคร 59

Figure 31 ผลการเปรียบเทียบ alpha diversity ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง 62

Figure 32 ผลการวิเคราะห์ richness และ evenness ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง .. 63

Figure 33 แสดง PCoA ของความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในมนุษย์ และสัตว์ทดลอง แบ่ง
ตามสปีดาร์ 64

Figure 34 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Phylum ใน
สัตว์ทดลอง 65

Figure 35 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Genus ใน
สัตว์ทดลอง 66

Figure 36 ผลแคลเซียมในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย 69

Figure 37 ผลแคลเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง 71

Figure 38 ผลออกซาเลตในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย 72

Figure 39 ผลออกซาเลตในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง 73

Figure 40 ผลซีเตรทในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย	74
Figure 41 ผลซีเตรทในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง.....	76
Figure 42 ผลแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย.....	77
Figure 43 ผลแมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง	78
Figure 44 ผล pH ในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย.....	79
Figure 45 ผล pH ในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง	80
Figure 46 ดัชนีความอึดตัวยิ่งยวดของปัสสาวะในสัตว์ทดลอง ตลอดระยะเวลาการวิจัย	81
Figure 47 ผลดัชนีความอึดตัวยิ่งยวดของปัสสาวะในสัตว์ทดลอง	83
Figure 48 ผลแคลเซียมในซีรัมของสัตว์ทดลอง	85
Figure 49 ผลแมกนีเซียมในซีรัมของสัตว์ทดลองในสัตว์ทดลอง.....	86
Figure 50 ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในสัตว์ทดลอง	88
Figure 51 ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียม.....	89
Figure 52 ผลออกซาเลตในอุจจาระของสัตว์ทดลอง	90
Figure 53 ผลพยาธิสภาพไตของสัตว์ทดลอง	92
Figure 54 ผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน jejunum ที่ย้อม ZO-1 ของสัตว์ทดลอง	94
Figure 55 ผลการแสดงออกของยีน <i>NF-κB</i> ในไตของสัตว์ทดลอง	95
Figure 56 ผลการแสดงออกของยีน <i>SLC26A6</i> ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง.....	96
Figure 57 ผลการแสดงออกของยีน <i>OCN</i> และ <i>ZO1</i> ในลำไส้สัตว์ทดลอง.....	97
Figure 58 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง.....	98
Figure 59 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง.....	99
Figure 60 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าการแสดงออกของยีน <i>SLC26A6</i> ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง	100
Figure 61 สรุปผลการวิจัย	107



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

โรคนิวไตเป็นโรคในระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยในคนไทย โดยเฉพาะในกลุ่มผู้มีอายุ ตั้งแต่ 40 ปี ขึ้นไป โดยมีรายงานพบได้สูงถึงร้อยละ 16.9 ในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (1) สาเหตุของการเกิดนิวไตมีหลายปัจจัย แต่ความผิดปกติที่พบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในคนไทย คือ ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) แคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) และ ออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) (2) ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติของเมแทบอลิซึมในร่างกาย อาทิ โรคไตบางชนิด กลุ่มอาการเมแทบอลิก หรือการได้รับยาบางชนิด นอกจากนี้ ยังมีหลักฐานว่า บุคคลในครอบครัวผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิวไตสูงกว่าคนทั่วไป (3) ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก พันธุกรรม สภาพแวดล้อม หรือการดำรงชีวิตที่คล้ายกัน ชนิดของนิวไตที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย ได้แก่ นิวไตชนิดแคลเซียม โดยเฉพาะแคลเซียมออกซาเลต ตามด้วยนิวไตชนิดกรดยูริก และนิวไตชนิดเชื้อ (struvite stone)

โรคนิวไตบางครั้งจะไม่แสดงอาการใด ๆ โดยก้อนนิวไตที่มีขนาดน้อยกว่า 1 ซม.สามารถหลุดออกเองได้พร้อมปัสสาวะ แต่ก้อนนิวไตใหญ่กว่า 1 - 2 ซม. ไม่สามารถหลุดเอง ต้องได้รับการรักษา โดยอาการเริ่มต้นอาจพบว่ามีเลือดปนมาในปัสสาวะ ปวดท้องร้าวไปหลัง หรือบางรายอาจมีไข้ เนื่องจากเป็นนิวไตชนิดติดเชื้อ ซึ่งแพทย์จะวินิจฉัยจากผลเลือด และปัสสาวะ ร่วมกับการทำ Non-contrast Computed Tomography (NCCT) เพื่อหาตำแหน่ง และระบุชนิดของนิวไตในผู้ป่วยเพื่อการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ถึงอย่างนั้นผู้ป่วยโรคนิวไตที่ได้รับการรักษาแล้ว จะกลับมาเป็นซ้ำได้อีก ในระยะเวลาเพียง 5 - 10 ปี โดยคิดเป็นร้อยละ 50 (4, 5)

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ในโรคต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในผู้ป่วยโรคนิวไตมีการศึกษาจุลินทรีย์ในลำไส้ พบว่ามีความแตกต่างจากคนสุขภาพดีที่ไม่เคยป่วยเป็นโรคนิวไต โดยจุลินทรีย์ในสกุล *Lachnoclostridium Bifidobacterium* และ *Blautia* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6) ซึ่งจุลินทรีย์ในสกุลดังกล่าวส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มโพรไบโอติก ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ ช่วยป้องกันผนังลำไส้จากแบคทีเรียก่อโรค ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน เช่น Short-chain fatty acid (SCFAs) ดังนั้นหาก SCFAs มีจำนวนลดลงอาจส่งผลต่อสุขภาพของ host ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย

สลายออกซาเลต (oxalate – degrading bacteria) ซึ่งเป็นสารก่อเนื้องอกที่สำคัญ และพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้น้อยในผู้ป่วยโรคนิ่ว เมื่อเทียบกับคนสุขภาพดี (7) จากงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้เชื่อว่าความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดนิ่ว

ปัจจุบันมีนักวิจัย รวมถึงแพทย์ที่สนใจศึกษาวิธีการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระ (Fecal microbiota transplantation หรือ FMT) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษา หรือการศึกษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและลำไส้ ซึ่งมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีในปัสสาวะของหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากหนู Zucker หรือหนูที่มีภาวะน้ำหนักเกินกว่าปกติ (obese) ไปยังหนูปลอดเชื้อ โดยวิธี gavage พบว่าปริมาณออกซาเลต แคลเซียม และแมกนีเซียมในปัสสาวะลดลงอยู่ในระดับปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรกที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระ (8) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของ SCFAs ในโมเดลหนูที่เป็นโรคนิ่ว แคลเซียมออกซาเลต พบว่า Acetate Propionate และ Butyrate ซึ่งเป็น SCFAs ที่สำคัญ สามารถลดจำนวนผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่ไตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (9) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการจำลองสภาวะ Eubiosis หรือสภาวะที่มีจุลินทรีย์ในลำไส้สมดุล มีโพรไบโอติก ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นสาเหตุ หรือเป็นผลของการเกิดโรคนิ่วไต รวมถึงยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ รวมถึงศึกษากลไกเบื้องต้น โดยการปลูกถ่ายอุจจาระของผู้ป่วยโรคนิ่วไตไปยังหนูที่มีภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายอุจจาระจากคนสุขภาพดี เพื่อเปรียบเทียบความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะ โดยใช้ดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะและดัชนีอื่น ๆ เป็นปัจจัยเปรียบเทียบ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของคนไทยที่ป่วยเป็นโรคนิ่วไต และคนสุขภาพดี
2. เพื่อศึกษาความเสี่ยงของการเกิดนิ่วระบบทางเดินปัสสาวะในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี
3. เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นของการเกิดโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต

สมมติฐาน

1. ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิวไตชาวไทยแตกต่างจากประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของคนสุขภาพดี
2. หนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิวไต มีความเสี่ยงในการเกิดนิ่วทางเดินปัสสาวะมากกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี
3. หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิวไต ทำให้ความแข็งแรงของ tight junction ลดลง ส่งผลให้เกิดการรั่วของออกซาเลตสู่กระแสเลือด และเพิ่มการขับ electrolyte ทางปัสสาวะผ่านไตมากขึ้น

กรอบแนวคิดในการวิจัย

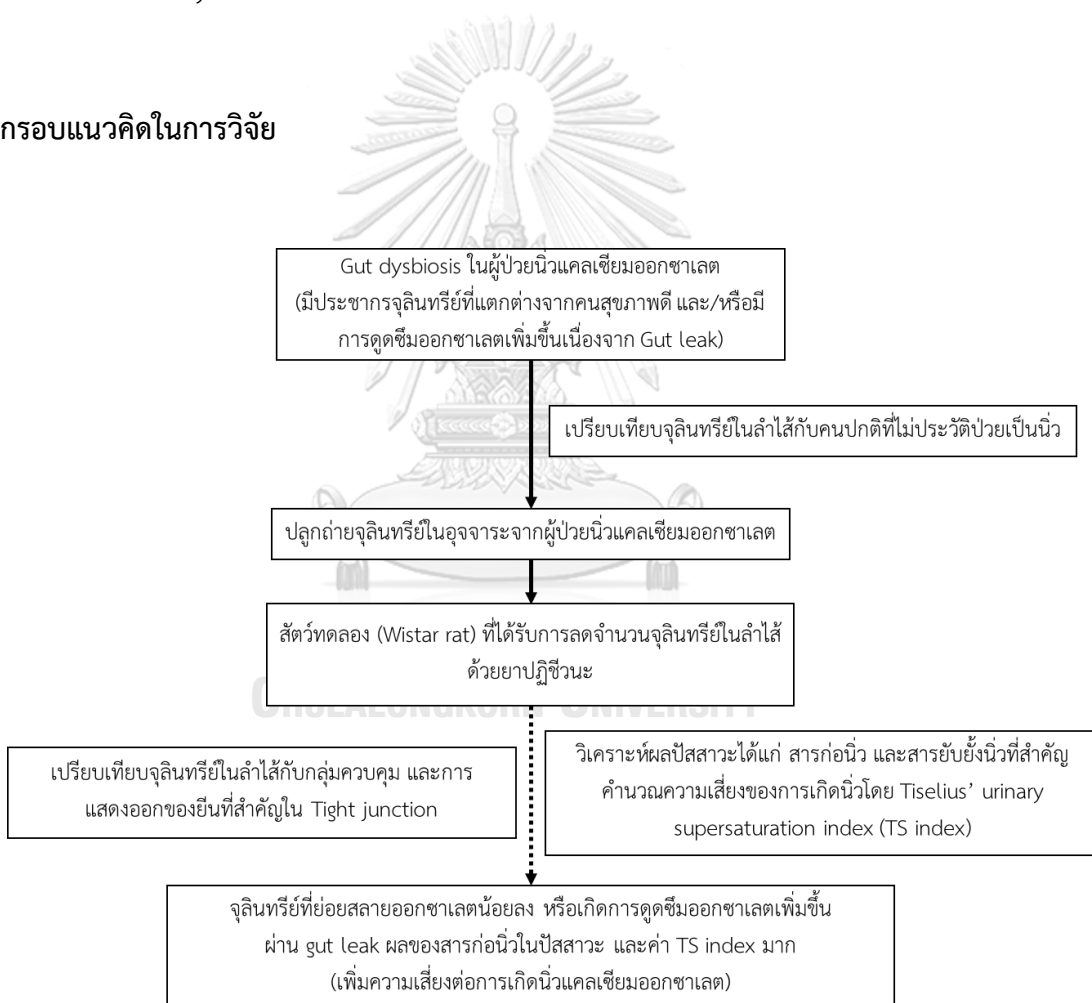


Figure 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

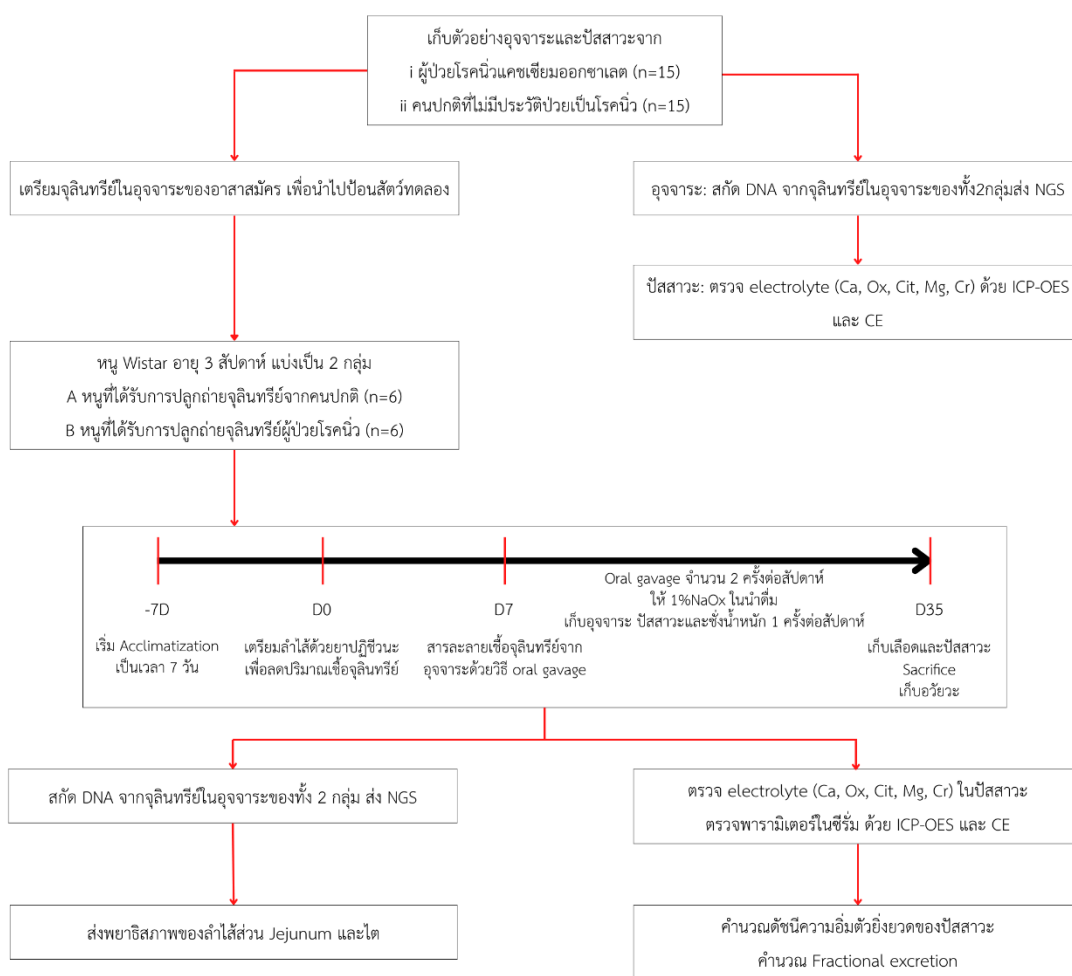


Figure 2 ขั้นตอนการดำเนินงานในงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำสำคัญ

Urolithiasis
Gut microbiota
Fecal microbiota transplantation
Oxalate
Urinary supersaturation index

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลการวิจัยจะสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิวเคลเซียมออกซาเลตกับคนสุขภาพดี ทราบถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวเคลเซียมออกซาเลต จากความผิดปกติของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบื้องต้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการดูแลสุขภาพผู้ป่วยโรคนิวเคลเซียมออกซาเลต รวมถึงพัฒนาแนวทางการรักษา ป้องกัน หรือสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวเคลเซียมออกซาเลตได้ในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคนิ้วไต

โรคนิ้วสามารถพบได้ทั่วไปในประชากรโลก โดยทั่วไป โอกาสเกิดโรคนิ้วของประชากรโลกตลอดอายุไข คือประมาณร้อยละ 1-15 และพบว่าความชุกของโรคนิ้วมีจำนวนที่เพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษาความชุกของโรคนิ้วในประเทศไทยพบมากถึง 3 ใน 100 คน (10) หากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องจะส่งผลให้เกิดการอุดตันที่ท่อไต เลือดออกทางปัสสาวะ เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และอาจส่งผลให้ไตเสื่อมได้ ผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการรักษาจนหายแล้ว 50% จะสามารถกลับมาเป็นใหม่ได้ในระยะเวลา 5-10 ปี และ 75% จะกลับมาเป็นซ้ำในระยะเวลา 20 ปี (11) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของค้ประกอบ และปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ้วในไทย โดย Tosukhowong และคณะ (4) พบว่าช่วงอายุ 40 – 60 ปี คนไทยป่วยเป็นโรคนิ้วมากที่สุด และพบว่ากว่าครึ่งของอาสาสมัครที่เข้าร่วมวิจัย เคยมีประวัติการป่วยเป็นโรคนิ้วมาก่อนแล้ว

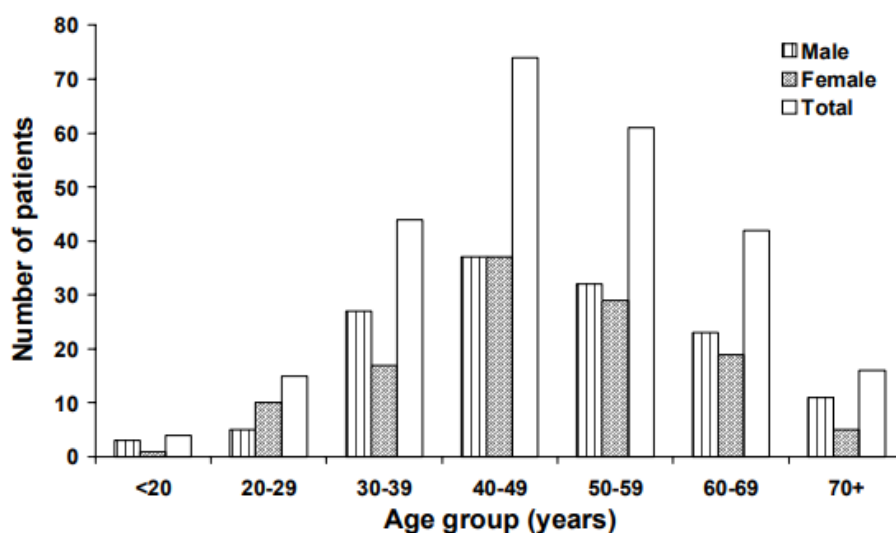


Figure 3 การกระจายตัวของจำนวนผู้ป่วยเป็นโรคนิ้วชาวไทยตามช่วงอายุ
(Tosukhowong P. et al., 2007) (4)

ผู้ป่วยโรคนิ่วส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการใด ๆ แต่บางรายพบว่ามีการเลือดปนมาในปัสสาวะ ปวดท้องร้าวไปหลัง หรือเริ่มมีไข้ โดยแพทย์จะวินิจฉัยจากผลเลือด และปัสสาวะ ร่วมกับการทำ Non-contrast Computed Tomography (NCCT) เพื่อหาตำแหน่ง ระบุขนาด และชนิดของนิ่ว โดยทั่วไปศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ จะจำแนกบริเวณที่พบนิ่วออกเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่ นิ่วที่พบบริเวณไต หรือ Renal Calculi (RC) ส่วนที่สองพบบริเวณท่อไต หรือ Ureteric Calculi (UC) (12, 13)

Table 1 แสดงแนวทางการรักษาโรคนิ่วเบื้องต้น

Renal Calculi (RC)	Ureteric Calculi (UC)
นิ่วที่มีขนาดเล็กกว่า 1 ซม. สามารถหลุดออกได้เองผ่านทางปัสสาวะ หรือถ้ามีผลกระทบหรือพบบริเวณจุดสำคัญในไต ต้องสลายนิ่ว	- นิ่วที่ท่อไตจะต้องรักษาเท่านั้น หากปล่อยไว้สามารถทำให้เกิดการอุดตัน (obstruction) ที่ท่อไต ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อที่ท่อไตหรือไต ทำให้ไตเสื่อมได้
นิ่วที่มีขนาด 1 – 2 ซม. สามารถเลือกวิธีรักษาได้ เช่น Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy (ESWL) หรือ Flexible Ureterorenoscopy (URS)	- โดยศัลยแพทย์จะพิจารณาเลือกวิธีการ เช่น ใช้ยาสลายนิ่ว (ส่วนใหญ่จะใช้ได้ผลกับนิ่วชนิดกรดยูริก) หรือวิธี ESWL หรือ URS
นิ่วที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 ซม. ต้องรักษาเท่านั้น ด้วยวิธี Percutaneous Nephrolithotomy (PCNL)	
ศัลยแพทย์ติดตามผลการรักษา (F/U) ทุก 3, 6 เดือน หรือ 1 ปี ด้วยวิธี X-ray, Ultrasound	

โดยทั่วไปนิ่วถูกจัดประเภทตามส่วนประกอบทางเคมี ซึ่ง calcium oxalate (CaOx) stone มีการตรวจพบมากที่สุด 65.9% ตามด้วย calcium phosphate (carbapatite) (15.6%), urate (12.4%), struvite [(Magnesium ammonium phosphate), 2.7%] และ brushite (1.7%) ตามลำดับ ซึ่ง CaOx และ urate stones สามารถพบได้ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ส่วน carbapatite และ struvite stones พบได้ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย (14) โดยพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ hypertension, chronic kidney disease (CKD) และ end – stage renal disease (ESRD) (15)

ปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดโรคนิ่ว (Stone promoting factors) รายงานในปัจจุบันกล่าวถึง crystal-cell interaction ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิด crystal retention ขึ้นที่ไต พบว่ามี

การแสดงออกของโปรตีน 1,141 ชนิด ที่แตกต่างกันในแบบจำลองการเกิดนิ่ว CaOx monohydrate (COM) ที่ทำในเซลล์ HK-2 ชี้ให้เห็นว่านิ่วชนิด COM ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เซลล์เยื่ออุทอไต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบโปรตีน glycosaminoglycan like CD44, nucleolin, hyaluronan (HA), heat shock protein 90 (HSP90), annexin II และ osteopontin (OPN) ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการก่อตัวของนิ่ว (stone inhibitors) (15) และพบอีกว่าอ็อกซาเลต ออกซาเลต ยูเรต และฟอสเฟต เป็นตัวเร่ง (promoters) ที่สำคัญในกระบวนการสร้างผลึกนิ่ว (crystal formation) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้ถูกขับออกจากร่างกายและกระจายตัวอยู่ในปัสสาวะ ถ้าหากมีปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะ hypercalciuria, hyperoxaluria, hyperuricosuria และ phosphaturia ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคนิ่วในมนุษย์ได้ (16, 17)

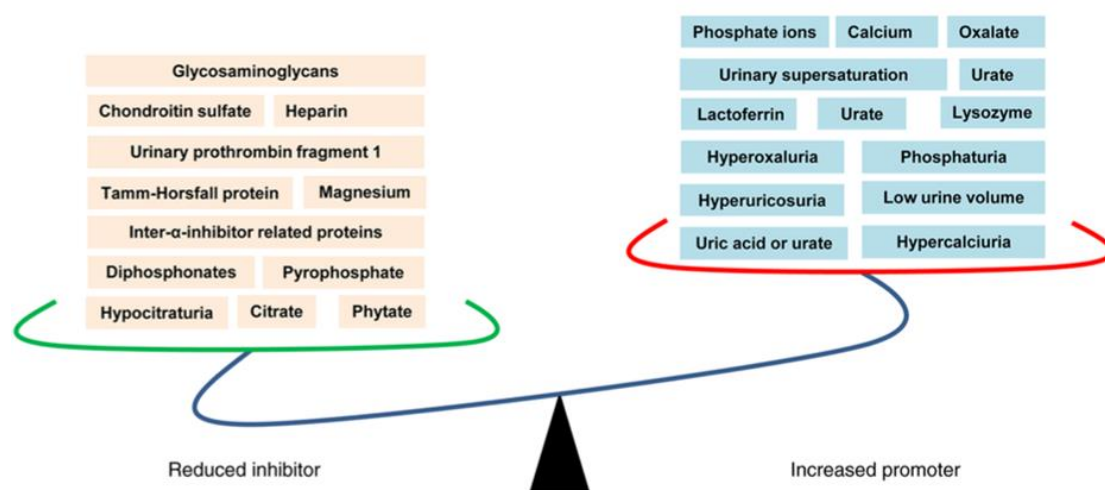


Figure 4 สารสำคัญในการเกิดนิ่ว

ปริมาณ inhibitors (ด้านซ้าย) ที่มีมากกว่า promoters (ด้านขวา) ช่วยลดการก่อตัวของผลึกและนิ่ว (Wang Z. et al., 2021) (15)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วนั้น งานวิจัยของ Ketha และคณะ (18) ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างแคลเซียมในเลือดและ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเกิดนิ่ว (stone formation) ในผู้ป่วยโรคนิ่ว ซึ่งนับเป็นงานวิจัยแรกๆ ที่ระบุถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมและ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ เมื่อระดับแคลเซียมในเลือดมีความเข้มข้นสูงจะทำหน้าที่เป็น promoter ในกระบวนการ lithogenesis ซึ่งเป็นการควบคุมโดยตรง ผ่าน calcium-sensing receptor (CaSR)

มีงานวิจัยที่พบว่า pH ของปัสสาวะยังมีส่วนสำคัญในการเกิดนิ่ว โดยพบว่าปัสสาวะที่มี pH เป็นกรดจะนำไปสู่การเกิด urate stone crystallization และเร่งให้เกิดการสร้างผลึกขึ้นที่ไต ในทาง

กลับกันปัสสาวะที่มี pH เป็นเบสจะนำไปสู่การเกิดนิ่วออกซาเลตได้เช่นกัน (15) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manissorn และคณะ (19) ที่พบว่าหาก pH ในปัสสาวะเพิ่มขึ้นอยู่ในระดับที่เป็นเบส (pH 8.0) จะส่งเสริมให้เกิดการตกผลึกของ CaOx dihydrate หรือ Weddellite ที่พบได้ในนิ่วที่มีองค์ประกอบเป็นแคลเซียมออกซาเลต ดังแสดงใน Figure 5

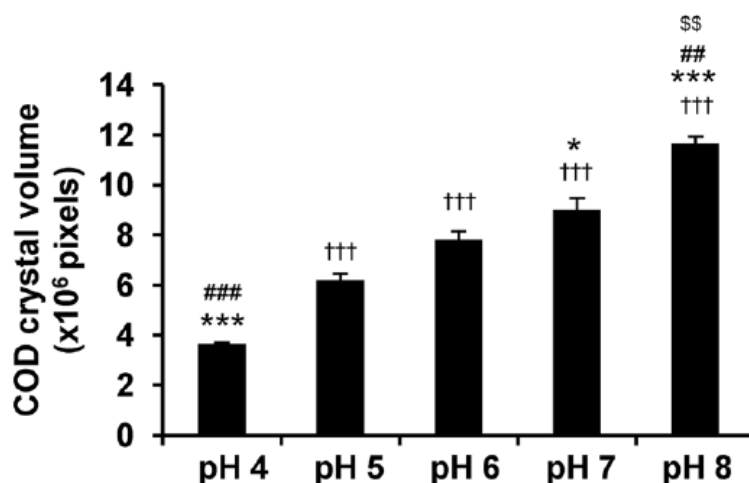


Figure 5 ปริมาณของ CaOx dihydrate หรือ COD ในปัสสาวะที่ pH ต่างกัน (Manissorn J. et al., 2017) (19)

ในผู้ป่วยโรคนิ่วส่วนใหญ่มักพบว่ามีปริมาณ promoter ที่เพิ่มขึ้นและ inhibitor ที่ลดลงจะส่งผลต่อการก่อตัวของผลึกและการเกิดนิ่วในที่สุด ตัวอย่าง inhibitor ที่สำคัญ ได้แก่ ซิเทรต เมื่อซิเทรตในปัสสาวะต่ำหรือลดลง จะไม่สามารถยับยั้งกระบวนการ crystallization (20) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารที่มีคุณสมบัติในลักษณะเดียวกันคือ สารในกลุ่ม metallic cations เช่น magnesium หรือโปรตีน OPN, Tamm-Horsfall protein (THP), urinary prothrombin fragment 1 (UPTF-1), nephrocalcin (NC) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการก่อตัวของนิ่ว ลดการยึดเกาะ (adhesion) ที่บริเวณ tubular cells (21)

การก่อตัวของนิ่ว หรือการเกิดนิ่วนั้นก่อให้เกิดการบาดเจ็บต่อเยื่อบุผิวเซลล์ (renal epithelial cells) (22) ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวที่บาดเจ็บในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมออกซาเลต สามารถเกิดจากก้อนนิ่วโดยตรง หรือเป็นผลจากสารออกซาเลตอิสระในปัสสาวะกระตุ้นให้เกิด lipid peroxidation (LPO) (23) ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) ผ่าน oxygen free radicals โดยมีการศึกษาที่นำเซลล์ LLC-PK1 และ MDCK บ่มไว้กับสารออกซาเลต จากการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายจากการ

สลายตัวของ PUFAs และพบลักษณะที่คล้ายกันในหนูที่ถูกกระตุ้นให้มีภาวะ hyperoxaluria อีกด้วย (23, 24)

นอกจากนี้ขบวนการก่อตัวของผลึกนึว (crystallization) ที่บริเวณ renal epithelium ยังกระตุ้นสารในกระบวนการอักเสบอย่าง Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cell (NF- κ B) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการอักเสบที่สำคัญ โดย NF- κ B จะจับกับ DNA และควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายหลากหลายตำแหน่ง (25) ซึ่งงานวิจัยของ Tozawa K. และคณะ ทำการศึกษาพบว่านึวชนิดแคลเซียมออกซาเลตสามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณของ NF- κ B และส่งเสริมการแสดงออกของ osteopontin (OPN) ที่ renal epithelial cells ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์บริเวณนั้นได้ (26)

ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง

นึวทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยมากที่สุด ในมนุษย์ ได้แก่ นึวแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งพบได้ราว 85% ของนึวทางเดินปัสสาวะทั้งหมด แคลเซียม เป็นไอออนประจุบวกที่พบมากในร่างกาย โดยสะสมอยู่ในเซลล์และกระดูก ระดับแคลเซียมในปัสสาวะถูกควบคุมสมดุลโดยฮอร์โมนที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินดี พาราไทรอยด์ และแคลซิโทนิน ร่างกายได้รับแคลเซียมจากอาหาร โดยวิตามินดีส่งเสริมการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ จากนั้นจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ต่าง ๆ และถูกนำไปสร้างเป็นมวลกระดูกในรูปของ hydroxyapatite โดยการทำงานของ osteoblast การกำจัดแคลเซียมเกิดขึ้นที่ไต แคลเซียมถูกกรองโดยอึสที่โกลเมอรูลัส แต่จะถูกดูดกลับที่ท่อไตโดยการควบคุมของวิตามินดีและพาราไทรอยด์ ดังแสดงใน Figure 6 ขณะที่แคลซิโทนินจะเพิ่มการขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะ (27)

ในภาวะขาดวิตามินดี เมื่อระดับแคลเซียมในเลือดต่ำ ส่งผลให้พาราไทรอยด์หลั่งมากขึ้น กระตุ้นการสลายมวลกระดูก ทำให้แคลเซียมในเลือดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการขับแคลเซียมทางปัสสาวะมากขึ้น (28) ในทางกลับกัน หากร่างกายได้รับวิตามินดีสูงเกินไป จะกระตุ้นการสลายกระดูก เกิดภาวะแคลเซียมในเลือดสูง และเพิ่มการขับแคลเซียมในปัสสาวะเช่นกัน (29) ดังนั้นภาวะขาดวิตามินดี หรือวิตามินดีเกิน หรือภาวะกระดูกผุ เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ hypercalciuria ได้ทั้งสิ้น (30)

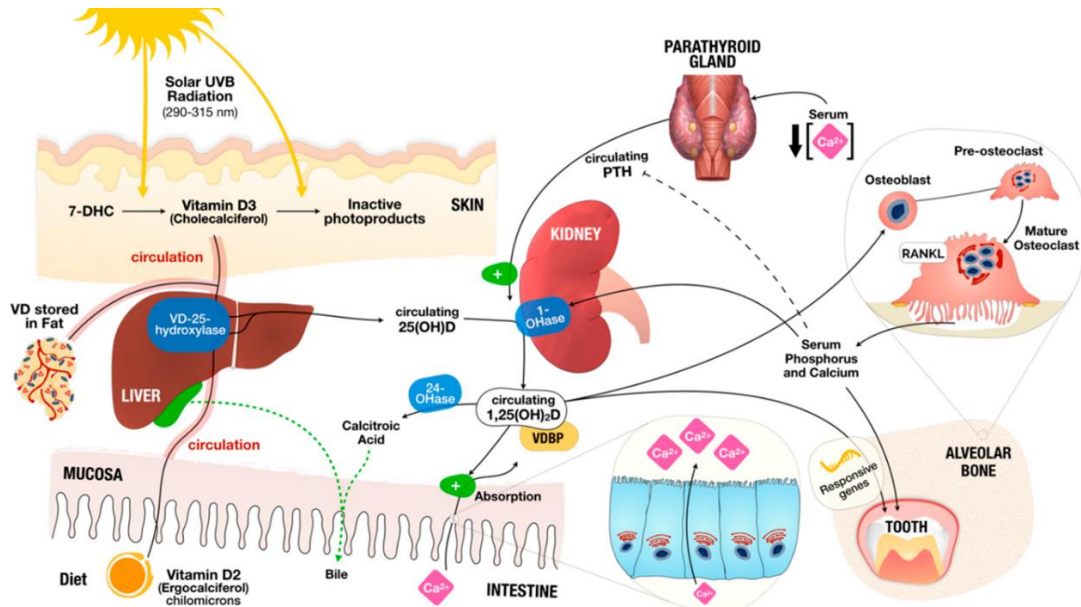


Figure 6 กลไกการควบคุมแคลเซียมของวิตามินดี พาราไทรอยด์ และแคลซิโทนิน (Botelho J. et al., 2020)

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลไกหลัก ได้แก่ Absorptive, Renal leak of Calcium และ Overproduction of Calcitriol (1,25(OH)₂D)

โดยกลไก Absorption เกิดขึ้นเมื่อเรารับประทานอาหารที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ ร่างกายจะดูดซึมแคลเซียมผ่านทางลำไส้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แคลเซียมในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ยับยั้งการหลั่งพาราไทรอยด์ ส่งผลให้ระดับ calcitriol เพิ่มขึ้นหรือเท่าเดิมเพื่อรักษาสสมดุลแคลเซียม และลดการดูดซึมแคลเซียมที่ renal tubular เนื่องจากมีปริมาณแคลเซียมในกระแสเลือดมาก จึงขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะผ่านไต ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงได้

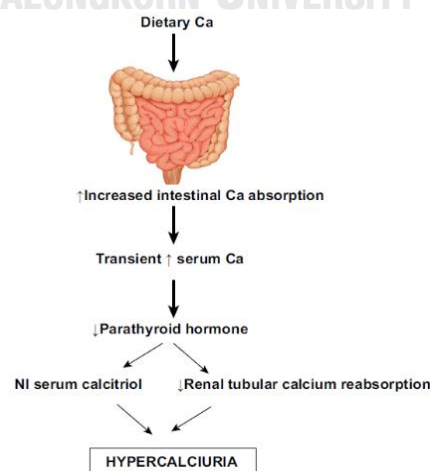


Figure 7 กลไกแคลเซียม Absorptive (NI: normal or increase) (Murray J. et al., 2018) (31)

กลไก Renal leak of calcium เกิดขึ้นเมื่อร่างกายมีปริมาณแคลเซียมในกระแสเลือดต่ำลงชั่วคราว ร่างกายจึงกระตุ้นให้หลังพาราไทรอยด์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยน calcitriol ที่ไตเพิ่มมากขึ้น ไปกระตุ้น osteoclast ให้สลายแคลเซียมจากกระดูก และ calcitriol เอง ไปกระตุ้นให้เกิดการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เพิ่มขึ้น เพื่อรักษาสสมดุลแคลเซียมในกระแสเลือด จากนั้นเมื่อมีปริมาณแคลเซียมในเลือดสูง จึงขับแคลเซียมทางปัสสาวะผ่านไต ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงได้

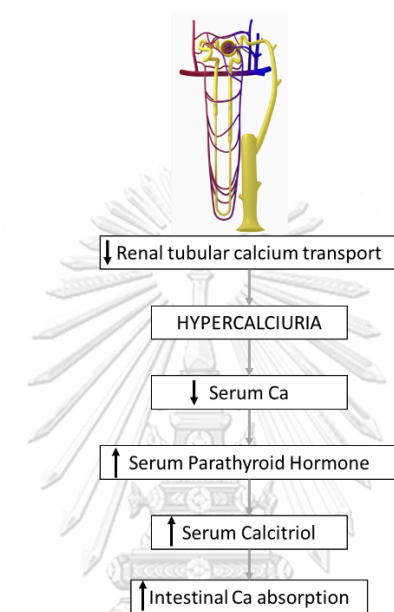


Figure 8 กลไก Renal leak of calcium

(Modifies from Murray J. et al., 2018) (31)

กลไก Overproduction of calcitriol เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับ calcitriol จากอาหารเสริม หรือสร้างขึ้นมากเกินไป จึงทำให้มีปริมาณ calcitriol ในกระแสเลือดมาก ไปกระตุ้นการทำงานของอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อที่มีตัวรับที่จำเพาะต่อ calcitriol หรือ Vitamin D receptor ส่งผลให้มีการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้เพิ่มขึ้น กระตุ้นการทำงานของ osteoclast ให้สลายแคลเซียมจากกระดูกเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณแคลเซียมในกระแสเลือดมาก จึงมีการขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะผ่านไต ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง

นอกจากนี้ ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้แคลเซียมในปัสสาวะสูงอีกประการ คือ การบริโภคน้ำน้อย ทำให้ไตขับน้ำออกทางปัสสาวะน้อย ปัสสาวะจึงมีความเข้มข้นของประจุต่างๆ รวมถึงแคลเซียมและออกซาเลตเพิ่มขึ้น

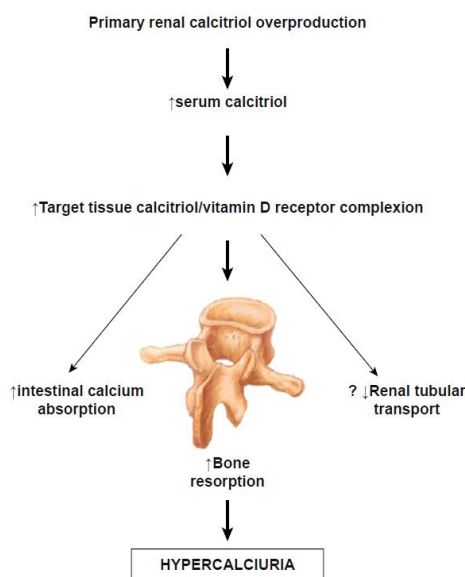


Figure 9 กลไก Overproduction of calcitriol
(Murray J. et al., 2018) (31)

ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงในประชากรไทยจะมีการขับแคลเซียมทางปัสสาวะมากกว่า 200 mg ต่อวัน (32) ซึ่งแคลเซียมในปัสสาวะสามารถจับกับสารประจุลบอื่น อาทิ ออกซาเลต และ ฟอสเฟต กลายเป็นสารเชิงซ้อนที่ละลายน้ำยาก เกิดการตกผลึก กลายเป็นนิ่วแคลิซิส และเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะในที่สุด

ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง

ออกซาเลต เป็นสารที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และกำจัดทิ้งทางไตเท่านั้น ร่างกายได้รับออกซาเลตจากสองแหล่ง คือจากอาหารที่มีออกซาเลตเป็นองค์ประกอบมาก (exogenous) เช่น ชา ช็อกโกแลต ผักบางชนิด นอกจากนั้น ออกซาเลตสร้างขึ้นได้ในร่างกายอันเป็นผลจากการสลายสารอื่น (endogenous) อาทิ วิตามินซี หรือ hydroxyproline ซึ่งเป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน เป็นต้น

เมื่อรับประทานอาหารที่มีปริมาณออกซาเลตเป็นองค์ประกอบมาก ออกซาเลตที่รับประทานไปจะถูกกำจัดออกผ่านทางอุจจาระถึง 75 % ส่วนที่เหลือจะผ่านกระเพาะอาหารมีการดูดซึมเล็กน้อย เมื่อเข้าสู่บริเวณลำไส้เล็ก ออกซาเลตจะถูกดูดซึมเป็นหลักประมาณ 20 % ของร่างกาย ทาง paracellular ผ่าน tight junction ซึ่งตัวที่สำคัญที่ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซาเลตคือ solute carrier family 26 member 6 หรือ *SLC26A6* (33) ซึ่งมีงานวิจัยระบุว่าหนูที่ถูก knockout ยีน

SLC26A6 พบผลึกแคลเซียมออกซาเลตมากกว่าปกติ (9) ส่วนการสังเคราะห์ออกซาเลตในร่างกาย เกิดขึ้นที่บริเวณตับ มากถึง 80% ของปริมาณออกซาเลตทั้งหมดในร่างกาย โดยมีออร์แกนелล์ที่สำคัญ 2 ออร์แกนลล์ในตับที่ทำหน้าที่ detoxification สารตัวกลางอย่าง glyoxylate จาก glyoxylate cycle โดย peroxisome ทำหน้าที่เปลี่ยน glyoxylate เป็น glycine ด้วยเอนไซม์ alanine-glyoxylate aminotransferase (AGT) ส่วนไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยน hydroxyproline ผ่าน hydroxyproline dehydrogenase (HYPDH) ซึ่งสามารถแยกเป็น glyoxylate และ pyruvate ได้ จากนั้นทั้งในไมโทคอนเดรียและไซโตซอล จะเปลี่ยน glyoxylate เป็น glycolate ด้วย glycolate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR) เพื่อป้องกัน lactate dehydrogenase (LDH) สร้างออกซาเลตมากเกินไป และ glyoxylate บางส่วนจะถูกออกซิไดซ์ด้วย LDH ที่บริเวณไซโตซอล เปลี่ยนเป็นออกซาเลต และขับออกทางปัสสาวะผ่านไต (34)

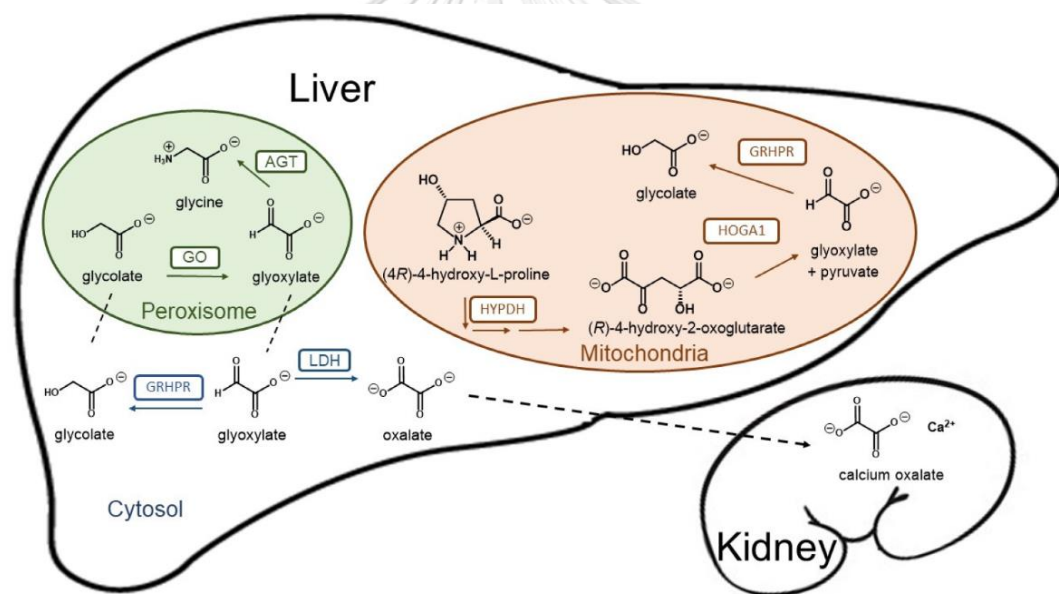


Figure 10 เมทาบอลิซึมของ Glyoxylate ในตับ และการสร้างแคลเซียมออกซาเลต (Garzon M. et al., 2021)

เมื่อมีการรับประทานออกซาเลตมากเกินไป ยิ่งเสี่ยงต่อการเกิดภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง และเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วได้ โดยออกซาเลต เมื่อจับกับแคลเซียมในปัสสาวะ จะเกิดเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลต (CaOx crystal) ซึ่งละลายน้ำได้ยาก ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงสัมพันธ์กับปริมาณออกซาเลตที่บริโภค หรือโรคทางพันธุกรรม ที่เรียกว่า primary hyperoxaluria นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ชื่อ *Oxalobacter* spp. สามารถสลายออกซาเลตใน

อาหารให้กลายเป็นแหล่งพลังงาน การศึกษาก่อนหน้านี้เชื่อว่าคนที่มีเชื้อ *Oxalobacter* ในลำไส้มาก จะดูดซึมออกซาเลตต่ำลง ลดการเกิดภาวะ hyperoxaluria และนิ่วทางเดินปัสสาวะ (35) ปัจจุบันมี รายงานพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรไบโอติก มีเอ็นที่สามารถย่อยสลายออกซาเลตได้ คือ *Oxalyl-CoA decarboxylase (Oxc)* และ *Formyl-CoA transferase (Frc)* ดังแสดงใน Table 2

Table 2 รายงานที่พบเอ็นสลายออกซาเลตของจุลินทรีย์ในลำไส้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ผลการศึกษาที่เกี่ยวข้อง	อ้างอิง
<i>Bifidobacterium animalis</i>	พบว่า <i>B. animalis</i> ทำให้ออกซาเลตต่ำลง	(36)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ใช้ <i>Lactobacillus</i> เป็นโพรไบโอติก สามารถลด ปริมาณออกซาเลตได้	(37)
<i>Oxalobacter formigenes</i>	ปริมาณออกซาเลตลดลงใน human embryo kidney (HEK) 293 cells ที่บ่มพร้อมกับจุลินทรีย์	(38)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	ใช้ <i>B. lactis</i> เป็นโพรไบโอติก สามารถลดปริมาณ ออกซาเลตได้	(39)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	บทบาทของ <i>frc</i> ในขบวนการเมแทบอลิซึมของออก ซาเลต	(40)

ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ

ซีเทรต หรือกรดซิตริก เป็นโมเลกุลที่มีประจุลบ 3 ประจุ พบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น ส้ม มะนาว ส้มโอ ในร่างกายซีเทรตเป็นตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไขมัน นอกจากนี้ยังเชื่อว่าไตใช้ซีเทรตในการสร้างไบคาร์บอเนตด้วย ในส่วนของโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ ซีเทรตทำหน้าที่จับกับแคลเซียมในปัสสาวะให้กลายเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ทำให้แคลเซียมอิสระในปัสสาวะลดลง ลดโอกาสการเกิดผลึกแคลเซียมและป้องกันการเกิดนิ่ว ดังนั้น ซีเทรตจึงจัดเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่สำคัญในปัสสาวะ

ในร่างกาย ซีเทรตเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์เกิดขึ้นที่ไมโทคอนเดรีย ซีเทรตถูกสร้างขึ้นจาก oxaloacetate และ acetyl-CoA หรือ coenzyme A อาศัยเอนไซม์ citrate synthase เมื่อขบวนการในวัฏจักรสิ้นสุดหนึ่งปฏิกิริยา จะได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (41) นอกจากนี้ ซีเทรตยังเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์กรดไขมัน รวมถึงคอเลสเตอรอล โดยอาศัยเอนไซม์ ATP

citrate lyase ซึ่งซิเทรตที่เหลือ (ประจุ 2 ลบ) จะถูกขับออกสู่ปัสสาวะและสามารถถูกดูดกลับ (reabsorption) ประมาณร้อยละ 65 – 90 ผ่านไปบริเวณ apical membrane ของ proximal tubular ทาง sodium-dependent dicarboxylate transporter (NaDC-1) พร้อมโซเดียม ซึ่งจะให้เกิดการถ่ายโอนประจุบวกเข้าสู่เซลล์มาก ดังนั้นต้องอาศัย Na/K adenosine triphosphatase (Na/K ATPase) หรือ Sodium/Potassium pump เคลื่อนย้ายโซเดียมที่มีประจุบวกออกนอกเซลล์ เพื่อรักษาสสมดุลภายในเซลล์ นอกจากนี้ pH ยังมีส่วนสำคัญในการดูดซึมซิเทรต เมื่อ pH ที่บริเวณ tubular ลดลง ส่งผลให้มีปริมาณ citrate^{2-} มากขึ้น (42, 43) ซึ่งจากที่กล่าวมาซิเทรตประจุ 2 ลบ เท่านั้นที่สามารถผ่าน NaDC-1 ได้ ร่างกายจึงเพิ่มการดูดกลับซิเทรตจากปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำได้

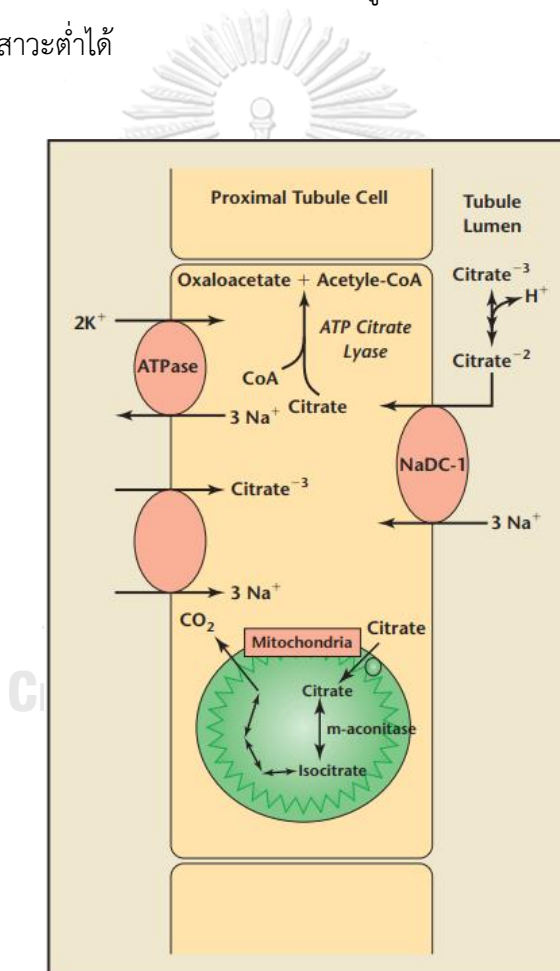


Figure 11 การดูดซึม และเมทาบอลิซึมของซิเทรต บริเวณ proximal tubule

(Zuckerman M. et al., 2009) (43)

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำสามารถเกิดได้จากซิเทรตในเลือดต่ำ เช่น ภาวะเลือดเป็นกรดเรื้อรัง การบริโภคซิเทรตน้อย หรือมีการทำงานของ NaDC-1 เพิ่มขึ้น อาทิ ภาวะ

ปัสสาวะเป็นกรด (44) เมื่อซีเทรตในปัสสาวะต่ำ จะไม่สามารถยับยั้งการเกิดนิ่วได้ และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมในทางเดินปัสสาวะ

ความอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ

ภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ (urine supersaturation) เกิดขึ้นจากความเข้มข้นของ electrolyte ในปัสสาวะสูงเกินกว่าภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (saturation) คือไม่สามารถละลายเพิ่มในปัสสาวะได้อีก โดยทั่วไปหน่วยไต หรือ nephron ทำหน้าที่ในการดูดกลับสารที่ต้องการเช่น โซเดียม ซีเทรต และน้ำ เมื่อถึงจุดอิ่มตัวและมีการดูดกลับน้ำเข้าสู่ร่างกาย ปัสสาวะจะเกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดได้

ระดับของภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ สามารถใช้อธิบายสัดส่วนของสาร electrolyte ในปัสสาวะหรือ actual ion-activity product (AP_{salt}) ได้ ซึ่งคำนวณได้จากความเข้มข้นของไอออนอิสระหรือ electrolyte ในปัสสาวะ และปริมาณปัสสาวะ มีสูตรการคำนวณ และวิธีการคำนวณดังแสดงใน 3.6.22 การคำนวณดัชนีความอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ โดย Tiselius และคณะ (45) ได้ทำการทดลอง ion-activity product ของนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (AP_{CaOx}) ในปัสสาวะ 8 ชม. จากโมเดลหนู พบว่าสามารถใช้บ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตได้อย่างมีประสิทธิภาพ แล้วจึงเริ่มมีการวิจัยในคนตามมา โดยมีการศึกษาความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในผู้ป่วยที่เป็นนิ่วไต เทียบกับคนสุขภาพดี พบว่าสูตรคำนวณสามารถใช้ในการประเมินความเสี่ยงในก่อดตัวของนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตได้ (46)

ภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลต นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งเสริมการก่อตัวของนิ่วแคลเซียมออกซาเลต ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของสารก่อนิ่ว เช่น แคลเซียม ออกซาเลต หรือการลดลงของสารยับยั้งนิ่ว เช่น แมกนีเซียม ซีเทรต หรือปริมาณปัสสาวะที่ลดลง รวมทั้ง pH ของปัสสาวะด้วย (47) จาก Figure 12 สภาวะการเกิดนิ่ว คือ homogenous nucleation หรือภาวะที่เกิดผลึกนิ่วได้เอง ซึ่งเกิดขึ้นจาก เมื่อ stone promotion หรือสารก่อนิ่วมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้เกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ จะส่งเสริมให้เกิดการก่อตัวของนิ่ว และ heterogenous nucleation หรือภาวะการเกิดผลึกนิ่ว ที่ต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ หรือสภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดผลึกได้ จะสังเกตว่าภาวะนี้เกิดขึ้นได้ในปัสสาวะที่มีทั้ง promotion (สารก่อนิ่ว) และ inhibition (สารยับยั้งนิ่ว) มีปริมาณที่พอดีกัน หรืออันใดอันหนึ่งเพิ่มขึ้น หรือลดลง โดยมีภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ pH หรือสารประกอบในปัสสาวะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวของนิ่ว (48)

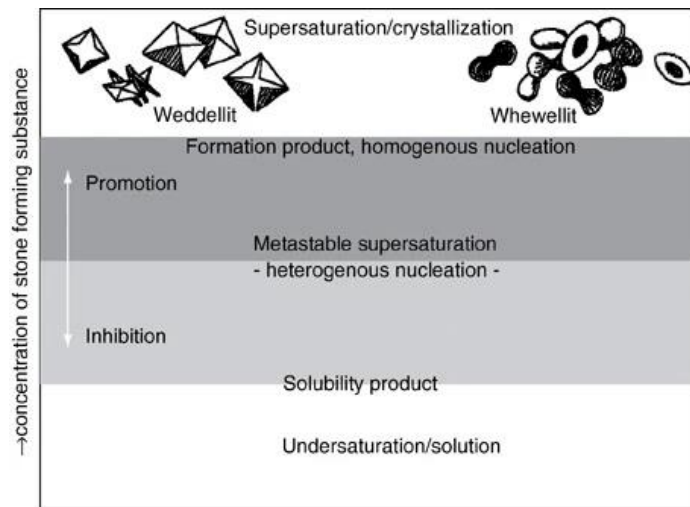


Figure 12 ความเข้มข้นของปัสสาวะ และการก่อตัวของพลีกรินิว

(Hesse A. et al., 2009) (48)

นิ้วไต และ Tight junction ที่ลำไส้

รอยต่อระหว่างเยื่อผิวที่อยู่บริเวณปลายสุดของเซลล์ หรือ Tight junction ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานเซลล์สองเซลล์เข้าด้วยกัน (cell-cell interaction) โดยสามารถจำแนกได้ภายใต้กล้อง electron microscopy ของส่วนที่เชื่อมกันระหว่างเซลล์ที่ผนังลำไส้ โดยมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการแพร่ผ่านของสารโมเลกุลอิสระที่ภายนอก และภายในของเซลล์ ไม่ให้ผ่านเข้ามาโดยง่าย หรือบ้างก็นิยามว่าเปรียบเสมือนเป็นประตู (gate function) หรือเป็นส่วนที่ป้องกันไม่ให้ apical membrane ปะปนกับ basolateral membrane คล้ายกับรั้ว (fence function) (49, 50)

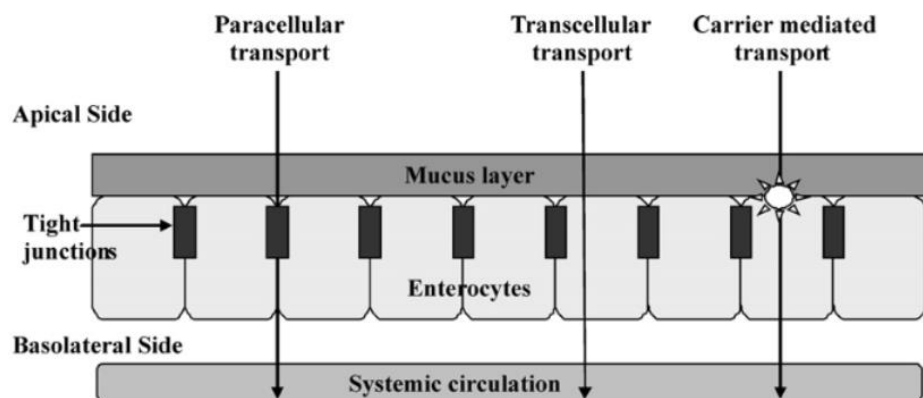


Figure 13 Apical และ basolateral side ถูกแยกโดย tight junction

(Rekha R. et al., 2011) (51)

การขนส่งสารบางชนิด หรือการดูดซึมแร่ธาตุกลับสู่ร่างกายผ่านลำไส้ รวมทั้งสารที่ถูกสร้างขึ้นจากจุลินทรีย์ จะต้องอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านเซลล์ มี 2 รูปแบบคือ transcellular หรือต้องอาศัยช่อง หรือ channel ที่จำเพาะต่อสารโมเลกุลนั้น ๆ ในการอนุญาตให้เคลื่อนผ่านไปอีกด้านของเซลล์ได้ ส่วน paracellular มีลักษณะเป็น Pore หรือ Leak pathway โดย Leak pathway ถูกควบคุมด้วย ZO-1 และ Occludin (OCLN) (52) จัดเป็นโปรตีนที่สำคัญของ tight junctions หรือขึ้นอยู่กับความคงตัวของการยึดเกาะกันของเซลล์ (integrity of the cell-cell tight junctions) หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเยื่อเมือกที่ผนังลำไส้ (51) หากสูญเสียการทำงานส่งผลต่อการขนส่งของสารได้

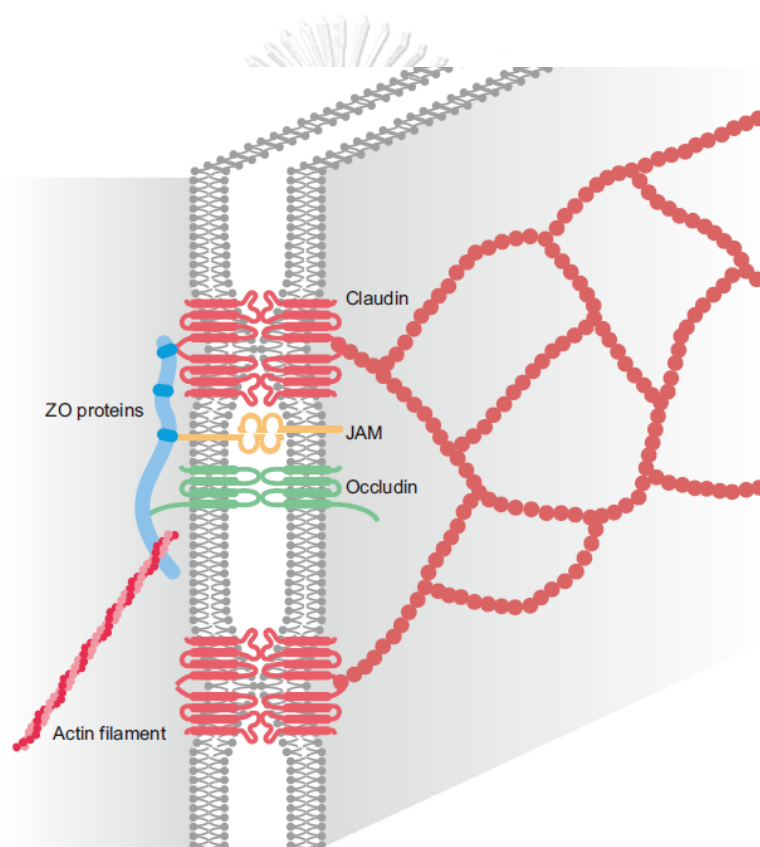


Figure 14 แบบจำลองโครงสร้างของ Tight junction

(Modified from Otani T. et al., 2020) (53)

โมเลกุลส่วนประกอบสำคัญของ tight junction ที่ประกอบกันเป็น barrier ได้แก่ Occludin (OCLN), Claudin และ Junctional adhesion molecules (JAM) โปรตีนเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่ม transmembrane proteins ซึ่งเชื่อมต่อกับโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ ได้แก่ Zonula

occludens (ZO-1 ถึง 3) ที่เชื่อมต่อกับ Actin filament หรือ Cytoskeleton อีกทอดหนึ่ง โดย ZO-1 และ Occludin มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก หากโปรตีนตัวใดตัวหนึ่งเสื่อม หรือถูกทำลาย จะส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction เพิ่มการซึมผ่าน (permeability) ของสารทาง paracellular (51, 53, 54) ทำให้เกิดการรั่วของสารจาก lumen เข้าสู่กระแสเลือดได้

มีการศึกษาพบว่านิวชนิดแคลเซียมออกซาเลต ส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction โดยนำเซลล์ Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells เป็นเซลล์ที่นิยมใช้ในการทดสอบ tight junction หรือ adhesions บ่มพร้อมกับ COM หรือ CaOx monohydrate เป็นเวลา 48 ชม. พบว่า ความเข้มข้นของ COM ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์ตายมากขึ้น เมื่อนำเซลล์ไปวัดการแสดงออกของยีน พบอีกว่า ZO-1 และ Occludin มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (55) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้เสนอแบบจำลองการส่งสัญญาณ ROS/Akt/p38 MAPK pathway ส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction ดังแสดงใน Figure 15 โดย COM กระตุ้นการสร้าง ROS ส่งผลให้เกิด phosphorylation ที่ Ser ตำแหน่งที่ 473 ของ Akt จากนั้น Akt ไปกระตุ้นให้ ASK1 ทำงานโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ Thr ตำแหน่งที่ 838 จากนั้น ASK1 ส่งเสริมให้ p38 MAPK กระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อ tight junction ของเซลล์ MDCK

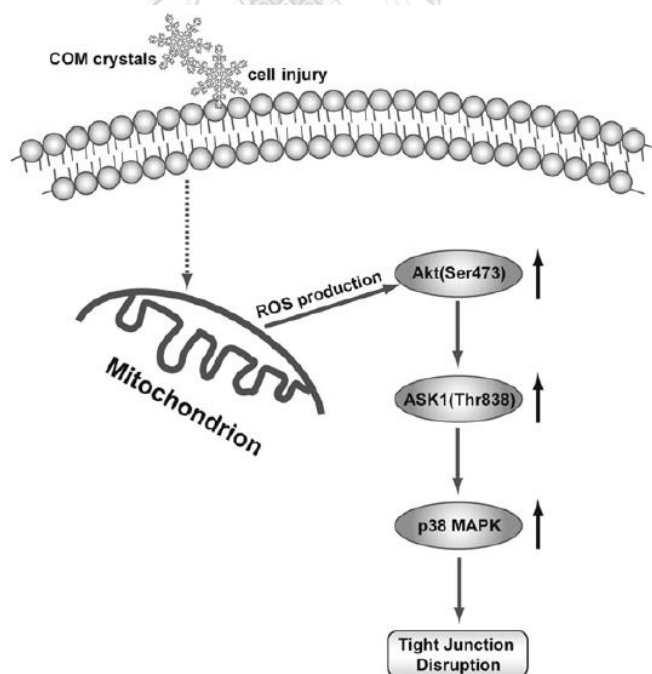


Figure 15 แบบจำลองการส่งสัญญาณ ROS/Akt/p38 MAPK pathway ส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction

(Yu L. et al., 2017) (55)

จุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะ

เป็นที่ทราบกันทั่วไปในปัจจุบันว่าจุลินทรีย์ในลำไส้ สัมพันธ์กับโรคในคน จุลินทรีย์ในลำไส้ของเราอยู่รวมกันเป็นระบบนิเวศน์นับล้านล้านตัว ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้เราสามารถจำแนก และจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ในลำไส้ได้ รวมทั้งสามารถเข้าใจกลไกที่ซับซ้อนซึ่งสัมพันธ์กับโรคได้ง่ายยิ่งขึ้น เช่น การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วยการตรวจ small subunit ribosomal RNA หรือ 16S rRNA (56-58) ที่มีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งให้ข้อมูลเชิงลึกที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ ตลอดจนข้อมูลเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่มีอยู่

งานวิจัยส่วนใหญ่บ่งชี้ว่าการลดความเสี่ยงของการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลต หรือลดความเสี่ยงที่จะกลับมาเป็นซ้ำ จะต้องลดการบริโภคออกซาเลต (59, 60) ซึ่งปัจจุบันพบว่าการปรับเปลี่ยนอาหารเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการลดระดับออกซาเลตในปัสสาวะ มีงานวิจัยที่ชี้ว่า ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลตที่กลับมาเป็นซ้ำ มีความแตกต่างจากกลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แล้วพบอีกว่าผู้ป่วยโรคนิ่วที่กลับมาเป็นซ้ำมีจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ออกซาเลตเป็นแหล่งพลังงานน้อยลง (61)

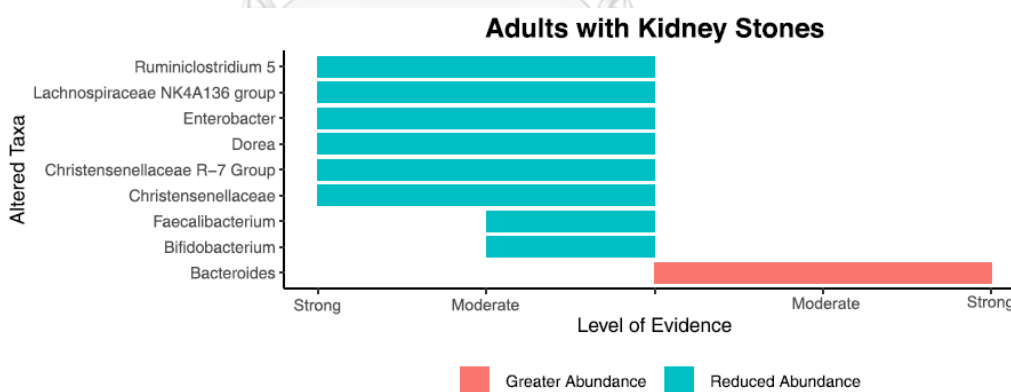


Figure 16 การกระจายตัวของ Altered taxa ในผู้ป่วยโรคนิ่ว เทียบกับคนสุขภาพดี

(Stanford J. et al., 2020) (62)

ความแตกต่างของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยนิ่วทางเดินปัสสาวะ มีความแตกต่างจากคนสุขภาพดี ดังแสดงใน

Figure 16 พบว่า จุลินทรีย์ที่อยู่ในไฟลัม *Firmicutes* ประกอบด้วย กลุ่ม *Lachnospiraceae* NK4A136, กลุ่ม *Ruminiclostridium* 5, *Dorea*, *Christensenellaceae*, และสกุล *Christensenellaceae* R7 รวมทั้ง *Enterobacter* ที่อยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนสุขภาพดี ตรงข้ามกับ *Bacteroides* ที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมากในผู้ป่วยโรคนิวไต นอกจากนี้ยังพบ *Bifidobacterium* และ *Faecalibacterium* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (62) ซึ่ง *Bifidobacterium* และ *Faecalibacterium* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในลำไส้ โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถผลิต SCFAs ที่สำคัญ เช่น butyrate (63) และเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายออกซาเลตมาเป็นแหล่งพลังงานได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ (6) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความจุลินทรีย์ในลำไส้นำไปสู่การเกิดนิ่วในคน พบว่าจุลินทรีย์ในสกุล *Bacteroides* และ *Prevotella*_9 มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แตกต่างจากจุลินทรีย์ในสกุล *Blautia* และ *Bifidobacterium* ซึ่งที่มีจำนวนลดลงในผู้ป่วยนิวไต โดยทั้งคู่จัดเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญในลำไส้ด้วย (Figure 17) จากที่กล่าวมาทำให้เชื่อว่าความแตกต่าง และจำนวนที่ลดลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยนิวไตทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะการลดลงของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ส่งผลต่อการเกิดนิ่วได้

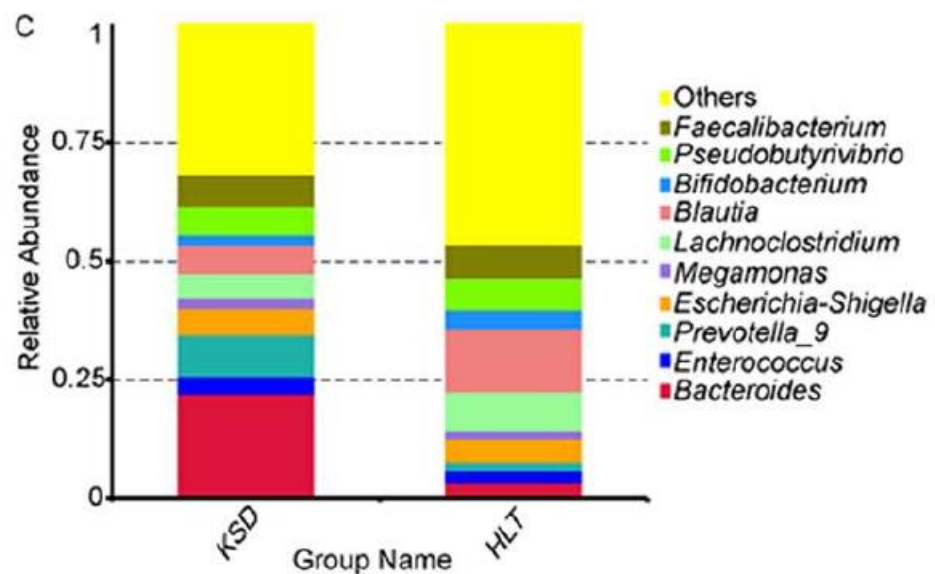


Figure 17 สัดส่วนจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยนิวไตทางเดินปัสสาวะ เทียบกับคนสุขภาพดี

(Zhao E. et al., 2021) (6)

การปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ

จุลินทรีย์ในลำไส้ หมายถึง แบคทีเรีย archaea microeukaryotes และไวรัส ที่อาศัยอยู่ร่วมกับมนุษย์ หรือ host ในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ ภาวะอิงอาศัย (commensal) ภาวะพึ่งพาอาศัย (symbiotic) และภาวะก่อโรค (pathogenic) (64) โดยเชื่อว่าจุลินทรีย์ในลำไส้มีอันสัมพันธ์กับโรคต่าง ๆ ดังนั้นเพื่อศึกษาหน้าที่ของจุลินทรีย์เหล่านั้น จึงเกิดวิธีการที่เรียกว่า “การปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ” หรือ Fecal microbiota transplantation (FMT) ซึ่งหมายถึง การนำอุจจาระสดจากผู้ให้ (donor) มาเตรียมเป็นสารละลายจุลินทรีย์ที่มีชีวิต จากนั้นนำไปปลูกถ่ายในลำไส้ของผู้รับ (recipient) เพื่อเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้ และเพื่อประโยชน์ทางสุขภาพแก่ผู้รับ (65, 66) โดยพบหลักฐานชิ้นแรกที่มีการนำอุจจาระมาใช้ในการรักษาโรค เกิดขึ้นที่ประเทศจีน ช่วงศตวรรษที่ 4 ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคท้องร่วง และอาการต่าง ๆ โดยใช้อุจจาระ (67) และเริ่มมีนำจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระมาใช้ในการศึกษาวิจัยเรื่อยมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ตับ และไต จนนำมาสู่กระบวนการรักษาโรคที่สำคัญอย่าง inflammatory bowel disease (IBD) ที่เกิดจาก *Clostridium difficile* โดยงานวิจัยของ Smits และคณะ (66) ได้นำอุจจาระจากคนสุขภาพดี ปลูกถ่ายลงในผู้ป่วยดังกล่าว พบว่าสามารถช่วยลดความรุนแรง และปรับสมดุลในลำไส้ได้

ความปลอดภัยของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ สามารถยืนยันได้จากงานวิจัยของ Brandt และคณะ (68) ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ ไปยังผู้ป่วย *Clostridium difficile* และติดตามผลการรักษาเป็นระยะเวลาถึง 17 เดือนหลังจากผู้ป่วยได้รับ FMT ไปแล้ว พบว่าผลจากการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ ไม่ส่งผลเสียต่อ host นอกจากนี้ Health Canada ซึ่งเป็นหน่วยงานภาครัฐด้านสาธารณสุขของประเทศแคนาดา ได้ออกนโยบายกำหนดให้กระบวนการทำ FMT รวมถึงวิธีการนำไปใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Clostridium difficile* สามารถทำได้ โดยขึ้นทะเบียนเป็น “new biological drug” เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคดังกล่าวด้วย (69) เช่นเดียวกับ US Food and Drug Administration (FDA) ของสหรัฐอเมริกา ได้พิจารณาให้อุจจาระเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ และยา ซึ่งอนุญาตให้แพทย์สามารถใช้วิธี FMT ในผู้ป่วยติดเชื้อ *Clostridium difficile* ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาแบบปกติได้ (70)

ปัจจุบันการศึกษาศึกษาการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ เริ่มมีการศึกษาในโรคอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้น ทั้งการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรค หรือการศึกษาหน้าที่ของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่วนใหญ่เป็นการวิจัยในสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนู rat หรือ mice เนื่องจากเลี้ยงง่าย โตเร็ว และมีโครงสร้าง

อวัยวะที่คล้ายกับคน (71, 72) มีขั้นตอนการเตรียมจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ วิธีการเก็บรักษา และการนำไปป้อนในสัตว์ทดลองดังแสดงใน Figure 18

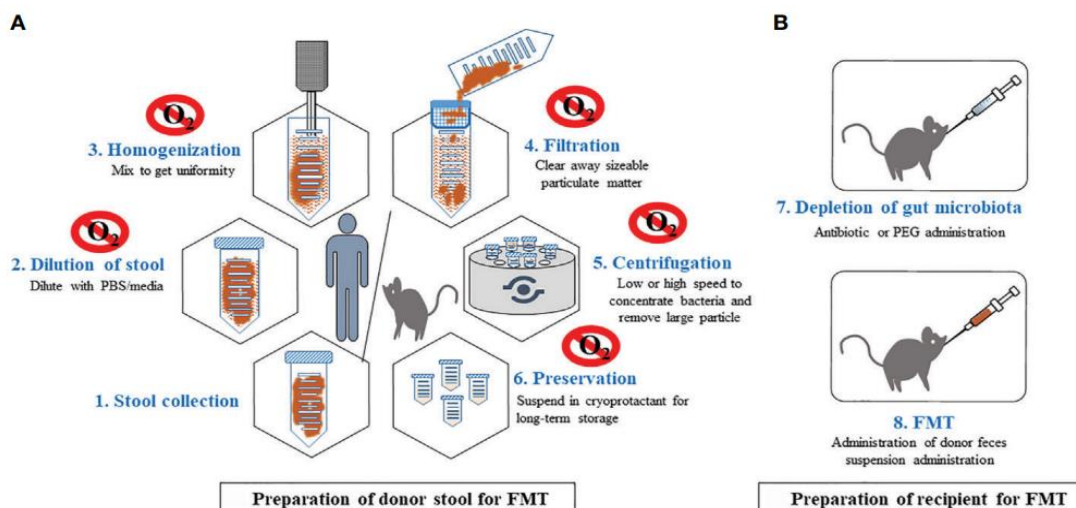


Figure 18 ขั้นตอนทั่วไปสำหรับการเตรียมการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ (Bokoliya S. et al., 2021) (71)

ขั้นตอนที่ได้รับยอมรับทั่วไปสำหรับการเตรียมการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ แบ่งออกเป็นขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่ 1) การเตรียมอุจจาระจากผู้ให้ (donor) (Figure 18A) เริ่มจากการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากคน หรือสัตว์ทดลอง หากจำเป็นต้องขนส่ง ตัวอย่างอุจจาระต้องสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด และควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 2) เจือจางตัวอย่างอุจจาระด้วยสารละลายที่ไม่ทำลายจุลินทรีย์ 3) ผสมอุจจาระ และสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วย vortex หรือ homogenizer 4) กรองชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ออกจากสารละลาย 5) นำจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระที่กรองได้ ไปปั่น centrifuge เพื่อแยกจุลินทรีย์ออกจากสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการ 6) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมเก็บรักษาไว้ที่ -80°C) พร้อมกับสารป้องกันเกล็ดน้ำแข็งทำลายเซลล์จุลินทรีย์ เช่น กลีเซอรอล maltodextrin และ trehalose หลังจากนั้นต้องเตรียมลำไส้ของสัตว์ทดลอง (Figure 18B) ด้วยการให้ยาปฏิชีวนะ หรือการล้างท้องด้วยสายสวน (Percutaneous endoscopic gastrostomy tube) จากนั้นนำสารละลายจุลินทรีย์ในอุจจาระมาป้อนหนูด้วยวิธี oral gavage (71, 73) หลังจากครบกำหนด ทำการเก็บปัสสาวะ อุจจาระของสัตว์ทดลองไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การศึกษาของ Stern และคณะ (8) เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้กับโรคนิวไตในหนู พบว่าหนู Zucker ที่ไม่มีเชื้อในลำไส้ (Germ-free) มีระดับแคลเซียม ออกซาเลต และแอมโมเนียในปัสสาวะสูงกว่าหนู Zucker ที่มีเชื้อในลำไส้ปกติ และเมื่อปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระจากหนูปกติ ไปยังหนู germ-free จนครบ 4 สัปดาห์ พบว่าหนู germ-free ที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากอุจจาระ มีระดับแคลเซียม ออกซาเลต และแอมโมเนียในปัสสาวะลดลงจนอยู่ในระดับปกติ แล้วพบอีกว่า pH ของปัสสาวะ จากที่เป็นกรดมาก กลับเพิ่มขึ้นมาอยู่ในระดับปกติ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในลำไส้มีผลต่อพารามิเตอร์ในปัสสาวะ โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ของหนูปกติช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวไตในปัสสาวะ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยในมนุษย์เป็นการศึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลภาคตัดขวาง (Cross-sectional analytic)

รูปแบบการวิจัยในสัตว์ทดลองเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study)

3.2 จริยธรรมการวิจัย

การวิจัยในมนุษย์ได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบอนุญาต COA No. 0995/2022

การวิจัยในสัตว์ทดลองได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบอนุญาต 019/2565 และ Institutional Biosafety Committee คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบอนุญาต MDCU-IBC 005/2022

3.3 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ประชากรเป้าหมาย (Target Population) ได้แก่ ผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตที่ได้รับการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก ภาควิชาศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต จำนวน 15 คน

ประชากรกลุ่มควบคุม (Control Population) ผู้ที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกับอาสาสมัครในกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งไม่ได้เป็นโรคนิ่วไต มาจากการเปิดรับสมัคร จำนวน 15 คน วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร (Approach to participant) อาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไตซึ่งอยู่ในความดูแลของแพทย์ผู้วิจัย และกลุ่มคนสุขภาพดีจากการเปิดรับสมัครโดยผู้ทำการขอความยินยอมเป็นบุคคลอื่นที่ไม่ใช่แพทย์เจ้าของไข้ และเป็นการขอภายหลังจากแพทย์หัวหน้าโครงการฯ ให้ข้อมูลคำอธิบายแก่อาสาสมัครแล้ว

โดยได้รับการยินยอมจากอาสาสมัครทั้งหมดก่อนเริ่มเก็บตัวอย่าง เพื่อตัดปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความแตกต่างของจุลินทรีย์ รวมถึงพารามิเตอร์ในปัสสาวะต่าง ๆ ด้าน เพศ อายุ และดัชนีมวลกาย (BMI) จึงเลือกอาสาสมัครที่มี เพศ อายุ และดัชนีมวลกาย ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตชาวไทย (Nephrolithiasis)

1. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

- 1) ผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต ในระยะเวลา 1 ปี
- 2) อายุระหว่าง 18 – 75 ปี
- 3) ไม่ได้บริโภคยาปฏิชีวนะ โพรไบโอติก หรืออาหารที่มีโพรไบโอติกในระยะ 3 เดือนที่ผ่านมา
- 4) ไม่ได้ใช้ยาขับปัสสาวะ วิตามินดี แคลเซียม วิตามินซี ยาถ่าย Potassium magnesium citrate (Uracit®) หรือ Shohl's solution เป็นประจำ

2. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

- 1) ผู้ที่ไม่สามารถเก็บอุจจาระโดยวิธีเก็บอุจจาระแบบสัมผัสออกซิเจนน้อยที่สุด (anaerobic) ได้
- 2) ผู้ที่ตั้งครรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- 3) ผู้ที่เกิดภาวะท้องเสีย หรือโรคติดเชื้อในลำไส้

กลุ่มคนสุขภาพดี (Healthy population)

1. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

- 1) ผู้เข้าร่วมวิจัยเชื้อชาติไทย และมีอายุระหว่าง 18 - 75 ปี
- 2) ผู้เข้าร่วมวิจัยไม่มีประวัติในเวชระเบียนว่าเคยป่วยเป็นโรคนิ่วไต
- 3) ไม่มีประวัติการป่วยเป็นเนื้องอก หรือ neoplasia
- 4) ไม่ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบ โรคตับ
- 5) ไม่ได้ใช้ยาขับปัสสาวะ วิตามินดี แคลเซียม วิตามินซี ยาถ่าย Potassium magnesium citrate (Uracit®) หรือ Shohl's solution เป็นประจำ

2. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

- 1) ผู้ที่ไม่สามารถเก็บอุจจาระโดยวิธีเก็บอุจจาระแบบสัมผัสออกซิเจนน้อยที่สุด (anaerobic) ได้
- 2) ผู้ที่ตั้งครรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- 3) ผู้ที่เกิดภาวะท้องเสีย หรือโรคติดเชื้อในลำไส้

กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent process) แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัคร แจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ

3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

1) อ้างอิงจากงานวิจัยของ Zhao E. และคณะ (6) ที่ทำการศึกษา microbiome data จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคนิวเคลอสิมออกซาลेटเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี พบว่าจำนวนเชื้อที่พบเพิ่มขึ้นมากที่สุดในผู้ป่วยโรคนิวไต คือ Bacteroides (0.222 ± 0.183 vs 0.036 ± 0.057 %, $p < 0.001$) เมื่อนำค่าไปคำนวณจำนวนประชากรโดยโปรแกรม G Power version 3.1 พบว่าต้องการอาสาสมัครจำนวนกลุ่มละ 15 คน

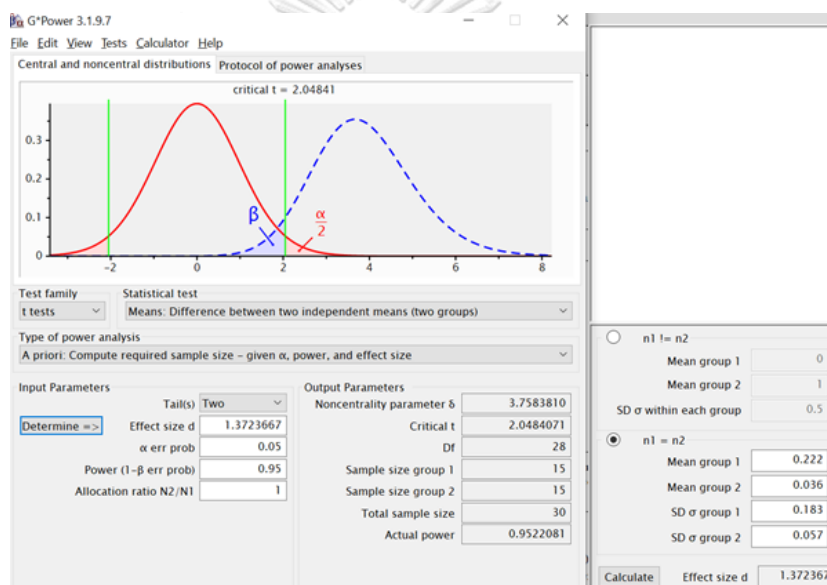


Figure 19 แสดงการคำนวณประชากรตัวอย่างโดยโปรแกรม G Power

2) อ้างอิงจากงานวิจัยของ Joshua M S. และคณะ (8) ที่ทำการปลูกถ่ายอุจจาระจากหนูปกติไปยังหนูปลอดเชื้อ พบการเปลี่ยนแปลงของระดับออกซาลेटที่ขับออกมาทางปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ นำค่าความแตกต่างของระดับออกซาลेटมาคำนวณด้วยโปรแกรม G Power version 3.1 ได้จำนวนประชากรหนูแต่ละกลุ่ม 5 ตัว ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยพิจารณาใช้ตัวอย่างหนูกลุ่มละ 6 ตัว (เพิ่ม 1 ตัว) เพื่อชดเชยกรณีหนูเสียชีวิตระหว่างปฏิบัติการ

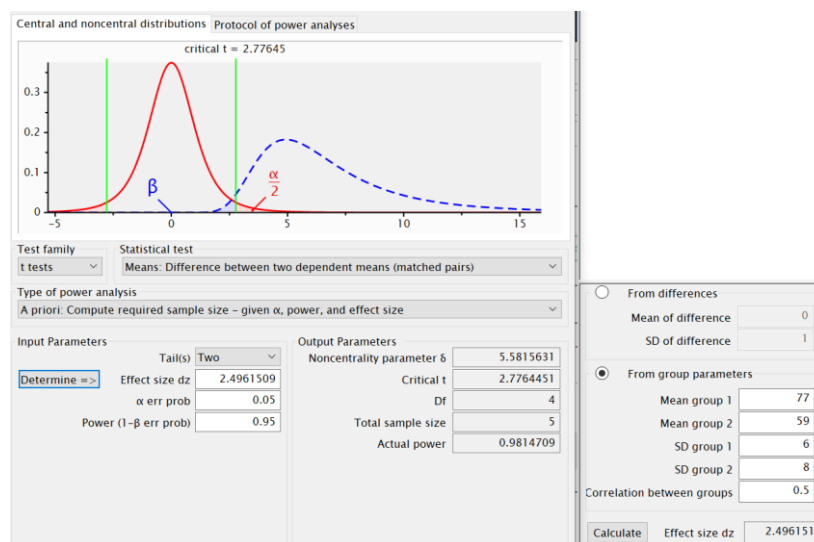


Figure 20 แสดงการคำนวณประชากรหนูโดยโปรแกรม G Power

3.5 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.5.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
2. Microcentrifuge tube 0.5, 1.5, 2 uL (Axygen, USA)
3. Centrifuge tube 50 mL (NEST, China)
4. Denovix DS11 FX+ spectrophotometer (DeNovix Inc., USA)
5. AnaeroPouch[®] -Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Co., Japan)
6. Gauze (NanoMed, Thailand)
7. Vortex (Scientific Industries, USA)
8. Feeding tube No. 18 # 1.5" (NLAC, Thailand)
9. Metabolic chamber
10. Anaerobic chamber Concept 400 (Ruskinn Technology, UK)
11. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
12. Syringe 1, 5, 20 mL (NIPRO, Japan)
13. Hypodermic needle 18, 26 G (NIPRO, Japan)

14. Syringe filter 0.2 μm (Whatman, UK)
15. Incubator (Mettler, Germany)
16. Thermo shaker incubator (MIULAB, China)
17. pH meter (MT, USA)
18. Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrometer Optima 2100 DV (PerkinElmer, USA)
19. Recirculator (PolyScience, USA)
20. Automatic voltage stabilizer (NATTA, Thailand)
21. Capillary electrophoresis (Beckman coulter, USA)
22. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, USA)

3.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ

1. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บอุจจาระของอาสาสมัคร และสัตว์ทดลอง
 - 1) DNA/RNA shield™ Fecal collection tube (PANGEA, USA)
 - 2) DNA/RNA shield™ (Zymo research, USA)
2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากอุจจาระ
 - 1) Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Microprep kit (Zymo research, USA)
3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมจุลินทรีย์จากอุจจาระสำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง
 - 1) 0.9% Sodium Chloride (Sofclens, Thailand)
 - 2) 98% Glycerol (Kemaus, AUS)
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์สำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง
 - 1) MRS agar (TMMEDIA, India)
 - 2) 0.85% Sodium Chloride
5. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเลือดในสัตว์ทดลอง
 - 1) 25,000 unit/5 mL Heparin LEO® (LEO Pharma A/S, Denmark)
 - 2) Ethanol absolute (Merck, Germany)
 - 3) Oxygen gas (Yuwell, Thailand)
6. สารเคมีที่ใช้ในการวัดออกซาลेटและซิเตรทในปัสสาวะ
 - 1) Tetradecyl trimethyl ammonium bromide (Pioneer chemical, China)
 - 2) Sodium hydrogen phosphate (Darmstadt, Germany)

- 3) Sodium hydroxide (Darmstadt, Germany)
- 4) Sodium oxalate (Kemaus, AUS)
- 5) Sodium citrate (Kemaus, AUS)
7. สารเคมีที่ใช้ในการวัดแคลเซียมและแมกนีเซียม
 - 1) 65% Nitric acid (CARLO ERBA Reagents, France)
 - 2) Quality control standard 21 (PerkinElmer, USA)
8. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมออกซาเลตในอุจจาระของสัตว์ทดลองสำหรับวัดปริมาณ
 - 1) 85% Ortho-Phosphoric acid Grade AR (QReC[®], New Zealand)
9. สารเคมีที่ใช้ในการการุณยฆาตรสัตว์ทดลอง
 - 1) 99.99% Isoflurane (Attane[™], USA)
 - 2) Ethanol absolute (Merck, Germany)
10. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บอวัยวะของสัตว์ทดลอง
 - 1) RNA later[™] Solution (Invitrogen, USA)
 - 2) 10% Neutral buffered formalin (Bio-Optica, Italy)
11. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA จากอวัยวะสัตว์ทดลอง
 - 1) TRIzol TM LS reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
 - 2) Chloroform (Merck, Germany)
 - 3) 2-Propanaol (Merck, Germany)
 - 4) Ethanol absolute (Merck, Germany)
 - 5) Water-DEPC Treated Water (Cellconic, Korea)
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ DNase treatment
 - 1) DNase I Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA
 - 1) RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
14. สารเคมีที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน (Gene expression)
 - 1) 4X CAPITAL[™] qPCR Green Master Mix (BiotechRabbit, Germany)
15. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR
 - 1) 10X PCR buffer (KOD-Plus-Neo, Japan)

- 2) 25mM Magnesium chloride (KOD-Plus-Neo, Japan)
 - 3) 0.2 Deoxynucleotide triphosphate หรือ dNTP (KOD-Plus-Neo, Japan)
 - 4) Taq DNA polymerase (KOD-Plus-Neo, Japan)
16. สารเคมีที่ใช้ในการลดจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง
- 1) 1.2 g/20 mL Amoxicillin (Siam Pharmaceutical, Thailand)
 - 2) 500 mg/100 mL Metronidazole (Fresenius Kabi, Thailand)
 - 3) 400 mg/200 mL Ciprofloxacin (Siam Pharmaceutical, Thailand)
 - 4) 500 mg/10 mL Vancomycin (Siam Pharmaceutical, Thailand)
17. สารเคมีที่ใช้ในการเติมลงในน้ำดื่มของสัตว์ทดลอง
- 1) Sodium Oxalate (Kemaus, AUS)
18. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
- 1) GraphPad Prism version 9.4.1 (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>)
 - 2) IBM SPSS statistics version 22 (SPSS, Chicago, IL)

3.6 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.6.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะของอาสาสมัคร

- 1) เมื่ออาสาสมัครได้รับเอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย พร้อมทั้งได้รับการอธิบายจนเข้าใจ อาสาสมัครจะได้รับเวลาในการตัดสินใจ เมื่ออาสาสมัครตัดสินใจเข้าร่วมโครงการ อาสาสมัครจะต้องเซ็นชื่อในเอกสารให้ความยินยอม
- 2) อาสาสมัครจะได้รับชุดเก็บตัวอย่างแบบครั้งเดียวโดยมี ชุดเก็บอุจจาระแบบครั้งเดียว (A) ประกอบด้วยกระปุกขนาด 50 mL พร้อมฝาปิด แผ่น AnaeroPouch® - Anaero และถุง Zip lock พร้อมด้วยชุดเก็บปัสสาวะแบบครั้งเดียว (B) ประกอบด้วย กระปุกขนาด 50 mL และถุง Zip lock รวมทั้งแนบคู่มือภาษาไทยแบบง่าย (C) ไปในชุดเก็บตัวอย่างด้วย โดยอาสาสมัครจะทำการเก็บตัวอย่างที่บ้าน

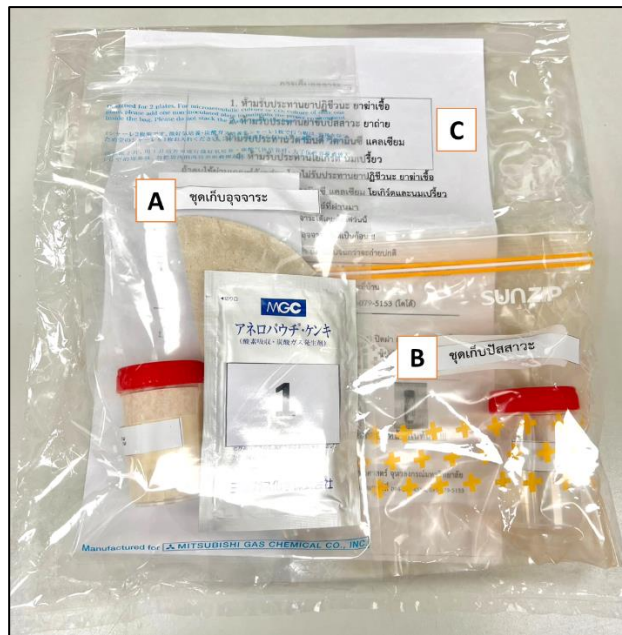


Figure 21 ชุดเก็บตัวอย่างแบบครั้งเดียว

ประกอบด้วย (A): ชุดเก็บอุจจาระแบบครั้งเดียว, (B): ชุดเก็บปัสสาวะแบบครั้งเดียว, (C): คู่มือภาษาไทยแบบง่าย

- 3) เมื่ออาสาสมัครเก็บอุจจาระลงในกระปุก จะใส่แผ่นคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อดูดซับออกซิเจนและกระปุกเก็บตัวอย่างลงในถุง zip lock และปิด zip ให้แน่น เพื่อให้สัมผัสกับออกซิเจนน้อยที่สุด และคงไว้ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ตามวิธีการที่อธิบายไว้ในคู่มือภาษาไทยแบบง่ายดังแสดงใน Figure 22 ปริมาณอุจจาระ 20-30 g จำนวนหนึ่งครั้ง

....การเก็บอุจจาระ....		แผ่นที่ 1	แผ่นที่ 2															
<ol style="list-style-type: none"> ห้ามรับประทานยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ ห้ามรับประทานยาขับปัสสาวะ ยาถ่าย ห้ามรับประทานวิตามินดี วิตามินซี แคลเซียม ห้ามรับประทานโยเกิร์ต นมเปรี้ยว <p>หากท่านผ่านเกณฑ์ดังกล่าว โดยไม่รับประทานยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ ยาขับปัสสาวะ ยาถ่าย วิตามินดี วิตามินซี แคลเซียม โยเกิร์ตและนมเปรี้ยว</p> <p>ภายใน 3 อาทิตย์ที่ผ่านมา</p> <p>สามารถเก็บอุจจาระได้เมื่อใดก็ได้ !!</p> <p>!! อุจจาระต้องเป็นอุจจาระปกติเป็นก้อน !!</p> <p>หากท้องเสียอุจจาระเป็นน้ำ ยังไม่เก็บจนกว่าจะถ่ายปกติ</p> <p>***หลังจากเก็บอุจจาระเสร็จ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ จากนั้นให้ห่อด้วยกระดาษที่แนบมา</p> <p>เจ้าหน้าที่จะส่งไปปรับตัวอย่างอุจจาระที่เย็น</p> <p>โดยติดต่อที่เบอร์ 094-590-4554 (มือถือ) หรือ 091-079-5153 (โตโต้)</p> <p>..ขั้นตอน..</p> <table border="1"> <tr> <td>1) ล้างมือให้สะอาด</td> <td>2) ถ่ายใส่จากกระปุก</td> <td>3) เปิดฝากระปุกเก็บอุจจาระ ใช้ช้อนตักปัสสาวะตรงกลางก้น 2 รอบ(ครั้งกระปุก)</td> <td>4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และน้ำของสี(เป็นนมและยา) นำมาผัดกับน้ำไดโนเจด และ บิลดงให้สนิท</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>หน่วยปฏิบัติการวิจัยเฝ้าทางและเฝ้าชันของระบบทางเดินอาหารและได้ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีข้อเสนอแนะว่าไม่สามารถติดต่อสอบถามได้ตลอดเวลาที่ 094-590-4554, 091-079-5153</p>		1) ล้างมือให้สะอาด	2) ถ่ายใส่จากกระปุก	3) เปิดฝากระปุกเก็บอุจจาระ ใช้ช้อนตักปัสสาวะตรงกลางก้น 2 รอบ(ครั้งกระปุก)	4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และน้ำของสี(เป็นนมและยา) นำมาผัดกับน้ำไดโนเจด และ บิลดงให้สนิท					<p>!!! หลังจากเก็บปัสสาวะและอุจจาระเรียบร้อยแล้ว ให้ห่อด้วยกระดาษที่แนบมา !!!</p> <p>....การเก็บปัสสาวะ....</p> <p>หากท่านผ่านเกณฑ์การเก็บอุจจาระ โดยไม่รับประทานยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อ ยาขับปัสสาวะ ยาถ่าย วิตามินดี วิตามินซี แคลเซียม โยเกิร์ตและนมเปรี้ยว ภายใน 3 อาทิตย์ที่ผ่านมา สามารถเก็บปัสสาวะได้</p> <p>หลังจากเก็บปัสสาวะแล้ว สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้</p> <p>..ขั้นตอน..</p> <table border="1"> <tr> <td>1) ล้างมือให้สะอาด</td> <td>2) เปิดฝากระปุกเก็บปัสสาวะ</td> <td>3) ปัสสาวะใส่กระปุก ประมาณ 3 ส่วน 4 ของกระปุก</td> <td>4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และบิลดงให้สนิท</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>!!! หลังจากเก็บปัสสาวะและอุจจาระเรียบร้อยแล้ว ให้ห่อด้วยกระดาษที่แนบมา !!!</p>	1) ล้างมือให้สะอาด	2) เปิดฝากระปุกเก็บปัสสาวะ	3) ปัสสาวะใส่กระปุก ประมาณ 3 ส่วน 4 ของกระปุก	4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และบิลดงให้สนิท				
1) ล้างมือให้สะอาด	2) ถ่ายใส่จากกระปุก	3) เปิดฝากระปุกเก็บอุจจาระ ใช้ช้อนตักปัสสาวะตรงกลางก้น 2 รอบ(ครั้งกระปุก)	4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และน้ำของสี(เป็นนมและยา) นำมาผัดกับน้ำไดโนเจด และ บิลดงให้สนิท															
1) ล้างมือให้สะอาด	2) เปิดฝากระปุกเก็บปัสสาวะ	3) ปัสสาวะใส่กระปุก ประมาณ 3 ส่วน 4 ของกระปุก	4) ปิดฝา ใส่นู๋จุลินทรีย์สด และบิลดงให้สนิท															

Figure 22 คู่มือภาษาไทยแบบง่ายสำหรับชุดเก็บตัวอย่างแบบครั้งเดียว ประกอบด้วย แผ่นที่ 1 วิธีการเก็บอุจจาระ, แผ่นที่ 2 วิธีการเก็บปัสสาวะ

- 4) การเก็บปัสสาวะเก็บโดยวิธีปกติในกระปุกเก็บปัสสาวะที่มอบให้ที่บ้าน โดยเก็บปัสสาวะ 30 - 50 mL จำนวนหนึ่งครั้ง
- 5) จากนั้นที่มิวจัดจะไปรับตัวอย่างชีวภาพของอาสาสมัคร นำตัวอย่างมาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอสำหรับการจัดการต่อไป

3.6.2 การเตรียมจุลินทรีย์จากอุจจาระของอาสาสมัครเพื่อนำไปปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

หลังจากได้ตัวอย่างอุจจาระจากอาสาสมัครโดยวิธีการเก็บแบบสัมผัสออกซิเจนน้อยที่สุดมาแล้ว จะดำเนินการเตรียมจุลินทรีย์ในอุจจาระของอาสาสมัครตามวิธีการของ Ma และคณะ (74) ดังนี้

- 1) นำอุจจาระของอาสาสมัครกลุ่มละ 5 ตัวอย่างแบบสุ่ม ตัวอย่างละ 3 g มาผสมกัน (รวม 15 g)
- 2) ละลายใน 45 mL 0.9% Sodium Chloride
- 3) ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex อย่างแรง เป็นเวลา 10 วินาที
- 4) กรองผ่าน gauze 3 ครั้ง
- 5) ส่วนน้ำที่ได้ นำไป Centrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 15 นาที
- 6) ดูดส่วน supernatant ผสมกับ 20% Glycerol เพื่อป้องกันเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลายจากเกล็ดน้ำแข็ง (75) เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปป้อนให้สัตว์ทดลองต่อไป

3.6.3 การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์สำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

หลังจากที่นำจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ไปปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองแล้ว นำจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่มาทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ทุกครั้ง ดังนี้

- 1) เตรียม MRS agar plate
- 2) นำจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ทำ Serial dilution ที่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ในสารละลาย 0.85% Sodium Chloride
- 3) ดูดสารที่เตรียมไว้ ที่ความเข้มข้น 10^{-6} ปริมาณ 100 μL ลงบน plate
- 4) Spread plate
- 5) นำ plate ใส่ chamber โดยให้สัมผัสออกซิเจนน้อยที่สุด
- 6) Incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชม.
- 7) เมื่อครบกำหนด นำออกมานับจำนวน colony
- 8) คำนวณจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้สูตร Bacterial enumeration by plate counts

3.6.4 การวิจัยในสัตว์ทดลอง

หนู Wistar เพศผู้ 12 ตัว อายุ 3 สัปดาห์ จากบริษัท Nomura Siam International ถูกเลี้ยงในกรงชนิด Stainless steel - Solid bottom, open top ขนาด 35 x 74.5 x 18 ซม. ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเริ่ม acclimatization 1 สัปดาห์ ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ความชื้น 30 – 50% RH และแสงสว่าง 12 ชม. มีการให้น้ำและอาหารแบบ ad libitum จากนั้นเริ่มการเตรียมลำไส้ด้วยยาปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (ก่อนสัปดาห์ที่ 0) โดยให้ Ampicillin 1 g/L + Ciprofloxacin 1 g/L + Metronidazole 1 g/L + Vancomycin 0.5 g/L ในน้ำดื่ม เป็นระยะเวลา 7 วัน (71) จากนั้นแบ่งหนูเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว โดยกลุ่มแรก (control rat) ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี กลุ่มที่สอง (urolithiasis rat) ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลต โดยทั้งสองกลุ่มใช้สารละลายเชื้อจุลินทรีย์จากอุจจาระปริมาตร 400 μ L ต่อครั้ง สัปดาห์ละสองครั้งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยหนูทั้งสองกลุ่มจะได้รับ 1% Sodium oxalate ในน้ำดื่ม มีการชั่งน้ำหนักของหนูทุกตัวในแต่ละกลุ่มทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ อุจจาระ และเลือดสัปดาห์ละครั้ง เมื่อครบ 4 สัปดาห์ หนูจะถูก sacrifice เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด อุจจาระ ลำไส้ และไต

3.6.5 การเก็บอุจจาระ ปัสสาวะ และเลือดในสัตว์ทดลอง

การเก็บอุจจาระในหนู Wistar จะทำการเก็บในช่วง 9.00 – 11.00 น. สัปดาห์ละครั้ง โดยเก็บอุจจาระสด จาก Anus โดยตรง ใช้วิธีการนวดบริเวณโคนหางของหนู อุจจาระจะถูกเก็บลงใน 1 mL DNA/RNA shield™ ในหลอดขนาด 1.5 mL และเก็บในหลอดเปล่า ซึ่งจะถูกรักษาไว้ที่ -20°C

การเก็บปัสสาวะในหนู Wistar จะเก็บโดยใช้ Metabolic chamber ทุกวันศุกร์เวลาประมาณ 9.00 น. ถึงเวลาประมาณ 17.00 น. รวม 8 ชม. เนื่องจากข้อจำกัดของสถานที่ และจะถูกเก็บรักษาไว้ที่ -20°C

การเก็บเลือดในหนู Wistar จะนำออกมาจากกรงที่ละตัว ทำให้สลบโดย Isoflurane ผ่านเครื่องดมยาสลบของศูนย์สัตว์ทดลองฯ จากนั้นเช็ดบริเวณหางด้วย 70% Ethanol ใช้ Hypodermic needle ขนาด 26 G เจาะลงไปบริเวณ Proximal ventral tail artery เพื่อเก็บเลือดประมาณ 250 μ L ลงใน 1.5 mL Tube ที่มี 0.5 μ L Heparin เลือดที่ได้จะนำไปแยกส่วนโดยการ centrifuge ที่ 1,500 g นาน 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนซีรัม และ PBMC แยกไว้ที่ -80°C

3.6.6 การวัดออกซาเลตและซีเตรทในปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะทั้งของคน และสัตว์ทดลองเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จะนำออกมาเตรียมไว้ โดยของคน aliquot ไว้ 2 mL ส่วนของสัตว์ทดลองจะต้อง dilute 50 เท่า ก่อนการนำไปตรวจวัด โดยใช้เครื่อง Capillary electrophoresis (CE) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียม Sodium citrate และ Sodium oxalate ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
- 2) เตรียมสารละลาย buffer สำหรับทดสอบ โดยเตรียม 0.9 mL ของ 150 mM Sodium hydrogen phosphate รวมกับ 0.3 mL ของ 0.5 mM Tetradecyl trimethyl ammonium bromide และน้ำกลั่น 4.8 mL จากนั้นปรับ pH ด้วย 1M Sodium hydroxide ให้ได้ pH 7 ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน aliquot ใน vial เฉพาะ CE
- 3) เปิดโปรแกรม Karat version 8.0 และเปิดเครื่อง CE
- 4) ประกอบ Cartridge ขนาด $75\ \mu\text{m}/60.2\ \text{cm}$ เข้ากับตัวเครื่อง CE
- 5) กด Load เพื่อใส่ buffer ที่เตรียมไว้
- 6) ทำการ Rinse ด้วย buffer ที่ pressure 20 psi เป็นเวลา 10 นาที
- 7) เตรียม Run โดยใส่ vial ปัสสาวะ/สารสำหรับทำกราฟมาตรฐาน และ buffer จำนวน 4 vial ใส่ลงในช่องใส่สาร
- 8) เลือก Run แบบ Series โดยกดที่ MDQ offline \rightarrow File \rightarrow Sequence \rightarrow Open \rightarrow เลือก platform ที่ตั้งค่าไว้/ตั้งค่าใหม่ โดยใส่รายละเอียดของตัวอย่างเช่น sample-ID filename และตั้งค่า Method โดยใช้ กำลังไฟ 15 kV เวลา 6 นาที
- 9) กด Run
- 10) เมื่อ Run เสร็จ ให้กดที่ MDQ offline \rightarrow Open \rightarrow Data \rightarrow เลือก result ที่ต้องการดู \rightarrow กด Man peak เพื่อให้โปรแกรมแสดงพื้นที่ใต้กราฟ และเวลา โดยออกซาเลตจะออกมาก่อนที่เวลาประมาณ 3.9 นาที ส่วนซีเตรทจะออกมาเวลา 4.6 นาที ตามลำดับ
- 11) นำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรง จะได้ปริมาณออกซาเลตและซีเตรทในปัสสาวะของแต่ละตัวอย่าง

3.6.7 การวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมในปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะทั้งของคน และสัตว์ทดลองเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จะนำออกมาเตรียมไว้ โดยปัสสาวะของคนจะต้อง dilute ที่ 250 เท่า และสัตว์ทดลองจะต้อง dilute ที่ 5,000 เท่า ก่อนการนำไปตรวจวัด โดยใช้เครื่อง Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) เตรียมสารมาตรฐาน Quality control standard 21 ที่ความเข้มข้น 0.10 0.15 0.20 0.25 และ 0.30 ppm ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน
- 2) เตรียม dilute ตัวอย่างปัสสาวะ โดยใช้ปริมาณ 5 mL ต่อตัวอย่าง กรองตัวอย่าง ผ่าน Syringe filter 0.2 μm
- 3) เปิดเครื่องมือตามลำดับ ตามคู่มือการใช้งานเครื่อง ICP-OES Optima 2100 DV Quick Guide
- 4) ทำการล้าง column ด้วย 2% Nitric acid เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
- 5) ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งานเครื่อง ICP-OES Optima 2100 DV Quick Guide
- 6) เมื่อ Run เสร็จ เครื่องจะคำนวณค่าความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมในตัวอย่างโดยจะแสดงเป็นตัวเลข สามารถนำค่าที่ได้ไปคำนวณ หรือเปลี่ยนหน่วยก็สามารถใช้ได้
- 7) ทำการล้าง column ด้วย 2% Nitric acid เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
- 8) ปิดเครื่องมือตามลำดับ ตามคู่มือการใช้งานเครื่อง ICP-OES Optima 2100 DV Quick Guide

3.6.8 การวัดครีเอทีนินในปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะของคน และสัตว์ทดลองที่เก็บไว้ นำออกมา aliquot ปริมาณ 250 μL และส่งตรวจด้วยเครื่อง COBRAS3000 ที่ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.9 การวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมในเซรัมของสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างเซรัมของสัตว์ทดลองที่เก็บไว้ นำออกมา aliquot ปริมาณ 200 μ L และส่งตรวจด้วยเครื่อง COBRAS3000 ที่ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูงตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.10 การวัดออกซาลेटในอุจจาระของสัตว์ทดลอง

เมื่อทำการเก็บอุจจาระของหนูลงใน Tube เปลา แล้วทำการชั่งน้ำหนักของอุจจาระไว้ใช้ในการคำนวณหาปริมาณออกซาลาในอุจจาระที่แท้จริง (76)

- 1) เตรียมสารละลาย 1M Ortho-Phosphoric acid Grade AR ปริมาณ 45 mL ต่ออุจจาระหนู 1 ตัว
- 2) นำอุจจาระของหนู Wistar ที่เก็บใน Tube เปลา 0.5 g ผสมลงในสารละลายข้อ 1
- 3) Vortex อย่างแรง 10 วินาที
- 4) นำไป Incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 1 ชม.
- 5) จะได้สารผสม ปริมาตร 5 mL จากนั้น aliquot 1 mL ลงใน 1.5 mL Tube
- 6) นำไป centrifuge ที่ 15,000 g นาน 2 นาที
- 7) ดูดส่วน supernatant เก็บไว้
- 8) ทำการ dilute ตัวอย่างในสัดส่วน 1 : 100
- 9) นำไปวัดออกซาลेटด้วยเครื่อง CE ตามข้อ 3.5.6
- 10) จะได้ปริมาณออกซาลेट ในปริมาณ 5 mL จากนั้นนำได้หารด้วยน้ำหนักของอุจจาระใน Tube เปลา จะได้ปริมาณออกซาลेटในอุจจาระของหนูจริง

3.6.11 การการุณยฆาต เก็บตัวอย่างอวัยวะของสัตว์ทดลอง

เมื่อครบกำหนด หนูทั้ง 2 กลุ่มจะถูกการุณยฆาตโดยทำให้สลบด้วย Isoflurane เกินขนาด จากนั้นจะทำการเก็บเลือดด้วยวิธี heart puncture ใช้ Hypodermic needle ขนาด 26 G เพื่อเก็บเลือดทั้งหมด ลงใน 1.5 mL Tube ที่มี 0.5 μ L Heparin เลือดที่ได้จะนำไปแยกส่วนโดยการ centrifuge ที่ 1,500 g นาน 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนซีรัม และ PBMC แยกไว้ ที่ -80°C

หลังจากเก็บเลือดเสร็จ ทำการเก็บไตทั้ง 2 ข้าง โดยบางส่วนเก็บใน 1.5 mL Tube ที่มี 1 mL RNA later™ Solution และไตที่เหลือทั้งหมดเก็บใน 10% Neutral buffered formalin จากนั้นทำการเก็บลำไส้ส่วน Cecum และ Jejunum เช่นเดียวกันกับวิธีการเก็บไต แล้วแช่ไว้ที่ 4°C

นอกจากนี้ยังเก็บอุจจาระสด ซึ่งเก็บจากอุจจาระที่ค้างอยู่ส่วน Rectum เพื่อให้ใกล้เคียงกับอุจจาระช่วงอื่น ๆ ตลอดการวิจัย

3.6.12 การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับส่งตรวจพยาธิสภาพ

นำชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ออกมาเตรียม โดยส่วนไตทำ Cross section แล้ววางลงบน cassette และลำไส้ส่วน Jejunum ตัดแนวขวางให้ได้กว้าง 1 ซม. ยาว 1 ซม. ลงบน cassette แช่ไว้ใน 10% Neutral buffered formalin ประมาณ 7 วัน จากนั้นนำส่งงานบริการการตรวจโดยวิธีย้อมพิเศษ อิมมูโนเคมี และเทคนิคทางอนุวิทยา หน่วยรับส่งส่งตรวจทางพยาธิวิทยา อาคาร อปร ชั้น 13 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยไตย้อม hematoxylin and eosin (HE) และลำไส้ส่วน Jejunum ย้อม hematoxylin and eosin (HE) และ immunohistochemistry ด้วย ZO1

3.6.13 การสกัด DNA จุลินทรีย์จากอุจจาระ

การสกัด DNA จุลินทรีย์ที่อยู่ในอุจจาระของคนและสัตว์ทดลองจะได้ Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Microprep kit

- 1) นำอุจจาระหนูหรือคนที่เก็บใน DNA/RNA shield™ ปริมาณ 500 uL ใส่ลงใน Lysis tube เติม 500 uL Lysis buffer
- 2) Vortex อย่างแรง โดยใช้หัว mix แบบพิเศษ 60 นาที
- 3) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 4) ดูดส่วน 400 uL supernatant ลงใน Spin filter ที่อยู่บน collection tube
- 5) นำไป centrifuge ที่ 8,000 g นาน 1 นาที
- 6) ทิ้งส่วน Spin filter-F และเติม 1,200 uL DNA binding buffer ผสมให้เข้ากัน
- 7) ดูดสารละลาย 800 uL ลงใน Spin column ที่อยู่บน collection tube
- 8) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที DNA จะติดอยู่ที่ filter
- 9) ทิ้งส่วนใสที่กรองได้ เติมสารละลายจากข้อ 6 ให้หมด
- 10) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 11) ทิ้งส่วนใสที่กรองได้ เติม 400 uL DNA wash buffer-1
- 12) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 13) ทิ้งส่วนใสที่กรองได้ เติม 700 uL DNA wash buffer-2
- 14) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 15) ทิ้งส่วนใสที่กรองได้ เติม 200 uL DNA wash buffer-2
- 16) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 17) ย้าย Spin column ไปยัง tube ใหม่

- 18) เติม 50 uL DNase Free water แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที
- 19) นำไป centrifuge ที่ 10,000 g นาน 1 นาที
- 20) เตรียม Spin filter III ตามคู่มือ
- 21) คูด DNA จากข้อ 19 ลงใน Spin filter III บน collection tube
- 22) นำไป centrifuge ที่ 16,000 g นาน 3 นาที
- 23) DNA ที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่ -80°C

3.6.14 การวัดคุณภาพ DNA

การวัดคุณภาพ DNA ด้วยเครื่อง Nano spectrophotometer โดยการหยด DNA ปริมาณ 1 uL ลงบนจากนั้นกดที่เครื่องวัด ซึ่งเลือก function เฉพาะการวัด DNA แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ DNase free water เป็น blank มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของ DNA (ng/uL)} &= \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor} \\ \text{คุณภาพของนิวคลีโอไทด์} &= \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \end{aligned}$$

โดยตัวอย่าง DNA ที่ควรจะเป็นจะมีค่าความเข้มข้น 0.05 ng/uL และควรมีคุณภาพของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 1.8 – 2 จากนั้นทำการส่งตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ ไปที่ บริษัท Modgut ต้องมีค่าความเข้มข้นอย่างน้อย 2 ng/uL ปริมาณ 10 uL เพื่อทำ library preparation และ sequencing

3.6.15 การตรวจยีน *Oxc* และ *Frc* ใน DNA ของจุลินทรีย์จากอุจจาระ

นำตัวอย่าง DNA ที่ได้คุณภาพ มาเตรียมปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *Oxalyl-CoA decarboxylase (Oxc)* (77) และ *Formyl-CoA-transferase (Frc)* (78) ดังนี้

- 1) เตรียม Master mix สำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 10 uL
(1 reaction)

Forward primer	0.2	uL
Reward primer	0.2	uL
10X PCR Buffer, Minus Mg	1	uL
2.5 mM dNTP	0.8	uL
Taq DNA polymerase	0.2	uL
25 mM MgCl ₂	0.6	uL
Autoclaved, distilled water	6	uL

Primer ที่ใช้มีดังนี้

Table 3 Primer ที่ใช้ในการตรวจยีน Oxc และ Frc ใน DNA ของจุลินทรีย์จากอุจจาระ

	Forward primer	Reward primer
<i>Oxf</i>	5' CGACAATGTAGAGTTGAC TGA 3'	5' CGTGTGTTCGTGACGGAA 3'
<i>Frc</i>	5' CTSTAYTTCACSATGCTSAAC 3'	5' GDSAAGCCCATVCGRTC 3'

- 2) ทำการ aliquot ลง PCR tube หลอดละ 9 uL
- 3) Pipette 1 uL DNA ลงใน PCR Tube
- 4) ผสมให้เข้ากันด้วย pipette
- 5) นำไป spin down และลงเครื่อง PCR
- 6) ตั้งค่า Experiment method ดังนี้

Hold stage	Step 1	72°C	30	วินาที
PCR stage	Step 1	94°C	30	วินาที
	Step 2*	59°C	30	วินาที
	Step 3	72°C	30	วินาที
	Step 4	72°C	5	วินาที

30 cycles, *ทั้งสอง primer ใช้อุณหภูมิที่ 59°C

- 7) เมื่อ Run เสร็จ นำ PCR product ไป Run gel
- 8) เตรียม 1.5% agarose ลงใน 10X TAE ปริมาณ 100 mL ต่อ 1 gel → เติม 2 uL DNA staining → เท gel ใน chamber → รอจนแห้งประมาณ 15 นาที
- 9) เตรียมหยอด gel โดยผสม Loding dry 2 uL กับ PCR product
- 10) หยอดลงในหลุม 10 uL และหยอด DNA marker 3 uL
- 11) Run gel ที่ 100V นาน 30 นาที → ส่องภายใต้แสง UV

3.6.16 การสกัด RNA จากอวัยวะของสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างอวัยวะได้แก่ ไต ลำไส้ส่วน Cecum และ Jejunum ของสัตว์ทดลองที่เก็บไว้ใน RNA later™ Solution จะนำมาซึ่งให้ได้ 100 mg แล้วนำไปสกัด RNA ด้วยวิธี TRIZOL™ LS reagent

- 1) เมื่อได้ชิ้นเนื้อน้ำหนักประมาณ 100 mg แล้วนำมาใส่โถงสำหรับบดชิ้นเนื้อ
- 2) เติม 500 uL TRIZOL™ LS reagent
- 3) บดชิ้นเนื้อให้ละเอียด
- 4) ดูดสารละลาย ใส่ลงใน 1.5 mL tube

- 5) เติม 500 uL TRIzol™ LS reagent เพื่อล้างโกร่ง
- 6) คูดสารละลาย ใส่ลงใน 1.5 mL tube
- 7) เติม 200 uL Chloroform และ vortex
- 8) นำตัวอย่าง incubate ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
- 9) นำไป centrifuge ที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที
- 10) คูดส่วนใสด้านบน (Colorless aqueous) 500 uL ลงใน 1.5 mL tube
- 11) เติม 500 uL 2-Propanol แล้ว incubate ไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 12) นำไป centrifuge ที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที
- 13) ทิ้งส่วน supernatant เติม 1 mL 75% Ethanol absolute แล้ว vortex
- 14) นำไป centrifuge ที่ 7,500 g อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที
- 15) ใช้ pipette คูดส่วน supernatant ทิ้ง
- 16) เปิดฝาพักไว้ให้แห้ง 10-20 นาที
- 17) เติม 50 uL Water-DEPC Treated Water ผสมให้เข้ากัน
- 18) นำไป incubate ที่ 60°C ด้วย Heat block นาน 10 นาที
- 19) ได้ RNA นำไปวัดคุณภาพด้วยเครื่อง Nano spectrophotometer แล้วเก็บไว้ที่ -80°C ถ้าหากความบริสุทธิ์ไม่ดีนักให้ทำ 3.5.18 ต่อ

3.6.17 การวัดคุณภาพ RNA

การวัดคุณภาพ RNA ด้วยเครื่อง Nano spectrophotometer คล้ายกับการ DNA โดยเลือก function เฉพาะการวัด RNA แล้วกดวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ RNase free water เป็น blank มีสูตรคำนวณและค่ามาตรฐานเหมือนกัน

3.6.18 การทำ DNase treatment ในตัวอย่าง RNA

- 1) ใช้ DNase I kit โดยเตรียม Reaction components ปริมาตรรวม 30 uL ดังนี้

RNA	20	uL
DNase I	3	uL
10X Reaction buffer	3	uL
Water-DEPC Treated Water	4	uL

- 2) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที
- 3) หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 3 uL 0.05M EDTA
- 4) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที
- 5) นำไปวัดคุณภาพด้วยเครื่อง Nano spectrophotometer แล้วเก็บไว้ที่ -80°C

3.6.19 การสังเคราะห์ cDNA

เตรียมความเข้มข้นตัวอย่าง RNA ที่ 2,000 ng จากนั้นทำตามขั้นตอนโดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ดังนี้

- 1) เตรียมหลอดปฏิกิริยาปริมาตรรวม 12 uL ประกอบด้วย

RNA	X	uL
Random hexamer	1	uL
Water-DEPC Treated Water	12 - X	uL

X: ปริมาณ RNA ที่คำนวณได้ที่ความเข้มข้น 2,000 ng

- 2) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 5 นาที
 3) เตรียม Master mix สำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย
 (1 reaction)

5X Reaction buffer	4	uL
Ribolock RNase inhibitor	1	uL
10M dNTP Mix	2	uL
RevertAid reverse transcriptase	1	uL

- 4) เติม 8 uL Master mix ลงในหลอดปฏิกิริยาข้อ 1
 5) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 10 นาที
 และอุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที
 6) หยุดปฏิกิริยา โดยนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที
 7) เก็บ cDNA ไว้ที่ -80°C

3.6.20 การวัดการแสดงออกของยีน

การวัดการแสดงออกของยีน โดยใช้เครื่อง QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) ซึ่งใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากลำไส้ส่วน Jejunum มาวัดการแสดงออกของยีน Zonula occluden-1 หรือ ZO-1 (79) cDNA จากลำไส้ส่วน Cecum มาวัดการแสดงออกของยีน Solute Carrier Family 26 Member 6 หรือ SLC26A6 (9) และ cDNA ของไตมาวัดการแสดงออกของยีน NFkB1 nuclear factor kappa B subunit 1 หรือ NF-kB (80) โดยใช้ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase หรือ GAPDH เป็นตัวหารของทุกยีน (79) โดย primer ที่ใช้ในการวิจัยแสดงใน Table 4 และใช้ 4X CAPITAL™ qPCR Green Master Mix มีวิธีการดังนี้

12) เตรียม Master mix สำหรับปฏิกิริยา RCR

(1 reaction)

SYBR Green	3.75	uL
Forward primer	0.15	uL
Reward primer	0.15	uL
Water for PCR	9.95	uL

Primer ที่ใช้มีดังนี้

Table 4 Primer ที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน

	Forward primer	Reward primer
ZO-1	5'GTATCCGATTGTTGTGTTCC3'	5'TCACTTGTAGCACCATCCGC3'
Occludin	5'CACGTTCGACCAATGC3'	5'CCCGTTCCATAGGCTC3'
SLC26A6	5'CAAGCCCCCAATCATGACCT3'	5'ACAGGACTGTAACAGGCTGC3'
NF-kB	5'CGCAAAAGGACCTACGAGAC3'	5'TGGGGGAAAACATCAAAG3'
GAPDH	5'TGGAGTCTACTGGCGTCTTC3'	5'TTCACACCCATCACAAACATG3'

13) ทำการ aliquot ลง PCR tube หลอดละ 14 uL

14) Pipette 1 uL cDNA ลงใน PCR Tube

15) ผสมให้เข้ากันด้วย pipette

16) นำไป spin down

17) เปิดคอมพิวเตอร์ → เปิดโปรแกรม Quant Studio™ Design & Analysis Software version 1.4.3

18) ทำตามคู่มือการใช้งานเครื่อง เครื่อง Quant Studio™ 5 Real-Time PCR System

19) ตั้งค่า Experiment method ดังนี้

Hold stage	Step 1	95°C	10	นาที
PCR stage	Step 1	95°C	10	วินาที
	Step 2*	61°C	15	วินาที
	Step 3	72°C	20	วินาที
Melt Curve stage	Step 1	95°C	1	วินาที
	Step 2	60°C	20	วินาที
	Step 3	95°C	1	วินาที

45 cycles, *NF-kB primer ใช้อุณหภูมิที่ 54°C

- 20) เมื่อ Run เสร็จ Export ผล แล้วนำมาคำนวณการแสดงออกของยีนด้วยสูตร $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method

3.6.21 การคำนวณการแสดงออกของยีน

เมื่อทำ Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) เสร็จแล้ว นำค่า CT ที่ได้มา คำนวณการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} 1) \quad & \Delta C_q T(\text{treatment}) = C_q T(\text{target}) - C_q T(\text{reference}) \\ & \Delta C_q T(\text{control}) = C_q T(\text{target}) - C_q T(\text{reference}) \\ 6) \quad & \Delta\Delta C_q T = \Delta C_q T(\text{treatment}) - \Delta C_q T(\text{control}) \\ 7) \quad & 2^{-\Delta\Delta C_q T} = \text{Normalized expression ratio} \end{aligned}$$

โดย

treatment	: กลุ่ม Urolithiasis Rat
control	: กลุ่ม Control Rat
target	: ค่า CT ของ ZO-1 หรือ Occludin หรือ NF-kB หรือ SLC26A6
reference	: ค่า CT ของ GAPDH

เมื่อคำนวณตามขั้นตอนจะได้ค่า $2^{-\Delta\Delta C_q T}$ ซึ่งเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่เทียบกับ House-keeping gene หากว่า $2^{-\Delta\Delta C_q T}$ มีค่ามาก แสดงว่ายีนนั้น ๆ มีการแสดงของมาก (81)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.6.22 การคำนวณดัชนีความอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ

คำนวณหาความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่ว ใช้ค่าดัชนีความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ หรือ Tiselius's urinary supersaturation index ซึ่งเป็นการคำนวณหา crystallization potentials (CP) ของนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต จากสภาวะของ urine supersaturation มีสูตรคำนวณดังนี้มีสูตรคำนวณดังนี้

$$AP_{CaOx} = \frac{2.7 \cdot \text{Calcium}^{0.84} \cdot \text{Oxalate}}{\text{Citrate}^{0.22} \cdot \text{Magnesium}^{0.12} \cdot \text{Volume}^{1.03}} \quad \text{_____ (A)}$$

$$AP_{CaOx} = \frac{4067 \cdot \text{Calcium}^{0.93} \cdot \text{Oxalate}^{0.96}}{(\text{Citrate} + 0.015)^{0.60} \cdot \text{Magnesium}^{0.55} \cdot \text{Volume}^{0.99}} \quad \text{_____} \quad (B)$$

โดย

AP_{CaOx} : Approximate estimate of the ion-activity product of calcium oxalate

Calcium, Oxalate, : ค่าพารามิเตอร์ที่วัดได้จากปัสสาวะ

Citrate, Magnesium

Volume : ปริมาณของปัสสาวะที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง (Spot urine)

ซึ่งสูตร A ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในคน และสูตร B ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในสัตว์ทดลองของงานวิจัยนี้ สามารถพิจารณาได้จากค่า AP_{CaOx} ยิ่งมีค่ามากจะแสดงถึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตและนิ่วแคลเซียมฟอสเฟตมาก (45, 46)

3.6.23 การคำนวณสัดส่วนการกรอง electrolyte ผ่านไต

เป็นการวัดสัดส่วนของการกรอง electrolyte จากกระแสเลือดผ่านไต และขับออกทางปัสสาวะ ซึ่งนำมาใช้ในการอธิบายทิศทางการขับแร่ธาตุในร่างกายทั้งคน และสัตว์ทดลอง มีสูตรคำนวณดังนี้

$$FE_x = \frac{\text{Urine}_x \cdot \text{Serum Cr level}}{\text{Serum}_x \cdot \text{Urine Cr level}} \times 100$$

โดย

FE : Fractional excretion หรือสัดส่วนการกรอง electrolyte ผ่านไต

Urine : ค่า electrolyte ในปัสสาวะ

Serum : ค่า electrolyte ในซีรัม

Cr : Creatinine

ค่า FE ที่ได้ควรสอดคล้องกับค่า electrolyte ในซีรัมและในปัสสาวะ

3.6.24 เกณฑ์ในการประเมินพยาธิสภาพของอวัยวะในสัตว์ทดลอง

การประเมินพยาธิสภาพของไตในสัตว์ทดลอง ใช้ polarizing microscope (magnification X400) เพื่อดู crystal deposit มีเกณฑ์ในการพิจารณา และให้คะแนนดังนี้ (82)

Table 5 เกณฑ์ที่ใช้ประเมิน crystal deposit ในไต

Crystal deposition	Point
papillary tip	1
cortical medullary junction	2
cortex	3
no deposit formation	0
หมายเหตุ ให้นำ point รวมกัน	

การประเมินพยาธิสภาพของลำไส้ส่วน Jejunum ในสัตว์ทดลอง ใช้ microscope (magnification X400) เพื่อดูการย้อมติด ZO-1 มีเกณฑ์ในการพิจารณา และให้คะแนนดังนี้ (83)

Table 6 เกณฑ์ที่ใช้ประเมินการย้อมติด ZO-1 ในลำไส้ส่วน Jejunum

Point	Definition score	
	Definition	ZO-1 content
1	negative	0
2	focal	< 50
3	multifocal	≥ 50
4	patchy	100

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัย ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ดัชนีมวลกาย โรคประจำตัวอื่น ยาที่บริโภคประจำ จำนวนครั้งที่ป่วยด้วยโรคนีเวไต และข้อมูลของสัตว์ทดลอง ได้แก่ น้ำหนัก ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทำวิจัยในครั้งนี้จะเก็บรวบรวมโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลองและบันทึกข้อมูลทั้งหมดลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ใช้สถิติ unpaired t-test ในการเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไป เช่น อายุ และ paired t-test ในการวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลง เช่น ผลปัสสาวะ chi-square ใช้วิเคราะห์ข้อมูลที่ไม่ใช่จำนวนนับ

อาทิ เพศ เป็นต้น และ binary logistic regression ใช้เพื่อคำนวณหา adjusted odd ratio ของข้อมูลชีวภาพที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละกลุ่ม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 23.0 (IBM statistics, USA) และ GraphPad Prism version 9.4.1

2) ข้อมูลของสัตว์ทดลอง การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 9.4.1 โดยใช้สถิติ multiple repeated measures ANOVA เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ และ student t-test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม และ chi-square ในการวิเคราะห์ผลขึ้นเนื้อ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3) ข้อมูลจุลินทรีย์ในอุจจาระ ข้อมูลประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระของทั้งผู้เข้าร่วมวิจัยและสัตว์ทดลองที่ได้ จะใช้โปรแกรม QIIME (Quantitative insights into microbial ecology) ในการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศของ 16S rRNA โดยจะใช้ different operational taxonomic units (OTUs) ตั้งค่าไว้ที่ 97% เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ (classifying sequences) การวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ โดยจะวิเคราะห์ alpha diversity ประกอบด้วย Richness หรือชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น ๆ และ Evenness หรือจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น ๆ (relative abundance) ใช้ Shannon ในการวิเคราะห์ (84, 85) มีสูตรคำนวณดังนี้

$$H = -\sum[(p_i \times \log(p_i))]$$

โดย

H : Shannon diversity index

p_i : สัดส่วนของสายพันธุ์ (species) ในชุมชนนั้น ๆ

เมื่อ Richness และ Evenness มีค่ามาก หมายความว่าความหลากหลายทางชีวภาพจะมากตามไปด้วย นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ beta diversity หรือตัวอย่างนั้น ๆ มีความหลากหลายของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ แตกต่างจากตัวอย่างอื่นมากน้อยเพียงใด ใช้ Bray-Curtis dissimilarity และ Jaccard index ในการวิเคราะห์ (86, 87) ดังนี้

Bray-Curtis dissimilarity หรือ Bray-Curtis distance เป็นวิธีการคำนวณระยะห่างหรือความแตกต่างระหว่างข้อมูลชนิดหนึ่ง โดยที่ข้อมูลจะเป็น

ค่าความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในชุดข้อมูล โดยปกติจะใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างในประชากรของสิ่งมีชีวิตที่สัมพันธ์กัน คำนวณจากการหาอัตราส่วนระหว่างผลรวมของค่าความแตกต่างขององค์ประกอบทั้งสอง และผลรวมของค่าความคล้ายคลึงขององค์ประกอบทั้งสอง แล้วนำผลลัพธ์ไปเปลี่ยนเป็นอัตราส่วน เพื่อให้ได้ค่าระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งระบุถึงความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงระหว่างองค์ประกอบ โดยค่าที่ใกล้เคียงกับ 0 จะแสดงถึงองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกันมาก และค่าที่ใกล้เคียงกับ 1 จะแสดงถึงองค์ประกอบที่แตกต่างกันมาก มีสูตรคำนวณดังนี้

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

โดย

B : Bray–Curtis dissimilarity

C_{ij} : ผลรวมของค่าที่น้อยกว่าเฉพาะ species ที่เหมือนกันระหว่างทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง

S_i และ S_j : จำนวนตัวอย่างทั้งหมดของทั้งสองกลุ่ม

Jaccard similarity หรือ Jaccard index เป็นวิธีการวัดความคล้ายคลึงระหว่างสองเซตของข้อมูล โดยที่จะนับจำนวนสมาชิกที่เหมือนกันของทั้งสองเซต แล้วหารด้วยจำนวนสมาชิกทั้งหมดของสองเซตรวมกัน โดยสามารถใช้กับข้อมูลประเภททั่วไปได้ ค่า Jaccard similarity จะเป็นจำนวนตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ค่า 0 หมายถึงว่าไม่มีสมาชิกที่เหมือนกันเลยระหว่าง A และ B และค่า 1 หมายถึงว่า A และ B เป็นเซตเดียวกัน (มีสมาชิกที่เหมือนกันทั้งหมด) มีสูตรคำนวณดังนี้

$$J(A, B) = |A \cap B| / |A \cup B|$$

โดย

A และ B : เป็นเซตของข้อมูล

$|A \cap B|$: จำนวนสมาชิกที่เหมือนกันระหว่าง A และ B (intersection)

$|A \cup B|$: จำนวนสมาชิกทั้งหมดของ A และ B รวมกัน (union)

ด้วยโปรแกรม R statistical software

โดยนิยมใช้ 2 algorithms ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มสองกลุ่ม โดยพิจารณาจากจำนวนของแต่ละกลุ่ม แบบ beta diversity ได้แก่ Bray–Curtis dissimilarity และ Jaccard index ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้จากการคำนวณ PERMANOVA โดยใช้ pseudo-F เป็นสถิติทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

- 4) ข้อมูลชีวภาพของผู้เข้าร่วมวิจัย สัตว์ทดลอง และจุลินทรีย์ในอุจจาระ ใช้สถิติ Spearman's rank correlation coefficient ในการหาความสัมพันธ์ เช่น ผลออกซาเลตในปัสสาวะกับจุลินทรีย์ระดับ Genera ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 23.0 (IBM statistics, USA) และ GraphPad Prism version 9.4.1



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมวิจัย

จากการศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่อการเกิดโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในทางเดินปัสสาวะของหนู เริ่มต้นจากเก็บตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะจากชาวไทยสุขภาพดี (Control) ที่ไม่มีประวัติเคยป่วยเป็นโรคนิ่ว จำนวน 10 ราย และผู้ป่วยโรคนิ่วชาวไทย (Urolithiasis patient) ที่เข้ารับการรักษาดูแลแผนกผู้ป่วยนอก หน่วยศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต จำนวน 8 ราย จากที่กำหนดไว้เบื้องต้นกลุ่มละ 15 คน พบว่า กลุ่มอาสาสมัครผู้ป่วยโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลต จำนวน 8 ราย ประกอบด้วย เพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 6 ราย มีอายุตั้งแต่ 29 ถึง 65 ปี เฉลี่ย 48.88 ± 14.6 ปี และดัชนีมวลกายเฉลี่ย 25.288 ± 3.526 Kg/m² และกลุ่มคนสุขภาพดี จำนวน 10 ราย มีอายุตั้งแต่ 28 ถึง 60 ปี เฉลี่ย 43.50 ± 11.8 ปี และดัชนีมวลกายเฉลี่ย 24.826 ± 3.506 Kg/m² โดยพบว่า เพศในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Pearson's chi-squared test: $p = 0.060$) และพบว่า อายุ รวมถึงดัชนีมวลกาย ของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Independent t-test: $p = 0.449$, $p = 0.785$ ตามลำดับ) ดังแสดงใน Table 7 นอกจากนี้ในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมออกซาเลตยังพบโรคอื่น ๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน จำนวน 1 ราย และความดันโลหิตสูง 2 ราย ผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมออกซาเลตทั้งหมดเป็นโรคนิ่วไตครั้งแรก ซึ่งบางรายพบก้อนนิ่วทั้งไตซ้ายและขวา นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการขับแคลเซียม และออกซาเลต ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต สูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Man-Whitney test: $p < 0.05$, < 0.005 ตามลำดับ) แตกต่างจากอัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วที่ต่ำกว่าคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (Man-Whitney test: $p < 0.031$) ส่วนอัตราการขับแมกนีเซียม และ pH ของปัสสาวะในผู้ป่วยโรคนิ่วนั้น ไม่มีความแตกต่างจากคนสุขภาพดี (Man-Whitney test: $p = 0.573$, 0.097 ตามลำดับ) เมื่อนำค่า electrolyte ในปัสสาวะของทั้งสองกลุ่มมาคำนวณค่าดัชนีความอิ่มตัวยังยวดในปัสสาวะ (Tiselius's urinary supersaturation index) พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลต มีค่า AP_{CaOx} ซึ่งสูงกว่าคนสุขภาพดีถึง 4 เท่า (Man-Whitney test: $p < 0.05$) (Table 8)

Table 7 ข้อมูลของอาสาสมัครแบ่งตามกลุ่มการศึกษา

Factors	Healthy control (n=10)	Urolithiasis (n=8)	P-value
Participants information			
Gender (M/F)	3/7	2/6	0.060
Age (Mean, SD, years)	43.5 ± 11.8	48.9 ± 14.6	0.449
BMI (Mean, SD, Km/m ²)	24.826 ± 3.506	25.288 ± 3.526	0.785
Diabetes mellitus	0	1	
Hypertension	0	2	
Stone location (R/L)	0	6/5	
Renal stone disease and/or recurrence	ND	ND	

(Participants information ใช้สถิติ Chi-square, Kidney stone location R: Right kidney, L: Left kidney, ND: Not detected)

Table 8 ผลตรวจ electrolytes ในปัสสาวะของอาสาสมัคร

Factors	Healthy control (n=10)	Urolithiasis (n=8)	P-value
Urinary parameters (Median, IQR)			
Ca/Cr (mg/gCr)	61.200 (35.759)	166.489 (242.042)*	0.043
Ox/Cr (mg/gCr)	19.740 (10.833)	40.670 (16.009)**	0.005
Cit/Cr (mg/gCr)	720.573 (247.252)	264.144 (153.581)*	0.031
Mg/Cr (mg/gCr)	91.335 (114.720)	73.225 (86.096)	0.573
Urine pH	6.945 (1.890)	6.260 (1.940)	0.097
Tiselius AP _{CaOx}	17.020 (76.74)	73.900 (302.78)*	0.027

(Urinary parameters ใช้สถิติ Mann Whitney test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$), AP_{CaOx}:

Approximate estimate of the ion-activity product of calcium oxalate)

4.2 น้ำหนักของสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการวิจัย

เพื่อตรวจสอบสุขภาพของสัตว์ทดลอง ตามหลักจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง โดยชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์หลังจากเริ่ม gavage ยาปฏิชีวนะ ไปจนครบระยะเวลาการทดลอง

ทั้งสิ้น 5 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักหนูในแต่ละกลุ่มเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ และไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม (Figure 23) (Mann Whitney test: $p > 0.999$)

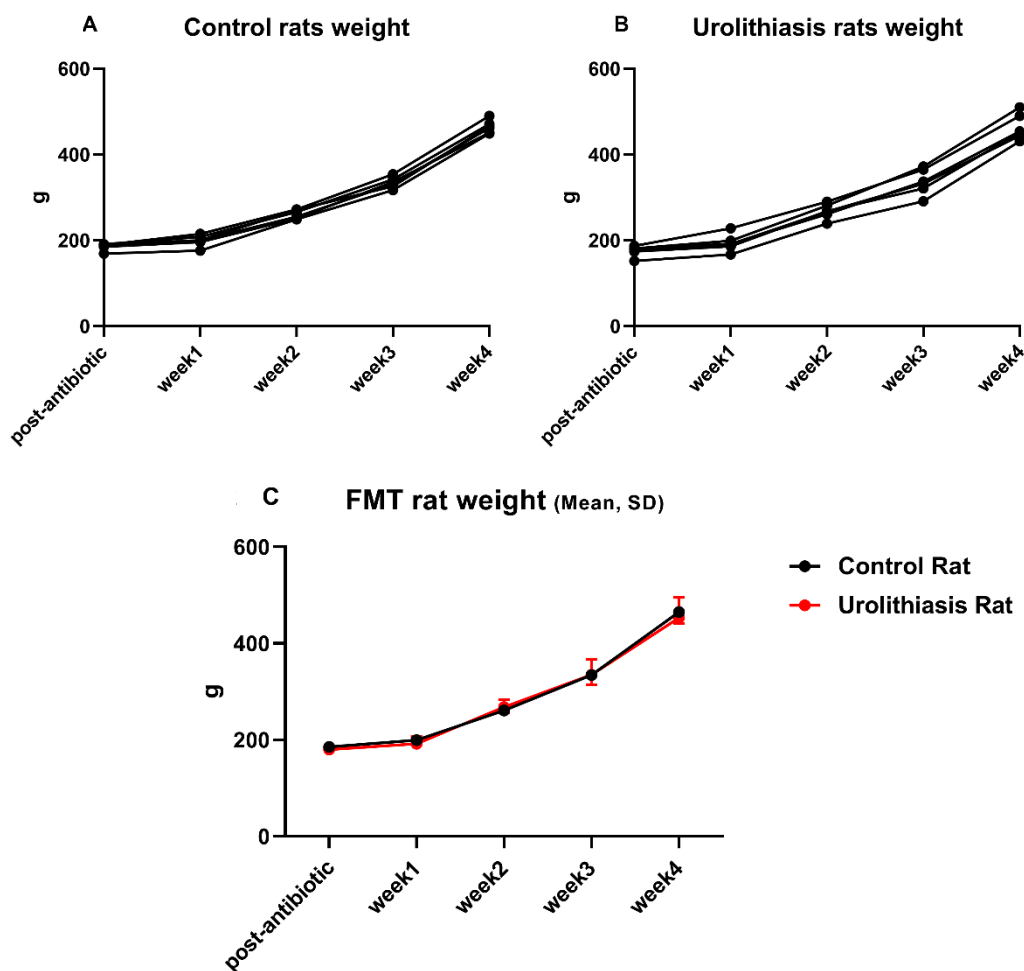


Figure 23 น้ำหนักของสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการวิจัย

(โดย A: แสดงน้ำหนักของหนูในกลุ่ม Control, B: แสดงน้ำหนักของหนูกลุ่ม Urolithiasis และ C: แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักหนูทั้งสองกลุ่ม)

4.3 ผลการศึกษาจุลินทรีย์ในอุจจาระ

4.3.1 ผลการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์สำหรับการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

เพื่อตรวจสอบจำนวนของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระที่เตรียมไว้ สำหรับปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง ซึ่งนำจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระหลังจากที่บ้อนในสัตว์ทดลอง มานับจำนวนทุกสัปดาห์ โดยใช้วิธี Bacterial enumeration by plate counts พบว่า จำนวนของจุลินทรีย์ใน

จุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระจากคนสุขภาพดีเฉลี่ยในทุกสัปดาห์ 5.35×10^7 CFU/mL ไม่แตกต่างจากจำนวนของจุลินทรีย์ในจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วเฉลี่ยในทุกสัปดาห์ 5.325×10^7 CFU/mL (Unpaired t test: $p = 0.620$) ดังแสดงใน Figure 24 กล่าวคือ ขั้นตอนการป้อนเชื้อจุลินทรีย์ในจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระให้สัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่มมีจำนวนไม่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์

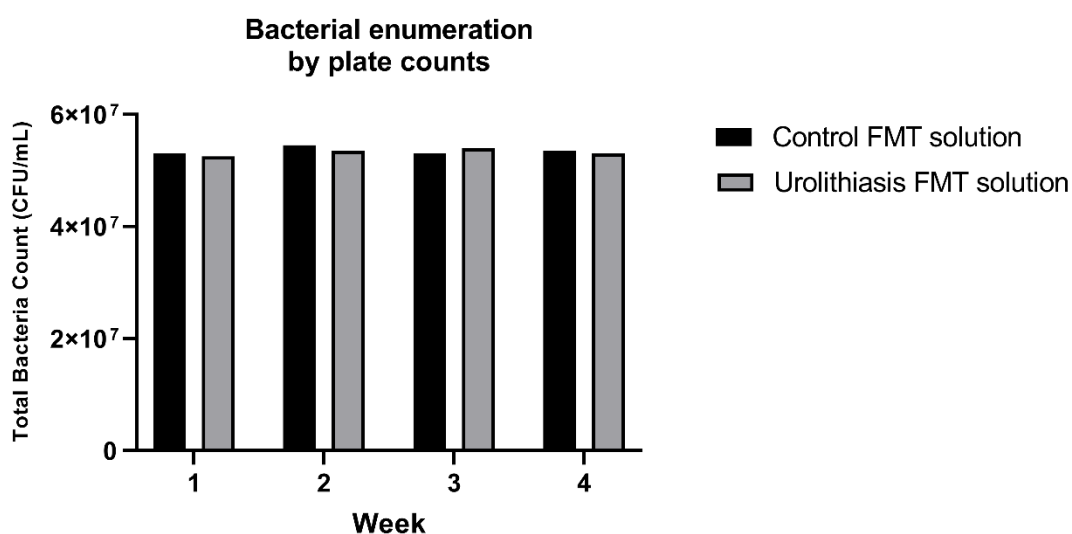


Figure 24 ผลการตรวจสอบจำนวนของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ

4.3.2 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระ

การศึกษาข้อมูลจุลินทรีย์ในอุจจาระแบ่งเป็น จุลินทรีย์ในอุจจาระของอาสาสมัคร ประกอบด้วย ตัวอย่าง จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต 8 ราย ตัวอย่างจากคนสุขภาพดี 10 ราย รวม 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากอุจจาระสัตว์ทดลอง แบ่งเป็น อุจจาระจากหนูก่อนได้รับสารทดสอบ (pre-treatment ซึ่งได้แก่ หนูที่ได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อลดจำนวนประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้มากที่สุด) จำนวนกลุ่มละ 4 ตัว รวม 12 ตัวอย่าง และตัวอย่างอุจจาระจากหนูหลังได้รับการทดสอบครบ 4 สัปดาห์ (post-treatment) จำนวนกลุ่มละ 4 ตัว รวม 12 ตัวอย่าง

หลังจากพิจารณาข้อมูลเบื้องต้น พบว่า total read ของตัวอย่างมีค่าระหว่าง 20,078 ถึง 253,442 มีค่ามัธยฐานที่ 55,198.500 (27,311.750) ซึ่งมากกว่าค่าที่ยอมรับกันโดยทั่วไปคือ 20,000 read ซึ่งทุกตัวอย่างอุจจาระสามารถอ่านผล sequencing ได้ (Figure 25)

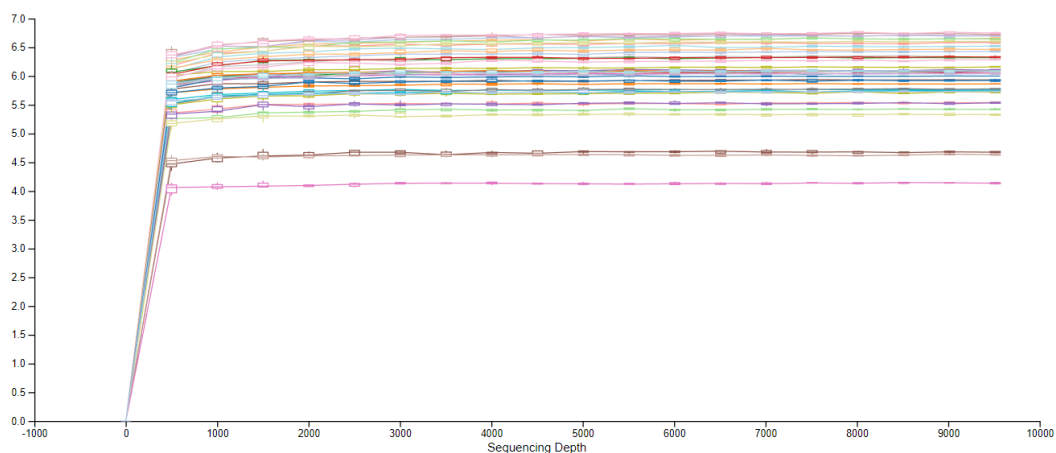


Figure 25 แสดงผลจำนวน read ของ 16s rRNA ของตัวอย่าง DNA ในอุจจาระ

4.3.2.1 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์

จากตัวอย่างอุจจาระ 18 ตัวอย่าง แบ่งเป็น อุจจาระของคนสุขภาพดี 10 ตัวอย่าง และ อุจจาระของผู้ป่วยโรคนิว 8 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ Taxonomy และหาค่าความหลากหลายของ ประชากรจุลินทรีย์ โดย alpha diversity ประกอบด้วย Richness หรือชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง นั้น ๆ และ Evenness หรือจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น ๆ การวิเคราะห์โดยใช้ Shannon index คือการนำ richness และ evenness มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า ความหลากหลายของจุลินทรีย์ใน อุจจาระของผู้ป่วยโรคนิวไต่เปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (6.664 (0.104) vs 6.496 (0.179), (median (IQR)), Kruskal-Wallis: $p = 0.657$) (Figure 26) ทั้งนี้ richness ของทั้งสองกลุ่มก็ไม่แตกต่างทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p = 0.306$) (Figure 27A) รวมถึง evenness ไม่แตกต่างทางสถิติด้วยเช่นกัน (Kruskal-Wallis: $p = 0.858$) (Figure 27B)

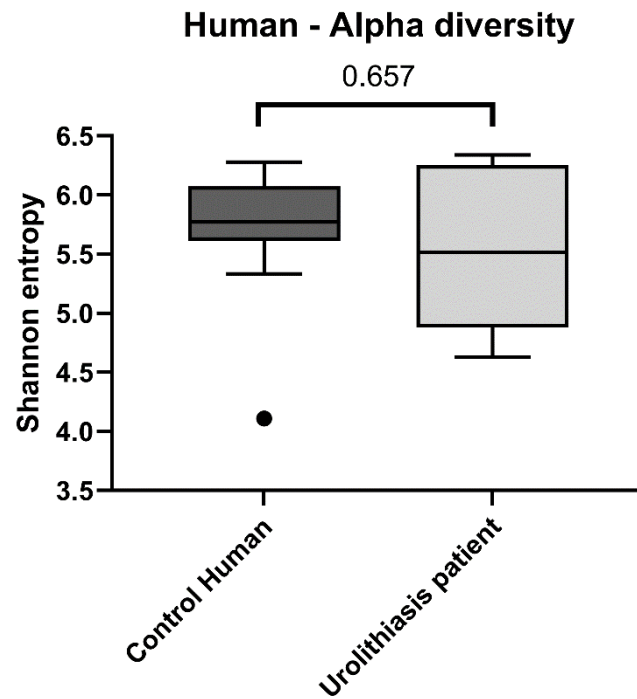


Figure 26 ผลการเปรียบเทียบ alpha diversity ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์ (โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมดใช้สถิติ Kruskal-Wallis ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%)

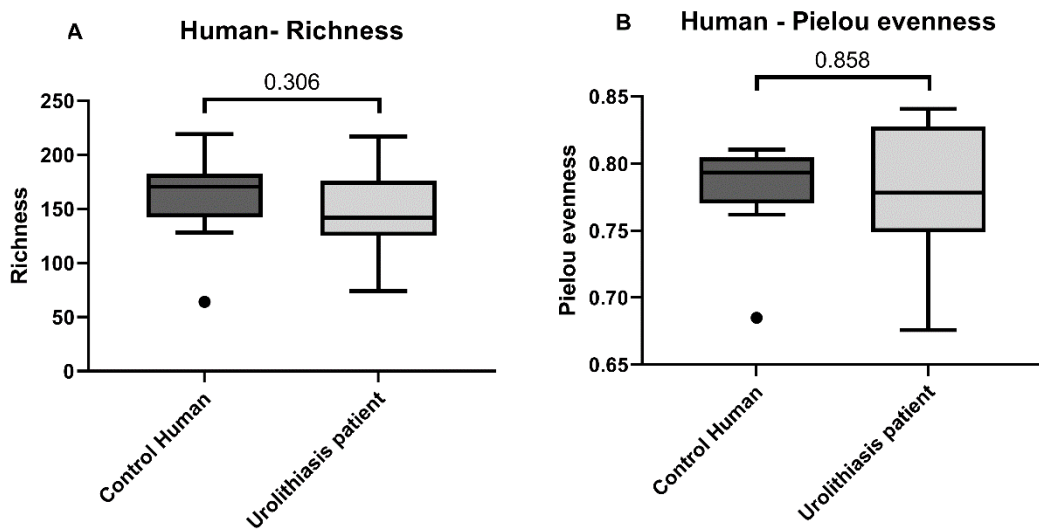


Figure 27 ผลการวิเคราะห์ richness และ evenness ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์ (โดย A: ผลการวิเคราะห์ richness หรือชนิดของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์ และ B: ผลการวิเคราะห์ evenness หรือจำนวนของจุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์, โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด ใช้สถิติ Kruskal-Wallis ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%)

เมื่อวิเคราะห์ beta diversity หรือความหลากหลายของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มตัวอย่างหนึ่ง แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างอื่นมากน้อยเพียงใด ใช้ Bray–Curtis dissimilarity และ Jaccard index ในการวิเคราะห์ ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย Bray–Curtis dissimilarity แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มคนสุขภาพดี กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี และกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่า PERMANOVA มีค่า F-value: 8.059 ,R-squared: 0.389 แตกต่างกันอย่างสถิติ (Bray–Curtis dissimilarity: $p < 0.01$) (Figure 28A) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ beta diversity ด้วย Jaccard index แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยพบว่า PERMANOVA มีค่า F-value: 5.479, R-squared: 0.302 แตกต่างกันอย่างสถิติ (Jaccard index: $p < 0.01$) (Figure 28B) เมื่อพิจารณาประกอบกันทั้งสอง algorithm พบว่า ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ของกลุ่มคนสุขภาพดี และกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีความใกล้เคียงกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ของหนูกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี และกลุ่มหนูที่ได้รับ จุลินทรีย์ในอุจจาระมีความใกล้เคียงเช่นกัน

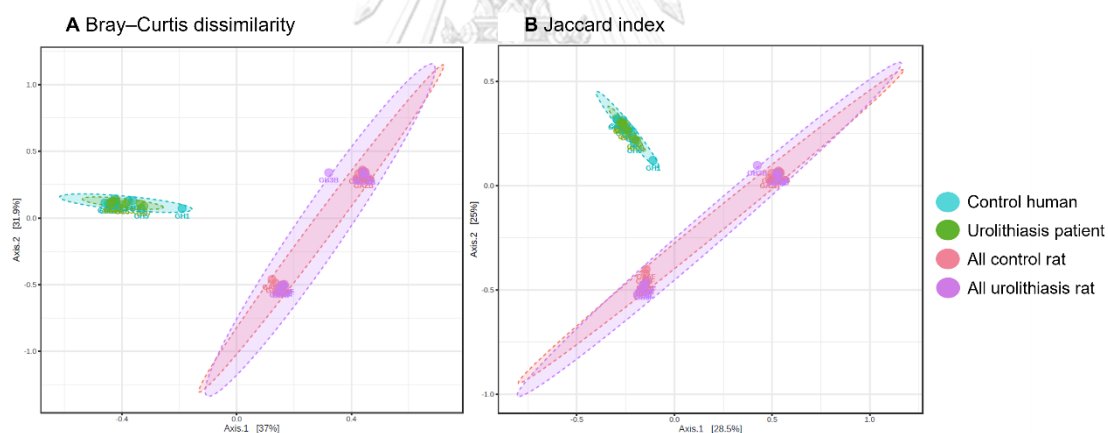


Figure 28 แสดง PCoA ของความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในมนุษย์ และสัตว์ทดลอง แบ่งตามประเภทของตัวอย่าง

(โดย A: แสดง PCoA ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Bray–Curtis dissimilarity และ B: แสดง PCoA ที่ได้จากการวิเคราะห์ Jaccard index)

เมื่อวิเคราะห์ relative abundance ของประชากรจุลินทรีย์ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี โดยจำแนกตาม phylum (Figure 29) พบว่า phylum *Firmicutes* สามารถพบได้มากที่สุด โดยพบได้ทั่วไปทั้งในคนสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคนิ่วไต ซึ่งมีค่า 60.400 (9.630) (median (IQR) และ 61.560 (20.890) (median (IQR) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกันทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 1.000$) phylum *Bacteroidota* พบมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วย

โรคนิวไทด์ (24.770 (16.240)) เมื่อเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี (14.260 (11.855)) (Mann Whitney test: $p < 0.05$) ส่วน phylum *Actinobacteriota* และ *Proteobacteria* มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์ นอกจากนี้ยังพบ phylum *Verrucomicrobiota* และ *Desulfobacterota* ได้ทั้งสองกลุ่ม ส่วน phylum *Fusobacteriota* พบได้ในกลุ่มคนสุขภาพดีเท่านั้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับผู้ป่วยโรคนิวไทด์ (Mann Whitney test: $p = 0.360$) (Table 9)

จากนั้นพิจารณา relative abundance ของประชากรจุลินทรีย์ในผู้ป่วยโรคนิวไทด์เปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี โดยจำแนกตาม genus ที่พบมากที่สุด 20 อันดับแรก (Figure 30) พบว่า genus *Blautia* พบได้มากที่สุดทั้งสองกลุ่ม มีค่ามัธยฐาน 8.970 (7.506) ในกลุ่มคนสุขภาพดี และ 9.595 (8.944) ในผู้ป่วยโรคนิวไทด์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.360$) genus *Bacteroides* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์มีแนวโน้มสูงกว่าคนสุขภาพดี ซึ่งมีค่ามัธยฐาน 8.261 (12.859) และ 5.460 (12.041) ตามลำดับ (Mann Whitney test: $p = 1.000$) genus *Collinsella* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์มีแนวโน้มต่ำกว่าคนสุขภาพดี มีค่ามัธยฐาน 5.544 (6.213) และ 8.192 (8.753) ตามลำดับ (Mann Whitney test: $p = 0.408$) genus *Bifidobacterium* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์พบได้น้อยกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่ามัธยฐาน 0.184 (1.135) และ 2.848 (5.491) ตามลำดับ (Mann Whitney test: $p < 0.05$) เช่นเดียวกับ genus *Oscillospiraceae UCG002* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์พบได้น้อยกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่ามัธยฐาน 0.126 (1.069) และ 1.608 (3.607) ตามลำดับ (Mann Whitney test: $p < 0.05$) แตกต่างจาก genus *Escherichia - Shigella* ที่พบน้อยลงในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไทด์ มีค่ามัธยฐาน 0.200 (0.323) เมื่อเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี 0.746 (1.414) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.05$) (Table 9)

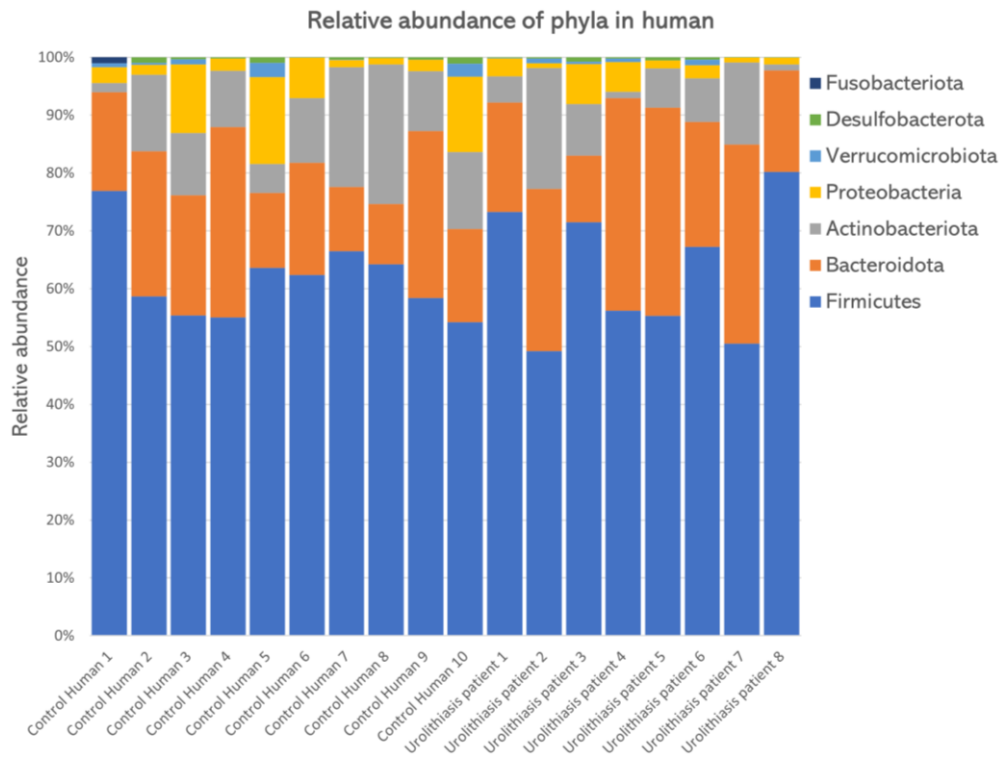


Figure 29 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Phylum ใน
 อาสาสมัคร

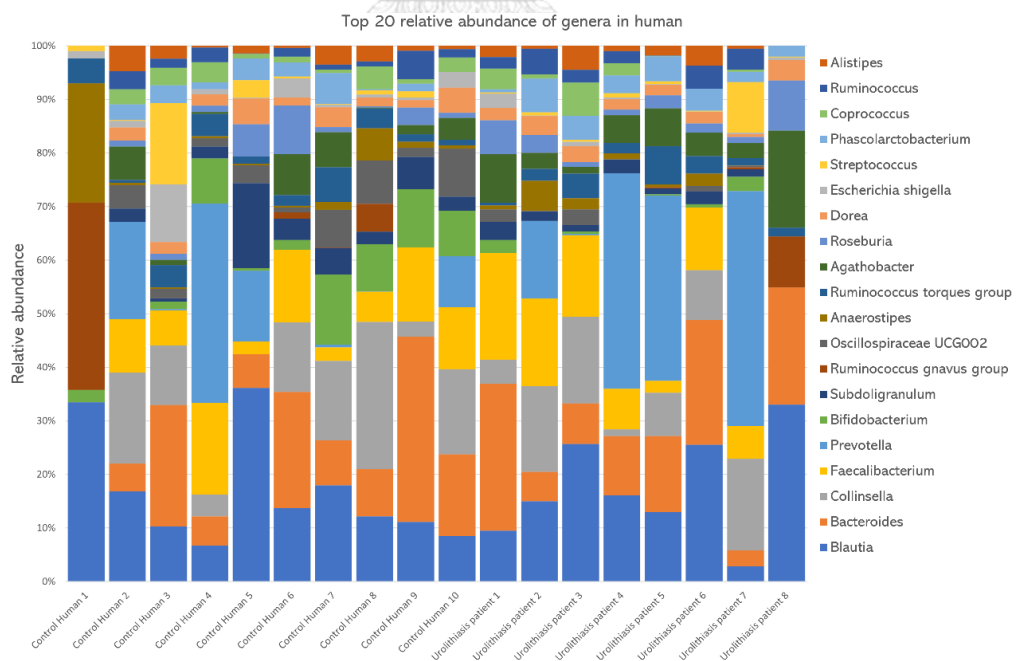


Figure 30 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Genus ใน
 อาสาสมัคร

Table 9 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในอาสาสมัคร

Relative abundance	Control Human (Median (IQR))	Urolithiasis Human (Median (IQR))	P-value
Phyla			
Firmicutes	60.4000 (9.630)	61.560 (20.890)	1.000
Bacteroidota	14.260 (11.855)	24.770 (16.240)*	0.021
Actinobacteriota	10.900 (6.606)	6.863 (10.838)	0.155
Proteobacteria	2.470 (10.444)	1.766 (3.667)	0.248
Verrucomicrobiota	0.221 (1.245)	0.263 (0.786)	0.633
Desulfobacterota	0.357 (0.848)	0.168 (0.725)	0.515
Euryarchaeota	0	0	1.000
Fusobacteriota	0.053 (0.234)	0	0.360
Elusimicrobiota	0	0	1.000
Synergistota	0	0	1.000
Cyanobacteria	0	0	1.000
Patescibacteria	0	0	1.000
Thermoplasmata	0	0	1.000
Genera			
Blautia	8.970 (7.506)	9.595 (8.944)	0.929
Bacteroides	5.460 (12.041)	8.261(12.859)	1.000
Collinsella	8.192 (8.753)	5.544 (6.213)	0.408
Faecalibacterium	5.397 (8.201)	5.759 (5.625)	0.965
Prevotella	0.258 (9.12)	3.558 (25.857)	0.633
Bifidobacterium	2.848 (5.4909)	0.184 (1.135)*	0.027
Subdoligranulum	1.687 (2.380)	0.925 (1.130)	0.173
Ruminococcus_gnavus_group	0.026 (1.448)	0.016 (0.231)	0.897
Oscillospiraceae UCG002	1.608 (3.607)	0.126 (1.069)*	0.016
Anaerostipes	0.321 (1.393)	0.589 (1.167)	0.965
Ruminococcus torques group	1.850 (2.183)	1.319 (1.080)	0.696
Agathobacter	1.019 (4.230)	3.132 (3.552)	0.122
Roseburia	0.825 (2.289)	1.314 (2.404)	0.408
Dorea	1.555 (1.364)	1.329 (0.365)	0.829
Escherichia-Shigella	0.746 (1.414)	0.200 (0.323)*	0.043
Streptococcus	0.389 (1.065)	0.215 (0.357)	0.965
Phascolarctobacterium	1.450 (2.306)	2.076 (1.484)	0.274
Coprococcus	1.088 (1.986)	0.336 (2.039)	0.237
Ruminococcus	0.967 (1.555)	1.393 (2.351)	0.633
Alistipes	0.741 (1.664)	0.899 (1.440)	1.000

(โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้สถิติ Mann Whitney test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%)

จากผลการศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีประชากรจุลินทรีย์ใน phylum *Bacteroidota* สูงกว่าคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาในระดับ genus พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไต มี genus *Bifidobacterium*, *Oscillospiraceae* UCG002 และ *Escherichia-Shigella* ต่ำกว่าคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ

4.3.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง

จากตัวอย่างอุจจาระ 24 ตัวอย่าง แบ่งเป็น อุจจาระของหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี (Control) 12 ตัวอย่าง และอุจจาระของหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Urolithiasis) 12 ตัวอย่าง ซึ่งอุจจาระทั้งสองกลุ่มแยกเป็นอุจจาระที่เก็บหลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ 1 สัปดาห์ (post - antibiotic) และอุจจาระที่เก็บหลังจากได้รับจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ 4 สัปดาห์ นำไปวิเคราะห์ Taxonomy หาค่าความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ โดย alpha diversity ประกอบด้วย Richness หรือชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น ๆ และ Evenness หรือจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น ๆ ซึ่งการวิเคราะห์ alpha diversity ใช้ Shannon index พบว่า ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ post - antibiotic ของหนูกลุ่ม Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p = 1.000$) เมื่อเปรียบเทียบ alpha diversity หลังจากที่ได้รับจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ กับ post - antibiotic พบว่าทั้งสองกลุ่มมีค่า Shannon index เพิ่มขึ้นเท่ากัน คือ 8.308 โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p < 0.004$) กล่าวคือหนูทั้งสองกลุ่มเมื่อได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ มีประชากรจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณา alpha diversity ของหนูกลุ่ม Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์น้อยกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p < 0.05$) (Figure 31)

ทั้งนี้พบว่า richness หรือชนิดของประชากรจุลินทรีย์ของทั้งสองกลุ่มในช่วง post - antibiotic ไม่แตกต่างทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p > 0.999$) แต่หลังจากได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่า richness ในหนูกลุ่ม Control และ Urolithiasis มีจำนวนประชากรจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis: $p < 0.05$, $p < 0.05$ ตามลำดับ) โดยพบว่าทั้งสองกลุ่มมีค่า richness ที่ 8.308 เท่ากัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ richness ของหนูกลุ่ม Urolithiasis กับหนูกลุ่ม Control หลังจากที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระไปแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่าประชากรจุลินทรีย์ของหนูทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (richness: 2.837, Kruskal-Wallis: $p = 0.092$) (Figure 32A)

เมื่อเปรียบเทียบ evenness หรือของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ ในหนูกลุ่ม Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control ช่วง post - antibiotic พบว่า หนูทั้งสองกลุ่มมีสัดส่วนของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ไม่แตกต่างทางสถิติ (evenness: 0.410, Kruskal-Wallis: $p = 0.522$) แต่หลังจากได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่า evenness ในหนูกลุ่ม Control และ Urolithiasis มีของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสองกลุ่ม (Kruskal-Wallis: $p < 0.05$, $p < 0.05$ ตามลำดับ) โดยพบว่าทั้งสองกลุ่มมีค่า evenness ที่ 8.308 เท่ากัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ evenness ของหนูกลุ่ม Urolithiasis กับหนูกลุ่ม Control หลังจากที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่าของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ของหนูทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (evenness: 1.641, Kruskal-Wallis: $p = 0.200$) (Figure 32B)

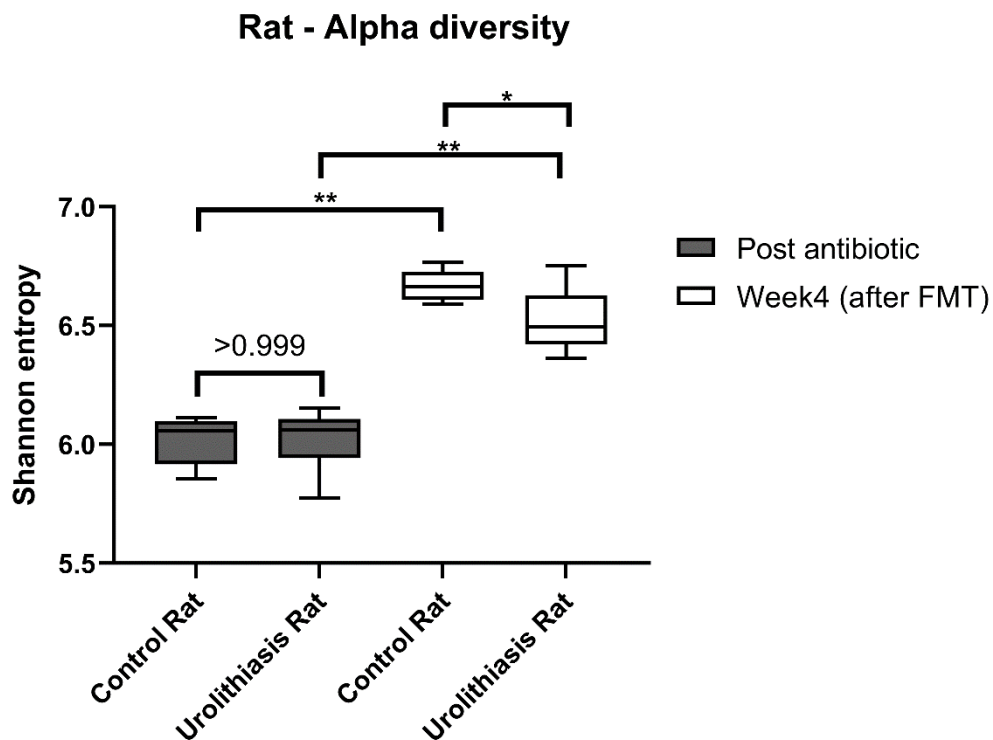


Figure 31 ผลการเปรียบเทียบ alpha diversity ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง (โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมดใช้สถิติ Kruskal-Wallis ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

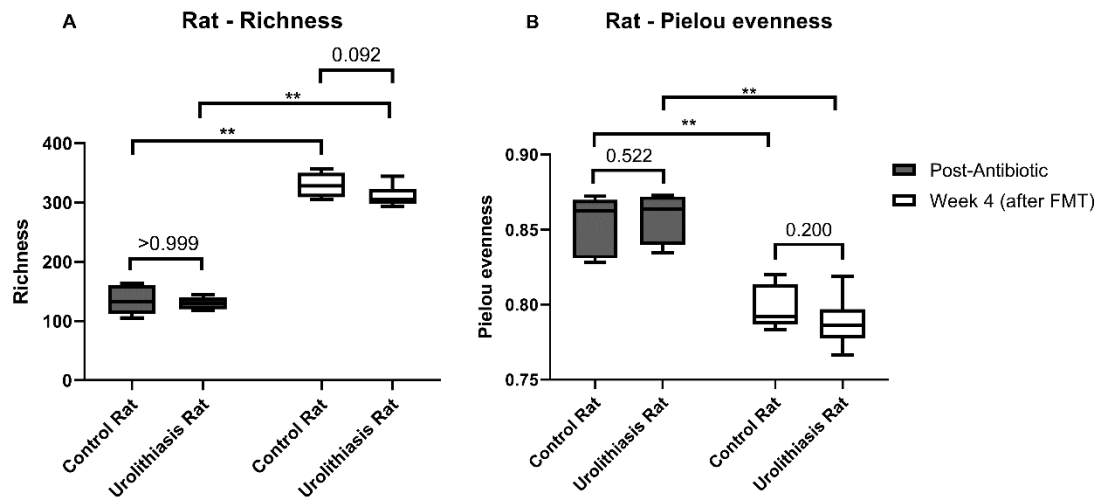


Figure 32 ผลการวิเคราะห์ richness และ evenness ของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง (โดย A: ผลการวิเคราะห์ richness หรือชนิดของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง และ B: ผลการวิเคราะห์ evenness หรือจำนวนของจุลินทรีย์ในอุจจาระของสัตว์ทดลอง, โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมดใช้สถิติ Kruskal-Wallis ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

เมื่อวิเคราะห์ beta diversity ใช้ Bray-Curtis dissimilarity และ Jaccard index ในการวิเคราะห์ ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย Bray-Curtis dissimilarity แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนู post-antibiotic กลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ และกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด พบว่า PERMANOVA มีค่า F-value: 42.001, R-squared: 0.683 แตกต่างกันทางสถิติ (Bray-Curtis dissimilarity: $p < 0.01$) (Figure 33A) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ beta diversity ด้วย Jaccard index แบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่า PERMANOVA มีค่า F-value: 5.479, R-squared: 0.302 แตกต่างกันทางสถิติ (Jaccard index: $p < 0.01$) (Figure 33B) เมื่อพิจารณาประกอบกันทั้งสอง algorithm พบว่า ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มแตกต่างกัน

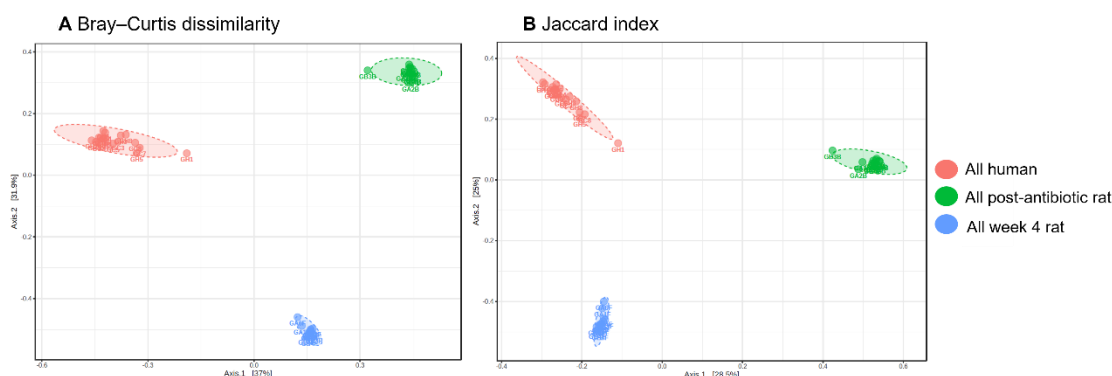


Figure 33 แสดง PCoA ของความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในมนุษย์ และสัตว์ทดลอง แบ่งตามสัปดาห์

(โดย A: แสดง PCoA ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย Bray-Curtis dissimilarity
และ B: แสดง PCoA ที่ได้จากการวิเคราะห์ Jaccard index)

เมื่อวิเคราะห์ relative abundance ของประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคนี้ไว้โต เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์จากอุจจาระของคนสุขภาพดี เป็นการวิเคราะห์แบบ cross sectional study โดยคำนวณการเปลี่ยนแปลงของ relative abundance ในสัปดาห์ที่ 4 และ post - antibiotic ซึ่ง relative abundance ในระดับ phylum โดยแสดงเป็นค่า delta (Δ) (Figure 34) พบว่า phylum *Firmicutes* สามารถพบได้มากที่สุด และพบได้ทั่วไปทั้งในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้โตเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี และมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ลดลงทั้งสองกลุ่มแสดงดัง (Table 10) ซึ่งมีค่ามัธยฐาน -22.239 (5.060) และ -27.174 (4.012) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกันทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.423$) phylum *Bacteroidota* พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์มากทั้งในกลุ่มหนูที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้ไว้โต 25.034 (3.699) เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี 27.651 (2.714) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.631$) phylum *Euryarchaeota* พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์มากทั้งในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้โต 0.142 (0.018) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระคนสุขภาพดี 1.708 (0.612) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า phylum *Desulfobacterota* *Cyanobacteria* และ phylum *Thermoplasmata* พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์มากขึ้นในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้โต เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระคนสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.05$, $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ) (Table 10)

จากนั้นพิจารณา relative abundance ของประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ว่าโตเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี เป็นการวิเคราะห์แบบ cross sectional study โดยคำนวณการเปลี่ยนแปลงของ relative abundance ในสัปดาห์ที่ 4 และ post - antibiotic เช่นเดียวกับ Figure 34 โดยจำแนกตาม genus ที่พบมากที่สุด 20 อันดับแรก (Figure 35) พบว่า genus *Muribaculaceae* พบได้มากที่สุดทั้งสองกลุ่ม แต่เมื่อพิจารณาพบว่า การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในกลุ่มหนูที่ได้รับ จุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ว่าโตสูงกว่าหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี โดยมีค่า 14.771 (2.633) และ 12.748 (0.502) (median (IQR)) ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.05$) genus *Lactobacillus* และ *Prevotellaceae NK3B31 group* พบได้ลดลงมา ซึ่งทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.109$ และ $p = 0.470$) genus *Prevotellaceae UCG-001 Methanosphaera Roseburia Colidextribacter* และ *Siraeum group* พบว่า การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่มหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ว่า ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) (Table 10)

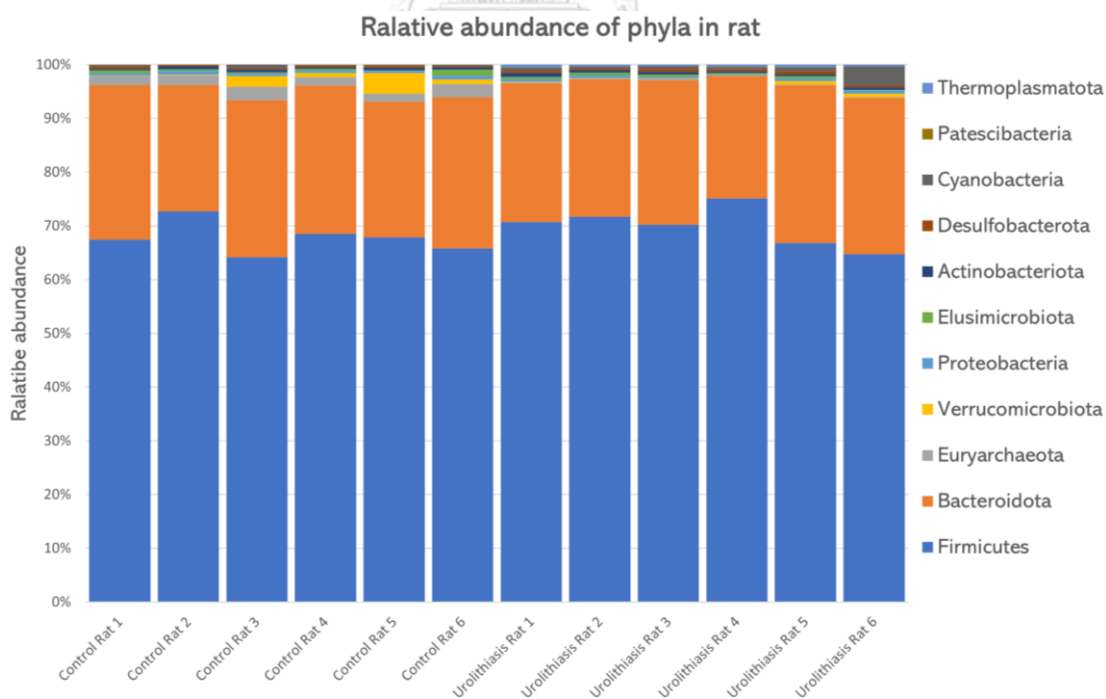


Figure 34 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Phylum ใน สัตว์ทดลอง

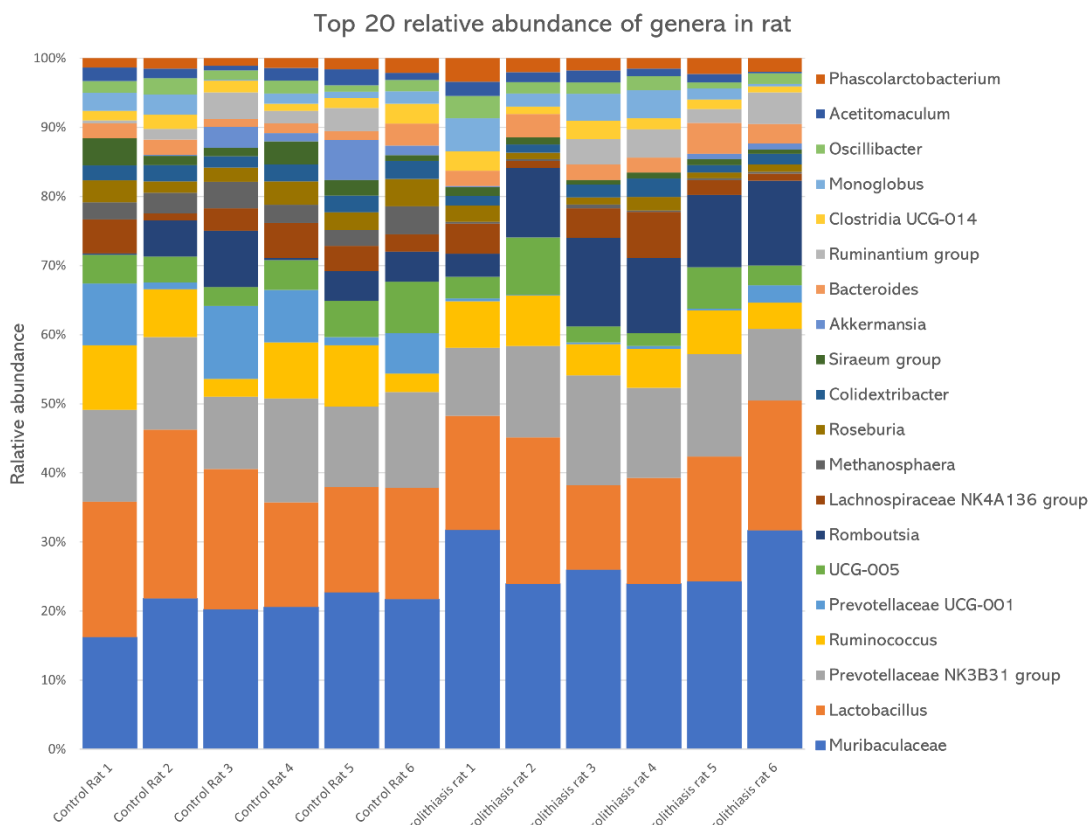


Figure 35 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) จำแนกตาม Genus ใน สัตว์ทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อเปรียบเทียบหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ พบประชากรจุลินทรีย์ใน phylum *Euryarchaeota* ต่ำกว่าหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี ในขณะที่พบประชากรจุลินทรีย์ใน phylum *Desulfobacterota*, *Cyanobacteria* และ *Thermoplasmata* สูงกว่าหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาในระดับ genus หนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ พบ genus *Muribaculaceae* ในอุจจาระของหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากสูงกว่าคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบประชากรจุลินทรีย์ใน genus *Prevotellaceae UCG-001*, *Methanosphaera*, *Roseburia*, *Colidextribacter* และ *Siraeum group* มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 10 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในสัตว์ทดลอง

Relative abundance	Control rat		Control rat week4		Δ Control Rat (Median (IQR))	Urolithiasis rat post - antibiotic (Median (IQR))		Urolithiasis rat week4 (Median (IQR))		Δ Urolithiasis Rat (Median (IQR))	P-value
Phyla											
Firmicutes	92.685 (4.619)	67.651 (2.128)	-27.173 (4.012)	93.405 (3.445)	70.494 (3.781)	-22.239 (5.060)	0.423				
Bacteroidota	0.268 (0.179)	27.919 (2.798)	27.651 (2.714)	0.100 (0.885)	26.311 (2.890)	25.034 (3.699)	0.631				
Euryarchaeota	0 0	1.708 (0.612)	1.708 (0.612)	0 0	0.142 (0.018)	0.142 (0.018)**	0.004				
Verrucomicrobiota	0 0	0.778 (1.437)	0.778 (1.437)	0 (0.024)	0.110 (0.449)	0.110 (0.434)	0.092				
Proteobacteria	3.705 (3.988)	0.478 (0.168)	-3.121 (3.965)	2.680 (1.340)	0.489 (0.200)	-2.307 (1.324)	0.631				
Elusimicrobiota	0 0	0.315 (0.200)	0.315 (0.200)	0 0	0.405 (0.152)	0.405 (0.152)	0.873				
Actinobacteriota	2.748 (0.615)	0.462 (0.118)	-2.286 (0.489)	2.433 (0.733)	0.462 (0.071)	-1.829 (0.741)	0.748				
Desulfobacterota	0 0	0.284 (0.100)	0.284 (0.100)	0 0	0.457 (0.129)	0.457 (0.129)*	0.010				
Cyanobacteria	0 0	0.163 (0.123)	0.163 (0.123)	0 0	0.510 (0.200)	0.510 (0.200)*	0.037				
Patescibacteria	0 (0.032)	0.026 (0.034)	0.021 (0.055)	0 (0.039)	0.042 (0.032)	0.005 (0.034)	1.000				
Synergistota	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1.000				
Fusobacteriota	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1.000				
Thermoplasmatota	0 0	0 0	0 0	0 0	0.326 (0.113)	0.326 (0.113)**	0.002				
Genera											
Muribaculaceae	0 0	12.748 (0.502)	12.748 (0.502)	0.053 (0.113)	14.829 (2.620)	14.771 (2.633)*	0.025				
Lactobacillus	10.562 (2.606)	9.700 (3.077)	-0.384 (4.770)	6.269 (0.870)	9.900 (2.712)	3.558 (1.718)	0.109				
Prevotellaceae NK3831 group	0 (0.063)	7.977 (1.214)	7.935 (1.193)	0 0	7.378 (2.436)	7.378 (2.436)	0.470				
Ruminococcus	0 0	4.461 (3.316)	4.461 (3.316)	0 0	3.353 (1.217)	3.226 (1.280)	0.423				
Prevotellaceae UCG-001	0 0	4.004 (4.338)	3.973 (4.322)	0.021 (0.058)	0.189 (0.087)	0.158 (0.134)*	0.010				
UCG-005	0 0	2.748 (0.956)	2.748 (0.956)	0 0	1.676 (1.850)	1.676 (2.086)	0.262				
Romboutsia	0.631 (0.016)	2.685 (2.204)	2.049 (2.215)	1.813 (0.681)	6.243 (1.077)	4.404 (1.776)	0.055				
Lachnospiraceae NK4A136 group	0 0	2.239 (1.240)	2.239 (1.240)	0 0	1.865 (1.611)	1.865 (1.611)	0.522				
Methanosphaera	0 0	1.708 (0.612)	1.708 (0.612)	0 0	0.142 (0.018)	0.142 (0.018)**	0.004				
Roseburia	0 0	1.834 (0.762)	1.834 (0.857)	0 0	0.599 (0.360)	0.599 (0.360)*	0.016				
Colditribacter	0 0	1.492 (0.131)	1.492 (0.131)	0 0	0.836 (0.273)	0.836 (0.289)*	0.010				

Table 11 แสดงจำนวนประชากรจุลินทรีย์ (Relative abundance) ในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

Relative abundance	Control rat post - antibiotic (Median (IQR))	Control rat week4 (Median (IQR))	Δ Control Rat (Median (IQR))	Urolithiasis rat post - antibiotic (Median (IQR))	Urolithiasis rat week4 (Median (IQR))	Δ Urolithiasis Rat (Median (IQR))	P-value
Genera							
Siraeum_group	0 0	1.125 (1.096)	1.125 (1.096)	0 0	0.510 (0.176)	0.510 (0.176)*	0.016
Akkermansia	0 0	0.757 (1.414)	0.757 (1.414)	0 (0.024)	0.037 (0.389)	0.037 (0.365)	0.053
Bacteroides	0.037 (0.113)	1.077 (0.583)	1.040 (0.565)	0 0	1.424 (0.681)	1.424 (0.681)	0.109
Ruminantium_group	0 0	0.988 (1.466)	0.988 (1.466)	0 0	1.640 (1.839)	1.640 (1.839)	0.747
Clostridia_UCG-014	0 0	1.009 (0.231)	1.009 (0.231)	0 0	0.851 (0.665)	0.851 (0.665)	0.378
Monoglobus	0 0	0.988 (0.878)	0.988 (0.878)	0 0	1.650 (1.153)	1.650 (1.153)	0.199
Oscillibacter	0 0	1.035 (0.255)	1.035 (0.255)	0 0	0.962 (0.173)	0.962 (0.173)	0.810

(โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้สถิติ Mann Whitney test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%, Δ : การเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบจำนวนประชากรจุลินทรีย์สัปดาห์ที่ 4 กับ post - antibiotic)

4.4 สารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

4.4.1 อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม ตลอดระยะเวลาการวิจัยพบว่า หลังจากหนูทั้งสองกลุ่มได้รับยาปฏิชีวนะ (post - antibiotic) มีอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะลดลงทั้งสองกลุ่ม และอัตราการขับแคลเซียมของหนูทั้งสองกลุ่ม จะค่อย ๆ ลดลงหลังจากให้ FMT จนถึงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน (Figure 36)

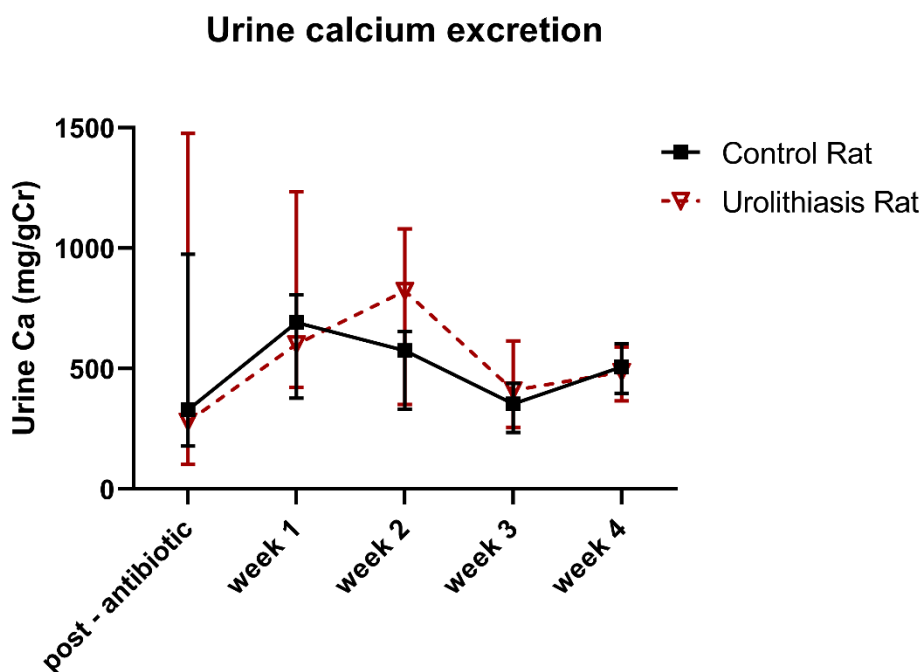
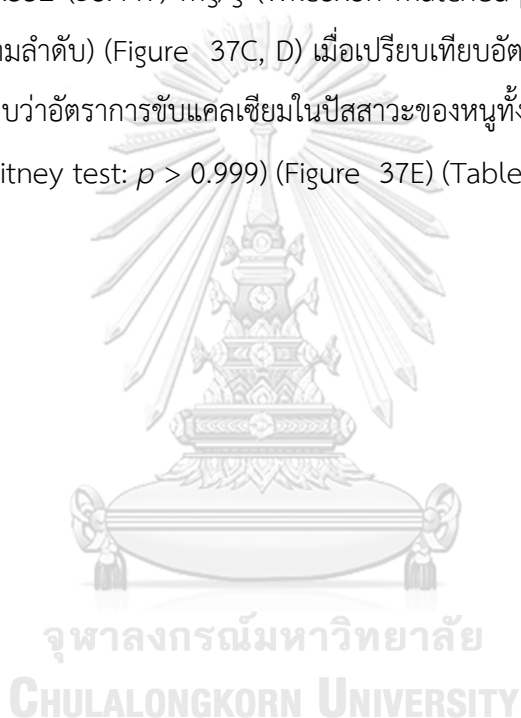


Figure 36 ผลแคลเซียมในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย (แสดงผลด้วย Median, IQR)

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - antibiotic) ต่ออัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม พบว่าหนูทั้งสองกลุ่มมีอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะทุกสัปดาห์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยช่วง post - antibiotic หนูในกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี มีอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะ 508.475 (118.725) mg/g ไม่แตกต่างจากช่วง pre - antibiotic ที่มีแคลเซียมในปัสสาวะ 329.374 (185.859) mg/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.813$) (Figure 37A) เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต ในช่วง post - antibiotic มีอัตราการขับแคลเซียมใน

ปัสสาวะ 487.013 (111.034) mg/g ไม่แตกต่างจากช่วง pre - antibiotic ที่มีแคลเซียมในปัสสาวะ 280.780 (785.661) mg/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.813$) (Figure 37B)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคนี้วัดเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ กับสัปดาห์ 0 พบว่าอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของทั้งสองกลุ่มหลังจากปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งสัปดาห์ที่ 0 พบว่าอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของกลุ่ม Control คือ 692.09 (100.167) mg/g และกลุ่ม Urolithiasis คือ 601.552 (38.447) mg/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.625$ และ 0.125 ตามลำดับ) (Figure 37C, D) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับแคลเซียมในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างสองกลุ่ม พบว่าอัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Mann Whitney test: $p > 0.999$) (Figure 37E) (Table 12)



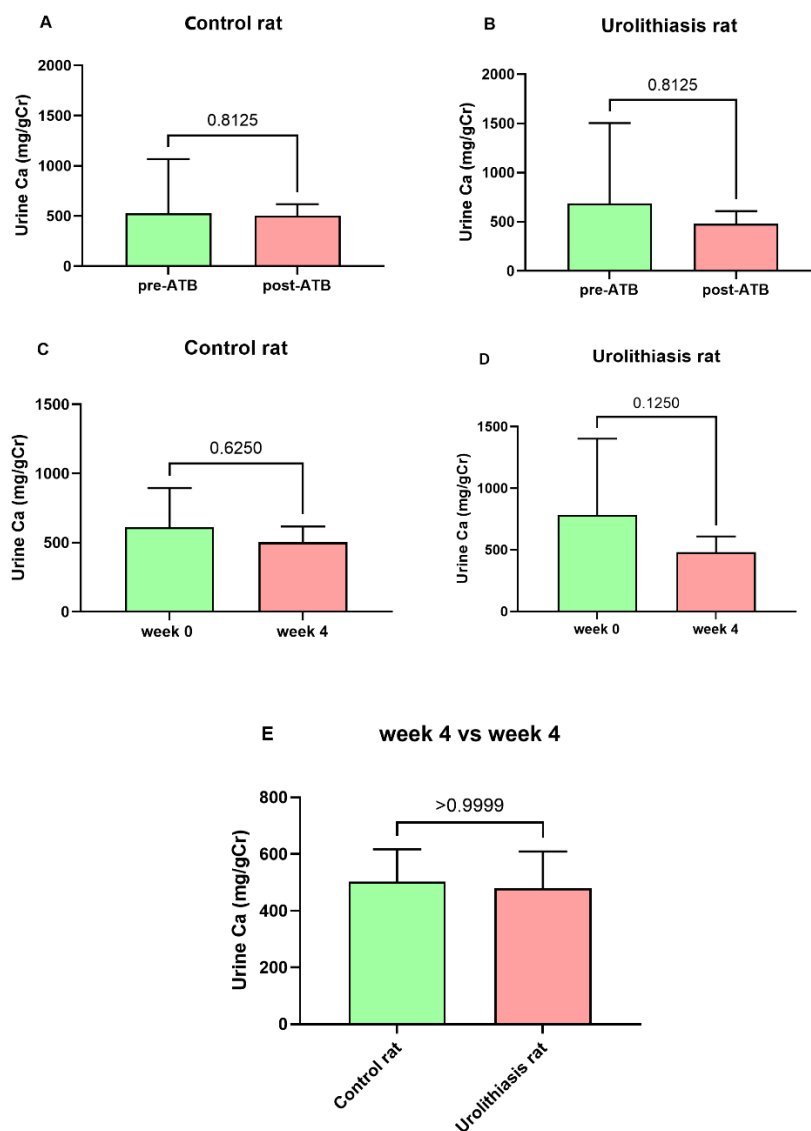


Figure 37 ผลแคลเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(โดย A: อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ช่วง pre – ATB vs post - antibiotic, B: อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis ช่วง pre – ATB vs post - antibiotic, C: อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: อัตราการขับแคลเซียมในปัสสาวะของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

4.4.2 อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม ตลอดระยะเวลาการวิจัยพบว่า หลังจากหนูทั้งสองกลุ่มได้รับยาปฏิชีวนะในช่วง post – antibiotic มีอัตราการขับออกซา

เลตในปัสสาวะเพิ่มขึ้นทั้งสองกลุ่ม และอัตราการขับออกซาเลตของหนูทั้งสองกลุ่ม จะลดลงหลังจากเริ่มให้ FMT ในสัปดาห์ที่ 1 ทันที (Figure 38)

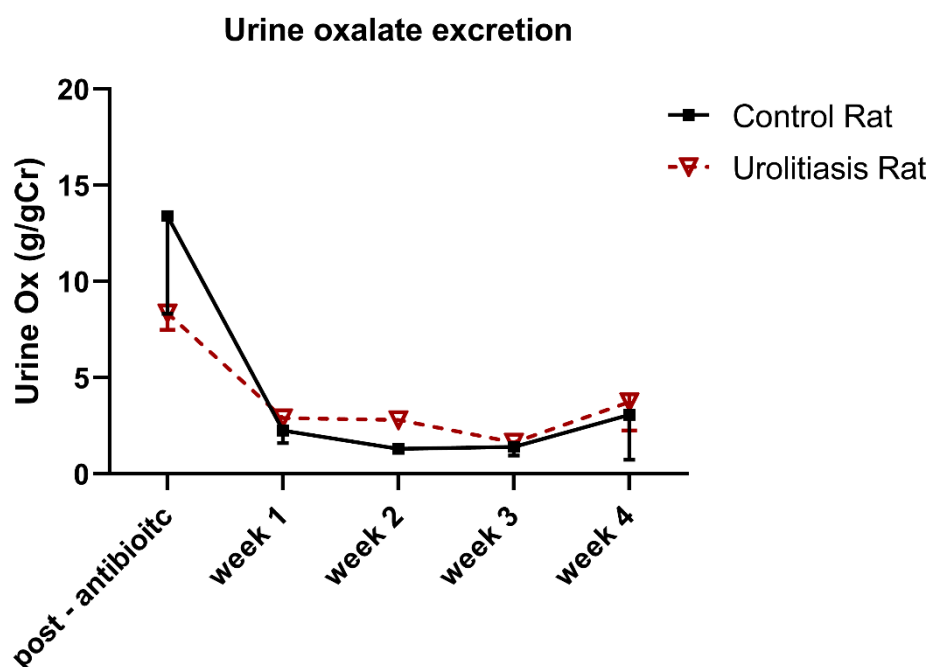


Figure 38 ผลออกซาเลตในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย (แสดงผลด้วย Median, IQR)

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - antibiotic) ต่ออัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่มหลังจากได้รับ FMT พบว่าอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ในช่วง post - antibiotic 3.079 (3.280) g/g ลดลงจากช่วง pre - antibiotic ซึ่งมีอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ 13.410 (8.796) g/g อย่างมีนัยสำคัญ (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.023$) หนูกลุ่ม Urolithiasis ในช่วง post - antibiotic มีอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ 3.745 (1.145) g/g มีแนวโน้มลดลงจากช่วง pre - antibiotic ซึ่งมีอัตราการขับออกซาเลต 8.352 (1.628) g/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.125$) (Figure 39A, B ตามลำดับ)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 4 มีอัตราการขับออกซาเลต 3.079 (3.280) g/g ไม่มีความแตกต่างจากสัปดาห์ 0 ที่มีอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ 2.260 (1.564) g/g (Wilcoxon matched-pairs signed

rank test: $p = 0.625$) (Figure 39C) แตกต่างจากกลุ่ม Urolithiasis ที่มีอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ 3.745 (1.145) g/g อย่างมีนัยสำคัญ (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.020$) (Figure 39D) แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับออกซาเลตในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างสองกลุ่ม พบว่าอัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูกกลุ่ม Urolithiasis มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม Control (Mann Whitney test: $p = 0.191$) (Figure 39E) (Table 12)

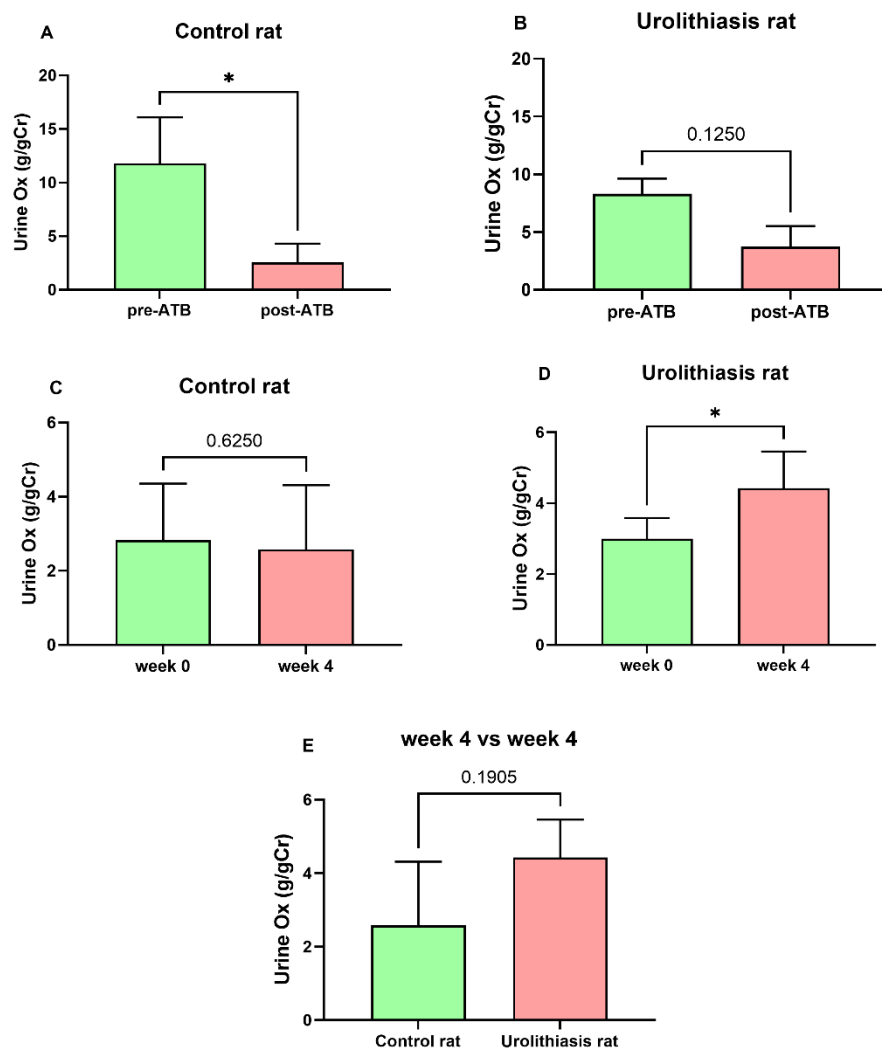


Figure 39 ผลออกซาเลตในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(โดย A: อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะหนูกกลุ่ม Control ช่วง post - ATB vs post - ATB , B: อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูกกลุ่ม Urolithiasis ช่วง post - ATB vs post - ATB, C: อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะหนูกกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะหนูกกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะของหนูก Control เปรียบเทียบกับหนูกกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 4, *: $p < 0.05$, ATB: antibiotic)

4.4.3 อัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม ตลอดระยะเวลาการวิจัย พบว่า หลังจากหนูทั้งสองกลุ่มได้รับยาปฏิชีวนะในช่วง post - antibiotic มีอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะลดลงทั้งสองกลุ่ม และอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น หลังจากเริ่มให้ FMT ผ่านไปในสัปดาห์ที่ 1 และจะลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 (Figure 40)

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - ATB) ต่ออัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม หลังจากได้รับ FMT พบว่าอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ช่วง pre - ATB 13.576 (19.765) g/g ไม่แตกต่างจากช่วง post - ATB ซึ่งมีอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะ 21.263 (3.621) g/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p > 0.999$) เช่นเดียวกับหนูกลุ่ม Urolithiasis ช่วง pre - ATB มีอัตราการขับซิเตรทในปัสสาวะ 19.519 (10.819) g/g ไม่แตกต่างจากช่วง post - ATB ซึ่งมีอัตราการขับซิเตรท 18.484 (3.643) g/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.813$) (Figure 41A, B ตามลำดับ)

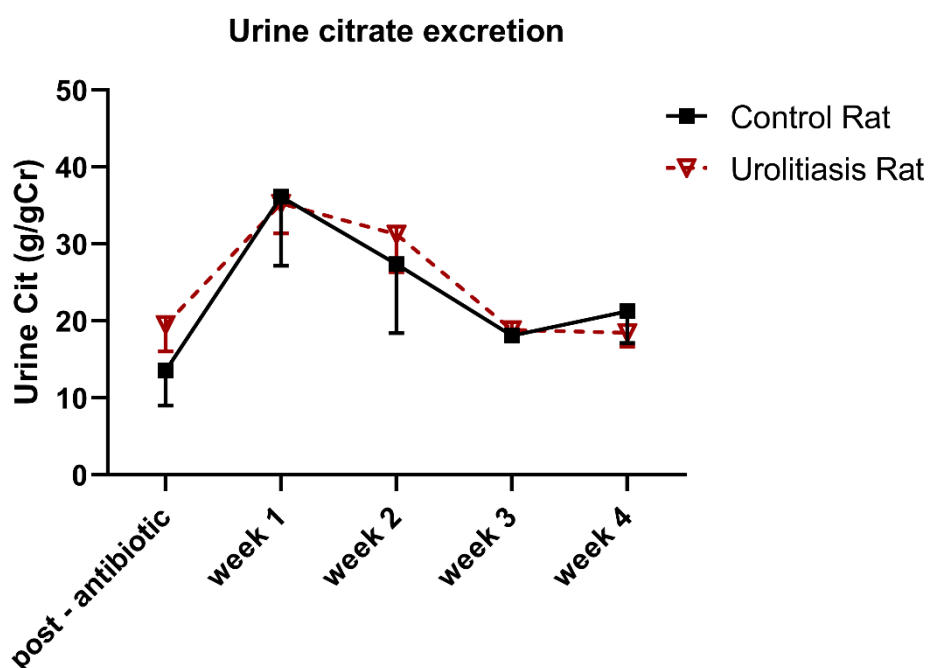


Figure 40 ผลซิเตรทในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย
(แสดงผลด้วย Median, IQR)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี ในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณซีเตรท 21.263 (3.621) g/g มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ 0 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.063$) (Figure 41C) เช่นเดียวกับกลุ่ม Urolithiasis ที่อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะมีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งมีซีเตรทในปัสสาวะ 18.484 (3.643) g/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.063$) (Figure 41D) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับซีเตรทในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างหนูทั้งสองกลุ่ม พบว่าอัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Mann Whitney test: $p > 0.999$) (Figure 41E) (Table 12)



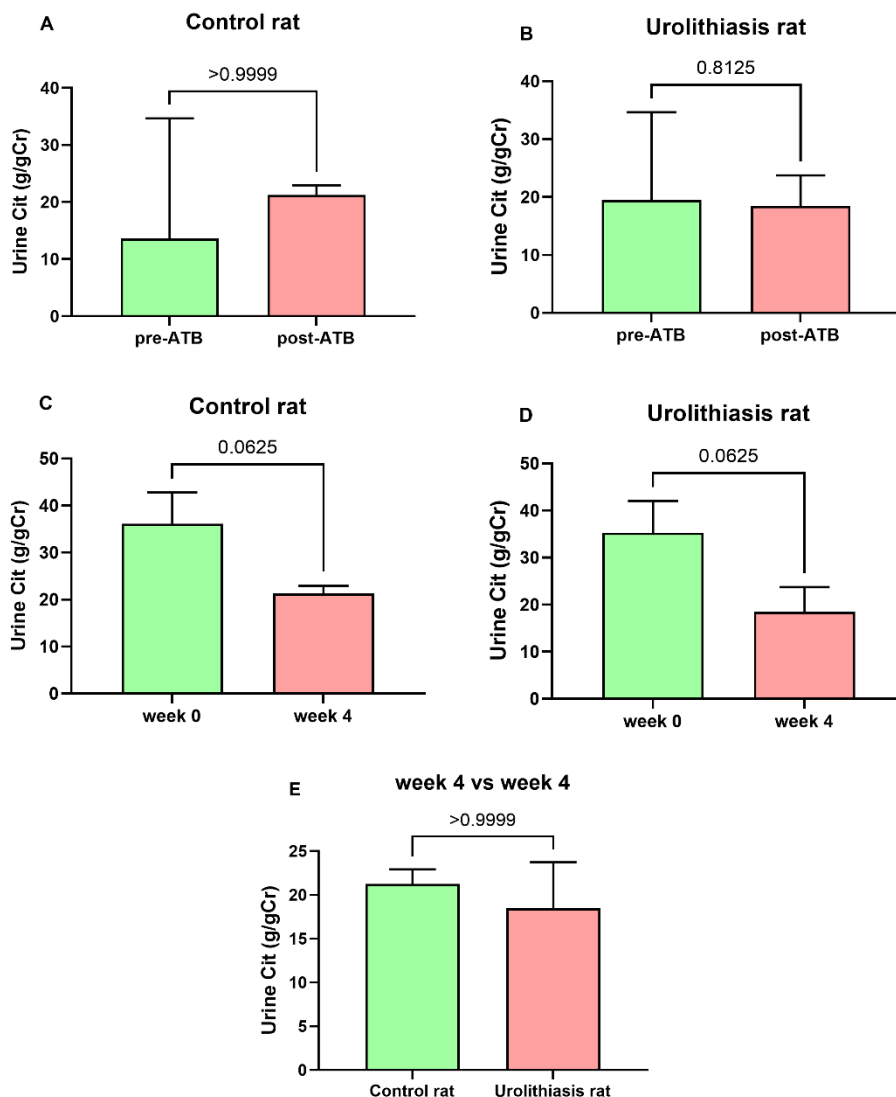


Figure 41 ผลซีเตรทในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(โดย A: อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะหนูกลุ่ม Control ช่วง post-ATB vs pre-ATB, B: อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis ช่วง post-ATB vs pre-ATB, C: อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: อัตราการขับซีเตรทในปัสสาวะของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

4.4.4 อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะ

อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูช่วงเตรียมลำไส้ ตลอดจนได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระครบทั้ง 4 สัปดาห์ แสดงใน Figure 42 พบว่าอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะ

ของหนูกลุ่มที่ได้รับการจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระจากคนสุขภาพดี มีอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - ATB) ต่ออัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่มหลังจากได้รับ FMT พบว่าอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี ในช่วง post - ATB มีอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะ 841.346 (290.604) mg/g มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากช่วง pre - antibiotic ซึ่งมีอัตราการขับแมกนีเซียม 462.478 (538.165) mg/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.500$) (Figure 43A) เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่ว ในช่วง post - ATB มีอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะ 508.850 (90.368) mg/g ไม่แตกต่างจากช่วง pre - ATB ที่มีแมกนีเซียมในปัสสาวะ 314.136 (260.894) mg/g (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.500$) (Figure 43B)

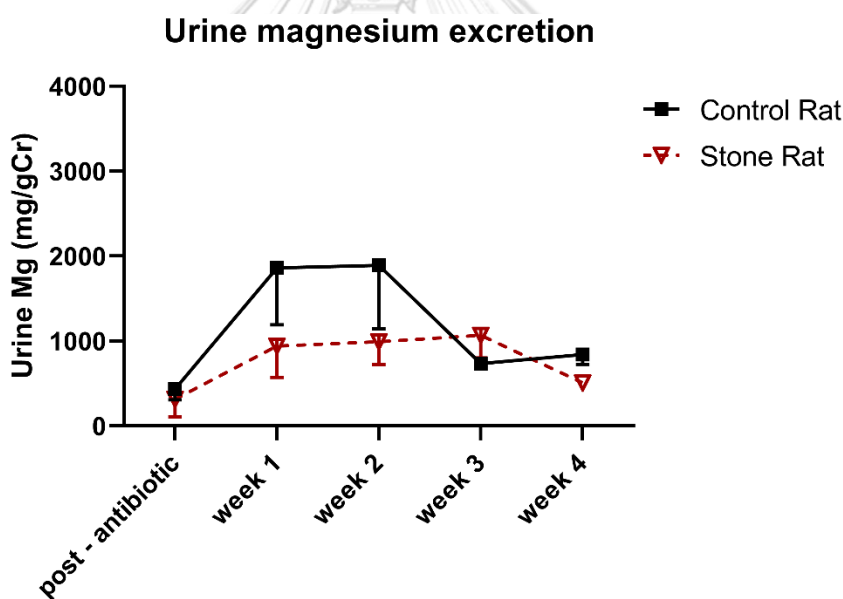


Figure 42 ผลแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย (แสดงผลด้วย Median, IQR)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณ 841.346 (290.604) mg/g มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.125$) เช่นเดียวกับกับกลุ่ม Urolithiasis ใน

สัปดาห์ที่ 4 มีอัตราการขับแมกนีเซียม 508.850 (90.368) mg/g มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.063$) (Figure 43C, D) แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการขับแมกนีเซียมในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างสองกลุ่ม พบว่าอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis น้อยกว่าอัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p < 0.001$) (Figure 43E) (Table 12)

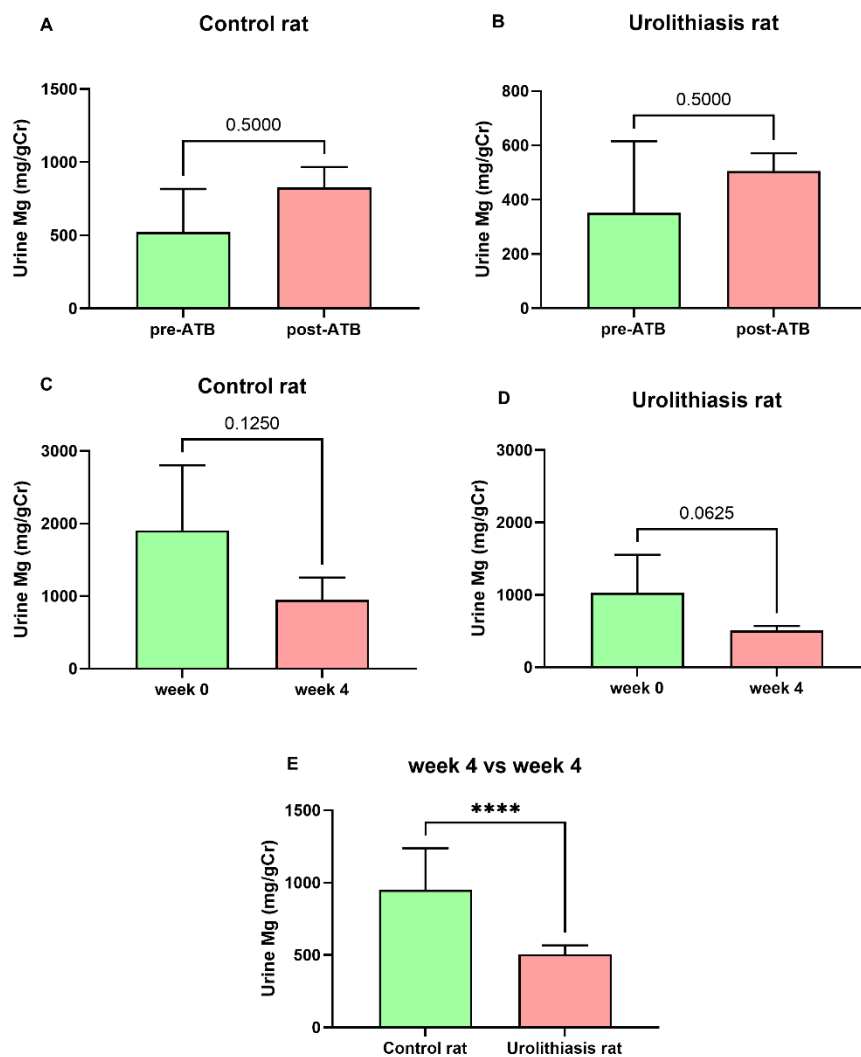


Figure 43 ผลแมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(โดย A: อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control ช่วง post-ATB vs pre-ATB, B: อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis ช่วง post-ATB vs pre-ATB, C: อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: อัตราการขับแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic, ****: $p < 0.001$)

4.4.5 ผล pH ในปัสสาวะ

ผล pH ในปัสสาวะของหนูช่วงเตรียมลำไส้ ตลอดจนได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระครบทั้ง 4 สัปดาห์ พบว่า ระดับ pH ในปัสสาวะของหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีระดับ pH สูงกว่าหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี (Figure 44)

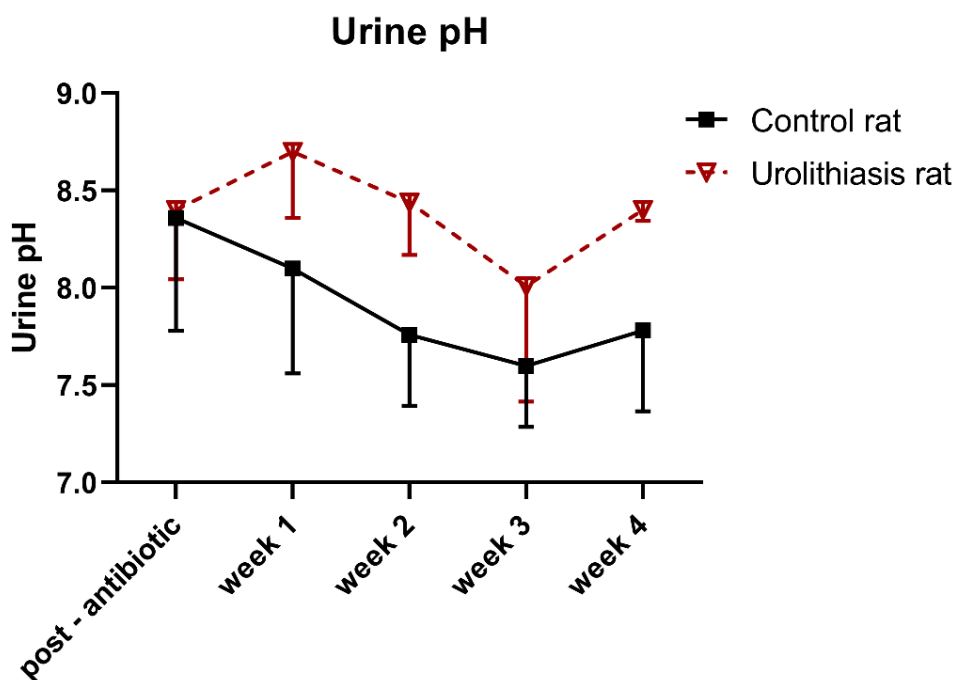


Figure 44 ผล pH ในปัสสาวะของหนู ตลอดระยะเวลาการวิจัย

(แสดงผลด้วย Median, IQR)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - ATB) ต่อผลของระดับ pH ในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่มหลังจากได้รับ FMT พบว่า pH ในปัสสาวะของหนูในกลุ่มที่ได้รับ FMT ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี ในช่วง post - ATB มี pH ในปัสสาวะ 7.780 (0.360) มีแนวโน้มลดลงจากช่วง pre - ATB ซึ่งมี pH ในปัสสาวะ 8.360 (0.880) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.125$) (Figure 45A) เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับการ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต ช่วง post - ATB มี pH ในปัสสาวะ 8.380 (0.220) ไม่แตกต่างจากช่วง pre - ATB ที่มี pH ในปัสสาวะ 8.360 (0.570) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.313$) (Figure 45B)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่ม Control หลังจากปลูกถ่ายจุลินทรีย์ใน

อุจจาระมี pH ในปัสสาวะ 7.780 (0.360) ไม่แตกต่างจาก pH ในปัสสาวะสัปดาห์ที่ 0 ที่มีค่า pH 8.100 (0.550) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.625$) เช่นเดียวกับกลุ่ม Urolithiasis ในสัปดาห์ที่ 4 มี pH ในปัสสาวะ 8.380 (0.220) ไม่แตกต่างจาก pH ในปัสสาวะสัปดาห์ที่ 0 ที่มีค่า pH 8.655 (0.230) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.625$) (Figure 45C, D) เมื่อเปรียบเทียบผลของระดับ pH ในปัสสาวะสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างสองกลุ่ม พบว่าระดับ pH ในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis สูงกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.008$) (Figure 45E) (Table 12)

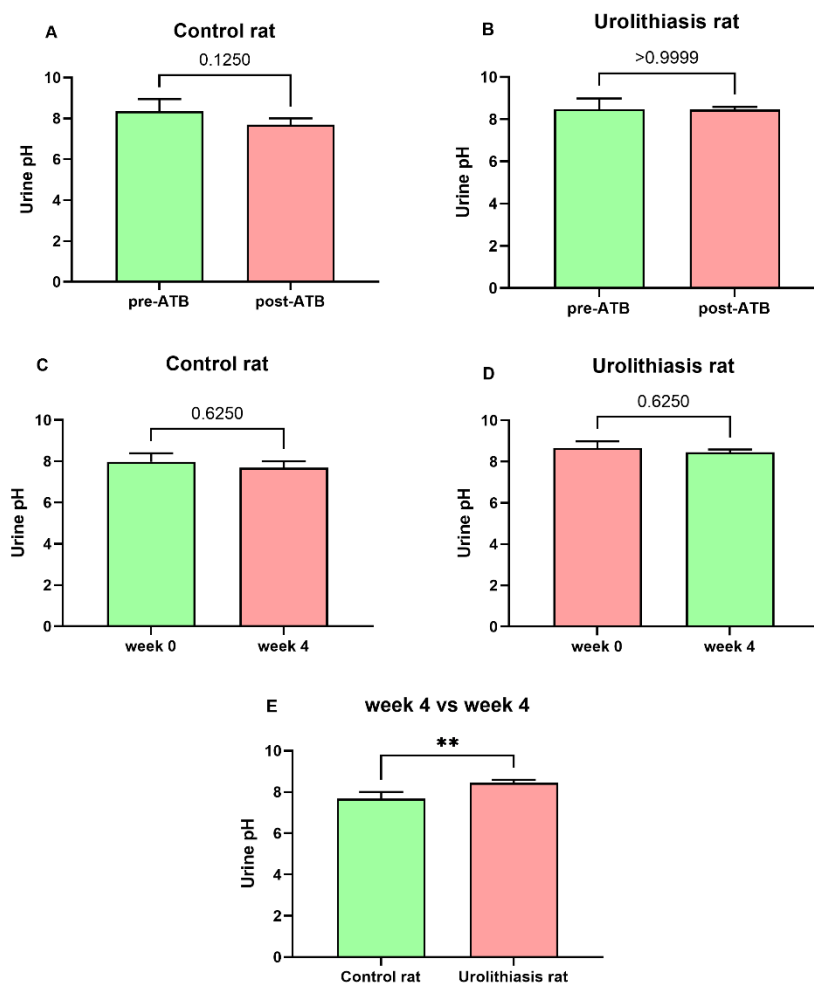


Figure 45 ผล pH ในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผล pH ในปัสสาวะหนูกลุ่ม Control ช่วง pre-ATB vs post-ATB, B: ผล pH ในปัสสาวะของหนูกลุ่ม Urolithiasis ช่วง pre-ATB vs post-ATB, C: ผล pH ในปัสสาวะหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: ผล pH ในปัสสาวะหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: ผล pH ในปัสสาวะของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic, **: $p < 0.01$)

4.4.6 ผลดัชนีความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ

จากการศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนู ทำการตรวจวัดค่า parameters ในปัสสาวะ นำมาคำนวณหาความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วไต ใช้ค่าดัชนีภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ Tiselius' urinary supersaturation index ซึ่งเป็นการคำนวณหา crystallization potentials (CP) ของนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต จากภาวะของ urine supersaturation โดยมีวิธีการคำนวณตาม 3.5.22 ได้ผลดังนี้

หลังจากปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้ในหนูสองกลุ่ม ครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ในช่วงเตรียมลำไส้ (post - antibiotic) มีค่า AP_{CaOx} ที่ได้จากการคำนวณสูงทั้งสองกลุ่ม หลังจากได้รับ FMT พบว่า ค่า AP_{CaOx} ลดลงทันทีในหนูทั้งสองกลุ่ม เมื่อพิจารณาพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีค่า AP_{CaOx} สูงกว่ากลุ่มหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี (Figure 46)

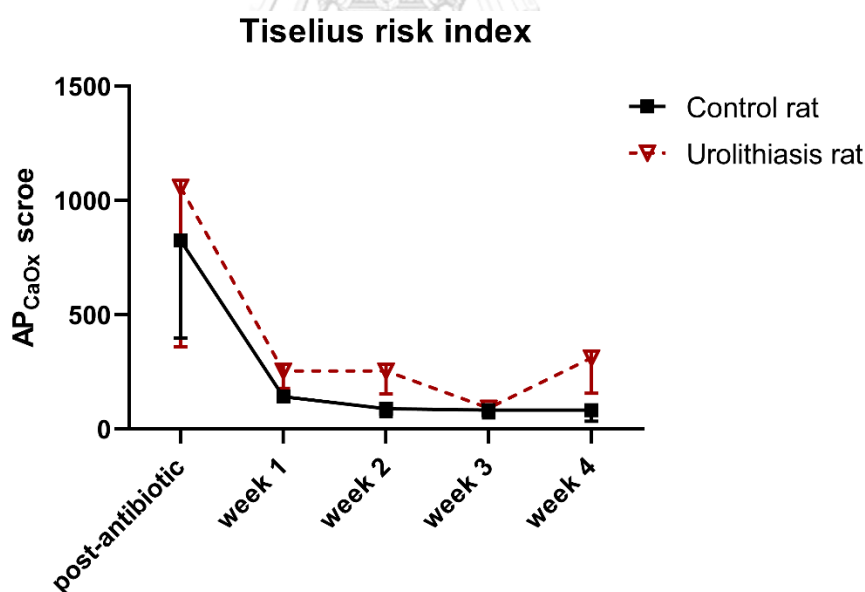
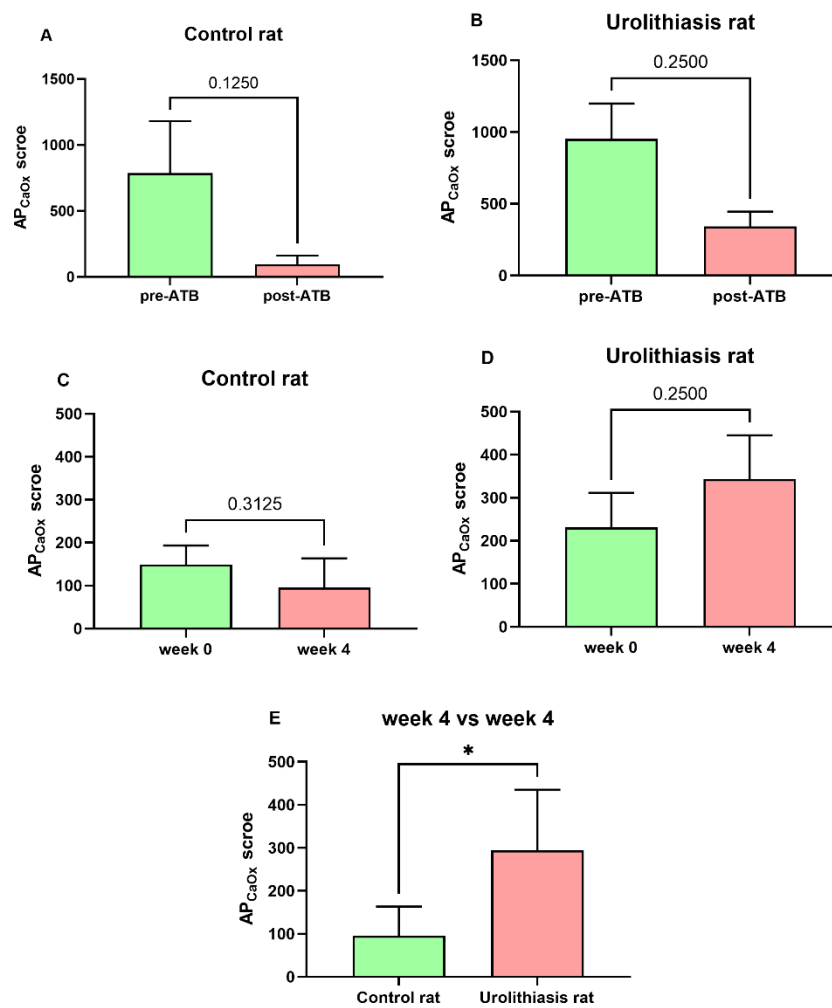


Figure 46 ดัชนีความอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะในสัตว์ทดลอง ตลอดระยะเวลาการวิจัย (แสดงผลด้วย Median, IQR)

เพื่อเปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะที่ให้หนูช่วงเตรียมลำไส้ (post - ATB) ต่อดัชนีความอัมตวยิ่งยวดในปัสสาวะของหนูทั้งสองกลุ่มหลังจากได้รับ FMT พบว่าหนูทั้งสองกลุ่มมีค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะทุกสัปดาห์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยช่วง post - ATB หนูในกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี มีค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะ 82.530 (105.049) มีแนวโน้มลดลงจากช่วง pre - ATB ที่มีค่า AP_{CaOx} 877.184 (452.232) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.063$) (Figure 47A) เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้วไต ในช่วง post - ATB มีค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะ 311.545 (195.268) มีแนวโน้มลดลงจากช่วง pre - ATB ที่มีค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะ 1058.348 (491.136) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.250$) (Figure 47B)

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในลำไส้จากผู้ป่วยโรคนี้วไตเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีในหนูหลังจากได้รับ FMT ผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะของทั้งสองกลุ่มหลังจากได้รับจุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ ไม่มีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 (Figure 47C, D) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า AP_{CaOx} ในสัปดาห์ที่ 4 ระหว่างสองกลุ่ม พบว่าค่า AP_{CaOx} ในปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้วไต มีค่า AP_{CaOx} 311.545 (195.268) สูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี ซึ่งมีค่า AP_{CaOx} 82.530 (105.049) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p < 0.032$) (Figure 47E) (Table 12)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Figure 47 ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะในสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะหนูกุ่ม Control ช่วง pre-ATB vs post-ATB, B: ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะของหนูกุ่ม Urolithiasis ช่วง pre-ATB vs post-ATB, C: ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะหนูกุ่ม Control สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, D: ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะหนูกุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ที่ 0 vs สัปดาห์ที่ 4, E: ผลดัชนีความอึดตัวของปัสสาวะของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic, *: $p < 0.05$)

Table 12 ผลตรวจ electrolytes ในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

Urine electrolyte	Groups – week 4 (Median, IQR)				P - value
	Control		Urolithiasis		
Calcium (mg/gCr)	508.470	(118.725)	487.010	(111.034)	0.999
Oxalate (g/gCr)	3.079	(3.280)	3.745	(1.145)	0.191
Citrate (g/gCr)	21.263	(3.621)	18.484	(3.643)	0.999
Magnesium (mg/gCr)	841.346	(290.604)	508.850	(90.368)***	0.001
pH	7.780	(0.360)	8.380	(0.220)**	0.008
Tiselius AP _{CaOx}	82.530	(105.049)	311.545	(195.268)*	0.032

(ใช้สถิติ Mann Whitney test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม และค่าความเชื่อมั่นที่ 95%, Cr: Creatinine)

จากผลการทดลองนี้ พบว่า หนูกลุ่ม urolithiasis มีปริมาณแมกนีเซียมต่ำกว่าหนูกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ในปัสสาวะของหนูกลุ่ม urolithiasis มีค่าสูงกว่าหนูอีกกลุ่ม ทั้งนี้พบว่า หนูกลุ่ม urolithiasis หลังจากได้รับ FMT ไปแล้ว 4 สัปดาห์ มีปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะสูงกว่าหนูกลุ่มเดียวกันในสัปดาห์ที่ 0 เมื่อพิจารณาพบว่า หนูกลุ่ม urolithiasis มีความเสี่ยงของการเกิดโรคนิวสูงกว่าหนูกลุ่ม control พิจารณาจากค่า Tiselius AP_{CaOx} ที่สูงกว่าหนูกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ

4.5 ผลพารามิเตอร์ในซีรัมของสัตว์ทดลอง

หลังจาก gavage จุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ ในหนู Wistar โดยได้รับ FMT เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และทุกสัปดาห์จะเก็บซีรัมในหนูทั้ง 2 กลุ่ม และนำไปวัดค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในซีรัม ได้แก่ ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม ดังนี้

4.5.1 ผลแคลเซียมในซีรัม

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อปริมาณแคลเซียมในซีรัม พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีสัปดาห์ 4 มีปริมาณแคลเซียมในซีรัม 16.200 (2.900) mg/dL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ 0 ซึ่งมีปริมาณแคลเซียม 10.400 (0.700) mg/dL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.063$) (Figure 48A) เช่นเดียวกับหนูที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิวไตสัปดาห์ 4 ที่มีปริมาณแคลเซียมในซีรัม 13.700 (1.400) mg/dL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ 0 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p < 0.063$) (Figure 48B) ที่มี

ปริมาณแคลเซียมในซีรัม 9.900 (0.800) mg/dL เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมในซีรัมหลังจากที่ได้รับ FMT ไปแล้ว 4 สัปดาห์ของหนูทั้งสองกลุ่มพบว่า ปริมาณแคลเซียมในซีรัมไม่แตกต่างกัน (Mann Whitney test: $p = 0.095$) (Figure 48C)

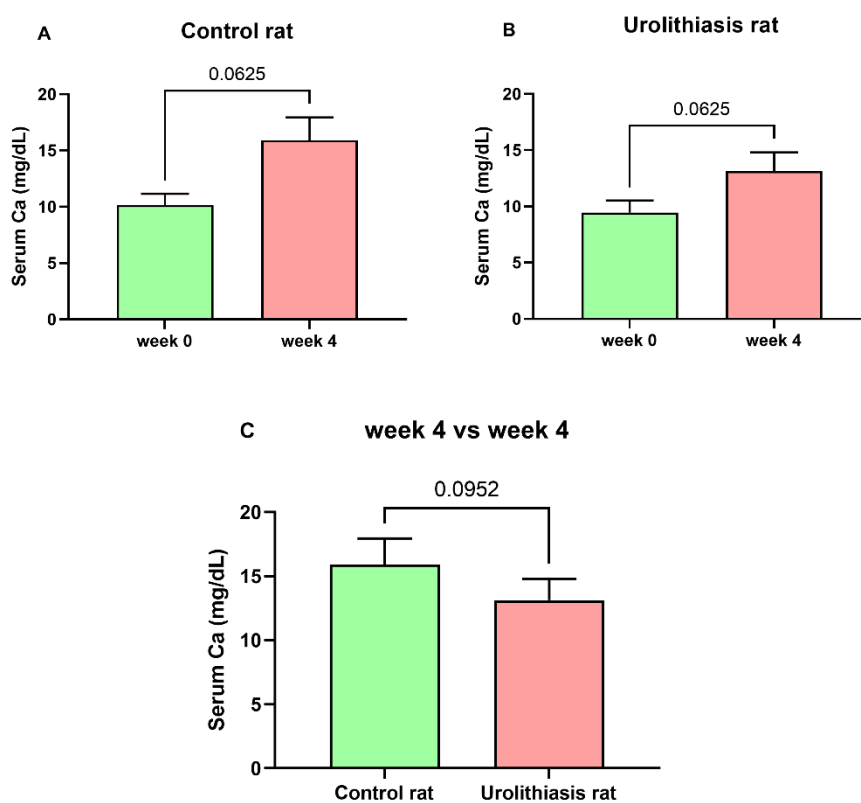


Figure 48 ผลแคลเซียมในซีรัมของสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลแคลเซียมในซีรัมของหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, B: ผลแคลเซียมในซีรัมของหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, C: ผลผลแคลเซียมในซีรัมของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

4.5.2 ผลแมกนีเซียมในซีรัม

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อปริมาณแมกนีเซียมในซีรัมพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีสัปดาห์ 4 มีปริมาณแมกนีเซียมในซีรัม 0.024 (0.001) mg/mL สูงขึ้นจากสัปดาห์ 0 ซึ่งมีปริมาณแมกนีเซียม 0.008 (0.001) mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p < 0.01$) (Figure 49A) เช่นเดียวกับหนูที่

ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไตสัปดาห์ 4 ที่มีปริมาณแมกนีเซียมในซีรัม 0.016 (0.003) mg/mL สูงขึ้นจากสัปดาห์ 0 ซึ่งมีปริมาณแมกนีเซียม 0.008 (0.001) mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p < 0.01$) (Figure 49B) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแมกนีเซียมในซีรัมหลังจากที่ได้รับ FMT ไปแล้ว 4 สัปดาห์ของหนูทั้งสองกลุ่มพบว่า ปริมาณแมกนีเซียมในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.056$) (Figure 49C)

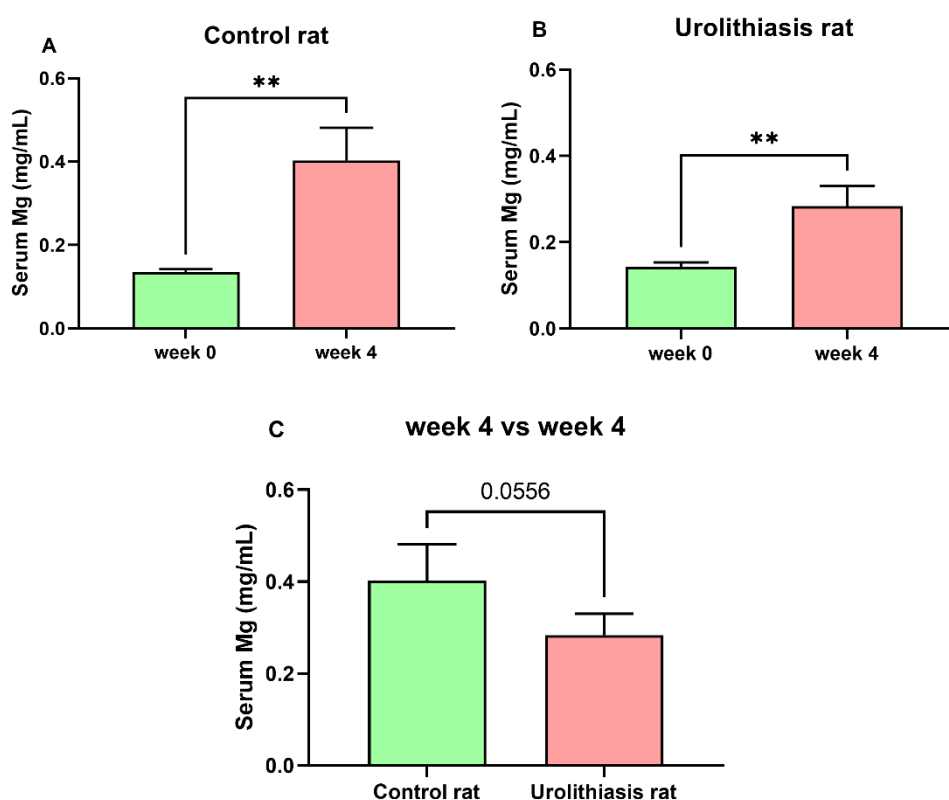


Figure 49 ผลแมกนีเซียมในซีรัมของสัตว์ทดลองในสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลแมกนีเซียมในซีรัมของหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, B: ผลแมกนีเซียมในซีรัมของหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, C: ผลแมกนีเซียมในซีรัมของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม

Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic, **: $p < 0.01$)

4.6 ผล Fractional excretion ของสัตว์ทดลอง

หลังจาก gavage จุลินทรีย์ที่สกัดจากอุจจาระ ในหนู Wistar โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ หนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี และ หนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้วัต โดยได้รับ FMT เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และทุกสัปดาห์จะเก็บซีรัมในหนูทั้ง 2 กลุ่ม และนำไปวัดค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในซีรัม ได้แก่ ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม นำไปคำนวณ Fractional excretion หรือสัดส่วนการกรอง electrolyte ผ่านไต เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างพารามิเตอร์ในซีรัมและปัสสาวะดังนี้

4.6.1 ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อสัดส่วนการกรองแคลเซียมผ่านไต พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีสัปดาห์ที่ 4 มีสัดส่วนแคลเซียมที่กรองผ่านไต 0.738 (0.280) mg/dL ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งมีสัดส่วนการกรองแคลเซียมผ่านไต 3.072 (2.956) mg/dL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.313$) (Figure 50A) เช่นเดียวกับกลุ่มหนูที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้วัต ที่มีสัดส่วนแคลเซียมที่กรองผ่านไตสัปดาห์ที่ 4 0.678 (0.297) mg/dL ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งมีสัดส่วนการกรองแคลเซียมผ่านไต 0.954 (3.651) mg/dL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.186$) (Figure 50B) เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนแคลเซียมที่กรองผ่านไตหลังจากที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ไปแล้ว 4 สัปดาห์ของหนูทั้งสองกลุ่มพบว่า สัดส่วนแคลเซียมที่กรองผ่านไตของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้วัต ไม่แตกต่างจากของหนูที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.841$) (Figure 50C)

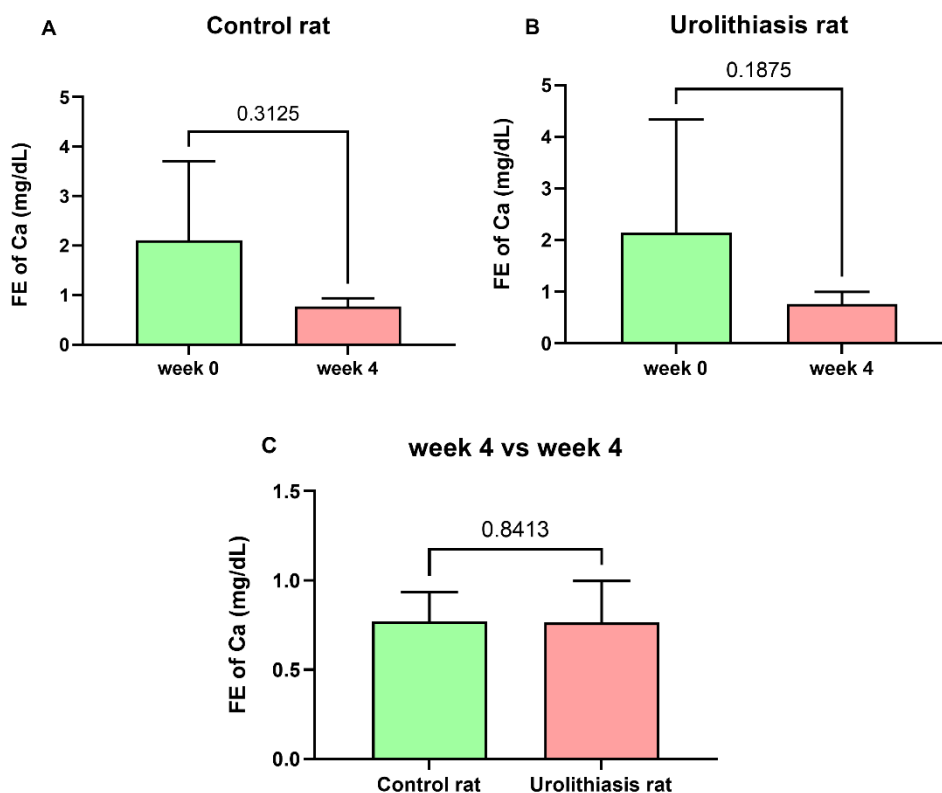


Figure 50 ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, B: ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, C: ผล Fractional excretion ของแคลเซียมในหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

4.6.2 ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียมในสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อสัดส่วนการกรองแมกนีเซียมผ่านไต พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีสัปดาห์ที่ 4 มีสัดส่วนแมกนีเซียมที่กรองผ่านไต 11.69 (4.786) mg/dL มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งมีสัดส่วนการกรองแคลเซียมผ่านไต 32.450 (78.740) mg/dL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.313$) (Figure 51A) เช่นเดียวกับกลุ่มหนูที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยนิ่ว ที่มีสัดส่วนแมกนีเซียมที่กรองผ่านไตสัปดาห์ที่ 4 6.267 (3.234) mg/dL มีแนวโน้มลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งมีสัดส่วนการกรองแคลเซียมผ่านไต 28.710 (79.460) mg/dL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.125$) (Figure 51B) เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนแมกนีเซียมที่กรองผ่านไตหลังจากที่ได้รับ FMT ไปแล้ว 4 สัปดาห์ของหนูทั้งสองกลุ่มพบว่า สัดส่วนแมกนีเซียมที่กรองผ่านไตของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ไม่แตกต่างจากของหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.095$) (Figure 51C)

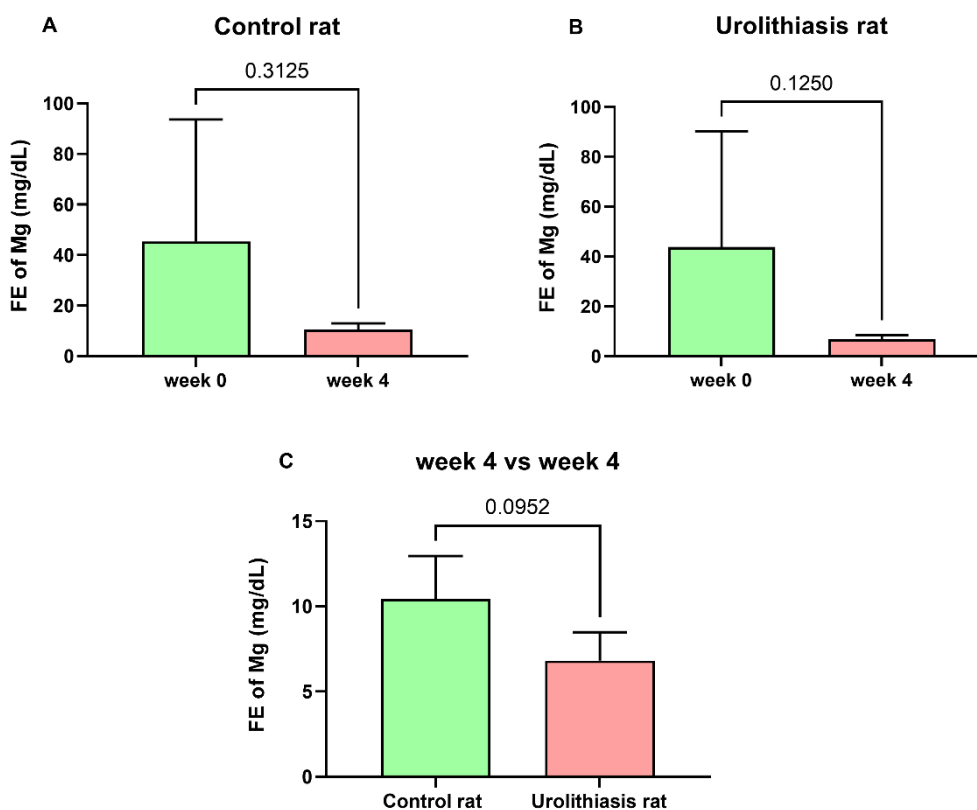


Figure 51 ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียม

(โดย A: ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียมในหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, B: ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียมในหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, C: ผล Fractional excretion ของแมกนีเซียมในหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

4.7 ผลออกซาเลตในอุจจาระของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อปริมาณออกซาเลตในอุจจาระ พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดีสัปดาห์ 4 มีปริมาณออกซาเลตในอุจจาระ 1.990 (1.375) mg/mL ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ 0 ซึ่งมีปริมาณออกซาเลตในอุจจาระ 1.860 (0.255) mg/mL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p = 0.438$) (Figure 52A) เช่นเดียวกับ กลุ่มหนูที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่มีปริมาณออกซาเลตในอุจจาระสัปดาห์ 4 1.950 (0.665) mg/mL ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ 0 ซึ่งมีปริมาณออกซาเลตในอุจจาระ 1.840 (0.465) mg/mL (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $p > 0.999$) (Figure 52B) เมื่อเปรียบเทียบ ปริมาณออกซาเลตในอุจจาระหลังจากที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ไปแล้ว 4 สัปดาห์ของหนูทั้งสอง

กลุ่มพบว่า ปริมาณออกซาเลตในอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต ไม่แตกต่างจากของหนูที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann Whitney test: $p = 0.695$) (Figure 52C)

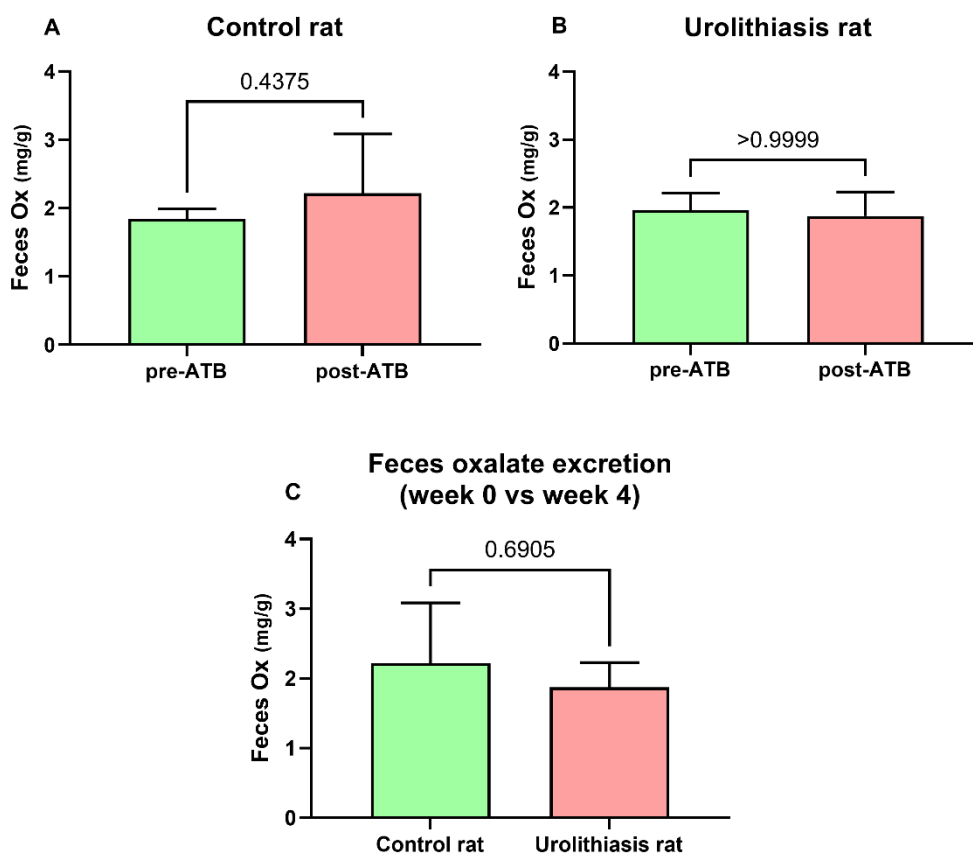


Figure 52 ผลออกซาเลตในอุจจาระของสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลออกซาเลตในอุจจาระของหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, B: ผลออกซาเลตในอุจจาระของหนูกลุ่ม Urolithiasis สัปดาห์ 0 vs สัปดาห์ 4, C: ผลออกซาเลตในอุจจาระของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, ATB: antibiotic)

จากการทดลองนี้ พบว่า หนูทั้งสองกลุ่ม เมื่อได้รับการ FMT ไปแล้ว 4 สัปดาห์ มีปริมาณแมกนีเซียมในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น เมื่อพิจารณาในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับ FMT ไปแล้ว พบว่าหนูกลุ่ม urolithiasis มีแนวโน้มของปริมาณแมกนีเซียมในซีรัมน้อยกว่าหนูกลุ่ม control เช่นเดียวกับผลสัดส่วนการกรองของแมกนีเซียมผ่านไต (Fractional excretion) ในหนูกลุ่ม urolithiasis มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูอีกกลุ่ม

4.8 ผลพยาธิสภาพไต และลำไส้ของสัตว์ทดลอง

4.8.1 ผลพยาธิสภาพไตของสัตว์ทดลอง

ผลการประเมินพยาธิสภาพไตของสัตว์ทดลอง โดยใช้ polarizing microscope (4x magnification) เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระต่อการเกิด calcium oxalate crystal deposit ที่ไต ซึ่งพิจารณาตาม 3.6.24 แบ่งเป็น 3 ระดับ พบว่าไตส่วน cortex ของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระของผู้ป่วยโรคนี้ไต และหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี มีพยาธิสภาพที่ไม่แตกต่างกัน พบการกระจายตัวของ glomerulus เป็นปกติ และไม่พบ crystal deposit ที่ชั้น cortex ของหนูทั้งสองกลุ่ม (Figure 53A, B) ไตส่วน cortical medullary junction ของหนูทั้งสองกลุ่มมีพยาธิสภาพที่ไม่แตกต่างกัน โดยพบการเรียงตัวของท่อ (tubules) เป็นแนวในระนาบเดียวกัน (parallel) และไม่พบ crystal deposit ที่ชั้นนี้ (Figure 53C, D) ไตส่วน papillary tip ของหนูทั้งสองกลุ่มมีพยาธิสภาพที่ไม่แตกต่างกัน โดยภาพตัดขวางพบเป็นลักษณะพีระมิด ส่วนฐานหันไปทาง cortex ซึ่งปัสสาวะจะไหลผ่านบริเวณ minor calyx ไปยัง renal pelvis และไม่พบ crystal deposit ที่ชั้นนี้เช่นกัน (Figure 53E, F)

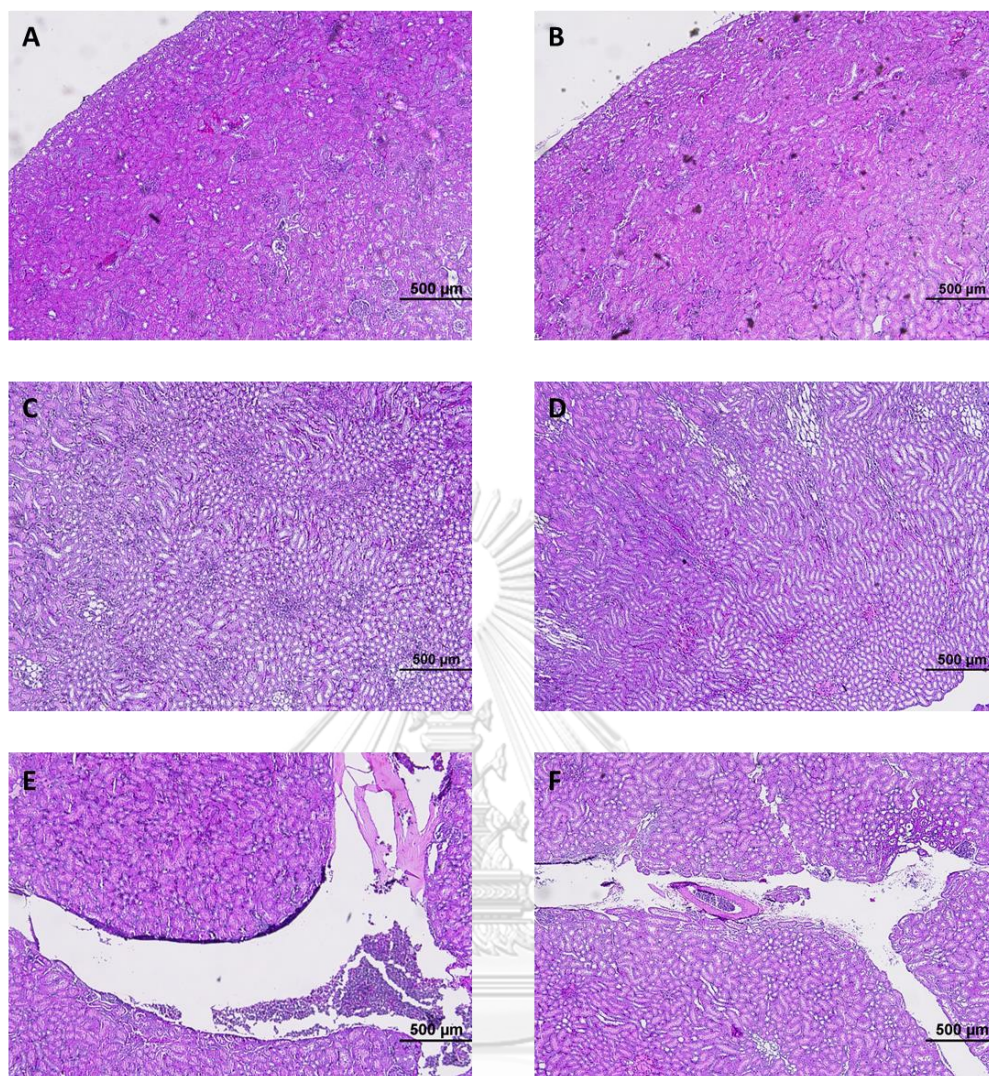


Figure 53 ผลพยาธิสภาพไตของสัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลพยาธิสภาพไตส่วน cortex ของหนูกลุ่ม Control, B: ผลพยาธิสภาพไตส่วน cortex ของหนูกลุ่ม Urolithiasis, C: ผลพยาธิสภาพไตส่วน cortical medullary junction ของหนูกลุ่ม Control, D: ผลพยาธิสภาพไตส่วน cortical medullary junction ของหนูกลุ่ม Urolithiasis, E: ผลพยาธิสภาพไตส่วน papillary tip ของหนูกลุ่ม Control, F: ผลพยาธิสภาพไตส่วน papillary tip ของหนูกลุ่ม Urolithiasis)

4.8.2 ผลพยาธิสภาพลำไส้ของสัตว์ทดลอง

ผลการประเมินพยาธิสภาพลำไส้ของสัตว์ทดลอง โดยใช้ immunohistochemistry เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ต่อการคงตัวของ tight junction (ZO-1) ที่ลำไส้ของสัตว์ทดลอง ซึ่งพิจารณาตาม 3.6.24 พบว่า ลำไส้ส่วน jejunum ของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระของผู้ป่วยโรคนิวไต มี ZO-1 content น้อยกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pearson chi-square: $p = 0.043$)

(Table 13) ซึ่งพบการกระจายตัวของ ZO-1 ที่ย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณ epithelium และบริเวณฐานของ villi ซึ่งสามารถแยก cytoplasm ที่ย้อมติดสีน้ำเงินบริเวณด้านในของ villi ได้ชัดเจน (Figure 54)

Table 13 แสดงผลการประเมินการย้อมติด ZO-1 content ที่ลำไส้ส่วน jejunum ของสัตว์ทดลอง

Sample code	ZO-1 content	Definition score
A1	3	multifocal
A2	3	multifocal
A3	3	multifocal
A4	3	multifocal
A5	4	patchy
A6	3	multifocal
B1	2	focal
B2	2	focal
B3	2	focal
B4	3	multifocal
B5	3	multifocal
B6	2	focal

(โดย A: หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี, B: หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้เวไต, ใช้ Pearson chi-square ในการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%)

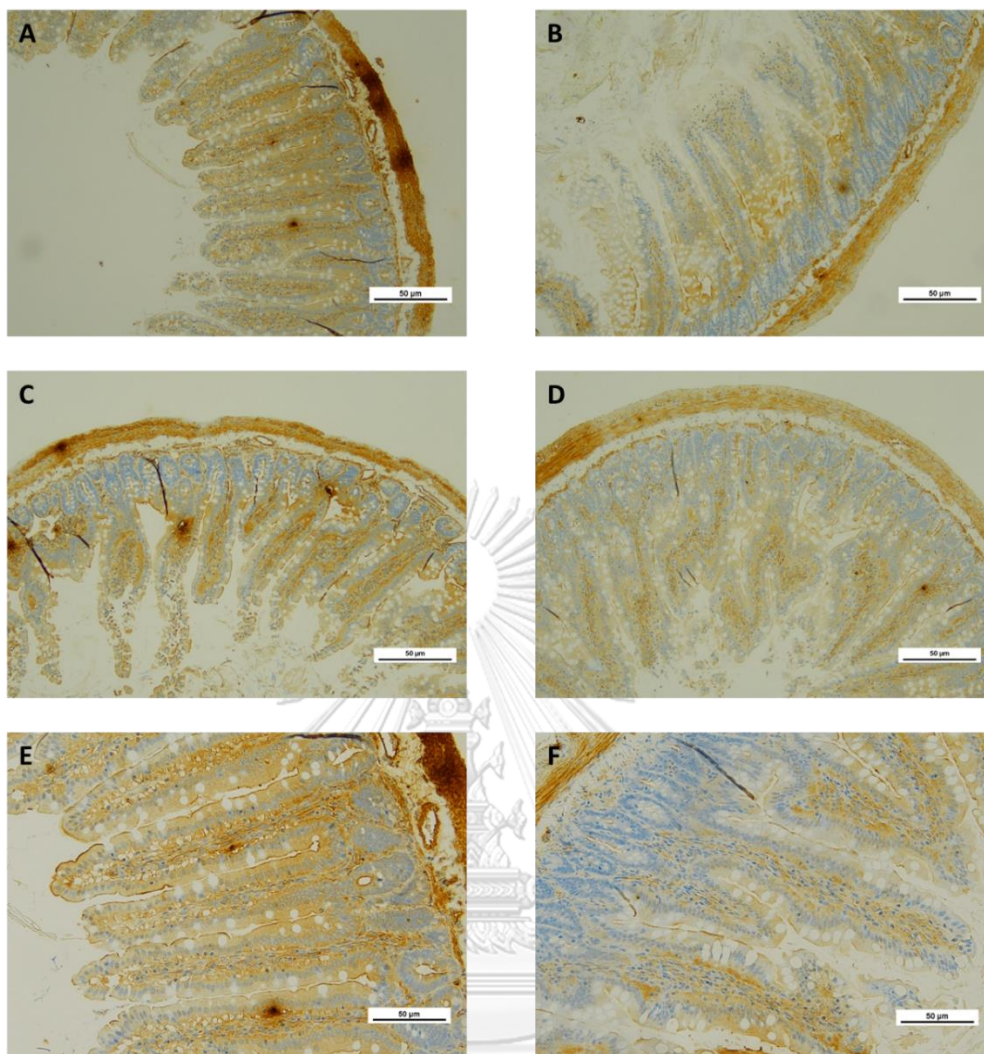


Figure 54 ผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน jejunum ที่ย้อม ZO-1 ของสัตว์ทดลอง (โดย A, C, E: ผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน jejunum ที่ย้อม ZO-1 ของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี, B, D, F: ผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน jejunum ที่ย้อม ZO-1 ของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน, ZO-1 ติดสีส้มหรือน้ำตาล, cytoplasm ติดสีฟ้า)

4.9 ผลการแสดงของยีน *NF-kB* *SLC26A6* *ZO1* และ *OCLN* ในสัตว์ทดลอง

4.9.1 ผลการแสดงออกของยีน *NF-kB* ในไตของสัตว์ทดลอง

ผลการแสดงออกของยีน *NFKB1* nuclear factor kappa B subunit 1 หรือ *NF-kB* ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) ซึ่งใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของชิ้นเนื้อไตในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อการแสดงออกของยีน *NF-kB* พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคเบาหวานไปแล้ว 4

สัปดาห์ มีค่าการแสดงออกของยีน 1.887 (3.335) ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย จุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีที่มีค่าการแสดงออกของยีน 1.119 (1.061) (Mann Whitney test: $p = 0.114$) (Figure 55)

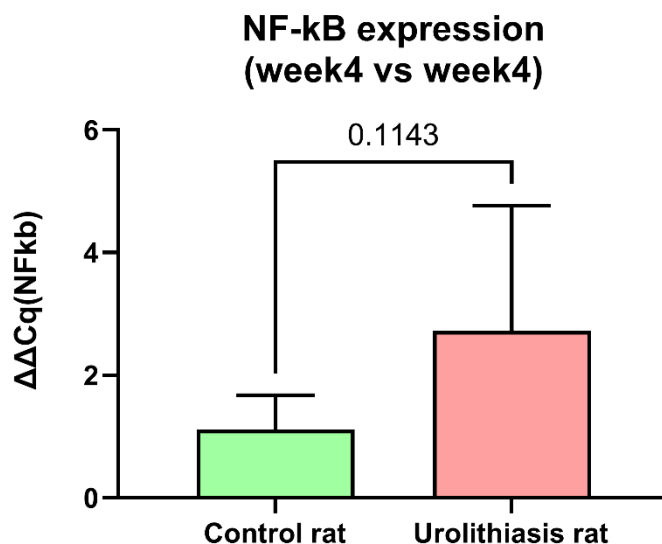


Figure 55 ผลการแสดงออกของยีน *NF-kB* ในไตของสัตว์ทดลอง (ผลการแสดงออกของยีน *NF-kB* ในสัตว์ทดลองของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4)

4.9.2 ผลการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้สัตว์ทดลอง

ผลการแสดงออกของยีน *Solute Carrier Family 26 Member 6* หรือ *SLC26A6* ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) ซึ่งใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของชิ้นเนื้อลำไส้ส่วน jejunum ในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อการแสดงออกของยีน *SLC26A6* พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคไตไปแล้ว 4 สัปดาห์ มีค่าการแสดงออกของยีน 1.414 (0.785) ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีที่มีค่าการแสดงออกของยีน 0.759 (0.359) (Mann Whitney test: $p = 0.057$) (Figure 56)

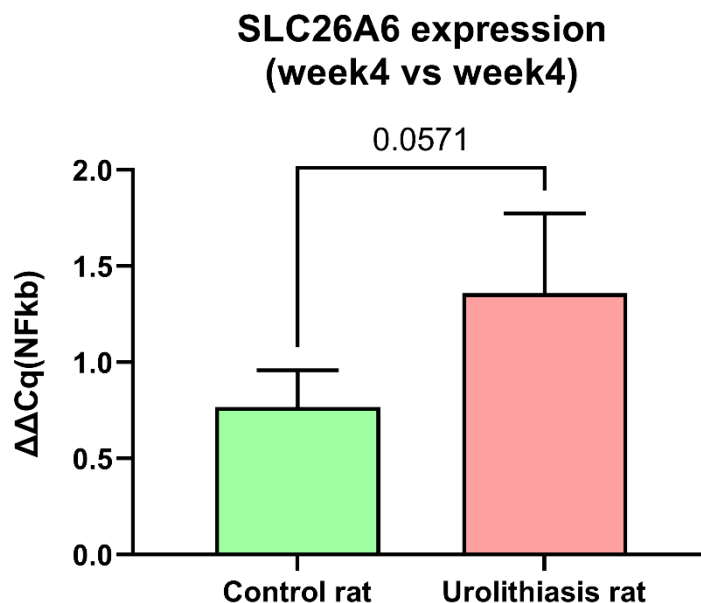


Figure 56 ผลการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง (ผลการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในสัตว์ทดลองของหนู Stone เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4)

4.9.3 ผลการแสดงออกของยีน *OCLN* และ *ZO1* ในลำไส้สัตว์ทดลอง

ผลการแสดงออกของยีน *Occludin* หรือ *OCLN* และ *Zonula occluden-1* หรือ *ZO-1* ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) ซึ่งใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของชิ้นเนื้อลำไส้ส่วน Jejunum ในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาผลของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระในหนูต่อการแสดงออกของยีน *OCLN* พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิวไทป์ไปแล้ว 4 สัปดาห์ มีค่าการแสดงออกของยีน *OCLN* 1.107 (0.475) ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดีที่มีค่าการแสดงออกของยีน *OCLN* 1.119 (0.340) (Mann Whitney test: $p = 0.421$) (Figure 57A) แต่การศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของยีน *ZO-1* ในหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิวไทป์ไปแล้ว 4 สัปดาห์ มีค่าการแสดงออกของยีน *ZO-1* 0.573 (0.127) ต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากคนสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่มีค่าการแสดงออกของยีน *ZO-1* 1.093 (0.172) (Mann Whitney test: $p < 0.05$) (Figure 57B)

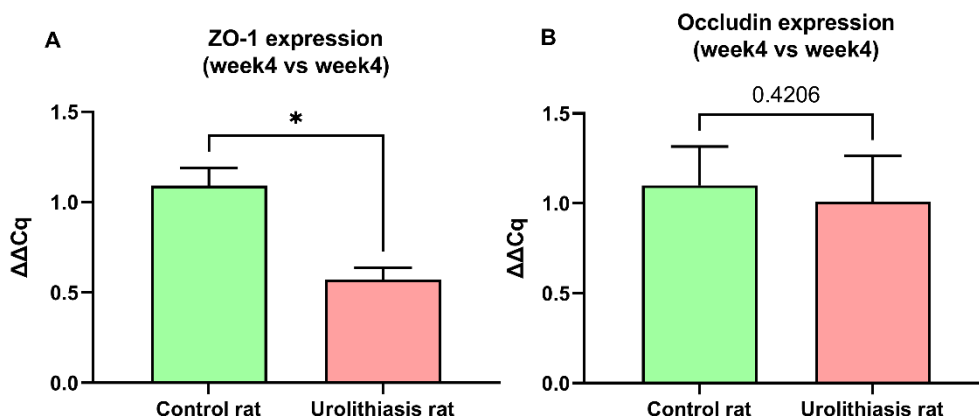


Figure 57 ผลการแสดงผลของยีน *OCN* และ *ZO1* ในลำไส้สัตว์ทดลอง

(โดย A: ผลการแสดงผลของยีน *OCN* ของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, B: ผลการแสดงผลของยีน *ZO-1* ของหนู Urolithiasis เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control สัปดาห์ที่ 4, *: $p < 0.05$)

จากผลการศึกษา พบว่าหนูกลุ่ม urolithiasis ไม่มีความแตกต่างของพยาธิสภาพที่ไตเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control หากแต่พบการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกตัวกลางการอักเสบ *NF-kB* นอกจากนี้ ยังพบพยาธิสภาพที่ลำไส้ โดยพบการแสดงออกของยีน *ZO-1* ที่เซลล์บุผนังลำไส้ลดลงเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

4.10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ

4.10.1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

หลังจากหนูทั้งสองกลุ่มได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ มีการตรวจค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในปัสสาวะ นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไต กับค่าพารามิเตอร์ในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง ได้ผลดังนี้

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระกับปริมาณออกซาลेटในปัสสาวะ ของหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ไตแล้ว 4 สัปดาห์ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซาลेटในปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้ไต กับจุลินทรีย์ชนิดใด (Figure 58)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระกับปริมาณแมกนีเซียมปัสสาวะ ของหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิวไตแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิวไต ไม่มีความสัมพันธ์ (Correlation) กับจุลินทรีย์ชนิดใด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาพบว่า จุลินทรีย์ genus *Methanospaera* มีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับปริมาณแมกนีเซียมโดยมีค่า R 0.900 แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติ (Spearman correlation: $p = 0.083$) (Figure 59)

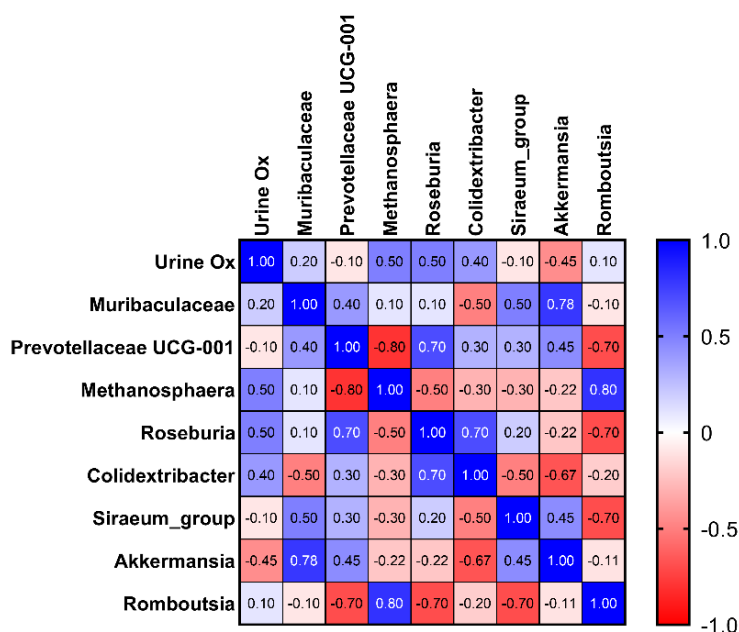


Figure 58 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง (การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติใช้ Spearman correlation ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดย Urine Ox: ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง)

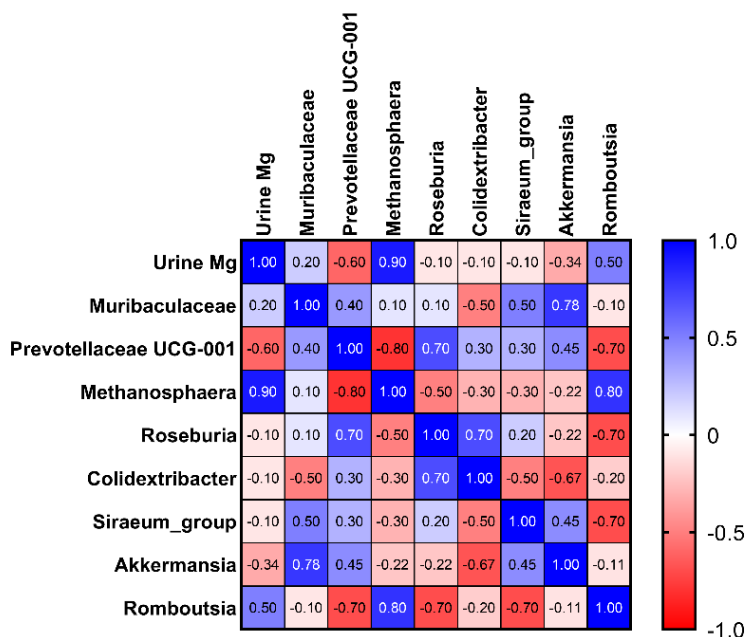


Figure 59 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับปริมาณ

แมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง

(การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติใช้ Spearman correlation ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดย Urine Mg: ปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง)

4.10.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในสัตว์ทดลอง

หลังจากหนูทั้งสองกลุ่มได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระแล้ว 4 สัปดาห์ มีการตรวจค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* หรือ oxalate transporter นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต กับค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง ได้ผลดังนี้

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของจุลินทรีย์ในอุจจาระกับค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ของหนูที่ได้รับจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต 4 สัปดาห์ พบว่า ค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้ของหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต ไม่พบความสัมพันธ์ (Correlation) กับจุลินทรีย์ชนิดใด (Figure 60)

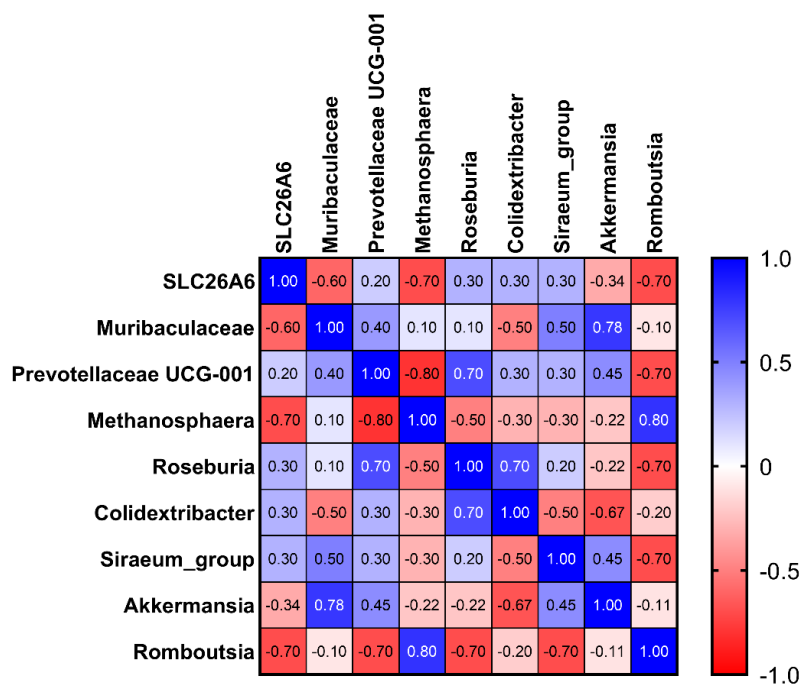


Figure 60 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง

(การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติใช้ Spearman correlation ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดย)

จากการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับปริมาณออกซาเลต และแมกนีเซียมในปัสสาวะของสัตว์ทดลอง รวมถึงไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระ กับค่าการแสดงออกของยีน *SLC26A6* ในลำไส้ของสัตว์ทดลองนี้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาปริมาณ electrolyte ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตชาวไทย ที่ได้รับการประเมินแล้วว่า เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต จำนวน 8 ราย เปรียบเทียบกับคนสุขภาพดีชาวไทย 10 ราย พบว่า ผู้ป่วยโรคไต มีภาวะซีเตรทในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) แคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) และ ออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ระบุว่าผู้ป่วยโรคไตชาวไทย มักมีภาวะแคลเซียม และออกซาเลตในปัสสาวะสูง ภาวะซีเตรทในปัสสาวะต่ำด้วย (2, 3) และพบว่าค่า Tiselius's urinary supersaturation index (Tiselius AP_{CaOx}) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต มีค่าสูงกว่าคนสุขภาพดีมาก ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ผู้ป่วยโรคไตกลุ่มนี้ ถึงแม้จะมีการผ่าตัดหรือสลายนิ่วไปแล้ว ก็ยังพบความผิดปกติของ electrolyte ในปัสสาวะ ซึ่งยังไม่ได้รับการแก้ไข และมีความเสี่ยงต่อการกลับมาเป็นนิ่วซ้ำได้สูงกว่าคนสุขภาพดี นอกจากนี้โรคประจำตัวที่พบได้แก่ โรคเบาหวาน มีภาวะ insulin resistance โดย insulin มี receptor ที่ renal tubular epithelium โดย insulin ที่ผลิตออกมามาก จะกระตุ้นการแสดงออกของ sodium – hydrogen (Na^+/H^+) exchanger ส่งผลให้มีการดูดกลับ H^+ เพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้แอมโมเนียที่มีอยู่ มีโอกาสจับกับ H^+ แล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียม ซึ่งทำให้ แอมโมเนียที่ lumen ลดลง ประกอบกับ H^+ เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ปัสสาวะมีความเป็นกรดมากขึ้น (88, 89) แต่เนื่องจากอาสาสมัครกลุ่มนี้ พบเพียง 1 รายที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานอาจไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ทางสถิติ โรคความดันโลหิตสูง มีรายงานพบว่า สัดส่วนโซเดียมและโพแทสเซียมในปัสสาวะ (Na/K) สูงขึ้น ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงชาวจีน (90) ซึ่งการดูดกลับซีเตรทที่ proximal tubular เกิดได้โดยอาศัย sodium-dependent dicarboxylate transporter ($NaDC-1$) พร้อมกับโซเดียม (43) ซึ่งอาจเป็นผลทางอ้อมทำให้การดูดกลับซีเตรทเพิ่มมากขึ้น เพื่อรักษาสมดุลของโซเดียมในร่างกาย

การศึกษาความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ ของผู้ป่วยโรคไตชาวไทย เปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี พบจำนวนประชากรจุลินทรีย์ phylum *Bacteroidota* ในผู้ป่วยโรคไตสูงกว่าคนสุขภาพดี นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในระดับ genus พบว่า ประชากรจุลินทรีย์ใน genus *Bifidobacterium*, *Oscillospiraceae* - *UCG002* และ *Escherichia* - *Shigella* ในผู้ป่วยโรคไตมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Stanford และคณะ

(62) ที่ศึกษาความแตกต่างของจุลินทรีย์ในลำไส้ของผู้ป่วยนิวไทด์ ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างจากคน สุขภาพดี โดยจำนวนประชากรจุลินทรีย์ phylum *Bacteroidota* มีจำนวนสูงกว่าคนสุขภาพดี และ พบอีกว่า *Bifidobacterium* มีจำนวนลดลงในผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhao และ คณะ (6) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ นำไปสู่การเกิดนิวไทด์ในคน พบว่า จุลินทรีย์ phylum *Bacteroidota* มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และงานวิจัยของ Stern และ คณะ (91) ที่ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ระหว่างผู้ป่วยนิวไทด์ และคนสุขภาพดีชาวจีน พบว่า phylum *Bacteroidota* มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง phylum *Bacteroidota* ที่มี จำนวนเพิ่มขึ้น อาจทำให้สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้เปลี่ยนไป จากรายงานพบว่า phylum *Bacteroidota* ประกอบได้ด้วยแบคทีเรียแกรมลบ มีความสามารถในการผลิต lipopolysaccharide (LPS) โดยโครงสร้างของ LPS มี lipid A ซึ่งมีคุณสมบัติในการ dissolve cell membranes นอกจากนี้ LPS สามารถจับกับ LPS binding protein (LPB) ซึ่ง LPS – LPB complex สามารถทำ ปฏิกริยากับ CD14 และส่งสัญญาณต่อไป กระตุ้นให้เกิดการสร้าง NF – kB เพิ่มขึ้นได้ (92) ซึ่งเป็น สารตัวกลางการอักเสบที่ได้ นอกจากนี้การบริโภคออกซาเลตสามารถเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ ในลำไส้ได้ (93) ซึ่งอาจเป็นเหตุให้ปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์สูงกว่าคนสุขภาพ ดีได้ ทั้งนี้ควรเพิ่มจำนวนอาสาสมัครเพื่อให้เห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

การศึกษาคความแตกต่างระหว่างประชากรจุลินทรีย์ในอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูก ถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ใน อุจจาระจากประชากรปกติ พบว่า หนูทั้งสองกลุ่ม เมื่อได้รับ FMT ไปแล้วเป็น 4 สัปดาห์ มีค่า Shannon entropy สูงขึ้น หมายความว่าหนูทั้งสองกลุ่มมี richness และ evenness เพิ่มมากขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลโดยตรงจากการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ เมื่อวิเคราะห์ในระดับ phylum พบ phylum *Euryarchaeota* มีการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ (relative abundance) ลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพ ดี แตกต่างจาก phylum *Desulfobacteria*, *Cyanobacteria* และ *Thermoplasmata* มี จำนวนเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์ เมื่อจำแนกตาม genus พบว่า genus *Muribaculaceae* มีการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จาก ผู้ป่วยโรคนี้ นิวไทด์ เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี

ยังไม่มีการศึกษาใด ที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่าง *Euryarchaeota* กับโรคนี้ นิวไทด์ หรือ สมดุลของแร่ธาตุและเกลือในปัสสาวะ และยังมีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง

Desulfobacteria, *Cyanobacteria* หรือ *Thermoplasmatota* กับ oxalate โดยตรงว่าสามารถย่อยสลาย oxalate ได้หรือไม่ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาบางรายงานระบุว่า *Cyanobacteria* อาจมีบทบาทในการเพิ่มปริมาณ oxalate ในระบบนิเวศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำทะเล (94) เมื่อจำแนกตาม genus พบว่า genus *Muribaculaceae* มีการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในหนูกุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิวไต เปรียบเทียบกับหนูกุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี ยังไม่มีการศึกษาที่ระบุความสัมพันธ์ของ *Muribaculaceae* กับโรคนิวไต หรือปริมาณออกซาเลตโดยตรง ซึ่ง genus *Muribaculaceae* จัดอยู่ใน phylum *Bacteroidota* ที่พบมากในผู้ป่วยนิวไตด้วย นอกจากนี้ยังพบ genus *Prevotellaceae* UCG-001, *Methanosphaera*, *Roseburia*, *Colidextribacter* และ *Siraenum group* มีการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในหนูกุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิวไต ต่ำกว่าหนูกุ่มที่ได้รับ FMT จากคนสุขภาพดี ซึ่งมีรายงานว่า genus *Roseburia* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ สามารถผลิต butyrate ได้ และพบได้ทั่วไปในคนสุขภาพดี แต่จะพบน้อยลงในผู้ป่วยโรคนิวไต (62, 95) เมื่อพิจารณา genus ที่มีรายงานพบมากในผู้ป่วยโรคนิวไต เช่น genus *Bacteroides* ซึ่งก็พบว่าในหนูกุ่มที่ได้รับ FMT จากผู้ป่วยโรคนิวไต มีการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ genus นี้ สูงขึ้นหนูกุ่ม Control เช่นกัน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

จากการศึกษานี้ พบว่า ผู้ป่วยโรคนิวไตมีความไม่สมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ คือ มีการเพิ่มขึ้นของ *Bacteroidota* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ และมีแนวโน้มการลดลงของเชื้อ *Bifidobacterium* ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ เมื่อทำการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระไปยังหนูทดลอง พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิวไตมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อในกลุ่ม *Bacteroidota* ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *Muribaculaceae*, *Desulfobacteria*, *Cyanobacteria* และ *Thermoplasmatota* ซึ่งยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนิวไต นอกจากนี้ ยังพบระดับความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของหนูที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคไตลดลง รวมถึงการลดลงของเชื้อในกลุ่ม *Euryarchaeota* เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับจุลินทรีย์จากประชากรปกติ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้า มีเพียงรายงานสนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ *Cyanobacteria* กับการเพิ่มขึ้นของออกซาเลตในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น

การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับ electrolyte ในปัสสาวะในช่วงก่อนและหลังการให้ยาปฏิชีวนะ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นจากการให้ยาปฏิชีวนะ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นจากการให้ยาปฏิชีวนะ จากการศึกษานี้ พบว่า อัตราการขับออกซาเลตใน

ปัสสาวะที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากประชากรปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างในหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้วไต แต่หลังได้รับยาปฏิชีวนะมีระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นในหนูกลุ่มทั้งสองกลุ่ม เมื่อเทียบกับก่อนได้รับยาปฏิชีวนะ แม้ไม่มีนัยสำคัญ ผู้วิจัยเชื่อว่าเป็นผลมาจากการเจริญของไต โดยหนูก่อนได้รับยาปฏิชีวนะมีอายุน้อย ไตอาจยังไม่เจริญเต็มที่ ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดกลับแมกนีเซียมทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อหนูมีอายุมากขึ้น ไตทำงานได้ดี สามารถดูดกลับแมกนีเซียมได้เป็นปกติ

เป็นที่น่าสังเกตว่า มีรายงานภาวะแมกนีเซียมในปัสสาวะสูงจากการได้รับ vancomycin ผลที่เกิดขึ้นจากการให้ยาปฏิชีวนะอาจเป็นผลทางตรง อาทิ ยามีผลขัดขวางหรือส่งเสริมการดูดซึมของ electrolyte จากลำไส้เข้าสู่ร่างกาย หรือก่อให้เกิดการอักเสบที่ไต ทำให้ไตสามารถขับ electrolyte ลดลงหรือเพิ่มขึ้น (96) ซึ่งภาวะนี้หายได้เองเมื่อหยุดยาในกลุ่มหนูทดลอง

เมื่อนำผลการตรวจ electrolyte ในปัสสาวะ มาคำนวณหาความเสี่ยงของการเกิดนิ่ว ใช้ค่าดัชนีภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ Tiselius' urinary supersaturation index ในช่วงหลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ ค่า Tiselius AP_{CaOx} เพิ่มขึ้นในหนูทั้งสองกลุ่มเมื่อเทียบกับช่วงก่อนได้รับยาปฏิชีวนะ เนื่องจากในช่วงหลังได้รับยาปฏิชีวนะ หนูมีอายุน้อย ทำให้การทำงานของไตยังไม่ดีนัก และอาจได้รับผลกระทบจากยา จึงทำให้มีสัดส่วน electrolyte ในปัสสาวะ ประกอบด้วยสารก่อนิ่วต่อสารยับยั้งนิ่วมาก เมื่ออายุเพิ่มขึ้นทำให้ไตทำงานได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ผล Tiselius AP_{CaOx} ลดลงหลังจากได้รับ FMT แต่เมื่อเปรียบเทียบความเสี่ยงของการเกิดนิ่ว พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนี้วไต มีความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้วแคลเซียมออกซาเลตมากกว่าหนูกลุ่ม Control สังเกตได้จากค่า Tiselius AP_{CaOx} ที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมาจากปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะหรือสารก่อนิ่วสูงขึ้น และปริมาณแมกนีเซียมในปัสสาวะ หรือสารยับยั้งนิ่วลดลง

การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับ electrolyte ในปัสสาวะในช่วงก่อนและหลังการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระแก่หนูแต่ละกลุ่ม กระทำเพื่อวิเคราะห์ผลจากการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งอาจเป็นผลโดยตรงจากเชื้อจุลินทรีย์ อาทิ เชื้อจุลินทรีย์มีผลช่วยเพิ่มหรือลดการดูดซึมของ electrolyte ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อในกลุ่มที่สามารถย่อยออกซาเลต (oxalate degrading bacteria) จะย่อยสลายออกซาเลตในลำไส้ ทำให้ออกซาเลตในลำไส้ลดลง และถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยลง นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ การส่งเสริมความแข็งแรงของ intestinal epithelial tight junction หรือ gut

barrier integrity การสร้างกรดไขมันสายสั้น การเปลี่ยน pH ของสิ่งแวดล้อมในลำไส้ทำให้ electrolyte แยกตัวเป็นประจุและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น เป็นต้น รวมถึงการลดลงของเชื้อก่อโรค ทำให้ลดการสร้างสารอักเสบ ลดการรั่วที่เกิดขึ้นที่เยื่ออุทิวลาไส้ เป็นต้น

อย่างไรก็ดี ปัจจัยอื่น ๆ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับระดับ electrolyte ในปัสสาวะได้ อาทิ อายุของหนู การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคทั้งจากอุจจาระของอาสาสมัคร หรือจากความผิดพลาดในการเตรียมสาร หรือผลข้างเคียงจากยาหรือสารเคมีอื่นที่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อ ดังนั้น การแปรผลจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง

นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ในปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อจากผู้ป่วยโรคนิวไต สูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากประชากรปกติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาผลของการปลูกถ่ายอุจจาระจากหนู Zucker ไปยังหนู germ-free พบว่า ก่อนให้ FMT หนู germ-free ที่ไม่มีจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut dysbiosis) มีปริมาณแอมโมเนียสูง ทำให้ pH ในปัสสาวะเป็นเบสมากเมื่อได้รับ FMT จากหนู Zucker แล้ว ค่า pH จึงกลับมาปกติ (8) แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่ได้ออกแบบมาเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในเลือดและปัสสาวะ แต่การที่ pH ในปัสสาวะเปลี่ยนแปลงเป็นเบส กลับเพิ่มโอกาสการเกิดนิ่ว ซึ่งมีรายงาน พบว่าปัสสาวะที่มี pH เป็นเบสจะนำไปสู่การเกิดนิ่วออกซาเลต (15) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Manissorn และคณะ (19) ที่พบว่า หาก pH ในปัสสาวะเพิ่มขึ้นอยู่ในระดับที่เป็นเบส (pH 8.0) จะส่งเสริมให้เกิดการตกผลึกของ CaOx dihydrate หรือ Weddellite ที่พบได้ในนิ่วที่มีองค์ประกอบเป็นแคลเซียมออกซาเลต

อย่างไรก็ตาม อัตราการขับออกซาเลตในปัสสาวะ สัปดาห์ที่ 4 ของหนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิวไต มีอัตราการขับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มเดียวกันในสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งไม่พบการเพิ่มขึ้นของออกซาเลตในปัสสาวะในหนูกลุ่ม control นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการขับออกซาเลตในหนูกลุ่ม urolithiasis มีแนวโน้มสูงกว่าในหนูกลุ่ม control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

การตรวจวัดปริมาณออกซาเลตในอุจจาระของหนูทั้งสองกลุ่ม ซึ่งเป็นช่องทางหลักในการกำจัดออกซาเลตในร่างกาย พบว่า หลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ไปแล้ว 4 สัปดาห์ ปริมาณออกซาเลตในอุจจาระของหนูทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิวไต มีแนวโน้มของการแสดงออกของยีน SLC26A6 ที่ลำไส้เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของหนูกลุ่ม urolithiasis ซึ่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกของ SLC26A6 (oxalate transporter) การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน oxalate transporter อาจเป็น

อีกปัจจัยที่เพิ่มการดูดซึมออกซาเลตจากลำไส้เข้าสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาใด แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลง gut microbiota ต่อการแสดงของของ oxalate transporter

อีกทั้งหนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีการแสดงออกของยีน *Zonula occluden-1* หรือ *ZO-1* ซึ่งเป็นโปรตีนในกุ่ม transmembrane proteins ต่ำกว่าหนูกุ่ม control ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่งผลต่อความคงตัวของ tight junction (97-99) เมื่อพิจารณาจากการทดลองพบว่า หนูกุ่มที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของออกซาเลตในซีรัม แต่ไม่มีหลักฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้เพิ่ม endogenous oxalate synthesis ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก exogenous เป็นการดูดซึมออกซาเลตที่ลำไส้เพิ่ม สอดคล้องกับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ genus *Roseburia* ที่มีจำนวนลดลงในหนูกุ่ม urolithiasis ซึ่งมีรายงานว่า genus *Roseburia* สามารถย่อยสลายออกซาเลต และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ (93, 100, 101) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Oxalobacter* spp. ในกุ่มตัวอย่างทั้งหมด ประกอบกับมีการแสดงออกของ oxalate transporter มากขึ้น และเกิดการรั่วของ paracellular (*ZO-1*) ส่งผลให้มีปริมาณออกซาเลตในเลือดสูงขึ้นได้ จึงขับออกทางปัสสาวะ ถึงแม้จะมีการดูดซึมออกซาเลตที่ลำไส้เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณออกซาเลตที่ดูดซึม ไม่ทำให้ปริมาณออกซาเลตในลำไส้เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งเห็นความแตกต่างทางสถิติของหนูกุ่มทั้งสองกุ่มอย่างชัดเจน

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของการอักเสบของเนื้อไต หลังจากได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระแก่หนูแต่ละกุ่ม พบว่า หนูกุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จากผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีแนวโน้มที่อาจจะมีการอักเสบเกิดขึ้นที่ไต เนื่องจากพบแนวโน้มการแสดงออกของยีน *NF- κ B* ในเนื้อไตเพิ่มสูงขึ้นกว่าหนูกุ่มที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากประชากรปกติ สอดคล้องกับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับภาวะ hyperoxaluria ในหนู พบว่าเกิดการอักเสบที่ไตมากกว่าหนูกุ่มควบคุม (24) นอกจากนี้ยังมีรายงานในผู้ป่วยที่มีภาวะ nephropathy มีสาเหตุมาจากปริมาณออกซาเลตที่เพิ่มสูงขึ้น ประกอบกับไม่พบว่ามี การ colonized ของ *O. formigenes* ซึ่งออกซาเลตที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดความเป็นพิษผ่านการกระตุ้นการทำงานของ phospholipase A2 ส่งผลให้มีการสร้าง lysophospholipid อีกหลายชนิด รวมทั้ง arachidonic acid ซึ่งท้ายที่สุด เกิดการสร้าง reactive oxygen and nitrogen species (RONS) ซึ่งส่งผลให้ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย (dysfunction) และเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่กระตุ้นเอนไซม์ caspase จนเกิด apoptosis ได้ (102) ซึ่งการที่ปัสสาวะมี

อัตราการขับออกขาลेतสูง มีความผิดปกติปรากฏให้เห็นแล้ว ถึงแม้ว่าผลทางพยาธิสภาพของไตจะไม่แตกต่างกันก็ตาม หากเพิ่มระยะเวลาการทดลองให้นานขึ้น อาจทำให้เห็นถึงความแตกต่างนี้ได้

กล่าวโดยสรุป การศึกษาผลกระทบของการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ต่อการเกิดโรคนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในทางเดินปัสสาวะของหนู พบว่า การเปลี่ยนแปลงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut dysbiosis) ส่งผลให้มีการอักเสบ ผ่านทางสารตัวกลางอย่าง NF - kB จึงลดการแสดงออกของยีน ZO-1 ทำให้ tight junction รั่ว และเพิ่มการแสดงออกของ oxalate transporter ส่งผลให้มีการดูดซึมออกซาเลตที่ลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น แล้วขับออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นจากภาวะ hyperoxaluria ประกอบกับมีการดูดกลับแมกนีเซียมที่ลำไส้ลดลง ทำให้ระดับแมกนีเซียมในเลือดลดลง จึงขับออกทางปัสสาวะลดลง อีกทั้งปัสสาวะมีความเป็นเบสมากขึ้น จึงเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่ว โดยพิสูจน์จาก Tiselius' urinary supersaturation index ในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต

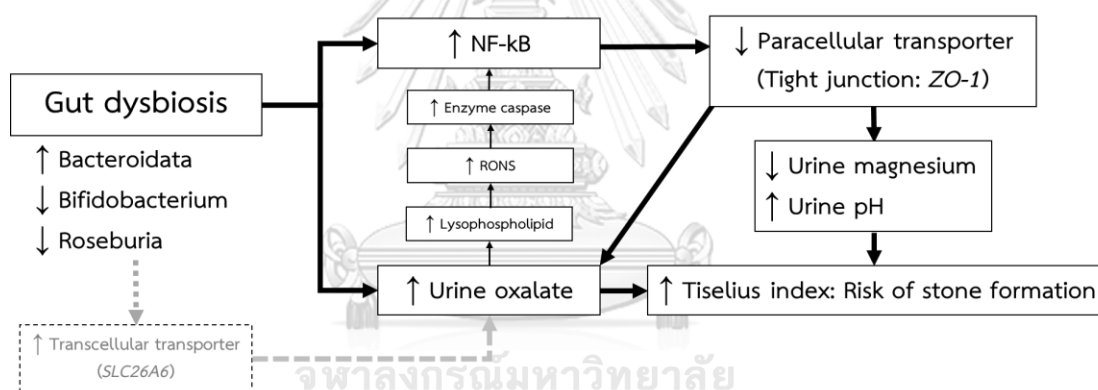


Figure 61 สรุปผลการวิจัย

(โดย NF - kB: NFKB1 nuclear factor kappa B subunit 1, RONS: Reactive oxygen and nitrogen species)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol.* 1997;4(6):537-40.
2. Tosukhowong P, Borvonpadungkitti S, Prasongwatana V, Tungsanga K, Jutuporn S, Dissayabutr T, et al. Urinary citrate excretion in patients with renal stone: roles of leucocyte ATP citrate lyase activity and potassium salts therapy. *Clin Chim Acta.* 2002;325(1-2):71-8.
3. Dissayabutra T, Kalponkul N, Rattanaphan J, Boonla C, Srisa-Art M, Ungjaroenwathana W, et al. Urinary stone risk factors in the descendants of patients with kidney stone disease. *Pediatr Nephrol.* 2018;33(7):1173-81.
4. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: Update 2007. *Asian Biomed.* 2007;1.
5. Eisner BH, Goldfarb DS. A nomogram for the prediction of kidney stone recurrence. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(12):2685-7.
6. Zhao E, Zhang W, Geng B, You B, Wang W, Li X. Intestinal dysbacteriosis leads to kidney stone disease. *Mol Med Rep.* 2021;23(3).
7. Tavasoli S, Alebouyeh M, Najji M, Shakiba majd G, Shabani Nashtaei M, Broumandnia N, et al. Association of intestinal oxalate-degrading bacteria with recurrent calcium kidney stone formation and hyperoxaluria: a case-control study. *BJU International.* 2020;125(1):133-43.
8. Stern JM, Urban-Maldonado M, Usyk M, Granja I, Schoenfeld D, Davies KP, et al. Fecal transplant modifies urine chemistry risk factors for urinary stone disease. *Physiol Rep.* 2019;7(4):e14012.
9. Liu Y, Jin X, Ma Y, Jian Z, Wei Z, Xiang L, et al. Short-Chain Fatty Acids Reduced Renal Calcium Oxalate Stones by Regulating the Expression of Intestinal Oxalate Transporter SLC26A6. *mSystems.* 2021;6(6):e0104521.
10. Liu Yu CY, Liao Banghua, Luo Deyi, Wang Kunjie, Li Hong, Zeng Guohua. Epidemiology of urolithiasis in Asia. *Asian Journal of Urology.* 2018;5(4):205-14.

11. Eisner BH, Goldfarb DS. A Nomogram for the Prediction of Kidney Stone Recurrence. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(12):2685-7.
12. Tosukhowong P, YC, Sasivongsbhakdi T., Boonla C., Tungsanga K. Nephrolithiasis: Pathophysiology, therapeutic approach and health promotion. *CHULA MED J*. 2006;50.
13. Bose A, Monk RD, Bushinsky DA. Chapter 30 - Kidney Stones. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 1365-84.
14. Ye Z, Zeng G, Yang H, Li J, Tang K, Wang G, et al. The status and characteristics of urinary stone composition in China. *BJU Int*. 2020;125(6):801-9.
15. Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Deng Q, Liang H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (Review). *Int J Mol Med*. 2021;48(2).
16. Voss S, Hesse A, Zimmermann DJ, Sauerbruch T, von Unruh GE. Intestinal oxalate absorption is higher in idiopathic calcium oxalate stone formers than in healthy controls: measurements with the ^{13}C oxalate absorption test. *J Urol*. 2006;175(5):1711-5.
17. Ha YS, Tchey DU, Kang HW, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, et al. Phosphaturia as a promising predictor of recurrent stone formation in patients with urolithiasis. *Korean J Urol*. 2010;51(1):54-9.
18. Ketha H, Singh RJ, Grebe SK, Bergstralh EJ, Rule AD, Lieske JC, et al. Altered Calcium and Vitamin D Homeostasis in First-Time Calcium Kidney Stone-Formers. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0137350.
19. Manissorn J, Fong-Ngern K, Peerapen P, Thongboonkerd V. Systematic evaluation for effects of urine pH on calcium oxalate crystallization, crystal-cell adhesion and internalization into renal tubular cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1798.
20. Kim D, Rimer JD, Asplin JR. Hydroxycitrate: a potential new therapy for calcium urolithiasis. *Urolithiasis*. 2019;47(4):311-20.
21. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int*. 2013;2013:292953.
22. Kirkali Z, Rasooly R, Star RA, Rodgers GP. Urinary Stone Disease: Progress, Status, and Needs. *Urology*. 2015;86(4):651-3.

23. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res.* 2005;33(1):65-9.
24. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol.* 1998;11 Suppl 1:66-9.
25. Wu Y, Zhang J, Li C, Hu H, Qin B, Wang T, et al. The Activation of ROS/NF- κ B/MMP-9 Pathway Promotes Calcium-Induced Kidney Crystal Deposition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021;2021:8836355.
26. Tozawa K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, et al. NF- κ B activation in renal tubular epithelial cells by oxalate stimulation. *International Journal of Urology.* 2008;15(10):924-8.
27. Botelho J, Machado V, Proença L, Delgado AS, Mendes JJ. Vitamin D Deficiency and Oral Health: A Comprehensive Review. *Nutrients.* 2020;12(5).
28. Girón-Prieto MS, Del Carmen Cano-García M, Arrabal-Polo M, Poyatos-Andujar A, Quesada-Charneco M, de Haro-Muñoz T, et al. Analysis of vitamin D deficiency in calcium stone-forming patients. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(8):1243-6.
29. Vitale C, Marangella M, Bermond F, Fabbrini L, Tricerri A. Metabolic effects of cholecalciferol supplementation in patients with calcium nephrolithiasis and vitamin D deficiency. *World J Urol.* 2021;39(2):597-603.
30. Wu KCJ, Anpalahan M. Normocalcaemic Primary Hyperparathyroidism: Is nephrolithiasis more common than osteoporosis? *Intern Med J.* 2021.
31. Favus MJ, Zeytinoglu M, Coe FL. Chapter 81 - Idiopathic Hypercalciuria and Nephrolithiasis. In: Feldman D, editor. *Vitamin D (Fourth Edition)*: Academic Press; 2018. p. 485-505.
32. Abdel-Halim RE. Urolithiasis in adults. Clinical and biochemical aspects. *Saudi Med J.* 2005;26(5):705-13.
33. Ermer T, Eckardt KU, Aronson PS, Knauf F. Oxalate, inflammasome, and progression of kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016;25(4):363-71.
34. Moya-Garzon MD, Gomez-Vidal JA, Alejo-Armijo A, Altarejos J, Rodriguez-Madoz

JR, Fernandes MX, et al. Small Molecule-Based Enzyme Inhibitors in the Treatment of Primary Hyperoxalurias. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(2):74.

35. Lange D. Dietary habits may influence oxalate degradation by intestinal bacteria commentary on: the role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease. *Urology*. 2014;84(6):1263-4.

36. Turroni S, Bendazzoli C, Dipalo SC, Candela M, Vitali B, Gotti R, et al. Oxalate-degrading activity in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*: impact of acidic conditions on the transcriptional levels of the oxalyl coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(16):5609-20.

37. Turroni S, Vitali B, Bendazzoli C, Candela M, Gotti R, Federici F, et al. Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol*. 2007;103(5):1600-9.

38. Ye ZQ, Kong DB, Chen ZQ, Yao LF, Guo H, Yu X, et al. Stable expression of the *oxc* and *frc* genes from *Oxalobacter formigenes* in human embryo kidney 293 cells: implications for gene therapy of hyperoxaluria. *Int J Mol Med*. 2007;20(4):521-6.

39. Federici F, Vitali B, Gotti R, Pasca MR, Gobbi S, Peck AB, et al. Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(9):5066-73.

40. Kullin B, Tannock GW, Loach DM, Kimura K, Abratt VR, Reid SJ. A functional analysis of the formyl-coenzyme A (*frc*) gene from *Lactobacillus reuteri* 100-23C. *J Appl Microbiol*. 2014;116(6):1657-67.

41. Krebs HA, Johnson WA. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett*. 1980;117 Suppl:K1-10.

42. Brennan S, Hering-Smith K, Hamm LL. Effect of pH on citrate reabsorption in the proximal convoluted tubule. *Am J Physiol*. 1988;255(2 Pt 2):F301-6.

43. Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol*. 2009;11(3):134-44.

44. Chuaypen N, Boonla C, Dissayabuttra T, Predanon C, Ruangvejvorachai P, Waiwijit U, et al. Increased intrarenal expression of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 in nephrolithiasis patients with acidic urine pH. *Asian biomedicine*. 2013;7:571-7.

45. Tiselius H-G, Ribeiro Nogueira Ferraz R, Pfeferman Heilberg I. An approximate

- estimate of the ion-activity product of calcium oxalate in rat urine. *Urological Research*. 2003;31(6):410-3.
46. Rodriguez A, Saez-Torres C, Mir C, Casasayas P, Rodriguez N, Rodrigo D, et al. Effect of sample time on urinary lithogenic risk indexes in healthy and stone-forming adults and children. *BMC Urology*. 2018;18(1):116.
47. Espinosa-Ortiz EJ, Eisner BH, Lange D, Gerlach R. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. *Nature Reviews Urology*. 2019;16(1):35-53.
48. Hesse A. Urinary Stones. In: Lang F, editor. *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 2144-7.
49. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016;17(9):564-80.
50. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:283-309.
51. Rekha MR, Sharma CP. Chapter 8 - Nanoparticle Mediated Oral Delivery of Peptides and Proteins: Challenges and Perspectives. In: Van Der Walle C, editor. *Peptide and Protein Delivery*. Boston: Academic Press; 2011. p. 165-94.
52. Meijers B, Farré R, Dejongh S, Vicario M, Evenepoel P. Intestinal Barrier Function in Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2018;10:298.
53. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(10):805-17.
54. Ho NFH, Day JS, Barsuhn CL, Burton PS, Raub TJ. Biophysical model approaches to mechanistic transepithelial studies of peptides. *Journal of Controlled Release*. 1990;11(1):3-24.
55. Yu L, Gan X, Liu X, An R. Calcium oxalate crystals induces tight junction disruption in distal renal tubular epithelial cells by activating ROS/Akt/p38 MAPK signaling pathway. *Ren Fail*. 2017;39(1):440-51.
56. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
57. Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Gonzalez-Parra

- E, Sanz AB, et al. Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2017;9(5).
58. Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, Minich JJ, Tripathi A, Brenner DA, et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):218-30.
59. Taylor EN, Curhan GC. Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(7):2198-204.
60. Zabłocka A, Janusz M. [The two faces of reactive oxygen species]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008;62:118-24.
61. Ticinesi A, Milani C, Guerra A, Allegri F, Lauretani F, Nouvenne A, et al. Understanding the gut-kidney axis in nephrolithiasis: an analysis of the gut microbiota composition and functionality of stone formers. *Gut*. 2018;67(12):2097-106.
62. Stanford J, Charlton K, Stefoska-Needham A, Ibrahim R, Lambert K. The gut microbiota profile of adults with kidney disease and kidney stones: a systematic review of the literature. *BMC Nephrol*. 2020;21(1):215.
63. Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52(6):2141-6.
64. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1449-58.
65. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA, et al. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(12):1044-9.
66. Smits LP, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology*. 2013;145(5):946-53.
67. Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol*. 2012;107(11):1755; author reply p.-6.
68. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, et al. Long-term

follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(7):1079-87.

69. Canada H. Guidance Document: Fecal Microbiota Therapy Used in the Treatment of *Clostridium difficile* Infections. Ottawa 2015.

70. FDA. Draft Guidance for Industry: Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies. Silver Spring: MD: US Food and Drug Administration; 2014.

71. Bokoliya SC, Dorsett Y, Panier H, Zhou Y. Procedures for Fecal Microbiota Transplantation in Murine Microbiome Studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2021;11:711055.

72. Khan I, Azhar EI, Abbas AT, Kumosani T, Barbour EK, Raoult D, et al. Metagenomic Analysis of Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota in a Pregnant Rat Model. *Front Pharmacol.* 2016;7:104.

73. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(5):761-7.

74. Ma S, Wang N, Zhang P, Wu W, Fu L. Fecal microbiota transplantation mitigates bone loss by improving gut microbiome composition and gut barrier function in aged rats. *PeerJ.* 2021;9:e12293.

75. Schmidt EKA, Torres-Espin A, Raposo PJF, Madsen KL, Kigerl KA, Popovich PG, et al. Fecal transplant prevents gut dysbiosis and anxiety-like behaviour after spinal cord injury in rats. *PLoS One.* 2020;15(1):e0226128.

76. Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG. Dietary oxalate and its intestinal absorption. *Scanning Microsc.* 1995;9(4):1109-18; discussion 18-20.

77. Prokopovich S, Knight J, Assimos DG, Holmes RP. Variability of *Oxalobacter formigenes* and oxalate in stool samples. *J Urol.* 2007;178(5):2186-90.

78. Khammar N, Martin G, Ferro K, Job D, Aragno M, Verrecchia E. Use of the *frc* gene as a molecular marker to characterize oxalate-oxidizing bacterial abundance and diversity structure in soil. *J Microbiol Methods.* 2009;76(2):120-7.

79. Li H, Wu Q, Xu L, Li X, Duan J, Zhan J, et al. Increased oxidative stress and

- disrupted small intestinal tight junctions in cigarette smoke-exposed rats. *Mol Med Rep.* 2015;11(6):4639-44.
80. Miri S, Rasooli A, Brar SK. Data on changes of NF- κ B gene expression in liver and lungs as a biomarker and hepatic injury in CLP-induced septic rats. *Data Brief.* 2019;25:104117.
81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
82. 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.* 2005;12(3):290-8.
83. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(7):2686-93.
84. Kemp PF, Aller JY. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography: Methods.* 2004;2(4):114-25.
85. Ortiz-Burgos S. Shannon-Weaver Diversity Index. In: Kennish MJ, editor. *Encyclopedia of Estuaries.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 572-3.
86. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs.* 1957;27(4):325-49.
87. Jaccard P. THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE.1. *New Phytologist.* 1912;11(2):37-50.
88. Fuster DG, Bobulescu IA, Zhang J, Wade J, Moe OW. Characterization of the regulation of renal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by insulin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F577-85.
89. Li H, Klett DE, Littleton R, Elder JS, Sammon JD. Role of insulin resistance in uric acid nephrolithiasis. *World J Nephrol.* 2014;3(4):237-42.
90. Sun N, Jiang Y, Wang H, Yuan Y, Cheng W, Han Q, et al. Survey on sodium and potassium intake in patients with hypertension in China. *The Journal of Clinical Hypertension.* 2021;23(11):1957-64.
91. Stern JM, Moazami S, Qiu Y, Kurland I, Chen Z, Agalliu I, et al. Evidence for a

- distinct gut microbiome in kidney stone formers compared to non-stone formers. *Urolithiasis*. 2016;44(5):399-407.
92. Di Pierro F. Gut Microbiota Parameters Potentially Useful in Clinical Perspective. *Microorganisms*. 2021;9(11).
93. Ticinesi A, Nouvenne A, Chiussi G, Castaldo G, Guerra A, Meschi T. Calcium Oxalate Nephrolithiasis and Gut Microbiota: Not just a Gut-Kidney Axis. A Nutritional Perspective. *Nutrients*. 2020;12(2).
94. Wei C-L, Rowe GT, Nunnally CC, Wicksten MK. Anthropogenic "Litter" and macrophyte detritus in the deep Northern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 2012;64(5):966-73.
95. Galán-Llopis JA, Sánchez-Pellicer P, Navarro-López V. Role of microbiome in kidney stone disease. *Current Opinion in Urology*. 2023;33(2):84-9.
96. Patel JB SA. *Nephrotoxic Medications*. 12 UJ, editor. Treasure Island (FL): Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
97. Stolfi C, Maresca C, Monteleone G, Laudisi F. Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases. *Biomedicines*. 2022;10(2).
98. Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, Jala VR. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2021;11(5):1463-82.
99. Panwar S, Sharma S, Tripathi P. Role of Barrier Integrity and Dysfunctions in Maintaining the Healthy Gut and Their Health Outcomes. *Frontiers in Physiology*. 2021;12.
100. Lewanika TR, Reid SJ, Abratt VR, Macfarlane GT, Macfarlane S. *Lactobacillus gasser* Gasser AM63T degrades oxalate in a multistage continuous culture simulator of the human colonic microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007;61(1):110-20.
101. Suryavanshi MV, Bhute SS, Jadhav SD, Bhatia MS, Gune RP, Shouche YS. Hyperoxaluria leads to dysbiosis and drives selective enrichment of oxalate metabolizing bacterial species in recurrent kidney stone endures. *Sci Rep*. 2016;6:34712.
102. Shruti G, Kanwar S. Intestinal Dysbiosis Induced Chronic Inflammation that Risk up Oxalate Nephropathy. 2022.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Sittiphong Hunthai
วัน เดือน ปี เกิด	28 July 1997
สถานที่เกิด	Nakhon Ratchasima
วุฒิการศึกษา	Bachelor of Science (Biotechnology) (Second Class Honors), King Mongkut's University of Technology North Bangkok
ผลงานตีพิมพ์	The paper entitled "Gut dysbiosis increases the risks of calcium oxalate urinary stone formation in rats with fecal microbiota transplant from urolithiasis patients" has been published as a full paper in the conference proceedings of the Nontri Conference on Innovation and Technology for Sustainable Society 10th (KU).
รางวัลที่ได้รับ	Best oral presentation award for the oral "Gut dysbiosis increases the risks of calcium oxalate urinary stone formation in rats with fecal microbiota transplant from urolithiasis patients" at Nontri Conference on Innovation and Technology for Sustainable Society 10th (KU), 26 November 2022