

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมในเซลล์เม็ดเลือดขาวกับอินเตอร์ลิวคิน-8 และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไต

ธนิดา จิระมงคลศิริ, สุสินัส ดิษยบุตร, พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒน์, ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: อุบัติการณ์การเกิดโรคนิ้วไตเพิ่มขึ้นในผู้ใหญ่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก เนื่องจากหลายปัจจัยด้วยกัน ทำให้โรคนิ้วไตเป็นโรคที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขมากยิ่งขึ้น โดยโรคนิ้วไตก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ไตได้หลายประการ ตั้งแต่หน่วยย่อยไตอักเสบ ไตเสื่อมหรือไตวายเรื้อรัง ในปัจจุบันยังไม่มีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพใดที่ช่วยบ่งชี้ภาวะแทรกซ้อนของโรคนิ้วไตที่เกิดขึ้นที่ไตได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมซึ่งจัดเป็นการควบคุมเหนือพันธุกรรม โดยมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนมมีความสัมพันธ์กับโรคต่าง ๆ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งจีโนม ระดับอินเตอร์ลิวคิน-8 (IL-8) และโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตเปรียบเทียบกับคนปกติ

ผู้ป่วยและวิธีการศึกษา: ผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 58 คน ประกอบด้วยผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกศัลยกรรมทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 29 คน และคนปกติที่ไม่ป่วยด้วยโรคนิ้วไตซึ่งอาศัยอยู่ในชุมชนเดียวกันกับผู้ป่วยจำนวน 29 ราย ทำการเจาะเลือดและเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง นำเม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ระดับร้อยละ 5-methylcytosine (5-mC%) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธี ELISA ปัสสาวะนำมาตรวจหาระดับครีเอตินินโดยใช้เอนไซม์ IL-8 โดย ELISA และโปรตีนโดยวิธี dye-binding

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยโรคนิ้วไตมีระดับ 5-mC% ความเข้มข้น IL-8 และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$, $p<0.001$ และ $p<0.001$ ตามลำดับ) และยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง 5-mC% กับความเข้มข้นของ IL-8 ในปัสสาวะ ($r=0.491$, $p<0.001$) และความเข้มข้นของ IL-8 กับระดับโปรตีนในปัสสาวะ ($r=0.661$, $p<0.001$) ผลการวิเคราะห์กราฟ ROC ของ 5-mC% พบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.799 (95% CI: 0.684-0.915) และที่ค่าอ้างอิงเท่ากับ ร้อยละ 0.35 ให้ค่า sensitivity และ specificity เป็นร้อยละ 82.76 และ 62.07 ตามลำดับ

สรุป: รายงานนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกเกี่ยวกับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่พบว่ามีความสัมพันธ์ที่สูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมที่เปลี่ยนแปลงนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนิ้วไต นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่เพิ่มสูงขึ้น ข้อมูลวิจัยนี้ชี้แนะว่าการตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและการวัดปริมาณ IL-8 ในปัสสาวะน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เกี่ยวกับโรคนิ้วไตได้ รวมทั้งการลดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมจากพฤติกรรมกรรมการดำเนินชีวิตอาจเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรคนิ้วไตได้ จึงควรศึกษาต่อไปโดยทำการเพิ่มจำนวนประชากรศึกษาเพื่อพิสูจน์ความสำคัญนี้

คำสำคัญ: การควบคุมเหนือพันธุกรรม, การเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ, Interleukin-8

Original article

Leukocyte global DNA methylation is associated with urinary interleukin-8 and protein in patients with renal stone diseases

Thanida Chiramongkolsiri, Thasinas Dissayabutra, Pisit Prapunwattana, Piyaratana Tosukhowong

Departments of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Abstract

Objective: Incidence of renal stone disease is increasing in every country, including Thailand. Renal stone has high rate of recurrence and causes renal injury, chronic renal disease and kidney failure. However, there was no biomarker indicating the stone formation or its complications. Global DNA methylation is a process of epigenetic modification that could be affected by the inflammatory or oxidative process, and used as a biomarker for several diseases. We investigated the leukocyte global DNA methylation, urinary interleukin-8 (IL-8) and proteinuria in renal stone patients and healthy controls

Material and Methods: Fifty-eight participants, divided into 29 renal stone disease patients who were visited the Urology Clinic, Sunpasitprasong Hospital, Ubon Ratchathani province, and 29 healthy controls who lived in the same communities with patients were enrolled. Blood and 24-hours urine samples were collected from all participants. DNA were extracted from leukocytes and measured for the percentage of 5-methylcytosine (5-mC%) level in global DNA by ELISA kit. Urine samples were analyzed for creatinine by enzymatic method, interleukin-8 (IL-8) as an inflammatory biomarker by ELISA kit and protein by dye binding method

Results: Renal stone disease patients had higher percentage of 5-mC, urinary IL-8 concentration and protein level were higher than the healthy control group ($p=0.002$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). There were the positive correlation between the percentage of 5-mC and urinary IL-8 ($r=0.491$, $p<0.001$) as well as the urinary IL-8 and protein ($r=0.661$, $p<0.001$). ROC analysis of 5-mC% revealed an area under curve of 0.7993 (95% CI: 0.6838-0.9147). At 0.35% cutoff, the test imparted sensitivity and specificity of 82.76% and 62.07%, respectively

Conclusion: We reported for the first time that the level of leukocyte global DNA methylation in patients with renal stone disease which was hypermethylated more than healthy controls. The global DNA hypermethylation appeared to be associated with the stone formation. Our data suggests that the levels of global DNA methylation and urinary IL-8 could be used as biomarkers for renal stone. Thus reducing the levels of global DNA methylation of lifestyle modification may be a new approach in the treatment of renal stones. However would be studied further by the increasing number of population to prove this importance

Key words: epigenetics, DNA methylation, interleukin-8

บทนำ

กลไกการเกิดนิ่วไตซึ่งเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันเชื่อว่าเมื่อปัสสาวะมีสารก่อนิ่วเข้มข้น เช่น แคลเซียม ฟอสเฟตและออกซาเลต และ/หรือ มีสารยับยั้งเช่น ซิเตรต แมกนีเซียม โพแทสเซียม ไม่เพียงพอในการป้องกันการตกผลึก ร่วมกับปัจจัยเสริมคือปริมาตรของปัสสาวะน้อย (low urine volume) จนเกิดการอิ่มตัว (saturation) ของสารเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำในปัสสาวะ (crystallization) เช่น ผลึกแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) และผลึกแคลเซียมฟอสเฟต (CaP) และเมื่อมีการเพิ่มของผลึกมากขึ้นจนเกินกว่าจุดอิ่มตัวหรือมีความอิ่มตัววดยิ่ง (supersaturation) กลุ่มผลึกจะมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์บุท่อไต ทำให้มีการติดค้างของผลึกเกาะติดท่อไต (crystal retention) กระตุ้นการผลิตสารอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์บุท่อไตและเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายและบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไต เพิ่มการดึงดูดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cells) เข้ามาจับกินผลึกนิ่ว ทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบสูงมากขึ้น เมื่ออยู่ในภาวะนี้เรื้อรังผลึกจะรวมตัวกันมากขึ้น เจริญเป็นจุดศูนย์กลางของก้อนนิ่ว (stone nidus) และเจริญกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด ก้อนนิ่วที่เกิดขึ้นนี้ยังก่อให้เกิดพยาธิสภาพในไตหากก้อนนิ่วใหญ่มากจะอุดกั้นช่องทางผ่านปัสสาวะ เป็นผลให้เกิดภาวะติดขัดได้ง่ายการอักเสบเรื้อรังและพังผืด (fibrosis) ในเนื้อไตตามมา อาจส่งผลให้ไตทำงานลดลง

ในปี ค.ศ. 2010 Suen และคณะ¹ ตรวจวัดตัวบ่งชี้การอักเสบในผู้ป่วยโรคนี้เทียบกับคนปกติโดยตรวจวัดไซโตไคน์ (cytokines) และเคโมไคน์ (chemokines) หลายชนิด พบว่า IL-8 ในปัสสาวะเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างชัดเจนระหว่างผู้ป่วยโรคนี้และคนปกติ สำหรับ IL-8 เป็น chemokine ชนิด superfamily ของ CXC (มี cysteine 2 ตัวคั่นด้วยกรดอะมิโนอื่น 1 ตัว) รวมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 99 กรดอะมิโนนอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันส่งผลให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตและเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มการสังเคราะห์สารตัวกลางของการอักเสบมากขึ้น เช่น interleukin (IL-6), prostaglandin E2, osteopontin² และยังพบ

ระดับ mRNA ของ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ในเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลงและเกิดการบาดเจ็บของไตเพิ่มขึ้น³ รวมทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบยังมีความสัมพันธ์กัน โดยพบปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) สูงขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบ⁴

การก่อนิ่วในไตเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย (multifactorial condition) เกี่ยวกับทั้งความเสี่ยงทางพันธุกรรม พฤติกรรมการรับประทานอาหารและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเสี่ยงดังกล่าวจะส่งผลให้มีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้ (lithogenic metabolic risk factors) ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการอิ่มตัวของสารก่อนิ่วในปัสสาวะจนเกิดภาวะอิ่มตัววดยิ่งและยังเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกขึ้นในปัสสาวะ (crystaluria) ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญมากที่สุดของผู้ป่วยโรคนี้ในไทยคือ ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) และภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (hyperoxaluria) จากการศึกษาของ Domrongkitchaiporn และคณะ⁵ ผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมจำนวน 83 ราย พบภาวะ hypocitraturia (citrate < 300 mg/day หรือ citrate < 1.43 mmol/day) ร้อยละ 50.6 Stitchantrakul และคณะ⁶ ศึกษาในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมจำนวน 79 ราย พบความชุกของ hypocitraturia, hypercalciuria และ hyperoxaluria ร้อยละ 69.6, 15.2 และ 1.3 ตามลำดับ รวมทั้งรายงานวิจัยของ Sriboolue และคณะ⁷ พบความชุกของ hypocitraturia, hypercalciuria และ hyperoxaluria ร้อยละ 100, 16 และ 0 ตามลำดับจากรายงานการศึกษาจำนวนมากพบว่าภาวะที่มีสารยับยั้งนี้ต่ำ โดยเฉพาะภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำเป็นความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่พบอยู่เสมอในผู้ป่วยโรคนี้ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก (ร้อยละ 20-63) ส่วนความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญมากที่สุดในต่างประเทศหรือในประเทศตะวันตก คือ ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูงและภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูงร้อยละ 20-53 และร้อยละ 15-33 ตามลำดับ⁸

มีรายงานที่พบว่าความเสี่ยงในการเกิดนิว (relative risk) ของผู้ป่วยที่มีประวัตินิวในครอบครัวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยเป็น 3.18 เท่าเมื่อเทียบกับผู้ไม่มีประวัตินิวในครอบครัว⁹ สอดคล้องกับรายงานของ Tosukhowong และคณะ¹⁰ พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคนิวไตทั้ง 4 ภาคของไทยประมาณร้อยละ 30 มีประวัตินิวในครอบครัว โดยเหตุที่ยังขาดข้อมูลการกระจายตัวของผู้ป่วยโรคนิวไตในครอบครัวเดียวกันและไม่มีรูปแบบการถ่ายทอดตามหลักของเมนเดลโดยทั่วไป อีกทั้งยังไม่มีรายงานใดที่พบความผิดปกติทางพันธุกรรมที่สามารถอธิบายได้และไม่มีรายงานใดบ่งชี้ได้ว่ามียีนเดี่ยว (monogenic) ยีนใดที่เป็นสาเหตุจำเพาะ ขณะที่ในต่างประเทศมีรายงานยีนผิดปกติที่เป็นยีนเดี่ยวซึ่งพบในผู้ป่วยเด็กที่มีประวัตินิวในครอบครัวในอัตราที่ต่ำกว่าร้อยละ 2 อาทิเช่น การพบยีนผิดปกติของโปรตีนขนส่งซิสทีน ส่งผลให้พบซิสทีนในปัสสาวะสูง (cystinuria) ยีนผิดปกติของช่องทางโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง และยีนผิดปกติของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง¹¹ นอกจากนี้ มีหลายรายงานที่สนับสนุนว่าโรคนิวไตส่วนใหญ่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย ส่วนความผิดปกติทางพันธุกรรมอาจเกี่ยวข้องกับหลายยีน (polygenic) เป็นแบบไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) และสาเหตุดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมหรือพฤติกรรมเสี่ยงที่มาปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีนโดยไม่ทำให้มีการเปลี่ยนรหัสทางพันธุกรรมทั้งที่ทำให้เกิดโรคและไม่เกิดโรคนิวไต สอดคล้องกับหลายรายงานที่กล่าวว่าสิ่งแวดล้อมและการบริโภคอาหารมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสของ DNA หรือเรียกว่าการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมหรือเอพิเจเนติก (epigenetic) ซึ่งในปัจจุบันนักวิจัยเห็นพ้องต้องกันว่าการควบคุมการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญและเป็นกลไกที่ใช้ศึกษาในโรคต่าง ๆ ที่ยังไม่ทราบสาเหตุ การควบคุมการเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรมมีหลายแบบ ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) การดัดแปลงฮิสโตน (histone modifications) รวมทั้งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling) ซึ่งการเปลี่ยนแปลง

ด้านเอพิเจเนติกนี้เป็นกลไกที่ทำให้มีแสดงออกของยีนที่สามารถเปลี่ยนแปลงผันกลับได้ (reversible) และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้¹² เช่น ในปี ค.ศ. 2005 Fraga และคณะ¹³ พบว่าในช่วงปีแรกของชีวิตฝาแฝดซึ่งเกิดจากไข่ใบเดียวกันจะมีการควบคุมเหนือพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน แต่เมื่ออายุมากขึ้นฝาแฝดจะแสดงความแตกต่างอย่างเด่นชัดเนื่องจากอิทธิพลของทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน เช่น การสูบบุหรี่ กิจกรรมทางกายภาพ การบริโภคอาหาร เป็นต้น จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าผู้ที่มีลำดับเบส (genotype) ที่เหมือนกันแต่มีลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ที่แตกต่างกันหรือเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสิ่งแวดล้อมได้ภายหลัง

กระบวนการเมทิลเลชันของ DNA เป็นกลไกที่สำคัญของการควบคุมเหนือพันธุกรรม ที่เกิดจากการเติมหมู่เมทิลให้กับนิวคลีโอไทด์ชนิด cytosine (C) บริเวณ CpG islands การเติมหมู่เมทิลของ DNA อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) และ DNA methylase โดยได้รับหมู่เมทิลจาก S-adenosyl methionine (SAM) กระบวนการนี้มักเกิดที่ตำแหน่งทรานสคริปชันโปรโมเตอร์ (transcription promoter) ของยีน ซึ่งระดับการเติมหมู่เมทิลมี 2 แบบ ได้แก่ ระดับการเติมหมู่เมทิลลดลง (hypomethylation) และระดับการเติมหมู่เมทิลเพิ่มขึ้น (hypermethylation) สำหรับเซลล์ปกติ นั้นการเกิดเมทิลเลชันมักจะเกิดที่เบส cytosine บริเวณที่มีรหัสของยีนและไม่พบที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์บริเวณ CpG islands แต่ในเซลล์มะเร็งกลับพบภาวะเมทิลเลชันระดับสูงบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (promoter hypermethylation) และพบภาวะเมทิลเลชันในระดับต่ำทั่วทั้งจีโนม (global DNA hypomethylation)

ปัจจุบันการศึกษาถึงการควบคุมเหนือพันธุกรรมในโรคต่าง ๆ กำลังได้รับความสนใจศึกษาเพิ่มขึ้นมาก Shengnan และคณะ¹⁴ พบภาวะ global DNA hypermethylation ในผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวนซินโดรม (Down syndrome) รวมทั้งมีการแสดงออกของ Ten-Eleven Translocation (TET) family genes และ RE1-Silencing Transcription factor (REST) ลดลง ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation โดย TET genes

เกี่ยวข้องกับ DNA demethylation และ RESTgene เป็นยีนที่ถอดรหัสให้ transcriptional repressor, Murphy และคณะ¹⁵ เปรียบเทียบระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ที่พยายามฆ่าตัวตาย (suicide attempt) กับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มผู้ที่พยายามฆ่าตัวตายมีภาวะ global DNA hypermethylation จากรายงานการวิจัย Liao และคณะ¹⁶ ศึกษาเกี่ยวกับ LINE-1 methylation ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งไต พบภาวะ global DNA hypermethylation สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งไต (renal cell cancer) โดยผู้ที่สูบบุหรี่จะมีระดับการเติมหมู่เมทิลและความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งไตสูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

หลายงานวิจัยเสนอว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบส่งผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของ DNA ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยมีการศึกษาในเม็ดเลือดขาวกับโรคต่าง ๆ ทั้งโรคเรื้อรังและโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่รวมเรียกว่าเมแทบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome) และพบเมทิลเลชันของ DNA ทั้งจีโนมในระดับสูง (global DNA hypermethylation) ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ¹⁷ โรคความดันเลือดสูง¹⁸ โรคไขมันในเลือดสูง¹⁹ โรคอ้วน²⁰ โรคเบาหวานและภาวะดื้อต่ออินซูลิน²¹ ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าผู้ที่มีภาวะเมแทบอลิกซินโดรมมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวไตได้ เช่น คนอ้วน อ้วนลงพุง²² และภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้ปัสสาวะเป็นกรดและมีซิเตรทในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia)²³

จากการทบทวนวรรณกรรมของคณะวิจัยพบว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเมทิลเลชันของ DNA ในโรคนิวไต ซึ่งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขของไทย เนื่องจากปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคนิวไตยังไม่ทราบแน่ชัดและยังมีพฤติกรรมการดำเนินชีวิตที่อาจส่งเสริมหรือส่งผลต่อการแสดงออกของยีนผ่านการควบคุมเหนือพันธุกรรมได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมทั้งจีโนม (global DNA methylation) ในเม็ดเลือดขาวกับระดับตัวบ่งชี้ของภาวะการอักเสบ IL-8 ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิวไตเทียบกับคนปกติที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมีความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงเหนือพันธุกรรมทั้งจีโนมกับภาวะการอักเสบซึ่งอาจจะสามารถประยุกต์ใช้เป็นตัวพยากรณ์การดำเนินโรค (prognosis) และทราบตัวบ่งชี้ (biomarker) ที่เป็นปัจจัยการก่อกวนในระดับอณูชีวโมเลกุลมากขึ้นและอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ต่อไป

ผู้ป่วยและวิธีการศึกษา

ศึกษาในผู้ป่วยโรคนิวไตที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานีในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 และกลุ่มควบคุมเป็นผู้มีสุขภาพดีซึ่งอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกลุ่มประชากรผู้ป่วย ซึ่งเข้าร่วมในแผนงานวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาจากมะนาวผงของไทยเพื่อการรักษาโรคนิวไต” ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาศาสตร์การแพทย์ระดับ 2 ของยาสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิวไต” โดยผู้วิจัยทำการคัดเลือกสารตัวอย่างของผู้ป่วยโรคนิวไตจำนวน 29 รายและอาสาสมัครจำนวน 29 ราย ซึ่งมีเพศและอายุที่ใกล้เคียงกัน โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พร้อมทั้งได้รับการยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) จากอาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมโครงการทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเพื่อนำส่งทีมแพทย์พยาบาล ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จากนั้นทีมแพทย์พยาบาลจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ตัวอย่างเลือดถูกเก็บโดยการปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของพลาสมาเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทีมแพทย์พยาบาลโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จัดส่งสารตัวอย่างปัสสาวะและเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยนำสาร

ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของ DNA ทั้งจีโนม และตัวอย่างปัสสาวะนำมาวิเคราะห์ ภาวะอักเสบปริมาณครีเอตินิน ปริมาณความเข้มข้น IL-8 และปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของ DNA ด้วย MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric)

สกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN, USA) ตรวจสอบปริมาณ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (EV60 UV-Visible, Thermo scientific, USA) โดยใช้โปรแกรมวัดสัดส่วน 260/280 จากนั้นนำ DNA มาตรวจวัดระดับ 5-mC ด้วย MethylFlash DNA methylation quantification kit (Epigentek, USA) โดยจะใช้ capture และ detection antibody ที่จำเพาะกับ 5-mC จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และคำนวณ 5-mC% ได้จาก

$$5\text{-mC}\% = \frac{(\text{sample OD} - \text{Negative Control OD}) \div S}{(\text{Positive Control OD} - \text{Negative Control}) \times 2 \div 5} \times 100\%$$

การตรวจวัด IL-8 ในปัสสาวะด้วย ELISA kit (Human IL-8/CXCL8 ELISA Kit)

เป็นการตรวจวัดแบบ Direct Sandwich ELISA โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน well plate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีซึ่งจำเพาะกับ Human IL-8 จากนั้นใส่ biotinylated antibody ซึ่งเป็น detection antibody จากนั้นใส่ HRP-conjugated streptavidin และ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณ IL-8 ในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับ IL-8 มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะด้วย enzymatic method โดยนำตัวอย่างใส่ creatininase ป่มที่ 37 องศาเซลเซียส creatinine ถูกเปลี่ยนแปลงเป็น sarcosine จากนั้นเติม sarcosine oxidase เกิดเป็น hydrogen peroxide ใส่ peroxidase และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550 นาโนเมตร

การวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะ โดยวิธี dye binding method

โดยใช้สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 dye ใน acidic solution (CCB reagent) ซึ่งเป็นสารสีแดงและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 465 นาโนเมตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นป่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เมื่อ CCB reagent จับกับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีฟ้า ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณปริมาณโปรตีนในปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD หรือ mean±SE) โดยนำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง ใช้สถิติ Independent-samples t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของ

5-mC% ปริมาณ IL-8 และปริมาณโปรตีนระหว่างทั้งสองกลุ่ม และสถิติ Pearson's correlation test ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง 5-mC% ปริมาณ IL-8 และปริมาณโปรตีนโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS เวอร์ชัน 16.0 (Chicago, IL) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

การศึกษานี้มีจำนวนผู้ป่วยโรคนิ่วไต 29 ราย เป็นเพศชาย 14 ราย (ร้อยละ 48.28) เพศหญิง 15 ราย (ร้อยละ 51.72) อายุเฉลี่ย 45.45 ± 9.20 ปี ดัชนีมวลกายเฉลี่ย 23.16 ± 3.31 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ผลการตรวจชนิดของก้อนนิ่วของผู้ป่วยโรคนี้ไตที่เข้าร่วมโครงการพบนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลาเลตมากที่สุดรวมร้อยละ 72.41 โดยเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาลาเลตบริสุทธิ์ร้อยละ 41.38 นิ่วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมแคลเซียมฟอสเฟตร้อยละ 17.24 นิ่วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมกรดยูริกร้อยละ 6.90 และนิ่วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 6.90 รองลงมาเป็นนิ่วชนิดแคลเซียมฟอสเฟต

ร้อยละ 17.24 โดยเป็นนิ่วแคลเซียมฟอสเฟตบริสุทธิ์ร้อยละ 10.34 นิ่วแคลเซียมฟอสเฟตผสมกรดยูริกร้อยละ 3.45 และนิ่วแคลเซียมฟอสเฟตผสมแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 3.45 นิ่วชนิดกรดยูริกร้อยละ 6.90 และนิ่วชนิดแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 3.45 อาสาสมัครผู้มีสุขภาพดีที่เข้าร่วมการวิจัยจำนวน 29 ราย เป็นเพศชาย 17 ราย (ร้อยละ 59) เพศหญิง 12 ราย (ร้อยละ 41) อายุเฉลี่ย 46.20 ± 9.24 ปี ดัชนีมวลกายเฉลี่ย 24.30 ± 4.58 kg/m^2 จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าเพศ ($p=0.876$) ค่าเฉลี่ยอายุ ($p=0.890$) และค่าเฉลี่ยดัชนีมวลกายเฉลี่ย ($p=0.151$) ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 1

ผลการวิเคราะห์ 5-mC% ซึ่งจะบ่งบอกระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม โดยศึกษาในสารตัวอย่าง DNA จากเม็ดเลือดขาวของผู้เข้าร่วมการวิจัยทั้งสองกลุ่ม พบว่าผู้ป่วยโรคนี้ไตมี 5-mC% สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$) โดยมีค่าเฉลี่ย 5-mC% อยู่ที่ 0.81 ± 0.097 และ $0.31 \pm 0.050\%$ ตามลำดับดังแสดง

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยโรคนี้ไตและอาสาสมัครผู้มีสุขภาพดี

Characteristics	Renal stone patients	Healthy controls	P value
Number of subjects	29	29	-
Male/Female	14/15	17 /12	0.876
Age (years) \pm SD	45.45 ± 9.20	46.20 ± 9.24	0.890
BMI (kg/m^2) \pm SD	23.16 ± 3.31	24.30 ± 4.58	0.151
Type of kidney stone			
Calcium Oxalate Stones	21 (72.41)		
Pure Calcium Oxalate Stones	12 (41.38)		
Calcium Oxalate and Calcium Phosphate Stones	5 (17.24)		
Calcium Oxalate and Uric Acid Stones	2 (6.90)		
Calcium Oxalate and Magnesium Ammonium Phosphate Stones	2 (6.90)		
Calcium Phosphate Stones	5 (17.24)		
Pure Calcium Phosphate Stones	3 (10.34)		
Calcium Phosphate and Uric Acid Stones	1 (3.45)		
Calcium Phosphate and Magnesium Ammonium Phosphate Stones	1 (3.45)		
Uric Acid Stones	2 (6.90)		
Magnesium Ammonium Phosphate Stones	1 (3.45)		

ในรูปที่ 1A

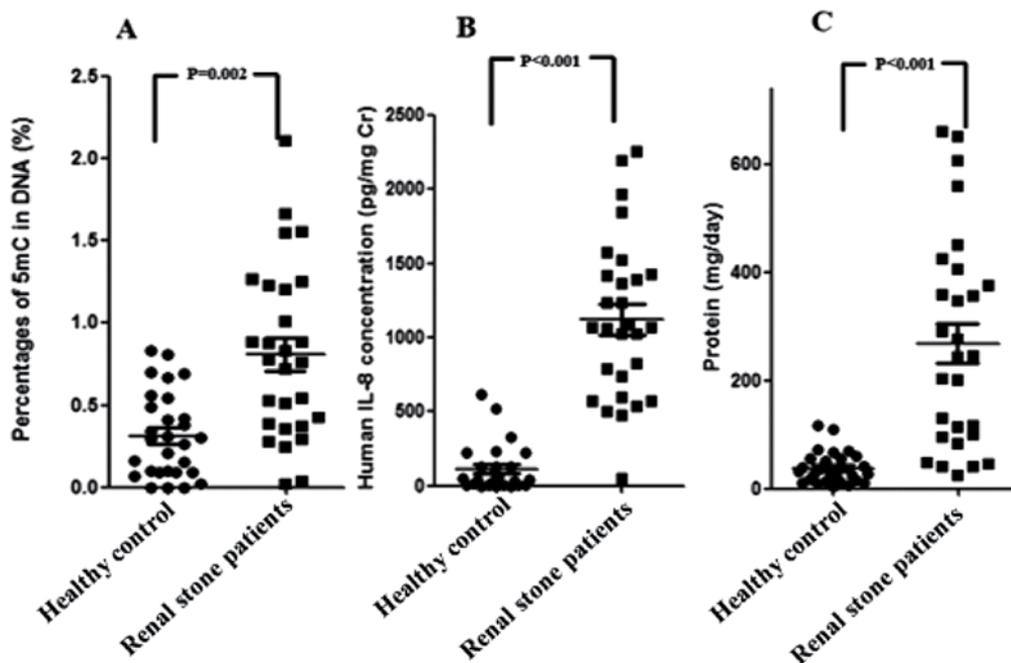
การวิเคราะห์ภาวะอักเสบจากการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้น IL-8 ในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัยทั้งสองกลุ่มพบว่า ผู้ป่วยโรคนี้วไตมีปริมาณความเข้มข้น IL-8 สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้น IL-8 อยู่ที่ 1124.37 ± 182.21 และ 113.29 ± 31.70 pg/mg creatinine ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1B

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากการใช้ CCB reagent ตรวจวัดในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมการวิจัยทั้งสองกลุ่มพบว่า ผู้ป่วยโรคนี้วไตมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยผู้ป่วยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 268.23 ± 36.34 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนคนปกติมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 44.38 ± 6.94 มิลลิกรัมต่อวัน ดังแสดงในรูปที่ 1C

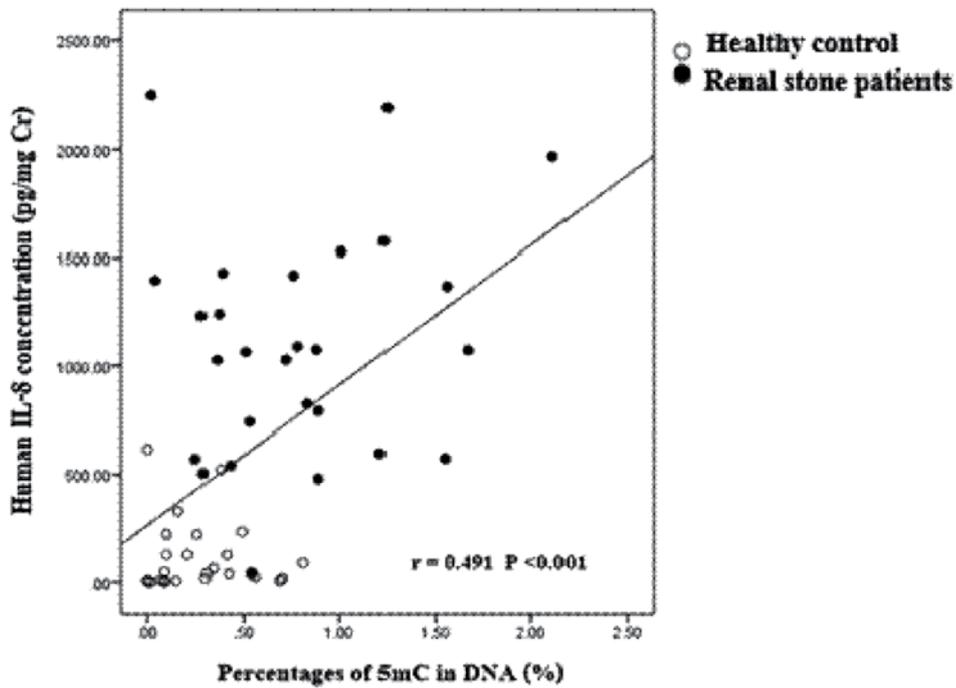
นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง 5-mC% กับปริมาณความเข้มข้น IL-8 ของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยรวมสองกลุ่ม โดยใช้ Pearson's correlation test พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง 5-mC% กับปริมาณ

ความเข้มข้น IL-8 ($r = 0.491$, $p < 0.001$) ดังรูปที่ 2 และทำนองเดียวกันสำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้น IL-8 กับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ พบว่าปริมาณความเข้มข้น IL-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ($r = 0.661$, $p < 0.001$) ดังรูปที่ 3

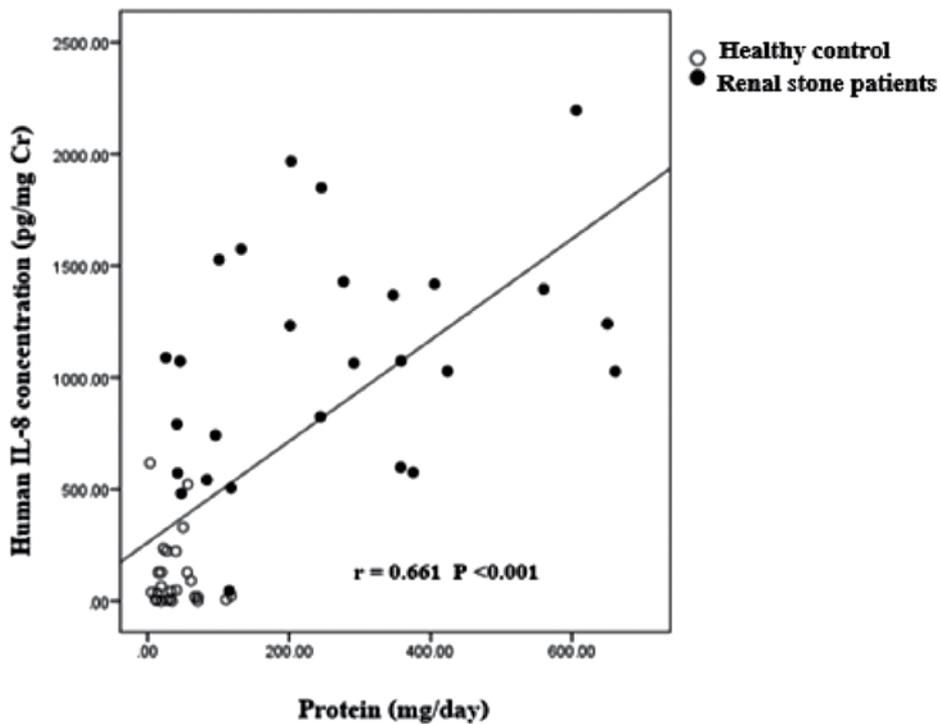
เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานค่าอ้างอิง (cutoff) ของ 5-mC% ในดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยนี้วไต การศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ Receiver operating characteristic (ROC) analysis เพื่อหาค่าอ้างอิงของ 5-mC% ที่เหมาะสม และประเมินคุณค่าของการตรวจวัด 5-mC% สำหรับใช้ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตจากคนปกติ รูปที่ 4 แสดง ROC curve ของตรวจวัด 5-mC% ที่วัดจากกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตและกลุ่มคนปกติ ROC curve ที่ได้มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) เท่ากับ 0.7993 (95% CI; 0.6838-0.9147) คณะวิจัยเลือกค่าอ้างอิงที่เหมาะสมของ 5-mC% ที่ ร้อยละ 0.35 นั่นคือผลการตรวจวัดเป็นบวกเมื่อมีค่า 5-mc% $> 0.35\%$ จำนวนผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มี 5-mC% สูงผิดปกติ (ให้ผลบวก) มี ร้อยละ 82.76 (24/29) ขณะที่จำนวนของกลุ่มควบคุม



รูปที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine (5-mC%) ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว (A) ปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 ในปัสสาวะ (B) และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (C) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้วไตและกลุ่มควบคุมผู้มีสุขภาพดี โดยพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมี 5-mC% ปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 และปริมาณโปรตีนสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$, $p < 0.001$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ)



รูปที่ 2 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine (5-mC%) กับปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด โดยปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกับ 5-mC% ($r=0.491$, $p<0.001$)

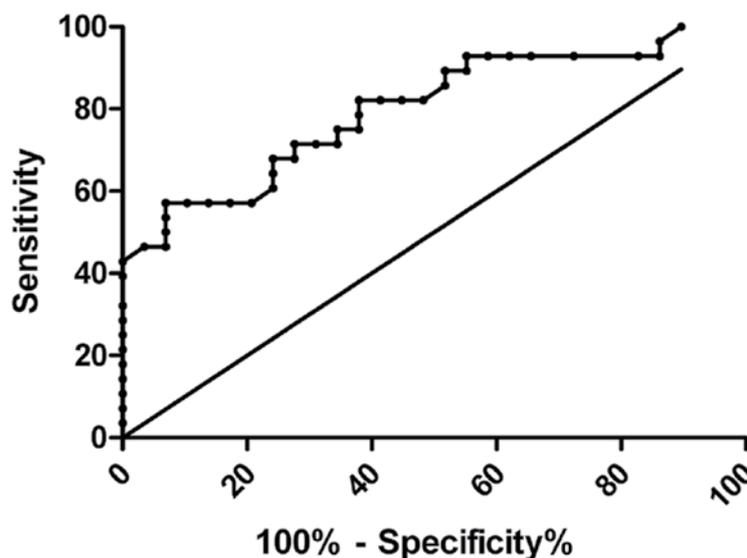


รูปที่ 3 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 กับปริมาณโปรตีนในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ปริมาณความเข้มข้น Interleukin-8 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณโปรตีน ($r=0.661$, $p<0.001$)

ที่มี 5-mC% สูงผิดปกติมีเพียงร้อยละ 37.93 (11/29) เมื่อคำนวณค่าการวินิจฉัย (diagnostic values) ของการตรวจวัด 5-mC% โดยใช้ค่าอ้างอิงร้อยละ 0.35 ได้ค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 82.76 และ 62.07 ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) เท่ากับร้อยละ 68.57 ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 78.26 และค่าความถูกต้องของการวินิจฉัย (accuracy) เท่ากับ ร้อยละ 72.41 (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

อุบัติการณ์การเกิดโรคนิวทางเดินปัสสาวะเพิ่มขึ้นในผู้ใหญ่ไทยและทั่วโลกส่วนใหญ่เป็นแบบไม่ทราบสาเหตุ ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสิ่งแวดล้อม อาหารและการออกกำลังกาย รวมทั้งภาวะเครียดจากออกซิเดชันและภาวะอักเสบเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับพันธุกรรมโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน²⁴ ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมจากเม็ดเลือดขาวของ



รูปที่ 4 ROC curve analysis เพื่อหาค่าอ้างอิง (cutoff) ของเปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine (5-mC%) ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว

ตารางที่ 2 แสดงผลการจำแนกกลุ่มประชากรตามค่าอ้างอิง (cutoff) ของเปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine (5-mC%) ใน DNA จากเม็ดเลือดขาว

5-methylcytosine of peripheral	Renal stone patients (%)	Healthy controls (%)	Total
Positive (>0.35 %)	24 (82.76)	11 (37.93)	35 (60.34)
Negative (≤ 0.35 %)	5 (17.24)	18 (62.07)	23 (39.66)
Total	29 (100)	29 (100)	58

ผู้ป่วยโรคนี้วัดเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นชาวชนบทและอาศัยในพื้นที่ใกล้เคียง มีรูปแบบการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกันกับผู้ป่วย โดยพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วัดมีระดับการเติมหมู่เมทิลของ DNA สูงกว่ากลุ่มควบคุม กล่าวคือผู้ป่วยโรคนี้วัดมีภาวะ global DNA hypermethylation การเติมหมู่เมทิลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์เกิดจากหมู่เมทิลไปจับกับดีเอ็นเอและยับยั้งการแสดงออกของยีนเป็นผลให้จำนวนของ mRNA ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนมีจำนวนลดลงนอกจากนี้ยังพบว่าระดับการเติมหมู่เมทิลของ DNA มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ urinary IL-8 ดังนั้นระดับ global DNA hypermethylation จึงอาจเป็นตัวชี้วัดระดับการอักเสบที่เกิดในโรคนี้วัดได้เช่นเดียวกับ urinary IL-8

จากผลการศึกษาภาวะอักเสบของผู้ป่วยโรคนี้วัดเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าผู้ป่วยโรคนี้วัดมีภาวะอักเสบสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้มีงานวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่กระตุ้นเซลล์ด้วยผลึก COM พบว่ามีการแสดงออกของ MCP-1 มากขึ้น และเมื่อมีปริมาณของ COM มากขึ้นเซลล์บุท่อไตจะถูกทำลายมากขึ้น²⁵⁻²⁸ การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย De Water และคณะ²⁹ พบว่าผลึกนี้ในท่อไตจะเคลื่อนเข้าสู่ renal interstitium เพื่อดึงดูดเซลล์อักเสบต่าง ๆ เข้ามาใน interstitium ส่งผลกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะหลั่ง chemokines และ cytokines ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นและเซลล์บุท่อไตถูกทำลายมากขึ้นทำให้ไตสูญเสียหน้าที่ ดังนั้นการเกิดผลึกนี้วัดในปัสสาวะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อท่อไตเกิดการบาดเจ็บและเกิดภาวะอักเสบ รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมโดยเฉพาส่วนที่มีผลึกเกาะและเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการเสียหายมากส่งผลให้เกิดพังผืด (fibrosis) ในที่สุด³⁰

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะอักเสบกับระดับ global DNA methylation และปริมาณโปรตีนในผู้ป่วยโรคนี้วัดและกลุ่มควบคุม พบว่าภาวะอักเสบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับทั้งระดับ global DNA methylation และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงว่าภาวะอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับการเติมหมู่เมทิลของทั้งจีโนมที่สูงขึ้น มีการรายงานก่อนหน้านี้

ของ Kato และคณะ³¹ รายงานว่า global DNA hypermethylation สัมพันธ์เชิงบวกกับระดับตัวบ่งชี้ภาวะอักเสบ ได้แก่ Procalcitonin (PCT) และ ferritin ในผู้ป่วยโรคไต งานวิจัยของ Hodge และคณะ³² พบว่า methyltransferase activity ใน K562 cells เพิ่มขึ้น 3.2 เท่าเมื่อถูก treat ด้วย interleukin 6 (IL-6) ทั้งนี้ เนื่องจาก methyltransferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับ DNA รวมทั้งมีรายงานภาวะอักเสบสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ DNA methylation ทั้งในผู้ป่วยภาวะแพ้อาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหาร ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก IL-6 ส่งผลต่อการเปลี่ยนการควบคุมเหนือลำดับเบสในเซลล์ผ่านการควบคุมของ DNA methyltransferase gene^{33,34} และเช่นเดียวกันภาวะอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่สูงขึ้น มีรายงานการศึกษาพบว่าภาวะอักเสบที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและหากมีการใช้สารต้านการอักเสบพบว่าจะมีภาวะการอักเสบและปริมาณโปรตีนในปัสสาวะลดลง³⁵⁻³⁷

อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ป่วยโรคนี้วัดมาก่อน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนี้วัดมีระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมที่สูงและเมื่อวิเคราะห์คุณค่าในการวินิจฉัยของระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมจาก 5-mC% พบว่ามีค่า area under ROC curve เท่ากับ 0.799 (95% CI: 0.684-0.915) บ่งชี้ว่าระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนม สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การวินิจฉัยได้ในระดับปานกลาง (adequate diagnostic potential) โดยมีค่าความไวของการตรวจวัดที่ร้อยละ 82.76 และค่าความจำเพาะร้อยละ 62.07 ตามเกณฑ์มาตรฐานแล้ว AUC = 0.5 บ่งชี้ว่าไม่สามารถใช้เป็น biomarker ในการจำแนกผู้ป่วยออกจากคนปกติได้ ขณะที่ AUC = 1.0 จัดเป็น perfect biomarker ที่สามารถจำแนกผู้ป่วยออกจากคนปกติได้อย่างสมบูรณ์ ค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 ดังนั้น จากการศึกษา global DNA hypermethylation จึงเป็นตัวบ่งชี้การอักเสบของไตจากโรคนี้วัดระดับปานกลางเท่านั้น อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในงานวิจัยนี้ยังน้อยอยู่ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อ

ยืนยันผลในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น และการศึกษาที่ศึกษาระดับเมทิลเลชันของ DNA ในเม็ดเลือดขาว ซึ่งไม่ใช่อวัยวะหรือเนื้อเยื่อของการเกิดโรคนิวไตโดยตรง แต่อย่างไรก็ตาม มีหลักฐานเพิ่มมากขึ้นว่าเม็ดเลือดขาวอาจจะเป็นรูปแบบของเซลล์ที่มีประโยชน์ในการประเมินผล การควบคุมเหนือพันธุกรรม เนื่องจากไม่ใช่เพียงแต่เนื้อเยื่อเท่านั้นที่ได้รับผลกระทบจากการเกิดโรค แต่ยังสามารถตรวจพบในเม็ดเลือดขาวได้³⁸ และตัวอย่างเลือดสามารถเก็บได้ง่าย สามารถนำมาใช้สำหรับการศึกษานานาชาติติดตามการเปลี่ยนแปลงของโรคได้ รวมทั้งการศึกษานี้ตรวจวัดระดับเมทิลเลชันทั้งจีโนม อาจจะต้องมีการศึกษาระดับเมทิลเลชันของยีนที่จำเพาะเจาะจงต่อโรคนิวไตต่อไปในอนาคต

รายงานนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกเกี่ยวกับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมในผู้ป่วยโรคนิวไต ที่พบว่ามีความสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ ระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมที่เปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคนิวไต นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะอักเสบที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่เพิ่มสูงขึ้นข้อมูลวิจัยนี้ชี้แนะว่าการตรวจวัดระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งจีโนมและการวัดปริมาณ IL-8 น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติมสำหรับการวินิจฉัยโรคนิวไตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2556 และส่วนหนึ่งจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553

เอกสารอ้างอิง

1. Suen J, Liu C, Lin Y, Tsai Y, Juo S, Chou Y. Urinary chemokines/cytokines are elevated in patients with urolithiasis. *Urol Res.* 2010 Apr;38:81-87. PubMed PMID: 20204339.
2. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone

patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res.* 2005;33:65-69.

3. Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsanga K, Sampatanukul P, et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 6 in stone containing kidneys. *BJU international.* 2008;101:1170-7.
4. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2007;121:2381-6.
5. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W. Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *Am J Kidney Dis.* 2006;48:546-54.
6. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S. Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *J Med Assoc Thai* 2007;90:688-98.
7. Sriboonlue P, Prasongwatana V, Tungsanga K, Tosukhowong P. Blood and urinary aggregator and inhibitor composition in controls and renal-stone patients from northeastern Thailand. *Nephron.* 1991;59:591-6.
8. Ertan P, Tekin G, Oger N, Alkan S, Horasan G. Metabolic and demographic characteristics of children with urolithiasis in Western Turkey. *Urol Res.* 2011;39:105-10.
9. Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemanee A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res.* 2009;37(3):141-6.
10. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich

- P, Dissayabutr T, Tungsanga K. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. *Asian Biomedicine* 2007;1:87-95.
11. Cameron M, Sakhaee K, Moe O. Nephrolithiasis in children. *Pediatr Nephrol.* 2005;20:1587-92.
 12. A Bird. Perception of epigenetics. *Nature.* 2007;447:396-8.
 13. Fraga M, Ballestar E, Ropero S. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jul 26;102:10604-10609. PubMed PMID: 16009939. Pubmed Central PMCID: 1174919.
 14. Jin S, Lee Y, Lim Y, Zheng Z, Michelle Lin X, Desmond P, Joanna D, Hai Y, Kenneth Y, George S, Chunming D. Global DNA Hypermethylation in Down Syndrome Placenta. *Plosone.* 2013;9:1-9.
 15. Murphy T, Mullins N, Ryan M, Foster T. Genetic variation in DNMT3B and increased global DNA methylation is associated with suicide attempts in psychiatric patients. *Genes, Brain and Behavior.* 2013;12:125-32.
 16. Liao L, Brennan P, Bemmell D, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Dabrowska N, Mates D, Rothman N, Boffetta P, Chow W, Moore L. LINE-1 Methylation Levels in Leukocyte DNA and Risk of Renal Cell Cancer. *Plosone.* 2011;6:1-8.
 17. Myungjin K, Tiffany I, Kazuko A, Renwei W, Mimi C, Peter W. DNA Methylation as a Biomarker for Cardiovascular Disease Risk. *Plusone.* 2010;5:1-8.
 18. Kulkarni A, Chavan P, Mehendale S, Yadav H, Joshi S. Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia. *Mary Ann Liebert.* 2011;30:79-84.
 19. Pirola L, Balcerzyk A, Tothill R, Haviv I. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res.* 2011 Oct;21:1601-1615. PubMed PMID: 21890681. Pubmed Central PMCID: 3202278.
 20. Wang X, Zhu H, Snieder H, Su S, Munn D, Harshfield G. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med.* 2010;8:87. PubMed PMID: 21176133. Pubmed Central PMCID: 3016263.
 21. Zhao J, Goldberg J, Bremner J, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *J Diabetes Res.* 2012 Feb;61:542-546. PubMed PMID: 22210312. Pubmed Central PMCID: 3266395.
 22. Taylor E, Stampfer M, Curhan G. Obesity, Weight Gain, and the Risk of Kidney Stones. *JAMA.* 2005;293:455-62.
 23. Strohmaier W, Wrobel B, Schubert G. Overweight, insulin resistance and blood pressure (parameters of the metabolic syndrome) in uric acid urolithiasis. *Urol Res.* 2012;40:171-5.
 24. Victoria K, Duncan C, Thomas A, Joan L, Carrie V, Thomas M, Kimberly D, Robert W, Peter W. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet.* 2012;131:1565-89.
 25. Habibzadegah P, Byer K, Khan S. Reactive oxygen species mediated calcium oxalate crystal-induced expression of MCP-1 in HK-2 cells. *Urol Res.* 2006;34:26-36.
 26. Umekawa T, Chegini N, Khan S. Increased expression of monocyte chemoattractant



- protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cells in culture on exposure to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:664-69.
27. Habibzadegah P, Byer K, Khan SR. Oxalate induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in HK-2 cells involves reactive oxygen species. *Urol Res*. 2005;33:440-7.
28. Chen S, Gao X, Sun Y, Xu C, Wang L, Zhou T. Analysis of HK-2 cells exposed to oxalate and calcium oxalate crystals: proteomic insights into the molecular mechanisms of renal injury and stone formation. *Urol Res*. 2010;38:7-15.
29. De Water R, Noordermeer C, van der Kwast TH, Nizze H, Boeve ER, Kok DJ. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. *Am J Kidney Dis*. 1999;33:761-71.
30. SR Khan. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol*. 2004;8:75-88.
31. Kato S, Lindholm B, Stenvinkel P, Ekström TJ, Luttrupp K, Yuzawa Y, Yasuda Y, Tsuruta Y, Maruyama S. DNA hypermethylation and inflammatory markers in incident Japanese dialysis patients. *Nephron Extra*. 2012;2:159-68.
32. Hodge D, Xiao W, Clausen P, Heidecker G, Moshe S, William L. Interleukin-6 Regulation of the Human DNA Methyltransferase (HDNMT) Gene in Human Erythroleukemia Cells. *J Biol Chem*. 2001;276:39508-11.
33. Jang T, Kim D, Shin Y, Chang H, Yang C. p16(INK4a) promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer*. 2001;93:629.
34. Kang G, Lee H, Hwang K, Lee S, Kim J, Kim J. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol*. 2003;163:1551-6.
35. Marisa T, Cristina P, Chiara S, Umberto L, Maria N. Acute and chronic acidosis influence on antioxidant equipment and transport proteins of rat jejunal enterocyte. *Cell Bio Int*. 2011;35:345-53.
36. Donadelli R, Zanchi C, Morigi M. Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathways. *J Am Soc Nephrol* 2003;10:2436-46.
37. Tang S, Leung J, Abe K, Katsushige A, Kwok W, Loretta Y, Tak M, Kar N. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2003;111:515-27
38. Pidsley R, Mill J. Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research. *Biol Psychiatry* 2011;69:146-56.
39. Sola R, Valls R, Goda G, Perez-Busquets G, Ribalta J. Cocoa, hazelnuts sterols and soluble fiber cream reduces lipids and inflammation biomarkers in hypertensive patients: a randomized controlled trial. *Plosone*. 2012;7:e31103.
40. Fang M, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman J. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARb, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* 2005;11:7033-41.