

การแสดงผลของยีนมิวซินในผู้ป่วยโรคนี้ว่าได้



นางสาวชนิษฐา พูนภิรมย์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUCIN GENE EXPRESSION IN NEPHROLITHIASIS



Miss Kanitta Poonpirome

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University


Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491572

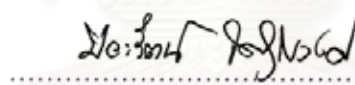
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนมิวซินในผู้ป่วยโรคนี้่วไต
โดย	นางสาวชนิษฐา พูนภิรมย์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียง ตั้งสง่า)

สถาบันแพทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิษฐา พูนภิรมย์ : การแสดงออกของยีนมิวซินในผู้ป่วยโรคนิ่วไต. (MUCIN GENE EXPRESSION IN NEPHROLITHIASIS) อ.ที่ปรึกษา: ศ.ปิยะรัตน์ ไตรสุโขวงศ์, อ.ที่ปรึกษา ร่วม: ดร.ชาญชัย บุญหล้า 89 หน้า.

มิวซิน เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ โครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่เป็น O-glycan ในปัจจุบันพบมิวซิน 19 ชนิด มีรายงานในนิ่วถุงน้ำดีและนิ่วในตับพบว่า มิวซินจะมีปริมาณมากขึ้น และส่งเสริมการเกิดก้อนนิ่ว โดยในขณะนี้หน้าที่และการแสดงออกของมิวซินต่อการเกิดนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังไม่มีการศึกษา รายงานนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และศึกษาบทบาทของมิวซินในปัสสาวะต่อการเกิดการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลาเลต ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ทำการศึกษามีจำนวนทั้งหมด 31 ราย โดยจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เนื้อเยื่อไตของกลุ่มควบคุม ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไตออก โดยทำการเก็บเนื้อเยื่อไตในส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและส่วนที่เป็นมะเร็ง มีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจากผู้มีสุขภาพดีจำนวน 31 ราย โดยทำการวัดการแสดงออกของ mRNA ของ MUC1 และ MUC2 โดยวิธี RT-PCR การหาปริมาณ 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งถือว่าเป็นสารบ่งชี้ของการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต การวิเคราะห์ปริมาณของครีเอตินีน ออกซาลาเลต ซิเทรต และ 8-OHdG ในปัสสาวะ ทำการสกัดมิวซินในปัสสาวะเพื่อหาปริมาณของมิวซินโดยวิธี CL-2B gel filtration ทำการย้อม MUC1 หากให้ผลเป็นบวกจะเทรวมกัน ซึ่งจะทำได้กลุ่ม fraction ที่ 27-43 จากปัสสาวะของผู้มีสุขภาพดี (HP1) fraction ที่ 5-17 จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1) และ fraction ที่ 24-40 จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP2) มาทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึก จากการศึกษาทั้งหมดพบว่า MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตให้ผลบวกทุกราย ในขณะที่การแสดงออกของ MUC2 ให้ผลบวกเพียง 64.52% (20 รายจาก 31 ราย) การแสดงออกของ MUC1 มีแนวโน้มสูงกว่าการแสดงออกของ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของกลุ่มควบคุม ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG กับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวัดการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาลาเลต พบว่า NLP1 มีค่าการเกาะกลุ่มสูงกว่า HP1 และ NP2 อย่างมีนัยสำคัญ และพบปริมาณของกรดเซียวิกใน NP1 มีปริมาณต่ำกว่า HP1 และ NLP2 จากผลการวิเคราะห์ MUC1 มีแนวโน้มแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต NLP1 มีขนาดใหญ่กว่าและมีปริมาณกรดเซียวิกต่ำ ซึ่งจะกระตุ้นการเกาะกลุ่มชนิดแคลเซียมออกซาลาเลต การศึกษานี้พบว่ามิวซินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะมีขนาดใหญ่และประจุลบน้อย ซึ่งทำให้มีผลส่งเสริมต่อการโตขึ้นของก้อนนิ่ว

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิตร..... พญ. ชาญชัย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Piyaratana Tosukorony
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

74709430 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEY WORD: NEPHROLITHIASIS/ GENE EXPRESSION/ MUC1/MUC2/ OXIDATIVE STRESS/ STONE FORMATION

KANITTA POONPIROME: MUCIN GENE EXPRESSION IN NEPHROLITHIASIS. THESIS.
THESIS ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, THESIS COADVISOR:
CHANCHAI BOONLA, Ph.D., 89 pp.

Mucin (MUC) is a large molecular weight glycoprotein containing numerous O-linked glycans. To date, 19 human mucin genes have been identified. In gallstone and hepatolithiasis, mucins are up-regulated and their role in lithogenesis has been demonstrated. Expression and lithogenic function of mucins in kidney stone disease have not been explored. This study aimed to investigate the expression of MUC1 and MUC2 in renal tissues of patients with nephrolithiasis and to examine the role of urinary mucins in calcium oxalate (CaOx) crystal aggregation. Renal biopsy and 24-hour urine specimens were obtained from 31 stone patients who underwent open stone surgery. Control renal tissues (n=7) were taken from non-cancerous and cancerous portions of nephrectomy patients with localized renal tumors. Control 24-hour urine samples were collected from 19 healthy subjects. Intrarenal expression of MUC1 and MUC2 transcripts were measured by real time RT-PCR. 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), an oxidative DNA damage marker was determined in renal tissues. Urine specimens were analyzed for creatinine, oxalate, citrate, *N*-acetyl glucosaminidase (NAG) activity and 8-OHdG. Urinary mucins were partially purified from pooled urine samples of healthy and renal stone subjects using CL-2B gel filtration column. MUC1-positive fractions were pooled and named HP1 (for healthy pool, fractions 27-43), NLP1 (for nephrolithiasis pool, fractions 5-17) and NLP2 (fractions 24-40). The lithogenic activity of each pooled fraction was examined by *in vitro* aggregation assays. Urinary citrates significantly lower than healthy subjects. Level of urinary 8-OHdG and NAG activity in nephrolithiatic group was significantly higher than in healthy group. In nephrolithiasis, MUC1 was positive in all samples whereas MUC2-positive tissues were accounted for 64.52% (20/31). Expression level of MUC1 was higher than MUC2. MUC1 trended to be overexpressed in nephrolithiasis tissues compared to non-cancerous renal tissue controls. Association between Oxidative DNA damage and the expression of MUC1 and MUC2 was not observed. CaOx crystal aggregation assay revealed that NLP1 had an aggregation coefficient significantly higher than HP1 and NLP2. Total Sialic acid content in NLP1 was lower than HP1 and NLP2. In conclusion, MUC1 trended to be up-regulated in stone-containing renal tissues. NLP1 had a very large size but low sialic acid content. It promoted the aggregation of CaOx crystals. The presence of large and low-negative-charge mucins in the urine of nephrolithiasis patients may enhance the growth of stone.

Field of study MEDICAL BIOCEMISTRY

Academic year 2006

Student's signature.....^{รศ.ดร. นิตยา ปูนปิระมด} Kanitta Poon Piramee
Advisor's signature.....^{พญ. พียรตนา โตสุกหวอง} Piyaratana Tosukhowong
Co-advisor's signature.....^{ช.ช.ไชย บูณลา} Chanchai Boonla

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ กรุณาช่วยเหลือค่าใช้จ่ายในการเรียน ช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนความรู้ ข้อเสนอแนะและกำลังใจ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณแพทย์และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บสิ่งตัวอย่าง ให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยทางชีวเคมีและโรคทางเมแทบอลิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหน่วยปฏิบัติการวิจัยกลาง ตึกอปร. ชั้น 10 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณนางสาวรัตติพร วุ่นสุวรรณ นางสาวปรารถนา เวสภักตร์ นางสาว ชนุตรา หุณาปเทศ และนายธรากร วุฒิเศรษฐ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ ให้ความรัก ความเข้าใจ และกำลังใจ จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
แนวคิดและทฤษฎี.....	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	25
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	30
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	49
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
ผลการวิเคราะห์.....	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	63
สรุปผลการวิจัย.....	63
อภิปรายผล.....	64
ข้อเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78

ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	84
ภาคผนวก ง.....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	89

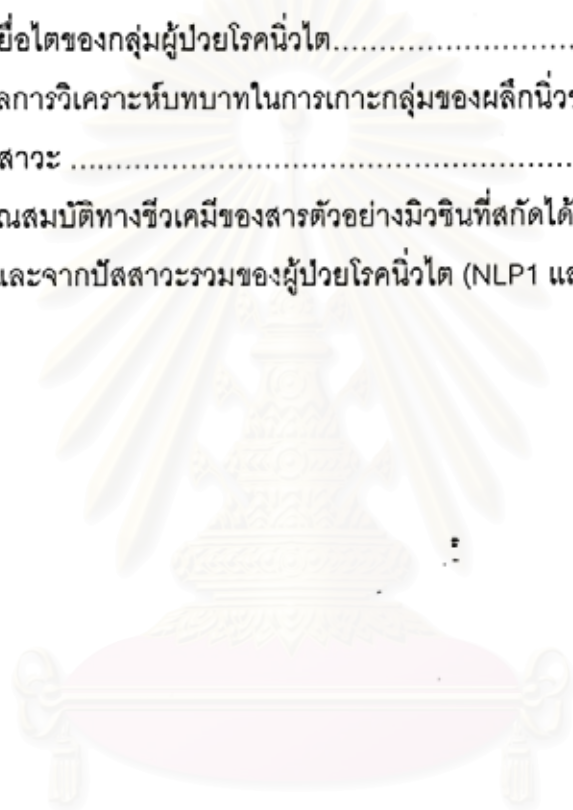


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1	ตำแหน่งโครโมโซมของยีนมิวซิน (<i>MUC</i> genes) และลำดับกรดอะมิโนใน TR domains ของมิวซินแต่ละชนิด.....21
2	แสดงกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย..... 25
3	แสดง Primer ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ <i>MUC1</i> และ <i>MUC2</i> โดยวิธี Real time RT-PCR..... 34
4	แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรที่ใช้เนื้อเยื่อไตในการศึกษา.....40
5	แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรที่ใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในการศึกษา.....41
6	แสดงระดับของ characteristic and metabolic profile ในปัสสาวะเปรียบเทียบกัน ระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคนิ่วไต..... 42
7	แสดงค่าอ้างอิงภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) และภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia).....43
8	แสดงความถี่ของความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 43
9	แสดงระดับของตัวบ่งชี้ของภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชันในปัสสาวะเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคนิ่วไต.....44
10	แสดงระดับการวิเคราะห์ปริมาณของออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีนิ่วแต่ละชนิด.....46
11	แสดงการแสดงออกของ <i>MUC1</i> และ <i>MUC2</i> ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา..... 50
12	แสดงการแสดงออกของ <i>MUC1</i> และ <i>MUC2</i> ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non- cancerous portion) และในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา.....51

13	แสดงการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non- cancerous portion) ของกลุ่มควบคุม และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุม.....52	52
14	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต กับการขับออกของ urine biochemistry ในปัสสาวะและระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต.....56	56
15	แสดงผลการวิเคราะห์หีบหบาทในการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วของมิวซินมิวซินที่สกัดได้ จากปัสสาวะ60	60
16	แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารตัวอย่างมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2).....62	62



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงแผนผังกรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual framework).....	6
2 กระบวนการเกิดนิว้ตาม Free particle theory.....	8
3 กระบวนการเกิดนิว้ตาม Fixed particle theory.....	9
4 แสดงกลไกการเกิดนิว้ในระบบทางเดินปัสสาวะและแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างกาเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับการยึดติดของผลึกกับเซลล์บุท่อไต.....	11
5 แสดงโครงสร้าง MUC protein backbone ของมิวซิน.....	20
6 แสดงชนิดของก้อนนิว้ของผู้ป่วยโรคนิว้ไต	45
7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการขับออกของ 8-OHdG ในปัสสาวะ และปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (urinary protein) ของกลุ่ม ผู้ป่วยโรคนิว้ไต.....	47
8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะและปริมาณ โปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (urinary protein) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิว้ไต.....	47
9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะและปริมาณ การขับออกของ 8-OHdG ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิว้ไต.....	48
10 แสดงภาพ Amplication curve จากการใช้โปรแกรม LightCycler 4.0.....	49
11 กราฟ box plot แสดงระดับการแสดงออกของ MUC1 (แสดงโดยค่า normalized ratio) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิว้ไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) ของกลุ่มควบคุม และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portionion) ของกลุ่มควบคุม.....	53
12 กราฟ box plot แสดงระดับการแสดงออกของ MUC2 (แสดงโดยค่า Δ Cp) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิว้ไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมและเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portionion) ของกลุ่มควบคุม.....	54
13 กราฟ box plot แสดงระดับของ intrarenal 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิว้ไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) ของกลุ่มควบคุม และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portionion) ของกลุ่มควบคุม.....	55

14	แสดงโครมาโตแกรมของการแยกมิวซินในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต โดยวิธี CL-2B Gel filtration จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร การย้อม โดยวิธี Periodic Acid Schiff (PAS staining) และการวิเคราะห์ MUC1 immunodetection.....	57
15	แสดงโครมาโตแกรมของการแยกมิวซินในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมโดยวิธี CL-2B Gel filtration จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร การย้อม โดยวิธี Periodic Acid Schiff (PAS staining) และการวิเคราะห์ MUC1 immunodetection.....	58
16	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เปรียบเทียบ การเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตระหว่างค่า AC ต่ำ และค่า AC สูง.....	60
17	แสดงผลการย้อม PAS staining และการทำ MUC1 และ MUC2 immunodetection ของสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2.....	61
18	แสดงปริมาณ Total sialic acid ในสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2.....	62
19	สรุปข้อสันนิษฐานของบทบาทของมิวซินที่อาจเกี่ยวข้องกับการรวมกลุ่มของผลึกกับ ปริมาณของกรดไซเลติกในโมเลกุล.....	68

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคนิ่วไต (nephrolithiasis หรือ renal stone disease) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานแก่ผู้ป่วยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้ในทุกภูมิภาคทั่วโลกมาเป็นเวลานาน โดยพบความชุกร้อยละ 1-20 ของประชากรทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานพบความชุกของการเกิดโรคนิ่วไตสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ จากรายงานของ Yanagawa และคณะในปี ค.ศ. 1997 พบความชุกของโรคนิ่วไตสูงถึงร้อยละ 16.9 ในจังหวัดขอนแก่น (1) นอกจากนี้โรคนิ่วไตยังมีอัตราการเกิดซ้ำ (recurrence) สูง มีรายงานพบว่าอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูงถึงร้อยละ 25 ในปีแรก และร้อยละ 39 ในเวลาติดตาม 2 ปี (2) ในผู้ป่วยบางรายสามารถตรวจพบนิ่วถึง 5-6 ครั้งในเวลา 10 ปี และอาจเกิดภาวะไตวายเรื้อรังตามมา ทำให้ผู้ป่วยมีวิถีชีวิตที่ทุกข์ทรมาน ส่งผลกระทบในการประกอบอาชีพ และยังทำให้รัฐต้องสูญเสียงบประมาณในการดูแลรักษา

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย (multifactorial disease) อาจมีสาเหตุจากปัจจัยภายใน (intrinsic factors) ได้แก่ พันธุกรรม ภาวะของไต เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย และเชื้อชาติ เป็นต้น หรือจากปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) ได้แก่ การบริโภคอาหารและน้ำ ยา ภูมิอากาศ อาชีพ และความเครียด เป็นต้น หรืออาจจะเกิดร่วมกันทั้ง 2 สาเหตุ (2) ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (metabolic abnormalities) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายภาวะร่วมกันในปัสสาวะ (3) เกิดภาวะความอิ่มตัววยวดยิ่ง (supersaturation) ของสารก่อนิ่ว และเป็นเหตุให้เกิดผลึกนิ่วสูงขึ้นในปัสสาวะ (crystalluria) ภาวะที่พบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ คือ ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะและภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะ เนื่องจากเป็นภาวะที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มของผลึกนิ่ว (stone aggregators) ได้สูงกว่าภาวะอื่น (4)

จากรายงานการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง เชื่อว่ากระบวนการเกิดนิ่วเริ่มต้นจากการเกิดผลึก (crystal nucleation) ของเกลือที่เป็นสารก่อนิ่วในปัสสาวะที่มีความอิ่มตัววยวดยิ่ง (supersaturated urine) ผลึกที่เกิดขึ้นอาจมายึดติดกับเซลล์ (adhesion) และนำผลึกเข้าไปภายในเซลล์ด้วยวิธี endocytosis เพื่อย่อยสลายในไลโซโซม (5) ผลึกสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นจนเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation กับสารชีวโมเลกุล เช่น ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ส่งผลให้เซลล์บุท่อไตเกิดการทำลายและบอบช้ำ (injury) และมีการขับออกของสารพวก oxidatively modified biomolecule เช่น oxidative DNA damage product (8-OHdG) ทางปัสสาวะมากขึ้น (6) ในบริเวณของเซลล์ที่ถูกทำลายดังกล่าวจะเป็นแหล่งเกาะยึดของผลึกนิ่ว ทำให้ผลึกนิ่วติดค้าง

ในท่อไต (crystal retention) เกิดเป็นนิ่วเคลือบขนาดเล็กหรือ nidus ที่เป็นศูนย์กลางของการเกิดก้อนนิ่ว nidus จะเกาะกลุ่มและรวมตัวกันมากขึ้น จนเกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด

ปัจจุบันมีความพยายามศึกษากลไกของการเกิดนิ่วกันมาก เพื่อหาแนวทางป้องกันและรักษา เนื่องจากยังมีข้อมูลการวิจัยที่ไม่ชัดเจนถึงบทบาทของสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) เช่น Tamm-Horsfall protein (THP), nephrocalcin และ mucins เป็นต้น โมเลกุลเหล่านี้อาจสามารถทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วได้ เนื่องจากมีประจุลบมาก หรืออาจเป็นตัวส่งเสริมการก่อนิ่ว หากสูญเสียประจุลบหรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง

มิวซิน (mucins; MUC) เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ มีคาร์โบไฮเดรตชนิด O-linked oligosaccharides เป็นองค์ประกอบร้อยละ 40-80 (7) มิวซินมีขนาดใหญ่มากกว่า $2-2 \times 10^5$ ดาลตัน ในปัจจุบันค้นพบมิวซินในมนุษย์ 19 ชนิด (8) โดยแบ่งชนิดของมิวซินตามโครงสร้างของ MUC protein backbone ซึ่งภายในโครงสร้างของ MUC protein backbone มีลักษณะเฉพาะคือ มีโดเมนของส่วนซ้ำ (tandem repeats, TR) กระจายอยู่ใน TR domains ส่วนใหญ่เป็น serine, threonine และ proline ซึ่งเป็นตำแหน่งของการเกิด O-glycosylation มิวซินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ membrane-associated mucins และ secreted mucins อย่างไรก็ตามมิวซินบางชนิดมีคุณสมบัติทั้งสองแบบ (9) มิวซินเป็นส่วนประกอบหลักของเมือก (mucus) สังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์เยื่อบุผิว ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวของระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจ ต่อม้ำลาย ต่อมไขมัน และในน้ำหล่อเลี้ยงต่างๆ เป็นต้น ทำหน้าที่ในการเคลือบป้องกันเซลล์จากอันตรายต่างๆ เช่น จุลชีพ สารพิษ และแรงกล เป็นต้น การสร้างมิวซินของเซลล์จึงจัดเป็นหนึ่งใน innate defense mechanism ของร่างกาย

Akbarienh และคณะ ได้ทำการศึกษาวิจัยในปี ค.ศ. 1991 พบว่า มิวซินมีบทบาทในการโตขึ้นของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) (10) และจากผลการทดลองเบื้องต้น (pilot study) ของกลุ่มวิจัย พบระดับของมิวซิน MUC1 และ MUC2 เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ด้วยเหตุนี้กลุ่มวิจัยจึงได้มีการตั้งสมมติฐานว่า เมื่อเกิดภาวะผิดปกติขึ้นที่เนื้อเยื่อไต เช่น มีการระคายเคืองจากออกซาเลตหรือผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต หรือเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน อาจส่งผลให้มีการหลั่งมิวซินเพิ่มมากขึ้น และมีผลในการส่งเสริมกระบวนการเกิดนิ่วไต โดยในการศึกษานี้มุ่งศึกษาแสดงออกของมิวซิน MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และบทบาทในการก่อนิ่วของมิวซินในปัสสาวะ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของมิวซินกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ผลการวิจัยจะทำให้ทราบถึงกลไกระดับ

โมเลกุลของการเกิดนิ่วมากขึ้น โดยเฉพาะบทบาทของมิวซินต่อการเกิดกระบวนการเกิดนิ่ว นอกจากนี้ผลงานวิจัยนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางคลินิกต่อไปในอนาคตได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
2. เพื่อวัดระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต
3. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตกับระดับความเครียดจากออกซิเดชัน
4. เพื่อศึกษาบทบาทการก่อกวนในหลอดทดลองของมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต เปรียบเทียบกับความสามารถในการก่อกวนของมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของคนปกติ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่เข้ามาทำการรักษาโดยการผ่าตัดนิ่ว ณ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. กลุ่มควบคุม (control) สำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต เป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องทำการผ่าตัดไตออกและไม่มีประวัติของการเป็นนิ่ว
3. กลุ่มควบคุม (control) สำหรับเปรียบเทียบ urine biochemistry และการรวมกลุ่มของผลึกนิ่วในปัสสาวะ เป็นคนที่มีสุขภาพดี ที่ไม่มีประวัติการเป็นนิ่วมาก่อน

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ เป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบคุณภาพ ความแม่นยำและความเที่ยงตรง ตามมาตรฐานของการทดสอบของเครื่องมือนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย ยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอม ภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบรายละเอียดในทุกด้าน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น

3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่เข้ามาทำการรักษาโดยการผ่าตัดนิ่ว ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น
4. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยจะต้องเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และ ศัลยแพทย์ทางเดินปัสสาวะจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (renal biopsy) ขณะทำการผ่าตัด

ข้อจำกัดของการวิจัย

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นผลให้ไม่สามารถเป็นตัวแทนที่ดีที่สุดของประชากรผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้

กลุ่มควบคุมที่ต้องเก็บเนื้อเยื่อไตควรจะเก็บจากคนที่มีสุขภาพดีที่ไม่เคยเป็นนิ่วมาก่อน แต่เนื่องด้วยเหตุผลทางจริยธรรมจึงต้องเก็บเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไตออก ทำให้การแปลผลนั้นมีข้อจำกัด อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อไตกลุ่มควบคุมได้เก็บจากทั้งส่วนที่เนื้อไตมีลักษณะปกติปกติ (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) สำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 และระดับ 8-OHdG กับกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Nephrolithiasis หรือ kidney stone disease คือ โรคนิ่วไต ซึ่งก้อนนิ่วอยู่ตำแหน่งที่สูงกว่ากรวยไต (renal pelvis) ขึ้นไป
2. Oxidative stress คือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เป็นภาวะที่ไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลที่สำคัญของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ และสารอื่นๆ ในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและถูกทำลายในที่สุด
3. Lithogenesis คือ กระบวนการก่อตัวเป็นหิน ในที่นี้ คือ กระบวนการเกิดก้อนนิ่ว (stone formation)
4. Crystal aggregation คือ การรวมตัวของกลุ่มของผลึก ซึ่งผลึกในปัสสาวะจะเข้ามารวมกันเป็นจำนวนมาก เพื่อให้ได้ขนาดโตขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

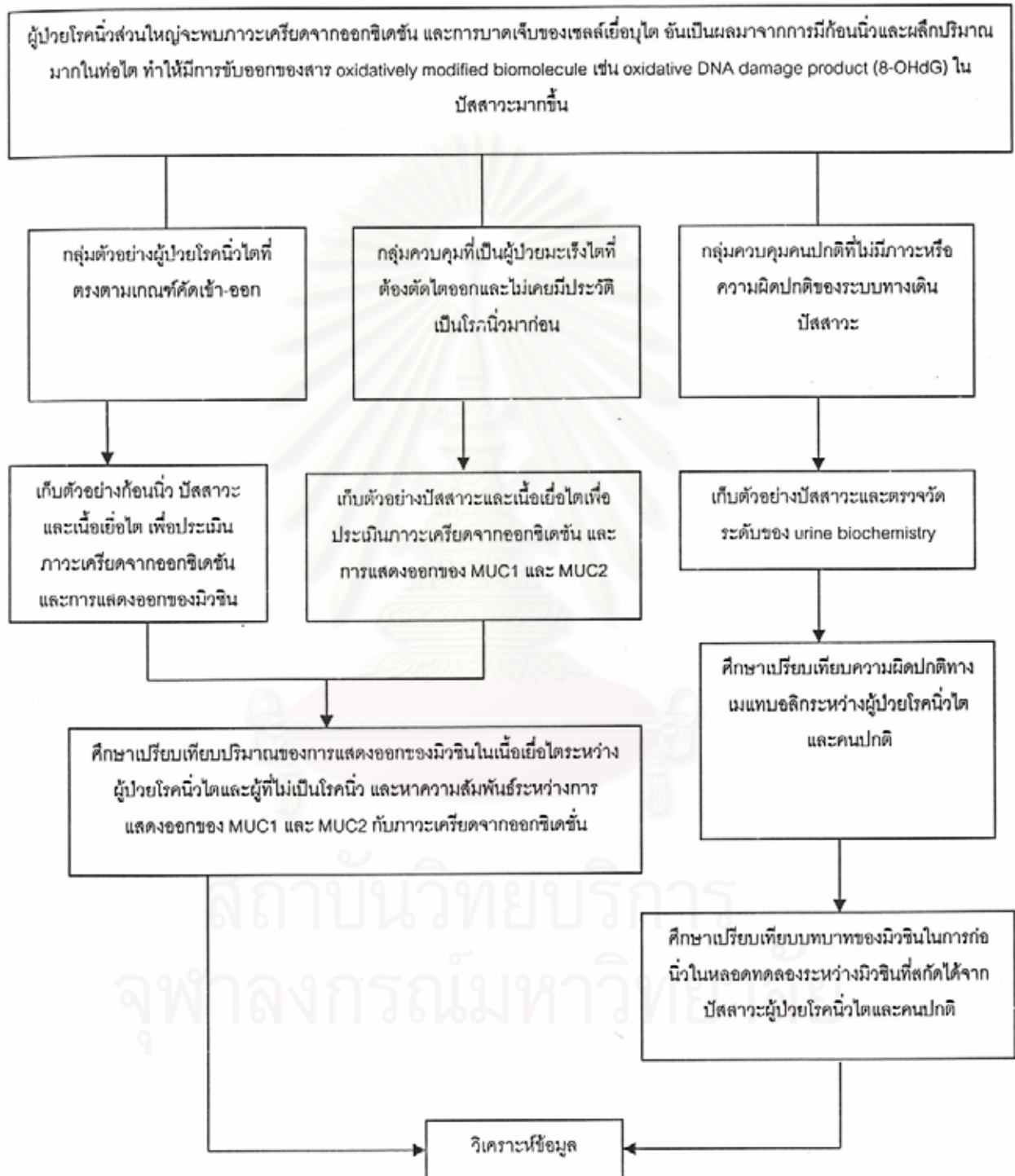
1. ทราบระดับของออกซาเลต (oxalate) และระดับของซิเตรต (citrate) ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ
2. ทราบระดับของมิวซินในระดับ mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อไตปกติ
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 กับระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อปกติ
4. ทราบบทบาทการก่อกำเนิดในหลอดทดลองของมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และปัสสาวะของคนปกติ
5. ทราบกลไกการเกิดนิ่วระดับโมเลกุลมากขึ้น โดยเฉพาะบทบาทของมิวซินในปัสสาวะต่อกระบวนการของการเกิดนิ่ว

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่เข้ามาทำการรักษาโดยการผ่าตัดนิ่ว ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์หรือโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และได้ลงนามในใบยินยอมแล้วด้วยความสมัครใจ ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตและก้อนนิ่วขณะทำการผ่าตัด และเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกและภาวะการบาดเจ็บของเยื่อท่อไต ตรวจประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันในตัวอย่างปัสสาวะและเนื้อเยื่อไต ตรวจวัดระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต และการทดสอบบทบาทของมิวซินในปัสสาวะต่อการเกิดการรวมกลุ่มของผลึกนิ่วในหลอดทดลอง (*In vitro crystal aggregation assay*) ดังกรอบแนวคิดและขั้นตอนการดำเนินการวิจัยแสดงในรูปที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual framework)



รูปที่ 1 แสดงแผนผังกรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual framework)

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

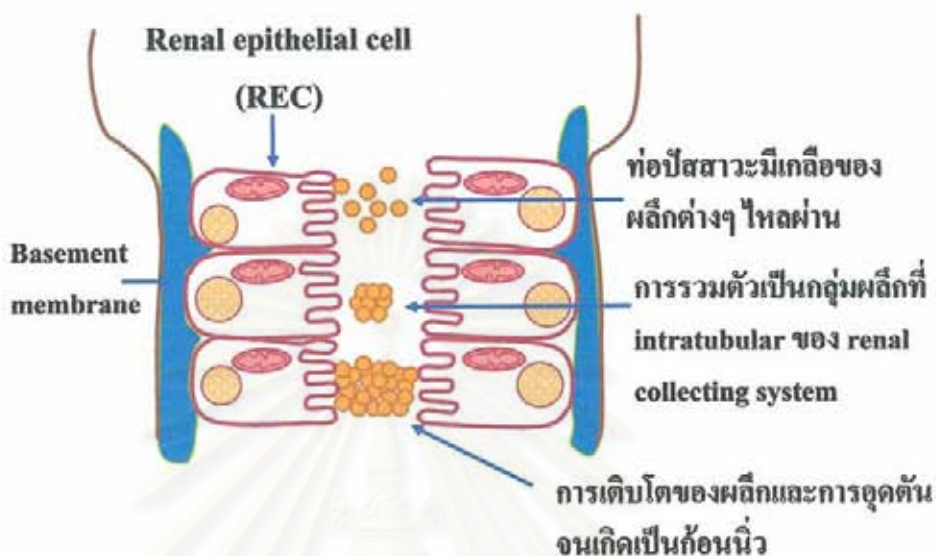
แนวคิดและทฤษฎี

โรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ (urolithiasis) และโรคนิ่วไต (nephrolithiasis) เป็นโรคของระบบทางเดินปัสสาวะที่เป็นปัญหาสำคัญที่พบบ่อยได้ทั่วโลกประมาณร้อยละ 10 ในประเทศตะวันตก และร้อยละ 20 ในประเทศแถบเขตร้อน (tropical and subtropical regions) เช่น ประเทศซาอุดีอาระเบีย (11) อุบัติการณ์ของโรคนิ่วไตมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ส่งผลกระทบต่อชีวิตผู้ป่วยและสูญเสียค่ารักษาพยาบาลจำนวนมาก (12) และยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง ภายหลังจากการรักษาด้วยวิธีสลายนิ่ว (lithotripsy) หรือภายหลังจากผ่าตัด (surgery) ผู้ป่วยบางรายมีนิ่วเกิดมากกว่า 2-3 ครั้งในระยะเวลา 2 ปี หรือเกิดเป็นซ้ำประมาณ ร้อยละ 47 ของผู้ป่วยนิ่วทุกภาคของประชากรในประเทศไทย (2) ผลการวิเคราะห์ชนิดของก้อนนิ่วรวม 4 ภาคของประเทศไทย ของ Tosukhowong และคณะในปี 2007 พบนิ่วแคลเซียมออกซาเลตเชิงเดี่ยว ร้อยละ 21.0 นิ่วแคลเซียมฟอสเฟตเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 นิ่วกรดยูริกเชิงเดี่ยวร้อยละ 14.0 และนิ่วแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตเชิงเดี่ยวร้อยละ 3.0 นอกจากนี้ยังพบสัดส่วนของนิ่วผสม (ร้อยละ 59.8) มากกว่านิ่วเชิงเดี่ยว (ร้อยละ 40.2) และนิ่วผสมที่พบมากที่สุดคือนิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมกับแคลเซียมฟอสเฟต (ร้อยละ 80.0) (60)

ก้อนนิ่วเกิดจากการรวมตัวของเกลือของสารต่าง ๆ ที่เป็นสารอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปของผลึก เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่เป็นผลึกอยู่รวมกันในก้อนนิ่ว เรียกว่า stone matrix หรือ organic matrix ที่พบประมาณร้อยละ 2-5 ในน้ำหนักแห้งของก้อนนิ่วทั้งหมดอีกด้วย สารอินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) มีโปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมันเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ขณะที่พบคาร์โบไฮเดรตเล็กน้อย สารเหล่านี้พบได้ปกติในระบบทางเดินปัสสาวะ สารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ต่างๆ สามารถรวมตัวกันจำนวนมากจนเกิดเป็นกลุ่มของผลึกนิ่ว โดยอาจจะเกาะยึดกันเองเป็นรูปทรงที่มีแบบเฉพาะ ด้วยพันธะนอนโคเวเลนต์ เช่น พันธะไฮออนิก ไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิกและแรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นต้น

ในปัจจุบันมีทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการของการเกิดก้อนนิ่วอยู่ 2 ทฤษฎี โดยทฤษฎีแรกคือ free particle theory (61) ซึ่งเชื่อว่ามีสารโมเลกุลใหญ่เหนียวนำไปมีการตกตะกอนและการรวมกลุ่มของผลึกนิ่วในปริมาณมาก จนทำให้ผลึกมีขนาดโตขึ้น และไปอุดตันบริเวณ distal tubular collecting duct เมื่อมีการสะสมของผลึกนิ่วมากขึ้นเกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด (รูปที่ 2)

กระบวนการเกิดนิ่วตาม Free Particle Theory

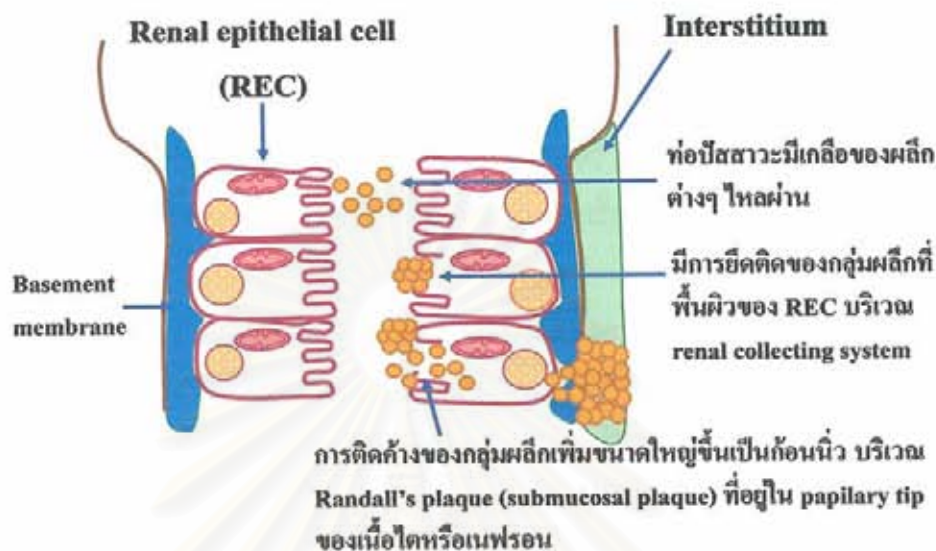


รูปที่ 2 กระบวนการเกิดนิ่วตาม free particle theory

ในทฤษฎีที่สองของการกระบวนการเกิดนิ่ว คือ fixed particle theory (61) ซึ่งเชื่อว่ามี การยึดติดของผลึกในบางแห่งของ collecting tubule system ทำให้เกิดการติดค้างและผลึกมีขนาดโตขึ้นจนเกิดเป็นก้อนนิ่ว การติดค้างของผลึกอาจเกิดบริเวณ Randall's plaque (submucosal plaque) ที่อยู่ใน papillary tip ทั้งใน intersitium และ nephron หรือติดค้างที่พื้นผิวของ renal epithelial cell บริเวณ collecting tubule ที่มีการบาดเจ็บจากผลึกเองหรือจากการติดเชื้อ (รูปที่ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการเกิดนิ่วตาม Fixed particle theory



รูปที่ 3 กระบวนการเกิดนิ่วตาม fixed particle theory

สารอินทรีย์หรือสารโมเลกุลขนาดใหญ่ในปัสสาวะพบว่ามีบทบาทในกระบวนการรวมตัวของกลุ่มผลึก สารโมเลกุลใหญ่บางชนิดไปจับกับผิวของผลึกทำให้เหมือนกาวและเป็นตัวยึดให้มีการเกาะกลุ่มกันของผลึก และสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดเมื่อถูกดูดซับเข้าที่ผิวของผลึกแล้วมีผลให้ผลึกกันเอง ยับยั้งการรวมกันเป็นผลึกขนาดใหญ่ และยับยั้งการเกิดนิ่วด้วย ดังนั้นสาเหตุสำคัญที่บางคนไม่เกิดนิ่วเพราะปัสสาวะมีสารยับยั้งการเกิดผลึกหรือยับยั้งการก่อตัวของนิ่วอยู่มากพอ หรือมีปริมาณสารก่อนิ่วอยู่น้อย เมื่อเกิดผลึกเช่นแคลเซียมฟอสเฟตก็จะถูกยับยั้งทำให้ผลึกไม่ยึดติดกับเยื่อรับท่อของเซลล์ผิวท่อไตถูกขับออกมาทางปัสสาวะ หรือผลึกถูกกำจัดโดยแมคโครฟาจ (macrophage) ของร่างกายละลายออกทางปัสสาวะ นอกจากนี้อาจมีสารซึ่งส่วนใหญ่มีประจุและในระดับที่สูงพอเพียงจะไปแย่งจับสารก่อนิ่ว เช่น ซิเตรตไปจับแคลเซียม หรือแมกนีเซียมจับออกซาเลต ทำให้เกิดเกล็ดของแคลเซียมซิเตรตหรือแมกนีเซียมออกซาเลต ซึ่งละลายในน้ำปัสสาวะได้ดี ช่วยลดสารก่อนิ่วยับยั้งไม่ให้เกิดผลึกนิ่วโดยตรง ในทางตรงกันข้ามหากร่างกายมีปริมาณสารก่อนิ่วอยู่มากหรือมีปริมาณสารยับยั้งน้อย จะส่งผลให้เพิ่มโอกาสการจับกับของผลึกที่เซลล์เยื่อไตและมีการทำลายของเยื่อเซลล์ เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกลุ่มและเกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด

ปัจจุบันมีความพยายามศึกษากลไกของการเกิดนิ่วกันมาก เพื่อหาแนวทางป้องกันและรักษา เนื่องจากยังมีข้อมูลการวิจัยที่ไม่ชัดเจนถึงบทบาทของสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ (macromolecules) เช่น Tamm-Horsfall protein (THP), urinary prothrombin fragment-1 (UPTF1), osteopontin (OPN), nephrocalcin และ mucins เป็นต้น สารโมเลกุลเหล่านี้อาจสามารถทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่ว (stone inhibitor) ได้ เนื่องจากมีประจุลบมาก หรืออาจเป็นตัวส่งเสริมการก่อนิ่ว (stone promoter) หากสูญเสียประจุลบหรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง

มิวซิน (Mucins, MUC) เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ ในโครงสร้างมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต (O-glycans) สูง มิวซินสังเคราะห์โดยเซลล์เยื่อบุผิว ที่บุตามท่อและต่อมต่างๆ ในร่างกาย มิวซินทำหน้าที่เกี่ยวกับ cytoprotection, lubrication และ hydration จากผลการทดลองเบื้องต้น (pilot study) ของกลุ่มวิจัยของเรา พบระดับของมิวซิน MUC1 และ MUC2 เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่า มิวซินที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตน่าจะสังเคราะห์มาจากเซลล์ท่อไต และมีบทบาทในการเกิดกระบวนการเกิดนิ่ว กล่าวคือ เมื่อเซลล์เยื่อบุท่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตถูกเสียดสีจากผลึกนิ่วและสารก่อนิ่ว ร่วมกับการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ มิวซินจะถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่งออกมามากขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์จากภาวะคุกคามดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต และบทบาทของมิวซินในปัสสาวะต่อกระบวนการเกิดนิ่ว ซึ่งในปัจจุบันในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาในหัวข้อนี้ทั้งในประเทศไทยและระดับนานาชาติ ผู้ทำการวิจัยคาดหวังว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้น่าจะมีประโยชน์ต่อการเกิดองค์ความรู้ใหม่ และการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

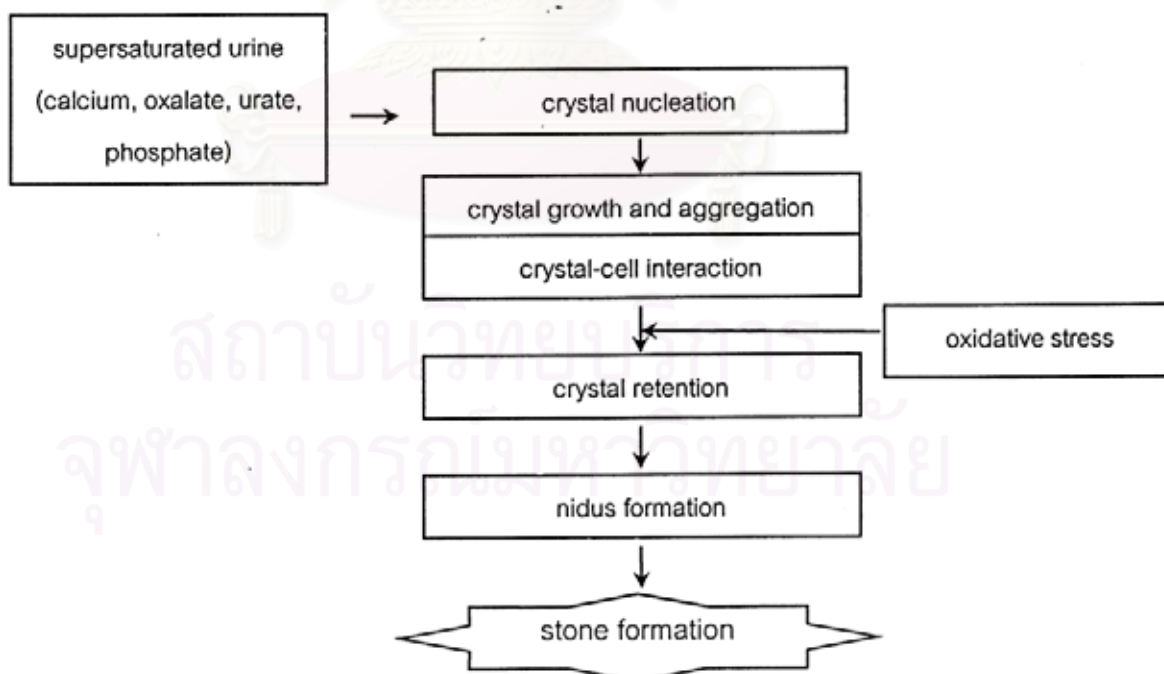
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กลไกการเกิดนิ่ว

กระบวนการเกิดนิ่วเชื่อว่าเริ่มต้นจากการเกิดผลึก (crystal nucleation) ของไอออนของสารก่อนิ่ว (lithogenic ions) ในปัสสาวะ ในภาวะอิ่มตัวด้วยผลึกที่เพิ่มขึ้นจะถูกกำจัด โดยการนำผลึกเข้าไปภายในเซลล์ด้วยวิธี endocytosis/ internalization เพื่อย่อยสลายในไลโซโซม หากผลึกเข้าไปมากจนเอนไซม์ใน lysosome ไม่สามารถย่อยสลายได้หมด จะถูกนำเข้าสู่ interstitium

เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้พลาเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาเก็บกินผลึก (63) ผลึกนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์ได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา oxidation โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้เกิดการทำลายชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุท่อไต นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยา oxidation กับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น โปรตีน และดีเอ็นเอ (DNA) ได้ ทำให้ส่งเสริมการทำลายและการบอบช้ำของเซลล์บุท่อไต และมีการขับออกของสารพวก oxidatively modified biomolecules มากขึ้น มีการศึกษาพบว่าการยึดติดของผลึกจะเกิดได้ดีกับเซลล์ที่บอบช้ำ (injured renal tubular cells) อย่างไรก็ตามการจับยึดของผลึกนี้จะขึ้นกับชนิดหรือระดับของสารที่มีประจุลบใน tubular fluid และขึ้นกับประจุลบที่ผิวของเซลล์บุท่อไต ซึ่งจะเป็นปัจจัยกำหนดว่าผลึกจะติดค้างที่ใดจนเป็นจุดเริ่มต้นของการเติบโตเป็นก้อนนิ่ว (crystal retention) หรือถูกขับออกไปทางปัสสาวะโดยออกไปตามการไหลของ tubular fluid

โดยทั่วไปจะทราบกันดีว่า ผู้ที่มีความอึดตัวของสารก่อนิ่ว (stone promoter) ในปัสสาวะสูง เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ยูเรต ฟอสเฟต เป็นต้น อาจจะไม่เกิดนิ่วก็ได้ ถ้าขณะนั้นในปัสสาวะมีปริมาณสารยับยั้งการก่อนิ่ว (stone inhibitor) สูงมากพอ ดังนั้นจึงมีความพยายามศึกษากันมากเพื่อหาสารยับยั้งการเกิดนิ่ว และศึกษากลไกการติดค้างของผลึก การเกิด nidus การเจริญเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (stone growth) จนกลายเป็นก้อนนิ่ว (stone) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงกลไกการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะและแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับการยึดติดของผลึกกับเซลล์บุท่อไต

สารโมเลกุลใหญ่ (Macromolecules) และการเกิดนิ่วไต

องค์ประกอบในก้อนนิ่วประกอบด้วยสาร 2 ชนิด คือ สารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของผลึกซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 95) และสารประกอบอินทรีย์ เรียกว่า stone matrix หรือ organic matrix ซึ่งมีประมาณร้อยละ 2-5 ของน้ำหนักแห้งของก้อนนิ่ว สารอินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรืออยู่ในรูปของไกลโคโปรตีนและไกลโคลิปิด เป็นต้น สารเหล่านี้พบได้ในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งอาจมีแหล่งกำเนิดทั้งจากพลาสมาและจากเซลล์ไตสร้างขึ้นเอง โดยพบว่าสารอินทรีย์ในก้อนนิ่วจะมีปริมาณต่างกันในแต่ละชนิด (13) การพบสารโมเลกุลขนาดใหญ่ในก้อนนิ่ว บ่งชี้ว่าสารเหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดนิ่ว

สารต่าง ๆ ที่ถูกขับออกทางปัสสาวะของคนทั่วไป เช่น calcium และ oxalate มักมีความเข้มข้นสูงและบ่อยครั้งที่อาจมี solubility product สูงกว่าระดับ supersaturation สำหรับผู้ป่วยโรคนี้ จะพบปรากฏการณ์นี้ได้บ่อยกว่าและรุนแรงมากกว่าในคนปกติ แต่ค่าเฉลี่ยของ solubility product ในผู้ป่วยโรคนี้และคนปกติไม่ได้แยกออกจากกันโดยเด็ดขาด ยังมีค่าตัวเลขที่คร่อมกันระหว่างคนทั้ง 2 กลุ่ม ถ้าพิจารณาตามหลักของ thermodynamics คนส่วนใหญ่ควรเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะ อย่างไรก็ตามในตลอดช่วงชีวิตของคน มีเพียงประมาณ 10% ของเพศชาย และ 4% ของเพศหญิงเท่านั้น ที่เกิดนิ่วขึ้นจริง ๆ ในทางเดินปัสสาวะ ปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นว่าต้องมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากระดับ saturation ของสารต่าง ๆ ในปัสสาวะที่มาควบคุมการเกิดนิ่ว สารที่ทำหน้าที่ขัดขวางการเกิดนิ่วนี้เรียกรวม ๆ ว่าตัวยับยั้งการเกิดนิ่วหรือ "Stone inhibitor"

การศึกษาที่แสดงถึงความสำคัญของสารโมเลกุลใหญ่ต่อกระบวนการเกิดนิ่ว

จากการศึกษาของ Thomas และ Howard ในปี 1959 (32) พบว่าถ้านำกระดูกอ่อนมา incubate ใน supersaturated solution ของ calcium และ phosphate สามารถเกิด calcification ขึ้นที่กระดูกอ่อนได้ การเกิด calcification ก็คือ การเกิดเป็นผลึกของ calcium ที่ bone matrix คล้ายคลึงกับการเกิดนิ่ว แต่ถ้านำกระดูกอ่อนไป incubate ในปัสสาวะของคนปกติที่มี supersaturation ใกล้เคียงกับ calcium phosphate solution กลับไม่เกิด calcification ขึ้นบนกระดูกอ่อน ในทางตรงข้าม ถ้านำปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้มาใช้ incubate จะพบ calcification เกิดขึ้นในกระดูกอ่อน การทดลองนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าในปัสสาวะของคนปกติมีสารที่ต่อต้านการเกิดนิ่ว อีกการศึกษาหนึ่งรายงานว่าการนำผลึกมาเติมลงใน supersaturated solution ผลึกจะโตขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าเติมปัสสาวะของคนปกติลงใน supersaturated

solution เพียงเล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 5 ของ supersaturated solution) จะพบว่าการเติบโตของผลึกลดลงมาก (33)

การเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะเริ่มจากสารในปัสสาวะ เช่น calcium oxalate มีความเข้มข้นสูงกว่าระดับ supersaturation ถ้ามีความเข้มข้นสูงมากจะเกิดผลึกเองเรียก nucleation การเกิด nucleation อาจเกิดได้ง่ายขึ้นหรือที่ระดับ supersaturation ที่ต่ำลง เมื่อสารอื่นทำตัวเป็นแกนในการเกิดผลึก สารเหล่านี้ ได้แก่ cell membrane, protein หรือผลึกของสารชนิดอื่นที่เกิดขึ้นก่อน การที่สารชนิดหนึ่งเกิดเป็นผลึกโดยอาศัยสารอื่นเป็นแกนในการเกิดนี้เรียก "heterogeneous nucleation" หลังจากการบวกรวม nucleation แล้ว ผลึกจะมีขนาดใหญ่โตขึ้นเรียก crystal aggregation ผลึกที่โตขึ้น หรือรวมกลุ่มของผลึกจับกันเป็นก้อนใหญ่ ผลึกที่เกิดขึ้นใหม่มักไม่มีขนาดใหญ่พอที่จะติดอยู่ใน collecting tubule ผลึกจำนวนมากจะไหลออกไปตามปัสสาวะออกจากร่างกาย การที่ผลึกเล็ก ๆ เหล่านี้สามารถเกิดเป็นนิ่วในทางเดินปัสสาวะ โดยผลึกที่เกิดขึ้นต้องสามารถเกาะติดกับ uroepithelial cell ได้ แล้วค่อย ๆ ขยายขนาดมากขึ้นจนเกิดเป็นนิ่วที่มองเห็นด้วยตาเปล่า inhibitor สามารถขัดขวางกระบวนการเหล่านี้ได้ inhibitor แต่ละชนิดจะมีความสามารถไม่เท่ากัน บางชนิดออกฤทธิ์เฉพาะที่ แต่บางชนิดอาจออกฤทธิ์ในทุกขั้นตอนของการเกิดนิ่ว เช่น nephrocalcin inhibitor จะออกฤทธิ์ขัดขวางการเกิดนิ่วโดยไม่ได้เปลี่ยนแปลงระดับของ relative supersaturation ในปัสสาวะ สารที่ลดการเกิดนิ่วโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารหรือเปลี่ยนแปลง relative supersaturation ไม่จัดว่าเป็น inhibitor

Robertson และ Peacock วัดขนาดของผลึกที่เกิดขึ้นนอกร่างกายในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วและคนปกติพบว่า ผลึกที่เกิดขึ้นในคนปกติมีขนาดเล็กกว่าและมีการกระจายตัวเป็น unimodal ในขณะที่ผลึกในผู้ป่วยโรคนิ่วมีขนาดใหญ่กว่าและกระจายตัวเป็น bimodal ผลึกในกลุ่มที่สองจะมีขนาดใหญ่กว่าและไม่พบในปัสสาวะของคนปกติ (34) Robertson และคณะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในคนปกติและผู้ป่วยโรคนิ่วพบว่าทั้ง 2 กลุ่ม สามารถแยกออกจากกันได้ อย่างชัดเจนโดยพิจารณาร่วมกันระหว่าง supersaturation และ inhibitor ดังนั้น Robertson และคณะให้ความสำคัญกับ inhibitor อย่างมาก จนสรุปว่าความบกพร่องของ urinary inhibitor เป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดนิ่ว และจะมีความรุนแรงมากขึ้นถ้ามีระดับ supersaturation ที่สูงขึ้น (35)

stone inhibitor สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) small molecules ได้แก่ citrate, pyrophosphate และ 2) macromolecules ได้แก่ glycoproteins และ

glycosaminoglycans การศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่า inhibitory activity ต่อ calcium oxalate ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ macromolecules

การเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะกล่าวได้ว่าเป็น pathological crystallization โดยมีจุดเริ่มต้นจาก supersaturation ของ calcium salt เช่น calcium oxalate หรือ calcium phosphate หลังจากที่เราสารเหล่านี้ตกผลึกในปัสสาวะ จะมีกระบวนการทาง physical chemistry ตามมาอีกหลายขั้นตอน ได้แก่ crystal growth, crystal aggregation และ crystal retention กระบวนการเหล่านี้จะทำให้ผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้นและเกาะติดกับ uroepithelium ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะได้รับอิทธิพลจาก macromolecules ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในปัสสาวะตามธรรมชาติ โดย macromolecules อาจเป็นตัวกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการเหล่านี้

calcium stone จะประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนประกอบหลักคือ calcium salt เช่น calcium oxalate และส่วนที่เป็น organic material อีกประมาณร้อยละ 2-5 (36) macromolecules ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วจะพบอยู่ในส่วนที่เป็น organic material ในขณะที่กระบวนการต่าง ๆ ของการเกิดนิ่วได้ดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง macromolecules บางชนิดจะรวมตัวกับ crystal อย่างจำเพาะ กล่าวคือมี macromolecules เพียงบางชนิดเท่านั้นที่พบใน organic matrix และพบในปริมาณที่แตกต่างจากที่พบในปัสสาวะ นิ่วแต่ละชนิดพบ organic matrix ที่แตกต่างกัน การรวมตัวของ macromolecules กับ crystal จึงไม่ได้เกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่เป็น selective incorporation (37) macromolecules ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ active peptide F₁ ของ prothrombin (38) ที่เรียกว่า urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1)

จากการศึกษาของ Stapleton และคณะ (39) พบ UPTF1 ใน stone matrix ของผู้ป่วยนิ่ว 9 ใน 10 รายที่มี calcium oxalate เป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อกระตุ้นให้เกิด calcium phosphate crystal ในปัสสาวะของคนจะพบว่า protein ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญใน crystal matrix คือ UPTF1 เช่นกัน UPTF1 นี้มีคุณสมบัติยับยั้ง crystal growth และ aggregation ของนิ่วชนิด calcium oxalate (40) และ calcium phosphate (41) เดิมเรียก protein นี้ว่า crystal matrix protein เนื่องจากเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในก้อนนิ่ว นอกจาก UPTF1 แล้ว ใน stone matrix (39) ยังประกอบด้วย macromolecules ชนิดอื่นที่สำคัญ ได้แก่ osteopontin, albumin, Tamm-Horsfall protein, α -trypsin, inhibitor และ α -microglobulin

Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1)

Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1) เป็น macromolecule ขนาด 31 kDa ถูกสร้างโดยไตของคนปกติ มีกรดอะมิโน γ -carboxyglutamic acid (Gla) เป็นองค์ประกอบ 10 ตัว ซึ่ง Gla สามารถจับกับ calcium ได้เป็นอย่างดี และเป็นตัวกำหนดบทบาทของการเป็น stone inhibitor ของ UPTF1 (42) นอกจากการศึกษาในห้องทดลองที่แสดงว่า UPTF1 เป็น stone inhibitor แล้ว การศึกษาในผู้ป่วยก็พบว่า ผู้ป่วย calcium stone มีปริมาณ UPTF1 ในปัสสาวะต่ำกว่าในคนปกติ ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของความผิดปกตินี้

จากข้อมูลทางภูมิคุ้มกันวิทยา สนับสนุนว่า UPTF1 เกิดจากการตัด prothrombin โดย Factor Xa และ thrombin protein ส่วนนี้เป็นส่วนที่มี Gla อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นตัวทำให้ UPTF1 สามารถจับกับ calcium ได้เป็นอย่างดี (41) UPTF1 สามารถยับยั้ง crystal growth และ crystal aggregation ได้ด้วยความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mg/L ความเข้มข้นของ UPTF1 ในคนปกติมีค่าประมาณ 300 mg/L ทำให้เชื่อว่าความเข้มข้นที่พบในปัสสาวะคนปกติน่าจะสูงพอที่ทำให้ UPTF1 ทำตัวเป็น inhibitor ได้

ยังไม่ทราบแหล่งกำเนิดที่แน่ชัดของ UPTF1 อาจถูกขับออกทางปัสสาวะโดย glomerular filtration หรืออาจสร้างขึ้นที่ไตโดยตรง เนื่องจาก renal cells มีเอนไซม์ vitamin K dependent carboxylase และสามารถสร้าง Gla protein ได้ นอกจากนี้การยับยั้ง renal tissue ด้วย antibody ต่อ UPTF1 พบสารนี้ที่ thick ascending limb of Henle's loop และที่ distal convoluted tubule อย่างไรก็ตามการยับยั้งด้วย antibody ยังไม่ใช่ข้อพิสูจน์ที่แน่ชัดว่าสารนี้สร้างที่ไต เพราะอาจเกิดจาก endocytosis เอา protein ที่อยู่ใน tubular lumen เข้าไปภายใน tubular cells

Uropontin (Osteopontin)

uropontin เป็น acidic glycoprotein พบในปัสสาวะของคนปกติ มี amino acid sequence ใกล้เคียงกับ osteopontin มากจนเชื่อว่าถูกสร้างมาจาก gene เดียวกัน ขนาดโมเลกุล 31 kDa และเกิด post-translational modification ได้แก่ glycosylation, phosphorylation และ sulfation นอกจากนี้มีกรดอะมิโน aspartic acid (Asp) เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก และยังประกอบด้วย Arg-Gly-Asp (RGD) sequence ซึ่งสามารถจับกับ cell surface integrin receptor ได้ uropontin สร้างมาจาก thin descending limb of Henle's loop การสร้างของโปรตีนนี้ถูกกระตุ้นโดย parathyroid hormone (PTH) และ $1,25(\text{OH})_2\text{Vit D}$

uroponin มีคุณสมบัติยับยั้งการเกาะตัวของผลึก calcium oxalate กับ cell surface (43) และยับยั้ง nucleation, crystal growth และ aggregation (44, 45)

Nephrocalcin

nephrocalcin เป็น macromolecule ชนิดแรกที่มีคุณสมบัติเป็น inhibitor ต่อ calcium oxalate และมีข้อมูลจากการทดลองมากที่สุด nephrocalcin มีขนาดประมาณ 14 kDa มี post-translational modification คือ phosphorylation และ glycosylation นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน Gla อยู่เป็นจำนวนมาก nephrocalcin มีแนวโน้มเกิด self-association เป็น multimer เชื่อว่า nephrocalcin ถูกสร้างขึ้นที่ proximal tubule เป็นส่วนใหญ่ ยังไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของ nephrocalcin ที่ถูกขับออกทางปัสสาวะในคนปกติ แต่คาดว่าอยู่ในช่วง 1-20 mg/day (46)

nephrocalcin สามารถยับยั้ง calcium oxalate crystal growth ได้ ปริมาณของ nephrocalcin ที่สามารถยับยั้ง crystal growth ประมาณ 10^{-6} - 10^{-8} mol/L ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในคนปกติ (47, 48) คุณสมบัตินี้พบได้ในโปรตีนชนิดอื่นที่พบในปัสสาวะเช่น Tamm-Horsfall protein และ albumin เป็นต้น nephrocalcin ออกฤทธิ์โดยจับกับผิวของผลึกทำให้ผลึกไม่สามารถเพิ่มขนาดต่อไปได้ จากการศึกษาโดยใช้ anti-nephrocalcin antibody เพื่อวัดปริมาณ nephrocalcin ที่ adsorb ไว้บนผิวผลึก พบว่า inhibitor activity แปรผันตามปริมาณ nephrocalcin ที่ adsorb บนผิวของผลึก (49)

nephrocalcin สามารถยับยั้ง crystal nucleation ได้ การเติม 5×10^{-7} mol/L ของ nephrocalcin หรือร้อยละ 20 ของปัสสาวะลงไปในการละลาย จะสามารถป้องกันการเกิด crystal nucleation ได้ ในขณะที่ albumin ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันทำไม่ได้ คุณสมบัติที่ยับยั้ง crystal aggregation เกิดจากการจับตัวของ nephrocalcin กับผลึก ทำให้ผิวหน้าของผลึกมีประจุลบมากขึ้น ทำให้ผลึกผลึกตัวกันมากขึ้น โอกาสเกิด aggregation จึงน้อยลง นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับ crystal-cell adhesion ใน cell culture model โดยใช้ renal epithelial cell (BSC-1) และ renal papillary collecting tubule (RPCT) พบว่า nephrocalcin สามารถลด crystal adhesion บนผิวของเซลล์ได้ถึงร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 10^{-7} mol/L (39)

โดยสรุป nephrocalcin เป็น macromolecule ที่ถูกสร้างขึ้นโดย proximal tubule แล้วถูก secrete ลงใน tubular fluid เป็น anionic phosphorylated glycoprotein ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดนิ่วในทางเดินปัสสาวะได้เกือบทุกขั้นตอนตั้งแต่ nucleation, crystal growth, aggregation จนถึง crystal adhesion

Tamm-Horsfall Protein (THP)

THP เป็น acidic glycoprotein ที่ถูกสร้างโดย thick ascending limb of Henle's loop และ distal convoluted tubule ที่พบได้มากที่สุดในปีสภาวะของคนปกติ โดยทั่วไปมีปริมาณ 20-200 mg/day THP มีขนาดประมาณ 80 kDa และมักเกิด self-aggregation โดยเฉพาะใน solution ที่มี cation สูง เช่น sodium, calcium และ magnesium เป็นต้น THP สามารถยับยั้ง crystal growth และ crystal nucleation ได้น้อยมาก แต่สามารถยับยั้ง crystal aggregation ได้ในลักษณะของ dose-dependent manner ที่ความเข้มข้น 10^{-8} mol/L สามารถยับยั้ง aggregation ได้ร้อยละ 50 ถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 5×10^{-8} mol/L จะสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 90 (50) คุณสมบัตินี้จะแตกต่างกับ nephrocalcin เนื่องจากคุณสมบัติของ THP ขึ้นอยู่กับ ionic strength และ pH ในสารละลาย ถ้า ionic strength สูงขึ้น หรือ pH ลดลง จะลด inhibitory activity ของ THP ลงอย่างชัดเจน เนื่องจาก THP เกิด self aggregation ขึ้น (51)

THP ไม่มีคุณสมบัติยับยั้งการจับของผลึกบนผิวเซลล์ (crystal-cell adhesion) (51) Gantor และ Hesse (52) ศึกษา crystal aggregation ในคนปกติและผู้ป่วยโรคนี้ พบว่า THP จากคนปกติมีคุณสมบัติยับยั้ง aggregation ในขณะที่ THP จากผู้ป่วยโรคนี้กลับมีคุณสมบัติส่งเสริมให้เกิด aggregation นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคนี้มีปริมาณ THP ในปีสภาวะต่ำกว่าในคนปกติ Schrierle และคณะ (53) พบว่า THP ที่สกัดได้จากผู้ป่วยโรคนี้มีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างจาก THP ที่ได้จากคนปกติ ค่า isoelectric point (pI) ของ THP ที่ได้จากผู้ป่วยโรคนี้มีค่าระหว่าง 4.5-6 ในขณะที่คนปกติมีค่า 3.5 การศึกษานี้บ่งชี้ว่าผู้ป่วยโรคนี้บางรายอาจมีความผิดปกติในโครงสร้างของ THP

Glauser และคณะ (54) ได้ศึกษา THP ในปีสภาวะ ปริมาณ THP ในปีสภาวะจะแปรผันตาม body size, renal function และ urinary citrate excretion ผู้ป่วยที่มีนิ่วชนิด calcium และ uric acid มี THP ต่ำกว่าคนปกติ นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจเป็นพิเศษ คือ ระดับ THP ในปีสภาวะจะแปรผันตามระดับ calcium ในปีสภาวะในคนปกติ แต่กลับไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ calcium ในปีสภาวะในผู้ป่วยโรคนี้ ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ calcium ในปีสภาวะ และ THP ทำให้ดูเหมือนว่าในคนปกติร่างกายสามารถตอบสนองต่อระดับ calcium ที่สูงขึ้นโดยการสร้างหรือขับ THP ออกมามากขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดนิ่วในทางเดินปีสภาวะแต่ในผู้ป่วยโรคนี้ความสามารถนี้อาจสูญเสียไป การศึกษาผลของ THP ต่อการเกิดนิ่วต้องทำด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากในสารละลายที่มี ionic strength และ pH ของปีสภาวะที่ต่างกัน protein นี้จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป จึงต้องศึกษาทั้งในแง่ของปริมาณและคุณภาพ

Glycosaminoglycans (GAGs)

glycosaminoglycans เป็น polysaccharide ที่ประกอบด้วย polymer ของ disaccharide เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย proteoglycans ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดใหญ่ GAGs จะถูกขับออกทางปัสสาวะ พบได้บ่อยใน stone matrix มีปริมาณร้อยละ 8 - 15 โดยน้ำหนักของ stone matrix ซึ่ง chondroitin sulphate เป็น GAGs ที่พบได้มากที่สุดที่ปัสสาวะ แต่ heparin sulphate เป็น GAGs ที่พบได้มากที่สุดในนิ่วชนิด calcium oxalate แต่ไม่พบเลยในนิ่วชนิด struvite การศึกษาพบว่า GAGs ทำหน้าที่เป็น inhibitor ต่อ crystal aggregation (55) อย่างไรก็ตาม ความสำคัญของ GAGs ในแง่ของ stone inhibitor ยังเป็นที่ถกเถียงกันมากว่ามีความสำคัญจริงหรือไม่ (56)

macromolecule inhibitor มีคุณสมบัติที่พอสรุปรวมกันได้คือ

1. เป็น polyanionic macromolecule และส่วนใหญ่มีกรดอะมิโน Asp และ Gla เป็นองค์ประกอบ macromolecules เหล่านี้มักเกิด post-translational modification เช่น phosphorylation และ glycosylation เป็นต้น
 2. macromolecule เหล่านี้ออกฤทธิ์โดยการจับกับผิวของผลึกนิ่ว (crystals)
 3. ส่วนใหญ่สร้างขึ้นโดย uroepithelial cells
 4. ความเข้มข้นที่จำเป็นในการเป็น inhibitor มักต่ำมาก
 5. มักพบใน stone matrix เนื่องจากการรวมตัวกับผลึกของ calcium oxalate
- ใน stone matrix จะเป็นในลักษณะ specific incorporation ดังนั้นสัดส่วนของสารเหล่านี้ใน matrix จะแตกต่างกับที่พบในปัสสาวะมาก

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ ภาวะของระบบออกซิเดชันที่อยู่ในภาวะที่ไม่สมดุล โดยมีสารออกซิเดนต์ (oxidants) มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) สารออกซิเดนต์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) สารออกซิเดนต์ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ superoxide anion ($O_2\cdot$) hydroxyl radical ($OH\cdot$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) จะไปทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และ คาร์โบไฮเดรต ทั้งที่เป็นอิสระและเป็น

องค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลายหรือเกิดการบอบช้ำ (cell injury) นำไปสู่การเสียหายที่และการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งเรียกว่า oxidative damage

มีรายงานวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับออกซาเลตและผลึกแคลเซียมออกซาเลต ในการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุท่อไตให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) การศึกษาของ Thamilselvan และ Khan ในปี ค.ศ. 1998 พบว่า ออกซาเลตไอออนและผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate crystal) ในปัสสาวะ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ของเยื่อบุท่อไต (renal epithelial cell) ผลิตอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ว่องไว จนเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่งผลให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเกิดการบอบช้ำ และถูกทำลายได้ (14)

จากการศึกษาในเซลล์ LLC-PK1 และเซลล์ MDCK ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์บุผิวของ proximal tubule และ collecting duct ตามลำดับ พบว่า หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วยออกซาเลตไอออน เซลล์จะสร้าง ROS เพิ่มขึ้น โดยสัมพันธ์กับการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ lactate dehydrogenase (LDH) และ *N*-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity ใน culture media (15,16,17) สำหรับหลักฐานในสัตว์ทดลอง พบว่า หนูที่เลี้ยงด้วย ethylene glycol เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะและเป็นนิ่วไตชนิดแคลเซียมออกซาเลต มีระดับของ lipid peroxide และ LDH เพิ่มขึ้นในปัสสาวะ (18)

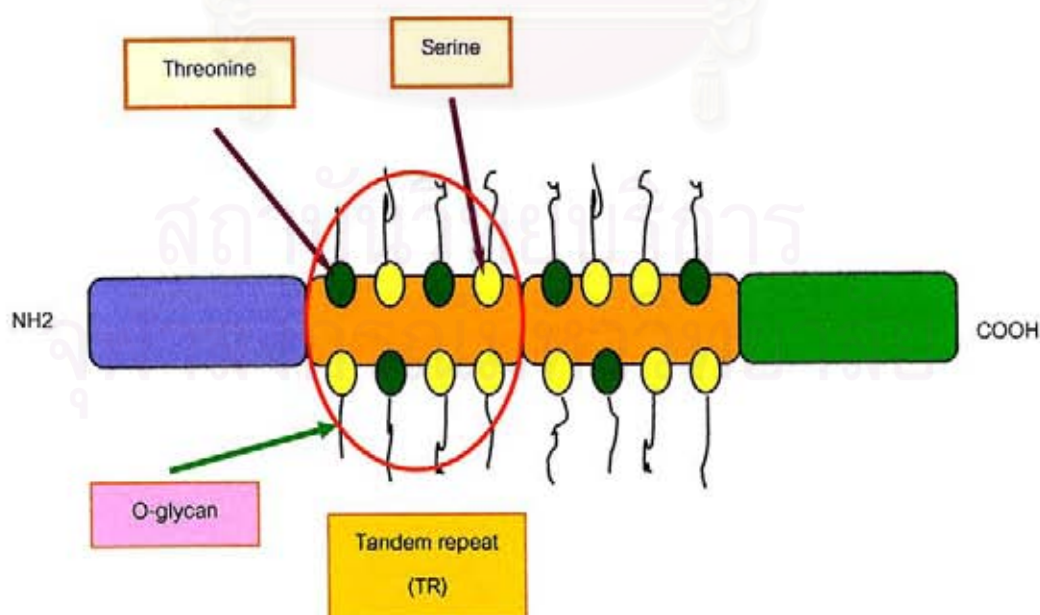
จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคนิ่วไตโดย Huang และคณะ (19) พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตชนิดแคลเซียมออกซาเลตจะมีระดับ α -glutathione S-transferase (α -GST), malondialdehyde (MDA) และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เพิ่มขึ้นในปัสสาวะ ร่วมกับการพบระดับของ β -galactosidase (GAL) และ NAG activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเอนไซม์และสารที่หลังออกมาในปัสสาวะเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของการบอบช้ำของเยื่อบุท่อไต (renal epithelium injury) และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Tosukhowong และคณะ (20) พบว่า โรคนี้มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการบอบช้ำของเยื่อบุท่อไต โดยผู้ป่วยโรคนี้จะมีระดับของ MDA ในพลาสมา, MDA ในปัสสาวะ และ NAG activity ในปัสสาวะสูงขึ้น และยังมีระดับของ glutathione (GSH), cellular glutathione peroxidase (cGPx), protein thiol และ vitamin E ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

การศึกษาของ Khan และคณะ พบว่า ระดับความเข้มข้นของออกซาเลตไอออนและผลึกแคลเซียมออกซาเลต สามารถกระตุ้นให้เซลล์ไตเพิ่มการสร้างตัวเหนี่ยวนำในกระบวนการอักเสบ (inflammatory mediators) เพิ่มตัวเหนี่ยวนำในการสร้าง extracellular matrix และเพิ่มตัว

เหนี่ยวนำการเกิดผลึกได้ โดย ROS จะกระตุ้นโมเลกุลนำสัญญาณ (signaling molecule) ได้แก่ protein kinase C (PKC), c-Jun N-terminal kinase (JNK) และ p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) เป็นต้น การกระตุ้นโมเลกุลนำสัญญาณเหล่านี้จะมีผลต่อ transcription factors เช่น NF- κ B และ activated protein-1 (AP-1) ผลจากการกระตุ้น transcription factor จะนำไปสู่การ up-regulation ของยีนหลายยีน เช่น osteopontin (OPN), bikunin และ β -1 microglobulin (21, 22)

มิวซิน

มิวซิน (mucins; MUC) เป็นไกลโคโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) และมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ($2-20 \times 10^5$ ดาลตัน) โครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 50-90 ซึ่งคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่เป็น O-glycans ขณะที่ส่วนของโปรตีนจะมีปริมาณร้อยละ 10 - 50 ของน้ำหนักของมิวซินทั้งหมด ส่วนของโปรตีน (protein backbone) เรียกว่า apomucin มีลักษณะเฉพาะ คือ มีโดเมนของ tandem repeats (TR) (รูปที่ 5) ส่วนของ TR domains เป็นลักษณะเฉพาะที่ใช้แยกมิวซินออกจากไกลโคโปรตีนชนิดอื่น ภายใน TR domains จะมีการต่อะมิโน serine และ threonine จำนวนมาก (Ser/Thr-rich domains) ซึ่งเป็นตำแหน่งของการเกิด O-glycosylation โดยน้ำตาลตัวแรกของสาย O-glycans คือ N-acetylgalactosamine (GalNAc)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง MUC protein backbone ของมิวซิน

ปัจจุบันพบมิวซินในมนุษย์ 19 ชนิด ประกอบด้วย MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19 และ MUC20 มิวซินออกเป็น 2 ประเภท จำแนกตามโครงสร้างของ apomucin คือ membrane-associated mucins และ secretory mucins (23)

Mucin Genes	Chromosomal location	Tandem repeat peptide sequences (No. of amino acid)
<i>MUC1</i>	1q21	PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA (20) (Gendler et al., 1987; Gendler et al., 1991)
<i>MUC2</i>	11p15.5	PTTTPITTTTTVTPPTPTGTQT (23) (Griffiths et al., 1990)
<i>MUC3A and MUC3B*</i>	7q22	HSTPSFTSSITTTETTS (17) (Pratt et al., 2000)
<i>MUC4</i>	3q29	TSSASTGHATPLPVD (16) (Porchet et al., 1991, Gross et al., 1992)
<i>MUC5AC</i>	11q15.5	TTSTTSAP (8) (Guyonnet Duperat et al., 1995)
<i>MUC5B</i>	11q15.5	SSTPGAHTLVTTTATTPTATGSTITATP (27) (Porchet et al., 1995)
<i>MUC6</i>	11q15.5	SPFSSTGPMATSFQITTTTYPTPSHPQTLPTHVPPFS TSLVTPSTGTVITPTHAQMATASASIHSTPTGTIPPPTL KATGSTHTAPPMTPTTSGYSAHSSTSTAAKTSTSLH SHTSSTHHPEVTPSTTTITPNPTSTGTSTPVAHTTSAT SSRLPTPFTTHSPPTGS (169) (Toribara et al., 1993, Pigny et al., 1996)
<i>MUC7</i>	4q13	TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPG (23) (Bobek et al., 1993)
<i>MUC8</i>	12q24.3	TSCRPLQEGTPGS (14)

		(Shankar et al., 1997)
<i>MUC9</i>	1p13	15 amino acid residues repeat unit
		(Arias et al., 1994, Lapensee et al., 1997)
<i>Muc10</i>	ND	A mouse mucin called MucCAM
		(Melnick et al., 2001)
<i>MUC11</i>	7q22	SGLSEESTTSHSSPGSTHTTLSPASTTT (28)
		(Williams et al., 1999)
<i>MUC12</i>	7q22	SGLSQESTTFHSSPGSTETTSPASTTT (28)
		(Williams et al., 1999)
<i>MUC13</i>	3q13.3	151 amino acid residues repeat unit
		(Williams et al., 2001)
<i>Muc14</i>	ND	A mouse mucin
		GenBank accession number NM_016885
<i>MUC15</i>	11p14.3	Lack of repetitive segment
		(Pallesen et al., 2002)
<i>MUC16</i>	19p13.3	165 amino acid residues repeat unit
		(Yin and Lloyd, 2001)
<i>MUC17</i>	7q22	contains an extended repetitive extracellular glycosylation domain
		(Gum et al., 2002)
<i>MUC19</i>	12q12	Contains many mucin-like threonine/serine-rich repeats
		(Chen et al., 2003)
<i>MUC20</i>	3q29	Contains a mucin tandem repeat of 19 amino acids
		(Higuchi et al., 2004)

ตารางที่ 1 ตำแหน่งโครโมโซมของยีนมิวซิน (*MUC* genes) และลำดับกรดอะมิโนใน TR domains ของมิวซินแต่ละชนิด

มิวซินทำหน้าที่เป็น protective glycoprotein โดยเป็นส่วนประกอบหลักของชั้นเมือก (mucus layer) ปกคลุมผิวของเซลล์เยื่อบุผิว เพื่อป้องกันอันตรายจาก toxic substances ต่างๆ พบการแสดงออกของมิวซินในเซลล์เยื่อบุผิวของระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจ ต่อม้ำลาย ต่อม้าน้ำนม และในน้ำหล่อเลี้ยงต่างๆ เป็นต้น

MUC1 เป็น membrane-associated mucin ซึ่ง TR domains ของ MUC1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ตัวเรียงต่อกัน (24) ซึ่งคล้ายกับมิวซินชนิดอื่นที่มี O-glycans เชื่อมด้วยพันธะ α -1, 3 glycosidic linkage ระหว่างน้ำตาล GalNAc และอะตอมออกซิเจนของ serine หรือ threonine ในโรคมะเร็งหลายชนิด พบว่า MUC1 มีการแสดงออกมากขึ้น (overexpression) และมี glycosylation ที่ผิดปกติ (63) หลายการศึกษารายงานว่า cytoplasmic tail ของ MUC1 สามารถเกิด Tyrosine phosphorylation ได้ จึงเชื่อว่า MUC1 น่าจะมีบทบาทในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ โดยมีหลักฐานว่า MUC1-cytoplasmic tail จับและส่งสัญญาณผ่าน β -catenin และผ่านวิถี mitogen-activated protein kinase (MAPK) (25) มีการรายงานพบการแสดงออกของยีน *MUC1* ที่เนื้อเยื่อไต (26)

MUC2 เป็น secreted mucin ในภาวะปกติสามารถพบการแสดงออกได้ที่ส่วนของ proximal และ villi ของลำไส้เล็กและระบบทางเดินหายใจ (27) เนื่องจากมีการแสดงออกลดลงในมะเร็งลำไส้ จึงเชื่อว่ายีน *MUC2* น่าจะเป็น tumor suppressor gene แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงในการป้องกันของผิวของลำไส้ใหญ่ ในกระบวนการ colonization ของแบคทีเรียในลำไส้เล็ก (63)

บทบาทของมิวซินกับกลไกการเกิดโรคนิ่วไต

บทบาทมิวซินในการกระบวนการเกิดนิ่วศึกษากันมากในโรคนิ่วในถุงน้ำดี (Gallstone) ปัจจุบันยอมรับกันว่ามิวซินเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่กระตุ้นการเกิด nucleation ของ cholesterol gallstone (64) หลักฐานของมิวซินในการเกี่ยวข้องกับกระบวนการของการเกิดโรคนิ่วไตยังมีน้อย การศึกษาของ Akbarienh และคณะ ในปี ค.ศ. 1991 เกี่ยวกับบทบาทของไกลโคโปรตีนต่อการโตขึ้นของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต โดยใช้มิวซินเป็นตัวแทนของไกลโคโปรตีน พบว่า มิวซินส่งผลให้ผลึกนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตโตขึ้น (10) การศึกษาของ Grases และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 พบว่า มิวซินมีผลทำให้มีการรวมกลุ่มของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตได้เร็วยิ่งขึ้น จนนำไปสู่การเกิด crystal nucleation (65) และในปี ค.ศ. 1998 ยังพบว่ามิวซินเป็น heterogeneous

nucleants ของเกลือแคลเซียม และมีบทบาทที่สำคัญในการเกิดนิว (66) การศึกษาของ Christmas และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ใช้มิวซินเป็นตัวแทนของไกลโคโปรตีนในการศึกษาการรวมกลุ่มของผลึก พบว่า มิวซินเป็นสารยับยั้งการรวมกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (67) และการศึกษากลไกของไกลโคโปรตีนต่อการเกิดผลึกนิวแคลเซียมออกซาเลต พบว่า มิวซินความเข้มข้นต่ำ (<15 mg/L) จะยับยั้งการเกิด nucleation ของผลึกนิวแคลเซียมออกซาเลต และมิวซินความเข้มข้นสูง (<250 mg/L) จะยับยั้งการเกิด nucleation ของผลึกนิวแคลเซียมฟอสเฟต ในขณะที่มิวซินความเข้มข้นสูงมาก (>500 mg/L) จะส่งเสริมการเกิด nucleation (68)

รายงานการศึกษาวิจัยของ Leiske JC และคณะ พบว่ากรดไซเอลิก (sialic acid) ที่อยู่ในโครงสร้างของไกลโคโปรตีนมีความเกี่ยวข้องกับการยึดติดของผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่เยื่อผิวของท่อไต (71) โดย sialic acid เป็น amino sugar ที่มีประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ในโครงสร้างของไกลโคโปรตีนหรือไกลโคลิปิด โดยในกระบวนการ O-glycosylation ของไกลโคโปรตีน ซึ่ง sialic acid จะทำหน้าที่เป็นน้ำตาลตัวสุดท้าย (terminal sugar/ capping sugar) และทำให้โมเลกุลของไกลโคโปรตีนมีประจุเป็นลบ (acidic property)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

กลุ่มตัวอย่างในการดำเนินการวิจัย เป็นผู้ป่วยโรคนิ้วโตชายและหญิงที่เข้ารับการรักษาใน
โดยวิธีการผ่าตัด จากแผนกศัลยกรรมระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่นและ
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะแล้วว่าเป็นโรค
นิ้วโต โดยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด รวมทั้งเก็บเนื้อเยื่อไตบริเวณที่ใกล้กับก้อนนิ้ว
และก้อนนิ้วหลังการผ่าตัด ส่วนในกลุ่มควบคุม (control) มีการเก็บสิ่งตัวอย่าง คือ ปัสสาวะ 24
ชั่วโมงและเนื้อเยื่อไต โดยแบ่งเป็นปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จะได้จากกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีที่ไม่มีประวัติการ
เป็นนิ้ว และความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ และเนื้อเยื่อไตจะได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่
ต้องตัดไตออก โดยศัลยแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะเก็บเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นมะเร็งและส่วนที่ไม่ใช่
มะเร็ง ซึ่งกลุ่มควบคุมจะต้องมีความสมัครใจเข้าร่วมโครงการ ลักษณะทั่วไปของประชากร กลุ่ม
ประชากรตัวอย่างที่ผ่านการคัดกรองทั้งหมดมีดังตารางที่ 2

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วโต
จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่เก็บเนื้อเยื่อไต (ชาย: หญิง)	7 (4: 3)	31 (9: 22)
จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (ชาย: หญิง)	31 (14: 17)	27 (8: 19)

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria)

1. กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยโรคนิ้วโตที่ได้รับการรักษาใน
ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคนิ้วโต โดยมีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และ
ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด
2. กลุ่มควบคุม (control) เป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ที่ต้องทำการผ่าตัดไตออกและไม่มี
ประวัติของการเป็นนิ้ว

3. กลุ่มควบคุม (control) ผู้มีสุขภาพดีที่ไม่มีประวัติการเป็นนิ่ว และความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

กลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยโรคไตที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไต และความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นนอกเหนือจากโรคไต เช่น polycystic kidney, persistant uretic obstruction, horseshoe kidney, neurogenic bladder, renal dysfunction และ renal tubular acidosis เป็นต้น

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือและอุปกรณ์ (equipments)	ผลิตภัณฑ์ (product)
24-hr Urine containers with small containers	Trefflab, Switzerland
8 Channel Micropipettor 50-200 μ l and tips	BIOHIT Plc., Helsinki, Finland
8-OHdG Microtiter plate	Japan Insititute for the Control of Aging (JaICA), Japan
autoclave (HVE-25)	HIRAYAMA, Japan
autopipette 20, 200, 500 and 1000 μ l and tips	NICHIRYO, Japan and Trefflab, Switzerland
capillary block	Roche applied science, USA
class II Biohazard safety cabinet	ESCO, Newzeland
deep freezer	REVCO, Germany
distilled water maker (GFL 2012)	GFL, Germany
double Beam Balance (JB-300)	Nexus
electical balance (BL 210S)	Sartorius, Germany
electrophoresis power supply	Weltec, Taiwan
electrophoresis power supply (EPS 1001)	Amersham Bioscience, UK
ELISA plate reader (Multiskan Ex)	Thermo Lab System, China

freeze dryer (Alpha 1-4)	CHRIST, Germany
Gel Doc	Biorad, USA
heat block (Dri-block DB-2A)	THECHNE, UK
high speed centrifuge (Speectrafuge 7M)	Labnet, USA
homogenizer	IKA-Labortechnik, Germany
hypercassette	Amersham Bioscience, UK
ice maker (NT609)	Newton food equipment, Thailand
incubator	memmert, Germany
lightCycler realtime PCR	Roche applied science, USA
ligh microscope	Nikon, Japan
low speed centrifuges	KOKUSAN, , Germany
magnetic sterier heat block	IKA-Labortechnik, Germany
mini-centrifuge	TOMOS, Germany
oil-less vacumm pump (Rocker 300)	FINE PCR, Korea
orbital Shaker (SLOS-20)	Kuhner, Switzerland
quartz cuvette spectrophotometer cells	Biorad, USA
refrigerator centrifuge 2320 k	HERMLE, USA
refrigerator freezer	SANYO, Japan
refrigerators	SANYO, Japan and USA
slot blot apparatus	Amersham Bioscience, UK
spectrophotometer Smart Spec 3000	Biorad, USA
Spectrophotometer UV-1601 PC	SHIMADZU, Japan
Thermo Hybaid PCR Print	Thermo, USA
vacumm pump	GAST, USA
vortex mixers (Genie 2 and VX 100)	Scientific Industries, USA and Labnet, USA
water baths	GFL, Germany
X-ray film processor (Optimax 2010)	Proteck medizintechnik, Germany

2. สารเคมี

สารเคมี (chemicals)	ผลิตภัณฑ์ (product)
10X NEBuffer 3	Biolab, USA
10X Reaction Buffer with MgCl ₂ for Dnase I	Fermentas, Canada
2-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
95 % ethanol	Sigma-Aldrich, USA
absolute ethanol	Sigma-Aldrich, USA
alkaline phosphatase, calf intestinal (CIP)	Biolab, USA
commercial oxalate kit	Trinity Biotech, USA
deoxyribonuclease I (Dnase I)	Fermentas, Canada
diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, USA
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Bioscience, UK
guanidine hydrochloride	Amersham Bioscience, UK
HRP- mouse secondary antibody	Amersham Bioscience, UK
hybond-P PVDF membrane	Amersham Bioscience, UK
hydrochloric acid	Sigma-Aldrich, USA
hyper film™ ECL	Amersham Bioscience, UK
ImProm-II™ Reverse Transcription system	Promega, USA
LightCycler Capillaries (20 ul)	Roche applied science , Germany
mucin 1 (VU 4H5) mouse monoclonal antibody	Santa Cruz biotechnology, USA
new 8-OHdG check ELISA kit	Japan Insitute for the Control of Aging (JaiCA), Japan
non fat dried milk	Sigma-Aldrich, USA
nuclease-free water	Promega, USA

oxalic acid	Sigma-Aldrich, USA
periodic acid	Sigma-Aldrich, USA
protein precipitation solution	Roche, Germany
QuantiTect SYBR Green PCR kit	Qiagen, Germany
Schiff' s reagent fuchsin sulfite reagent	Sigma-Aldrich, USA
sepharose CL-2B	Sigma-Aldrich, USA
sodium arsenite	Sigma-Aldrich, USA
sodium hydroxide	Sigma-Aldrich, USA
sulfuric acid	Sigma-Aldrich, USA
SV Total RNA Isolation System	Promega, USA
thiobabituric acid	Sigma-Aldrich, USA
thymol	Sigma-Aldrich, USA
urine reagent strips	UPS, USA
white cell lysis buffer	Roche applied science, Germany

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย ต้องยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอม ภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบรายละเอียดในทุกด้าน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น (ภาคผนวก ก)

2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยโรคนี้่วไต ที่เข้ามาทำการรักษาโดยการผ่าตัดนี้่วไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น โดยทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด รวมทั้งเก็บเนื้อเยื่อไตบริเวณที่ใกล้กับก้นนี้่วไต และก้นนี้่วไตหลังการผ่าตัด สำหรับกลุ่มควบคุม (control) มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมสำหรับเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เป็นกลุ่มผู้มีสุขภาพดีที่ไม่มีประวัติการเป็นนี้่วไต และความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ และกลุ่มควบคุมสำหรับเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต เป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไตออก (nephrectomy) โดยศัลยแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะเก็บเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นมะเร็งและส่วนที่ไม่ใช่ มะเร็ง

3. ผู้ทำการวิจัยทำการชักประวัติและเก็บข้อมูลพื้นฐานผู้ร่วมโครงการวิจัย ได้แก่ ภูมิภาค อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเป็นนิ่วหรือประวัติการเป็นมะเร็งไต และประวัติการเป็นโรคอื่นๆ ในระบบเดินปัสสาวะ (ภาคผนวก ค)

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. การเก็บเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยเก็บเนื้อเยื่อไตบริเวณที่ใกล้กับก้อนนิ่ว และจากกลุ่มควบคุมจากผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไตออก โดยศัลยแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะเก็บเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นมะเร็งและส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง เก็บใน RNA later เพื่อรักษาคุณภาพและปริมาณ RNA ของเนื้อเยื่อไตในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน แล้วจึงนำมาเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

2. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จะใช้ thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บครบ 24 ชั่วโมง วัดปริมาตร และวัดค่าความเป็นกรดต่าง แล้วนำมาแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3. การเก็บตัวอย่างก้อนนิ่ว ทำการเก็บก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้จากการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เก็บตัวอย่างนิ่วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับรอทำการวิเคราะห์ชนิดของนิ่วต่อไป

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวัดปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดผลึกนิ่วและวัดปริมาณเซลล์และการเกิดผลึกนิ่ว

1.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง โดยนำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงมาวัดค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่อง pH meter

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณออกซาลेटในปัสสาวะ นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีมาตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปหาปริมาณออกซาลेट (Sigma, USA) โดยใช้หลักการ enzymatic reaction จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร เทียบกับออกซาลेटมาตรฐานที่ทราบค่า

1.3 การวิเคราะห์วัดปริมาณเซลล์และผลึกนิ่ว นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มผู้มีสุขภาพดีปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนในทิ้ง ให้เหลือตะกอนที่ก้นหลอด 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาตรวจนับวิเคราะห์จำนวนและชนิดของเซลล์ และผลึกนิ่ว โดยปัสสาวะที่พบเซลล์เม็ดเลือดขาว มากกว่า 5

cells/ HPF ถือว่ามีสัญญาณของการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ จัดอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะร่วม

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีน การวิเคราะห์ครีเอตินีนในปัสสาวะใช้หลักการของ Jaffe (57) ซึ่งเป็น modified picric acid method โดยใช้ปัสสาวะเจือจาง 200 เท่า ทำปฏิกิริยากับ 1.4 N NaOH และ 0.04 M Picric acid นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เทียบกับค่าครีเอตินีนมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยปริมาณโปรตีนในปัสสาวะสามารถตรวจได้โดยวิธี Lowry method (58) โดยผสม Lowry A: 2% (w/v) Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH กับ Lowry B: 1% (w/v) copper sulfate และ Lowry C: 2% (w/v) sodium potassium tartrate ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ในอัตราส่วน 98: 1: 1 โดย Lowry stock reagent (Lowry A: Lowry B: Lowry C ในอัตราส่วน 98: 1: 1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรผสมกับปัสสาวะปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยากับ Folin's reagent (Folin-Ciocalteu reagent) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าโปรตีน bovine serum albumin มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

1.6 การวิเคราะห์อัตราการกิริยาของเอนไซม์ *N*-acetyl gluosaminidase (NAG) โดยนำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาหาอัตราการกิริยาของเอนไซม์ *N*-acetyl gluosaminidase (NAG) โดยวิธีของ Horak และคณะ (59) โดยนำปัสสาวะมาทำปฏิกิริยากับ 0.9% NaCl และ NAG substrate นำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

1.7 การวิเคราะห์ปริมาณ oxidative DNA damage (8-OHdG) ในปัสสาวะ โดยนำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง บั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปตรวจวัดปริมาณของ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) โดยใช้หลักการ competitive *In vitro* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (JalCA, Japan) วิธีการโดยย่อ คือ นำตัวอย่างปัสสาวะปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ primary antibody ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing solution buffer 3 ครั้ง แล้วทำปฏิกิริยากับ secondary antibody ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing solution buffer 3 ครั้งแล้ว เติม chromatic solution: diluting solution (1:100) ที่งไว้ที่มีด 15 นาที จะเกิดสีฟ้าอ่อน ให้นำชุดปฏิกิริยาด้วย terminating solution จะทำให้เกิดสีเหลือง นำมาวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader นำค่าที่ได้มาเทียบกับ 8-OHdG มาตรฐานที่ทราบค่า

2. การตรวจวัดสารเพื่อประเมินภาวะเครียดจากออกซิเดชันของเนื้อเยื่อไต

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ oxidative DNA damage (8-OHdG) ในเนื้อเยื่อไต โดยนำเนื้อเยื่อไตของกลุ่มตัวอย่างโรคนิวไตและกลุ่มควบคุมโรคมะเร็งไตทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) มาสกัดดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อไต โดยตัดชิ้นเนื้อชิ้นละประมาณ 30 ไมโครกรัม นำมาปั่นให้ชิ้นเนื้อละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer ใน white blood cell lysis buffer (Roche, Germany) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วย protein precipitation solution (Roche, Germany) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตูดส่วนใสใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ (sterile) จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร สำหรับล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วคว่ำหลอดให้แห้งประมาณ 2 ชั่วโมง จึงเติม TE buffer, pH 8.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดไป incubate เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้ละลาย จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.1.2 การวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ sterile deionized water อัตราส่วน 1:50 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 260, 280 และ 320 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเข้มข้นโดยนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรคูณกับค่า dilution factor (ในที่นี้ คือ 50) คูณด้วย conversion factor ของการวัดดีเอ็นเอ คือ 50 (dsDNA in H₂O: 1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml) ส่วนการบอกความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ คำนวณจากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรหารด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งอัตราส่วนที่ได้ต้องอยู่ในระหว่าง 1.6-1.9

2.1.3 การย่อยดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ deoxyribonuclease I (Dnase I) (Dnase I ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใน 10X reaction buffer with MgCl₂ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)

ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ใน 10X NEBuffer3 ปริมาณ 12 ไมโครลิตร โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ย่อยแล้ว (สารละลายนิวคลีโอไซด์) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวัดปริมาณของ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ต่อไป

2.1.4 การวัดปริมาณ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปตรวจวัดปริมาณของ 8-OHdG ตามหลักการ competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (JalCA, Japan) วิธีการโดยย่อ คือ นำสารละลายนิวคลีโอไซด์ (จากข้อ 2.1.3) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน ELISA plate ที่เคลือบ (pre-coated) ด้วย 8-OHdG แล้วเติม primary antibody นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing solution buffer 3 ครั้ง แล้วเติม secondary antibody นำไป incubate อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing solution buffer จำนวน 3 ครั้ง เติม chromatic solution:diluting solution (1:100) ทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 15 นาที จะเกิดสีฟ้าอ่อน หยุดปฏิกิริยาด้วย terminating solution จะทำให้เกิดสีเหลือง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader ปริมาณ 8-OHdG ในสารตัวอย่างคำนวณจากกราฟของสารละลาย 8-OHdG มาตรฐาน

3. การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะ

นำเนื้อเยื่อไตของกลุ่มตัวอย่างและในกลุ่มควบคุมจะใช้เนื้อเยื่อทั้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของ MUC1 mRNA และ MUC2 mRNA ในการยืนยันอีกครั้งว่าเนื้อเยื่อไตที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเป็นบริเวณที่ไม่ใช่ส่วนที่เป็นมะเร็งจริง ซึ่งผู้ป่วยมะเร็งไตจะมีการแสดงออกของ MUC1 mRNA และ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไตที่ผิดปกติ

3.1 การตรวจวัดการแสดงออกของ MUC1 mRNA และ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไต

3.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อไต โดยนำเนื้อเยื่อไตประมาณ 30 ไมโครกรัม มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ RNA isolation kit (Promega, USA) โดยอาร์เอ็นเอ ที่สกัดได้นำมาวัดและคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรคูณกับค่า dilution factor คือ 50 แล้วคูณด้วย conversion factor ของการวัดอาร์เอ็นเอ คือ 40 (RNA in H₂O: 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml) ส่วนการบอกความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

คำนวณจากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรหารด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งอัตราส่วนที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 1.6 -1.9 แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยให้สุดท้ายมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยวิธี two step RT-PCR (Promega, USA) โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำ total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ random hexamer primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรแล้วผสมกับ nuclease free water ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้ว heat ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (PCR Sprint, ThermoHybaid) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นให้แช่สารละลายในน้ำแข็งทันที อย่างน้อย 5 นาที จากนั้นเติม ImProm-II™ reverse transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5x ImProm-II™ reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1x), 2.5 mM MgCl₂ ปริมาตร 2.4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 3mM), 10 Unit ของ dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 unit), 40 U/ul recombinant RNasin ribonuclease inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 20 unit) และ nuclease-free water ปริมาตร 5.1 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทำ reverse transcription (RT) โดยให้ annealing step อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียสจำนวน 1 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ขั้น extend step อยู่ที่ 42 องศาเซลเซียสจำนวน 1 รอบ เป็นเวลา 60 นาที และขั้น inactivation ของเอนไซม์ reverse transcriptase ที่ 70 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ cDNA ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวัดการแสดงออก mRNA ของ MUC1 และ MUC2 ต่อไป

3.1.3 ตรวจวัดการแสดงออก mRNA ของ MUC1 และ MUC2 โดยนำ cDNA มาตรวจวัดการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 โดยวิธี two step real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real time RT-PCR) (Qiagen, Germany) โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ MUC1 และ MUC2 และใช้ Beta-2 microglobulin (B2M) เป็น internal control ซึ่ง primers ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 3

Target	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
MUC1	5'-agacgtcagcgtgagtgatg-3'	5'-cagctgcccgtagttcttcc-3'	57	172
MUC2	5'-ggtaaaacgacccacacaa-3'	5'-caaacaggctgtccttgatg-3'	55	70
B2M	5'-ggctatccagcgtactccaa-3'	5'-tcaggaaatttgacttccattc-3'	55	74

ตารางที่ 3 แสดง primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 โดยวิธี real time RT-PCR

ขั้นตอนการทำ real time RT-PCR โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำ cDNA ที่ได้จาก ข้อ 3.3.2 มา 2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ PCR mix reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ PCR grade water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ในหลอด capillary (Roche, Germany) แล้วปั่นเบาๆให้สารละลายตกลงไปที่ก้นหลอด แล้วนำมาทำ realtime RT-PCR (Roche, Germany) โดยการกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้ใช้ตามที่บริษัทกำหนดในบรรจุภัณฑ์ แต่ให้ใช้ annealing temperature ตามแต่ละยีนดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมี B2M เป็น internal control และ calibrator ที่ใช้สำหรับคำนวณค่า relative gene expression (แสดงค่าเป็น normalized ratio) โดยใช้โปรแกรม LightCycler 4.05 software (Roche, Germany) ซึ่งจะได้ค่า Cp (crossing point) คือ จำนวนรอบที่น้อยที่สุดของ PCR ที่ให้สัญญาณของ SYBR green fluorescence ที่เท่ากัน นั่นคือค่า Cp ต่ำแสดงว่ามีการแสดงออกของยีน (ระดับ mRNA) สูง ควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์โดยการทำ no template control ซึ่งจะเป็นหลอดที่มีทุก amplification reagent แต่จะไม่มี cDNA template โดยจะใช้ PCR grade water แทน ซึ่งผลของการทำ realtime RT-PCR ของ no template control จะต้องมีค่า Cp

3.1.4 วิธีการคำนวณค่า ΔC_p และ ค่า normalized ratio ในการเปรียบเทียบ gene expression ในเนื้อเยื่อไตจากการทำ realtime RT-PCR โดยใช้วิธี comparative method หรือ $2^{-\Delta\Delta C_p}$ method (Roche, Germany) จากสมการดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณค่า ΔC_p ของตัวอย่างและของ calibrator โดย

$$\text{ค่า } \Delta C_p = C_p \text{ ของตัวอย่าง} - C_p \text{ ของ internal control}$$

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณค่า $\Delta\Delta C_p$ ของตัวอย่างและของ calibrator โดย

$$\text{ค่า } \Delta\Delta C_p = \Delta C_p \text{ ของตัวอย่างและของ calibrator} - \Delta C_p \text{ ของ calibrator}$$

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณค่า normalized target gene expression หรือ ค่า normalized ratio

$$\text{โดยค่า normalized ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

จากนั้นนำค่า ΔC_p และค่า normalized ratio มาเปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่าง โดยค่า ΔC_p สูง แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนน้อยหรือแสดงค่า normalized ratio ต่ำ ส่วนค่า ΔC_p ต่ำ แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนมากหรือแสดงค่า normalized ratio สูง

4. การแยกมิวซินโดยวิธี CL-2B gel filtration chromatography

4.1 การเตรียมสิ่งตัวอย่างในการแยกมิวซินในปัสสาวะ นำ pooled urine ที่ปั่นเอาตะกอนออกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 500 มิลลิลิตร มาทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilized) จากนั้นละลายกลับด้วย 1x guanidine reduction buffer (GuRB) (0.1M Tris-HCl/ 5 mM EDTA ใน 6 M GuHCl, pH 8.0) เขย่าให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน ปั่นเอาตะกอนออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 การเตรียม column โดยใช้ column ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 25 เซนติเมตร ตั้งยึดกับขาตั้งให้ตรง จากนั้นใส่ glass wool ปิดตรงส่วนปลาย column ให้แน่น เพื่อไม่ให้เจลไหลออกจาก column จากนั้นเทเจล sepharose CL-2B (Pharmacia Biotech, Sweden) ที่ละลายอยู่ใน 20% ethanol ให้เจลมีความสูง 14 เซนติเมตรจากความยาวของ column หรือปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดย sepharose CL-2B จะมี agarose ปริมาณ 2 % สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาด $70 \times 10^3 - 40 \times 10^5$ ดาลตัน มีขนาดของเม็ด bead อยู่ระหว่าง 60 - 200 kDa จากนั้นปรับ flow rate ให้มีความเร็ว 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที โดยค่อยๆ เติม 20% ethanol ลงใน column ให้ solution ไหลออก 3 - 4 column volume หรือ 75 - 100 มิลลิลิตร โดยระวังให้หน้าเจลเรียบเสมอกัน

4.3 การแยกมิวซิน ปล่อยให้ 20% ethanol ที่อยู่ใน column ไหลออกจนเกือบหมดให้เหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตรจากหน้าเจล ระวังไม่ให้เจลแห้ง จากนั้นค่อยๆ ริน 4M guanidine hydrochloride (4M GuCl) ให้ไหลผ่านเจล 2 column volume หรือ 50 มิลลิลิตรจนสุดท้ายให้เหลือ 4M GuCl ประมาณ 0.5 เซนติเมตรจากหน้าเจล แล้วจึงใส่ตัวอย่าง pooled urine ที่ได้เตรียมไว้แล้วลงใน column ให้ท่วมหน้าเจลเสมอกัน ค่อยๆ ปล่อยให้ solution ไหลออก แล้วค่อยๆ เติม 4M GuCl ลงใน column ระวังไม่ให้เจลแห้งโดยมี flow rate ที่ความเร็ว 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที เก็บ solution ที่ไหลออกปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งหลอดหรือ fraction เป็นจำนวน 80 fractions จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

4.4 การย้อมสี periodic acid Schiff (PAS staining) ใน CL-2B fractions นำ hybond-P PVDF membrane มาทำให้เปียก (wet) ด้วย absolute methanol นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง นาน 5 นาที แช่ใน 1x TBS- T (1x TBS, pH 8.0 containing 0.05% Tween 20) รวม 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำแผ่น membrane วางบน slot blot apparatus

จากนั้น load สารตัวอย่าง ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง section pump จนกว่า ปัสสาวะจะซึมผ่านแผ่น membrane จนหมด จากนั้นนำแผ่น membrane ออกจาก slot blot แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น incubate ด้วย oxidizing solution (1% (w/v) periodic acid 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 3% ((v/v) acetic acid 3 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วย 0.1% (w/v) sodium metabisulfite ใน 1 M HCl 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น membrane มา incubate ใน Schiff's Fuchsin-sulfite reagent ประมาณ 15-20 นาที จนกระทั่งเห็น band เป็นสีชมพู แล้วล้างด้วย sodium metabisulfite solution 1 ครั้ง 5 นาที ตามด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาฝั่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วแผ่น membrane ที่แห้งแล้วมา scan แล้วนำรูปที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบสีด้วยโปรแกรม Gel Doc (Biorad, USA)

4.5 การวิเคราะห์ MUC1 และ MUC2 immunodetection

4.5.1 การย้อม MUC1 และ MUC2 immunodetection โดยนำ hybond- P PVDF membrane มาล้างด้วย absolute methanol นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วล้าง membrane ใน TBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้ววางแผ่น membrane ลงใน slot blot ใส่ pooled urine 150 ไมโครลิตร แล้วต่อ slot blot ต่อเข้ากับเครื่อง section pump รอประมาณ 5 นาทีหรือจนกว่าปัสสาวะจะซึมผ่านแผ่น membrane จนหมด จากนั้นนำแผ่น membrane ออกจาก slot blot แล้วล้างด้วย TBS-T 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้ว block membrane ด้วย 5% (w/v) non-fat dried milk ใน TBS-T เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย TBS-T 1 ครั้ง แล้ว incubate membrane ด้วย Mucin1 (VU 4H5) mouse monoclonal antibody (1:1000) หรือ MUC2 antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย TBS-T รวม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้ว incubate membrane ด้วย HRP-mouse secondary antibody (1:8,000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น membrane มา incubate ด้วย ECL western blotting detection reagents (Amersham bioscience, UK) เป็นเวลา 1 นาที แล้วรืบนำแผ่น membrane มาวางที่ hypercassette ล้างฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด

4.5.2 การล้างฟิล์มเอกซเรย์ นำแผ่น membrane ที่ incubate ด้วย ECL western blotting detection reagents (Amersham bioscience, UK) วางใน hypercassette เพื่อล้างฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด โดยตัด hyper film™ ECL (Amersham bioscience, UK) ให้เท่ากับขนาดของ membrane แล้ววางฟิล์มทับกับด้านหน้าของ membrane ใน hypercassette

เป็นเวลา 1 นาที ล้างฟิล์มด้วยน้ำยา developer เป็นเวลา 45 วินาที แล้วล้างในน้ำยา fixer เป็นเวลา 5 นาที จะทำให้เห็นแถบสีดำตรงส่วนที่มี MUC1 และนำฟิล์มที่ได้ไปล้างน้ำประปาเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างฟิล์มให้แห้ง แล้วนำฟิล์มเอกซเรย์มา scan นำรูปที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบสีดำด้วยโปรแกรม Gel Doc (Biorad, USA)

5. การทดสอบบทบาทของมิวซินต่อการเกิดก้อนนิ่วในหลอดทดลอง

5.1 การเตรียม urinary mucin extract นำ pooled CL-2B fractions มาทำ dialysis เพื่อเอา 4M guanidine hydrochloride ออก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ pooled CL-2B fractions ที่ผ่านการทำ dialysis แล้วเอาน้ำออกเพื่อให้ปริมาณมิวซินที่ได้เข้มข้นขึ้นโดยการ speedvac เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป

5.2 การคำนวณหาปริมาณของมิวซินในแต่ละ pooled CL-2B fraction นำ pooled fractions ของปัสสาวะของคนปกติและของผู้ป่วยโรคนิ่วไต จากการทำ CL-2B gel filtration chromatography ใส่ลงในหลอด micro tube ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปซึ่งบันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นนำหลอดไป speedvac ให้แห้งสนิทประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ จะได้ปริมาณตะกอนของ pooled fraction แล้วคำนวณหาน้ำหนักของมิวซิน

5.3 การทดสอบการรวมกลุ่มผลึก (aggregation assay) เตรียมผลึก seed calcium oxalate monohydrate (COM) โดยผสม calcium chloride 100 มิลลิโมลต่อลิตรและ sodium oxalate มิลลิโมลต่อลิตร (อัตราส่วน 1:1) นำสารทั้ง 2 ชนิดมาอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน และเก็บผลึกโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน และทำให้ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับใช้ COM ที่เตรียมได้โดยเจือจางให้มีปริมาตร 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Tris buffer 0.05 โมลต่อลิตร และ sodium chloride 0.15 โมลต่อลิตร ที่ pH 6.5

นำมิวซินที่เตรียมได้ในแต่ละ pooled CL-2B fraction ปริมาณมิวซิน 50 มิลลิกรัม โดยให้ 1 หลอดเป็นหลอดควบคุม จากนั้นเติม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของผลึก seed COM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่ 0 นาที (AT_0) แล้วนำไปตรวจสอบผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์ light microscope จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่ 10 นาที (AT_{10}) แล้วนำไปตรวจสอบผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเกาะกลุ่มของผลึกที่มากขึ้นจะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืน

แสง (หรือ turbidity) ที่ลดลง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่ม (aggregation coefficient) จากสมการ

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

5.4 การวิเคราะห์กรดไซเอลิก (total sialic acid) ใน CL-2B pooled fraction โดยนำแต่ละ pooled CL-2B fraction มา 200 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ periodic reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำปฏิกิริยากับ 2% sodium arsenite ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและ 0.1M TBA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 7.5 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วเติม DMSO 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 549 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอและเปรียบเทียบข้อมูลตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) โดยการใช้ค่าแนวโน้มเข้าสู่ส่วนกลาง (central tendency) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ค่ากลาง (median) ค่าต่ำสุด (min) ค่าสูงสุด (max) และการใช้ตารางแจกแจงความถี่และร้อยละ (percentage) สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) และการสร้างกราฟ จะใช้โปรแกรม microsoft excel

ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้สถิติ two sample t-test และ Mann-Whitney test สำหรับข้อมูลที่มีมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไปจะใช้ ANOVA test และ Kruskal-Wallis test เมื่อข้อมูลไม่ผ่านข้อตกลงเบื้องต้นของ two-samples t-test และ ANOVA test เช่น ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (skewed distribution data) จะเลือกใช้ non parametric test (Mann-Whitney test และ Kruskal-Wallis test) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง categorical variables จะทดสอบโดย chi-square test สำหรับประสิทธิภาพความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร คำนวณจาก Pearson's correlation test หรือ Spearman' rank correlation test ขึ้นอยู่กับชนิดของข้อมูล

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

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนมิวซินในเนื้อเยื่อไต

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNA และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) ในเนื้อเยื่อไต มีประชากรเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 38 ราย (ตารางที่ 3) แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคไตจำนวน 31 ราย เป็นเพศชาย 9 ราย (ร้อยละ 29.3) เพศหญิง 22 ราย (ร้อยละ 71.0) อายุเฉลี่ยเท่ากับ 51.9 ปี ค่า median เท่ากับ 54.0 ปี (ช่วงอายุตั้งแต่ 31-72 ปี) และกลุ่มควบคุมจำนวน 7 ราย เป็นเพศชาย 4 ราย (ร้อยละ 57.1) เพศหญิง 3 ราย (ร้อยละ 42.9) อายุเฉลี่ยเท่ากับ 61.9 ปี ค่า median เท่ากับ 60.0 ปี (ช่วงอายุตั้งแต่ 43-97 ปี) โดยกลุ่มควบคุมเป็นผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไตออกและไม่มีประวัติของการเป็นนิ่ว เก็บเนื้อเยื่อไตทั้งส่วนที่ไม่เป็นมะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion)

ดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไตไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.1875$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต	กลุ่มผู้ป่วยโรคไต
จำนวนประชากรศึกษา	7	31
เพศ (ชาย: หญิง)	4: 3	9: 22
อายุ (mean: SD) (median: min-max)	61.9: 18.4 60.0: 43-97	51.9: 11.4 54.0: 31-72
BMI (mean: SD) (median: min-max)	20.7: 3.2 21.5: 16.2-25.4	23.4: 3.6 23.3: 16.8-36.5

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรที่ใช้เนื้อเยื่อไตในการศึกษา

กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ urine biochemistry profile

ในการศึกษาปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนิ่วไต (hyperoxaluria และ hypocitraturia) ภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไต และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และบทบาทของมิวซินต่อการเกิดนิ่วไตในปัสสาวะ มีประชากรเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 58 ราย (ตารางที่ 5) แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตจำนวน 27 ราย เป็นเพศชาย 8 ราย (ร้อยละ 29.6) เพศหญิง 19 ราย (ร้อยละ 70.4) ค่าอายุเฉลี่ยเท่ากับ 51.5 ปี ค่า median เท่ากับ 54.0 ปี (ช่วงอายุตั้งแต่ 31-68 ปี) และกลุ่มควบคุมจำนวน 31 ราย เป็นเพศชาย 14 ราย (ร้อยละ 45.2) เพศหญิง 17 ราย (ร้อยละ 54.8) ค่าเฉลี่ยของอายุกลุ่มควบคุมเท่ากับ 38.4 ปี ค่า median เท่ากับ 40.0 ปี (ช่วงอายุตั้งแต่ 23-59 ปี) กลุ่มควบคุมเป็นผู้มีสุขภาพดีไม่มีประวัติของการเป็นนิ่วและความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะอื่นๆ

อายุของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ขณะที่ดัชนีมวลกายของผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงและกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.188$) ดังตารางที่ 5

ลักษณะของกลุ่มประชากรศึกษา	กลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี	กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต
จำนวนประชากรศึกษา	31	27
เพศ (ชาย: หญิง)	14: 17	8: 19
อายุ (mean: SD)	38.4: 11.4	51.5: 10.9
(median: min-max)	40 : 23 - 59	54: 31 - 68
BMI (mean: SD)	22.4: 3.2	23.1: 2.5
(median: min-max)	22.1: 17.3 - 31.1	23.3: 16.8 - 26.8

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรที่ใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมงในการศึกษา

การศึกษา metabolic profile

ค่าความเป็นกรด-ด่างในปัสสาวะ (urine pH) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.002$) ขณะที่ปริมาตรของปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ($P = 0.585$) และระดับ

ของครีเอตินีน ($P = 0.095$) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับของออกซาเลตในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.413$) แต่ระดับของซิเตรตกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.004$) (ตารางที่ 6)

characteristic and metabolic profile	disease status		P value
	healthy (n=31)	nephrolithiasis (n=27)	
24-hr urine volume (ml) mean: SD median: min-max	1978.71: 717.61 1840: 810-3870	2170.0: 832.24 2200: 1050-4200	0.585
urine pH mean: SD median: min-max	6.26: 0.29 6.22: 5.70- 6.86	6.80: 0.76 6.84: 5.52- 8.62	0.002*
creatinine (g/day) mean: SD median: min-max	1.17: 0.40 1.03: 0.63- 1.90	0.98: 0.25 0.97: 0.64-1.43	0.095
oxalate (mg/day) mean: SD median: min-max	26.78: 22.09 21.19: 2.45-91.53	26.47: 12.93 24.47: 8.49- 57.48	0.413
citrate (mg/day) mean: SD median: min-max	287.35: 184.66 267.75: 42.48- 787.09	172.31: 195.50 104.53: 7.10- 931.76	0.004*

ตารางที่ 6 แสดงระดับของ characteristic and metabolic profile ในปัสสาวะเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคนิ่วไต (* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test, $P < 0.05$)

เมื่อประเมินภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) และภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) โดยใช้เกณฑ์อ้างอิงตามตารางที่ 7 พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 14.2) กลุ่มควบคุมพบภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง 6 ราย (ร้อยละ 19.4) ซึ่งสัดส่วนการพบภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.544$) (ตารางที่ 8) ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำจำนวน 20 ราย (ร้อยละ 74.1) กลุ่มควบคุมพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ 14 ราย (ร้อยละ 45.2) สัดส่วนการพบภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.034$) (ตารางที่ 8)

metabolic abnormality	cutoff value
hyperoxaluria	urinary oxalate > 0.45 mmol/day (> 40 mg/day)
hypocitraturia	urinary citrate < 250 mg/day

ตารางที่ 7 แสดงค่าอ้างอิงภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) และภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia)

Metabolic abnormality	Disease status		P value
	Healthy (n=31)	nephrolithiasis (n=27)	
Hyperoxaluria			0.544
- No	25 (80.6%)	23 (85.2%)	
- Yes	6 (19.4%)	4 (14.2%)	
Hypocitraturia			0.034*
- No	17 (54.8%)	7 (25.9%)	
- Yes	14 (45.2%)	20 (74.1%)	

ตารางแสดงที่ 8 แสดงความถี่ของความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่พบในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ chi square test, $P < 0.05$)

การศึกษาภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไต และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

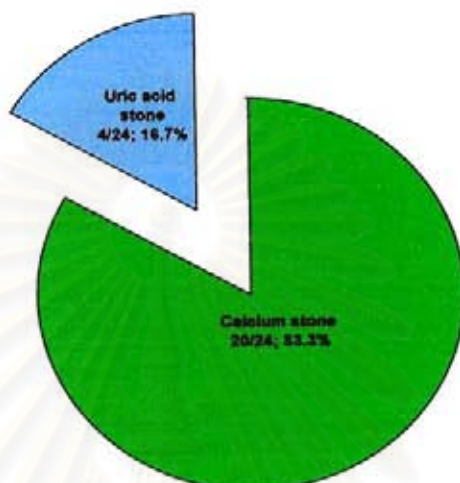
การศึกษานี้ใช้ตัวบ่งชี้ (biomarker) สำหรับภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไต คือ *N*-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity และโปรตีนในปัสสาวะ สำหรับตัวบ่งชี้สำหรับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ผลการศึกษาพบว่า ระดับของ NAG activity ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับระดับของโปรตีนในปัสสาวะที่พบสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตเมื่อเปรียบเทียบกับควบคุม ($P < 0.001$) ระดับผลิตผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DNA (8-OHdG) ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) แสดงว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และภาวะการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติ

Urine biochemistry	Disease status		P value
	Healthy (n=31)	Nephrolithiasis (n=27)	
urinary NAG activity (U/g Cr)			<0.001*
mean: SD	3.17: 1.78	8.08: 6.76	
median: min-max	2.81: 0.60- 8.81	4.90: 0.00- 23.83	
urinary protein (g/g Cr)			0.001*
mean: SD	0.09: 0.06	0.32: 0.25	
median: min-max	0.08: 0.03- 0.28	0.27: 0.02- 0.94	
urinary 8-OHdG (ug/g Cr)			<0.001*
mean: SD	6.35: 3.95	28.39: 26.40	
median: min-max	5.54: 1.92- 21.67	21.60: 3.02- 137.21	

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

ผลการวิเคราะห์ชนิดของนิ่ว

ผลการวิเคราะห์ชนิดของก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคไตจำนวน 24 ราย พบว่าเป็นนิ่วชนิดแคลเซียม 20 ราย (ร้อยละ 83.3) และนิ่วกรดยูริก 4 ราย (ร้อยละ 16.7) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงชนิดของก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคไต (calcium stone = นิ่วชนิดแคลเซียม, uric acid stone = นิ่วชนิดกรดยูริก)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของนิ่วและระดับการขับออกของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะ

ค่า median ของออกซาเลตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตชนิดนิ่วแคลเซียมเท่ากับ 27.52 mg/day (มีช่วงของปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ 11.58-57.48 mg/day) และค่า median ของออกซาเลตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตชนิดนิ่วกรดยูริกเท่ากับ 20.28 mg/day (มีช่วงของปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ 13.06-40.09 mg/day) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณการขับออกของออกซาเลตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตทั้ง 2 กลุ่ม ($P = 0.533$) (ตารางที่ 10)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการขับออกของซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า ค่า median ของซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตชนิดนิ่วแคลเซียมเท่ากับ 141.30 mg/day (มีช่วงของปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ 17.59-931.76 mg/day) ขณะที่ค่า median ของซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตชนิดนิ่วกรดยูริกเท่ากับ 70.80 mg/day (มีช่วงของปริมาณซี

เทรตในปัสสาวะ 19.90-300.01 mg/day) ซึ่งปริมาณของซิเทรตในปัสสาวะของทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.012$)

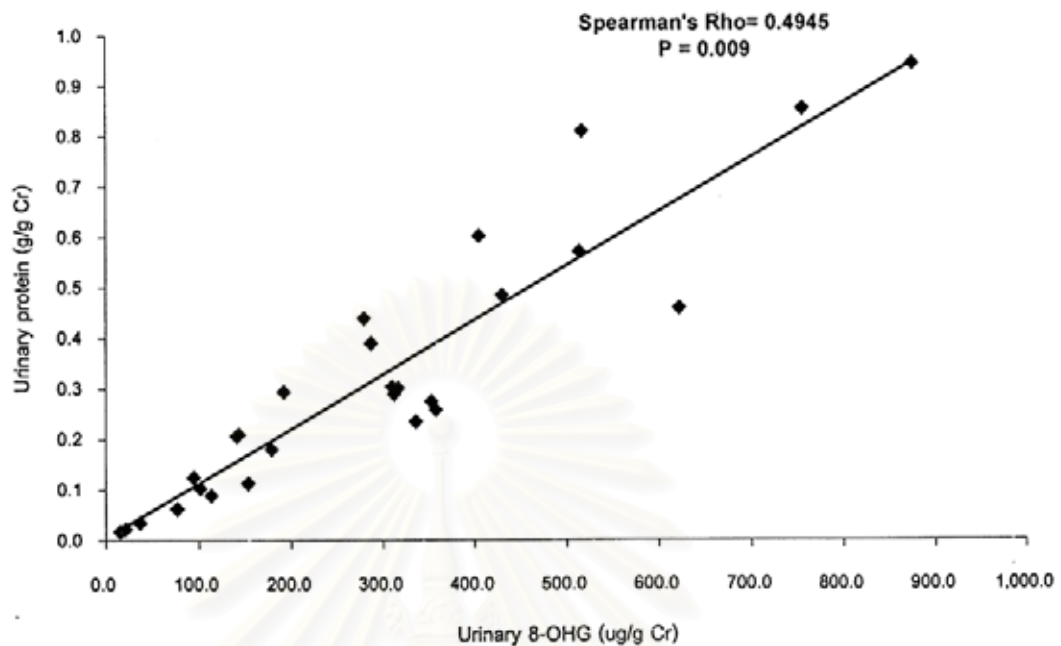
(ตารางที่ 10)

Variables	Calcium stone	Uric acid stone	P value
number of cases	20	4	
oxalate (mg/day)			0.533
mean: SD	29.96: 13.01	23.43: 12.11	
median: min-max	27.52: 11.58-57.48	20.28: 13.06-40.09	
citrate (mg/day)			0.012*
mean: SD	211.27: 220.29	115.38: 126.41	
median: min-max	141.30: 17.59-931.76	70.80: 19.90-300.01	

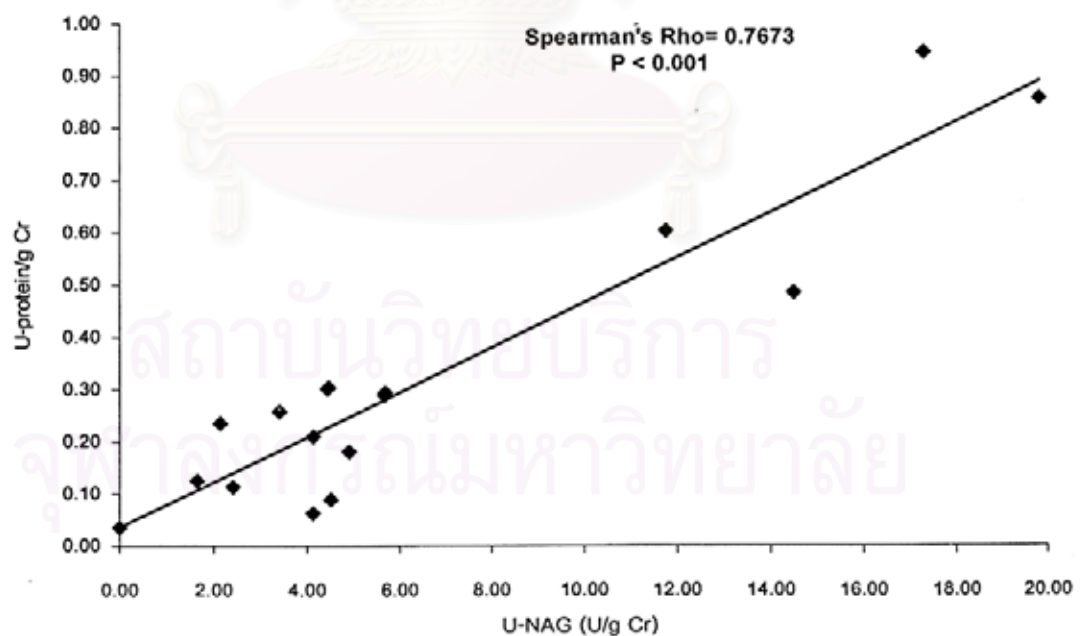
ตารางที่ 10 แสดงระดับการวิเคราะห์ปริมาณของออกซาเลตและซิเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีนิ่วแต่ละชนิด (* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ Mann-Whitney test, $P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะการทำลายเซลล์เยื่อท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต

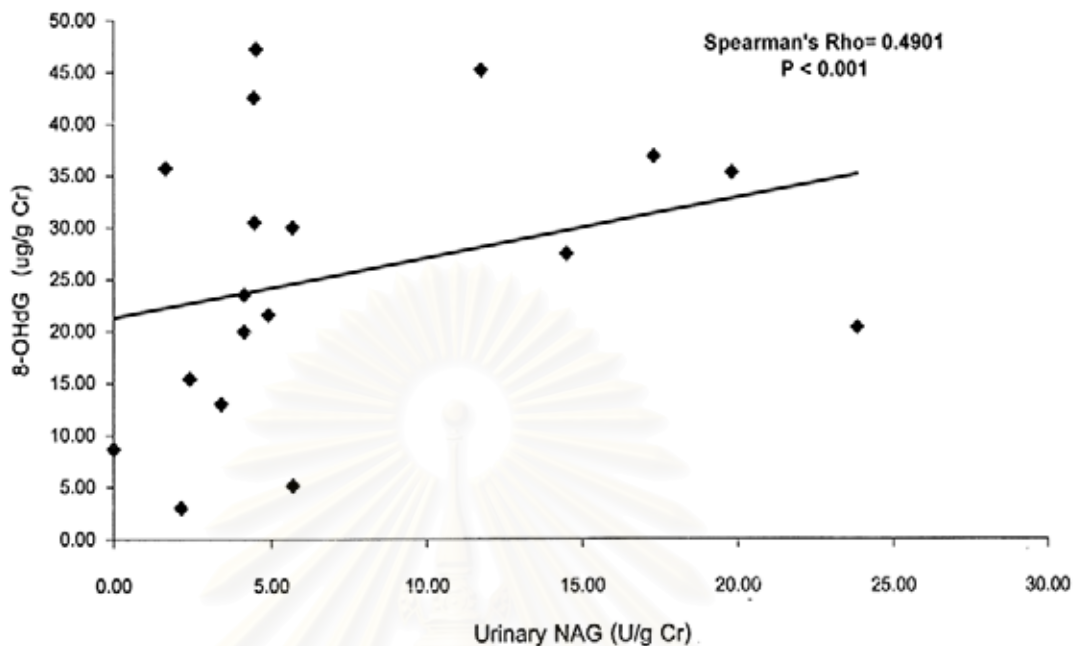
ระดับโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ 8-OHdG ที่ขับออกมาในปัสสาวะ (Spearman's Rho = 0.495, $P = 0.009$) (รูปที่ 7) พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะกับโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Spearman's Rho = 0.4208, $P = 0.029$) (รูปที่ 8) และพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะและปริมาณการขับออกของ 8-OHdG ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Spearman's Rho = 0.4901, $P < 0.001$) (รูปที่ 9)



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการขับออกของ 8-OHdG ในปัสสาวะ (urinary 8-OHdG) และปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (urinary proteins) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไต



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ (urinary NAG activity) และปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในปัสสาวะ (urinary proteins) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไต

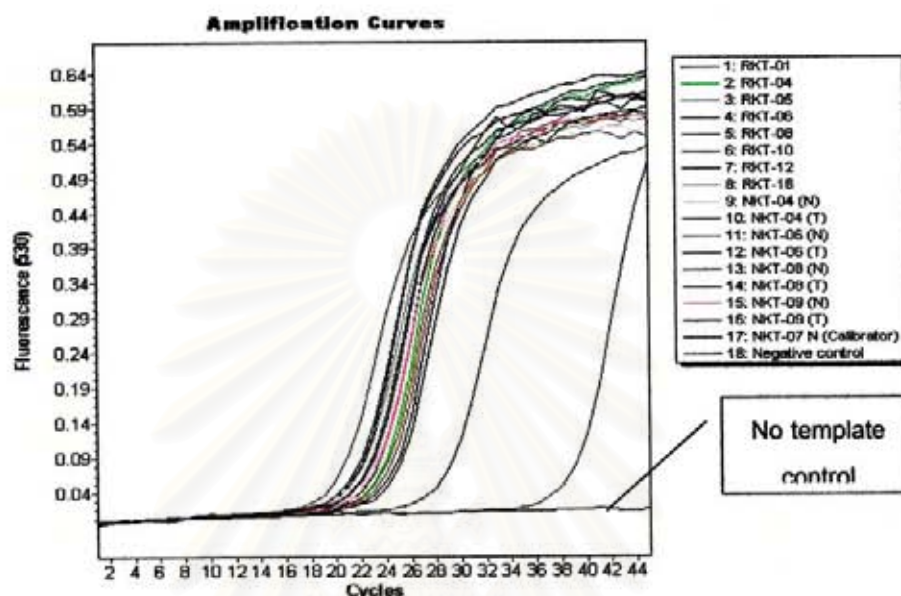


รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ NAG activity ในปัสสาวะ (urinary NAG activity) และปริมาณการขับออกของ 8-OHdG ในปัสสาวะ (urinary 8-OHdG) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไต

การวิเคราะห์ระดับของ MUC1 และ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไต โดยวิธี two step real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real time RT-PCR)

ศึกษาระดับของ MUC1 และ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไต เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต โดยวิธี real time RT-PCR โดยมี B2M เป็น internal control และใช้ calibrator ซึ่งเป็นตัวอย่าง cDNA จากเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง มาวัดทุกครั้งของการทำ realtime RT-PCR เพื่อใช้สำหรับคำนวณค่า relative gene expression (แสดงค่าเป็น normalized ratio) โดยค่า Cp (crossing point) คือจำนวนรอบที่น้อยที่สุดของ PCR ที่ให้สัญญาณของ SYBR green fluorescence ที่เท่ากัน นั่นคือค่า Cp ต่ำแสดงว่ามีการแสดงออกของยีน (ระดับ mRNA) สูง และควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์โดยการทำ no template control (ใช้น้ำกลั่นแทน cDNA template) นำมาคำนวณค่า ΔCp และ ค่า normalized ratio (Roche, Germany) โดยค่า ΔCp สูง แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนน้อยหรือแสดงค่า normalized ratio ต่ำ ส่วนค่า ΔCp ต่ำ แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนมากหรือแสดงค่า

normalized ratio สูง ดังรูปที่ 10 แสดงตัวอย่างผล real time RT-PCR โดยโปรแกรม LightCycler 4.05 software (Roche applied science, Germany)



รูปที่ 10 แสดง amplification curve ของ real time RT-PCR

พบการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนิ่วไตทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ (ร้อยละ 100) ในขณะที่พบการแสดงออกของ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตเพียงร้อยละ 64.2 ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ใช้ในการศึกษา (ตารางที่ 11)

ผลการวัดระดับ MUC1 mRNA ในเนื้อเยื่อไต พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าเฉลี่ย normalized ratio เท่ากับ 2.64 (SD; 2.01) (min-max; 0.11-7.57) (ตารางที่ 11) และมีค่า ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 5.82 (SD; 1.31) (min-max; 3.69-9.86) ในกลุ่มควบคุมการแสดงออกของ MUC1 mRNA ใน non-cancerous portion มีค่าเฉลี่ย normalized ratio เท่ากับ 2.40 (SD; 1.53) (min-max; 1.00-5.43) และค่า ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 5.81 (SD; 1.00) (min-max; 4.33-7.10) (ตารางที่ 12) สำหรับระดับ MUC1 mRNA ใน cancerous portion พบ ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 7.98 (SD; 3.52) (min-max; 4.25-14.61) ค่าเฉลี่ย normalized ratio เท่ากับ 1.49 (SD; 1.79) (min-max; 0.01-5.13) (ตารางที่ 12)

ระดับ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีค่า ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 20.50 (SD; 2.83) (min-max; 12.21-24.92) (ตารางที่ 11) ในกลุ่มควบคุมระดับการแสดงออก

ของ MUC2 mRNA ใน non-cancerous portion มีค่า ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 22.28 (SD; 3.03) (min-max; 17.27-25.87) (ตารางที่ 12) สำหรับระดับ MUC2 mRNA ใน cancerous portion พบ ΔC_p เฉลี่ยเท่ากับ 20.37 (SD; 4.56) (min-max; 11.04-25.42) (ตารางที่ 12)

Renal stone tissues (n = 31)	age (years)	MUC1		MUC2
		ΔC_p	normalized ratio	ΔC_p
RKT-01	59	5.82	1.73	18.29
RKT-02	50	5.45	3.14	12.21
RKT-03	54	6.22	1.84	18.27
RKT-04	66	6.62	0.99	20.22
RKT-05	63	5.5	2.16	19.84
RKT-06	61	4.1	5.70	16.06
RKT-07	61	5.26	3.58	24.02
RKT-08	43	5.84	1.71	19.93
RKT-09	31	6.43	1.59	20.69
RKT-10	62	3.89	6.59	18.43
RKT-11	36	5.73	2.58	22.71
RKT-12	34	7.21	0.66	19.86
RKT-13	31	4.99	4.32	23.98
RKT-14	43	6.23	1.83	20.64
RKT-15	50	4.5	6.06	21.17
RKT-16	68	3.69	7.57	20.11
RKT-17	45	6.41	1.16	18.65
RKT-18	47	6.15	1.39	24.07
RKT-19	54	6.79	0.89	23.02
RKT-20	35	6.67	0.97	16.81
RKT-21	56	4.76	3.63	22.82
RKT-22	46	6.52	1.07	19.26
RKT-23	51	6.2	1.34	19.86
RKT-24	39	4.65	3.92	20.46
RKT-25	55	5.86	1.69	23.33
RKT-26	67	4.35	4.82	24.92
RKT-27	60	9.86	0.11	19.89
RKT-28	60	5.26	2.57	23.75
RKT-29	51	7.44	0.57	19.51
RKT-30	58	7.92	0.41	24.67
RKT-31	72	4.22	5.28	18.18
Median	54	5.84	1.83	20.11
Mean	51.87	5.82	2.64	20.50
SD	11.41	1.31	2.01	2.83

Min	31	3.69	0.11	12.21
Max	72	9.86	7.57	24.92

ตารางที่ 11 แสดงการแสดงผลของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

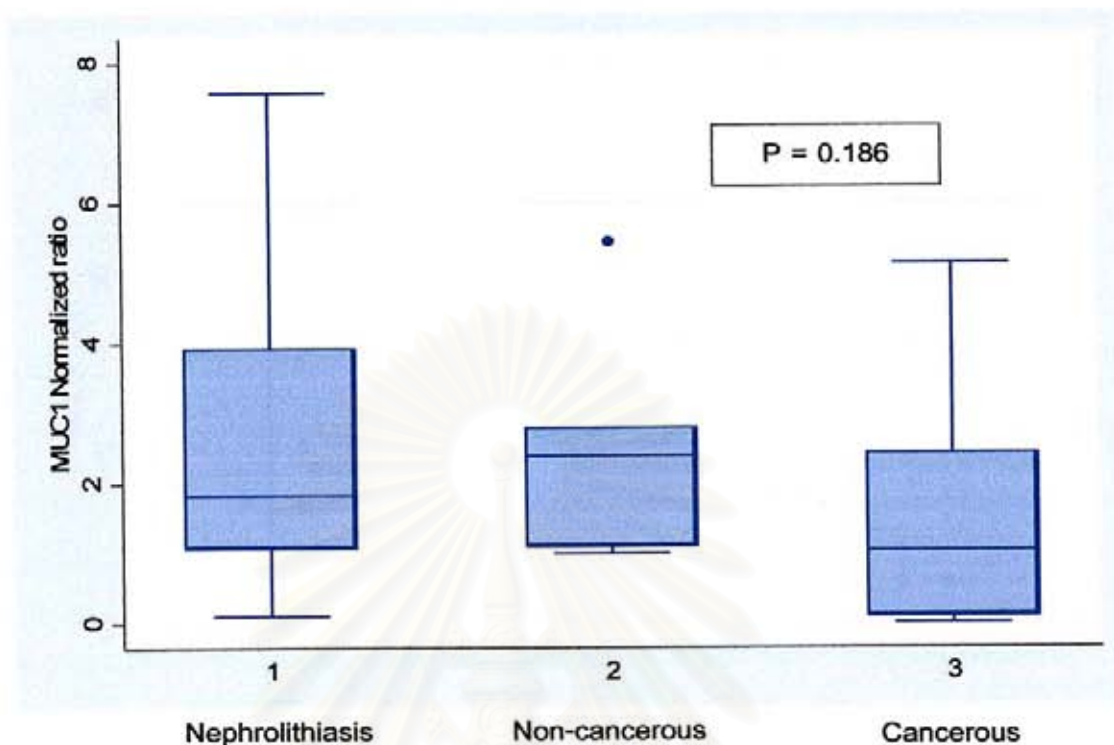
Renal cancer tissues (n = 7)	age (years)	MUC1		MUC2
		ΔC_p	normalized ratio	ΔC_p
non-cancerous tissue				
NKT-02 (N)	60	6.96	1.10	25.37
NKT-05 (N)	97	5.65	2.73	19.99
NKT-06 (N)	63	6.15	1.38	23.69
NKT-07(N)	72	7.1	1.00	25.87
NKT-08 (N)	50	5.35	2.39	17.27
NKT-09 (N)	48	5.13	2.79	21.92
NKT-10 (N)	54	4.33	5.43	21.86
Median	60	5.65	2.39	21.92
Mean	63.43	5.81	2.40	22.28
SD	16.93	1.00	1.53	3.03
Min	48	4.33	1.00	17.27
Max	97	7.10	5.43	25.87
cancerous tissue				
NKT-02 (N)	60	7.64	0.69	23.01
NKT-05 (N)	97	7	1.07	22.36
NKT-06 (N)	63	5.33	2.43	20.08
NKT-07(N)	72	10.47	0.10	21.03
NKT-08 (N)	50	4.25	5.13	11.04
NKT-09 (N)	48	6.57	1.03	19.67
NKT-10 (N)	54	14.61	0.01	25.42
Median	60	7.00	1.03	21.03
Mean	63.43	7.98	1.49	20.37
SD	16.93	3.52	1.79	4.56
Min	48	4.25	0.01	11.04
Max	97	14.61	5.13	25.42

ตารางที่ 12 แสดงการแสดงผลของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไตทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ผลการศึกษาการแสดงออกของมิวซินในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เนื้อเยื่อไตทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต พบการแสดงออกของ MUC1 สูงกว่าการแสดงออกของ MUC2 (ค่า ΔC_p ของ MUC1 ต่ำกว่าค่า ΔC_p ของ MUC2) และการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ระหว่างในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13) แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงกว่าการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตควบคุมทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (รูปที่ 11)

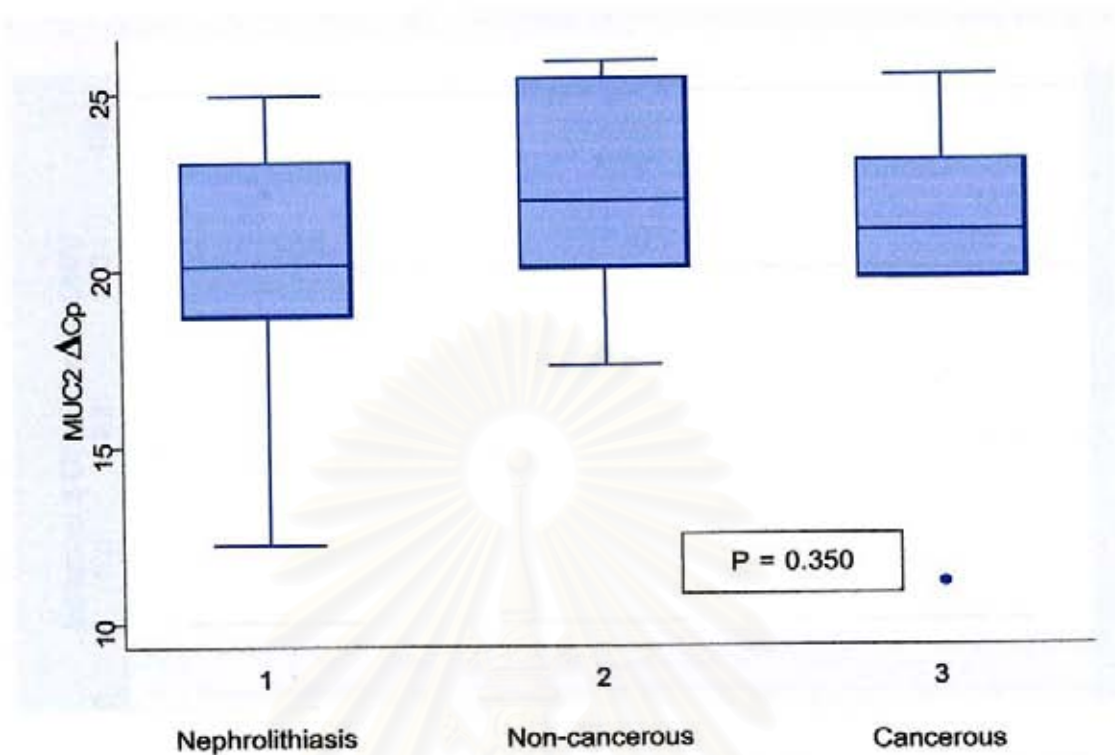
Gene expression	Renal tissues			P value
	Nephrolithiasis tissue	Non-cancerous portion	Cancerous portion	
<u>MUC1 normalized ratio</u>				
mean: SD	2.64: 2.01	2.40: 1.53	1.49: 1.79	0.186
median: min-max	1.83: 0.11-7.57	2.39: 1.00-5.43	1.03: 0.01-5.13	
<u>MUC1 ΔC_p</u>				
mean: SD	5.82: 1.31	5.81: 1.00	7.98: 3.52	0.192
median: min-max	5.84: 3.69-9.86	5.56: 4.33-7.10	7.00: 4.25-14.61	
<u>MUC2 ΔC_p</u>				
mean: SD	20.50: 2.83	22.28: 3.03	20.37: 4.56	0.350
median: min-max	20.11: 12.21-24.92	21.92: 17.27-25.87	21.03: 11.04-25.42	

ตารางที่ 13 แสดงการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (P values from Kruskal-Wallis test)



รูปที่ 11 กราฟ box plot แสดงระดับการแสดงออกของ MUC1 (แสดงโดยค่า normalized ratio) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)

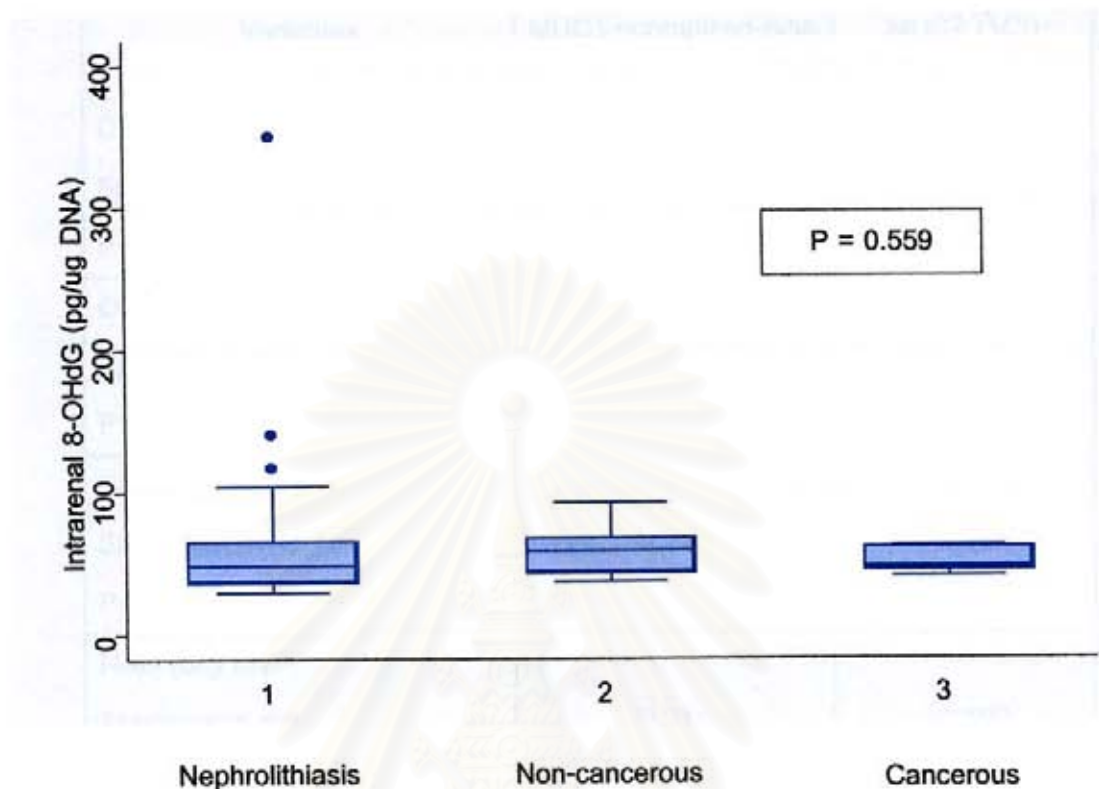
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 กราฟ box plot แสดงระดับการแสดงออกของ MUC2 (แสดงโดยค่า ΔC_p) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต

การศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต ใช้ตัวบ่งชี้ (biomarker) คือระดับผลิตผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ผลการศึกษาพบว่า ค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเท่ากับ 48.6 pg/g DNA (min-max; 26.92-349.27) ส่วนในกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต พบค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งเท่ากับ 61.06 pg/g DNA (min-max; 37.1-92.58 pg/gDNA) และค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งเท่ากับ 47.5 pg/g DNA (min-max; 40.6-62.5 pg/g DNA) ซึ่งเมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Kruskal-Wallis test พบว่าระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.599$) ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 กราฟ box plot แสดงระดับของ intrarenal 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตกับ urine biochemistry และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตกับ urine biochemistry และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (8-OHdG) ในปัสสาวะและในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต ทดสอบโดย Spearman's rank correlation test พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 14)

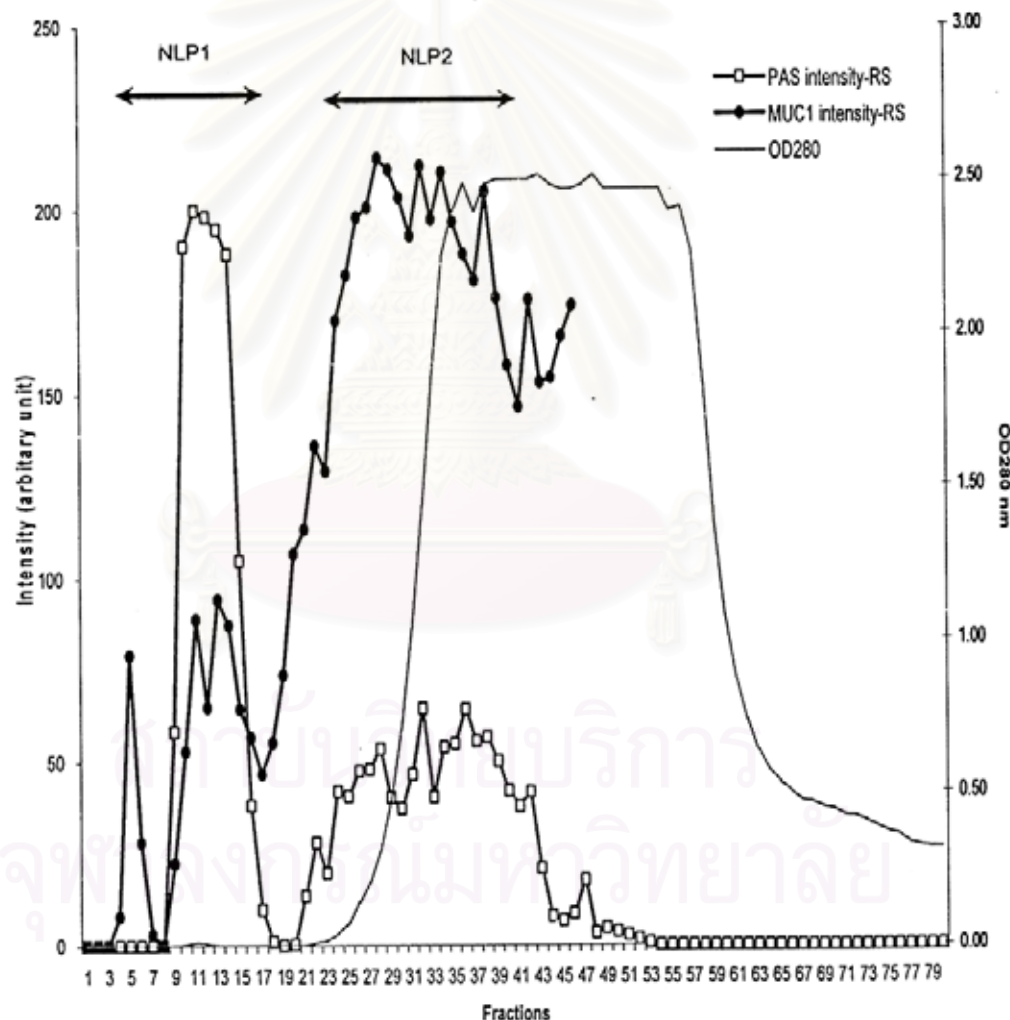
Variables	MUC1 normalized ratio	MUC2 ΔC_p
Creatinine (g/day)		
Spearman's rho	- 0.168	0.217
P value	0.402	0.278
Oxalate (mg/day)		
Spearman's rho	0.043	- 0.211
P value	0.830	0.290
Citrate (mg/day)		
Spearman's rho	0.222	- 0.307
P value	0.265	0.119
NAG (U/g Cr)		
Spearman's rho	0.316	- 0.100
P value	0.109	0.619
Protein (g/g Cr)		
Spearman's rho	0.098	- 0.111
P value	0.628	0.580
Urinary 8-OHdG (ug/g Cr)		
Spearman's rho	- 0.006	0.154
P value	0.976	0.444
Intrarenal 8-OHdG (pg/ug DNA)		
Spearman's rho	- 0.272	- 0.285
P value	0.139	0.121

ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต กับ urine biochemistry และระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (ทดสอบโดยใช้ Spearman' rank correlation test, $P < 0.05$)

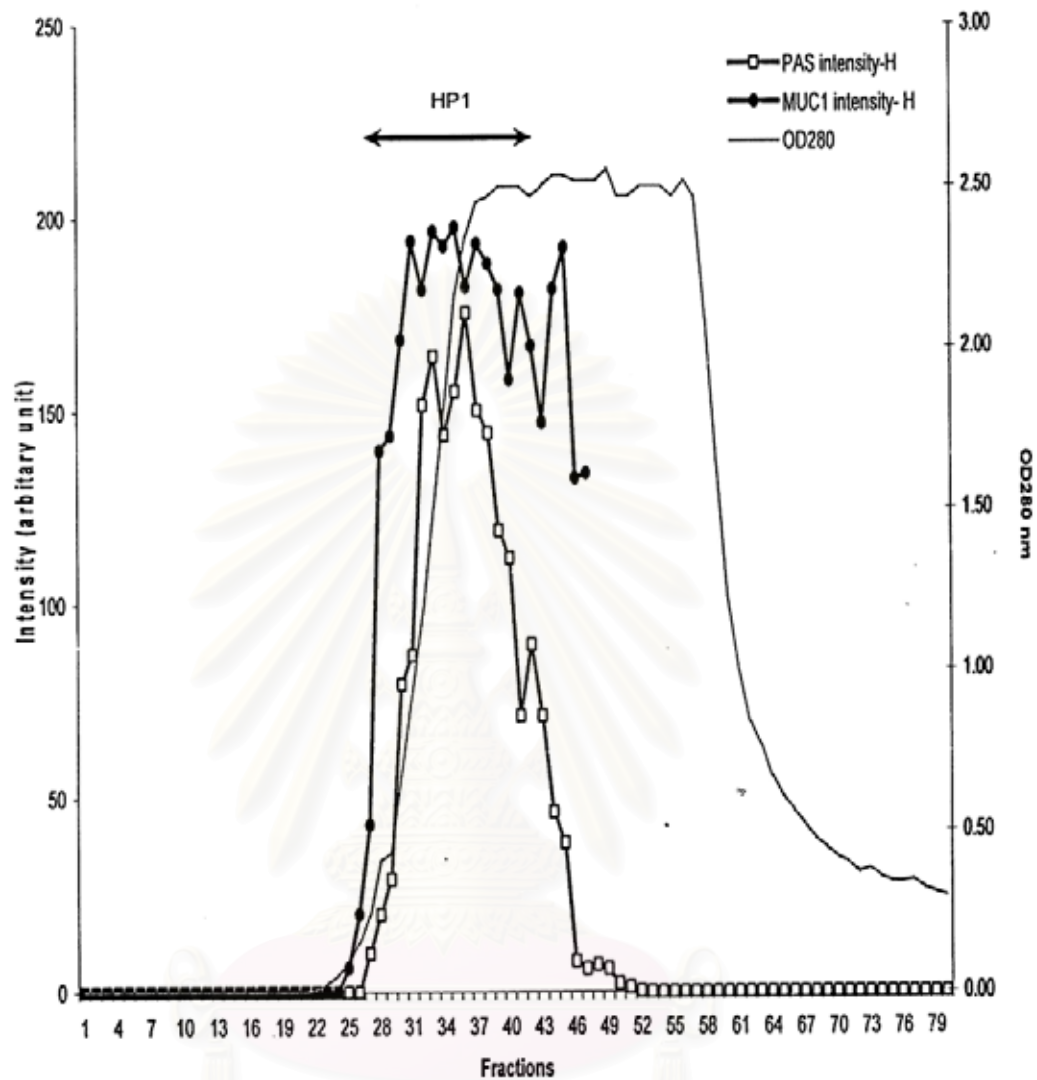
ผลการวิเคราะห์มีวซินในปัสสาวะ โดยวิธี CL-2B Gel filtration chromatography

ทำการแยกมีวซินจากตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยวิธี CL-2B gel filtration chromatography เก็บตัวอย่าง fraction ทั้งหมด 80 fractions (fraction size = 1 ml) นำแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ย้อมคาร์โบไฮเดรต (hexose sugars) โดย periodic acid Schiff (PAS) staining และวัดระดับโปรตีน MUC1 โดยวิธี immunodetection

รูปที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างปัสสาวะรวม (pooled urine) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis pool; NLP) และรูปที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี (healthy pool; HP)



รูปที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของการแยกมีวซินในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP) โดยวิธี CL-2B gel filtration จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัดระดับคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี periodic acid Schiff staining และวัดระดับโปรตีน MUC1 โดยวิธี immunodetection



รูปที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของการแยกมิวซินในบัสสภาวะของกลุ่มควบคุม (HP) โดยวิธี CL-2B gel filtration จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัดระดับคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี periodic acid Schiff staining และวัดระดับโปรตีน MUC1 โดยวิธี immunodetection

จากโครมาโตแกรม พบไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ที่ถูก elute ออกมาใน void fractions (fractions 5-17) ในตัวอย่าง NLP ขณะที่ไม่พบในตัวอย่าง HP แสดงว่าไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่เหล่านี้สร้างเพิ่มขึ้นเฉพาะในผู้ป่วยโรคนี้

ทำการเทรวม (pool) ตัวอย่าง CL-2B fractions ตามระดับของ MUC1 ได้ดังนี้

ตัวอย่างปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP)

- nephrolithiasis pool 1 (NLP1) รวม fractions 5 – 17
- nephrolithiasis pool 2 (NLP2) รวม fractions 24 – 40

ตัวอย่างปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP)

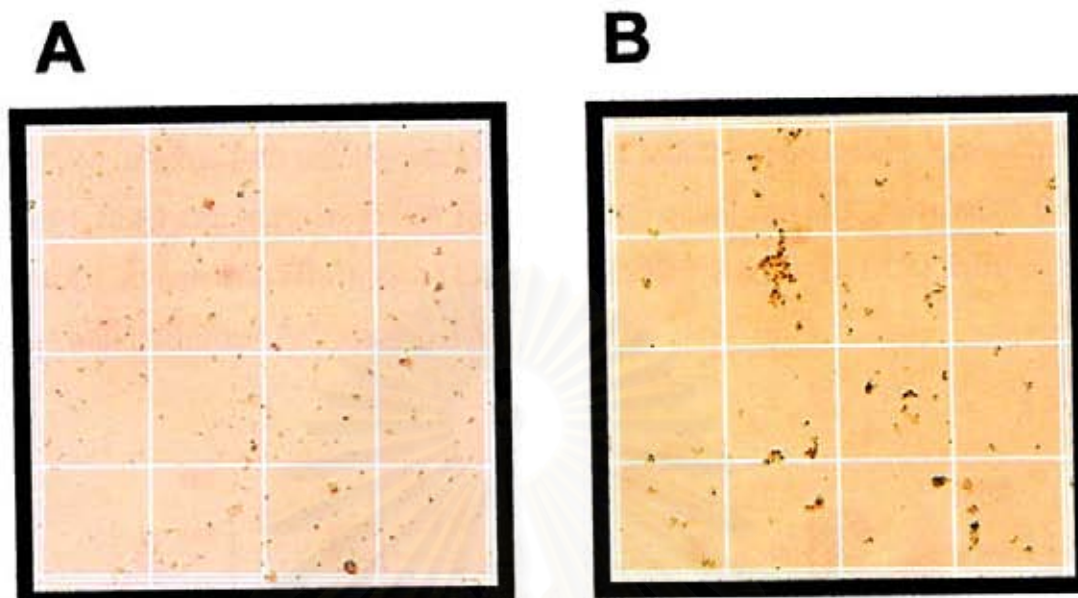
- healthy pool 1 (HP1) รวม fractions 27 – 43

นำ pooled CL-2B fractions ที่ได้ (NLP1, NLP2 และ HP1) ไปทำ dialysis ในน้ำกลั่น ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำออก แล้วจึงทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่ว โดยวิธี *in vitro* crystal aggregation assay

ผลการวิเคราะห์บทบาทในการก่อตัวของมิวซินในปัสสาวะ โดยการทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึก (aggregation assay)

นำสารตัวอย่างมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2) มาทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ 50 มิลลิกรัม และวัดการเกาะกลุ่มของผลึกจากค่า OD 620 นาโนเมตร ที่ลดลง ณ เวลา 0 นาที (AT_0) และ 10 นาที (AT_{10}) ความสามารถในการส่งเสริมการเกาะกลุ่มของผลึกแสดงโดยค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่ม (aggregation coefficient, AC) ดังรายละเอียดในบทที่ 3 (ข้อ 5.3) ค่า AC สูงแสดงว่าสารตัวอย่างสามารถกระตุ้นการเกาะกลุ่มของผลึกได้สูง (รูปที่ 16) การศึกษานี้ทำการทดลองวัดค่า AC ซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

ผลการทดลองการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลต เปรียบเทียบระหว่างมิวซินจากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และมิวซินจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2) พบว่าค่า AC เฉลี่ย ของสารตัวอย่าง NLP1, NLP2 และ HP1 เท่ากับ 7.19, 2.31, 2.16 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า AC โดยใช้ ANOVA test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.013$) และจากผลการวิเคราะห์ multiple comparison test โดยใช้ Bonfferoni test พบว่าค่า AC ของ HP1 และ NLP2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 1.000$) ขณะที่ค่า AC ของ NLP1 สูงกว่า HP1 ($P = 0.023$) และ NLP2 ($P = 0.028$) อย่างมีนัยสำคัญ



T_{10} : HP1 (F27-43), AC = 2.82

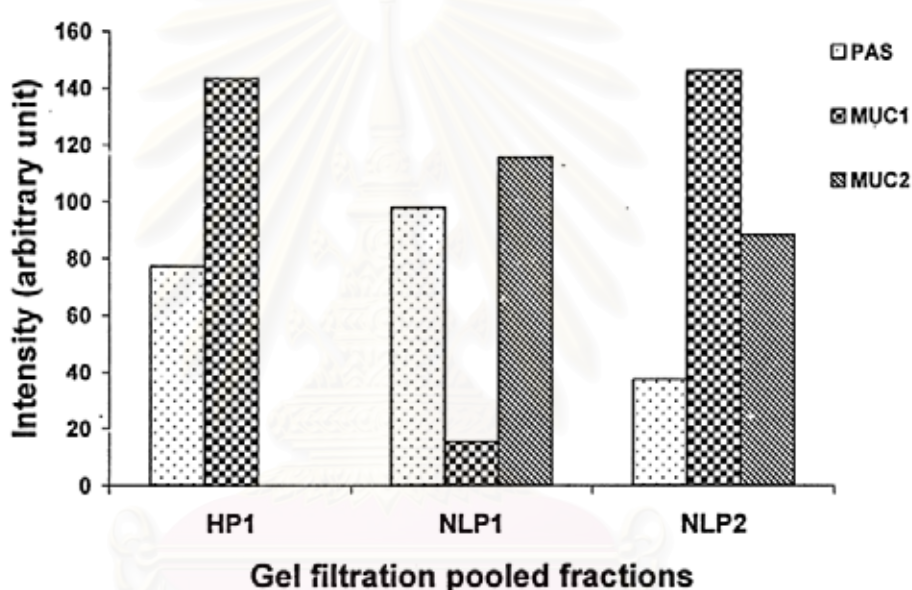
T_{10} : NLP1 (F 5-17), AC = 6.21

รูปที่ 16 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เปรียบเทียบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เคลือบเยื่อออกซาเลตระหว่างค่า AC ต่ำ (AC = 2.82) และค่า AC สูง (AC = 6.21) A = การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อเติมมีวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของคนปกติ (HP1) B = การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อเติมมีวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1) ค่า AC ที่สูงขึ้นบ่งชี้ว่ามีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากขึ้น (กำลังขยาย 400 เท่า)

Partially purified urinary mucins	Aggregation assay			
	AT ₀ เฉลี่ย	AT ₁₀ เฉลี่ย	AC	P value
Healthy pooled CL-2B fractions 27-43 (HP1)	0.426	0.405	2.16	0.0013*
Nephrolithiasis pooled CL-2B fractions 5- 17 (NLP1)	0.405	0.333	7.19	
Nephrolithiasis pooled CL-2B fractions 24- 40 (NLP2)	0.452	0.429	2.31	

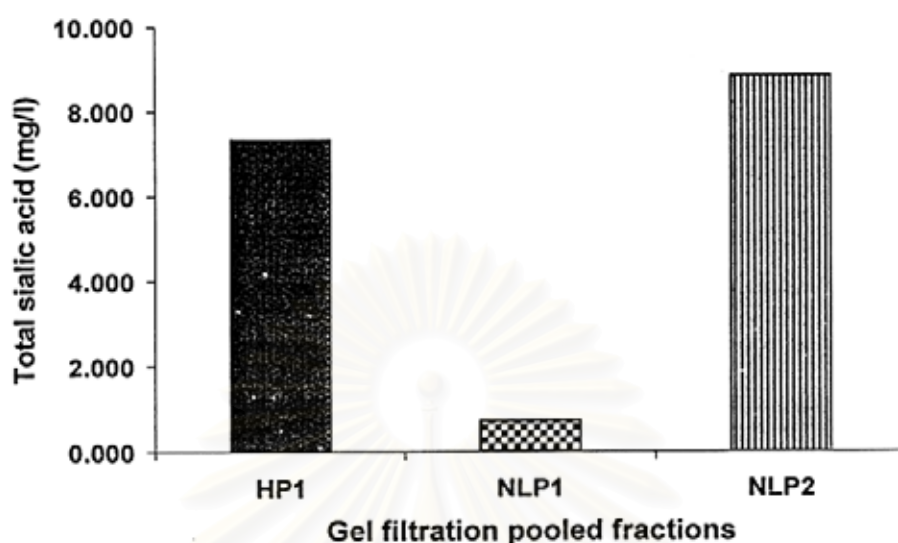
ตารางที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์บทบาทในการเกาะกลุ่มของผลึกนิวของมิวซินมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะ (* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้ ANOVA test, $P < 0.05$)

เมื่อย้อม PAS staining และทำ MUC1 และ MUC2 immunodetection ของสารตัวอย่าง HP1, NLP1 และ NLP2 พบว่า HP1 มีปริมาณ MUC1 สูงแต่ไม่พบ MUC2 ส่วน NLP1 มีปริมาณ MUC1 ต่ำที่สุด ขณะที่ปริมาณ MUC2 สูงที่สุด สำหรับตัวอย่างมิวซิน NLP2 มีปริมาณ MUC1 สูง แต่มีการติดสีของ PAS staining ต่ำที่สุด (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แสดงผลการย้อม PAS staining และการทำ MUC1 และ MUC2 immunodetection ของสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ total sialic acid ในสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2 พบว่าปริมาณ total sialic acid ใน NLP1 มีค่าต่ำที่สุด ขณะที่ HP1 และ NLP2 มีปริมาณ total sialic acid สูงใกล้เคียงกัน (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 แสดงปริมาณ total sialic acid ในสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2

จากผลการศึกษามิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมโดยวิธี CL-2B Gel filtration chromatography การย้อม PAS staining การทำ MUC1 และ MUC2 immunodetection และการหาปริมาณ total sialic acid ในสารตัวอย่างมิวซินจากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2) สามารถสรุปคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารตัวอย่างมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2 ได้ดังตารางที่ 14

Urinary mucins	AC	ขนาดโมเลกุล	Total sialic acid content	PAS intensity	MUC1 content	MUC2 content
HP1	ต่ำ	เล็กกว่า	สูง	ปานกลาง	สูง	ไม่มี
NLP1	สูง	ใหญ่กว่า	ต่ำ	สูง	ต่ำ	สูง
NLP2	ต่ำ	ใหญ่	สูง	ต่ำ	สูง	ปานกลาง

ตารางที่ 16 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารตัวอย่างมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 รวมทั้งระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไต (renal tissue) ของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ต้องตัดไต รวมทั้งศึกษาสารต่างๆที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วและแยกมิวซินจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ป่วยโรคไตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี (healthy control)

กลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำร้อยละ 74.1 มีภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงร้อยละ 14.2 มีการขับออกของโปรตีน และ NAG activity ในปัสสาวะปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ และมีปริมาณของ 8-OHdG ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีภาวะการบาดเจ็บของเซลล์ท่อไตสูงและมีการทำลายโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ขับออกมาในปัสสาวะ พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณการขับออกของโปรตีนในปัสสาวะสัมพันธ์กับปริมาณของ 8-OHdG และ NAG activity ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต

ผลการศึกษาการแสดงออกของมิวซินในเนื้อเยื่อไต พบว่า การแสดงออกของ MUC1 สูงกว่าการแสดงออกของ MUC2 (ค่า ΔC_p ของ MUC1 ต่ำกว่าค่า ΔC_p ของ MUC2) การแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ระหว่างเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต และเนื้อเยื่อไตทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion) ของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีแนวโน้มสูงกว่าการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตควบคุมทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง

ผลการศึกษามิวซินซึ่งเป็นสารไกลโคโปรตีนในปัสสาวะ พบว่า ปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ (high molecular weight glycoproteins) สูงกว่าในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมคนปกติ ซึ่งไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่นี้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง และให้ผลบวกกับ MUC1 และ MUC2 immunostaining แสดงว่าเป็นมิวซิน และเมื่อนำมาทดสอบ *in vitro* aggregation assay พบว่ามิวซินขนาดใหญ่ที่ขับออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตมี

บทบาทเป็น "crystal aggregator" จากผลการศึกษาที่บ่งชี้ว่า มิวซิน ในปัสสาวะน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดก้อนนิ่ว เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำการเกาะรวมตัวกันของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตได้

อภิปรายผลการวิจัย

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกลไกการเกิดนิ่วทั้งในหลอดทดลอง เซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง และในมนุษย์ เพื่อลดอุบัติการณ์ของการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะมีภาวะอิ่มตัวของสารที่ก่อให้เกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะ มีการรวมกลุ่มของผลึก หรือมีการติดค้างของผลึก จนก่อให้เกิดเป็นก้อนนิ่วอุดตันในระบบทางเดินปัสสาวะ มีการกล่าวว่าต้องมีสารอินทรีย์หรือสารโมเลกุลขนาดใหญ่ในปัสสาวะ จึงจะสามารถเกิดนิ่วไตได้ ถ้าไม่มีสารชีวโมเลกุลจะเกิดนิ่วไม่ได้ (no macromolecule, no stone) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาโมเลกุลใหญ่ คือ มิวซิน ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องต่อการเกิดนิ่ว แต่ในรายงานการศึกษาในขณะนี้มีน้อย และยังไม่มีการศึกษามิวซินจากมนุษย์โดยตรง

จากการวิเคราะห์ชนิดของก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบนิ่วผสมชนิดแคลเซียมออกซาเลตกับแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 83.3 และนิ่วกรดยูริกร้อยละ 16.7 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาวิจัยของ Tosukhowong และคณะในปี ค.ศ. 2007 ซึ่งพบนิ่วผสมระหว่างนิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมกับแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 80.0 และนิ่วกรดยูริกร้อยละ 14.0 (60)

จากการวิเคราะห์ระดับของออกซาเลตและซีเทรตในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำร้อยละ 74.1 ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะร้อยละ 14.2 และผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะมากกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคล้ายกับรายงานการศึกษาอื่น จะพบปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมมากในผู้ป่วยโรคนิ่วไตทั่วโลกในภาวะใดภาวะหนึ่งหรือหลายภาวะร่วมกัน ได้แก่ ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (4)

ภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

รายงานการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับของ NAG activity, lactate dehydrogenase (LDH) และ malondialdehyde (MDA) ในปัสสาวะสูง ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับภาวะการทำลายเซลล์เยื่อบุท่อไตและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (20) ในปี ค.ศ. 2005

Tungsanga และคณะรายงานว่าผู้ป่วยโรคไตพบภาวะเครียดจากออกซิเดชันมากกว่าคนปกติ และสัมพันธ์กับการทำลายเซลล์ท่อไต (20) มีรายงานวิจัยหลายฉบับทั้งการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง และในมนุษย์เกี่ยวกับออกซาเลตและผลึกแคลเซียมออกซาเลตในการกระตุ้นเซลล์เยื่อท่อไตเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) การศึกษาของ Thamilselvan และ Khan ในปี ค.ศ. 1998 พบว่า ออกซาเลตอิออนและผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate crystal) ในปัสสาวะสามารถกระตุ้นให้เซลล์ของเยื่อท่อไต (renal epithelial cell) ผลิตอนุมูลอิสระ (free radical) และอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) จนเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่งผลให้เซลล์เยื่อท่อไตเกิดการบอบช้ำ สูญเสียหน้าที่ และถูกทำลายได้ (14)

การอักเสบและการบอบช้ำของเซลล์เยื่อไต (Renal tubular epithelial cell injury) จะส่งเสริมให้เกิดการติดค้างของผลึก (crystal retention) ในท่อไต และเมื่อมีภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จะเกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ต่างๆ ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ปริมาณการขับออกของโปรตีนและ NAG activity ในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีภาวะ renal tubular epithelial cell injury สูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนที่มีสุขภาพดี ซึ่งผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่ผ่านมา ที่รายงานว่าผู้ป่วยโรคไตจะพบการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อไตมากกว่าคนปกติ (20)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดจากการมีอนุมูลอิสระมากเกินไป สารต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยตรวจวัดผลผลิตของปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอคือ 8-OHdG ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อไต ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า ระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาระดับของ 8-OHdG ในปัสสาวะและระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ การที่ระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจากจำนวนสิ่งตัวอย่างของกลุ่มควบคุมมีจำนวนน้อย อีกทั้งการตัดเนื้อเยื่อไตจะมีศัลยแพทย์หลายท่าน ทำให้มีข้อจำกัดของบริเวณที่ตัดเนื้อเยื่อไตอาจไม่ใช่บริเวณเดียวกัน ทำให้ได้เซลล์เนื้อเยื่อไตคนละชนิด นอกจากนี้เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไตที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งไตที่ต้องตัดไต อาจจะไม่ใช่เนื้อเยื่อไตปกติจริง ซึ่งเนื้อเยื่อบริเวณนั้นอาจมีพยาธิสภาพอื่นที่ทำให้มีผลต่อระดับของ 8-OHdG และการแสดงออกของมิวซินในเนื้อเยื่อไต อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ตรวจวัด

ระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไต ซึ่งระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตมีรายงานในโรคมะเร็ง เช่น ในผู้ป่วยมะเร็ง Renal cell carcinoma (RCC) ซึ่งพบระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ (69)

การแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไต

งานวิจัยนี้ศึกษาการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไต เทียบกับเนื้อเยื่อไตควบคุมจากผู้ป่วยมะเร็งไตทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous portion) และส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous portion)

การศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน มีเพียงการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของโรคมะเร็ง renal cell carcinoma (RCC) ซึ่งพบว่ามี MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยมะเร็ง renal cell carcinoma (70) ซึ่งการศึกษานี้พบมีการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคไตทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ในขณะที่พบการแสดงออกของ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตเพียง 64.2% ผู้ป่วยโรคไตที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคไตมีแนวโน้มสูงกว่าเนื้อเยื่อไตของกลุ่มควบคุมของผู้ป่วยมะเร็งไตทั้งส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งและส่วนที่เป็นมะเร็ง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อจำกัดในการศึกษานี้คือ การตัดเนื้อเยื่อไตจากคลังแพทย์หลายท่าน ทำให้มีข้อจำกัดของบริเวณที่ตัดเนื้อเยื่อไตอาจไม่ใช่บริเวณเดียวกัน ทำให้ได้เซลล์เนื้อเยื่อไตคนละชนิด อีกทั้งจำนวนตัวอย่างของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยมะเร็งไตมีน้อย ($n = 7$) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของกลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งไตที่ต้องตัดไต อาจจะไม่ใช่ส่วนปกติจริง ซึ่งเนื้อเยื่อบริเวณนั้นอาจมีพยาธิสภาพอื่นที่ทำให้มีผลต่อการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มควบคุมผู้ป่วยมะเร็งไต

การขับออกของมิวซินในปัสสาวะและบทบาทในการก่อนิ่ว

การศึกษานี้ทำการแยกสกัดมิวซินจากปัสสาวะรวมของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis pool, NLP) เปรียบเทียบกับมิวซินจากปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี (healthy pool, HP) และศึกษาบทบาทของมิวซินในปัสสาวะที่แยกสกัดได้ต่อกระบวนการเกิดก้อนนิ่ว ซึ่งการศึกษาของมิวซินในปัสสาวะต่อกระบวนการเกิดก้อนนิ่วในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ยังไม่มีการศึกษาโดยตรง มีเพียงการศึกษากระบวนการก่อนิ่วของมิวซินจากแหล่งอื่น เช่น bovine mucin (68) และจากการศึกษาอื่นเชื่อว่า มิวซินมีบทบาทในการโคจรรวมของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (10)

การศึกษานี้แยกมิวซินในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุมคนปกติ โดยวิธี CL-2B gel filtration chromatography วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัดระดับไกลโคโปรตีนโดย PAS staining และวัดปริมาณ MUC1 และ MUC2 โดย slot blot immunodetection ในแต่ละ CL-2B fraction จาก CL-2B chromatogram (รูปที่ 16 และ รูปที่ 17) พบว่าปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis pool; NLP) มี peak ของไกลโคโปรตีนที่ถูกชะ (elute) ออกมาใน void fraction (fractions 5-17) แสดงว่าเป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ ที่สำคัญ peak ของไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่นี้ไม่พบในปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมคนปกติ (healthy pool; HP) แสดงว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีการสร้างและขับไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ออกมาในปัสสาวะมากกว่าคนปกติ จากผล PAS staining และ OD₂₈₀ บ่งชี้ว่าไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่นี้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรต่ำ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของมิวซิน นอกจากนี้ยังให้ผลบวกกับ MUC1 และ MUC2 immunostaining เป็นหลักฐานที่บ่งชี้ว่าไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่นี้เป็นมิวซิน อย่างไรก็ตามอาจมีมิวซินชนิดอื่น เช่น gel-forming mucins (MUC5B, MUC5AC, MUC6) อยู่ใน void fraction นี้ ซึ่ง CL-2B gel filtration ไม่สามารถจำแนกตามขนาดได้

ผู้วิจัยทำการรวม CL-2B fractions ตาม peak ของ MUC1 ได้ตัวอย่าง pooled CL-2B fractions 3 ตัวอย่าง คือ NLP1 (pooled fractions 5-17 ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต), NLP2 (pooled fractions 24-40 ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต) และ HP1 (pooled fractions 27-43 ของกลุ่มควบคุมคนปกติ) จากการวิเคราะห์บทบาทของมิวซินในการเกาะกลุ่มของผลึก (aggregation assay) พบว่าค่า aggregation coefficient (AC) ของทั้ง 3 ตัวอย่าง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ NLP1 กระตุ้นการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้สูงกว่า NLP2 และ HP1 อย่างมีนัยสำคัญ และจากการวัดปริมาณ total sialic acid ใน NLP1 พบว่ามีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบ

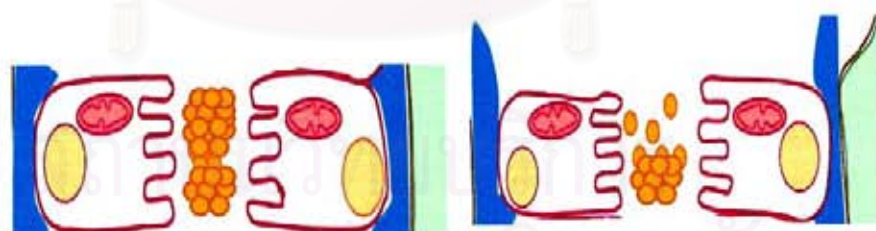
กับ HP1 และ NLP2 แสดงว่าการลดลงของปริมาณ sialic acid มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการเกาะกลุ่มของผลึกนิวเคลียมออกซาเลต และจากรายงานการศึกษาวิจัยของ Leiske JC และคณะ พบว่า sialic acid ที่อยู่ในไกลโคโปรตีนเกี่ยวข้องกับการยึดติดของผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่เยื่อผิวของท่อไต (71)

กรดไซเอลิก (sialic acid) เป็น amino sugar ที่มีประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ในกระบวนการ O-glycosylation ของมิวซิน sialic acid ทำหน้าที่เป็นน้ำตาลตัวสุดท้าย (terminal sugar/ capping sugar) และทำให้โมเลกุลของมิวซินมีประจุเป็นลบ (acidic property) หาก O-glycans ของมิวซินมี sialic acid ต่ำ จะส่งผลให้โมเลกุลมีประจุลบสุทธิต่ำ เมื่อถูกดูดซับ (adsorb) บนผิวของผลึกแคลเซียมออกซาเลต จะทำให้ประจุลบสุทธิของผลึกลดลงด้วย แรงผลักระหว่างผลึกจะลดลง ทำให้ผลึกมีโอกาสเข้าใกล้กันมากขึ้นจึงเกิดการเกาะกลุ่มที่ใหญ่ขึ้น

เนื่องจากมิวซินมี hydration property และ gel-forming property มิวซินขนาดใหญ่ที่มีปริมาณน้ำตาลสูง จะทำหน้าที่เป็นเจลเชื่อมระหว่างผลึกแคลเซียมออกซาเลต เสริมให้ผลึกเกาะกลุ่มกันง่ายและมั่นคงขึ้น ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ การพบมิวซินขนาดใหญ่ที่มีปริมาณกรดไซเอลิกต่ำในปัสสาวะอาจเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วหรือการเป็นนิ่วซ้ำได้ ดังรูปที่ 21

Aggregation activity of urinary Mucins (MUC)

From nephrolithiasis patients



MUC from NPL1

MUC from NPL2

รูปที่ 19 รูปข้อสันนิษฐานของบทบาทของมิวซินที่อาจเกี่ยวข้องกับการรวมกลุ่มของผลึกกับปริมาณของกรดไซเอลิกในโมเลกุล

ผลการวิจัยสรุปว่า มีวุ้นที่ขับออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีขนาดโมเลกุลใหญ่ แต่มีประจุลบต่ำ มีบทบาทเป็น "crystal aggregator" ในกระบวนการเกิดก้อนนิ่ว (lithogenesis) การตรวจวิเคราะห์มีวุ้นในปัสสาวะอาจมีประโยชน์ทางคลินิกในแง่ของการช่วยวินิจฉัย และการประเมินความเสี่ยงของการเกิดนิ่วได้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิจัยครั้งนี้ดำเนินภายใต้กลุ่มตัวอย่างที่จำกัด การเพิ่มจำนวนประชากรที่ศึกษา ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุม จะทำให้ตอบคำถามงานวิจัยได้ชัดเจนมากขึ้น
2. กลุ่มควบคุมที่เก็บเนื้อเยื่อไตเนื้อเยื่อไตในส่วนที่ไม่ไข่มะเร็ง ที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งไตที่ต้องตัดไต โดยไม่ได้ทำการพิสูจน์ระดับย้อมชิ้นเนื้อ (histological proof) จึงมีโอกาที่จะไม่ใช่เนื้อเยื่อไตปกติ (normal kidney tissue) จริง เนื้อเยื่อไตควบคุมที่ใช้นี้อาจมีพยาธิสภาพอื่นที่ทำให้มีผลต่อการศึกษาวิจัย จึงต้องมีการย้อมชิ้นเนื้อ (histological staining) ก่อน
3. ควรมีการวัดระดับ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติในทุกรายเพิ่มเติม เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตและการขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะ ตลอดจนการศึกษามีวุ้นชนิดอื่นต่อการเกิดก้อนนิ่ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Yanagawa, M.; Kawamura, J.; Onishi, T.; Soga, N.; Kameda, K.; Sriboonlue, P.; Prasongwattana, V.; Borwornpadungkitti, S. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol* 1997 Nov; 4:537-40.
- [2] Borwornpadungkitti, S.; Sriboonlue, P.; Tungsanga, K. Recurrence rates after renal stone surgery in Khon khaen hospital. *J Urology* 1992; 13
- [3] Amaro, C. R.; Goldberg, J.; Amaro, J. L. Padovani CR. Metabolic assessment in patients with urinary lithiasis. *Int Braz J Urol* 2005 Jan-Feb; 31(1):29-33.
- [4] Tosuklowong, P.; Tungsanga, K.; Prapanwatta, P.; Yachantha, C.; Borwornpadungkitti, S.; Sriboonlue, P. Improvement in renal tubular damage and antioxidant status after treatment of renal stone patients with potassium-magnesium citrate plus vitamin C and vitamin E. *ISU* 2004 Proceedings; 168-9.
- [5] Borges, F. T.; Michelacci, Y. M.; Aguiar, J. A.; Dalboni, M. A.; Garofalo, A. S.; Schor, N. Characterization of glycosaminoglycans in tubular epithelial cells: calcium oxalate and oxalate ions effects. *Kidney Int* 2005 Oct; 68(4):1630-42.
- [6] Wu, L. L.; Chiou, C. C.; Chang, P. Y. ; Wu, J. T. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004 Jan; 339 (1-2):1-9.
- [7] Carlstedt, I.; Sheehan, J. K.; Corfield, A. P.; Gallagher, J. T. Mucus glycoproteins: a gel of a problem. *Essays Biochem* 1985; 20, 40-76.
- [8] Moniaux, N.; Escande, F.; Porchet, N.; Aubert, J. P.; Batra, S. K. Structural organisation and classification of the mucin genes. *Front Biosci* 2001; 6: D1192-206.
- [9] Gum, J. R. Jr; et al. The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J. Biol. Chem* 267 1992; 21375-83.

- [10] Akbarieh, M.; Tawashi, R. Calcium oxalate crystal growth in the presence of mucin. Scanning Microsc 1991 Dec;5 (4):1019-26; discussion 1026-7.
- [11] Ramello, A.; Vitale, C. Marangella, M. Epidemiology of nephrolithiasis. J Nephrol 2000 Nov-Dec; 13 Suppl 3: S45-50.
- [12] Trinchieri, A. Epidemiological trends in urolithiasis: impact on our health care systems. Urol Res 2006 Apr; 34(2):70-8. Epub 2006 Feb 28.
- [13] Khan, S. R.; Kok, D. J. Modulators of urinary stone formation. Front Biosci 2004 May 1; 9:1450-82.
- [14] Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. J Nephrol 1998 Mar-Apr; 11 Suppl 1:66-9.
- [15] Scheid, C. R.; Koul, H.; Hill, W. A.; Lubner-Narod, J.; Kennington, L.; Honeyman, T.; Jonassen, J.; Menon, M. Ox toxicity in LLCPK1 cells: role of free radicals. Kidney Int 1996 49: 413.
- [16] Thamilselvan, S.; Hackett, R. L.; Khan, S. R. Free radical scavengers catalase and superoxide dismutase provide protection from oxalate associated injury to LLC-PK1 and MDCK cells. J Urol 2000; 164: 224.
- [17] Thamilselvan, S.; Khan, S. R.; Menon, M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. Urol Res 2003; 31: 3.
- [18] Thamilselvan, S.; Hackett, R. L.; Khan, S. R. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and CaOx nephrolithiasis. J Urol 1997; 157: 1059.
- [19] Huang, H-S.; Ma, M-C.; Chen, C-F.; Chen, J. Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones. Urology 2003; 61: 1123.
- [20] 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 Feb; 33(1):65-9.

- [21] Khan, S. R. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue culture studies. Clin Exp Nephrol 2004; 8: 75.
- [22] Khan, S. R. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. Nephron Exp Nephrol 2004; 98: 55.
- [23] Rose, M. C.; Rose, M. C.; Voynow, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. Physiol Rev 2006 Jan; 86(1):245-78. Review.
- [24] Ligtenberg, M. J.; Vos, H. L.; Gennisen, A. M.; Hilkens, J. Episialin, a carcinoma associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternate amino termini. J Biol Chem 1990; 265: 5573-8.
- [25] Quin, R. J. & McGuckin, M. A. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. Int. J. Cancer 2000; 87, 499-506.
- [26] Scholfield, D. P.; Simms, M. S.; Bishop, M. C. MUC1 mucin in urological malignancy. BJU Int 2003 Apr; 91(6):560-6.
- [27] Gum, J. R. Jr, Hicks, J. W.; Toribara, N. W.; Siddiki, B.; Kim, Y. S. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. J Biol Chem 1994 Jan 28; 269(4):2440-6.
- [28] Sasivongsbhakdi, T.; et al. The affect of lime powder on metabolic risk factors and oxidative stress in renal stone former. The Thai Journal of UROLOGY 2005; 59-69.
- [29] Kamolrattanakul, P.; Chalaprawat, M.; Tanprayoon, T. How to make successful research? Bangkok. Text and Journal Publication Co., Ltd., 2002; 125-30.
- [30] Atmani, F.; Khan, S. R. Role of urinary bikunin in the inhibition of calcium oxalate crystallization. J Am Soc Nephrol. 1999 Nov; 10 Suppl 14:S385-8.

- [31] Robertson, W. G.; Peacock, M.; Marshall, R. W. Saturation inhibitor index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. N Engl J Med 1976; 294: 249-52.
- [32] Thomas, W. C.; Howard, J. E. Studies on the mineralizing propensity of urine from patients with and without renal calculi. Trans Assoc Am physicians 1959;72:181-7.
- [33] Meyer, J. I.; Smith, H. L. Growth of calcium oxalate inhibitors. Invest Urol 1975;13:36-9.
- [34] Robertson, W. G.; Peacock M. Calcium oxalate crystalluria and inhibitor of crystallization in recurrent renal stone formers. Clin Sci 1972;499-506.
- [35] Robertson, W. G.; Peacock, M.; Marshall, R. W. Saturation inhibitor index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. N Engl Med 1976;294:249-52.
- [36] Morse, R. M.; Resnick, M. I. Current trends in urological research: Urinary stone matrix. J Urol 1988;139:602-10.
- [37] Doyle, I. R.; Ryall, R. L. Precipitated from human urine: a highly selective phenomenon. Clin Chem 1991;37:1589-94.
- [38] Stapleton, A. M. F.; Ryall, R. L. Blood coagulation proteins and urolithiasis are linked, crystal matrix protein is the F₁ activation peptide of human prothrombin. Br J Urol 1995;75:712-9.
- [39] Stapleton, A. M. F.; Dawson, C. J.; Grover, P. K.; et al. Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: urinary prothrombin fragment is present in stone matrix. Kidney Int 1996;49:880-8.
- [40] Ryall, R. L.; Grover, P. K.; Stapleton, A. M. F.; et al. The Urinary F₁ activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted urine in vitro. Clin Sci 1995;89:553-41.
- [41] Stapleton, A. M. F.; Ryall, R. L. Crystal matrix protein getting blood out of a stone. Miner Electrolyte Metab 1994;20:399-409.

- [42] Suzuki, K.; Miyazawa, K.; Tsugawa, R. Crystal matrix protein is related to activation peptide (F1) of human prothrombin. In *Urolithiasis 1996*. Pak CYC Resnick M. Preminger GM. Dallas: Millet the Printer, Inc. 1996:224-5.
- [43] Lieske, J.C.; Leonard, R.; Toback, F. G. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystal to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. Am J Physiol 1995;268:F604-12.
- [44] Asplin, J. R.; Hoyer, J.; Gillespie, C. Uropontin (UP) inhibits aggregation calcium oxalate monohydrate (COM) crystals. J Am Soc Nephrol 1995;6:941-8.
- [45] Sorensen, S.; Justesen, S. J.; Johnsen, A. H. Identification of a macromolecule crystal growth inhibitor in human urine as osteopontin. Urol Res 1995;23:327-34.
- [46] Nabagawa, Y.; Sirivongs, D.; Nory, M. B. Nephrocalcin biosynthesis by human renal carcinoma cells In vitro and in vivo. Cancer Res 1992;52:1573-9.
- [47] Nakagawa, Y.; Abram, V.; Kezdy, F. J. Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. J Biol Chem 1983;258:12594-600.
- [48] Nakagawa, Y.; Abram, V.; Park, J. H. Urine glycoprotein crystal growth inhibitor: Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. Clin Invest 1985;76:1455-62.
- [49] Worcester, E. M.; Nakagawa, Y.; Wabner, C. L. Crystal absorption and growth slowing by nephrocalcin, albumin, and Tamm-Horsfall protein. Am J Physiol 1988;255:F1197-205.
- [50] Hess, B. ; Nakagawa, Y. ; Coe, F. L. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. Am J Physiol 1989;257:F99-100.
- [51] Hess, B. Tamm-Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. Miner Electrolyte Metab 1994;20:393-8.

- [52] Ganter, K.; Hesse, A. Experimental studies on the effect of Tamm-Horsfall protein on agglomeration of calcium oxalate (CaOX) crystal. In Urolithiasis 1996. Proceedings of the VIIIth International Symposium on Urolithiasis. Edited by Pak CYC, Resnick M, Preminger GM. Dallas, Millet the Printer Inc. 1996:214-5.
- [53] Schnierle, P.; Hering, F.; Seiler, H. Isoelectric focusing of Tamm-Horsfall glycoproteins: a simple tool for recognizing recurrent calcium oxalate renal stone formers. Urol Res 1996;24:79-82
- [54] Glauser, A.; Hochreiter, W.; Jaeger, P. ; et al. Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. Nephrol Dial Transplant 200;15:1580-7
- [55] Yoshimura, K.; Yoshida, T.; Miyake, O.; et al. Glycosaminoglycan in crystal surface blinding substances and its role on calcium oxalate crystal growth. In Urolithiasis 1996. Proceedings of the VIIIth International semposium on Urolithiasis. Edited by Park CYC, Resnick M, Perminger GM. Dallas : Millet the Printer, Inc. 1996:291-2
- [56] Heese, A.; Wuzel, H.; Vahlensieck, W. Significance of glycosaminoglycans for the formation of calcium oxalate stones. Am J Kidney Dis 1991;17:414-9
- [57] Jaffe, M. Über den Niederchlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des kreatinins. Physiol Chem 1986;10:319-400.
- [58] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A.L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J Biol. Chem 193: 265-275.
- [59] Horak, E.; Hopfer, S.; Sunderman, F. W. Spectrophotometric assays for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. Clin chem 1981;27:1180-5.
- [60] Tosukhowong; et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: Update 2007. Asian biomedicine 2007; in press
- [61] Finlayson, B.; Reid, S. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. Invest Urol 1978;15:442-8

- [62] Umekawa, T.; Iguchi, M.; Uemura, H.; Khan, S. R. Oxalate ions and calcium oxalate crystal-induced up-regulation of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal fibroblasts. BJU Int. 2006 Sep;98(3):656-60.
- [63] Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nature reviews cancer 2004;4: 45-60.
- [64] Dayan, Y. B.; Vilkin, A.; Niv, Y. Gallbladder plays a role in gallstone formation. European Journal of Internal Medicine 2004;15: 411-14.
- [65] Grases, F.; Costa-Bauza, A. Study of factors affecting calcium oxalate crystalline aggregation. Br J Urol 1990 Sep;66(3):240-4.
- [66] Grases, F.; Llobera, A. Experimental model to study sedimentary kidney stones. Micron 1998 Apr-Jun;29(2-3):105-11.
- [67] Christmas, K. G.; Gower, L. B.; Khan, S. R.; El-Shall, H. Aggregation and dispersion characteristics of calcium oxalate monohydrate: effect of urinary species. J Colloid Interface Sci. 2002 Dec 1;256(1):168-74.
- [68] Grases, F.; Isern, B.; Perello, J.; Costa-Bauza, A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. BJU Int 2004 Jul;94(1):177-81.
- [69] Miyake, H.; Hara, I.; Kamidono, S.; Eto, H. Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. Urology 2004 Nov;64(5):1057-61.
- [70] Cao, Y.; Karsten, U.; Zerban, H.; Bannasch, P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. Virchows Arch. 2000 Feb;436(2):119-26.
- [71] Lieske, J. C.; Toback, F. G.; Deganello, S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. Kidney Int 2001 Nov;60(5):1784-91.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
(patient information sheet)

ชื่อโครงการ การแสดงออกของยีนมิวซินในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
 (Mucin gene expression in nephrolithiasis)

ชื่อผู้วิจัย	นางสาวชนิษฐา พูนภิรมย์ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์ อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า	ผู้วิจัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยร่วม
---------------------	---	---

ผู้ดูแลที่ติดต่อได้

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

สถานที่วิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นมาของโครงการ

นิ่วไต เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานแก่ผู้ป่วยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้ในทุกภูมิภาคทั่วโลก โดยพบความชุกประมาณร้อยละ 1-20 ของประชากรทั่วโลก สำหรับข้อมูลในประเทศไทยมีรายงานพบความชุกของการเกิดโรคนิ่วไตสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความชุกการเกิดนิ่วซ้ำสูงถึงร้อยละ 25 ในปีแรก และร้อยละ 39 ในเวลาติดตาม 2 ปี สำหรับผู้ป่วยบางรายสามารถตรวจพบนิ่วถึง 5-6 ครั้งในเวลา 10 ปี และอาจเกิดไตวายเรื้อรังตามมา ทำให้มีวิถีชีวิตที่ทุกข์ทรมาน ส่งผลกระทบในการประกอบอาชีพ และยังทำให้รัฐต้องสูญเสียงบประมาณในการดูแลรักษาผู้ป่วย

กระบวนการเกิดเนื้องอกเชื่อว่าเริ่มต้นจากการเกิดผลึกของเกลือที่เป็นสารก่อเนื้องอกในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นสูงยิ่ง เมื่อมีการยึดติดของผลึกที่เกิดขึ้นกับเซลล์บุท่อไต จะเกิดการนำผลึกเข้าไปภายในเซลล์ หากผลึกเข้าไปมากจนเอนไซม์ในไลโซโซมไม่สามารถย่อยสลายได้หมด จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ส่งผลให้มีการทำลายชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุท่อไต นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ เช่นโปรตีน และ ดีเอ็นเอ ทำให้มีการขับออกของสารเหล่านี้ในปัสสาวะมากขึ้น เซลล์บุท่อไตตำแหน่งที่บอบช้ำและถูกทำลาย จะเป็นบริเวณที่ผลึกจะติดค้างที่ไต จนเป็นจุดเริ่มต้นของการเติบโตเป็นก้อนเนื้องอก จนมีการเจริญเติบโตเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และกลายเป็นก้อนเนื้องอกในที่สุด

มีรายงานการวิจัยพบว่า มิวซินมีบทบาทในการโค่นของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและจากผลการทดลองเบื้องต้นของกลุ่มวิจัยของเรา ซึ่งตรวจพบระดับของไกลโคโปรตีนมิวซิน 1 และไกลโคโปรตีนมิวซิน 2 เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานในการวิจัยครั้งนี้ว่า มิวซินที่พบในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตน่าจะมีส่วนในการเกิดกระบวนการเกิดเนื้องอก กล่าวคือ เมื่อเซลล์เยื่อบุท่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตถูกเสียดสีจากผลึกนิ่วและสารก่อเนื้องอก ร่วมกับการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ มิวซินจึงน่าจะถูกระตุ้นให้สร้างและหลั่งออกมามากขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายของเซลล์จากภาวะดังกล่าว

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของมิวซิน 1 และมิวซิน 2 ในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะ ทั้งในระดับยีนและโปรตีนต่อกระบวนการเกิดเนื้องอกในผู้ป่วยโรคนี้ไต เพื่อที่จะตอบคำถามเกี่ยวกับบทบาทและการแสดงออกของมิวซินทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีนในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะ โดยเฉพาะบทบาทของมิวซิน 1 และมิวซิน 2 ที่พบในผู้ป่วยโรคนี้ไตว่ามีคุณสมบัติเป็นปัจจัยส่งเสริมหรือยับยั้งการเกิดเนื้องอก รวมทั้งศึกษาบทบาทมิวซินต่อการเกิดก้อนเนื้องอกด้วย ซึ่งในปัจจุบันในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาในหัวข้อนี้ทั้งในประเทศไทยและระดับนานาชาติ ผู้ทำการวิจัยจึงมีความคาดหวังว่าผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อการเกิดองค์ความรู้ใหม่และการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตผู้ป่วยโรคนี้ไต
2. เพื่อวัดระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต
3. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตกับระดับความเครียดจากออกซิเดชัน

4. เพื่อศึกษาบทบาทการก่อกำเนิดในหลอดทดลองของมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้โต เปรียบเทียบกับความสามารถในการก่อกำเนิดของมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะของคนปกติ

รายละเอียดที่จะปฏิบัติต่อผู้เข้าร่วมโครงการ

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษานิว โดยการผ่าตัดเอานิวออก ซึ่ง ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ จะให้ผู้ป่วยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนการผ่าตัดและ ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป
2. กลุ่มควบคุมเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโรคมะเร็งโดยการผ่าตัดไตออก ซึ่งแพทย์ผู้ทำการผ่าตัดจะ ให้ผู้ป่วยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนการผ่าตัดและศัลยแพทย์จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต ขณะทำการผ่าตัด เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป
3. ท่านจะได้รับการวิเคราะห์และวัดปริมาณการแสดงออกของตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเครียด จากออกซิเดชันและการแสดงออกของมิวซินที่มีผลต่อการเกิดโรคนี้โต
4. ท่านจะได้รับค่าตอบแทนและค่าเดินทางในการเข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้ 200 บาท

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีเก็บตัวอย่าง

1.1. การเก็บปัสสาวะ ทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัดนี้โต

วิธีเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ปัสสาวะทิ้งก่อนเป็นเวลา 7.00 น. (เวลาเริ่มเก็บ) แล้วเริ่มเก็บปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่จัดเตรียมไว้ให้ รวมกันจนครบ 24 ชั่วโมง คือ ถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นเป็นครั้งสุดท้าย เก็บตัวอย่างปัสสาวะไว้ที่ -20°C ก่อนการวิเคราะห์ ในระหว่างเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยรับประทานอาหารตามปกติ

1.2 การเก็บเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรคนี้โตและผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ แล้วเก็บเนื้อเยื่อไตในน้ำยารักษาชิ้นเนื้อ เพื่อรักษาคุณภาพและปริมาณ RNA ของเนื้อเยื่อไตในตู้เย็น 4°C แล้วนำมาเก็บที่ -70°C ก่อนการวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างที่ได้จะนำมาหาปริมาณและวิเคราะห์หาสารที่มีความสำคัญที่เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน รวมทั้งวิเคราะห์และหาปริมาณการแสดงออกของมิวซินทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีน รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการถูกทำลายของเซลล์จากภาวะเครียดจากออกซิเดชันกับระดับของการแสดงออกของมิวซิน

ประโยชน์และผลข้างเคียงที่จะเกิดแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ

1. ท่านจะได้ทราบและเข้าใจในกลไกการตอบสนองของร่างกาย ที่มีสาเหตุเกิดจากการที่มีผลึกก้อนนิ่วในไต
2. ท่านจะได้ทราบปริมาณปฏิกิริยาภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการแสดงออกของมิวซิน ที่มีผลต่อการเกิดโรคนี้
3. ท่านจะได้ทราบถึงแนวทางในการเกิดโรคนี้และโอกาสในการเกิดนี้รวมทั้งวิธีการในการรักษาโรคนี้และวิธีการป้องกันการเกิดนี้จากผู้เชี่ยวชาญ
4. ผู้วิจัยรับรองว่าหากท่านได้รับอันตรายใดๆ อันเป็นผลโดยตรงจากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยยินดีรับผิดชอบการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า และท่านจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลตามความเหมาะสม

การเก็บข้อมูลเป็นความลับ

ผู้วิจัยขอยืนยันว่า ข้อมูลเกี่ยวกับตัวท่านจะถูกเก็บไว้เป็นความลับและจะใช้สำหรับการทำวิจัยเท่านั้น และชื่อของท่านจะไม่ปรากฏในแบบฟอร์มการเก็บข้อมูลและในฐานข้อมูลทั่วไป ผู้วิจัยจะให้ฐานข้อมูลลับที่มีชื่อของท่านไว้ต่างหาก โดยที่ผู้วิจัยเพียงท่านเดียวเท่านั้นที่ทราบรายละเอียดของข้อมูลนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านที่ให้ความร่วมมือมาเข้าโครงการวิจัยและขอให้ท่านตระหนักว่าไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมโครงการนี้หรือไม่ก็ตาม จะไม่มีผลต่อการรักษาพยาบาลที่ได้รับจากโรงพยาบาลนี้ และเมื่อท่านเข้าร่วมโครงการนี้แล้ว ท่านสามารถออกจากโครงการได้ตลอดเวลาโดยไม่กระทบต่อการดูแลรักษาที่ท่านจะได้รับจากแพทย์ เมื่อท่านต้องการโดยแจ้งให้ผู้ทำการวิจัยทราบก่อน

หากท่านมีข้อสงสัยประการใดเกี่ยวกับการวิจัยนี้กรุณาติดต่อมาที่ นางสาวณิชชฎา พูนภิรมย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 081-6285230 (มือถือ)

ถือ), 0-2252-4986 (ที่ทำงาน) หรือ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะ
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)

หากท่านมีข้อสงสัยหรือมีปัญหาเกี่ยวกับสิทธิของท่าน สามารถติดต่อสำนักงาน
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์
0-2256-4455 ต่อ 14,15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (consent form)

การวิจัยเรื่อง การแสดงออกของยีนมิวซินในผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Mucin gene expression in nephrolithiasis)

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

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงจุดประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าพึงจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลข้อมูลเกี่ยวกับตัวของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกระทำได้ในกรณีที่เป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่คิดมูลค่า และจะได้รับกวดขันดูแลอย่างดีที่สุดจนหายป่วยไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นตามความเหมาะสม

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วและมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ลงนาม.....ผู้ทำวิจัย

(.....)

ภาคผนวก ค
แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย case record form (CRF)

ข้อมูลทั่วไป

Code.....บันทึกวันที่.....

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

อาชีพ.....ภูมิลำเนาจังหวัด.....

เกณฑ์การรับเข้าในโครงการ

- มีภาพถ่ายรังสียืนยันการวินิจฉัยว่าเป็นนิ่วไต () yes () no

เกณฑ์การปฏิเสธการเข้าในโครงการ

มีความผิดปกติทางกายวิภาคหรือเกิดพยาธิสภาพของระบบปัสสาวะอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

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

ข้อมูลทางคลินิก

1. อาการที่มาพบแพทย์ () Back pain () groin pain () bloody urine () ปัสสาวะขัด/บ่อย () อื่น ๆ.....

2. จำนวนครั้งที่ เป็นนิ่ว () ครั้งแรก () ครั้งที่ 2 () ครั้งที่ 3 () มากกว่า 3 ครั้ง

3. (สำหรับผู้ป่วยที่เป็นนิ่วซ้ำ) มีระยะปลอดนิ่ว (stone-free period)เดือน

4. Fever: () no () yes

5. KUB x-ray: () negative () positive

6. IVP (intravenous pyelogram): () negative () positive

7. Affected kidney: () right () left () both

8. Stone type: () opaque () non-opaque

9. Stone quantity: () single () multiple

10. Stone location: () Pelvis () Upper calyx () Middle calyx () Lower calyx

11. Surgical approach: () Open surgery () Percutaneous nephrolithotomy () ESWL

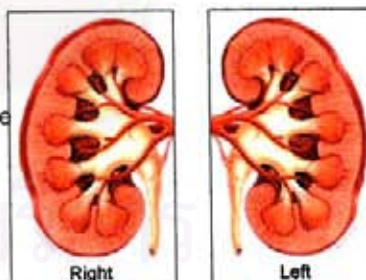
12. Kidney biopsy (contact with stone): () Septum (R1) () Cortex (R2) () other.....

13. Urinary analysis: Red blood cells:...../HP

White blood cells:...../HP

Bacteria: () occasional () few () moderate () numerous () other.....

14. Urine culture:



Please illustrate:

- Stone location

- Biopsy location

ลงชื่อ.....ผู้บันทึก

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารเคมี

1. 1 N hydrochloric acid (1N HCl)

conc. hydrochloric acid (35%-38% w/w)	8.5	ml
---------------------------------------	-----	----

ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
(ข้อควรระวัง เติมกรดลงในสารละลายน้ำ)
2. Periodic Acid Schiff (PAS) stain reagent (1% (w/v) periodic acid / 3% (v/v) acetic acid)
 - 1.1 oxidizing solution

- 50% (v/v) periodic acid		
periodic acid (MW = 227.90)	5	g
น้ำกลั่น	10	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ Periodic acid solution 2 ml
ผสมกับ Acetic acid 3 ml ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml
 - 1.2 0.1% (w/v) sodium metabisulfite (sodium disulfite) in 0.01 M HCl

sodium metabisulfite (MW = 109.10)	0.1	g
1 N HCl	1	ml

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากัน
3. 0.1 M sodium oxalate (0.1 M NaOx)

sodium oxalate (MW = 134.00)	134	g
------------------------------	-----	---

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
4. Lowy stock reagent
 - 1.1 Lowry A: 2% (w/v) Na₂CO₃ in 0.1 M NaOH

Na ₂ CO ₃	2	g
sodium hydroxide	0.4	g

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
 - 1.2 Lowry B: 1% (w/v) copper sulfate in 5·H₂O

copper sulfate	0.1	g
----------------	-----	---

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.3 Lowry C: 2% (w/v) sodium potassium tartrate ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

sodium potassium tartrate	0.2	g
---------------------------	-----	---

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.4 Lowry mixture solution (Lowry A: Lowry B: Lowry C = 98:1: 1)

Lowry A	39.2	ml
---------	------	----

Lowry B	0.4	ml
---------	-----	----

Lowry C	0.4	ml
---------	-----	----

ผสมให้เข้ากัน เตรียมแล้วใช้ทันที

5. Folin's reagent (Folin- Ciocalteu reagent)

phenol reagent - 2N	1	ml
---------------------	---	----

น้ำกลั่น	1	ml
----------	---	----

ผสมให้เข้ากัน เตรียมแล้วใช้ทันที

6. 0.1% (v/v) DEPC-treated water

diethylene pyrocarbonate	2	ml
--------------------------	---	----

deionized water	2	liters
-----------------	---	--------

ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ข้ามคืน แล้ว Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 45 นาที

7. 20x Tris buffer saline (TBS), pH 8.0 (0.2 M Tris-HCl/3 M NaCl, pH 8.0)

Tris base	6.05	g
-----------	------	---

sodium chloride	43.85	g
-----------------	-------	---

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับให้ pH เท่ากับ 8.0 ด้วย conc. HCl จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมี ปริมาตร 250 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. 1x TBST, pH 8.0 (1x TBS, pH 8.0 containing 0.05% Tween 20)

20x Tris Buffer Saline (TBS)	125	ml
------------------------------	-----	----

Tween 20	1.25	ml
----------	------	----

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 2.5 liters เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 6 M guanidine hydrochloride

guanidine hydrochloride (MW = 95.53)	114.64	g
--------------------------------------	--------	---

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. 1x guanidine reduction buffer (GuRB) (0.1M Tris-HCl/ 5 mM EDTA in 6 M GuHCl, pH 8.0)

- | | | |
|--|-------|----|
| Tris base | 1.21 | g |
| EDTA.2H ₂ O | 0.186 | g |
| ละลายทั้งหมดใน 6M GuHCl แล้วปรับให้ pH เท่ากับ 8.0 ด้วย conc. HCl จากนั้นปรับให้มีปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 6M GuHCl เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 11. 4 M guanidine hydrochloride for gel filtration chromatography | | |
| guanidine hydrochloride (MW = 95.53) | 76.4 | g |
| จากนั้น deionized water จนมีปริมาตร 200 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 12. 20% (v/v) ethanol for gel filtration chromatography | | |
| absolute ethanol | 200 | ml |
| จากนั้น deionized water จนมีปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 13. 5% non-fat dry milk blocking solution | | |
| non-fat dry milk | 5 | g |
| 1x Tris buffer saline (TBS) | 100 | ml |
| ผสมให้เข้ากัน เตรียมแล้วใช้ทันที | | |
| 14. 70% (v/v) ethanol for DNA isolation | | |
| absolute ethanol | 350 | ml |
| จากนั้น sterilized deionized water จนมีปริมาตร 500 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 15. 95% (v/v) ethanol for DNA isolation | | |
| Absolute ethanol | 475 | ml |
| จากนั้น sterilized deionized water จนมีปริมาตร 500 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 16. 95% (v/v) ethanol for RNA isolation | | |
| absolute ethanol | 95 | ml |
| จากนั้น DEPC-treated water จนมีปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง | | |
| 17. film developer solution (Kodak, Japan) | | |
| developer | 109.5 | ml |
| จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในขวดที่ปิดสนิท | | |
| 18. film fixer solution (Kodak, Japan) | | |
| fixer | 109.5 | ml |
| จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในขวดที่ปิดสนิท | | |
| 19. 0.3% (w/v) NaHSO ₃ | | |

NaHSO ₃	0.3	g
จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml		
20. 0.2% (v/v) sulfuric acid		
sulfuric acid	0.2	ml
จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml		



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย) นางสาวชนิษฐา พูนภิรมย์

ตำแหน่งทางวิชาการ ไม่มี

(ภาษาอังกฤษ) Miss.Kanitta Poonpirome

วัน เดือน ปีเกิด 10 มกราคม พ.ศ. 2523 สถานที่เกิด จังหวัดอุบลราชธานี

ตำแหน่ง นิสิตวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตหลักสูตร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-18628-5230, 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)

ที่อยู่ปัจจุบัน 2030/8 ถ.ประชาสงเคราะห์ แขวงดินแดง เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์ 0-2274-6886

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่สำเร็จการศึกษา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	เทคนิคการแพทย์	2543

ผลงานวิจัยในอดีต (ในระยะเวลา 3 ปี)

Tosukhowong P et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. *Asian Biomedicine* 2007;1(1):89-97

ทุนการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย