



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของมิวซินและบทบาทในการก่อกวนในโรคหัวใจ

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า

มิถุนายน 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของมิวซินและบทบาทในการก่อกำเนิดโรคนิวไต

ชาญชัย บุญหล้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980101  
ชื่อโครงการ : การแสดงออกของมิวซินและบทบาทในการก่อกวนในโรคนี้่วไต  
ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า  
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
E-mail Address : chanchai.b@chula.ac.th  
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

**วัตถุประสงค์:** มิวซินเป็นไกลโพรตีนขนาดใหญ่ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง ปัจจุบันพบมิวซินในมนุษย์อย่างน้อย 19 ชนิด บทบาทในการก่อกวนและการแสดงออกที่ผิดปกติของมิวซินมีรายงานในโรคนี้่วไต ถุงน้ำดีและนี้่วในท่อน้ำดี แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาในโรคนี้่วไต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของมิวซินชนิด MUC1 และ MUC2 ในผู้ป่วยโรคนี้่วไต และหาความสัมพันธ์กับการอักเสบในไต ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการทำงานของไต นอกจากนี้เพื่อศึกษาบทบาทของมิวซินที่สกัดจากปัสสาวะต่อการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลต **วิธีการ:** เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต เลือด และปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากผู้ป่วยโรคนี้่วไต จำนวน 29 ราย ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตควบคุมได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งไต จำนวน 6 ราย ทั้งเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งและส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงควบคุมได้จากคนปกติ จำนวน 30 ราย ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไต การทำลายเซลล์บุท่อไต และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยอาศัยตัวบ่งชี้ creatinine clearance, urinary *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase activity และ urinary 8-hydroxydeoxyguanosine ตามลำดับ วัดปริมาณ mRNA ของ MUC1, MUC2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ interleukin-6 (IL-6) โดยวิธี real time RT-PCR **ผลการศึกษา:** ผู้ป่วยโรคนี้่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการทำลายเซลล์บุท่อไตสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ การแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไตต่ำกว่าในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง ผลการย้อมชิ้นเนื้อพบว่าเนื้อเยื่อไตทุกตัวอย่างมีการอักเสบเกิดขึ้น และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อไตสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ที่สูงขึ้นกับการทำงานของไตที่ลดลง การแสดงออกของ MUC1 mRNA พบในทุกตัวอย่างเนื้อเยื่อไต ขณะที่เนื้อเยื่อไตที่มีการแสดงออกของ MUC2 mRNA พบได้ 76% (22/29) การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNA กับตัวบ่งชี้การอักเสบและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ผลการศึกษามิวซินในปัสสาวะพบว่าการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตสูงกว่าในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระดับของ MUC1 ในปัสสาวะไม่แตกต่างกัน พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ MUC2 ในปัสสาวะกับระดับของ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไต แสดงว่า MUC2 ในปัสสาวะน่าจะสังเคราะห์จากเซลล์ไต สกัดมิวซินจากตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตและกลุ่มคนปกติด้วยวิธีโครมาโตกราฟี (Sepharose CL-2B column) แทรม fractions ที่ให้ผลบวกกับ MUC1 antibody ได้ตัวอย่างมิวซิน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ HP1 (ได้จากปัสสาวะรวมของกลุ่มคนปกติ, fractions 27-43), NLP1 (ได้จากปัสสาวะรวมของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต, fractions 5-17) and NLP2 (จากปัสสาวะรวมของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต, fractions 24-40) มิวซิน NLP1 พบเฉพาะในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต และมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า มีปริมาณ MUC2 มากกว่า แต่มีปริมาณ MUC1 และกรดเซียลิกน้อยกว่า HP1 และ NLP2 ผลการทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึกพบว่า NLP1 มีค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่มสูงกว่าทั้ง HP1 และ NLP2 อย่างมีนัยสำคัญ **สรุป:** มีการอักเสบเกิดขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคนี้่วไต การแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคนี้่วไต ผู้ป่วยโรคนี้่วไตมีระดับ MUC2

ในปัสสาวะสูงกว่าปกติอาจมีแหล่งกำเนิดมาจากไตที่เป็นนิ่ว มีวชิน NLP1 ซึ่งไม่พบในปัสสาวะของคนปกติ สามารถกระตุ้นการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้ดี ดังนั้น การมีวชินขนาดใหญ่แต่ประจุลบต่ำ (NLP1) ในปัสสาวะอาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วและเร่งการเจริญของก้อนนิ่ว

คำหลัก : โรคนิ่วไต, มีวชิน, กลไกการก่อนิ่ว, การอักเสบในไต, ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

## Abstract

---

**Project Code :** MRG4980101  
**Project Title :** Expression of mucin and lithogenic role in kidney stone disease  
**Investigator :** Assistant Professor Dr. Chanchai Boonla  
Department of Biochemistry, faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University  
**E-mail Address :** chanchai.b@chula.ac.th  
**Project Period :** 2 years

**Objectives:** Mucins are large molecular weight glycoproteins containing numerous O-linked glycans. At least 19 human mucin (MUC) genes have been identified. Overproduction and lithogenic function of mucins have been demonstrated in cholecystolithiasis and hepatolithiasis while in nephrolithiasis (NL) there has not been explored. The present study was aimed to investigate the intrarenal and urinary expression of MUC1 and MUC2 in patients with NL, and assess their associations with intrarenal inflammation, oxidative stress and renal dysfunction. In addition, role of urinary mucins in calcium oxalate (CaOx) crystal aggregation was examined. **Methods:** Renal biopsies from near the stone, and blood and 24-h urine specimens were collected from 29 patients with nephrolithiasis. Control renal tissues were taken from non-cancerous and cancerous portions of nephrectomy from six patients with renal cancers, and control 24-h urine samples were obtained from 30 healthy subjects. Creatinine clearance, urinary *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase activity and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine were determined as markers for glomerular dysfunction, renal tubular injury and oxidative stress, respectively. Messenger RNA expressions of MUC1, MUC2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-6 (IL-6) in the renal tissues were measured by real time RT-PCR. **Results:** NL patients had significantly higher oxidative stress and renal tubular injury than the healthy controls. Intrarenal mRNA expressions of MCP-1 and IL-6 in stone-adjacent renal tissues were significantly lower than in cancerous renal tissues, but not statistically different from that in non-cancerous renal tissues. Histological examination showed that all renal sections were inflamed and the number of infiltrated leukocytes corresponded well with the intrarenal mRNA levels of MCP-1 and IL-6. In NL patients, a greater intrarenal mRNA expression of MCP-1 and IL-6 was associated with enhanced renal impairment. MUC1 mRNA was positive in all stone-adjacent renal sections whereas MUC2-positive renal tissues were accounted for 76% (22/29). Associations of MUC1 and MUC2 expressions with intrarenal inflammation and oxidative stress biomarkers in NL patients were not observed. Urinary excretion of MUC2 in NL patients was significantly higher than that in healthy controls, but MUC1 was not. Level of urinary MUC2 significantly correlated to its mRNA level in renal tissues. Urinary mucins were partially purified from pooled healthy and NL urines by Sepharose CL-2B gel filtration. MUC1-positive CL-2B fractions were pooled and named HP1 (for healthy pool, fractions 27-43), NLP1 (for nephrolithiasis pool, fractions 5-17) and NLP2 (nephrolithiasis pool, fractions 24-40). NLP1 material was presented only in NL pooled urine. Compared to HP1 and NLP2, NLP1 mucins had larger size, higher amount of

MUC2 but lower in MUC1 and sialic acid contents. The crystal aggregation assay revealed that NLP1 had an aggregation coefficient significantly higher than HP1 and NLP2. **Conclusion:** There was an active intrarenal inflammation in NL patients. The expression of MCP-1 and IL-6, at least in part, contributed to the progression of kidney stone disease. Urinary MUC2 excretion was elevated in NL patients, and may be originated from the stone-affected kidneys. NLP1, which was not found in healthy urine, promoted the aggregation of CaOx crystals. Thus, the presence of large and low-negative-charge mucins (NLP1) in urine may increase stone-forming potential and accelerate the growth of stone.

**Keywords :** Kidney stone, mucins, stone formation, intrarenal inflammation, oxidative stress

## หน้าสรุปโครงการ

### Executive Summary

---

#### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคนิ่วไต (kidney stone หรือ renal stone หรือ nephrolithiasis) มีอุบัติการณ์การเกิดโรคทั่วโลกอยู่ระหว่าง 2-20% และสภาวะโลกร้อนทำให้อุบัติการณ์ของโรคนิ่วไตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลกเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ในประเทศไทยมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคนิ่วไตสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ถึงแม้ว่าอัตราการตาย (mortality rate) ของโรคนิ่วไตไม่สูงมากนัก แต่โรคนิ่วไตมีอัตราเป็นนิ่วซ้ำสูงมาก ซึ่งเป็นสาเหตุให้การทำงานของไตเสื่อมลง (renal dysfunction) ในที่สุดจะเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) และโรคไตระยะสุดท้าย (end stage renal disease) ตามมานอกจากนี้การเป็นนิ่วซ้ำหลายครั้งทำให้ทั้งผู้ป่วยและภาครัฐต้องรับภาระค่ารักษาที่สูงมากขึ้น ดังนั้นโรคนิ่วไตจึงเป็นโรคที่บั่นทอนคุณภาพชีวิตของประชากรไทยในปัจจุบัน

ก้อนนิ่วประกอบด้วยองค์ประกอบที่เป็นแร่ธาตุ (mineral composition) และองค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ (organic matrix) ซึ่ง organic matrix ส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ที่พบอยู่ในปัสสาวะ เช่น proteins, lipids และ glycosaminoglycans เป็นต้น สารโมเลกุลใหญ่เหล่านี้บางชนิดมีบทบาทเป็นตัวส่งเสริมการเกิดนิ่ว บางชนิดเป็นตัวยับยั้งการก่อตัว เมื่อเร็วๆ นี้มีการศึกษาผลของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) (โดยใช้ commercial mucin เป็นตัวแทนของ glycoprotein) ต่อการเกิดผลึกนิ่วพบว่า glycoprotein ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถยับยั้งการก่อตัวได้ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นกลับทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมการก่อตัว ความรู้เกี่ยวกับกลไกการเกิดนิ่วในระดับโมเลกุลในปัจจุบันยังมีจำกัด จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่มีการศึกษาวิจัยในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ขณะที่มีการศึกษาในโรคนิ่วในท่อน้ำดี (bile duct stone) และในผู้ป่วยนิ่วในถุงน้ำดี (gall bladder stone) พบว่ามีการแสดงออกของมิวซินแตกต่างไปจากภาวะปกติ และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของมิวซินที่สกัดจากปัสสาวะในการก่อตัวไต

มิวซิน (mucin) คือไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ (large molecular weight heavily-O-glycosylated proteins) ที่สร้างจากเซลล์บุผิวที่บุตามท่อและต่อมต่างๆ ของร่างกาย ปัจจุบันพบยีนมิวซินในมนุษย์อย่างน้อย 19 ชนิด ได้แก่ *MUC1*, *MUC2*, *MUC3A*, *MUC3B*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6*, *MUC7*, *MUC8*, *MUC9*, *MUC11*, *MUC12*, *MUC13*, *MUC15*, *MUC16*, *MUC17*, *MUC19* และ *MUC20* ในภาวะปกติของเซลล์บุผิวท่อใดจะมีชั้นเมือก (mucus layer หรือ mucin layer) ปกคลุมผิวเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์สัมผัสโดยตรงกับปัสสาวะซึ่งมีสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (hostile substances) เช่น toxins, toxic metabolites, microorganisms, extreme pH condition และ urinary crystals เป็นต้น องค์ประกอบหลักใน mucin layer คือมิวซิน การสร้างมิวซินจึงจัดเป็น innate defense mechanism ของเซลล์บุผิวทุกชนิดที่บุตามท่อและต่อมต่างๆ ในร่างกาย ปริมาณการสร้าง mucin น้อยหรือมากเกินไปมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น dry eye disease, asthma, cystic fibrosis, cancers รวมทั้งโรคนิ่วในท่อน้ำดี (hepatolithiasis) และนิ่วในถุงน้ำดี (cholecystolithiasis) โดยสารหลายชนิดสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์มิวซินได้ เช่น toxic chemicals, microorganism toxins, free radicals, mechanical damage, cytokines, inflammatory mediators และ growth factors เป็นต้น

ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบจะมีการสร้าง free radicals, inflammatory mediators, cytokines และ growth factors ปริมาณมาก รวมทั้งยังมี mechanical stress จากผลึกและก้อนนิ่ว จากผลการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่า ก้อนนิ่วที่เก็บหลังจากการผ่าตัดจะมีเมือกเคลือบ

อยู่ที่ผิว บ่งชี้ว่าเซลล์มีการสร้างมิวซินตอบสนองต่อภาวะที่มีก้อนเนื้อ และสามารถตรวจพบ MUC1 และ MUC2 (โดยวิธี Slot blot) ได้ในน้ำล้างก้อนเนื้อและในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ่วไต ขณะที่ในปัสสาวะของคนปกติพบได้ต่ำกว่า ส่วน MUC5AC ไม่พบในตัวอย่างปัสสาวะและพบ MUC5B น้อยมาก ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบจะส่งผลให้เซลล์บุผิวท่อไตสังเคราะห์มิวซินมากขึ้น แล้วถูกขับมิวซินออกมาในปัสสาวะมากขึ้น และเนื่องจากมิวซินมีสัดส่วนของน้ำตาลในโมเลกุลสูงมากจึงมีคุณสมบัติเหนียวเป็นเจลและมีประจุลบ มิวซินปริมาณมากในปัสสาวะน่าจะมีส่วนทำให้เกิดการก่อตัวของนิ่วได้มากขึ้น โดยมีมิวซินอาจทำหน้าที่เป็นตัวเหนียวทำให้เกิดผลึกนี้ (nucleating agent) หรือเป็นการกาวชีวภาพ (biological glue or adhering agent) ช่วยให้การเชื่อมและเกาะรวมตัวกันของผลึกเกิดได้ดีขึ้น

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบส่งผลให้กระบวนการ glycosylation ในเซลล์ผิดปกติ (aberrant glycosylation) ได้ ดังเช่นที่มีรายงานในโรค asthma, cystic fibrosis และมะเร็งหลายชนิด Aberrant glycosylation ทำให้โครงสร้าง glycan ของมิวซินผิดปกติไป ส่งผลให้คุณลักษณะทางกายภาพของมิวซิน เช่น size, charge และ glycan epitope (sugar epitope) เปลี่ยนแปลงไปและมีความสัมพันธ์การพยาธิสภาพของโรค มิวซินที่พบในผู้ป่วยโรคนิ่วไตอาจมี aberrant glycosylation ได้เช่นกัน การศึกษานี้จะศึกษาขนาดและประจุ (จากปริมาณกรดเซียลิก (sialic acid) ในโมเลกุล) ของมิวซินในปัสสาวะเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่ามิวซินในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับโรคนิ่วไตหรือไม่ หากมีอาจนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางคลินิกในอนาคตได้

## 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNA ในเนื้อเยื่อไต (kidney biopsy) ของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยมะเร็งไตทั้งส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissues) และส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissues) และหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNA กับภาวะอักเสบและภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต
2. ตรวจวัดระดับโปรตีน MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับปัสสาวะของคนปกติ และหาความสัมพันธ์ระหว่าง MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตกับภาวะการอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และระดับการทำลายเซลล์บุท่อไต
3. ศึกษาบทบาทในการก่อตัวของนิ่ว (lithogenic role) ของมิวซินที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติในหลอดทดลอง (in vitro stone formation experiment)
4. ศึกษาขนาดโมเลกุลและปริมาณกรดเซียลิกในโมเลกุลของมิวซินที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเปรียบเทียบกับคนปกติ

## 3. ระเบียบวิธีวิจัย

กลุ่มประชากรศึกษาแบ่งเป็น กลุ่มทดลองคือผู้ป่วยโรคนิ่วไต และกลุ่มควบคุมคือคนปกติ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ (urologists) ว่าเป็นโรคนิ่วไต มีผลการเอกซเรย์ฉีดสี (IVP) และ/หรือการเอกซเรย์ KUB ร่วมกับอาการแสดงทางคลินิกยืนยันการเป็นโรคนิ่วไต สำหรับกลุ่มควบคุมได้รับการยืนยันและตรวจจากแพทย์ว่าเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี สมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีประวัติเจ็บป่วยของระบบทางเดินปัสสาวะ และมีอายุและเพศเหมือนกับกลุ่มทดลอง (age- and sex-matched control)

กลุ่มประชากรตัวอย่างในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis) จำนวน 29 ราย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งไต (renal cancer) จำนวน 6 ราย และกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy) จำนวน 30 ราย

สารตัวอย่าง (specimens) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (kidney biopsy) ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (24-hour urine) ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากผู้ป่วยโรคนิ่วไตเก็บในขั้นตอนสุดท้ายของการผ่าตัดเอาก้อนนิ่วออก (biopsy) โดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อไตควบคุมเก็บจากผู้ป่วยโรคมะเร็งไต (renal cancer) ทั้งส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissues) และส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissues) ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ตัวอย่างเลือดเก็บก่อนการผ่าตัดโดยแพทย์หรือพยาบาล สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยและผู้ร่วมโครงการวิจัยเก็บด้วยตนเอง โดยผู้วิจัยอธิบายวิธีการเก็บที่ถูกต้องและขอความร่วมมือก่อนการเก็บ ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตเก็บตัวอย่างปัสสาวะก่อนการผ่าตัด การเก็บสารตัวอย่างทุกชนิดได้รับคำยินยอมโดยสมัครใจพร้อมกับลงชื่อเป็นหลักฐานจากผู้ป่วยและญาติผู้ป่วยก่อน และ protocol การวิจัยทั้งหมดได้รับการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อเยื่อไต 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), และระดับ mRNA ของ MUC1, MUC2 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ interleukin-6 (IL-6) โดย 8-OHdG เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ขณะที่ MCP-1 และ IL-6 ตัวบ่งชี้การอักเสบ ระดับ mRNA ตรวจวัดโดยวิธี two-step real time RT-PCR และใช้ beta-2 microglobulin (B2M) เป็น internal control (reference gene)

ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ตรวจวัดระดับ creatinine (chemical method), ปริมาณ magnesium, ปริมาณสารก่อนิ่ว oxalate (enzymatic method), ตัวบ่งชี้การทำลายเซลล์บุท่อไต N-acetylglucosaminidase (NAG) (โดย enzymatic method) และ total protein (chemical method), 8-OHdG (competitive ELISA), และการตรวจวัดมิวซิน MUC1 และ MUC2 โดยวิธี Slot blot

ตัวอย่างเลือดจะทำการตรวจวัด creatinine และ magnesium เพื่อใช้คำนวณค่า creatinine clearance (CCr) และ fractional excretion of magnesium (FE-Mg) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไต

การวิเคราะห์บทบาทในการก่อนิ่ว (lithogenic role) ของมิวซิน MUC1 และ MUC2 ใช้โมเดลการก่อนิ่วในหลอดทดลอง โดยสกัดเอามิวซิน MUC1 และ MUC2 จากปัสสาวะ (ทั้งปัสสาวะผู้ป่วยและคนปกติ) ด้วยวิธี gel filtration (CL-2B column) แล้วนำมิวซินที่สกัดได้มาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นรวมกลุ่มผลึกแคลเซียมออกซาเลต (aggregation assay) ถ่ายภาพผลของมิวซินต่อรวมกลุ่มของผลึกในหลอดทดลองจากกล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของมิวซิน ในการศึกษานี้จะศึกษาขนาด (size) และปริมาณกรดเซียลิก (sialic acid content) ในโมเลกุลมิวซิน MUC1 และ MUC2 เปรียบเทียบระหว่างมิวซินที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ การเปรียบเทียบ molecular size ด้วยวิธี gel filtration (CL-2B column) และวัดปริมาณกรดเซียลิกโดย Warren's method

การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลนำเสนอโดยใช้สถิติพรรณนา ได้แก่ ความถี่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน median และ interquartile range สถิติอนุมานที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง Zcontinuous variables) 2 กลุ่ม คือ two-samples t-test หรือ Mann Whitney test ระหว่างตัวแปรต่อเนื่องมากกว่า 2 กลุ่มใช้ one-way ANOVA test หรือ Kruskal-Wallis test วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสองตัวแปรใช้ Spearman's rank correlation test สำหรับ chi-square test และ Fisher's exact test ใช้ในการ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรกลุ่ม (categorical variables) โปรแกรมสถิติที่ใช้คือ STATA version 8.0 (Collage station, TX, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  แบบ two-tails

#### 4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

##### แผนการดำเนินงานปีที่ 1

| กิจกรรม                                                                                                                    | ปีที่ 1 (เดือน) |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---|---|---|---|---|-------------|---|---|----|----|----|
|                                                                                                                            | 6 เดือนแรก      |   |   |   |   |   | 6 เดือนหลัง |   |   |    |    |    |
|                                                                                                                            | 1               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7           | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| คัดเลือกตัวอย่าง เก็บสารตัวอย่าง และเก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย                                                    |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างเนื้อเยื่อไต: ทำ lab real time RT-PCR สำหรับ MUC1, MUC2, MCP-1, IL-6 และ lab ELISA สำหรับ 8-OHdG   |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างเลือด: ตรวจวัด creatinine และ magnesium                                                            |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง: ตรวจวัด creatinine, magnesium, oxalate, NAG, total protein, MUC1, MUC2, 8-OHdG |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล สำหรับเขียนรายงานความก้าวหน้าการวิจัย 1                                                           |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล                                                                                                   |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ร่าง manuscript 1 ส่งผลงานวิจัยตีพิมพ์                                                                                     |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| Submit manuscript 1                                                                                                        |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| เขียนรายงานความก้าวหน้าการวิจัย 2                                                                                          |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |

##### แผนการดำเนินงานปีที่ 2

| กิจกรรม                                                                                                 | ปีที่ 2 (เดือน) |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---|---|---|---|---|-------------|---|---|----|----|----|
|                                                                                                         | 6 เดือนแรก      |   |   |   |   |   | 6 เดือนหลัง |   |   |    |    |    |
|                                                                                                         | 1               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7           | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| นำผลงานวิจัยไปนำเสนอต่างประเทศ                                                                          |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ศึกษาบทบาทในการก่อตัวของมิวซิน: สกัดแยกมิวซินจากปัสสาวะ และทำ lab <i>in vitro</i> stone formation assay |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| ศึกษา size และ sialic acid content ของมิวซินจากปัสสาวะ                                                  |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| สรุปผลเขียนรายงานความก้าวหน้าการวิจัย 3                                                                 |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล สำหรับร่าง manuscript 2 ส่งผลงานวิจัยตีพิมพ์                                   |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| Manuscript 1 revision                                                                                   |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| Manuscript 1 accepted                                                                                   |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| Manuscript 2 preparation                                                                                |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |
| เขียนรายงานสรุปการวิจัยฉบับสมบูรณ์ส่ง สกว.                                                              |                 |   |   |   |   |   |             |   |   |    |    |    |

## เนื้อหาบทวิจัย

### กลุ่มประชากรตัวอย่าง

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis) จำนวน 29 ราย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งไต (renal cancer) จำนวน 6 ราย และกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (healthy) จำนวน 30 ราย ดังแสดงในตารางที่ 1 อายุเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มเท่ากับ  $50.86 \pm 11.20$ ,  $64.50 \pm 18.26$  และ  $41.43 \pm 10.34$  ปี ตามลำดับ ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของการวินิจฉัย ผลการตรวจชิ้นเนื้อ และวิธีการผ่าตัดของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งไต

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต (stone-adjacent renal biopsy) เลือด และปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต เนื้อเยื่อไตควบคุมได้จากเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็ง (cancerous renal tissue) และเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (non-cancerous renal tissue) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งไต สำหรับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี เก็บเฉพาะตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างเนื้อเยื่อเก็บรักษาไว้ใน RNA later reagent (Ambion, USA) เพื่อป้องกันการทำลาย RNA ในเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 1 Basic characteristics of subjects

| Characteristics                          | Subject groups    |                   |                   |
|------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                          | Healthy           | Nephrolithiasis   | Renal cancers     |
| n                                        | 30                | 29                | 6                 |
| Gender (M:F)                             | 11 : 19           | 9 : 20            | 2 : 4             |
| Age (years) (mean $\pm$ SD)              | 41.43 $\pm$ 10.34 | 50.86 $\pm$ 11.20 | 64.50 $\pm$ 18.26 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) (mean $\pm$ SD) | 22.56 $\pm$ 3.16  | 23.08 $\pm$ 2.54  | 21.28 $\pm$ 4.92  |

BMI: body mass index

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และการทำลายเซลล์ท่อไต (renal tubular damage) และการขับออกของออกซาเลต (urinary oxalate excretion) ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการทำลายเซลล์ท่อไต ระหว่างกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ urinary 8-OHdG และ NAG activity สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการทำลายเซลล์ท่อไตสูงขึ้นกว่าระดับปกติ

ระดับการขับออกของออกซาเลตระหว่างกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตไม่แตกต่างกัน ขณะที่การขับออกของซิเตรตในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่ากลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมที่สำคัญในผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทย คือ ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia) และการศึกษาก่อนหน้าของคณะวิจัยพบว่าระดับของสารก่อนิ่ว (แคลเซียม) ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ผู้ป่วยในประเทศแถบตะวันตกมักจะพบภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (Hypercalciuria) และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (Hyperoxaluria) เป็นปัจจัยเสี่ยงหลัก ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่ากลไกการเกิดนิ่วไตระหว่างผู้ป่วยไทยกับผู้ป่วยตะวันตกน่าจะมีความแตกต่างกัน

**ตารางที่ 2** Clinical characteristics of six renal cancer patients recruited in the study

| Code   | Age : Sex | Diagnosis and pathology                                                                                                                                                                                                         | Stage | Operation                                                   | Co-morbidity                                                         |
|--------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| NKT-04 | 56 : F    | Renal cyst (Lower pole Rt. kidney)                                                                                                                                                                                              | 2     | Right nephrectomy                                           |                                                                      |
| NKT-05 | 97 : F    | Transitional cell carcinoma at lower pole Rt. kidney. Low-grade papillary urothelial carcinoma of renal pelvis. Presence of tumor invading renal parenchyma. Free ureteric an vascular resected margins, chronic pyelonephritis | 2     | Cystoscopy and Bilateral RP and Laparoscopic nephrectomy    | Hypertension, Hyponatremia                                           |
| NKT-06 | 64 : M    | High grade urothelial cell carcinoma with squamous differentiation. Invade peripheric tissue & renal parenchyma. Malignant neoplasma of kidney bone metastasis                                                                  | 5     | Lt nephroureterectomy LN dissection                         | Secondary malignant neoplasm of other and unspecified respiratory    |
| NKT-07 | 72 : M    | Malignant neoplasm of kidney except renal pelvis, unclassified renal cell carcinoma versus collecting duct type renal cell carcinoma sarcomatoid change renal capsule. Renal cell carcinoma with multiple metastasis            | 2     | Transfusion of packed computerized axial tomography of head | Secondary malignant neoplasm of lung / brain and cerebral meningitis |
| NKT-08 | 50 : F    | Mucinous adenocarcinoma at Renal Pelvis                                                                                                                                                                                         | 2     | Left nephrectomy                                            |                                                                      |
| NKT-09 | 48 : F    | Renal cell carcinoma, except renal pelvis Rt RCC, malignant neoplasm of kidney except renal pelvis, free margin, ureter invasion                                                                                                | 3     | Right radical Nephroureterectomy                            | Hypo-osmolality, Hyponatremia                                        |

M: male, F: female

**ตารางที่ 3** Urine biochemistry, renal tubular damage and oxidative stress compared between nephrolithiasis patients and healthy controls.

| Urinary variables       | Disease status  |                 | P value |
|-------------------------|-----------------|-----------------|---------|
|                         | Healthy         | Nephrolithiasis |         |
| 24-hr urine volume (ml) | 1780 (1000)     | 1900 (1250)     | 0.500   |
| Creatinine (g/day)      | 0.99 (0.52)     | 0.93 (0.40)     | 0.404   |
| Oxalate (mg/day)        | 21.19 (44.54)   | 24.47 (16.51)   | 0.413   |
| Citrate (mg/day)        | 267.75 (372.31) | 104.53 (460.88) | 0.004*  |
| NAG activity (U/g Cr)   | 3.02 (2.28)     | 5.32 (8.35)     | <0.001* |
| 8-OHdG (μg/g Cr)        | 4.32 (4.93)     | 23.53 (24.51)   | <0.001* |

Data are presented as median (interquartile range). P values were obtained from Mann-Whitney test; \* indicates statistical significance. NAG: *N*-acetyl-β-glucosaminidase, 8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

### การวัดระดับ mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไต

ตัวอย่างเนื้อเยื่อไตนำมาสกัด total RNA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ MUC1, MUC2, IL-6 และ MCP-1 โดยวิธี two-step real time RT-PCR ใช้ B2M เป็น internal control (reference gene) และใช้ SYBRE Green เป็นสาร fluorescence สำหรับติดตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอ็นเอ ตารางที่ 4 แสดง specific primers ที่ใช้สำหรับทำ real time PCR (Roche Diagnostics, Germany)

ปริมาณ mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไตคำนวณแบบ relative quantification จากสูตร  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (normalized ratio of gene expression) ค่า  $C_t$  หรือที่ใช้ในการศึกษานี้คือ  $C_p$  (crossing point) คำนวณจาก LC4 LightCycler software 4.05 ค่า  $\Delta C_p$  และ  $\Delta\Delta C_p$  คำนวณได้จากสมการ

$$\Delta C_{p_{\text{sample}}} = C_{p_{\text{sample}}} - C_{p_{\text{reference}}}$$

$$\Delta\Delta C_{p_{\text{sample}}} = \Delta C_{p_{\text{sample}}} - \Delta C_{p_{\text{calibrator}}}$$

$$\text{Relative gene expression (normalized ratio)} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Calibrator ใช้สำหรับปรับมาตรฐานในการ run real time PCR ในแต่ละครั้ง การศึกษานี้ใช้ non-cancerous renal tissue (NKT-07) เป็น calibrator ซึ่งค่า normalized ratio ของ calibrator จะเท่ากับ 1 ค่า  $C_p$  และ  $\Delta C_p$  ที่ต่ำแสดงว่ามีปริมาณ mRNA หรือมีการแสดงออกของยีนสูง

ตารางที่ 4 Specific primers used for real-time PCR

| Target mRNA | Primer sequences                                                | Annealing Temp. (°C) | Product size (bp) | Accession No. |
|-------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|---------------|
| B2M         | F: 5'-aggctatccagcgctactcca-3'<br>R: 5'-tcaatgtcggatggatgaaa-3' | 55                   | 112               | NM_004048     |
| IL-6        | F: 5'-ttctccacaagcgcttc-3'<br>R: 5'-gaaggcagcaggcaacac-3'       | 55                   | 69                | NM_000600     |
| MCP-1       | F: 5'-tcagccagatgcaatcaatg-3'<br>R: 5'-gcttcttgggacacttgct-3'   | 55                   | 120               | S71513        |
| MUC1        | F: 5'-agacgtcagcgtgagtgatg-3'<br>R: 5'-cagctgcccgtagtcttttc-3'  | 57                   | 172               | J05581        |
| MUC2        | F: 5'-ggtaaacgacccacacaa-3'<br>R: 5'-caaacaggctgtccttgatg-3'    | 55                   | 70                | NM_002457     |

B2M:  $\beta$ -2 microglobulin, IL-6: interleukin-6, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

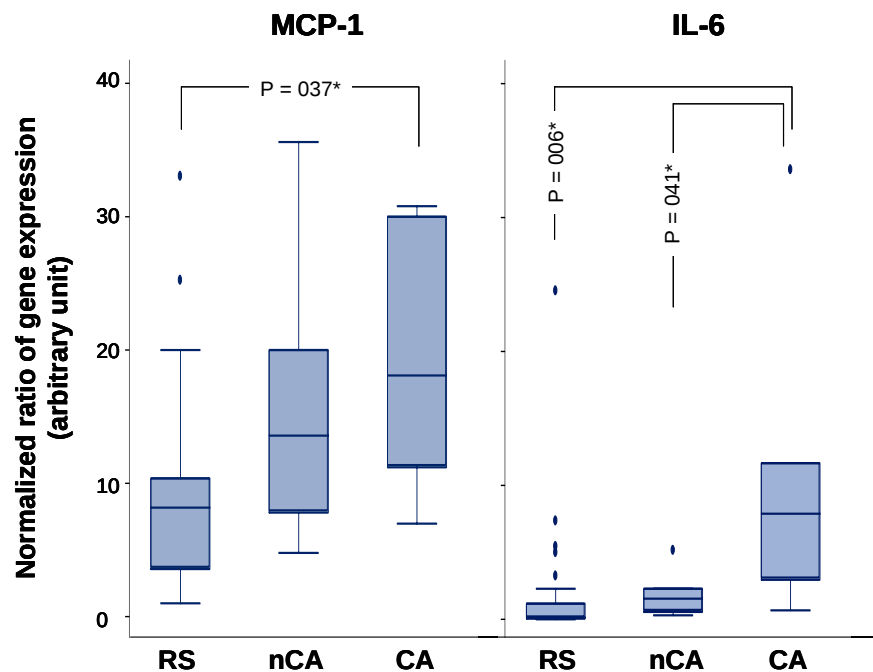
### ภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคหัวใจ

ผลการวิเคราะห์ภาวะการอักเสบในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคหัวใจ โดยใช้ระดับ IL-6 และ MCP-1 mRNAs เป็นตัวบ่งชี้ (markers) พบว่า stone-adjacent renal tissues มีระดับของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ต่ำกว่า cancerous renal tissues อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 1) ระดับ IL-6 mRNA ใน cancerous renal tissues (CA) สูงกว่าทั้ง non-cancerous (nCA) และ stone-adjacent renal tissues (RS) อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ MCP-1 mRNA ใน cancerous และ non-cancerous renal tissues ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า non-cancerous renal tissues ที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจไม่ใช่ normal renal tissues จริง อาจมีพยาธิสภาพของการอักเสบแต่อยู่ในระดับต่ำกว่า cancerous renal tissues มาก ซึ่งจากรายงานการศึกษา

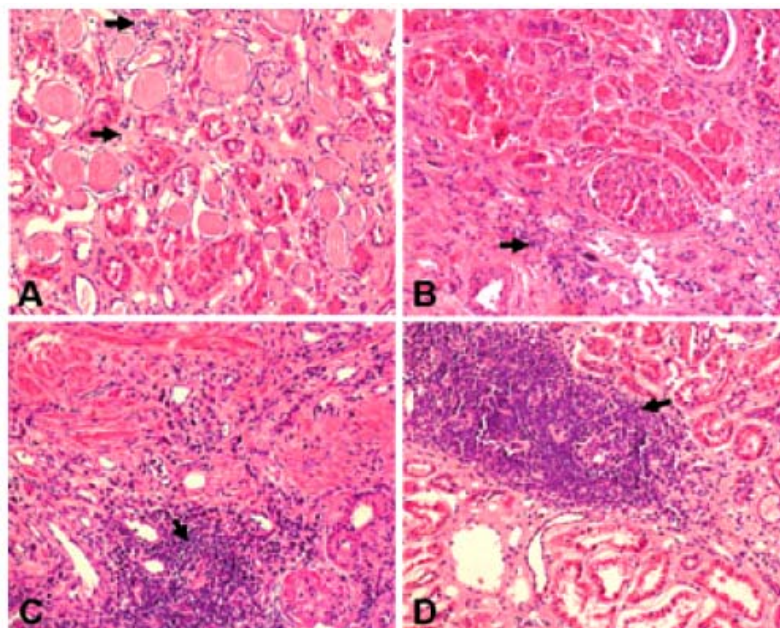
การแสดงออกของ MCP-1 ในโรคไตชนิดอื่น เช่น membranous nephropathy และ reflux nephropathy พบว่าไม่มีการแสดงออกของ MCP-1 ใน control normal renal tissues ที่ผู้วิจัยเหล่านั้นใช้ในการศึกษา

เพื่อพิสูจน์ว่าเนื้อเยื่อไตมีการอักเสบเกิดขึ้นจริงหรือไม่ คณะวิจัยจึงย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธี Hematoxylin and Eosin staining (H&E) เพื่อดูปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อไต (leukocyte infiltration) พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดขาวในเนื้อเยื่อสัมพันธ์กับระดับของ MCP-1 และ IL-6 mRNAs และเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง หรือ non-cancerous renal tissues มีเม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ปริมาณมากแสดงว่ามีอักเสบเกิดขึ้นจริง (รูปที่ 2) และระดับการอักเสบของ non-cancerous (nCA) และ stone-adjacent renal tissues (RS) เทียบเท่ากัน แต่ต่ำกว่าใน cancerous renal tissues (CA) อย่างเห็นได้ชัด

ดังนั้นการศึกษานี้สรุปว่าการอักเสบในไตของผู้ป่วยโรคไตอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อไตที่เป็นมะเร็ง โดยไตของผู้ป่วยโรคไตมีระดับการอักเสบเทียบเท่ากับเนื้อเยื่อไตส่วนที่อยู่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อไตที่เป็นมะเร็ง



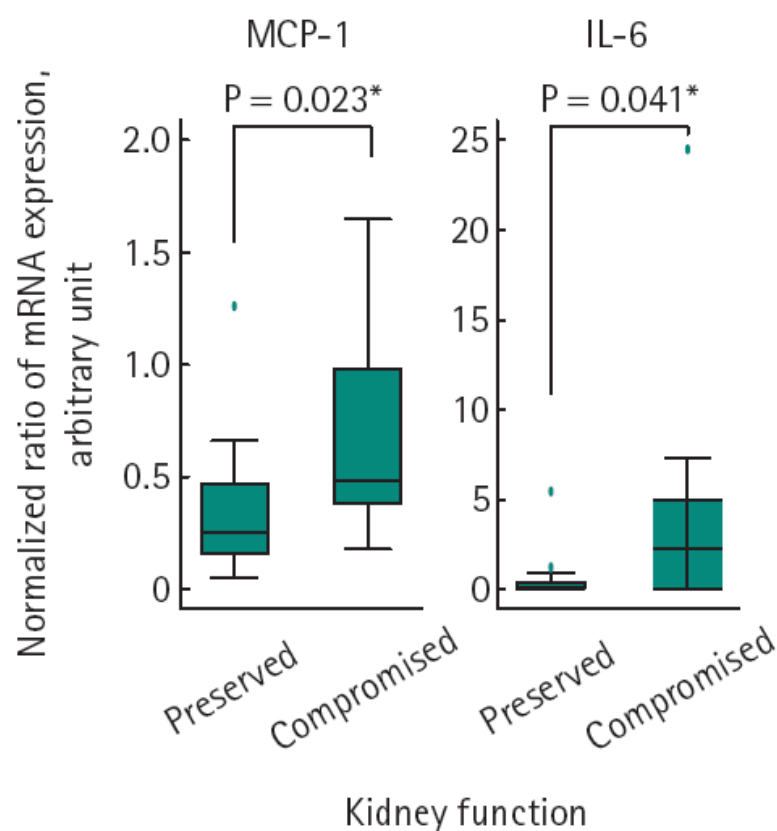
**รูปที่ 1** Box-Whisker plot of normalized ratios of MCP-1 and IL-6 mRNA expressions compared between the three sources of renal tissues, stone-adjacent renal tissues (RS), non-cancerous renal tissues (nCA) and cancerous renal tissues (CA). Boxes depict 10<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles. Intrarenal mRNA expression of MCP-1 in cancerous renal tissues was significantly higher than only in stone-adjacent renal tissues whereas intrarenal mRNA expression of IL-6 in cancerous renal tissues was significantly higher than both in stone-adjacent and non-cancerous renal tissues. P values were obtained from Sidak multiple-comparison test.



**รูปที่ 2** H&E stained renal sections from patients with nephrolithiasis or renal cancer. A, MLs (arrow) were rare in stone-adjacent renal sections with low mRNA expressions of MCP-1 (NR 0.13) and IL-6 (NR 0.05). B, a stone-adjacent renal section with moderate mRNA expression of MCP-1 (NR 0.52) and IL-6 (NR 0.38) shows mild infiltration of MLs (arrow). C, there was marked infiltration of MLs (arrow) in stone-adjacent renal sections with high mRNA expression of MCP-1 (NR 1.65) and IL-6 (NR 24.49). D, there was also an aggregate of lymphoid cells (arrow) in non-cancerous renal sections with high mRNA expressions of MCP-1 (NR 1.78) and IL-6 (NR 2.07). Original magnification x200.

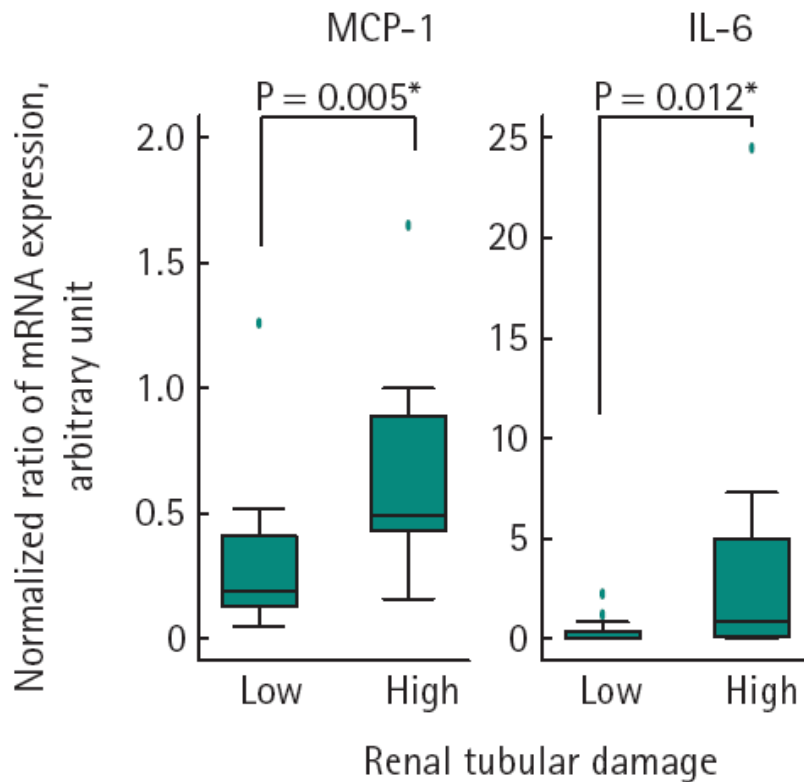
ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตพบระดับการแสดงออกของ MCP-1 สูงกว่า IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ อาจบ่งชี้ว่า MCP-1 มีบทบาทในกระบวนการอักเสบในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตมากกว่า IL-6 อย่างไรก็ตามระดับของ MCP-1 mRNA มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อระดับ IL-6 mRNA (Spearman's rho 0.763,  $P < 0.001$ ) คณะวิจัยสรุปว่าสารตัวกลางการอักเสบทั้งสองตัวนี้มีบทบาทสำคัญในการเกิด intrarenal inflammation ในผู้ป่วยโรคนี้ไต

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการอักเสบในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตกับประสิทธิภาพการทำงานของไต พบว่า เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไตดี (preserved kidney function; ค่า corrected creatinine clearance (CCr)  $\geq 50$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>) และ 2) กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไตเสื่อมลง (compromised kidney function; ค่า corrected CCr  $< 50$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>) กลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไตเสื่อมลงมีระดับของ MCP-1 และ IL-6 mRNA ในไตสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไตดี อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3) ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ที่สูงขึ้นในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตมีส่วนส่งเสริมให้เกิด glomerular dysfunction สูงขึ้น



**รูปที่ 3** A comparison of intrarenal mRNA expression of MCP-1 and IL-6 in patients with compromised or preserved kidney function. Intrarenal mRNA levels of MCP-1 and IL-6 in patients with compromised kidney function (corrected CCr  $\leq 50$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) were significantly greater than in those with preserved kidney function. Boxes show the 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles.

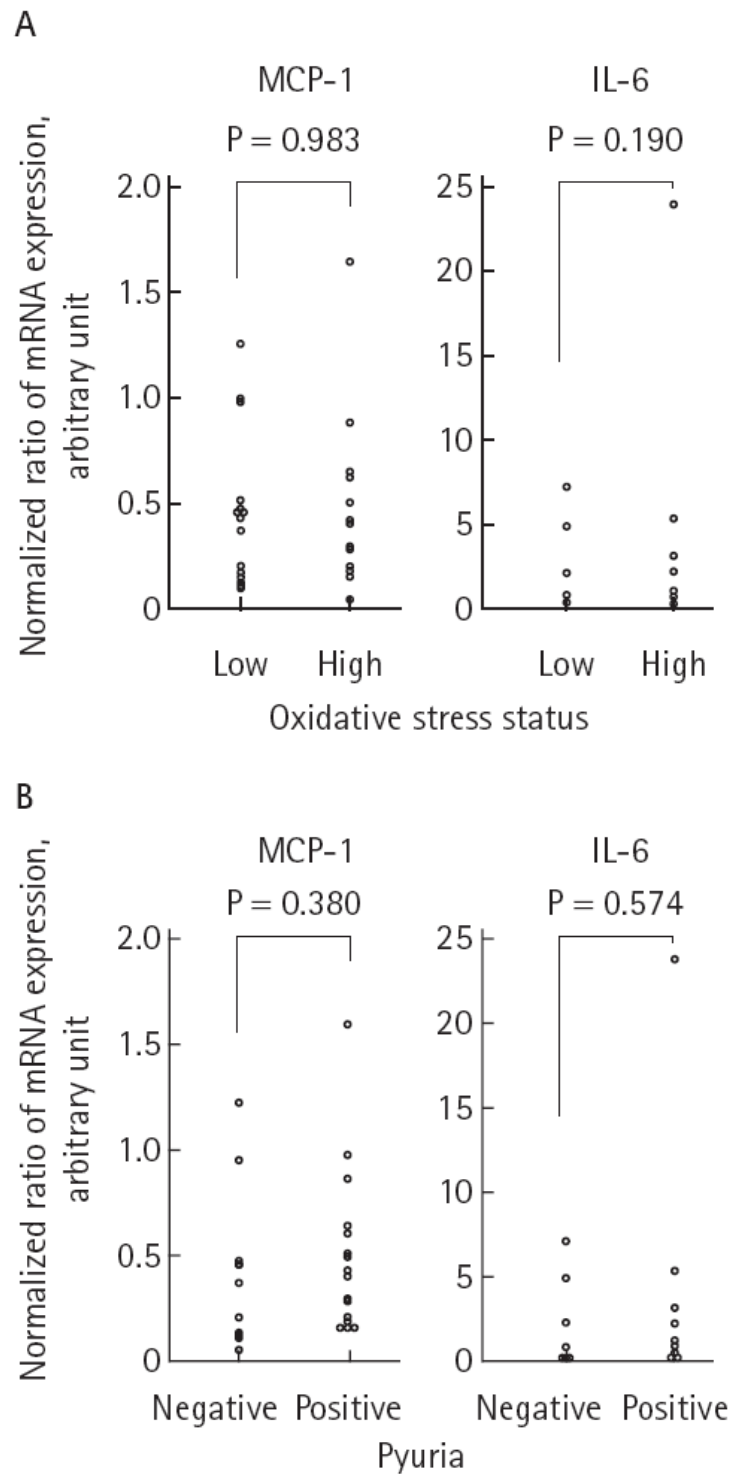
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำลายเซลล์บุท่อไตในผู้ป่วยโรคไตกับภาวะการอักเสบในไต พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการทำลายเซลล์บุท่อไตสูง (urinary NAG activity  $\geq 5.32$  U/g Cr) มีระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ในไตสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการทำลายเซลล์บุท่อไตต่ำ (urinary NAG activity  $< 5.32$  U/g Cr) อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ระดับการอักเสบในไตของผู้ป่วยโรคไตที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์บุท่อไตมากขึ้น



**รูปที่ 4** A comparison of intrarenal mRNA expression of MCP-1 and IL-6 between patients with low and high renal tubular injury. Intrarenal mRNA levels of MCP-1 and IL-6 in patients with high renal tubular injury (urinary NAG activity >5.32 U/g creatinine) were significantly higher than in those with low renal tubular injury. Boxes show the 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles.

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ในไตกับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูง (urinary 8-OHdG  $\geq$  23.53  $\mu$ g/g Cr) และผู้ป่วยโรคไตที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นต่ำ (urinary 8-OHdG < 23.53  $\mu$ g/g Cr) (รูปที่ 5, A)

เช่นเดียวกันกับเมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไตตามการพบเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ (pyuria) พบว่าการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 ในไตระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่พบเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ (positive pyuria) และกลุ่มที่ไม่พบ (negative pyuria) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5, B)



**รูปที่ 5** A comparison of intrarenal mRNA levels of MCP-1 and IL-6 by the severity of oxidative stress and pyuria. The mRNA expressions of MCP-1 and IL-6 were not significantly different between patients with high oxidative stress (urinary 8-OHdG >23.53  $\mu\text{g/g}$  creatinine) and those with low oxidative stress ( $\leq 23.53 \mu\text{g/g}$ ) (A), or between patients with pyuria and those without (B).

### ระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNAs ในตัวอย่างเนื้อเยื่อไต

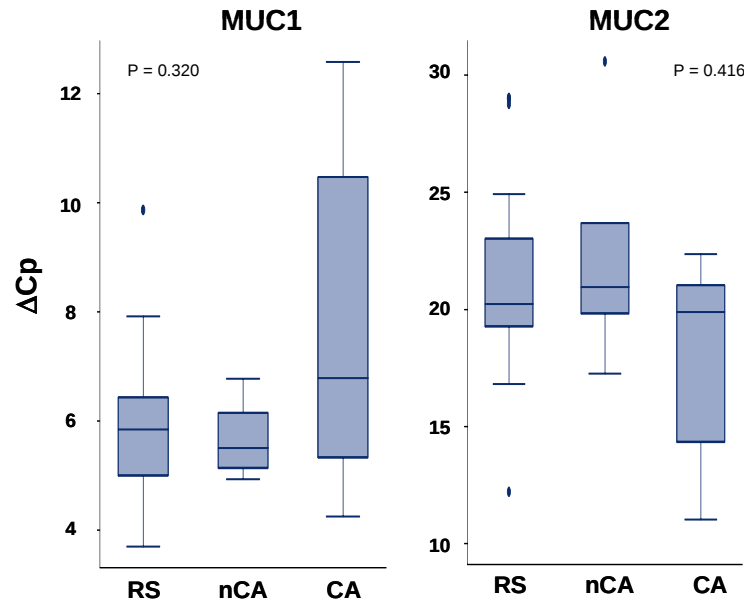
การแสดงออกของมิวซินชนิด MUC1 และ MUC2 เปรียบเทียบระหว่าง stone-adjacent renal tissues, cancerous renal tissues และ non-cancerous renal tissues พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตามพบแนวโน้มการแสดงออกของ MUC2 สูงขึ้นใน stone-adjacent renal tissues และ cancerous renal tissues ขณะที่การแสดงออกของ MUC1 มีแนวโน้มลดลงใน stone-adjacent renal tissues และ cancerous renal tissues เมื่อเทียบกับ non-cancerous renal tissues

เมื่อเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ MUC1 และ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต (stone-adjacent renal tissues) พบว่า ค่า  $\Delta C_p$  ของ MUC1 ต่ำกว่าค่า  $\Delta C_p$  ของ MUC2 อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 7) แสดงว่าในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไต มีการแสดงออกของ MUC1 สูงกว่า MUC2

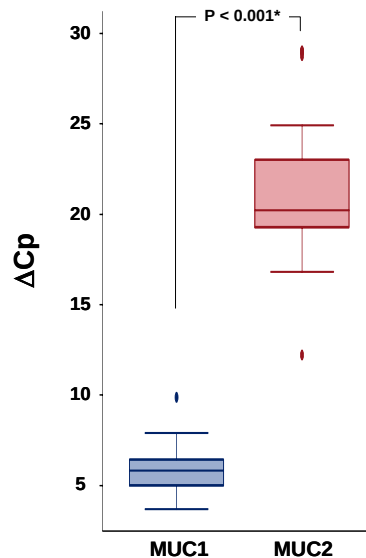
พบการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ในขณะที่พบการแสดงออกของ MUC2 ในเนื้อเยื่อไตเพียงร้อยละ 76% (22/29) ผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต ใช้ตัวบ่งชี้ (biomarker) คือระดับผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ผลการศึกษาพบว่า ค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไตเท่ากับ 48.6 pg/ $\mu$ g DNA (min-max; 26.92-349.27 pg/ $\mu$ g DNA) ส่วนในกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต พบค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งเท่ากับ 61.06 pg/ $\mu$ g DNA (min-max; 37.1-92.58 pg/ $\mu$ g DNA) และค่า median ของระดับ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งเท่ากับ 47.5 pg/ $\mu$ g DNA (min-max; 40.6-62.5 pg/ $\mu$ g DNA) เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดย Kruskal-Wallis test พบว่าระดับของ 8-OHdG ในเนื้อเยื่อไตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไต เนื้อเยื่อไตส่วนที่ไม่ใช่มะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต และเนื้อเยื่อไตส่วนที่เป็นมะเร็งของกลุ่มควบคุมผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.599$ ) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าระดับ oxidative DNA damage ในไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตสูงเทียบเท่ากับในผู้ป่วยโรคมะเร็งไต ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการอักเสบแบบเรื้อรังในไตของผู้ป่วยนี้

การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 กับภาวะอักเสบและภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเนื้อเยื่อไต ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนตัวอย่างน้อย (small sample size) อย่างไรก็ตามพบแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MUC1 ในเนื้อเยื่อไตที่สูงขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง



រូបភាព 6 Box-Whisker plot of  $\Delta C_p$  of MUC1 and MUC2 compared between the three sources of renal tissues, stone-adjacent renal tissues (RS), non-cancerous renal tissues (nCA) and cancerous renal tissues (CA). Boxes depict 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles. The  $\Delta C_p$  values of MUC1 and MUC2 compared among RS, nCA and CA were not statistically different. A trend of increase in MUC2 and decrease in MUC1 expressions in RS and CA compared to nCA were observed. A lower  $\Delta C_p$  indicates a higher mRNA expression. P values were obtained from Kruskal-Wallis test.



រូបភាព 7 Box-Whisker plot of  $\Delta C_p$  of MUC1 and MUC2 in stone-adjacent renal tissues. The  $\Delta \Delta C_p$  value of MUC1 was significantly lower than MUC2. This indicated that expression of MUC1 in the kidney of nephrolithiasis patients was higher than that of MUC2. A lower  $\Delta C_p$  indicates a higher mRNA expression. P value was obtained from Mann-Whitney test. Boxes depict 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles.

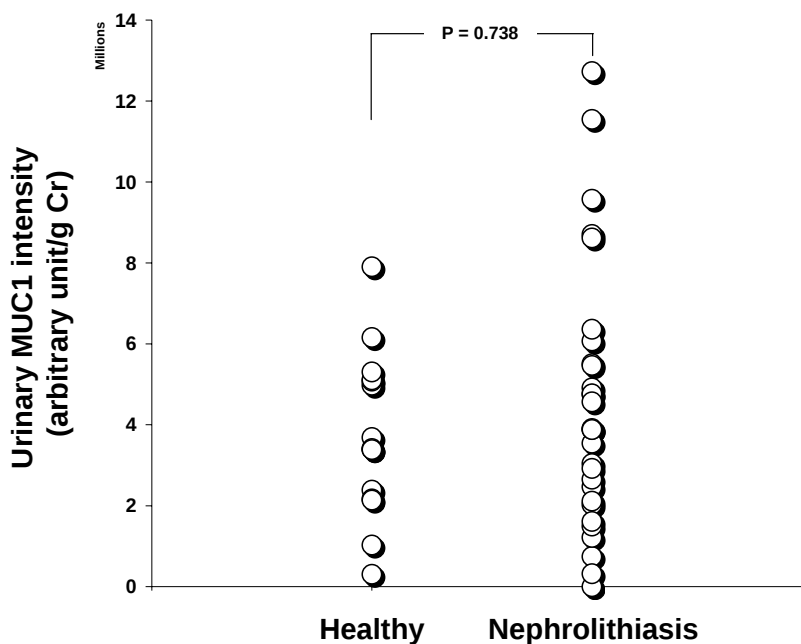
### การขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะ

ระดับการขับออกของ MUC1 ในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (n=29) และกลุ่มควบคุมคนปกติ (n=19) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.738$ ) (รูปที่ 8) ขณะที่การขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.003$ ) (รูปที่ 9)

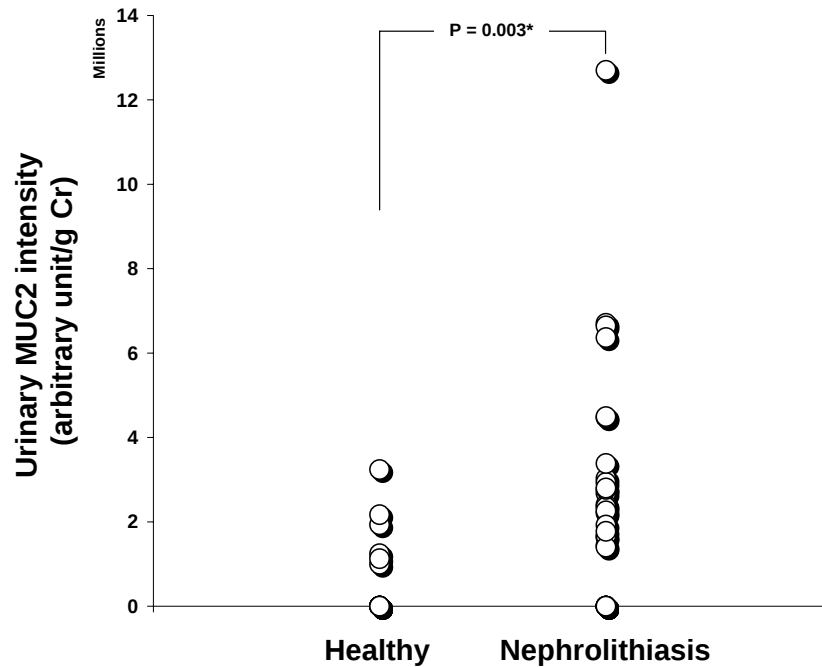
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดย Spearman's rank correlation test พบว่าระดับการขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (Spearman's  $\rho = 0.871$ ,  $P < 0.001$ ) (รูปที่ 10)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MUC1 และ MUC2 mRNA ในไตกับระดับการขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะ พบว่าค่า  $\Delta C_p$  ของ MUC2 mRNA สัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะ (รูปที่ 11) บ่งชี้ว่าโปรตีน MUC2 ที่พบในปัสสาวะนั้นจะมีแหล่งกำเนิดมาจากเซลล์ไต อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $\Delta C_p$  ของ MUC1 mRNA กับปริมาณการขับออกของ MUC1 ในปัสสาวะ ซึ่งน่าจะบ่งชี้ว่า MUC1 ในปัสสาวะมีแหล่งกำเนิดมาจากแหล่งอื่นในระบบทางเดินปัสสาวะ อีก เช่น กระเพาะปัสสาวะ และท่อทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น

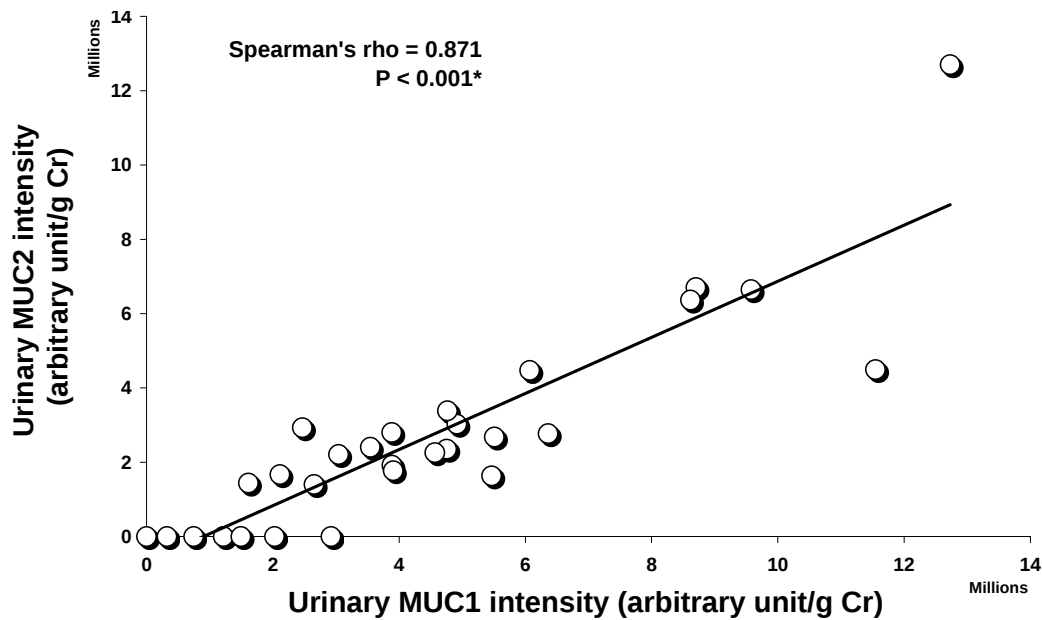
การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณการขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตกับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (urinary 8-OHdG) และการทำลายเซลล์บุท่อไต (urinary NAG activity) (ตารางที่ 5) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตกับระดับการแสดงออกของ MCP-1 และ IL-6 mRNAs ในเนื้อเยื่อไต



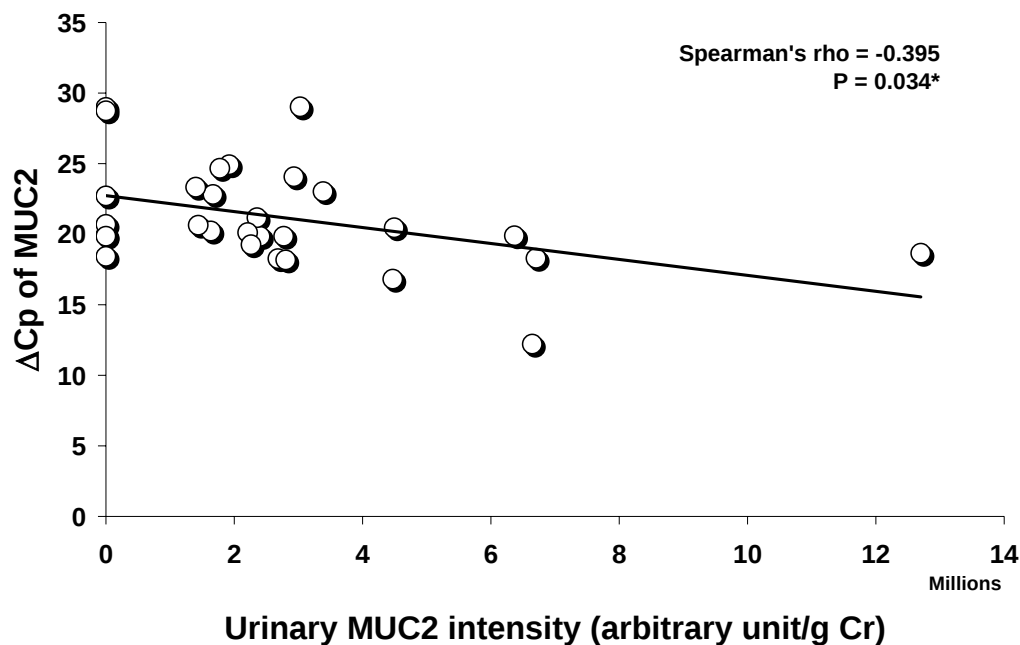
รูปที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณการขับออกของ MUC1 ในปัสสาวะระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (nephrolithiasis (NL) group) และกลุ่มควบคุมคนปกติ (healthy (H) group) พบว่าการขับออกของ MUC1 ในปัสสาวะระหว่าง NL group และ H group ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Mann-Whitney test,  $P = 0.738$ )



รูปที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะระหว่าง nephrolithiasis (NL) group และ healthy (H) group พบว่าการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะระหว่าง NL group สูงกว่า H group อย่างมีนัยสำคัญ (Mann-Whitney test,  $P = 0.003$ )



รูปที่ 10 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการขับออกของ MUC1 และ MUC2 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Spearman's  $\rho = 0.871$ ,  $P < 0.001$ )



รูปที่ 11 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ MUC2 ในไตกับระดับการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะ พบว่าค่า  $\Delta C_p$  ของ MUC2 สัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณการขับออกของ MUC2 ในปัสสาวะ ค่า  $\Delta C_p$  ต่ำแสดงว่ามีปริมาณ mRNA สูง

ตารางที่ 5 Assessment of associations between urinary excretion of MUC1 and MUC2 and oxidative stress and renal tubular damage in nephrolithiasis patients using Spearman's rank correlation test

| Urinary biomarkers            | Spearman's rho (P > 0.05) |              |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|
|                               | Urinary MUC1              | Urinary MUC2 |
| 8-OHdG ( $\mu\text{g/g Cr}$ ) | -0.092                    | 0.093        |
| NAG activity (U/g Cr)         | -0.107                    | -0.032       |

#### การแยกสกัดมิวซินจากตัวอย่างปัสสาวะ

การศึกษานี้ใช้วิธี CL-2B column gel chromatography ในการแยกสกัดมิวซินจากตัวอย่างปัสสาวะรวม (pooled urine) ของกลุ่มควบคุมคนปกติ (HP) และของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP) ในแต่ละ fraction ทำการวัดปริมาณโปรตีน (โดย OD280 nm) ระดับไกลโคโปรตีน (โดย PAS staining) และระดับ MUC1 (โดย slot blot immunodetection) รูปที่ 12 และรูปที่ 13 แสดง chromatogram ของตัวอย่างปัสสาวะรวม HP และ NLP ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของไกลโคโปรตีน (PAS staining pattern) ที่พบในปัสสาวะรวม HP และ NLP พบว่า ใน HP มี peak ของ PAS intensity เพียง peak เดียว (peak A) ขณะที่ใน NLP มี peak ของ PAS intensity อย่างน้อย 3 peaks (peaks B, C, D) (รูปที่ 14) แสดงว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีการขับออกของไกลโคโปรตีนหลายชนิดมากกว่าปัสสาวะของคนปกติ

ผลการตรวจสอบ MUC1 ในแต่ละ fraction พบว่า MUC1 ในตัวอย่าง NLP ถูกชะ (elute) ออกมาจาก CL-2B column เร็วกว่า MUC1 ในตัวอย่าง HP (รูปที่ 15) แสดงว่า MUC1 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีขนาดใหญ่กว่า MUC1 ในปัสสาวะของคนปกติ

นอกจากนี้พบ MUC1 peak ที่อยู่ระหว่าง fractions 5-17 ในตัวอย่างปัสสาวะรวม NLP แต่ไม่พบในตัวอย่างปัสสาวะรวม HP ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตน่าจะมี MUC1 isoforms มากกว่า 1 isoforms และมีขนาดใหญ่มากกว่า MUC1 ที่พบในปัสสาวะของคนปกติ และที่สำคัญ MUC1 isoform ที่อยู่ระหว่าง fractions 5-17 ไม่พบในปัสสาวะของคนปกติ

จากผลของ MUC1 blotting รวม (pool) fractions ตาม MUC1 intensity ได้สารตัวอย่างใหม่ดังนี้

ตัวอย่างปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP)

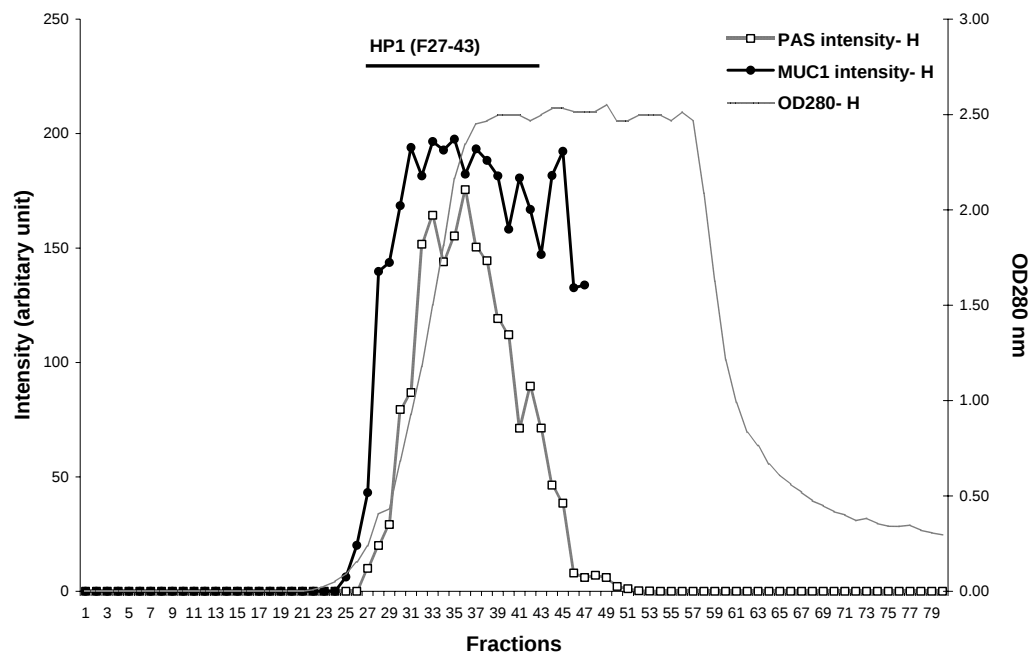
- Healthy pool 1 (HP1) รวม fractions 27 – 43 (รูปที่ 12)

ตัวอย่างปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP)

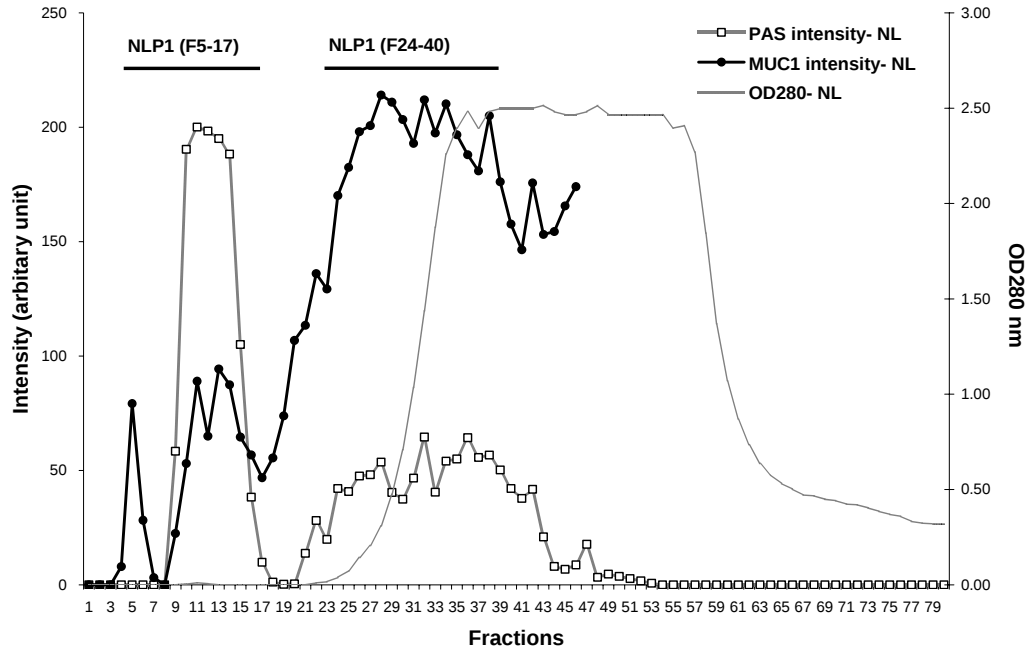
- Nephrolithiasis pool 1 (NLP1) รวม fractions 5 – 17 (รูปที่ 13)
- Nephrolithiasis pool 2 (NLP2) รวม fractions 24 – 40 (รูปที่ 13)

นำ pooled CL-2B fractions ที่ได้ (NLP1, NLP2 และ HP1) ไปทำ dialysis ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำออก (Savant Speed Vac)

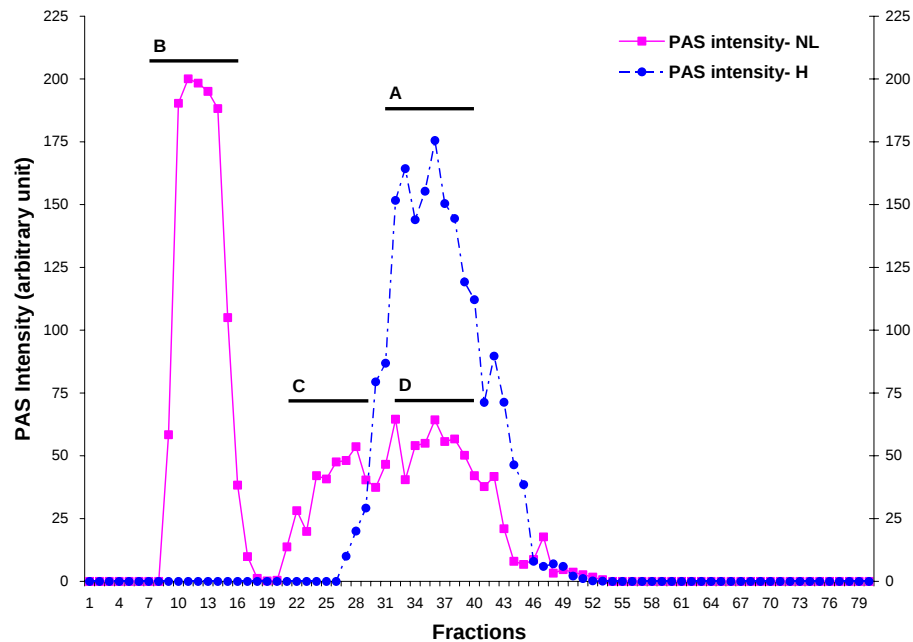
จากนั้นนำตัวอย่าง urinary mucin pool ที่ได้นี้ไปทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) ในหลอดทดลอง (*in vitro* CaOx crystal aggregation assay)



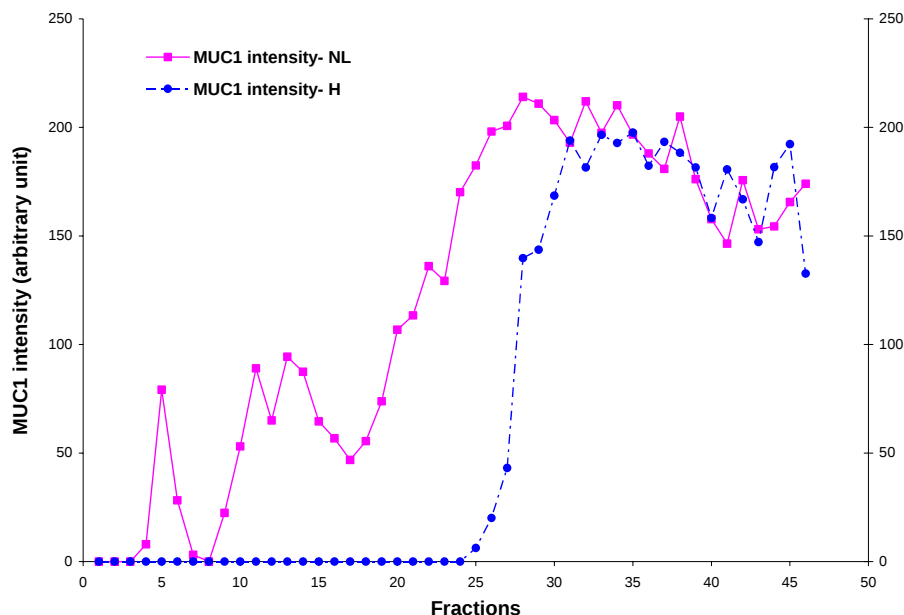
รูปที่ 12 การแยกสกัดมิวซินจากตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมคนปกติ (HP) ในแต่ละ fraction วัดปริมาณโปรตีน (โดย OD280 nm) ระดับไกลโคโปรตีน (โดย PAS staining) และระดับ MUC1 (โดย slot blot immunodection)



รูปที่ 13 การแยกสกัดมิวซินจากตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจไต (NLP) ในแต่ละ fraction วัดปริมาณโปรตีน (โดย OD280 nm) ระดับไกลโคโปรตีน (โดย PAS staining) และระดับ MUC1 (โดย slot blot immunodection)



รูปที่ 14 เปรียบเทียบ PAS staining patterns ระหว่างตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมคนปกติ (HP) กับกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจไต (NLP) ใน HP พบไกลโคโปรตีนเพียงกลุ่มเดียว (Peak A) ขณะที่ใน NLP พบไกลโคโปรตีนอย่างน้อย 3 กลุ่ม (Peak B, Peak C และ Peak D)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบ MUC1 patterns ระหว่างตัวอย่างปัสสาวะรวมของกลุ่มควบคุมคนปกติ (HP) กับกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไต (NLP) MUC1 ในตัวอย่างปัสสาวะรวม NLP ถูกชะ (elute) ออกมาจาก CL-2B column เร็วกว่าใน HP และ MUC1 peak ที่อยู่ระหว่าง fractions 5-17 พบเฉพาะใน NLP

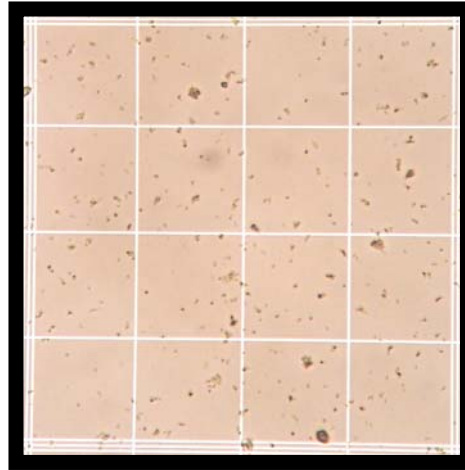
#### การวิเคราะห์บทบาทในการก่อตัวของมิวซินจากปัสสาวะ

นำตัวอย่าง urinary mucin pools (NLP1, NLP2 และ HP1) มาทดสอบการเกาะกลุ่มของผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) ในหลอดทดลอง (*in vitro* CaOx crystal aggregation assay) เพื่อเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่มของผลึก (aggregation coefficient, AC) ของแต่ละตัวอย่าง โดยสารตัวอย่างที่มีค่า AC สูงจะมีความสามารถกระตุ้นหรือส่งเสริมเกาะกลุ่มของผลึกได้มากกว่าสารตัวอย่างที่มีค่า AC ต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 16

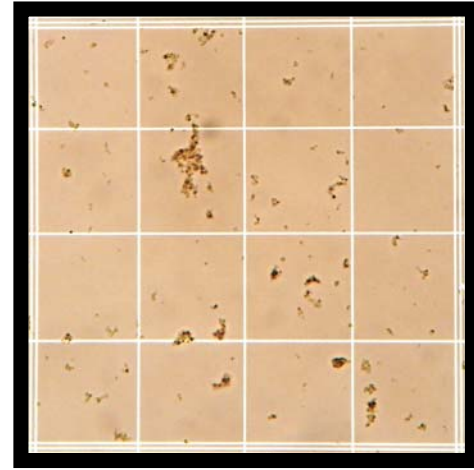
ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของผลึกระหว่างมิวซินจากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และมิวซินจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนี้ไต (NLP1 และ NLP2) พบว่าค่า AC เฉลี่ย ของสารตัวอย่าง NLP1, NLP2 และ HP1 เท่ากับ 7.19, 2.31, 2.16 ตามลำดับ ทดสอบทางสถิติโดยใช้ ANOVA test พบว่าค่า AC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.013$ ) และจากผล Sidak multiple-comparison 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 (รูปที่ 17)

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 18)

ผลการวัดปริมาณกรดเซียลิก (total sialic acid (TSA) content) แสดงในรูปที่ 19 ปริมาณกรดเซียลิกใน NLP1 ต่ำกว่าใน NLP2 และ HP2 อย่างชัดเจน

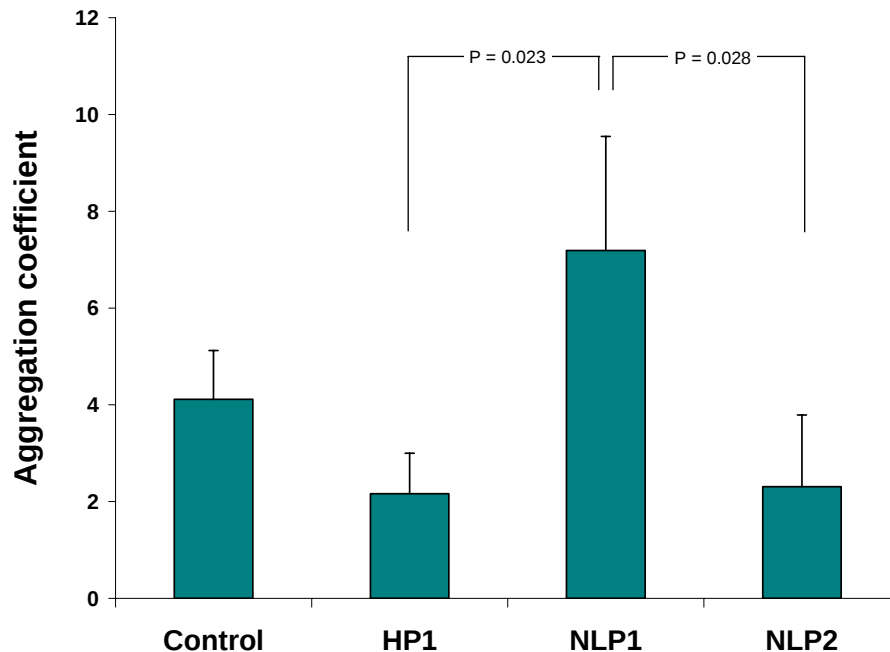


(A) HP1 (F27-43): AC = 2.82



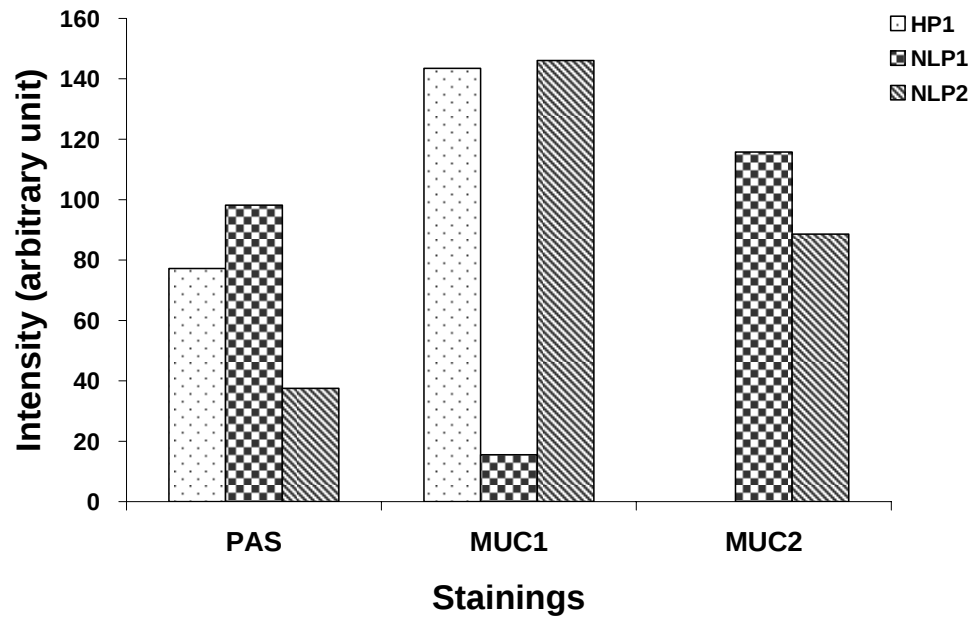
(B) NLP1 (F5-17): AC = 6.21

รูปที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เปรียบเทียบการเกาะกลุ่มของผลึกนิวเคลียสมอกซาเลตระหว่างค่า AC ต่ำ (AC = 2.82) และค่า AC สูง (AC = 6.21) A = การเกาะกลุ่มของผลึกเมื่อเติมมีวชินที่สกัดได้จากปัสสาวะของคนปกติ (HP1) B = การเกาะกลุ่มของผลึกเมื่อเติมมีวชินที่สกัดได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไต (NLP1) ค่า AC ที่สูงขึ้นบ่งชี้ว่าการเกาะกลุ่มของผลึกมากขึ้น (กำลังขยาย 400 เท่า)

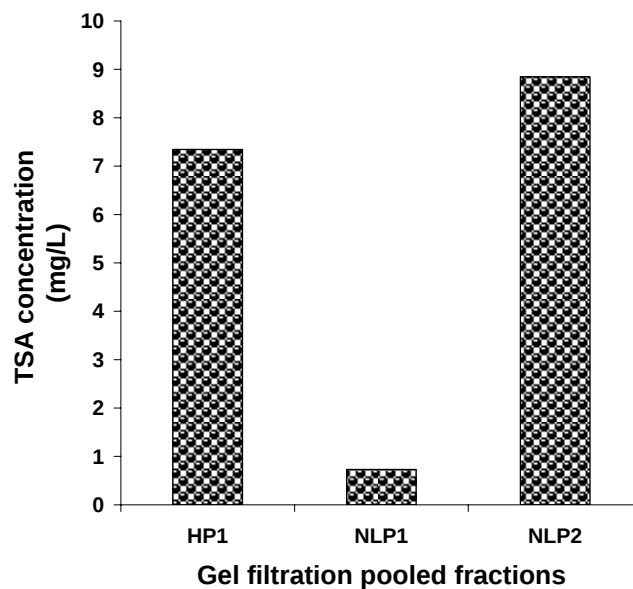


รูปที่ 17 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การเกาะกลุ่มของผลึก (aggregation coefficient, AC) ของตัวอย่างมีวชินจากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และมีวชินจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนี้ไต (NLP1 และ NLP2) พบว่าค่า AC ของ HP1 และ NLP2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 1.000$ ) ขณะที่ค่า AC ของ NLP1 สูงกว่า HP1 ( $P = 0.023$ ) และ NLP2 ( $P = 0.028$ ) อย่างมีนัยสำคัญ (Sidak multiple-comparison)

test) Control คือหลอดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างมีวชิ (ค่า AC สูงบ่งชี้ว่าการเกาะกลุ่มของผลึกมาก)



รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณไกลโคโปรตีน (PAS staining) MUC1 และ MUC2 ในสารตัวอย่างมีวชิ HP1, NLP1 และ NLP2



รูปที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณกรดเซียลิก (total sialic acid (TSA) content) ใน HP1, NLP1 และ NLP2 ปริมาณกรดเซียลิกใน NLP1 ต่ำกว่าใน NLP2 และ HP2 อย่างชัดเจน

จากผลการศึกษามิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมโดยวิธี CL-2B Gel filtration chromatography การย้อม PAS staining การทำ MUC1 และ MUC2 immunodetection และการหาปริมาณ total sialic acid ในสารตัวอย่างมิวซินจากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2) สามารถสรุปคุณลักษณะของมิวซิน HP1, NLP1 และ NLP2 ได้ดังตารางที่ 6

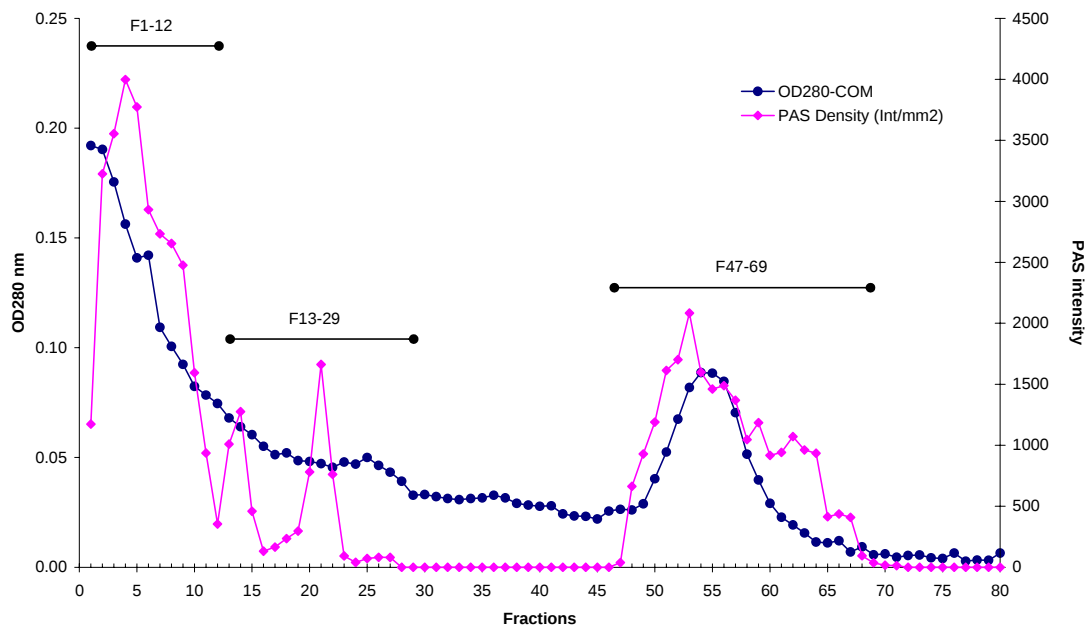
ตารางที่ 6 สรุปคุณลักษณะของตัวอย่างมิวซินที่สกัดได้จากปัสสาวะรวมของคนปกติ (HP1) และจากปัสสาวะรวมของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (NLP1 และ NLP2)

| Partially purified urinary mucins | AC   | Molecular size | TSA content | PAS intensity | MUC1 content | MUC2 content |
|-----------------------------------|------|----------------|-------------|---------------|--------------|--------------|
| HP1                               | Low  | Small          | High        | Intermediate  | High         | Undetectable |
| NLP1                              | High | Larger         | Low         | High          | Low          | High         |
| NLP2                              | Low  | Large          | High        | Low           | High         | Intermediate |

สรุป มิวซิน NLP1 พบได้เฉพาะในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และมีคุณสมบัติเป็น “crystal aggregator” มิวซิน NLP1 นี้มีขนาดใหญ่มากแต่มีประจุลบต่ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก aberrant glycosylation คือมี increased glycosylation แต่มี decreased sialylation เมื่อมิวซินนี้ถูกดูดซับ (adsorb) บนผิวของผลึกแคลเซียมออกซาลेट จะทำให้ประจุลบสุทธิของผลึกลดลงด้วย แรงผลักระหว่างผลึกจะลดลง ทำให้ผลึกมีโอกาสเข้าใกล้กันมากขึ้นจึงเกิดการเกาะกลุ่มที่ใหญ่ขึ้น และเนื่องจากมิวซินมี hydration property และ gel-forming property มิวซินขนาดใหญ่ที่มีปริมาณไกลแคนสูงนี้ จะทำหน้าที่เป็นเจลเชื่อมระหว่างผลึกแคลเซียมออกซาลेट ทำให้ผลึกเกาะกลุ่มกันง่ายและมั่นคงขึ้น ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ การพบมิวซินขนาดใหญ่ที่มีปริมาณกรดเซียลิกต่ำในปัสสาวะอาจเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วหรือการเป็นนิ่วซ้ำได้

จากผลการวิจัยนี้คณะวิจัยได้ตั้งสมมุติฐานต่อว่า การมีผลึกหรือก้อนนิ่วในไตจะทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและเกิดการอักเสบขึ้น ส่งผลต่อการสร้างมิวซินที่ผิดปกติทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ดังที่แสดงให้เห็นในการศึกษานี้ มิวซินที่ผิดปกตินี้จะมีบทบาทเป็น stone promoter ส่งเสริมการเกิด stone nidi และการเจริญของก้อนนิ่ว เพื่อพิสูจน์ว่ามิวซินที่ผิดปกติเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเกิดก้อนนิ่วจริง การศึกษาต่อไปตรวจสอบมิวซินในก้อนนิ่ว ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนมิวซินในเนื้อเยื่อไต เซลล์ชนิดไตในไตที่สังเคราะห์มิวซิน รวมทั้งศึกษาผลของผลึกและสารตัวกลางการอักเสบต่อการสังเคราะห์มิวซินในเซลล์บุท่อไต

ผลการวิจัยเบื้องต้นของคณะวิจัยพบว่าในก้อนนิ่ว (stone matrix) ชนิดแคลเซียมออกซาลेट ประกอบด้วยโปรตีนหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็น glycoproteins เนื่องจากให้ผลบวกกับ PAS staining ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 fractions ตามขนาดของโมเลกุล (รูปที่ 20) ที่น่าสนใจคือ เมื่อตรวจสอบด้วย MUC1 antibody พบ MUC1 positive fractions ได้ในกลุ่ม large MW glycoproteins ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่ามิวซินเกี่ยวข้องกับการก่อตัวเป็นก้อนนิ่วจริง หลายคำถามวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของมิวซินในโรคนิ่วไตรอคำตอบจากงานวิจัยต่อไป



**รูปที่ 18** The CL-2B gel filtration chromatogram of proteins extracts from CaOx stone. The fractions were analyzed for OD280 nm (circle dot) and PAS staining (diamond dot) to detect proteins and glycoproteins, respectively. The overall data suggested that most of proteins found in stone matrix were glycoproteins. At least 3 major peaks of glycoproteins (F1-12, F13-29, F47-69) found in the CaOx stone matrix. Two of them (F1-12 and F13-29) were large MW glycoproteins, which were positive for mucin antibody (MUC1). The data suggested that large MW glycoproteins (likely to be mucins) play role in the formation of stone.

## Output ที่ได้จากโครงการ

---

### 1. การไปเสนอผลงานวิจัยในต่างประเทศ (Presentations)

1. นำไปเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ (poster presentation) เรื่อง Urinary mucins isolated from nephrolithiasis patients promote the aggregation of calcium oxalate crystals ในการประชุม The 5th eULIS Symposium (12th European Symposium on Urolithiasis) ณ เมือง Lisbon ประเทศโปรตุเกส ระหว่างวันที่ 4 – 7 กรกฎาคม 2550 (<http://www.eulis2007.com>)
2. นำไปเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า (oral presentation) เรื่อง Intrarenal gene expression of monocyte chemoattractant protein-1, interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in kidney stone patients ในการประชุม 11<sup>th</sup> International Symposium on Urolithiasis ณ เมือง Nice ประเทศฝรั่งเศส ระหว่างวันที่ 2-5 กันยายน 2551 (<http://www.urol2008.com>)

### 2. ผลงานตีพิมพ์ (Publications)

1. **Boonla C**, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, **Tosukhowong P**. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidney. BJU Int 2008; 101(9): 1170-7. มี impact factor 2.635
2. กำลังจัดเตรียม manuscript ฉบับที่ 2 ชื่อเรื่องที่จะตีพิมพ์ "Evidence for involvement of mucins in lithogenesis in kidney stone disease" ชื่อวารสารที่จะตีพิมพ์ Kidney International (impact factor 4.79) หรือ Nephrology Dialysis Transplantation (impact factor 3.154) หรือ FEBS J (impact factor 3.033) หรือ BJU International (impact factor 2.635)

ภาคผนวก