



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การทดสอบความแม่นยำของการตรวจวัดดัชนีการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต (โคซี) เพื่อการวินิจฉัยโรคนิ่วในปัสสาวะ และการพัฒนานวัตกรรมวิธีการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ โดยอาศัยอนุภาคนาโนควอนตัมดอท

Test accuracy of urinary calcium oxalate crystallization index (COCI) for diagnosis of urolithiasis, and development of an innovative quantum dot nanoparticle-based method for determination of urinary oxalate

ชาญชัย บุญหล้า  
และคณะ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุนงบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 สัญญาเลขที่ สัญญาเลขที่ GB-B\_60\_067\_30\_11

ขอขอบคุณผู้วิจัยร่วมทุกท่าน นิสิตบัณฑิตศึกษาที่ช่วยงานวิจัย ผู้ช่วยวิจัย ผู้อำนวยการโรงพยาบาล  
ส่งเสริมสุขภาพตำบลบ้านโคกไร่และอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านในเครือข่าย ศัลยแพทย์ระบบทางเดิน  
ปัสสาวะ รังสีแพทย์ และพยาบาลประจำหอผู้ป่วยยูโร และผู้เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัยทุกท่าน ที่มีส่วน  
ร่วมให้สามารถสร้างผลงานวิจัยออกมาได้

และขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน ทั้งอาสาสมัครจากหมู่บ้านในอำเภอแกดำ  
จังหวัดมหาสารคาม ผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาสารคาม และโรงพยาบาลบุรีรัมย์

## บทคัดย่อ

โรคนิ้วปัสสาวะเป็นภาวะที่มีก้อนนิ้วในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพมายาวนานมากทั่วโลก และยิ่งมากขึ้นในประเทศเขตร้อน รวมทั้งประเทศไทย นิ้วปัสสาวะส่วนใหญ่เกิดขึ้นในไต เรียกว่า นิ้วไต ซึ่งปัจจุบันถือว่านิ้วไตเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงสำคัญของโรคไตวายเรื้อรัง โดยทั่วไปมีหลายชนิดแต่ที่พบบมากที่สุดคือ นิ้วแคลเซียมออกซาเลต เกิดจากการอิมิตัววยวดยิ่งของปัสสาวะแล้วทำให้เกิดตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต ดังนั้น การวัดว่าปัสสาวะความสามารถในการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้มากน้อยเพียงใด จะสามารถประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดนิ้วแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะได้ คณะวิจัยได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดดัชนีการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต (โคซี) ขึ้นมาในปี ค.ศ. 2014 สำหรับคัดกรองโรคนิ้วแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ ซึ่งได้ผลดี แต่กระบวนการตรวจวัดโคซียังใช้เวลานาน ใช้เวลาตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต 60 นาที การศึกษานี้จึงปรับวิธีการทำใหม่โดยลดเวลาตกผลึกลงเป็น 10 นาที จากนั้นวัดค่าโคซีด้วยวิธีใหม่นี้ในตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (n=302) จากกลุ่มผู้ป่วยนิ้วจำนวน 176 ราย และกลุ่มที่ไม่เป็นนิ้วจำนวน 129 ราย ค่าโคซีในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยนิ้วสูงกว่ากลุ่มไม่เป็นนิ้วอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ ROC เพื่อจำแนกคนที่เป็นนิ้วออกจากคนที่ไม่เป็นนิ้ว พบว่าวิธีโคซีมีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.7651 (95% CI: 0.7124–0.8178) สำหรับจำแนกคนเป็นนิ้วทั้งหมด และเท่ากับ 0.8839 (95% CI: 0.8115–0.9564) สำหรับจำแนกเฉพาะคนที่เป็นนิ้วแคลเซียมออกซาเลต ผลการศึกษานี้ชี้ว่าวิธีโคซีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำในการวินิจฉัยโรคนิ้วปัสสาวะในระดับปานกลาง (moderately accurate: มีค่าพื้นที่ใต้กราฟอยู่ระหว่าง 0.7–0.9) เมื่อกำหนดค่าปกติ (cutoff) ที่ 460 COM eqv. mg/day วิธีโคซีนีจะให้ค่าการวินิจฉัย sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy เท่ากับ 84%, 81%, 61%, 94% และ 82% ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาใช้ในคลินิกจริงสำหรับคัดกรองได้ อีกปัญหาหนึ่งของวิธีการทำโคซีคือต้องใช้การปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนผลึกโคซีออกมาซึ่งการปั่นเหวี่ยงทำให้ต้องใช้เวลามากขึ้น คณะวิจัยจึงพัฒนาวิธีใหม่เพิ่มเติม เรียกว่า magnetic-assisted COCI (mCOCI) โดยมีแนวคิดว่าจะฝัง magnetic nanoparticles เข้าไปในผลึกโคซี แล้วแยกผลึกออกมาโดยใช้แรงแม่เหล็กแทนการใช้แรงปั่นเหวี่ยง แต่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ ถึงแม้ magnetic nanoparticles ถูกฝังเข้าไปในผลึกได้ แต่การแยกผลึกด้วยแรงแม่เหล็กไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร เหตุผลหลักมาจากความแรงของแม่เหล็กในผลึกต่ำมากจนไม่สามารถใช้แม่เหล็กดูดได้ดี นอกจากนี้คณะวิจัยได้พยายามที่จะปรับปรุงวิธีโคซีให้ถูกลงและใช้งานง่ายขึ้น โดย เปลี่ยนจากการวัดปริมาณผลึกแคลเซียมออกซาเลตจากการวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่น UV ที่ 215 nm มาเป็นช่วงคลื่น visible ที่ 470 nm วิธีที่พัฒนาขึ้นเพิ่มเติมจากโคซีเดิมนี้นี้ เรียกว่า chromogenic COCI (cCOCI) มีหลักการคือฝังสารสี Coomassie brilliant blue (CBB, R-250) เข้าไปในผลึกโคซี ทำให้ผลึกใหญ่ขึ้น ตกตะกอนได้ง่ายขึ้น และผลึกเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีฟ้า ผลึกสีฟ้าที่ได้จะล้างด้วยสารละลายอะซิติกแล้วละลายด้วย 2 N HCl จะได้เป็นสารละลายสีม่วงแดง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 nm

ผลการทดลองพบว่าค่า cCOCl ให้ผลสอดคล้องกับค่า COCl ซึ่งผลการศึกษาทำให้เชื่อว่า cCOCl น่าจะสามารถประยุกต์ใช้ในคลินิกได้ดีกว่าและถูกกว่า COCl เดิม

อีกหนึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาวิธีใหม่สำหรับตรวจวัดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะและในตัวอย่างอาหาร คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมา 2 วิธีที่มีหลักการต่างกัน คือ วิธีที่หนึ่งอาศัย quantum dot (QD) nanoparticles และลิแกนด์ที่จับจำเพาะกับออกซาเลต (oxalate-binding ligands) เรียกวิธีนี้ว่า QD-based oxalate test ซึ่งปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ oxalate-binding ligands ได้แล้วและอยู่ระหว่างการเชื่อมต่อกับ QD nanoparticles ส่วนวิธีที่สองวัดปริมาณออกซาเลตโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ oxalate oxidase (OxO) และการสร้าง protein nanoparticles เป้าหมายที่พัฒนาวิธี enzymatic oxalate test นี้ขึ้นมา คือ เพื่อใช้เป็น point-of-care testing (POCT) ปัจจุบันคณะผู้วิจัยสามารถโคลน recombinant OxO (ยีนจากข้าวบาร์เลย์) ในยีส (Pichia pastoris) ได้แล้ว อยู่ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นเพื่อใช้ผลิต OxO-containing protein nanoparticles ในระหว่างนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนา POCT สำหรับการตรวจวัดกลูโคสขึ้นด้วย แนวคิดคือต้องการให้ 1 POCT test สามารถตรวจวัดได้พร้อมกันทั้งออกซาเลตและกลูโคส ซึ่งจะมีประโยชน์มากสำหรับผู้ป่วยนี้ให้สามารถรู้ได้ว่าอาหารที่กำลังจะรับประทานนั้นมีปริมาณออกซาเลตและกลูโคสมากน้อยเพียงใด ทำให้สามารถเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีออกซาเลตและน้ำตาลสูงได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในอนาคต และยังเป็นประโยชน์ต่อคนปกติทั่วไปที่ต้องการเลี่ยงอาหารที่มีออกซาเลตและน้ำตาลสูงด้วย

## Abstract

Urinary stone disease or urolithiasis, a condition with presence of mineral masses in the urinary tract, is a long-standing urologic problem worldwide, and it is more pronounced in the tropics, especially Thailand. Most of urinary stones are formed in kidneys, so-called kidney stone that increases risk of chronic renal failure. The most common type of stones is calcium oxalate (CaOx), and formation of this stone is driven by urinary CaOx supersaturation and crystallization. Therefore, measurement of urine capacity to crystallize CaOx is reasonable to estimate the risk of CaOx stone formation. We had developed a new method called calcium oxalate crystallization index (COCI) to be used for screening CaOx urolithiasis. The original procedure of COCI test published in 2014 was time-consuming, as it set an incubation time for CaOx crystallization at 60 min. In this study, the incubation time was reduced to 10 min, and COCI values based on the new procedure were measured in 24-h urine samples (n=302) from stone-forming subjects (SFS, n=173) and non-stone forming subjects (NSFS, n=129). Urinary COCI values in SFS were significantly greater than that in NSFS. ROC analysis to separate SFS from NSFS revealed an area under curve (AUC) of COCI test of 0.7651 (95% CI: 0.7124–0.8178) and 0.8839 (95% CI: 0.8115–0.9564) for all stone cases and only Ca stone cases, respectively. This indicated that the COCI test had a moderate diagnostic power (AUC: 0.7-0.9), especially for Ca stone urolithiasis. At cutoff of 460 COM eqv. mg/day, it gave sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of 84%, 81%, 61%, 94% and 82%, respectively. The other issue of COCI procedure was that it required centrifugation to separate the crystals and it takes time. We, therefore, developed the new form of COCI called magnetic-assisted COCI (mCOCI). The idea of mCOCI is to embed magnetic nanoparticles into the COCI crystals in order to separate the crystals by magnet instead of centrifugation. Unfortunately, the mCOCI did not work. We could embed the magnetic nanoparticles into the crystals, but magnetic separation was relatively ineffective, mainly due to the low magnetic strength of the magnetic nanoparticles-embedded COCI crystals. The other thing that we tried to improve the COCI measurement is to change the way to quantify amount of CaOx crystals from UV absorption at 215 nm to visible wavelength at 470 nm, as UV spectrophotometer is rather expensive and not practical for the routine laboratory measurement. An alternative form of COCI was

developed and designated chromogenic COCI (cCOCI). Coomassie brilliant blue (CBB, R-250) was embedded into the COCI crystals, and the crystals turned blue. The stained crystals were washed with acetic solution and re-dissolved in 2 N HCl for measuring absorbance at 470 nm. The data of cCOCI were corresponded well with COCI data, suggested that that cCOCI test could be clinically useful.

The other purpose of the present study was to develop novel tests for measuring oxalate in urine and food samples. Two methods with different detection principles have been developed. One method was developed based on quantum dot (QD) nanoparticles and oxalate-binding ligands, called QD-based oxalate test. The other was based on enzymatic reaction of oxalate oxidase (OxO) and protein nanoparticles, and we aimed to use this enzymatic oxalate test as point-of-care testing (POCT). We successfully synthesized oxalate-binding ligands and be ready for conjugating with QD nanoparticles. For recombinant OxO, we successfully cloned the Barley OxO in yeasts (*Pichia pastoris*), and be ready for up-scaling to get sufficient amount of OxO enzyme for fabrication of OxO-containing protein nanoparticles. POCT for detection of glucose was also developed. The idea was that to have a dual detection of oxalate and glucose in one test. It will be useful for the stone patients to know levels of oxalate and glucose in ready-to-eat food, in order to avoid consumption of food containing high oxalate and sugar. Also, it will be beneficial for general healthy people who want to avoid intake of oxalate and sugar rich diets.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
สัญลักษณ์และคำย่อ	11
บทนำ	12
การทบทวนวรรณกรรม	17
วิธีดำเนินการวิจัย	25
ผลการวิจัย	36
อภิปราย สรุปผล และข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	60
ภาคผนวก	65
ประวัตินักวิจัย (หัวหน้าโครงการวิจัย)	66

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 STARD Checklist for the Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy	24
ตารางที่ 2 ประชากรตัวอย่างที่รวบรวมได้ในการศึกษานี้	36
ตารางที่ 3 Demographic data และค่าการตรวจวัดต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นนิ่ว (non-stone forming subjects, NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่ว (stone forming subjects, SFS)	37
ตารางที่ 4 ค่า diagnostic values ของ urinary COCI ที่คำนวณได้ในแต่ละ cutoff ในการจำแนกคนที่เป็นนิ่วทั้งหมด (SFS, n=173) ออกจากคนปกติ (NSFS, n=129) และตาราง 2x2 ของแต่ละ cutoff	40
ตารางที่ 5 ค่า diagnostic values ของ urinary COCI ที่คำนวณได้ในแต่ละ cutoff ในการจำแนกคนที่เป็นนิ่วทั้งหมด (SFS, n=37) ออกจากคนปกติ (NSFS, n=129) และตาราง 2x2 ของแต่ละ cutoff	44
ตารางที่ 6 ผลการวัดค่าโคซีในเครื่องตีม เรียงลำดับตามค่าโคซีสูงไปต่ำ	51
ตารางที่ 7 ผลการวัดค่าโคซีในน้ำสกัดจากผักต่าง ๆ เรียงลำดับตามค่าโคซีสูงไปต่ำ	52



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 Conceptual framework of the proposed study	16
รูปที่ 2 วิธีการทำ urinary COCI test (original procedure)	20
รูปที่ 3 ค่า urinary COCI เปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยโรคนิ่วไต	21
รูปที่ 4 ROC curve ของ urinary COCI test AUC: area under curve	22
รูปที่ 5 ค่า urinary COCI ในผู้ป่วยนิ่วแต่ละชนิด CaOx: calcium oxalate, CaP: calcium phosphate, UA: uric acid, MAP: magnesium ammonium phosphate, NS: not significant	22
รูปที่ 6 A classic single-gate design (prototypical flow diagram) for diagnostic accuracy study	23
รูปที่ 7 ผังการออกแบบการวิจัย single-gate design สำหรับ diagnostic test accuracy study	28
รูปที่ 8 ตัวอย่าง FTIR spectrum ของ CaOx stone	29
รูปที่ 9 กระบวนการทำ COCI test ที่ปรับเปลี่ยนใหม่ให้เร็วขึ้นและจำเพาะกับ CaOx มากขึ้น	30
รูปที่ 10 กระบวนการทำ iCOCI test มีขั้นตอนการตกตะกอน CaOx เหมือนกับวิธี COCI แต่เปลี่ยนระบบตรวจเป็น indole reaction	31
รูปที่ 11 กระบวนการทำ cCOCI test ที่ปรับจาก original COCI เพื่อฝังสารสี CBB ลงในผลึกโคซีให้มองเห็นผลึกเป็นสีฟ้า และวัดปริมาณผลึกโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 470 nm	33
รูปที่ 11A เปรียบเทียบค่า urine volume, urinary creatine, urinary proteins และ urinary TAC ระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone forming subjects (SFS) error bars แสดง mean $\pm$ SD	38
รูปที่ 12 ค่า urinary COCI วัดโดยวิธี COCI test ที่ปรับใหม่ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone forming subjects (SFS) พบว่าระดับ urinary COCI ในกลุ่ม SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ error bars แสดง mean $\pm$ SD	39
รูปที่ 13 ROC curve ของ urinary COCI ในการจำแนก (differentiate) กลุ่ม NSFS ออกจาก SFS ทั้งในหน่วยต่อวัน (COM eqv. mg/day) (A) และหน่วยที่ normalized ด้วยค่า creatinine ในปัสสาวะ (COM eqv. mg/g Cr) (B)	39
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง urinary COCI และ urinary proteins (n=302)	42
รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง urinary COCI และ urinary TAC (n=302)	42

รูปที่ 16 ค่า urinary COCI วัดโดยวิธี COCI test ที่ปรับใหม่ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วแคลเซียม (Ca SFS) พบว่าระดับ urinary COCI ในกลุ่ม Ca SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ error bars แสดง mean $\pm$ SD	43
รูปที่ 17 ROC curve ของ urinary COCI ในการจำแนก (differentiate) กลุ่ม NSFS (n=129) ออกจาก Ca SFS (n=37) ทั้งในหน่วยต่อวัน (COM eqv. mg/day) (A) และหน่วยที่ normalized ด้วยค่า creatinine ในปัสสาวะ (COM eqv. mg/g Cr) (B)	44
รูปที่ 18 ค่า urinary iCOCI เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone-forming subjects (SFS) พบว่าระดับ urinary iCOCI ในกลุ่ม SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.0003) error bars แสดง mean $\pm$ SD	46
รูปที่ 19 ROC curve ของ urinary iCOCI ในการจำแนกกลุ่ม NSFS ออกจาก SFS	47
รูปที่ 20 โครงสร้างของ Coomassie Brilliant Blue (CBB, R-250) MW: 825.972	48
รูปที่ 21 ผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง COCI (A) และ cCOCI (B) ในสารละลายมาตรฐาน ออกซาเลต ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันดี	48
รูปที่ 22 ค่า urinary COCI ของหนู เปรียบเทียบก่อน (Day 0) และหลังการเป็นนิ่ว (Day 35) หนูทุกตัวมีค่า urinary COCI สูงขึ้น และในวันที่ 35 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับวันที่ 0	49
รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ของค่า urinary COCI กับปริมาณผลึก CaOx ในไตของหนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่ว พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ	49
รูปที่ 24 ตัวอย่างภาพที่ถ่ายจากกล้อง polarized light microscope เพื่อดูและนับจำนวนของ CaOx crystal deposits ในไตของหนูที่เป็นนิ่ว (Day 35) CaOx crystal deposits จะเห็นเป็นสีขาววาวภายใต้กล้อง polarized light microscope (A) และเมื่อย้อมสีผลึก CaOx ด้วยวิธี Yasue staining จะเห็นผลึกเป็นสีดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B) Magnification: 10x (upper and lower), 40x (middle)	50
รูปที่ 25 ปฏิกริยาเคมีสำหรับสังเคราะห์ oxalate binding ligand (Cu <sub>2</sub> L)	55
รูปที่ 26 หลักการการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตด้วย oxalate binding ligand (Cu <sub>2</sub> L)	55
รูปที่ 27 ตัวอย่าง SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน OxOx พบว่า band ที่ประมาณ 30 kDa เป็น OxOx และจากผลวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry พบว่า band ดังกล่าวเป็นโปรตีน OxOx จริง	56
รูปที่ 28 ตัวอย่างการทำ POCT สำหรับตรวจวัดกลูโคส เปรียบเทียบระหว่าง chromogenic substrate DAB และ TMB ในภาวะที่มีกรดและไม่มีกรด	57

## สัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
95% CI	95% confidence interval
AUC	Area under ROC curve
CaOx	Calcium oxalate
CE	Capillary electrophoresis
COCI	Calcium oxalate crystallization index
cCOCI	Chromogenic COCI
mCOCI	Magnetic-assisted COCI
CT scan	Computed topography scan
ESRD	End-stage renal disease
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GOx	Glucose oxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
iCOCI	Indole calcium oxalate crystallization index
NPV	Negative predictive value
NSFS	Non-stone forming subjects
Ox	Oxalate
OxOx	Oxalate oxidase
PPV	Positive predictive value
QD	Quantum dot
ROC	Receiver operating characteristic
SFS	Stone-forming subjects
Thai SEEK study	Thai Screening and Early Evaluation of Kidney Disease study
รพ.สต.	โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล
อสม.	อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน

## บทนำ

โรคนิวในปัสสาวะ (urolithiasis หรือ urinary stone disease) เป็นภาวะที่พบก้อนนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยการก่อตัวของนิ่วเกิดจากความอิ่มตัวยวดยิ่ง (supersaturation) และการตกผลึก (crystallization) ของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ และผลึกนิ่วที่สำคัญและพบมากที่สุดคือ ผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) ความชุกของโรคนิวในปัสสาวะสูงขึ้นทั่วโลก และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี มีงานวิจัยรายงานว่าความชุกของโรคนิวในปัสสาวะที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับภาวะโลกร้อน [1] ความชุกของโรคนิวในปัสสาวะในประเทศไทยพบสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณร้อยละ 16.9 นั่นคือในประชากร 100 คน จะมีคนที่มีโอกาสเป็นโรคนิวในปัสสาวะในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งของชีวิต ประมาณ 17 คน ซึ่งสูงมาก [2, 3] และจากผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเองจากการสำรวจในหมู่บ้านในจังหวัดมหาสารคาม พบว่า ความชุกของนิ่วที่ยังไม่แสดงอาการ (asymptomatic stones) สูงถึงร้อยละ 12 การแบ่งชนิดของโรคนิวในปัสสาวะแบ่งตามตำแหน่งที่เกิดนิ่วได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1. นิ่วในไต (nephrolithiasis หรือ kidney stone disease) 2. นิ่วในท่อไต (ureterolithiasis หรือ ureteral stone) และ 3. นิ่วในกระปัสสาวะ (cystolithiasis หรือ bladder stone) ชนิดที่พบมากที่สุด คือ นิ่วในไต

ปัญหาที่สำคัญที่สุดของโรคนิวในปัสสาวะ คือ การเป็นนิ่วซ้ำ (stone recurrence) เมื่อเป็นแล้วมีโอกาสกลับเป็นซ้ำอีกสูงมาก ข้อมูลจากการศึกษาในโรงพยาบาลขอนแก่น พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำสูงถึงร้อยละ 38 ภายใน 2 ปีหลังการผ่าตัดเอานิ่วออก [4] และการศึกษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบอัตราการเกิดนิ่วซ้ำร้อยละ 25 ภายใน 3 ปีหลังการสลายนิ่ว ที่สำคัญผู้ป่วยของไทยส่วนใหญ่จะเป็นนิ่วซ้ำหลายครั้ง และก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่มาก เมื่อเทียบกับผู้ป่วยนิ่วในประเทศตะวันตก จึงส่งผลให้ไตถูกทำลายได้มากขึ้น งานวิจัยที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยนิ่วไตมีประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ และในไตของผู้ป่วยมีการอักเสบ (intrarenal inflammation) และการเกิดพังผืดสูง (renal fibrosis) [5-7] ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ไตเสื่อมและนำไปสู่การเป็นโรคไตวายเรื้อรังในที่สุด ในประเทศไทยเป็นที่ยอมรับกันดีว่าโรคนิวไตจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคไตระยะสุดท้าย (End-stage renal disease, ESRD) [6] โดยข้อมูลจากการศึกษาเชิงประชากรของ Thai SEEK study พบว่าการเป็นโรคนิวไตเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง 2.73 (95% CI: 1.80 - 4.12) เท่า [8] ดังนั้น การพัฒนาวิธีตรวจกรองความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวในปัสสาวะจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นมาก เพื่อประเมินในประชากรทั่วไปว่าใครมีโอกาสเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคนิวในปัสสาวะบ้าง แล้วหาวิธีป้องกันการเกิดนิ่ว (โรคนิวเป็นโรคที่ป้องกันได้โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมและอาหาร) ซึ่งในที่สุดจะสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรคไตวายเรื้อรังที่ต้องล้างไตได้ ทำให้ภาครัฐต้องสูญเสียงบประมาณในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังลดลง อย่างไรก็ตามเพื่อให้เหมาะกับบริบทของประเทศที่กำลังพัฒนาอย่างเช่นประเทศไทย วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ควรเป็นวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพง แต่มีความน่าเชื่อถือสูง

แม้ว่ากลไกการเกิดนิ่วปัสสาวะจะยังไม่ทราบแน่ชัดทั้งหมด แต่ยอมรับกันว่าผลึกนิ่วในปัสสาวะเป็นหน่วยย่อย (building block) สำหรับก่อตัวเป็นก้อนนิ่ว และปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการตกผลึก คือ ความอิ่มตัว

ยวดยิ่งของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ [9] ซึ่งที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และฟอสเฟต โดยผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลตเป็นผลึกนิ่วที่สำคัญกับการเกิดนิ่วมากที่สุดและพบได้บ่อยที่สุด [10, 11] ดังนั้นการตรวจวัดศักยภาพของปัสสาวะในการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลตหรือวัดระดับความอิ่มตัวของแคลเซียมออกซาเลต จึงมีประโยชน์ในการช่วยประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะได้ดี ผลการศึกษาที่ผ่านมาในผู้ป่วยโรคนิ่วไทย พบว่า ผู้ป่วยมีระดับความอิ่มตัวของแคลเซียมออกซาเลตสูงมากกว่าคนปกติที่ไม่เป็นนิ่ว [12] และผลึกแคลเซียมออกซาเลตในผู้ป่วยเกิดขึ้นได้แม้ในปัสสาวะที่มีค่าความถ่วงจำเพาะต่ำ [13] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตไทยมีระดับของสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะต่ำมาก โดยเฉพาะ ซิเตรท [14-17] ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีระดับความอิ่มตัวของแคลเซียมออกซาเลตสูงขึ้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การพัฒนาวิธีการใหม่ที่สามารถวัดศักยภาพในการตกตะกอนแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะได้น่าจะสามารถจำแนกผู้ป่วยที่เป็นโรคนิ่วในปัสสาวะออกจากคนปกติที่ไม่เป็นนิ่วได้

เมื่อเร็วๆ นี้ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการใหม่ขึ้นมาสำหรับตรวจวัดศักยภาพในการตกตะกอนผลึกแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (post-diagnostic 24-h urine samples) เรียกว่า “ดัชนีการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต หรือ calcium oxalate crystallization index (COCI หรือ โคซี่)” และพบว่า urinary COCI test นี้สามารถแยกผู้ป่วยโรคนิ่วไตออกจากคนปกติได้ดีมาก มีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 83.33% และ 97.18% ตามลำดับ [18] และที่สำคัญพบค่า urinary COCI สูงในคนที่เป็นนิ่วในปัสสาวะแต่ไม่แสดงอาการ (asymptomatic nephrolithiasis) ด้วย ซึ่งคณะผู้วิจัยเชื่อว่า urinary COCI test นี้สามารถตรวจกรองคนที่เป็นนิ่วในปัสสาวะที่ไม่แสดงอาการได้ อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำมาใช้จริงได้ในทางคลินิก จำเป็นต้องทำการวิจัยต่อ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการใช้งาน (validation) ของ urinary COCI test เนื่องจาก urinary COCI test ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเป็นวิธีทดสอบสำหรับวินิจฉัยหรือตรวจกรองการเป็นนิ่วในปัสสาวะ จึงต้องทำการศึกษาความแม่นยำในการวินิจฉัย (diagnostic accuracy study) ของวิธีทดสอบนี้ ซึ่ง diagnostic accuracy หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบในการแยก (differentiate) ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นโรคที่ต้องการวินิจฉัยออกจากผู้ที่ไม่เป็นโรคนั้นๆ โดยการศึกษาคความแม่นยำในการวินิจฉัยต้องเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น (เรียกว่า index test) กับผลการทดสอบที่ได้จากวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง (เรียกว่า reference standard) ซึ่ง reference standard ต้องเป็นวิธีที่ดีที่สุด ในปัจจุบันที่ใช้สำหรับวินิจฉัยว่าเป็นหรือไม่เป็นโรคที่กำลังสนใจศึกษา และสำหรับโรคนิ่วในปัสสาวะ reference standard คือ computed tomography (CT) scan [19] การออกแบบการทดลอง (study design) ที่ดีที่สุดสำหรับ diagnostic accuracy study เพื่อลด bias ให้ได้มากที่สุดในการรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่าง ควรออกแบบการทดลองเป็น single-gate design [20] โดยรวบรวมกลุ่มตัวอย่างจากกลุ่มประชากรที่คาดว่าน่าจะเป็นโรคที่สนใจศึกษา ทำการตรวจวัด index test จากนั้นวัดด้วย reference standard เพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่าง ตามผลการตรวจวัดของ reference standard ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นโรคที่สนใจศึกษา และกลุ่มที่ไม่เป็นโรค แล้วคำนวณค่าความแม่นยำของวิธีทดสอบ ซึ่งนิยามรายงานเป็น ค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) และหากค่าการตรวจวัดของ index test เป็นตัวเลข (ratio scale) ต้องทำการวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis เพื่อประเมินว่า

index test ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใดในการจำแนกผู้ป่วยที่เป็นโรคที่สนใจศึกษาออกจากคนที่ไม่มีโรค

ในการศึกษานี้ ได้รวบรวมกลุ่มตัวอย่างจากกลุ่มประชากรที่มีโอกาสที่จะเป็นนิ่วในปัสสาวะ ณ โรงพยาบาลมหาสารคาม และโรงพยาบาลบุรีรัมย์ และหมู่บ้านใกล้เคียงกับโรงพยาบาล (นพ.ประวีณ และ นพ.เชาวนวิศ เป็นผู้ดำเนินการหลัก) เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (pre-diagnostic 24-h urine samples) และวัดค่า urinary COCI จากนั้นนำกลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมโครงการทุกคนมาทำ CT scan เพื่อวินิจฉัยว่ามีนิ่วในระบบปัสสาวะหรือไม่ แล้วแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วในปัสสาวะ (urolithiasis patients หรือ stone forming subjects) และ 2. กลุ่มคนที่ไม่เป็นนิ่ว (non-stone forming subjects) ทำการวิเคราะห์ ROC analysis กำหนดค่า cutoff ของ urinary COCI test และคำนวณค่าการวินิจฉัย (diagnostic values) ได้แก่ sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) เพื่อประเมินว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้เป็น diagnostic test หรือ screening test ของโรคนิ่วในปัสสาวะได้หรือไม่

การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการวัดค่า urinary COCI test ในหนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่วในไต เพื่อตรวจสอบว่าค่าโคซีจะสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดผลึกนิ่วในไตของหนูทดลองหรือไม่ และสามารถใช้ในการบอกความเสี่ยงการเกิดนิ่วในปัสสาวะได้หรือไม่ และเนื่องจากการกินอาหารที่มีสารออกซาเลตสูงทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วในปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคนิ่วปัสสาวะต้องหลีกเลี่ยงการกินอาหารที่มีออกซาเลตสูง คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การวัดค่าโคซีในสารตัวอย่างอาหารสามารถบ่งชี้ปริมาณออกซาเลตในอาหารทางอ้อมได้ และน่าจะใช้การตรวจวัดค่าโคซีสำหรับจัดกลุ่มของอาหารตามความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดนิ่วได้ โดยแบ่งออกเป็น อาหารก่อนิ่ว (lithogenic diets) คือ อาหารที่มีค่าโคซีสูง และอาหารต้านนิ่ว (anti-lithogenic diets) คือ อาหารที่มีค่าโคซีต่ำ ดังนั้น การศึกษานี้จึงวัดระดับโคซีในสารตัวอย่างผักผลไม้และเครื่องดื่มที่ขายตามท้องตลาดด้วย

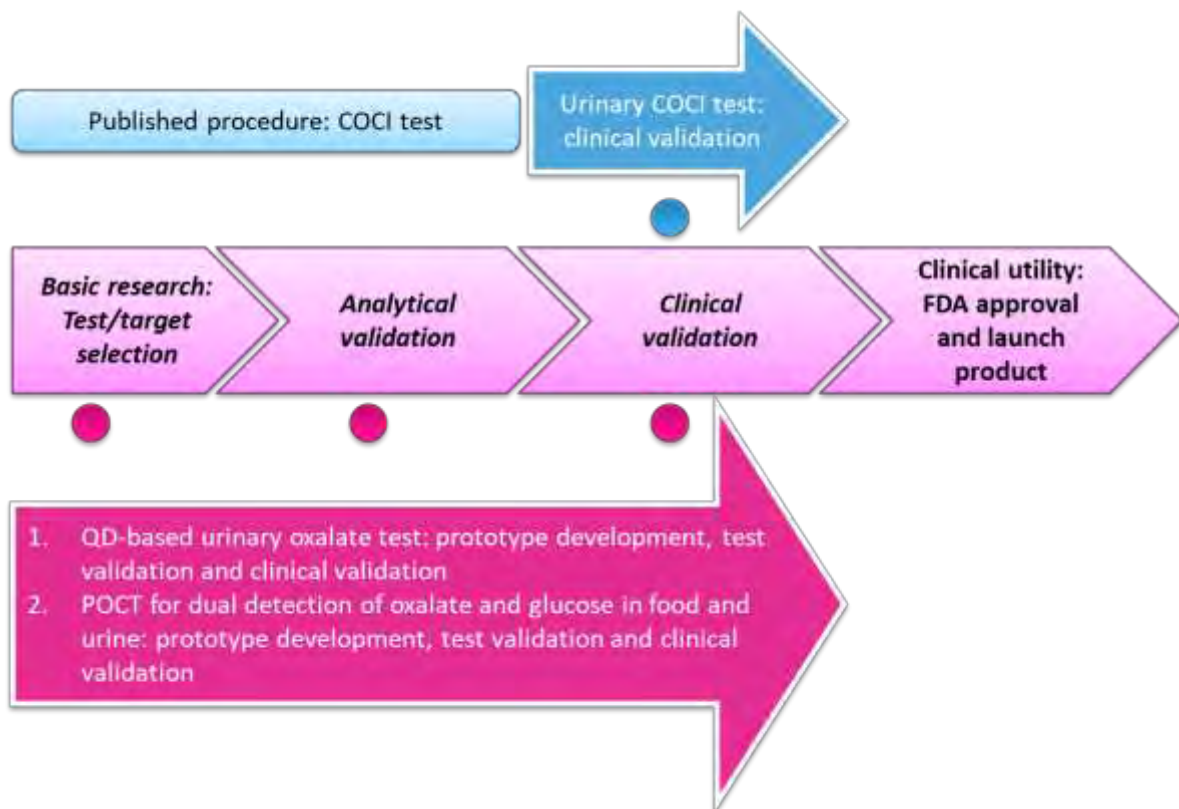
ในปัจจุบันการตรวจวัดระดับออกซาเลตในปัสสาวะที่นิยมใช้มี 3 วิธี ได้แก่ 1. high performance liquid chromatography (HPLC) 2. capillary electrophoresis (CE) และ 3. oxalate oxidase enzymatic method อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ยังมีข้อเสียที่การตรวจวัดยุ่งยาก หลายขั้นตอน และต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวัด โดยเฉพาะเทคนิค HPLC นอกจากนี้ความไวของการตรวจวัดยังไม่ดีเท่าที่ควร คณะผู้วิจัยจึงเสนอวิธีใหม่สำหรับการตรวจวัดออกซาเลตในปัสสาวะ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 อาศัย 2 ปัจจัยที่สำคัญคือ ใช้ลิแกนด์จับจำเพาะกับออกซาเลต (oxalate binding ligand) ร่วมกับเทคโนโลยีอนุภาคนาโนควอนตัมดอท (quantum dot (QD) nanoparticle) โดยคาดว่าลิแกนด์จับจำเพาะกับออกซาเลตที่เคลือบอยู่บน QD nanoparticle น่าจะเพิ่มความจำเพาะและไวของการตรวจวัดออกซาเลตในปัสสาวะได้ จากการทบทวนวรรณกรรม คณะผู้วิจัยเลือก oxalate binding ligands ที่น่าจะจับจำเพาะกับออกซาเลตได้ดีคือ Ligand I ที่รายงานโดย Hu and Feng ในปี 2012 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ Ligand เป็นวงกลมคล้ายโดนัท ให้ออกซาเลตเข้าไปจับตรงกลาง ลิแกนด์นี้พร้อมทั้ง QD nanoparticle สังเคราะห์ขึ้นโดยนักเคมีในคณะผู้วิจัย จากนั้นจะนำลิแกนด์มาเชื่อมติดกับ QD nanoparticle แล้วพัฒนาวิธีการตรวจให้สามารถตรวจได้

ในสารตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อนำไปวัดจริงในกลุ่มประชากรตัวอย่างกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ในปัสสาวะ และกลุ่มคนที่ไม่เป็นนี้ คล้ายกับการวัดค่า urinary COCI โดยหลักการพอสั่งเซปของการตรวจวัดออกซาลेटในปัสสาวะด้วยวิธี QD-based oxalate test นี้ คือ นำสารละลายที่มี Ligand-conjugated QD nanoparticles เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะ ปล่อยให้ ออกซาลेटในปัสสาวะจับกับลิแกนด์บน QD nanoparticles เมื่อจับแล้วจะทำให้ QD nanoparticles เปลี่ยนสมบัติทางเคมี และพร้อมที่จะเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อกระตุ้นด้วยแสงยูวี ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณออกซาลेटที่มีในปัสสาวะ ส่วนวิธีที่ 2 สำหรับการตรวจวัดออกซาลेटจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ oxalate oxidase (OxOx) และการสร้าง protein nanoparticles โดยมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาให้เป็น point-of-care testing (POCT) ขั้นตอนที่สำคัญคือต้องทำการโคลน recombinant OxOx ให้ได้มากพอสำหรับผลิต POCT test kit ซึ่งยีน OxOx ที่เลือกมาจากจากข้าวบาร์เลย์ (Barley OxOx) โดย host ที่ใช้สำหรับ cloning คือ ยีสต์ Pichia pastoris เมื่อได้ recombinant OxOx แล้วจะนำมาสังเคราะห์เป็น OxOx-containing protein nanoparticles ต่อไป หลักการการตรวจวัดคือสารออกซาลेटในสารตัวอย่าง จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเอนไซม์ OxOx ได้ผลผลิตเป็น H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> แล้วจะทำปฏิกิริยาต่อกับเอนไซม์ horse-radish peroxidase (HRP) เพื่อเปลี่ยน chromogenic substrate (TMB) ให้เป็นสารที่มีสีขึ้น และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันกับปริมาณออกซาลेटที่มีอยู่ในสารตัวอย่างที่ทดสอบ โดยอาศัยหลักการเดียวกันนี้ คณะผู้วิจัยได้พัฒนา POCT สำหรับการตรวจวัดกลูโคสขึ้นด้วย เพียงเปลี่ยนจากเอนไซม์ OxOx เป็น glucose oxidase (GOx) แนวคิดสำหรับการพัฒนา POCT นี้ คือ ต้องการให้ 1 POCT test สามารถตรวจวัดได้พร้อมกันทั้งออกซาลेटและกลูโคส ซึ่งจะมีประโยชน์มากสำหรับผู้ป่วยนี้ให้สามารถรู้ได้ว่าอาหารที่กำลังจะรับประทานนั้นมีปริมาณออกซาลेटและกลูโคสมากน้อยเพียงใด ทำให้สามารถเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีออกซาลेटและน้ำตาลสูงได้ เพื่อป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในอนาคต และยังเป็นประโยชน์ต่อคนปกติทั่วไปที่ต้องการเลี่ยงอาหารที่มีออกซาลेटและน้ำตาลสูงด้วย

จากที่กล่าวมาข้างต้น สรุปได้ว่า ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวัดในตัวอย่างปัสสาวะที่ง่ายและความถูกต้องสูงในการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะหรือใช้วินิจฉัยโรคนี้ในปัสสาวะ ทำให้ประชากรทั่วไปไม่ทราบว่าตนเองเสี่ยงหรือไม่มากนักน้อยเพียงใดต่อการเกิดนิ่ว จึงขาดการระวังและป้องกัน ส่งผลให้อุบัติการณ์การเกิดนิ่วสูง และผู้ป่วยนี้ไทยส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์ก็ต่อเมื่อมีอาการเกิดขึ้นมากแล้ว เป็นนิ่วก้อนใหญ่แล้ว และประสิทธิภาพการทำงานของไตเริ่มเสื่อมลง ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดไตวายเรื้อรังในอนาคตได้ง่ายขึ้น ที่สำคัญการตรวจประเมินความเสี่ยงโรคนี้ หรือ การทำ metabolic workup ในปัจจุบันต้องตรวจสารหลายชนิดในปัสสาวะ ทั้งสารก่อนนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว อย่างน้อย 12 parameters (Na, K, Ca, Mg, NH<sub>4</sub>, Cl, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, UA, Ox, citric acid and pH) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก และมีการใช้จริงในประเทศไทยน้อยมาก หรือแทบไม่ได้ทำเลย เนื่องจากความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง คณะผู้วิจัยจึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับตรวจวัดศักยภาพการตกผลึกแคลเซียมออกซาลेटและความอิมมิตัววัดยั้งของแคลเซียมออกซาลेटในปัสสาวะ (urinary COCI test) ให้ง่ายและใช้ได้จริงในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังต้องการพัฒนาการตรวจวัดปริมาณออกซาลेटในปัสสาวะและในตัวอย่างอาหารทั้งแบบที่อาศัยอนุภาคนาโนควอนตัมดอท (QD-based oxalate test) และแบบที่ต้องการให้ใช้เป็น POCT ซึ่งต้องเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและราคาไม่แพง

เหมาะสมกับบริบทของสังคมไทย คณะผู้วิจัยมีความมุ่งมั่นและแน่วแน่ที่จะนำวิธีพัฒนาขึ้นมาใหม่มาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกจริง ในการวินิจฉัยหรือช่วยวินิจฉัยโรคนิวในปัสสาวะ อีกทั้งน่าจะสามารถใช้ในการตรวจกรองเกิดนิวในประชากรทั่วไปได้ และในอนาคตจะผลิตเป็นชุดทดสอบ (kits) สำหรับ annual medical check up ได้

เนื่องการพัฒนาชุดทดสอบขึ้นมาใหม่นั้น ต้องอาศัยการวิจัยหลายขั้นตอน เริ่มจากการวิจัยพื้นฐานเพื่อคิดค้น คัดเลือก และสร้างวิธีทดสอบ จากนั้นพิสูจน์การใช้งานในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้วิธีการที่สมบูรณ์แล้วนำมาพิสูจน์การใช้งานจริงในคลินิกหรือในผู้ป่วย และในขั้นตอนต่อไปเป็นการผลิตชุดทดสอบ ขออนุญาตจาก อย. และนำออกสู่ตลาดเพื่อใช้งานจริง [21, 22] (รูปที่ 2) สำหรับวิธี COCI test คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเสร็จแล้วในห้องปฏิบัติการวิจัย และได้ตีพิมพ์ผลการทดสอบเบื้องต้นสำหรับการวินิจฉัยโรคนิวในปัสสาวะแล้ว [18] ในการศึกษาที่มุ่งเน้นไปที่การพิสูจน์ในระดับคลินิกที่ออกแบบการทดลองแบบ prospective หรือ cohort study (single-gate study design for diagnostic accuracy study) เพื่อประเมินความแม่นยำในการวินิจฉัยของ COCI test ส่วน QD-based oxalate test และ POCT for dual detection of oxalate and glucose จะเริ่มตั้งแต่การวิจัยพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ให้ได้ prototypes และต่อเนื่องจนถึงการพิสูจน์ในระดับคลินิก (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 Conceptual framework of the proposed study



## การทบทวนวรรณกรรม

โรคนิ่วปัสสาวะ (urolithiasis or urinary stones) คือโรคที่เกิดจากการตกผลึกของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ก่อตัวเป็นก้อนนิ่วในไต กรวยไต ท่อไต หรือกระเพาะปัสสาวะ ในปัจจุบันนิ่วส่วนใหญ่ที่พบเป็นนิ่วไต (nephrolithiasis) และผลึกนิ่วส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลต (มักพบผสมกับผลึกแคลเซียมฟอสเฟต) รองลงมาเป็นผลึกกรดยูริก และผลึกของสารอื่นๆ [23, 24] ถ้าผลึกหรือก้อนนิ่วที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก จะสามารถหลุดออกมาจากร่างกายได้เอง โดยการไหลของปัสสาวะ แต่ถ้าผลึกหรือก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่กว่าทางเดินปัสสาวะ จะไปอุดตันอยู่ในระบบทางเดินปัสสาวะส่วนใดส่วนหนึ่ง ไม่สามารถผ่านออกมาได้ และทำให้เกิดอาการของโรคนิ่วขึ้น โรคนิ่วไตจัดว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของไทย และโรคนิ่วที่พบได้บ่อยทั่วโลก [25] เช่น ประเทศแถบตะวันตกมีความชุกร้อยละ 5-16 ประเทศแถบเอเชียมีความชุกร้อยละ 5-10 ประเทศสหรัฐอเมริกามีความชุกร้อยละ 8.8 และในปัจจุบันความชุกของโรคนิ่วเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ สัมพันธ์กับภาวะโลกร้อน [1] สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีอุบัติการณ์การเป็นโรคนิ่วสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบประมาณร้อยละ 10-17 [2] นอกจากอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงแล้ว โรคนิ่วไตยังเป็นโรคที่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงภายหลังการรักษาทั้งด้วยวิธีสลายนิ่วหรือการผ่าตัด [26] ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดไตวายเรื้อรังและโรคไตระยะสุดท้ายตามมา [6, 27]

ชนิดของนิ่วแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของผลึกในก้อนนิ่ว คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 80 อาจเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต หรือนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต หรือนิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต หรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก นิ่วอีกชนิดหนึ่งคือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) พบได้ประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และนิ่วซิสทีน (cystine stone) เป็นต้น

ปัสสาวะประกอบไปด้วยสารต่างๆ มากมาย ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยสารก่อนิ่วที่มีอยู่ในปัสสาวะตามปกติ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต กรดยูริก ในภาวะที่มีปริมาณผิดปกติและสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย สารเหล่านี้สามารถรวมตัวกันเป็นก้อนผลึกแข็งและค่อยๆ โตขึ้น จนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่างๆ ของทางเดินปัสสาวะ สำหรับสารที่ป้องกันการเกิดผลึกในปัสสาวะเรียกว่า สารยับยั้งนิ่วที่สำคัญได้แก่ ซิเตรท โปแทสเซียม และแมกนีเซียม

โรคนิ่วในปัสสาวะจัดเป็น multifactorial disease มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วหลายปัจจัย [9, 24, 28] ทั้งปัจจัยภายใน (intrinsic risk factors) และปัจจัยภายนอก (extrinsic risk factors) ทำให้เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิก (metabolic abnormality) ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เหล่านี้ส่งผลต่อความชุกของโรคนิ่วในปัสสาวะ และอุบัติการณ์การเกิดนิ่วซ้ำ

ปัจจัยเสี่ยงภายใน (intrinsic risk factors) ที่ทำให้เกิดโรคนิ่ว ได้แก่

- พันธุกรรม ถ้ามีประวัติครอบครัวเป็นโรคนิ่วไตจะมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรค
- เพศและอายุ เพศชายพบอุบัติการณ์ของนิ่วมากกว่าเพศหญิง และพบในเด็กน้อยกว่าผู้ใหญ่

- ดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วเพิ่มขึ้นในคนที่มีค่า BMI สูง
  - เชื้อชาติ หลายงานวิจัยรายงานว่าอุบัติการณ์ของการเกิดนิ่วในคนผิวขาวสูงกว่าในคนผิวดำ
- ปัจจัยเสี่ยงภายนอก (extrinsic risk factors) ที่ส่งผลให้เกิดโรคนิ่ว ได้แก่
- อาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วมากที่สุด เนื่องจากการบริโภคอาหารและการดื่มน้ำ มีผลให้เพิ่มหรือลดของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว
  - ภูมิอากาศ พบอุบัติการณ์โรคนิ่วไต่มากขึ้นในบริเวณที่มีภูมิอากาศร้อน
  - อาชีพ ผู้ที่ทำงานในสภาพอากาศที่ร้อน ทำให้มีภาวะขาดน้ำจากการเสียเหงื่อมากจะพบอุบัติการณ์ของนิ่วไต่เพิ่มขึ้น
  - ยา การรับประทานยาบางชนิดมีผลต่อการขับสารก่อนิ่วออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น เช่น การได้รับวิตามินซีในปริมาณสูงเป็นประจำ ทำให้ออกซาเลตในเลือดและในปัสสาวะสูง

ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่ส่งผลต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่

- ภาวะออกซาเลตในปัสสาวะสูง (Hyperoxaluria)
- ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (Hypercalciuria)
- ภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง (Hyperuricosuria)
- ภาวะฟอสเฟตในปัสสาวะสูง (Hyperphosphaturia)
- ภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ (Hypocitraturia)
- ภาวะผิดปกติของสารยับยั้งการเกิดนิ่วที่เป็นมหโมเลกุล (abnormal inhibitory macromolecules)
- ภาวะปัสสาวะเข้มข้นเนื่องจากการขาดน้ำ (Dehydration)
- ภาวะปัสสาวะเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป (Low/high urinary pH)

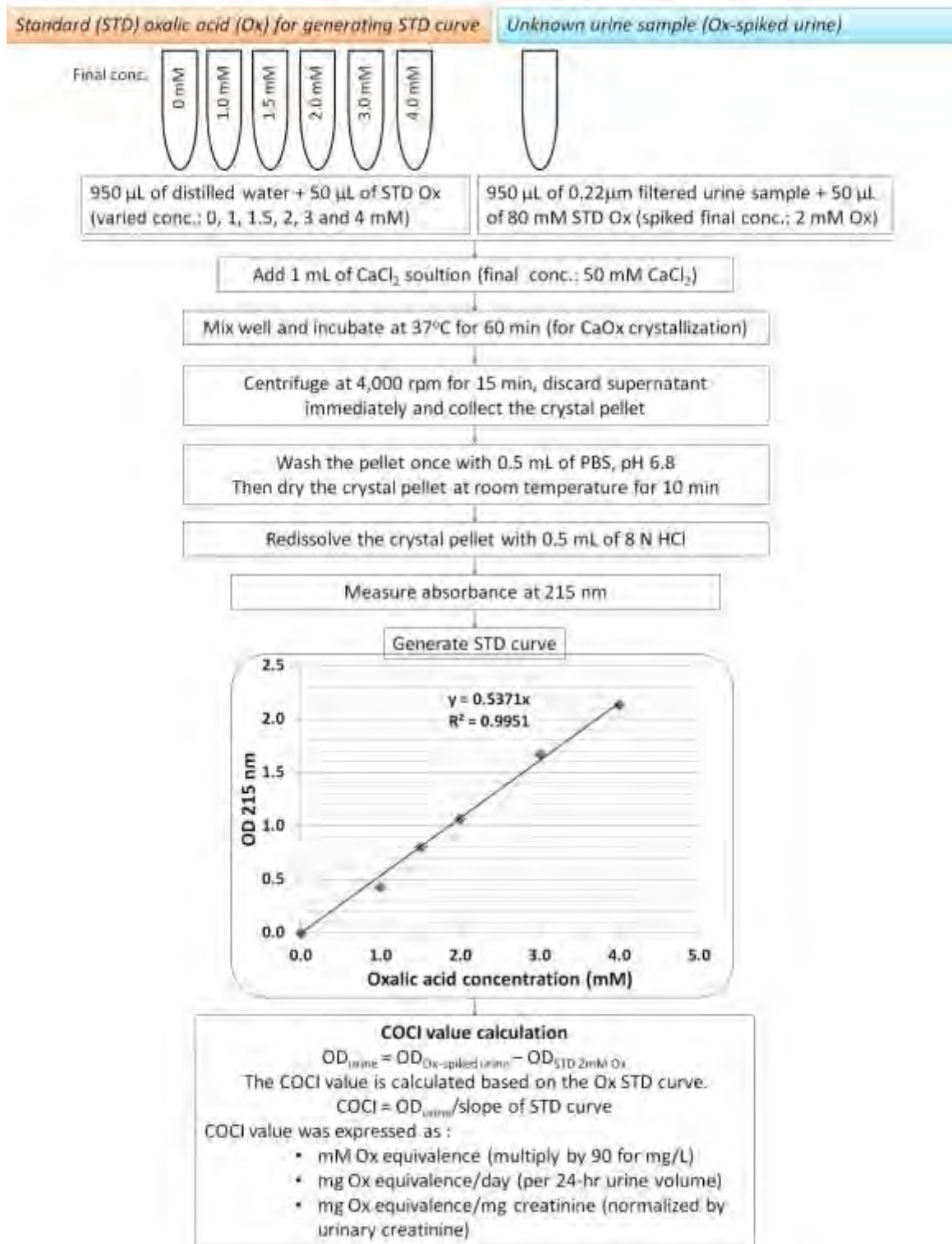
การเกิดนิ่ว (stone formation) เริ่มจากการเกิดผลึก (crystal formation) ในปัสสาวะ ผลึกนิ่วเป็น building blocks ของก้อนนิ่ว [29] ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดผลึกในปัสสาวะ คือ ภาวะอิ่มตัววดยิ่ง (supersaturation) ของสารก่อนิ่ว ซึ่งได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัสสาวะมีสารอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ดังนั้นการเกิดผลึกจึงไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารก่อนิ่วในปัสสาวะเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับสารที่สามารถจับหรือมีปฏิสัมพันธ์กับสารก่อนิ่วหรือกับผลึกที่เกิดขึ้นด้วย สารที่ช่วยลดภาวะอิ่มตัววดยิ่งของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ลดโอกาสการเกิดผลึก หรือลดการเกาะติดของผลึกที่เซลล์บุท่อไต เรียกว่า สารยับยั้งการก่อนิ่ว ซึ่งมีทั้งสารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ซิเตรต แมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) เป็นต้น และสารโมเลกุลขนาดใหญ่ จำพวกสารชีวโมเลกุล เช่น glycosaminoglycans (GAGs), Tamm-Horsfall protein (THP), nephrocalcin, urinary prothrombin fragment-1 (UPTF1), osteopontin (OPN), bikunin (BK) และ albumin เป็นต้น โดยสารบางตัวอาจทำหน้าที่ทั้งช่วยเพิ่มและลดการเกิดนิ่วได้ และนอกจากนี้ไกลโคโปรตีนที่มีประจุลบ (sialic acid-

containing glycoproteins) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดกันระหว่างผลึกกับเซลล์ (cell-crystal interaction) มีการศึกษาใน renal epithelial cells พบว่า ผลึก calcium oxalate monohydrate (COM) สามารถจับกับ sialic acid ที่ผิวเซลล์ได้ และการจับกันระหว่างผลึกกับเซลล์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วย lectin โดยที่ lectin จะไปแย่งจับกับ sialic acid ที่ผิวเซลล์ [30] จะเห็นได้ว่าในปัสสาวะมีทั้งสารที่เพิ่มและลดปัจจัยการเกิดนิ่ว ดังนั้น การจะเกิดนิ่วหรือไม่นั้น จึงขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งการก่อนิ่ว หากในปัสสาวะมีสารก่อนิ่วมากกว่าตัวยับยั้งก็มีโอกาสเสี่ยงจะเกิดนิ่วได้ง่าย และในทางตรงกันข้าม ถ้ามีตัวยับยั้งมากกว่าสารก่อนิ่วก็จะลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยเริ่มแรกที่เป็นตัวกระตุ้นการตกผลึกในปัสสาวะ คือ ภาวะการอิ่มตัววดยิ่งของสารก่อนิ่ว โดยเฉพาะ การอิ่มตัวของแคลเซียมและออกซาเลต ด้วยเหตุนี้ การตรวจวัดศักยภาพของปัสสาวะในการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต และวัดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วในปัสสาวะ

จากการทบทวนวรรณกรรม ในปัจจุบันมีการตรวจวัดศักยภาพการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ (CaOx crystal-forming potential) อย่างน้อย 4 วิธี ได้แก่ 1. วิธี oxalate tolerance test ใช้สำหรับวัดค่า upper limit of metastability [31-33] ซึ่งวิธีนี้จะวัดปริมาณออกซาเลตที่เติมลงไปปัสสาวะที่มากที่สุดที่ยังไม่ก่อให้เกิดการตกผลึกในปัสสาวะ 2. เป็นการวัดความสามารถของปัสสาวะในการก่อให้เกิดเกลือแคลเซียม [34] ทำโดยการจุ่มพื้นผิวที่เรียกว่า non-protected non-renewed surface ลงในตัวอย่างปัสสาวะ แล้ววัดปริมาณผลึกที่เกาะอยู่บนพื้นผิวนั้น ซึ่งพบว่าปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วจะมีผลึก แคลเซียมเกาะ ขณะที่ปัสสาวะของคนปกติจะไม่มีผลึกเกาะ การทดสอบนี้ให้ค่าความไวกับความจำเพาะ เท่ากับ 92% และ 73% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องการปริมาณปัสสาวะมากถึง 40 มล. และต้องวัดปริมาณแคลเซียมเพื่อใช้แปลผลร่วมด้วย 3. วิธีที่พัฒนาโดย Sriboonlue et al [35] ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต โดยเติมแคลเซียมลงไปให้มากเกินไป (excessive calcium) ในสภาวะที่มี ethanol จากนั้นวัดปริมาณแคลเซียมในผลึกที่เกิดขึ้น ซึ่งพบว่าปริมาณแคลเซียมในผลึกมีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ จึงสามารถใช้เป็นวิธีวัดปริมาณออกซาเลตทางอ้อมได้ และ 4. วิธี Bonn-risk Index (BRI) พัฒนาขึ้นโดย Laube et al. ในปี 2000 [36] เป็นวิธีที่นิยมและใช้กันแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากวิธีทำงานง่าย และไม่ต้องการการเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบ ค่า BRI คำนวณจากสัดส่วนของความเข้มข้นของแคลเซียมในปัสสาวะต่อปริมาณแอมโมเนียมออกซาเลตที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดการตกผลึกแรกขึ้น [36, 37] วิธี BRI สามารถจำแนกผู้ป่วยโรคนิ่วออกจากคนปกติได้ดี มีค่าความจำเพาะสูงมาก (100%) แต่ความไวยังไม่สูงนัก (69.7%) [38] อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องการเครื่องมือพิเศษที่ต้องติดตามการเกิดผลึกในหลอดทดลองแบบ real-time หรือ kinetic เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมออกซาเลตที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดการตกผลึกแรกขึ้น

สำหรับวิธีที่ใช้เป็น gold standard ของการตรวจวัด urinary saturation และ crystal-forming potential คือ การคำนวณจากโปรแกรม EQUIL2 ซึ่งต้องใช้ค่าที่วัดได้ในปัสสาวะ 12 ค่า ได้แก่ ความเข้มข้นของ Na, K, Ca, Mg, NH<sub>4</sub>, Cl, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, uric acid, oxalate, citrate และค่า pH [39] ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง

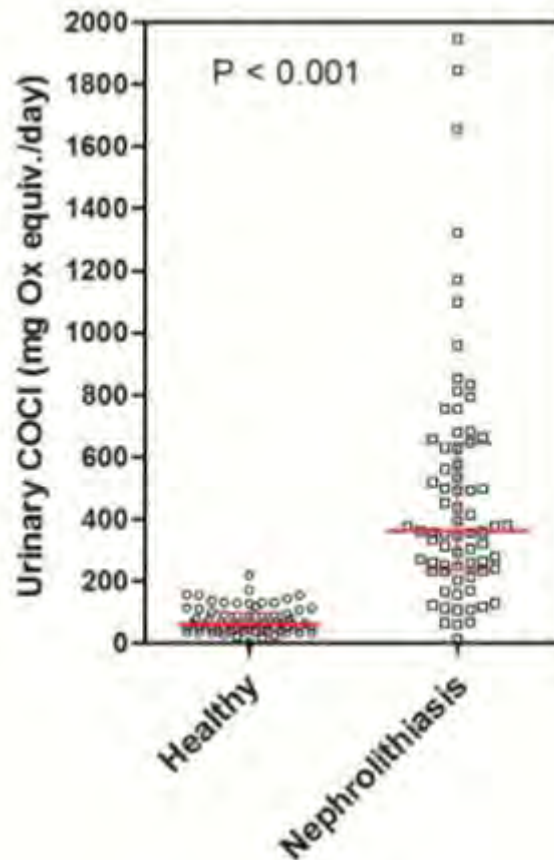
และใช้เวลานาน และไม่นิยมใช้ในประเทศไทย ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคใหม่ขึ้นมาที่ง่ายกว่า และเป็นแบบ endpoint measurement เพื่อวัดศักยภาพการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ และตั้งชื่อวิธีนี้ว่า “calcium oxalate crystallization index หรือ COCI” [18] โดยมีวิธีการทำดังแสดงในรูปที่ 2



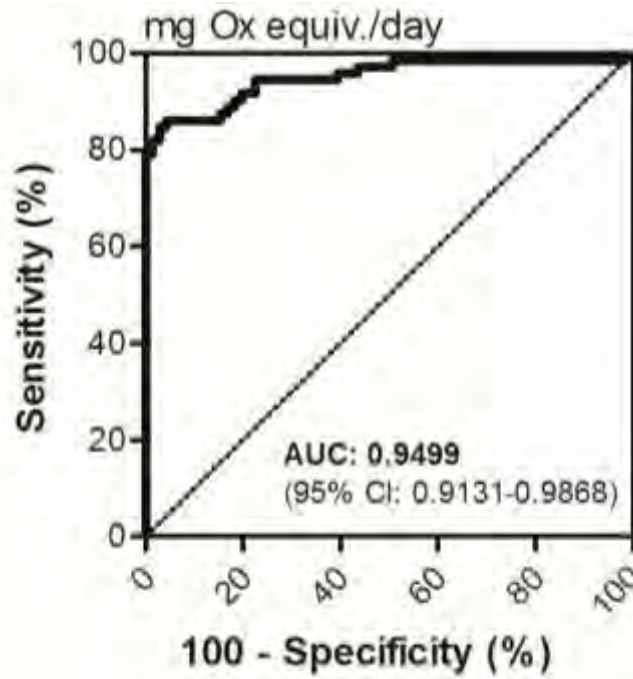
รูปที่ 2 วิธีการทำ urinary COCI test (original procedure)

ผลการศึกษา urinary COCI test ในตัวอย่าง post-diagnostic 24-h urine samples พบว่าวิธีนี้สามารถแยกผู้ป่วยโรคนิ่วไตออกจากคนปกติได้ดีมาก (รูปที่ 3) มีค่า area under ROC curve มากถึง 0.9499 (รูปที่ 4) บ่งชี้ว่าความแม่นยำในการวินิจฉัยของวิธี COCI test สำหรับแยกภาวะเป็นโรครอกจากไม่เป็นโรคอยู่ในระดับ excellent or highly accurate [40] และเมื่อกำหนดค่า cutoff ที่ 165 mg oxalate equivalence/day จะมีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 83.33% และ 97.18% ตามลำดับ ซึ่งสูงมากพอที่จะนำมาใช้จริงในคลินิกได้ แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ระดับคลินิก (clinical validity) ก่อน โดยศึกษาใน pre-diagnostic 24-h urine samples และเปรียบเทียบผลกับวิธีมาตรฐาน CT scan

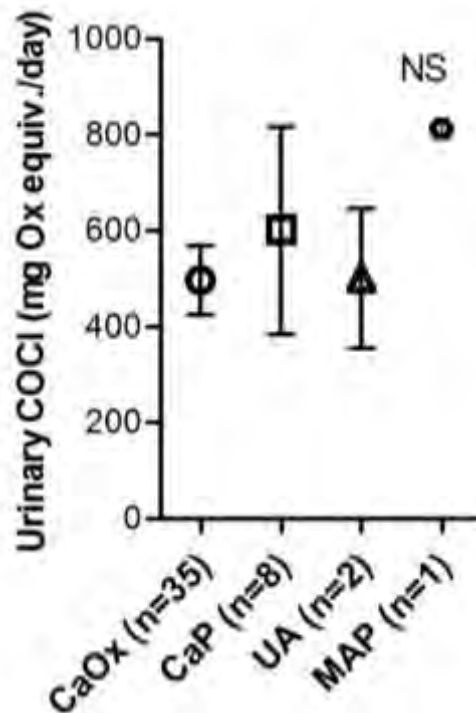
ผลการศึกษายังพบอีกว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วแต่ละชนิดมีค่า urinary COCI ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) อย่างไรก็ตามจำนวนผู้ป่วยโรคนิ่วแต่ละชนิด โดยเฉพาะนิ่วกรดยูริก และนิ่วสตรูไวท์ ยังมีน้อยอยู่ จะควรที่จะทำการวิจัยเพื่อยืนยันผลที่พบนี้ต่อไป



รูปที่ 3 ค่า urinary COCI เปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยโรคนิ่วไต



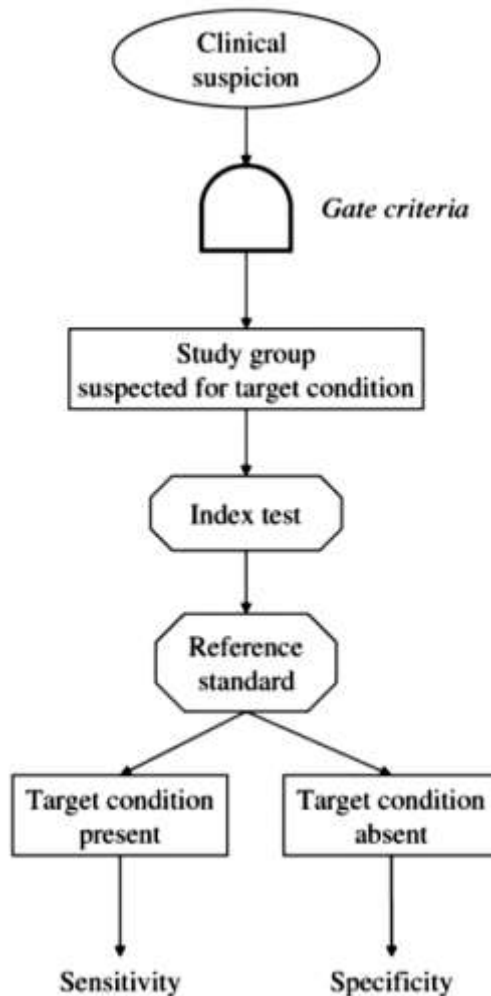
รูปที่ 4 ROC curve ของ urinary COCI test AUC: area under curve



รูปที่ 5 ค่า urinary COCI ในผู้ป่วยนิ่วแต่ละชนิด CaOx: calcium oxalate, CaP: calcium phosphate, UA: uric acid, MAP: magnesium ammonium phosphate, NS: not significant

ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้บ่งชี้ว่า urinary COCI test น่าจะนำมาพัฒนาต่อไปเป็นวิธีทดสอบที่ใช้ได้จริง สำหรับวินิจฉัย ช่วยวินิจฉัย หรือใช้ประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะ

ในกระบวนการพัฒนาชุดทดสอบขึ้นมาใหม่นั้น ต้องอาศัยการวิจัยหลายขั้นตอน เริ่มจากการวิจัยพื้นฐานเพื่อคิดค้น คัดเลือก และสร้างวิธีทดสอบ จากนั้นพิสูจน์การใช้งานในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้วิธีการที่สมบูรณ์แล้วนำมาพิสูจน์การใช้งานจริงในคลินิกหรือในผู้ป่วย และในขั้นตอนต่อไปเป็นการผลิตชุดทดสอบ ขอบข่าย และนำออกสู่ตลาดเพื่อใช้งานจริง [21, 22] ซึ่งการวิจัยเพื่อพิสูจน์การใช้งานจริงในคลินิกหรือในผู้ป่วย (clinical validity) จะต้องเป็นการศึกษาเพื่อประเมินความแม่นยำของการวินิจฉัย หรือ diagnostic test accuracy study โดยจะต้องเปรียบเทียบผลของวิธีที่ศึกษา (index test) กับผลที่ได้จากวิธี reference standard ซึ่ง reference standard จะต้องเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่ใช้สำหรับวินิจฉัยการเป็นโรคนั้นๆ สำหรับระเบียบวิธีวิจัย การออกแบบการทดลอง และการรายงานผลควรเป็นไปตามข้อกำหนดใน STARD (The Standard for Reporting of Diagnostic Accuracy) [41, 42] การออกแบบการทดลองสำหรับรวบรวมกลุ่มตัวอย่างควรออกแบบเชิง prospective study และเพื่อลด bias ให้ได้มากที่สุดควรเลือกใช้ single-gate study design ดังแสดงในรูปที่ 6 [20] และการรายงานผลการศึกษาคควรเป็นไปตาม STARD checklist ดังแสดงในตารางที่ 1 [42-44]



รูปที่ 6 A classic single-gate design (prototypical flow diagram) for diagnostic accuracy study

ตารางที่ 1 STARD Checklist for the Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy

Table. STARD Checklist for the Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy\*

Section and Topic	Item #		On page #
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	1	Identify the article as a study of diagnostic accuracy (recommend MeSH heading "sensitivity and specificity").	
INTRODUCTION	2	State the research questions or study aim, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.	
METHODS		Describe:	
Participants	3	The study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where the data were collected.	
	4	Participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?	
	5	Participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in item 3 and 4? If not, specify how participants were further selected.	
	6	Data collection: Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?	
Test methods	7	The reference standard and its rationale.	
	8	Technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.	
	9	Definition of and rationale for the units, cutoffs, and/or categories of the results of the index tests and the reference standard.	
	10	The number, training, and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.	
	11	Whether or not the readers of the index tests and reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any other clinical information available to the readers.	
Statistical methods	12	Methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g., 95% confidence intervals).	
	13	Methods for calculating test reproducibility, if done.	
RESULTS		Report	
Participants	14	When study was done, including beginning and ending dates of recruitment.	
	15	Clinical and demographic characteristics of the study population (e.g., age, sex, spectrum of presenting symptoms, comorbidity, current treatments, recruitment centers).	
	16	The number of participants satisfying the criteria for inclusion that did or did not undergo the index tests and/or the reference standard, describe why participants failed to receive either test (a flow diagram is strongly recommended).	
Test results	17	Time interval from the index tests to the reference standard, and any treatment administered between.	
	18	Distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition, other diagnoses in participants without the target condition.	
	19	A cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard, for continuous results. The distribution of the test results by the results of the reference standard.	
	20	Any adverse events from performing the index tests or the reference standard.	
Estimates	21	Estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g., 95% confidence intervals).	
	22	How indeterminate results, missing responses, and outliers of the index tests were handled.	
	23	Estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centers, if done.	
	24	Estimates of test reproducibility, if done.	
DISCUSSION	25	Discuss the clinical applicability of the study findings.	

\* MeSH = Medical Subject Heading; STARD = Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy.



## วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก ส่วนที่หนึ่ง เป็นการศึกษาความแม่นยำของวิธี COCI test (index test) ในการวินิจฉัยโรคนิ่วในปัสสาวะ ซึ่งเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีโอกาสเป็นนิ่วในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่ที่มีความชุกของการเกิดนิ่วสูง โดยรวบรวมกลุ่มตัวอย่างจากโรงพยาบาลมหาสารคาม โรงพยาบาลบุรีรัมย์ และจากหมู่บ้านในอำเภอแกดำ จังหวัดมหาสารคาม ประชากรตัวอย่างจากหมู่บ้านทุกคนจะต้องทำ CT scan เพื่อตรวจหานิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ และแบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยผล CT scan (reference test) คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วปัสสาวะ (CT positive: stone forming subjects, SFS) และกลุ่มคนที่ไม่เป็นนิ่วปัสสาวะ (CT negative: non-stone forming subjects, NSFS) คำนวณค่าการวินิจฉัย (diagnostic values) ของ urinary COCI test โดยใช้ CT scan เป็น gold standard method

ส่วนที่สอง เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวัดออกซาเลตในปัสสาวะและอาหารทั้ง 2 แบบ คือ แบบที่ 1 อาศัย oxalate-binding ligands และ QD nanoparticles เรียกว่า QD-based oxalate test และแบบที่ 2 อาศัยเอนไซม์ OxOx โดยพัฒนาเป็น POCT คู่กับการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคส (POCT for dual detection of oxalate and glucose) เพื่อใช้การตรวจวัดออกซาเลตร่วมกันกับการตรวจวัดค่าโคซี สำหรับการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วในปัสสาวะให้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งมีปริมาณออกซาเลตสูงในปัสสาวะ งานวิจัยส่วนนี้แบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ ระยะทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อสังเคราะห์ oxalate binding ligand และสังเคราะห์ QD nanoparticles จากนั้นเชื่อมต่อ QD nanoparticles กับ ligand เป็น ligand-conjugated QD แล้วพัฒนาวิธีให้สามารถใช้ตรวจวัดออกซาเลตในปัสสาวะ โดยงานวิจัยส่วนสังเคราะห์นี้เป็นงานวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกของ นางสาวณัฐกาญจน์ พรหมศิริ ภายใต้การกำกับดูแลหลักของ อ.ดร.นำพน อินสิน สำหรับงานวิจัยในระยะที่สอง เป็นการตรวจวัดออกซาเลตในสารตัวอย่างปัสสาวะจริงที่ได้จากกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วในปัสสาวะและกลุ่มคนที่ไม่เป็นนิ่ว ซึ่งเป็นตัวอย่างปัสสาวะชุดเดียวกับที่ใช้วัดค่าโคซี ในส่วนของการพัฒนา POCT เป็นงานวิทยานิพนธ์ของ นางสาวนฤรัตน์ จ้อยบำรุง ภายใต้การกำกับดูแลหลักของ ผศ.ดร.ชาญชัย บุญหล้า และร่วมงานวิจัย (collaborate) กับ Prof. Hans Bäumlner ที่ Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

### การคำนวณขนาดประชากรตัวอย่าง (sample size calculation)

ขนาดประชากรตัวอย่าง คำนวณขนาดประชากรตัวอย่างสำหรับ diagnostic test accuracy study ตามรายงานของ Flahault et al. [45] ตามสมการและตารางแสดงด้านล่าง การศึกษานี้คาดหวังว่าค่าความไวของวิธีทดสอบจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.95 (95%) กำหนด minimal acceptable lower confidence limit ที่ 0.8 และ probability ที่ 95% จะต้องรวบรวมจำนวน cases (ผู้ป่วยโรคนิ่วในปัสสาวะ) อย่างน้อย 50 ราย และจากข้อมูลความชุกของโรคนิ่วในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เท่ากับ 16.9% จำนวน controls (ผู้ที่ไม่เป็น

นิวในปัสสาวะ) ที่จะต้องรวบรวม เท่ากับ 246 (50\*83.1/16.9) ราย รวมประชากรตัวอย่างที่ต้องรวบรวมทั้งสิ้น 50 + 246 = 296 ราย

สมการที่ใช้คำนวณจำนวน cases หรือผู้ป่วยนิวในปัสสาวะ

Suppose the expected sensitivity of the diagnostic test is  $\pi$ , and we wish for the  $1 - \alpha$  lower confidence limit for  $\pi$  to be greater than  $\pi - \delta$  with probability  $1 - \beta$ . Based on the normal approximation, the required number of subjects is

$$n = \frac{[z_{1-\beta}\sqrt{\pi(1-\pi)} + z_{1-\alpha}\sqrt{(\pi-\delta)(1-\pi+\delta)}]}{\delta^2} \quad (A1)$$

where  $z_{1-\alpha}$  and  $z_{1-\beta}$  are the  $1 - \alpha$  and  $1 - \beta$  quantiles, respectively, of the standard normal distribution. Note

จำนวน cases ที่ได้จากการคำนวณ เมื่อกำหนดความไว 0.95 lower confidence limit 0.8

Table 1  
Number of cases (or controls) for expected sensitivities (or specificities) ranging from 0.60 to 0.95

Expected sensitivity (or specificity)	Minimal acceptable lower confidence limit								
	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9
0.60	268	1,058							
0.65	119	262	1,018						
0.70	67	114	248	960					
0.75	42	62	107	230	869				
0.80	28	40	60	98	204	756			
0.85	18	26	33	52	85	176	624		
0.90	13	18	24	31	41	70	235	474	
0.95	11	12	14	16	24	34	50	93	298

The probability that the estimated 95% lower confidence limit is above the minimal acceptable value is 0.95.

สมการที่ใช้คำนวณจำนวน controls หรือ ผู้ที่ไม่เป็นนิวในปัสสาวะ

$$N_{\text{controls}} = N_{\text{cases}} [(1 - \text{Prev})/\text{Prev}]$$

จำนวนผู้ที่ไม่เป็นนิวในปัสสาวะ เท่ากับ (50\*83.1)/16.9 = 246 ราย และ จำนวนผู้ป่วยโรคนิวในปัสสาวะ อย่างน้อย 50 ราย รวมเป็น 296 ราย ดังนั้นการศึกษานี้จะรวบรวมตัวอย่างอาสาสมัครประชากรตัวอย่างอย่างน้อย 296 ราย

โครงการวิจัยนี้ได้ยื่นขอพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากโรงพยาบาลมหาสารคาม และได้รับการรับรองและอนุมัติให้เก็บข้อมูลทำวิจัยแล้ว

เกณฑ์คัดเข้าและคัดออก

*เกณฑ์คัดเลือกเข้า (inclusion criteria)*

1. เพศชายหรือหญิง
2. อายุ 18 ปี ขึ้นไป
3. สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงได้
4. สามารถทำ CT scan ได้
5. สนใจเข้าร่วมโครงการวิจัย

*เกณฑ์คัดออก (exclusion criteria)*

1. หญิงตั้งครรภ์
2. ปัสสาวะมีเลือดปน
3. ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
4. มีภาวะที่ทำให้เก็บปัสสาวะลำบาก เช่น urinary incontinence

การเข้าถึงอาสาสมัครแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก เป็นการคัดเลือกอาสาสมัครในหมู่บ้าน ซึ่งติดต่อผ่านทางอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) สำหรับรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่างจากหมู่บ้านใกล้เคียงกับโรงพยาบาล โดย อสม. อธิบายวิธีวัตถุประสงค์ของการทำงานวิจัยและวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะรวมทั้งกระบวนการวิจัยให้อาสาสมัครรับทราบ จนเข้าใจถึงถ้อยแถลงและลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ ส่วนที่สอง เป็นการรวบรวมประชากรตัวอย่างจากโรงพยาบาล ซึ่งติดต่อประสานงานกับแพทย์หรือพยาบาลที่เข้าร่วมวิจัยและพยาบาลประจำหอผู้ป่วยในโรงพยาบาล พยาบาลเป็นผู้อธิบายกระบวนการวิจัยให้อาสาสมัครเข้าใจเช่นเดียวกับการรวบรวมกลุ่มตัวอย่างจากหมู่บ้าน เพื่อเข้าสู่กระบวนการยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยเช่นเดียวกัน

อาสาสมัครทุกคนที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ได้ทำ CT scan เพื่อตรวจสอบการมีนิ่วในระบบปัสสาวะ การทำ CT scan นี้เป็นวิธีการทำแบบไม่มีการฉีดสี และใช้ระยะเวลาในการทำ CT scan ประมาณ 5-10 นาทีต่ออาสาสมัคร 1 ราย ความเสี่ยงของการทำ CT scan คล้ายคลึงกับการ X-ray เนื่องจากใช้รังสีชนิดเดียวกัน แม้จะมีความเสี่ยงในการทำ CT scan อยู่บ้าง แต่ยังคงมีความจำเป็นในการวินิจฉัยโรค รายงานการวิจัยพบว่า CT scan ไม่มีผลเสียต่อสุขภาพในระยะยาว ถึงแม้ว่าบางงานวิจัยจะรายงานว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง แต่ความเสี่ยงนั้นมีน้อยมาก ๆ

**ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)**

ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยและปฏิบัติต่ออาสาสมัครให้สอดคล้องกับหลักจริยธรรมพื้นฐาน 3 ข้อของ The Belmont Report ได้แก่ 1) หลักการเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย 2) หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) ผู้ป่วยจะได้รับประโยชน์อะไรบ้าง อาจเกิดความเสี่ยงอะไรต่อตัวผู้ป่วย การรักษาความลับของผู้ป่วยโดยในแบบบันทึก

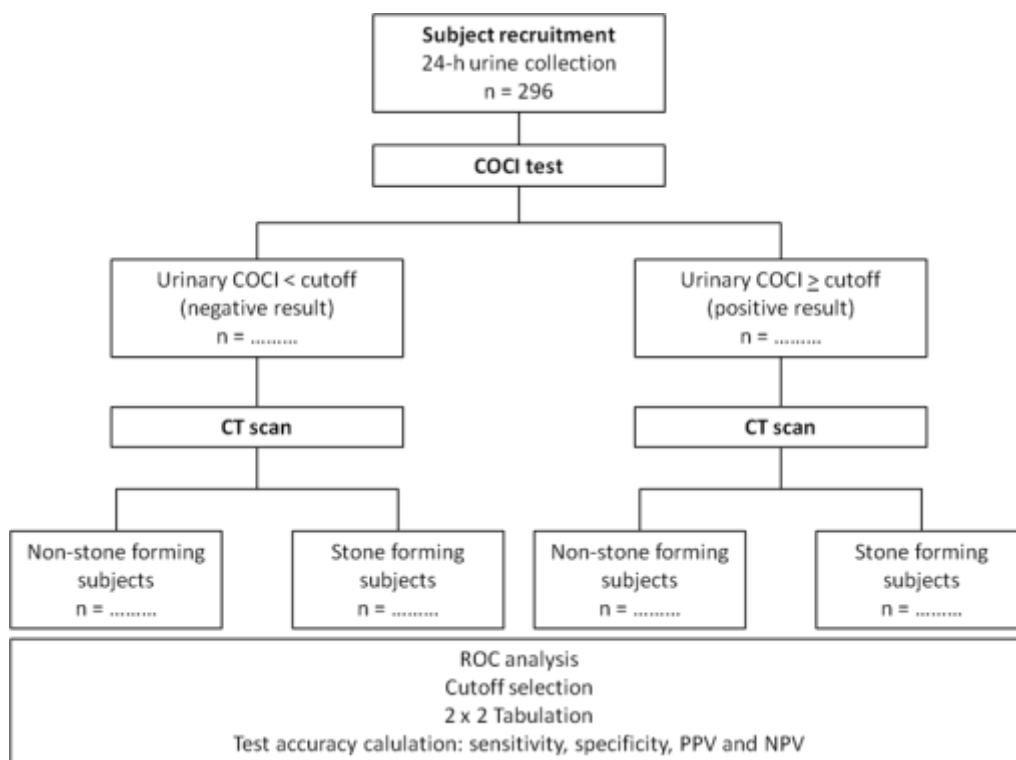
ข้อมูล identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย และ 3) หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีสุ่มเข้ากลุ่มศึกษา ดังนั้นในการศึกษานี้

- อาสาสมัครทุกคนจะได้รับการชี้แจงโดยละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยชิ้นนี้ก่อนการลงนามยินยอมเข้าร่วมวิจัย
- อาสาสมัครทุกคนมีสิทธิในการตัดสินใจเข้าร่วมงานวิจัยได้โดยอิสระ
- การวิจัยจะไม่ทำให้อาสาสมัครได้รับการบาดเจ็บ ถ้ารู้สึกมีอาการผิดปกติของร่างกายที่เกิดจากการเข้าร่วมวิจัย อาสาสมัครมีสิทธิถอนตัวทันที

ข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครทุกคนจะถูกเก็บเป็นความลับ แต่ข้อมูลอาจถูกเปิดเผยต่อสาธารณะเพื่อประโยชน์ต่อทางวิชาการ โดยไม่ระบุชื่อของอาสาสมัคร

### การออกแบบงานวิจัย (study design)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา diagnostic accuracy จึงออกแบบการทดลอง (study design) เป็น single-gate design [20] เพื่อให้ลด bias ในการรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่างให้ได้มากที่สุด โดยรวบรวมกลุ่มตัวอย่างจากกลุ่มประชากรที่คาดว่าจะป่วยเป็นโรคนิ่วปัสสาวะก่อนที่จะวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐาน CT scan (reference standard) เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวัดค่าโคซี่ (index test) ผังการดำเนินการวิจัย diagnostic test accuracy study แสดงในรูปที่ 7



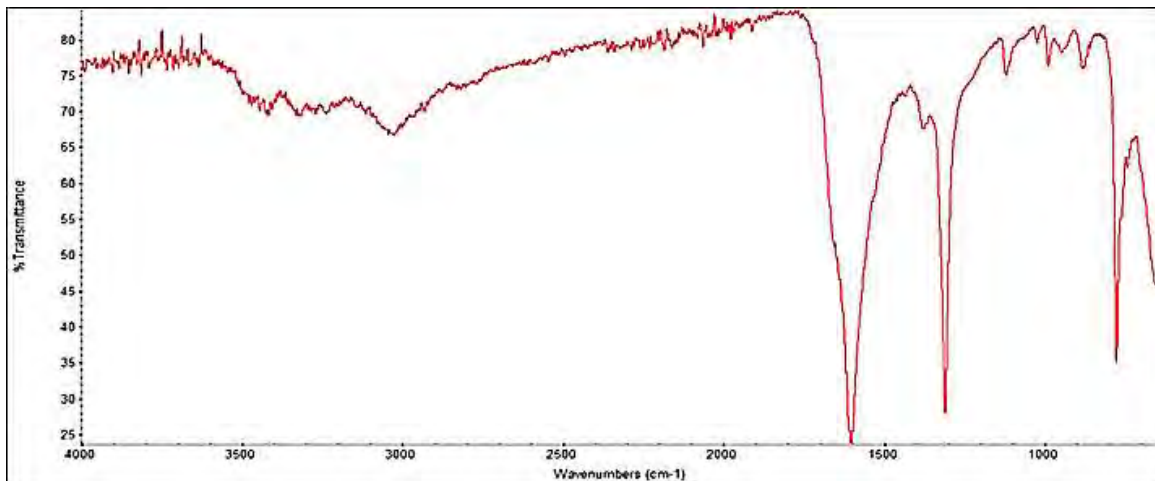
รูปที่ 7 ผังการออกแบบการวิจัย single-gate design สำหรับ diagnostic test accuracy study

### การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และก้อนนิ่ว

คณะผู้วิจัย หรือ อสม. หรือ พยาบาล อธิบายวิธีการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงที่ถูกต้องให้อาสาสมัครทุกราย เมื่อเข้าใจดีแล้วจึงเริ่มเก็บปัสสาวะ บันทึกเวลาเริ่มเก็บและเวลาสิ้นสุด ใช้สารไทมอล (thymol) เป็นสาร preservative สำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ตัวอย่างก้อนนิ่วจะเก็บในห้องผ่าตัดระหว่างการผ่าตัดเอาก้อนนิ่วออก เฉพาะในรายที่ศัลยแพทย์ยูโรสามารถเก็บก้อนนิ่วได้ และผู้ป่วยยินยอมให้ใช้สารตัวอย่างก้อนนิ่วในการวิจัย

สารตัวอย่างทั้งปัสสาวะ 24 ชั่วโมงและก้อนนิ่ว จะนำมาวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การวิเคราะห์เบื้องต้นของสารตัวอย่างปัสสาวะ ได้แก่ วัดปริมาตร ค่า pH และ ตรวจ urine strip test จากนั้นแบ่งเก็บเป็นหลอดเล็ก ๆ (50 mL) หลาย ๆ หลอด เก็บตัวอย่างที่  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป สำหรับตัวอย่างก้อนนิ่ว ล้างทำความสะอาดและอบให้แห้ง เพื่อวิเคราะห์ชนิดของนิ่วด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ตัวอย่าง FTIR spectrum ของนิ่ว  $\text{CaOx}$  เป็นดังรูปที่ 8

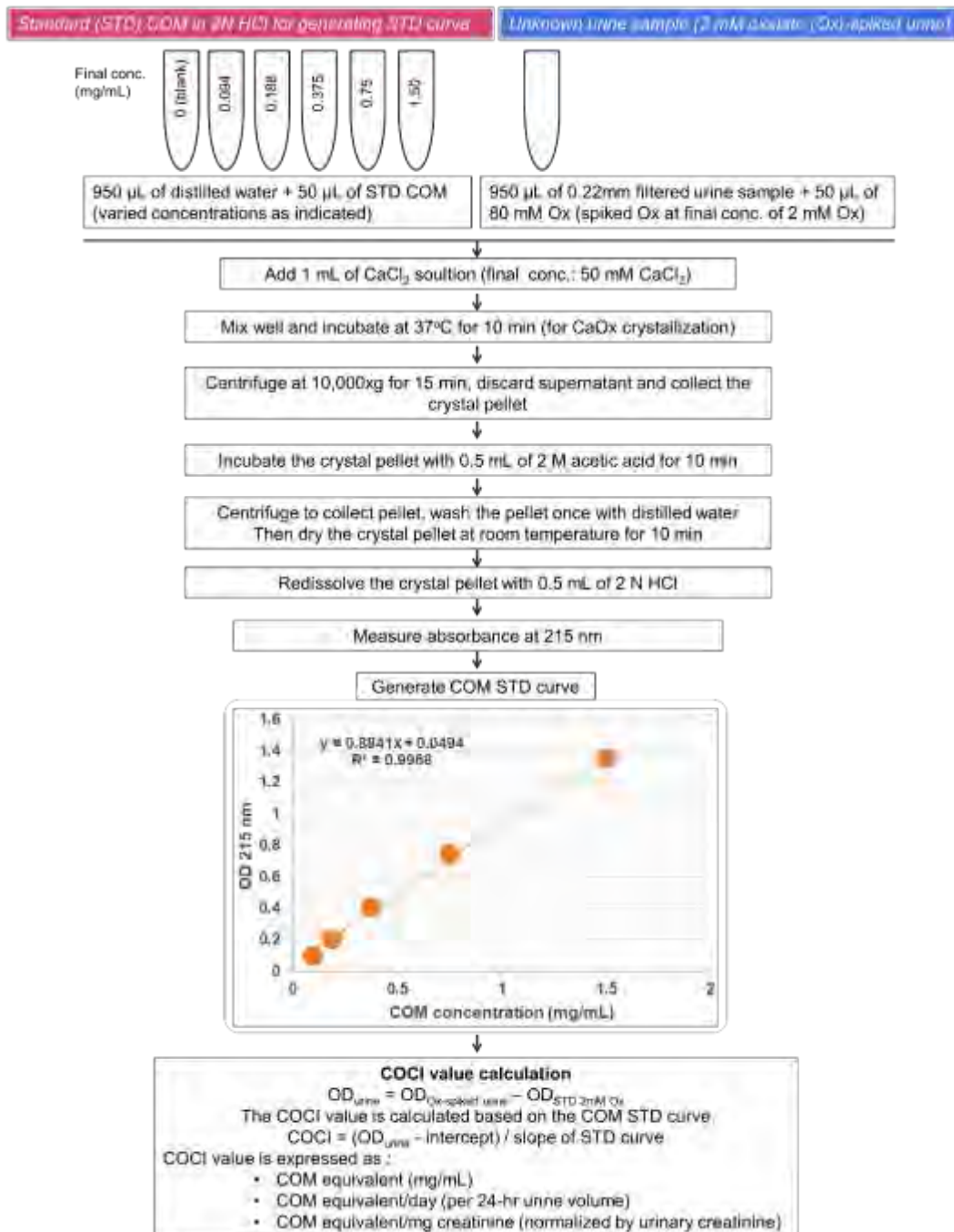


รูปที่ 8 ตัวอย่าง FTIR spectrum ของ  $\text{CaOx}$  stone

### การตรวจวัดค่าโคซีในสารตัวอย่างปัสสาวะ

กรรมวิธีหรือกระบวนการ (procedure) ตรวจวัดค่า urinary COCI ได้ปรับปรุงเปลี่ยนแปลงจากต้นฉบับที่รายงานไว้ในปี 2014 [18] เพื่อให้มีความจำเพาะกับผลึก  $\text{CaOx}$  มากขึ้น โดยอาศัยคุณสมบัติของ  $\text{CaOx}$  ที่ไม่ละลายใน acetic acid ขณะที่ผลึกอื่น ๆ เช่น calcium phosphate และ calcium carbonate ละลายได้ใน acetic acid solution วิธี COCI ที่ปรับเปลี่ยนใหม่นี้ จึงลดเวลาการตกผลึกลงจาก 60 นาที เป็น 10 นาที และเพิ่มขั้นตอน incubation กับ acetic acid solution เป็นเวลา 10 นาที หลังจากที่ได้ตะกอนผลึกจากตัวอย่างปัสสาวะแล้ว เพื่อละลายผลึกอื่นที่มีโซ่ผลึก  $\text{CaOx}$  จากนั้นล้างผลึกด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้ง

ละลายกลับด้วย 2 N HCl แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ OD 215 nm กระบวนการและลำดับขั้นตอนการทำ modified COCI แสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 กระบวนการทำ COCI test ที่ปรับเปลี่ยนใหม่ให้เร็วขึ้นและจำเพาะกับ CaOx มากขึ้น

### การตรวจวัดค่าไอโคซี (iCOCI) ในสารตัวอย่างปัสสาวะ

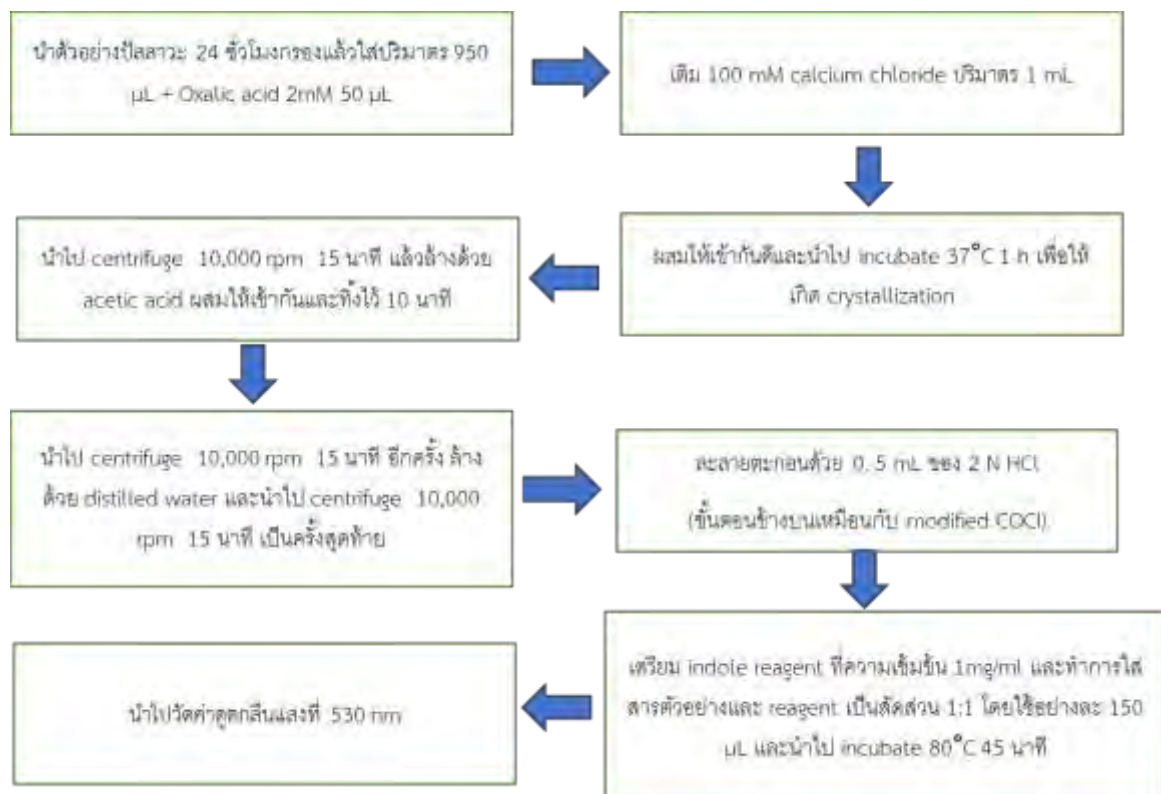
เนื่องจาก modified COCI จำเป็นต้องใช้ UV spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 nm จึงอาจทำให้บางห้องปฏิบัติการไม่สามารถวัดได้ เพราะไม่มี UV spectrophotometer และเนื่องจาก UV spectrophotometer ราคาแพงกว่า visible (VIS) spectrophotometer ที่วัดความยาวคลื่นช่วง visible wavelength คณะผู้วิจัยจึงหาวิธีใหม่ที่จะวัดปริมาณผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้ โดยใช้ปฏิกิริยา



ที่ทำให้เกิดสี แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง visible wavelength จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ออกซาเลตสามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร indole ในสภาวะกรดได้ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีชมพู ที่ดูดกลืนแสงได้ดีที่ 530 nm ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงได้พัฒนาเทคนิคขึ้นมาใหม่ ใช้ชื่อว่า Indole Calcium Oxalate Crystallization Index หรือ “iCOCI” รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนการทำ iCOCI

วิธี iCOCI สำหรับการตรวจสอบและวัดปริมาณผลึก CaOx มีขั้นตอนพอสังเขป ดังนี้ กรองตัวอย่างปัสสาวะด้วย filter membrane 0.22 µm จากนั้นดูดตัวอย่างปัสสาวะที่กรองแล้วมา 950 µL เติม 50 µL ของ 2 mM standard oxalate solution (Ox spiking) ตามด้วย 1 mL ของ 100 mM calcium chloride ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 h เพื่อให้เกิด crystallization หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที เก็บตะกอนผลึกไว้ แล้ว incubate กับ 2 M acetic acid solution เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น centrifuge 10,000 rpm นาน 15 นาที อีกครั้ง เก็บตะกอนไว้และล้างตะกอนด้วย distilled water และนำไป centrifuge 10,000 rpm นาน 15 นาที อีกเป็นครั้งสุดท้าย เก็บตะกอนแล้วละลายตะกอนด้วย 0.5 mL ของ 2 N HCl ตัวอย่างผลึกที่ละลายใน 2 N HCl นี้ พร้อมทั้งจะเอาไปทำปฏิกิริยากับ indole reagent

เตรียม indole reagent ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ใส่สารตัวอย่างผลึกที่ละลายใน 2 N HCl และ indole reagent เป็นสัดส่วน 1:1 (อย่างละ 150 µL) และนำไป incubate ที่ 80°C นาน 45 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 nm และคำนวณค่า iCOCI ของสารตัวอย่าง โดยใช้ COM STD curve (ความเข้มข้น 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.5 mg/mL) เหมือนกับการคำนวณใน modified COCI ข้างต้น



รูปที่ 10 กระบวนการทำ iCOCI test มีขั้นตอนการตกตะกอน CaOx เหมือนกับวิธี COCI แต่เปลี่ยนระบบตรวจเป็น indole reaction

### หนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่ว

ทำการทดลองเบื้องต้นในหนู Wistar rats จำนวน 11 ตัว อายุ 5-6 สัปดาห์ ซึ่งจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำให้หนูเกิดนิ่วโดยให้ดื่มน้ำที่มีส่วนผสมของ 1% ethylene glycol (EG) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (35 วัน) เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยใช้ metabolic case วัดค่า urinary COCI เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการเกิดนิ่ว นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างไตจากหนู เพื่อเตรียมชิ้นเนื้อไตสำหรับย้อมดู CaOx crystal deposits ในไตของหนู วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่า COCI กับ ปริมาณ CaOx crystal deposits ในไตของหนู ว่าสัมพันธ์กันหรือไม่

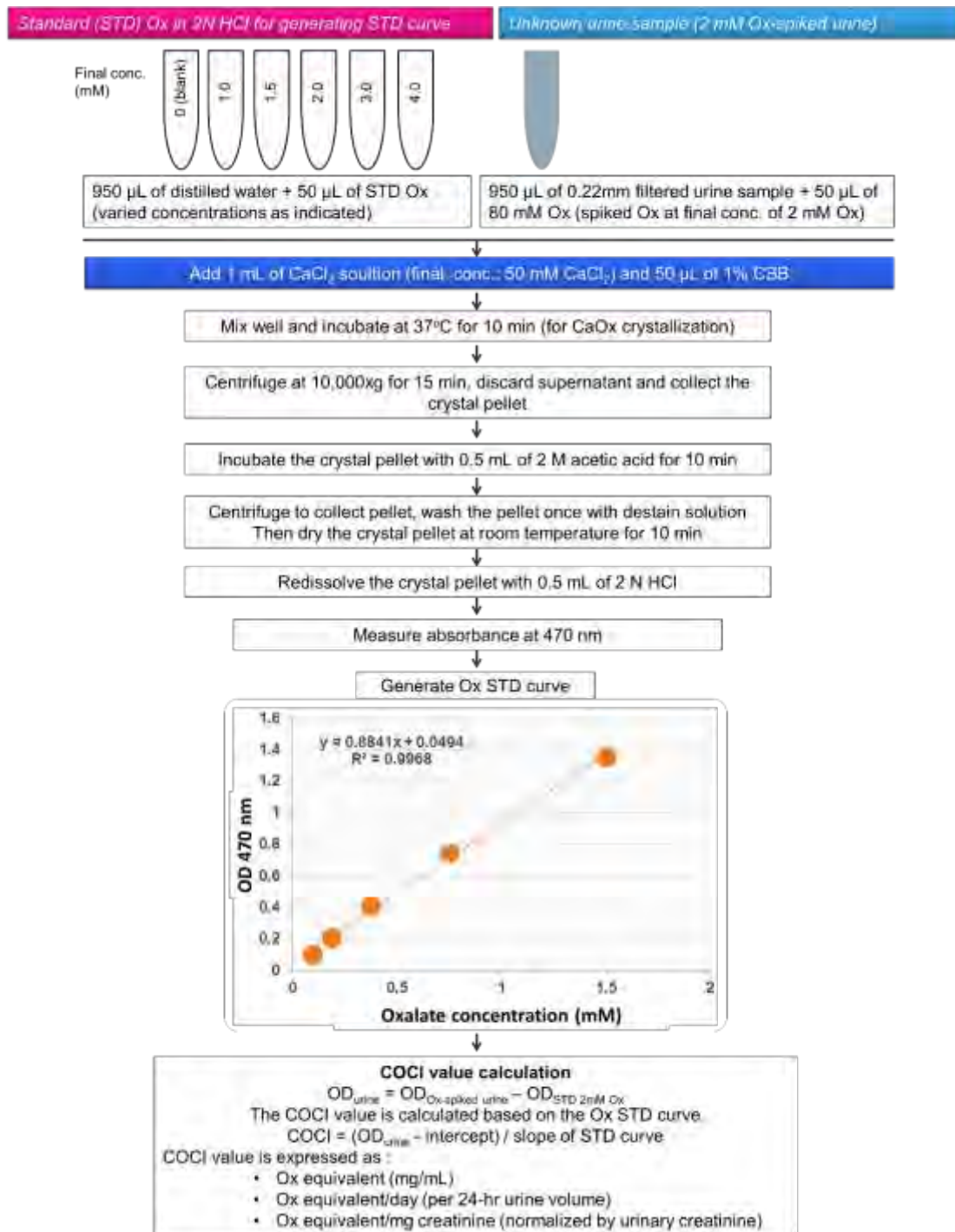
### วัดค่าโคซีในตัวอย่างอาหาร

เพื่อประเมินและจัดกลุ่มอาหารที่เสี่ยงต่อการเกิดนิ่วปัสสาวะตามค่าโคซี ทำการวัดค่าโคซีในตัวอย่างเครื่องดื่มและผักต่าง ๆ ตามวิธีของ original COCI แต่เปลี่ยนจากตัวอย่างปัสสาวะเป็นตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างเครื่องดื่มซื้อตามร้านสะดวกซื้อและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล มีหลายกลุ่ม ได้แก่ ชา กาแฟ นม น้ำผลไม้ soft drink เครื่องดื่มชูกำลัง และเครื่องดื่มวิตามิน ส่วนตัวอย่างผักซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และตลาดสดตอนเช้าในจังหวัดบุรีรัมย์ (ตรงข้ามโรงพยาบาลบุรีรัมย์)

### วิธีการตรวจวัดค่าซีโคซี (cCOCI)

กระบวนการทำซีโคซีจะเหมือนกับ COCI ในรูปที่ 9 แต่มีจุดที่แตกต่างกันคือ standard ที่ใช้เป็น oxalate แทนที่จะเป็น COM crystals เพื่อให้สามารถฝึ่งหรือย้อมผลึกโคซีได้ดีขึ้น ขั้นตอนการตกผลึกใน cCOCI ได้เพิ่มการเติม 50 uL ของ Coomassie brilliant blue (CBB, R250) solution (1%) ด้วย และเมื่อได้ผลึกโคซีแล้ว ต้องล้างเอาสีส่วนเกินที่ไม่ได้ฝึ่งในผลึกออกด้วยสารละลาย destaining solution (containing acetic acid and methanol) 1 ครั้ง แล้วละลายผลึกด้วย 2 N HCl จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 470 nm ดังแสดงในรูปที่ 11





รูปที่ 11 กระบวนการทำ cCOCI test ที่ปรับจาก original COCI เพื่อฝังสารสี CBB ลงในผลึกโคซีให้มองเห็นผลึกเป็นสีฟ้า และวัดปริมาณผลึกโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 470 nm

### การผลิต recombinant OxOx ในยีสต์

ขั้นตอนการโคลนยีน OxOx และการผลิตเอนไซม์ OxOx ในเซลล์ยีสมีหลายขั้นตอนย่อย ดังที่อธิบายพอสังเขปด้านล่าง เมื่อได้เอนไซม์ OxOx แล้วจะนำปสังเคราะห์เป็น OxOx-containing protein microparticles เพื่อทำ POCT for oxalate detection ต่อไป

### Vector construction

1. สั่งสังเคราะห์ Barley oxalate oxidase (Barley OxOx) gene (Genbank 289356) ใน PUC vector (Barley OxOx gene in PUC vector, Genescript, New Jersey, USA) with codon usage optimized for Pichia pastoris
2. นำ Barley OxOx gene เข้าไปใน pPICZ $\alpha$ A vector ซึ่ง pPICZ $\alpha$ A vector เป็น Pichia expression vector และมี gene ตัวยา Zeocin มีขั้นตอนการทำ Vector digestion and ligation โดยย่อ ดังนี้
  - ตัด vector PUC-Barley OxOx และ pPICZ $\alpha$ A-Derp8 ด้วย XhoI และ NotI restriction enzymes (BioLabs) และ purified ส่วนของ linearized Barley OxOx จาก PUC-Barley OxOx และ linearized vector pPICZ $\alpha$ A จาก pPICZ $\alpha$ A-Derp8
  - เชื่อม linearized Barley OxOx และ linearized vector pPICZ $\alpha$ A (ในอัตราส่วน 5:1) เข้าด้วยกันด้วย Enzyme T4 DNA ligase (BioLabs)

### Transformation of E. coli

- นำ vector pPICZ $\alpha$ A-Barley OxOx ที่ ligation เรียบร้อยแล้ว transform เข้า competent E. coli Top10 ด้วยวิธี heat shock method และเลี้ยงบน LB low salt agar ที่มี 100  $\mu$ g/ml Zeocin, overnight ที่ 37 °C
- เพิ่มจำนวน vector ใน E. coli Top10 ใน LB low salt broth with 100  $\mu$ g/ml Zeocin overnight 37 °C , shake ด้วยความเร็ว 250 rpm
- สกัด vector pPICZ $\alpha$ A-Barley OxOx จาก E. coli Top10

### Transformation of Pichia pastoris

- ตัด vector pPICZ $\alpha$ A-Barley OxOx ด้วย SacI (BioLabs) เพื่อให้ได้ linearized vector pPICZ $\alpha$ A-Barley OxOx
- ใช้ linearized vector pPICZ $\alpha$ A-Barley OxOx จำนวน 5  $\mu$ g สำหรับ transform เข้า competent P. pastoris X-33 ด้วยวิธี electroporation
- เลี้ยงบน YPD agar with 100  $\mu$ g/ml Zeocin ที่ 30 °C เป็นเวลา 3-7 days

### OxOx protein expression

- เลือก 3-5 transformed colony เลี้ยงใน BMGY media, overnight 30 °C
- Wash yeast cells ด้วย BMMY 1 ครั้ง
- Resuspend yeast cells ใน BMMY 5 mL ให้ได้ OD<sub>600</sub> เริ่มต้นเท่ากับ 1 กระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยการเติม methanol ทุกวัน โดยใช้ 0.5% methanol ของ final concentration และเก็บ supernatant ของ culture yeast media ทุกวันก่อนเติม methanol วันละ 200  $\mu$ L

- ใช้ SDS-PAGE สำหรับ check การแสดงออกของโปรตีนรวมถึงเอนไซม์ OxOx
- ย้อม acrylamide gel ด้วย Coomassie blue และ PAS เพื่อตรวจสอบ band ของโปรตีน และ glycoproteins ตามลำดับ
- ขนาดของ molecular weight ของ OxOx ประมาณ 30 kDa

### การวัดขนาด และความเข้มข้นของ particles โดยใช้เครื่อง NanoSight NS300

เครื่อง NanoSight ใช้เทคโนโลยี Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) สำหรับวัดขนาด nanoparticles ที่มีขนาดระหว่าง 10 – 2000 nm โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของ particles ในของเหลว ตามทฤษฎี Brownian motion และ light scattering การเคลื่อนที่ของ particles จะถูกบันทึกไว้ในรูปแบบ วิดีโอ เมื่อผ่านการ processing ของ software จะรายงานผลทั้งขนาด particle (nm) และ ความเข้มข้นของ particles (particles/ml) รวมถึงการกระจายตัวของ particles

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

- นำเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางความถี่ ร้อยละ ค่า mean  $\pm$  SD หรือ median (interquartile range, IQR) ตามชนิดและการกระจายตัวของข้อมูล
- ประเมินศักยภาพในการเป็น diagnostic test โดยอาศัย ROC analysis จากนั้นกำหนดค่า cutoff สร้าง 2 x 2 Table และ คำนวณค่า diagnostic values
- เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า urinary COCl ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เป็นนิ่วในปัสสาวะ และกลุ่มที่ไม่เป็นนิ่ว ด้วย Two-samples t-test
- การหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรต่อเนื่อง โดย Pearson's correlation test
- คำนวณโดยใช้โปรแกรมสถิติ Graph Pad Prism 5.0 และ Stata version 12.0
- กำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$

## ผลการวิจัย

### ประชากรตัวอย่างที่ศึกษา

รวบรวมประชากรตัวอย่างและเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จาก 3 สถานที่ ได้แก่ 1) โรงพยาบาลบุรีรัมย์ อำเภอมือง จังหวัดบุรีรัมย์ 2) โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) บ้านโคกไร่ ตำบลหนองกุ้ง อำเภอกำแพง จังหวัดมหาสารคาม และ 3) โรงพยาบาลมหาสารคาม อ.เมือง จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 302 ราย จำแนกเป็น จากโรงพยาบาลบุรีรัมย์ จำนวน 22 ราย จากหมู่บ้านใกล้เคียงที่รับผิดชอบโดย รพ.สต. บ้านโคกไร่ จำนวน 137 ราย และจากโรงพยาบาลมหาสารคาม จำนวน 141 ราย (ตารางที่ 2)

อาสาสมัครทุกรายได้ลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ นำสารตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดกลับมายัง ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและตรวจวัดค่าดัชนีการตกผลึกแคลเซียมออกซาเลต (โคซี) และการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการอื่น ๆ

### ตารางที่ 2 ประชากรตัวอย่างที่รวบรวมได้ในการศึกษา

Variables	Frequency (%)
Number of subjects	302 (100%)
Age (years) (mean ± SD)	53.97 ± 11.16
Gender	
Males	152 (50.33%)
Females	150 (49.67%)
Urine volume (mL) (mean ± SD)	1460 ± 744
Subjects by stations	
โรงพยาบาลบุรีรัมย์	21 (6.95%)
หมู่บ้านในเครือ รพ.สต. บ้านโคกไร่	137 (45.37%)
โรงพยาบาลมหาสารคาม	144 (47.68%)

### ผลการวิเคราะห์โคซี (urinary COCI)

วัดค่าโคซีในตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก่อนการวินิจฉัย (pre-diagnostic 24-h urine samples) ทั้งหมด จำนวน 302 ตัวอย่าง แล้วแบ่งกลุ่มตามผล CT scan ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้ผล CT scan เป็นลบ หรือกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นนิ่ว (non-stone forming subjects, NSFS) จำนวน 129 ราย (42.72%) และกลุ่มที่ให้ผล CT scan เป็นบวก หรือกลุ่มที่เป็นนิ่ว (stone forming subjects, SFS) หรือ urolithiasis (UL)

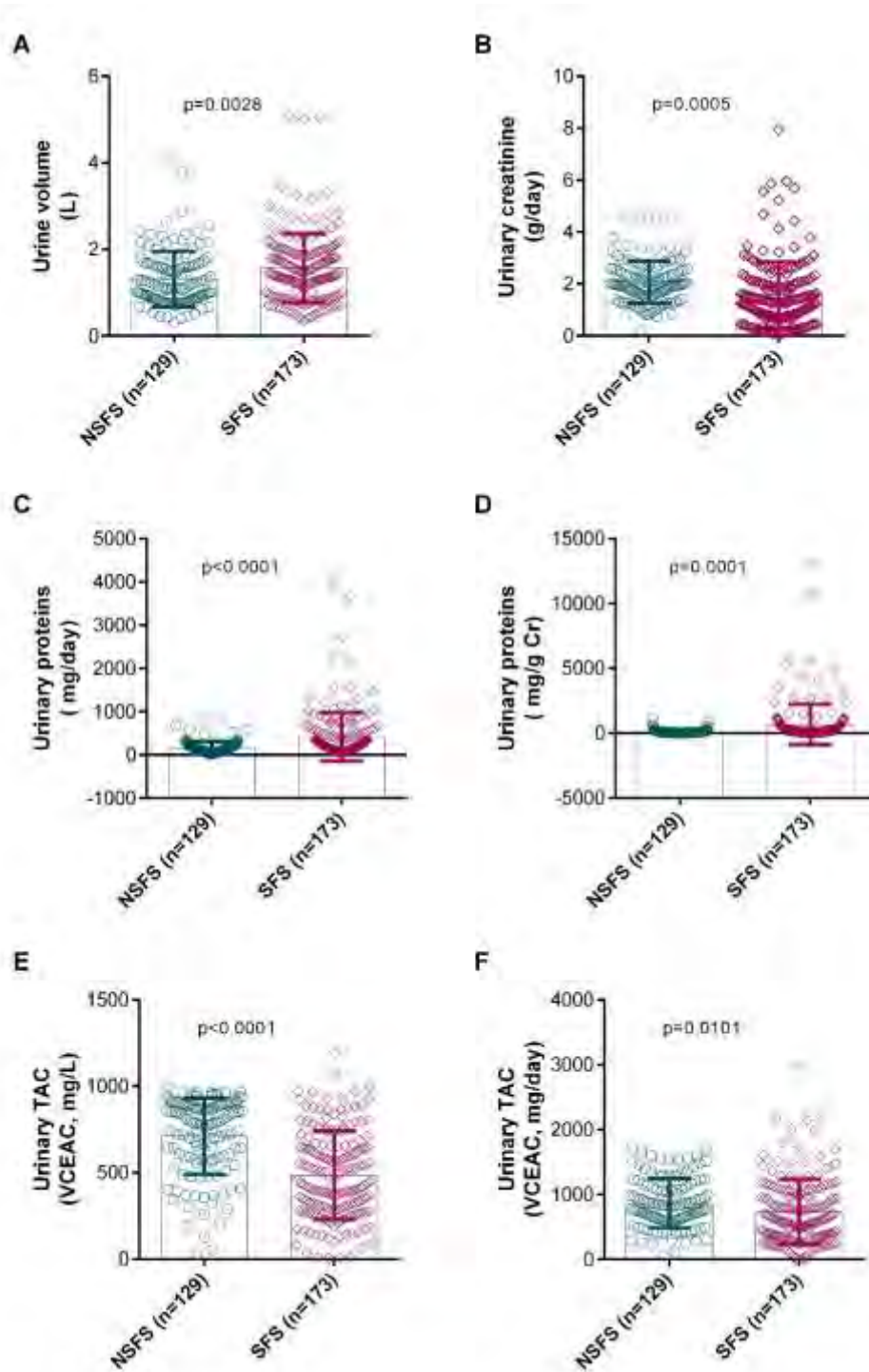
patients) จำนวน 173 ราย (57.28%) ตามที่แสดงในตารางที่ 3 กลุ่มกลุ่มผู้ป่วยนิ่วและกลุ่มควบคุมมีอายุและการกระจายตัวของเพศแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณ Urinary proteins ในกลุ่ม SFS สูงกว่า NSFS อย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity, TAC) ในปัสสาวะของกลุ่ม SFS ต่ำกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) (รูปที่ 11A)

ผลการวัดระดับ urinary COCI ด้วยวิธีการที่ปรับปรุงใหม่ (ตามรูปที่ 9) พบว่ากลุ่ม SFS มีค่า urinary COCI สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในหน่วยต่อวัน (COM eqv. mg/day) และหน่วยที่ normalized ด้วยค่า creatinine ในปัสสาวะ (COM eqv. mg/g Cr) ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 12

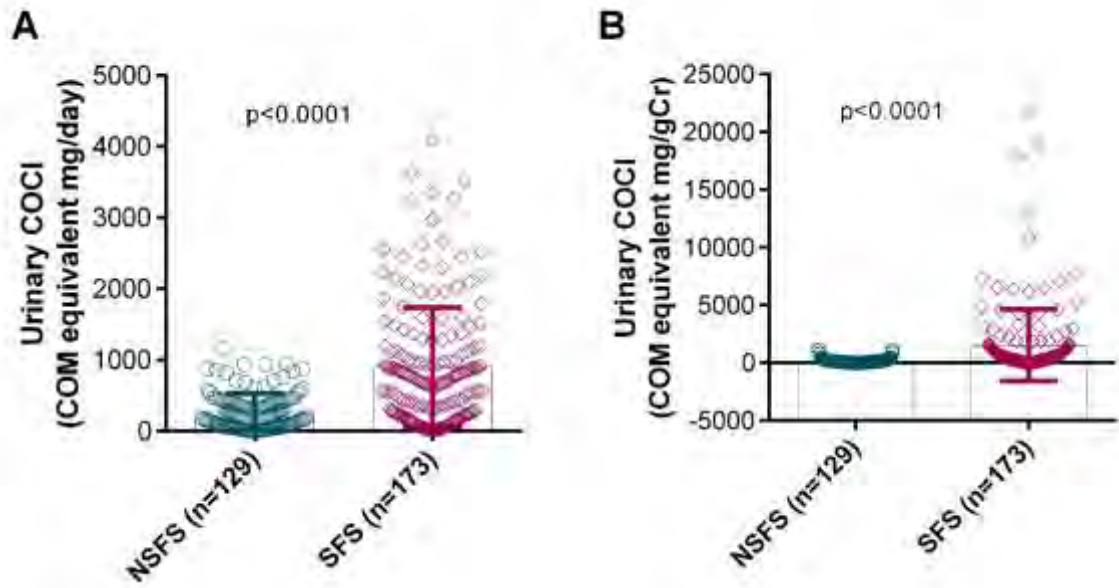
เมื่อวิเคราะห์ ROC analysis พบว่า การวัดค่า urinary COCI (COM eqv. mg/day) มีอำนาจในการจำแนกกลุ่ม NSFS ออกจาก SFS ได้ดี มีค่า area under ROC curve (AUC) เท่ากับ 0.7651 (95% CI: 0.7124 – 0.8178) และค่า urinary COCI ในหน่วย COM eqv. mg/g Cr มีค่า AUC เท่ากับ 0.8088 (95% CI: 0.7602 – 0.8573) ดังแสดงในรูปที่ 13

**ตารางที่ 3** Demographic data และค่าการตรวจวัดต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นนิ่ว (non-stone forming subjects, NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่ว (stone forming subjects, SFS)

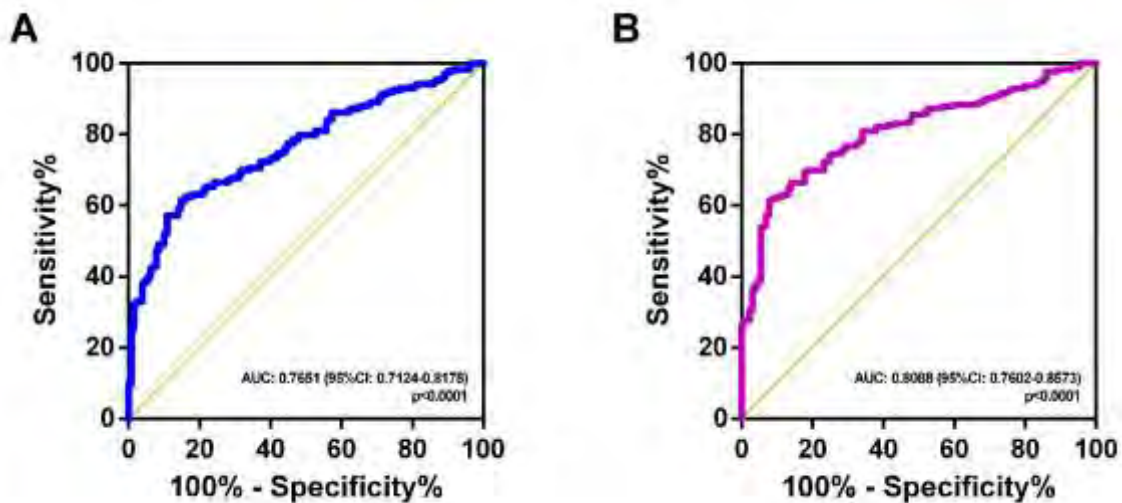
Variables	NSFS (CT negative)	SFS (CT positive)	P values
Number of subjects	129	173	
Age (years)	51.23±9.73	56.18±11.76	0.0002
Sex (%)			<0.001
Males	39 (30.23)	113 (65.32)	
Females	90 (69.77)	60 (34.68)	
Urine volume (mL)	1313.46±639.83	1570.78±797.83	0.0028
Urinary Cr (g/day)	2.23±2.01	1.57±1.27	0.0005
Urinary proteins (mg/day)	165.36±140.69	417.51±560.36	<0.001
Urinary proteins (mg/g Cr)	99.72±140.47	658.83±1555.10	0.0001
Urinary TAC (VCEAC mg/L)	711.33±222.33	485.57±254.63	<0.001
Urinary TAC (VCEAC mg/day)	865.11±379.62	728.66±501.25	0.0101
Urinary COCI (COM eqv. mg/day)	292.22±305.49	902.06±837.61	<0.001
Urinary COCI (COM eqv. mg/g Cr)	166.18±216.25	1509.42±3094.20	<0.001



รูปที่ 11A เปรียบเทียบค่า urine volume, urinary creatine, urinary proteins และ urinary TAC ระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone forming subjects (SFS) error bars แสดง mean  $\pm$  SD



รูปที่ 12 ค่า urinary COCI วัดโดยวิธี COCI test ที่ปรับใหม่ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone forming subjects (SFS) พบว่าระดับ urinary COCI ในกลุ่ม SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ error bars แสดง mean  $\pm$  SD



รูปที่ 13 ROC curve ของ urinary COCI ในการจำแนก (differentiate) กลุ่ม NSFS ออกจาก SFS ทั้งในหน่วยต่อวัน (COM eqv. mg/day) (A) และหน่วยที่ normalized ด้วยค่า creatinine ในปัสสาวะ (COM eqv. mg/g Cr) (B)

เมื่อคำนวณค่า diagnostic values ในแต่ละและ cutoff ที่เลือกมา (ค่าที่สูงกว่า cutoff ถือเป็นผลบวก) ได้ผลตามตารางที่ 4 ค่า cutoff ที่ทำให้ได้ accuracy สูงสุด คือ 460 COM eqv. mg/day (มีค่า sensitivity

และ specificity เท่ากับ 63.01% และ 81.40% ตามลำดับ) และ 350 COM eqv. mg/g Cr (มีค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 61.85% และ 89.92% ตามลำดับ)

**ตารางที่ 4** ค่า diagnostic values ของ urinary COCI ที่คำนวณได้ในแต่ละ cutoff ในการจำแนกคนที่ป็นนิ่วทั้งหมด (SFS, n=173) ออกจากคนปกติ (NSFS, n=129) และตาราง 2x2 ของแต่ละ cutoff

Diagnostic values	Urinary COCI cutoff (COM eqv. mg/day)			Urinary COCI cutoff (COM eqv. mg/g Cr)		
	200	325	460	140	180	350
Sensitivity (%)	80.35	70.52	63.01	80.08	75.72	61.85
Specificity (%)	47.29	65.12	81.40	62.02	70.54	89.92
PPV (%)	67.15	73.05	81.95	74.35	77.51	89.17
NPV (%)	64.21	62.22	62.13	72.07	68.42	63.74
PLR (true positive/false positive rates)	1.52	2.02	3.39	2.16	2.57	6.14
NLR (false negative/true negative rates)	0.42	0.45	0.45	0.29	0.34	0.42
Accuracy (%)	66.23	68.21	<b>70.86</b>	73.51	73.51	<b>73.84</b>

PPV, positive predictive value, NPV: negative predictive value, PLR: positive likelihood ratio, NLR: negative likelihood ratio

		Reference test (Gold standard)				
		CT scan				
Index test	cutoff: 200 COM eqv. mg/day		Positive (SFS)	Negative (NSFS)	Total	
	COCI test	Positive		139	68	207
		Negative		34	61	95
Total			173	129	302	

		Reference test (Gold standard)				
		CT scan				
Index test	cutoff: 325 COM eqv. mg/day		Positive	Negative	Total	
	COCI test	Positive		122	45	167
		Negative		51	84	135
Total			173	129	302	



		Reference test (Gold standard)		
		CT scan		
Index test	cutoff: 450 COM eqv. mg/day	Positive	Negative	Total
	COCl test	Positive	109	26
Negative		64	103	167
Total		173	129	302

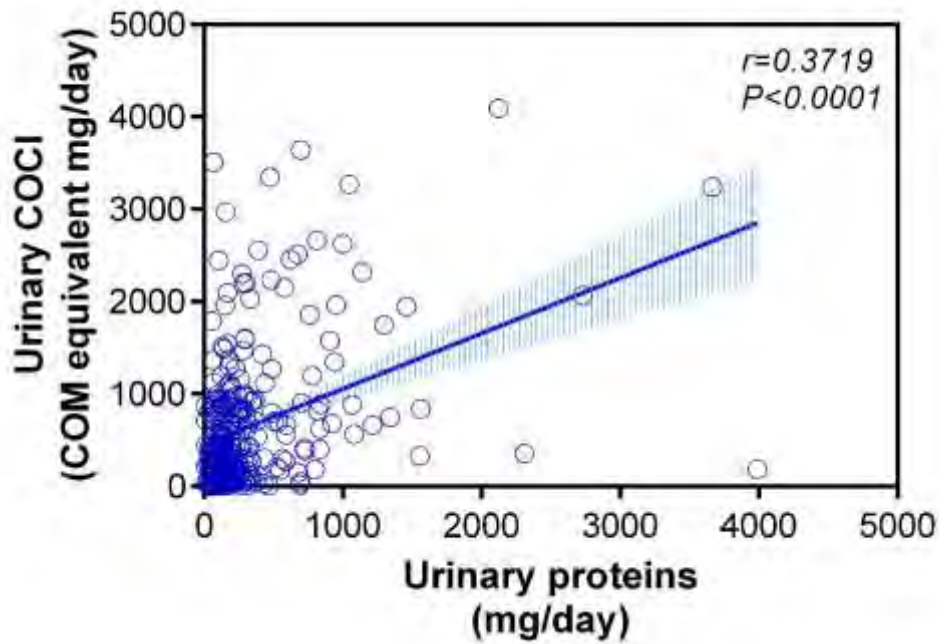
		Reference test (Gold standard)		
		CT scan		
Index test	cutoff: 140 COM eqv. mg/g Cr	Positive	Negative	Total
	COCl test	Positive	142	49
Negative		31	80	111
Total		173	129	302

		Reference test (Gold standard)		
		CT scan		
Index test	cutoff: 180 COM eqv. mg/g Cr	Positive	Negative	Total
	COCl test	Positive	131	38
Negative		42	91	133
Total		173	129	302

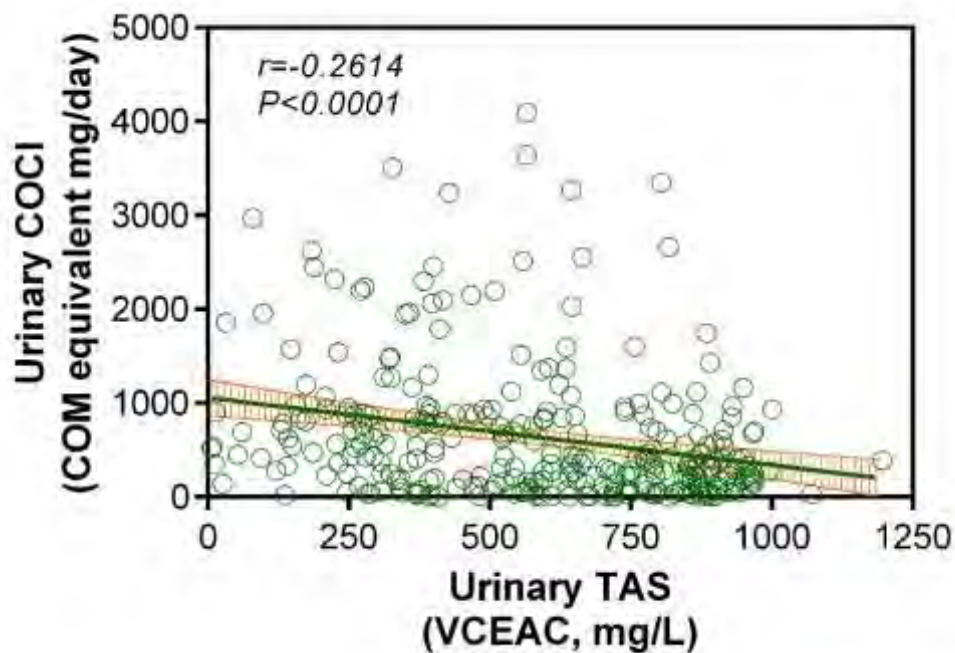
		Reference test (Gold standard)		
		CT scan		
Index test	cutoff: 460 COM eqv. mg/day	Positive	Negative	Total
	COCl test	Positive	109	24
Negative		64	105	169
Total		173	129	302

**ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง urinary COCl และ urinary proteins และ urinary TAC**

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย Pearson's correlation test พบว่า ค่า urinary COCl สัมพันธ์เชิงบวกกับค่า urinary proteins (รูปที่ 14) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ urinary TAC อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 15) ข้อมูลนี้ชี้แนะว่า ค่า urinary COCl ที่สูงขึ้น สัมพันธ์กับ renal tubular damage และ oxidative stress ที่สูงขึ้น



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง urinary COCI และ urinary proteins (n=302)



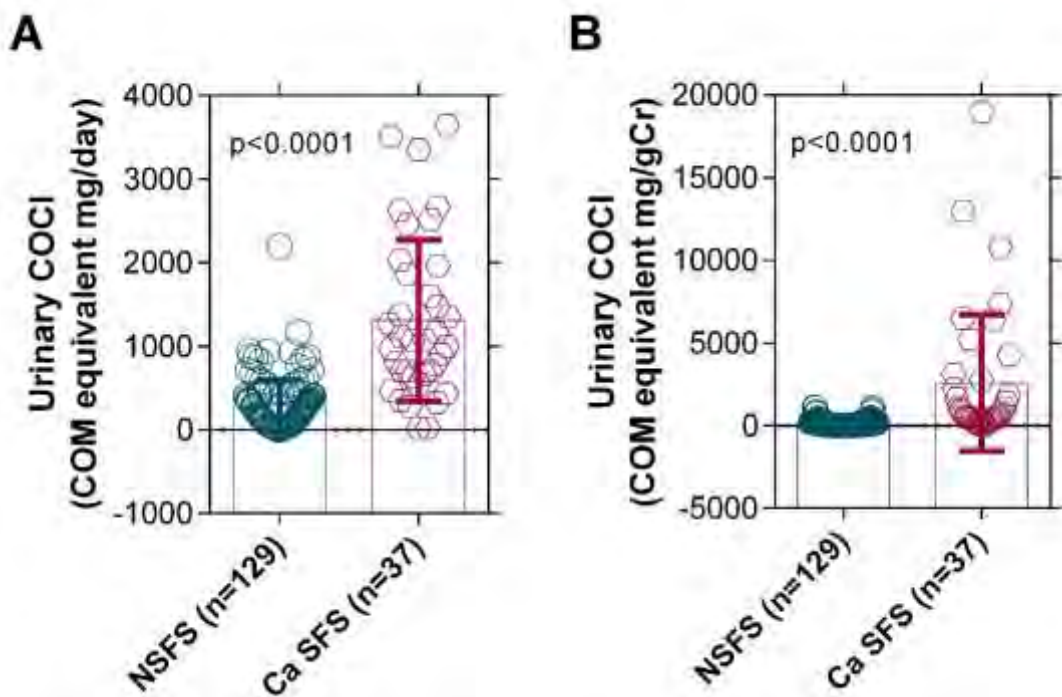
รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง urinary COCI และ urinary TAC (n=302)

ผลการวิเคราะห์ ROC และ diagnostic values ของ urinary COCI เฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟต (Ca SFS)

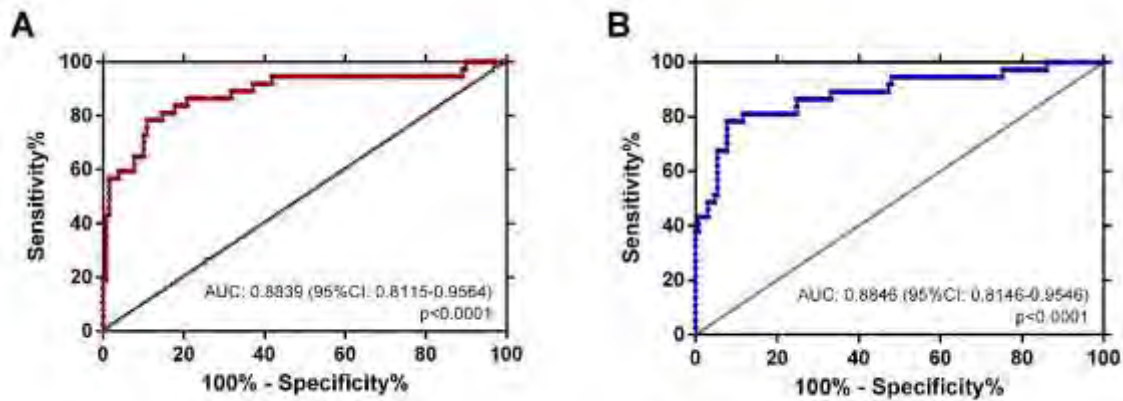
เนื่องจากนิ่วมีหลายชนิด ดังนั้นการใช้ค่า urinary COCI (ซึ่งวัดเฉพาะ capacity ของตกผลึก CaOx) ในการจำแนกนิ่วทั้งหมดออกจากคนปกติ ทำให้มีอำนาจจำแนกต่ำ การศึกษานี้จึงลองแยกวิเคราะห์เฉพาะ

ผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟต จากกลุ่มผู้ป่วยนิ่ว (SFS) จำนวน 173 ราย มีเพียง 44 รายที่มีตัวอย่างก้อนนิ่วเพื่อวิเคราะห์ชนิดของนิ่วด้วยวิธี FTIR จาก 44 ราย มี 37 ราย เป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟต และอีก 7 ราย เป็นนิ่วกรดยูริก ดังนั้น การวิเคราะห์ ROC นี้ จึงเป็นการหา diagnostic potential ในการแยก 37 Ca SFS ออกจาก 129 NSFS

ค่า urinary COCI ในกลุ่ม Ca SFS (n=37) สูงกว่าในกลุ่ม NSFS (n=129) อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 16) และเมื่อวิเคราะห์ ROC analysis พบว่า AUC ของ urinary COCI (COM eqv. mg/day) เท่ากับ 0.8839 (95% CI: 0.8115 – 0.9564) ส่วน AUC ของ urinary COCI ในหน่วย COM eqv. mg/g Cr มีค่า AUC เท่ากับ 0.8846 (95% CI: 0.8146 – 0.9546) ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 16 ค่า urinary COCI วัดโดยวิธี COCI test ที่ปรับใหม่ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วแคลเซียม (Ca SFS) พบว่าระดับ urinary COCI ในกลุ่ม Ca SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ error bars แสดง mean  $\pm$  SD



รูปที่ 17 ROC curve ของ urinary COCI ในการจำแนก (differentiate) กลุ่ม NSFS (n=129) ออกจาก Ca SFS (n=37) ทั้งในหน่วยต่อวัน (COM eqv. mg/day) (A) และหน่วยที่ normalized ด้วยค่า creatinine ในปัสสาวะ (COM eqv. mg/g Cr) (B)

เมื่อคำนวณค่า diagnostic values ในแต่ละและ cutoff ที่เลือกมา (ค่าที่สูงกว่า cutoff ถือเป็นผลบวก) ได้ผลตามตารางที่ 5 ค่า cutoff ที่ทำให้ได้ accuracy สูงสุด คือ cutoff 460 COM eqv. mg/day ให้ค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 84.09% และ 81.40% ตามลำดับ และ cutoff 320 COM eqv. mg/g Cr ให้ค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 81.82% และ 86.82% ตามลำดับ ที่น่าสนใจคือ ทั้งสอง cutoff ให้ค่า NPV สูงถึง 93.75% และ 93.33% ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่า diagnostic values ของ urinary COCI ที่คำนวณได้ในแต่ละ cutoff ในการจำแนกคนที่ป็นนิวทั้งหมด (SFS, n=37) ออกจากคนปกติ (NSFS, n=129) และตาราง 2x2 ของแต่ละ cutoff

Diagnostic values	Urinary COCI cutoff (COM eqv. mg/day)		Urinary COCI cutoff (COM eqv. mg/g Cr)	
	460	300	320	110
Sensitivity (%)	84.09	90.91	81.82	93.18
Specificity (%)	81.40	61.24	86.82	51.94
PPV (%)	60.66	44.44	67.92	39.81
NPV (%)	93.75	95.18	93.33	95.71
PLR (true positive/false positive rates)	4.52	2.35	6.21	1.94
NLR (false negative/true negative rates)	0.20	0.15	0.21	0.13
Accuracy (%)	<b>82.08</b>	68.79	<b>85.55</b>	62.43

PPV, positive predictive value, NPV: negative predictive value, PLR: positive likelihood ratio, NLR: negative likelihood ratio

		Reference test (Gold standard)			
		CT scan			
Index test	cutoff: 460 COM eqv. mg/day		Positive	Negative	Total
	COCI test	Positive	37	24	61
		Negative	7	105	112
Total		44	129	173	

		Reference test (Gold standard)			
		CT scan			
Index test	cutoff: 300 COM eqv. mg/day		Positive (SFS)	Negative (NSFS)	Total
	COCI test	Positive	40	50	90
		Negative	4	79	83
Total		44	129	173	

		Reference test (Gold standard)			
		CT scan			
Index test	cutoff: 320 COM eqv. mg/g Cr		Positive	Negative	Total
	COCI test	Positive	36	17	53
		Negative	8	112	120
Total		44	129	173	

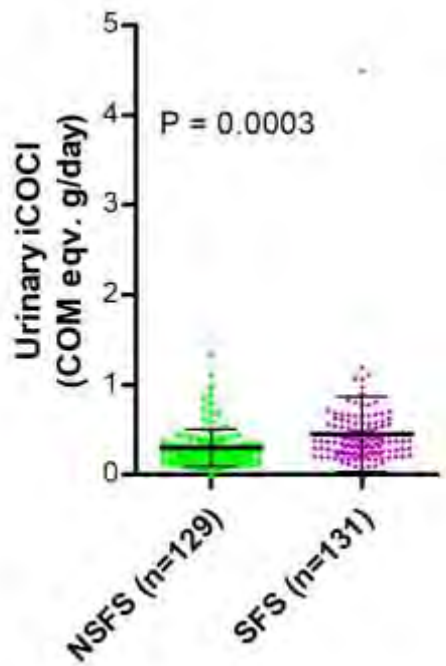
		Reference test (Gold standard)			
		CT scan			
Index test	cutoff: 110 COM eqv. mg/g Cr		Positive	Negative	Total
	COCI test	Positive	41	62	103
		Negative	3	67	70
Total		44	129	173	

### ผลการวิเคราะห์ไอโคซี (urinary iCOCI)

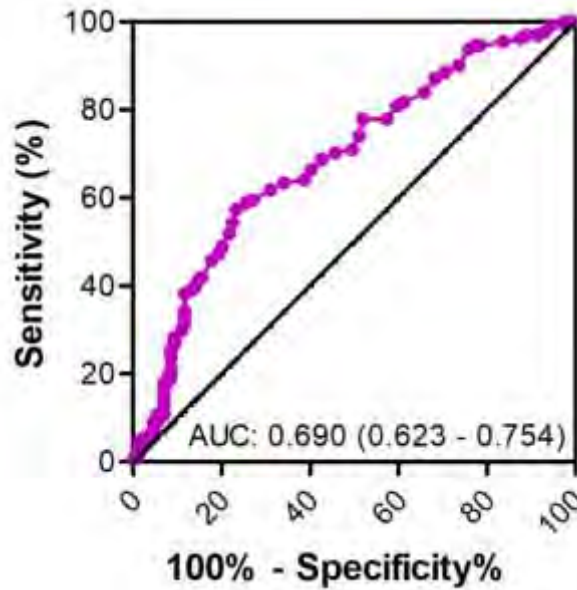
การศึกษานี้ยังได้พัฒนาวิธีใหม่ขึ้นจากโคซีเดิมเรียกว่า iCOCI test โดยใช้สารละลาย indole ทำปฏิกิริยากับ oxalate ใน COCI crystals เพื่อให้สามารถวัดการดูดกลืนแสงช่วง visible ได้ โดยไม่ต้องวัดช่วงคลื่น UV จากจำนวนตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ได้วัดค่าไอโคซี 260 ราย แบ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นนิ่ว (NSFS) จำนวน 129 ราย (49 ± 10.14 years old) และกลุ่มที่เป็นนิ่ว (SFS) จำนวน

131 ราย ( $56 \pm 10.24$  years old) ผลการศึกษาพบว่าระดับ urinary iCOCI ในกลุ่ม SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ ( $0.45 \pm 0.42$  vs.  $0.30 \pm 0.21$  COM equivalent, g/day) (รูปที่ 18)

เมื่อวิเคราะห์ ROC analysis พบว่า การวัดค่า urinary iCOCI มีอำนาจในการจำแนกกลุ่ม NSFS ออกจาก SFS ได้ดี มีค่า AUC เท่ากับ 0.690 (95% CI: 0.623 – 0.754) ดังแสดงในรูปที่ 19 หากกำหนดค่า cutoff ที่ 0.305 (ถ้ามากกว่าค่านี้ ให้เป็นผลบวก) จะมีค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 64.12% และ 61.24% ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า AUC ของ iCOCI ต่ำกว่าค่า AUC ของ COCI ปกติมาก คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า iCOCI test ให้คุณค่าทางคลินิกและมีโอกาสประยุกต์ใช้ได้น้อยกว่า COCI test



**รูปที่ 18** ค่า urinary iCOCI เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม non-stone forming subjects (NSFS) และกลุ่มที่เป็นนิ่วปัสสาวะ stone-forming subjects (SFS) พบว่าระดับ urinary iCOCI ในกลุ่ม SFS สูงกว่ากลุ่ม NSFS อย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.0003$ ) error bars แสดง mean  $\pm$  SD



รูปที่ 19 ROC curve ของ urinary iCOCI ในการจำแนกกลุ่ม NSFS ออกจาก SFS

#### ผลการพัฒนาวิธี magnetic-assisted COCI (mCOCI)

เนื่องจากกระบวนการทำ COCI ต้องมีขั้นตอน centrifugation สำหรับปั่นตกตะกอนผลึก COCI ที่เกิดขึ้น ขั้นตอนนี้ทำให้เพิ่มเวลาในการทำมากขึ้น และบางครั้งตะกอน COCI ตกไม่ดีฟุ้งกระจายและหลุดง่าย เมื่อดูดเอา supernatant ออก คณะผู้วิจัยจึงคิดว่าจะปรับวิธีการแยกตะกอนจาก centrifugation เป็น magnetic separation ดังนั้น จึงทำการฝัง magnetic nanoparticles (zeta potential approx. -30) ลงในผลึก COCI เพื่อให้ผลึกที่เกิดขึ้นมีสมบัติเป็นแม่เหล็ก และสามารถดูดแยกออกได้ด้วยแม่เหล็ก โดยไม่ต้อง centrifugation ซึ่งจะเป็นการลดเวลาของการแยกผลึกลงมาก และผลึกจะติดแน่นกับหลอดทดลองด้วยแรงแม่เหล็ก โดยไม่ฟุ้งกระจายหรือหลุดเมื่อดูด supernatant ออก

ผลการทดลอง พบว่า สามารถฝัง (embedded) magnetic nanoparticles ลงในผลึก COCI ได้ แต่สมบัติการเป็นแม่เหล็กของผลึกต่ำ ทำให้ไม่สามารถแยกผลึก (magnetic nanoparticles-embedded COCI crystals) ได้ด้วยแรงแม่เหล็ก ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงหยุดพัฒนาต่อ และสรุปว่า mCOCI ไม่น่าจะประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้จริง

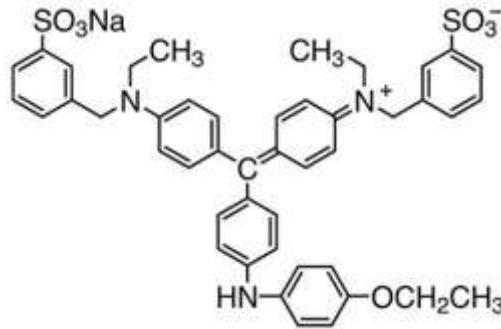
#### ผลการพัฒนาวิธี chromogenic COCI (cCOCI)

เมื่อการพัฒนา mCOCI ล้มเหลว คณะผู้วิจัยจึงคิดค้นวิธีใหม่ ที่จะทำให้การตรวจวัด COCI ง่ายขึ้น และถูกลง ไอเดียของการคิดค้นนี้ คือ ต้องการทำให้ผลึก COCI ให้เกิดสี และสามารถวัดการดูดกลืนแสงในช่วง visible wavelength ได้ เนื่องจากผิวของผลึก CaOx มีทั้งประจุบวก (จากแคลเซียม) และลบ (จากออกซาลेट) ดังนั้น สีที่จะฝังหรือติดกับผลึก CaOx ต้องมีประจุเป็นบวกหรือไม่ก็ลบ คณะผู้วิจัยเลือกใช้ Coomassie Brilliant Blue (CBB, R-250) ซึ่งเป็นสีที่มีความเป็นประจุลบสูงจากหมู่ซัลเฟต 2 หมู่ (รูปที่ 20) และการใช้สี



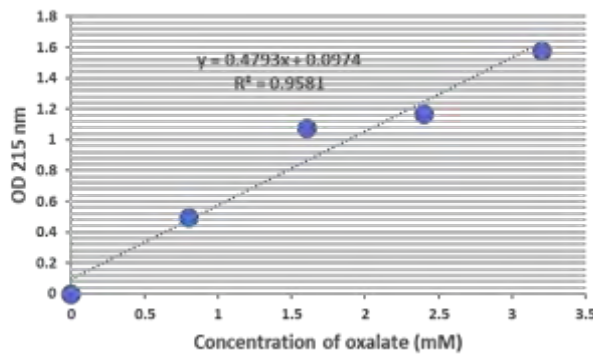
ประจุลบก็จะไม่รบกวนหรือไปแย่งจับแคลเซียมกับออกซาเลต วิธีการตรวจวัด cCOCl คล้ายคลึงกับ original COCl รายละเอียดแสดงในรูปที่ 11

ผลการศึกษาในสารละลายมาตรฐานออกซาเลต พบว่าทั้งค่า COCl และ cCOCl ให้ผลสอดคล้องกัน ดี (รูปที่ 21) แสดงว่า cCOCl น่าจะใช้แทน COCl ได้ และมีข้อดีกว่า คือ ได้ผลึกที่มีสี ขนาดใหญ่ ปั่น ตกตะกอนได้ดี ไม่ฟุ้งกระจายเวลาคูด supernatant ออก และที่สำคัญวัดการดูดกลืนแสงได้ในช่วงคลื่น visible wavelength 470 nm ซึ่งวิธี cCOCl จะทำเปรียบเทียบในตัวอย่าปัสสาวะจริงต่อไป

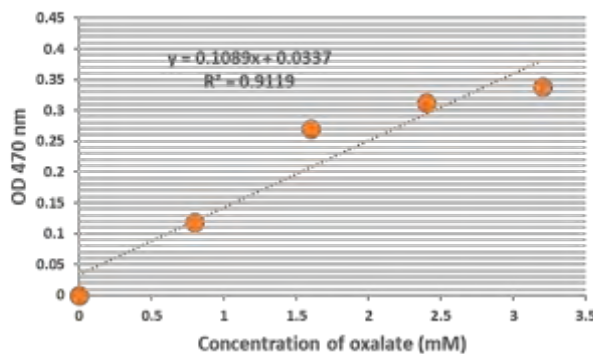


รูปที่ 20 โครงสร้างของ Coomassie Brilliant Blue (CBB, R-250) MW: 825.972

A: COCl test



B: cCOCl test



รูปที่ 21 ผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง COCl (A) และ cCOCl (B) ในสารละลายมาตรฐานออกซาเลต ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันดี

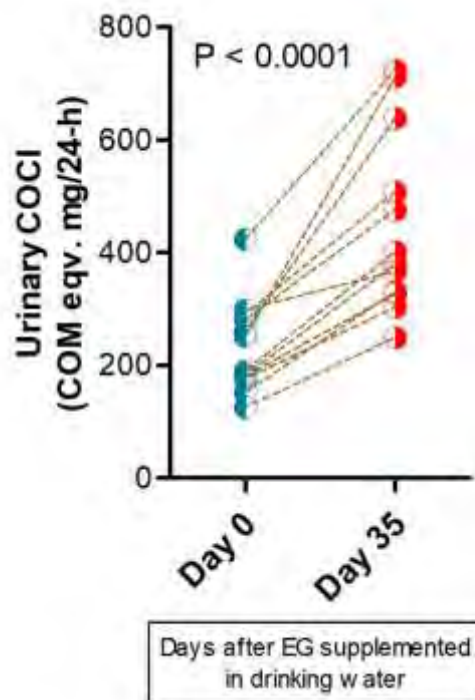
ผลการวิเคราะห์โคซี่ในหนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่วไต



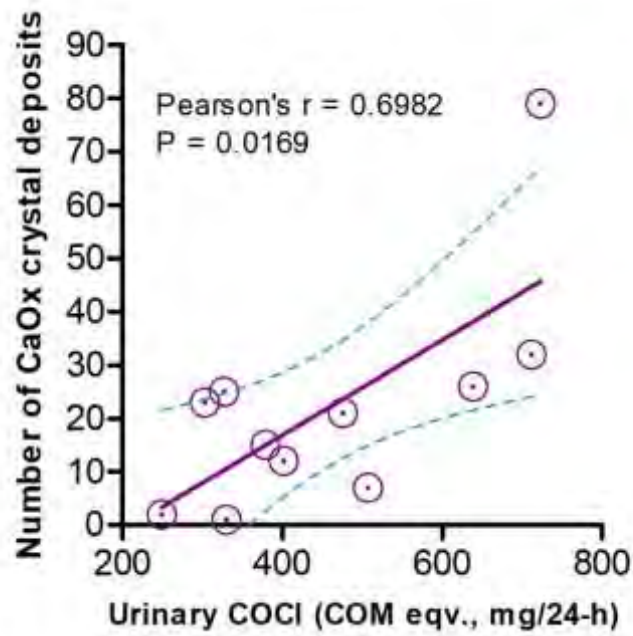
เพื่อตรวจสอบว่าค่าโคซีจะสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดผลึกนิ่วในไตของหนูทดลองหรือไม่ และสามารถใช้ในการบอกความเสี่ยงการเกิดนิ่วในปัสสาวะได้หรือไม่ การศึกษาครั้งนี้จึง วัดค่า urinary COCI ในหนูทดลอง (Wistar rats, n = 12) ที่ทำให้เกิดนิ่วไต ด้วยการให้ดื่มน้ำที่มีสารเอทิลีนไกลคอล (EG supplemented in drinking water) เป็นเวลา 35 วัน เก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ใน metabolic cage ในวันที่ 0 ก่อนการให้ EG และวันที่ 35 หลังการได้รับ EG

ผลการทดลองพบว่า ค่า urinary COCI ของหนูทุกตัวในวันที่ 35 สูงกว่าวันที่ 0 อย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบทั้งกลุ่ม (หนู 12 ตัว) พบว่า ค่า urinary COCI ก่อนได้รับ EG หรือก่อนการทำให้เป็นนิ่วไต (Day 0) ต่ำกว่าค่า urinary COCI หลังได้รับ EG หรือเมื่อเป็นนิ่วแล้ว (Day 35) อย่างมีนัยสำคัญ รูปที่ 22 แสดงค่า urinary COCI ก่อนและหลังเป็นนิ่ว แสดงว่า urinary COCI บ่งชี้การเป็นนิ่วไตของหนูทดลองได้

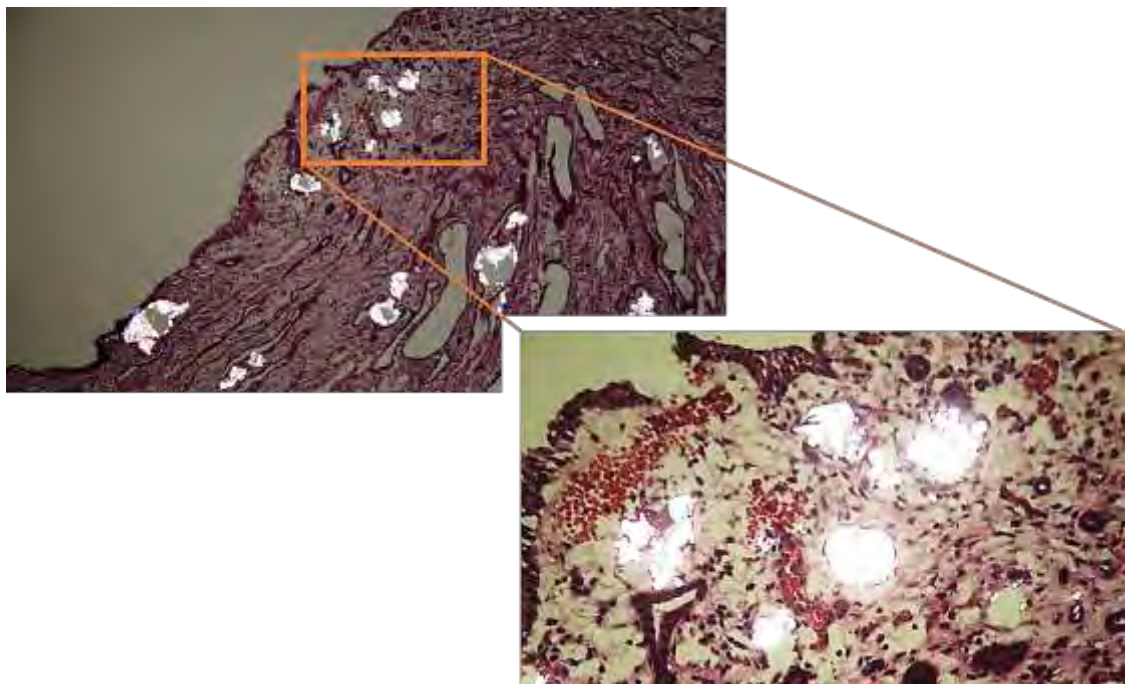
เมื่อนับจำนวน CaOx crystal deposits ในไตของหนูที่เป็นนิ่ว (Day 35) และหาความสัมพันธ์กับค่า urinary COCI (Day 35) พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ค่า Pearson's correlation coefficient เท่ากับ 0.698 (P=0.0169) แสดงว่า ค่า urinary COCI ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณ CaOx crystal deposits ที่เพิ่มขึ้นในไตของหนูทดลอง (รูปที่ 23) ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่า การตรวจวัด urinary COCI สามารถใช้ประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วปัสสาวะชนิดแคลเซียมออกซาเลตได้ รูปที่ 24 แสดงตัวอย่างลักษณะของ CaOx crystal deposits ในไตของหนูที่เป็นนิ่ว (Day 35) ที่ดูผ่านกล้อง polarized light microscope



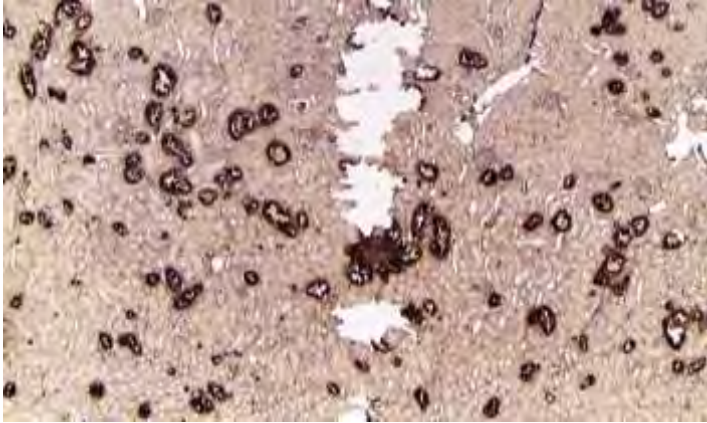
รูปที่ 22 ค่า urinary COCI ของหนู เปรียบเทียบก่อน (Day 0) และหลังการเป็นนิ่ว (Day 35) หนูทุกตัวมีค่า urinary COCI สูงขึ้น และในวันที่ 35 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับวันที่ 0



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ของค่า urinary COCl กับปริมาณผลึก CaOx ในไตของหนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่ว พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ



A:



B:

รูปที่ 24 ตัวอย่างภาพที่ถ่ายจากกล้อง polarized light microscope เพื่อดูและนับจำนวนของ CaOx crystal deposits ในตาของหนูที่เป็นนิ่ว (Day 35) CaOx crystal deposits จะเห็นเป็นสีขาววาวภายใต้กล้อง polarized light microscope (A) และเมื่อย้อมสีผลึก CaOx ด้วยวิธี Yasue staining จะเห็นผลึกเป็นสีดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B) Magnification: 10x (upper and lower), 40x (middle)

### ผลการวิเคราะห์โคซี่ในอาหาร

เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีออกซาเลตสูง จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วปัสสาวะ คณะผู้วิจัยคิดว่า COCI test น่าจะนำมาวัดในสารตัวอย่างอาหารได้ และค่า COCI ที่ได้ น่าจะสามารถบ่งชี้ปริมาณออกซาเลตในอาหารทางอ้อมได้ ดังนั้นอาหารที่มีค่าโคซี่สูง จึงถือเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงสูงที่จะทำให้เกิดนิ่วในปัสสาวะ หรือจัดเป็น อาหารก่อนิ่ว (lithogenic diets) การศึกษานี้จึงวัดค่าโคซี่ในสารตัวอย่าง ผักผลไม้และเครื่องดื่มที่ขายตามท้องตลาด เพื่อประเมินว่าอาหารชนิดใดที่น่าจะส่งเสริมการเกิดนิ่วปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคนิ่วควรหลีกเลี่ยง ผลการตรวจวัดค่าโคซี่ในเครื่องดื่มและผักต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

จากผลการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยแนะนำ อาหารที่มีค่าโคซี่สูงมาก และน่าจะเป็นอาหารก่อนิ่ว (lithogenic diets) ซึ่งผู้ป่วยโรคนิ่วปัสสาวะควรหลีกเลี่ยง ได้แก่ เครื่องดื่มประเภทโคลา กาแฟ และน้ำใบบัวบกคั้น ในขณะที่เครื่องดื่มชูกำลัง เช่น ลิโพ กระทิงแดง คาราบาวแดง M-150 มีค่าโคซี่ต่ำมาก ส่วนผักที่มีค่าโคซี่สูงมากและควรหลีกเลี่ยงในผู้ป่วยนิ่วปัสสาวะ ได้แก่ มะเขือพวง ไบย่านาง ผักชี และผักโขม อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ พบว่า ผักเมื่อต้มแล้ว (เช่น ไบย่านาง และ กวางตุ้ง ในตารางที่ 7) จะมีค่าโคซี่ลดลง นั่นคือการกินผักที่ต้มสุกน่าจะลดโอกาสการเกิดนิ่วได้ดีกว่ากินผักสด การต้มจึงเป็นวิธีที่แนะนำหากผู้ป่วยต้องการรับประทานผักที่มีค่าโคซี่สูงจริง ๆ

### ตารางที่ 6 ผลการวัดค่าโคซี่ในเครื่องดื่ม เรียงลำดับตามค่าโคซี่สูงไปต่ำ

Rank	เครื่องดื่ม (measured as it is)	COCI values: COM eqv. (mg/mL)
1	est cola	1.65
2	Pepsi	1.55

3	Espresso กาแฟสด (1)	1.50
4	Espresso กาแฟสด (2)	1.45
5	Moccona instant coffee	1.41
6	Nescafe Espresso พร้อมดื่ม	1.38
7	น้ำใบชา	1.30
8	Coca cola	1.19
9	sappe Sunny น้ำสีส้ม	1.17
10	น้ำส้ม	1.17
11	Heritea Bai Hao Oolong tea	1.17
12	Birdy black พร้อมดื่ม	1.11
13	Schweppes มะนาวโซดา	0.94
14	sappe Green น้ำสีเขียว	0.91
15	if sorrento lemonade	0.90
16	Meiji นมสด	0.83
17	น้ำผลไม้รวม	0.79
18	น้ำผลไม้ปั่น	0.76
19	Oishi Sakura green tea	0.63
20	Ichitan green tea	0.41
21	Puriku white tea	0.40
22	Lipo ลิโพ	0.34
23	C-vitt Lemon	0.32
24	Oishi green tea	0.30
25	กระทิงแดง	0.19
26	M-150	0.09
27	คาราบาวแดง	0.08

ตารางที่ 7 ผลการวัดค่าโคชีในน้ำสกัดจากผักต่าง ๆ เรียงลำดับตามค่าโคชีสูงไปต่ำ

Rank	ผัก (10 g บดในน้ำ 10 mL)	COCI values: COM eqv. (mg/mL)
1	มะเขือพวง	1.36
2	ใบย่านาง*	1.34
3	ผักชี	1.27
4	ผักโขม	1.24
5	อีหาล้า	1.17
6	ตำลึง	1.15
7	ชะอม	1.12
8	ขมิ้น	1.11

9	ผักต้ว	1.11
10	พริกแดง	1.10
11	มะขาม	1.10
12	กระโดน	1.09
13	มะเขือเปราะ	1.09
14	ผักกาดเขียว	1.09
15	ผักหวาน	1.08
16	หน่อไม้	1.06
17	ผักบุ้ง (2)	1.06
18	ขนุนอ่อน	1.06
19	ใบยอ	1.05
20	หัวปลี	1.04
21	ผักชีลาว	1.03
22	ผักบุ้ง (1)	1.03
23	กระชาย	1.02
24	กระถิน	0.98
25	ฟัก	0.97
26	บวบหอม	0.97
27	มะระขี้นก	0.97
28	กะเพรา	0.96
29	ฟักทอง	0.94
30	ผักปลัง	0.92
31	พินิจูลี	0.91
32	กระเจี๊ยบ	0.89
33	สะเดา	0.88
34	ข่า	0.88
35	ผักชีฝรั่ง	0.88
36	กวางตุ้ง*	0.87
37	ซีเหล็ก	0.86
38	มะละกอดิบ	0.84
39	โหระพา	0.84
40	ผักบุ้งนา	0.84
41	ตะไคร้	0.83
42	มันเทศ	0.83
43	มะนาว	0.80
44	มะเขือเทศ	0.79
45	น้ำใบย่านาง (คั้นขาย)	0.76

46	บวบงู	0.76
47	สะเดาดิน	0.76
48	ขจร	0.74
49	เผือก	0.72
50	สายบัว	0.72
51	แมงลัก	0.69
52	ดอกขี้เหล็ก	0.68
53	มะรุม	0.65
54	ดอกแค	0.65
55	ตั้งโอ้ คื่นช่าย	0.61
56	กวาดุ้งต้ม**	0.59
57	ใบกุ่มช่าย	0.55
58	ใบมะกรูด (2)	0.55
59	ผักกาดขาว	0.51
60	ดอกหอม	0.50
61	ใบย่านางต้ม**	0.50
62	ใบมะกรูด (1)	0.49
63	คะน้า	0.46
64	ผักดอง	0.44
65	ผักกะเฉด	0.43
66	ใบมะขาม	0.41
67	แตงกวา	0.38
68	ถั่วฝักยาว	0.37
69	ถั่วพลู่	0.37
70	ต้นหอม	0.33
71	ข้าวเหนียว	0.05
72	มันแกว	0.02

\*, \*\*: เปรียบเทียบระหว่างไม่ต้ม (\*) กับต้ม (\*\*)

### ผลการสังเคราะห์ oxalate binding ligands

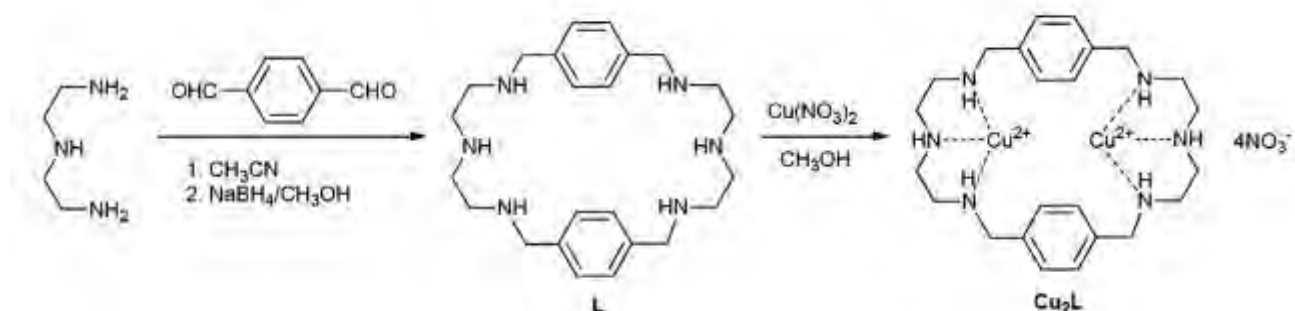
งานวิจัยส่วนนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาใหม่จากสารเคมีขนาดเล็ก ให้ได้เป็น oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) ตามที่รายงานโดย Hu and Feng ในปี 2012 [46] รายละเอียดปฏิกิริยาเคมีของการสังเคราะห์แสดงในรูปที่ 25 ปัจจุบันมีผลเบื้องต้นที่ยืนยันว่า สามารถสังเคราะห์ oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) ได้แล้ว

ขั้นตอนต่อไปคือ ลองนำไปทำปฏิกิริยากับ fluorescent dye (indicator) ซึ่งตัวที่จะใช้คือ Eosin Y ซึ่ง Eosin Y indicator นี้จะเข้าไปจับกับ oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) แล้วไม่เรืองแสง (fluorescence

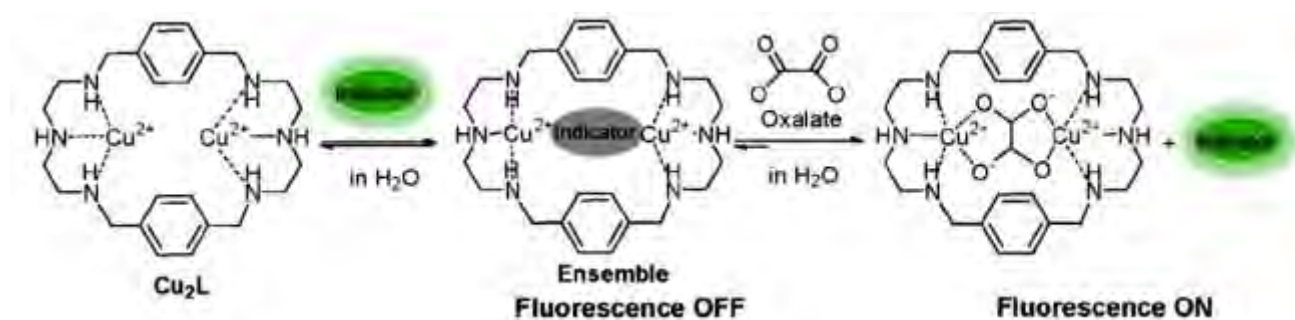


off) เมื่อเติมสารตัวอย่างที่มีสารออกซาเลต (oxalate) ลงไป ออกซาเลตจะไปจับกับ oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) แทนที่ Eosin Y indicator ทำให้ Eosin Y indicator หลุดออกมา และสามารถเรืองแสงสีเขียวได้เมื่อถูกกระตุ้น (fluorescence on, green) ปริมาณแสงที่เรืองจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณออกซาเลตที่มีในสารตัวอย่าง (รูปที่ 26)

หลังจากตรวจสอบว่าสามารถตรวจวัดออกซาเลตได้แล้ว จะนำ oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) ที่ได้นี้ไปเชื่อมต่อกับ QD nanoparticles สำหรับพัฒนากรรมวิธี QD-based oxalate determination ตามที่วางแผนไว้ต่อไป



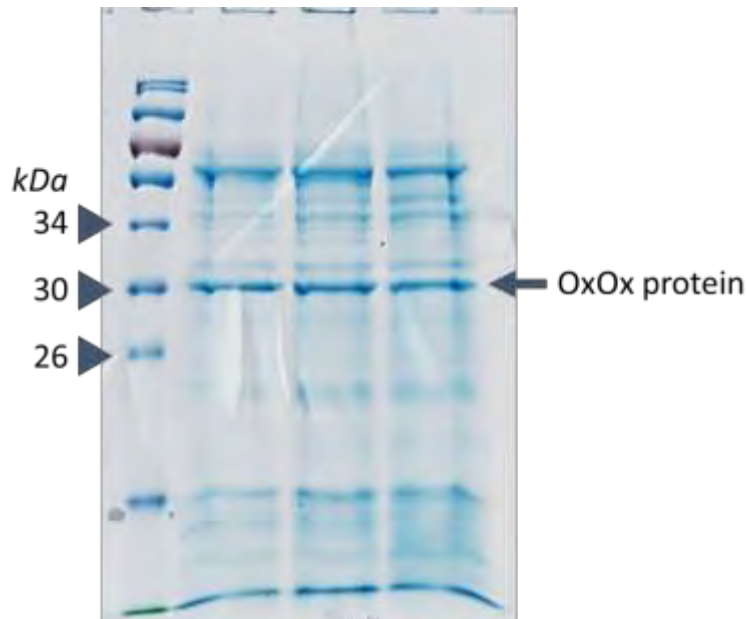
รูปที่ 25 ปฏิกิริยาเคมีสำหรับสังเคราะห์ oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) [46]



รูปที่ 26 หลักการการตรวจวัดปริมาณออกซาเลตด้วย oxalate binding ligand ( $Cu_2L$ ) [46]

### ผลการสังเคราะห์ recombinant OxOx สำหรับการทำ POCT for dual detection of oxalate and glucose

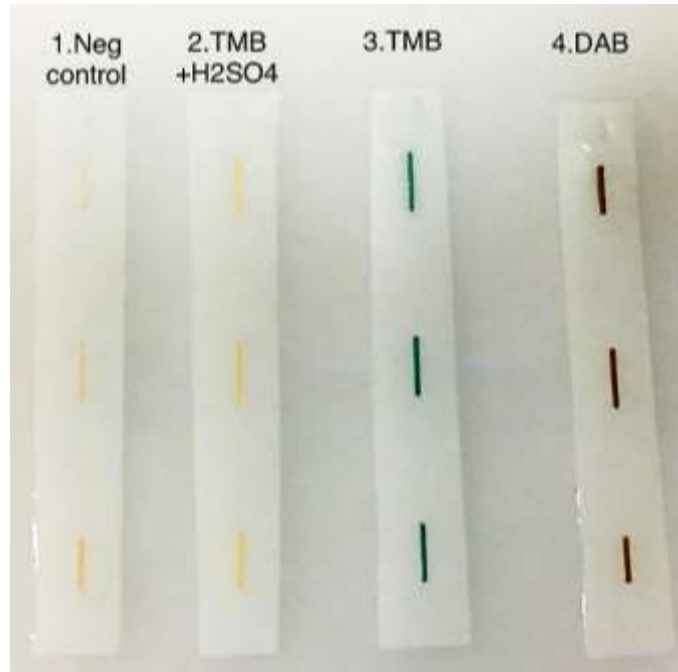
เนื่องจาก commercial recombinant OxOx มีราคาแพงมาก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิต recombinant OxOx เอง เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป และจากผลการทดลองพบว่าสามารถ express โปรตีน OxOx ในเซลล์ยีสต์ได้แล้ว (รูปที่ 27) และขั้นตอนต่อไปคือ upscale ให้ได้ปริมาณมากขึ้น แล้ว purify เพื่อนำไปใช้สำหรับสร้าง (fabricate) protein nanoparticles เพื่อทำ POCT ต่อไป



**รูปที่ 27** ตัวอย่าง SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน OxOx พบว่า band ที่ประมาณ 30 kDa เป็น OxOx และจากผลวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry พบว่า band ดังกล่าวเป็นโปรตีน OxOx จริง

เนื่องจากยังไม่ได้เอนไซม์ OxOx สำหรับพัฒนา POCT คณะผู้วิจัยจึงใช้เอนไซม์ glucose oxidase (GOx) ซึ่งถูกกว่ามาเริ่มทำการทดลองก่อน เพื่อเป็น model สำหรับพัฒนา POCT ของ oxalate ต่อไป ผลการทดลองเบื้องต้นพัฒนา POCT สำหรับตรวจวัด glucose พบว่า เอนไซม์ GOx สามารถนำไปสร้างเป็น protein nanoparticles ได้ และใน protein particles นี้ มีเอนไซม์ HRP ด้วย จากนั้นนำ GOx/HRP-containing protein particles มา blot ลงบน nitrocellulose membrane เพื่อทำเป็น detection strip ในขั้นตอนการตรวจวัดกลูโคส ใช้ strips ที่เตรียมได้ จุ่มลงในสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นนำไปจุ่มใน substrate solution หากสารตัวอย่างมีกลูโคสอยู่ protein particles ก็จะเปลี่ยนสีไปตามสีของ chromogenic substrates ดังแสดงในรูปที่ 28 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า POCT ของการตรวจวัดกลูโคสสามารถพัฒนาขึ้นสำเร็จได้ และน่าจะใช้เป็นต้นแบบสำหรับทำ POCT ของการตรวจวัดออกซาเลตได้ต่อไปไม่ยาก





รูปที่ 28 ตัวอย่างการทำ POCT สำหรับตรวจวัดกลูโคส เปรียบเทียบระหว่าง chromogenic substrate DAB และ TMB ในภาวะที่มีกรดและไม่มีกรด

## อภิปราย สรุปผล และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโรคนี้ในปัสสาวะเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของไทยมายาวนาน และเป็นหนึ่งในปัจจัยสาเหตุของการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง [8] ชนิดของนิ่วที่พบมากที่สุดคือนิ่ว CaOx ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีตรวจปัสสาวะที่ง่ายและสามารถประเมินความเสี่ยงการเกิดนิ่วในปัสสาวะได้ดี ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีใหม่ขึ้นมาสำหรับประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคนี้ดังกล่าวในปัสสาวะ การศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยได้รายงานการพัฒนาวิธีการตรวจปัสสาวะใหม่ ชื่อ โคซี่ (urinary COCI test) สำหรับบ่งชี้และวินิจฉัยการเป็นนิ่วในปัสสาวะ [18] แต่ยังมีข้อเสีย คือ วิธีโคซี่ที่พัฒนาขึ้นตอนแรกนั้นยังไม่จำเพาะกับผลึก CaOx อย่างเดียว และยังใช้เวลาการตรวจวัดนานอยู่พอสมควร การศึกษานี้จึงปรับปรุงเพิ่มเติมให้มีความจำเพาะกับผลึก CaOx มากขึ้น และใช้เวลาในการตกผลึกโคซี่ลดลง เป็น 10 นาที จาก 60 นาที จากนั้นทดสอบความแม่นยำของวิธีโคซี่ที่พัฒนาขึ้นนี้ (index test) เปรียบเทียบกับวิธีวินิจฉัยนิ่วมาตรฐาน CT scan (reference test) โดยตรวจวัดในสารตัวอย่างปัสสาวะจริง (pre-diagnostic urine samples) ผลการทดสอบพบว่าค่าความแม่นยำของโคซี่ในการวินิจฉัยโรคนี้ปัสสาวะอยู่ในระดับปานกลาง (AUC อยู่ระหว่าง 0.7-0.9) และจะมีความแม่นยำสูงขึ้นในการวินิจฉัยเฉพาะนิ่วแคลเซียม มีค่า AUC ของ ROC curve เท่ากับ 0.7651 (95% CI: 0.7124 – 0.8178) สำหรับการวินิจฉัยนิ่วทุกชนิด และเท่ากับ 0.8839 (95% CI: 0.8115 – 0.9564) สำหรับการวินิจฉัยเฉพาะนิ่วแคลเซียม เมื่อกำหนดค่า cutoff ที่ 460 COM eqv. mg/day วิธี urinary COCI นี้ จะให้ค่า diagnostic values ได้แก่ sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy เป็น 84%, 81%, 61%, 94% และ 82% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าสูงพอที่จะใช้จริงในโรงพยาบาลได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับค่าโคซี่ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับค่าโปรตีนในปัสสาวะที่สูงขึ้นด้วย แสดงว่าค่าโคซี่น่าจะบ่งชี้ renal tubular injury ได้ด้วย และที่สำคัญอีกประการ คือ พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคซี่ที่สูงขึ้นกับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้นด้วย

ผลการทดลองของ iCOCI test ให้ผลไม่ดีตามที่คาดหวัง และค่า AUC ของ ROC curve ต่ำกว่า 0.7 แสดงว่ามีความแม่นยำต่ำในการวินิจฉัยโรคนี้ปัสสาวะ เช่นเดียวกัน ผลการทดสอบ mCOCI ก็ให้ผลไม่เป็นไปตามที่คาดหวังไว้ จึงหยุดการพัฒนาต่อ ส่วนวิธี cCOCI ให้ผลดีสอดคล้องกับผลของ COCI แต่มีข้อดีที่มากกว่า คือ ได้ผลึกโคซี่ที่มีสี ขนาดใหญ่ ปั่นตกตะกอนได้ดี ตะกอนไม่ฟุ้งกระจายเวลาดูด supernatant ออก และที่สำคัญวัดการดูดกลืนแสงได้ในช่วงคลื่น visible wavelength 470 nm ซึ่งวิธี cCOCI จะทำเปรียบเทียบในตัวอย่าปัสสาวะจริงต่อไป

การยืนยันผลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวิธีโคซี่ในการประเมินความเสี่ยงการเกิดนิ่ว CaOx ในหนูทดลองที่ทำให้เกิดนิ่ว ผลการทดลองพบว่าในหนูที่ทำให้เกิดนิ่ว CaOx ในไต (nephrolithic Wistar rats) มีค่าโคซี่ในปัสสาวะสูง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังเป็นนิ่ว พบว่า ค่าโคซี่ในปัสสาวะของหนูก่อนเป็นนิ่วสูงกว่าหลังเป็นนิ่วอย่างมีนัยสำคัญ และที่สำคัญพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างค่าโคซี่ในปัสสาวะและปริมาณ CaOx crystal deposits ในไตของหนูทดลอง นั่นคือ ค่าโคซี่ในปัสสาวะที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณ CaOx crystal deposits ในไตที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองเป็นการยืนยันว่า ค่า urinary COCI สามารถบ่งชี้หรือทำนายการมีนิ่ว CaOx ในไตได้

การศึกษานี้ยังทำการวัดค่าโคซีในตัวอย่างอาหารผักและเครื่องต้ม เพื่อจัดกลุ่มอาหารที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วไต ผลการวัดค่าโคซีในเครื่องต้มและผักต่าง ๆ พบว่า กลุ่มที่มีค่าโคซีสูงและน่าจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วปัสสาวะ ได้แก่ เครื่องต้มประเภทโคลา กาแฟ น้ำใบบัวบกคั้นสด มะเขือพวง ไบยานาง ผักชี และผักโขม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่รายงานว่าอาหารกลุ่มนี้มีปริมาณออกซาเลตสูง และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในปัสสาวะ [47, 48] ผลการศึกษายังพบว่า การต้มผักทำให้มีค่าโคซีลดลง จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรับประทานอาหารที่มีค่าโคซีสูง ให้มีโอกาสการที่จะส่งเสริมให้เกิดนิ่วน้อยลง อย่างผลการทดลองเหล่านี้ยังต้องทำเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างอาหารที่ใหญ่ขึ้น เพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้ และน่าสนใจที่จะศึกษาเพื่อยืนยันผลของการกินผักที่มีค่าโคซีต่อการเกิดนิ่วปัสสาวะในสัตว์ทดลองต่อไป

อีกส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ คือ พัฒนาการใหม่สำหรับตรวจวัดปริมาณออกซาเลตในปัสสาวะ ทั้งแบบที่อาศัย QD nanoparticles เรียกชื่อว่า QD-based oxalate test และแบบที่อาศัยเอนไซม์ OxOx เพื่อทำเป็น POCT ผลการศึกษา ณ ปัจจุบัน คือ สามารถสังเคราะห์ oxalate-binding ligands ได้แล้ว และในส่วนของ recombinant OxOx ก็สามารถโคลนและกระตุ้นให้แสดงออกได้ในยีสต์แล้ว ขั้นตอนต่อไป คือพัฒนาให้เป็นชุดทดสอบที่สมบูรณ์ ทั้ง QD-based oxalate test และ POCT for dual detection of oxalate and glucose in food and clinical specimens

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า)

หัวหน้าโครงการวิจัย

.....1...../....สิงหาคม.../.....2561.....

## บรรณานุกรม

1. Brikowski TH, Lotan Y, Pearle MS. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9841-6.
2. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 1997;4(6):537-40.
3. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. *Asian Biomed*. 2007;1(1):87-95.
4. บวรผดุงกิตติ ส, ศรีบุลือ พ, ตั้งสง่า ก. อัตราการเกิดนิ่วใหม่ภายหลังการผ่าตัดนิ่วไตในโรงพยาบาลขอนแก่น. *วารสารยูโร*. 2535;13(13).
5. Boonla C, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Spittau B, Predanon C, et al. Fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in the kidneys of patients with staghorn calculi. *BJU international*. 2011;108(8):1336-45.
6. Alexander RT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Bello A, Morgan C, Samuel S, et al. Kidney stones and kidney function loss: a cohort study. *BMJ*. 2012;345(e5287).
7. Boonla C, Hunapathed C, Bovornpadungkitti S, Poonpirome K, Tungsganga K, Sampatanukul P, et al. Messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in stone-containing kidneys. *BJU international*. 2008;101(9):1170-7.
8. Ingsathit A, Thakkinstian A, Chaiprasert A, Sangthawan P, Gojaseni P, Kiattisunthorn K, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the Thai adult population: Thai SEEK study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1567-75.
9. Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9(1450-82).
10. Hesse A, Siener R. Current aspects of epidemiology and nutrition in urinary stone disease. *World journal of urology*. 1997;15(3):165-71.
11. Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(6):1847-60.

12. Sriboonlue P, Prasongwattana V, Tungsanga K, Sitprijia V. Measurements of urinary state of saturation with respect to calcium oxalate and brushite (CaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) in renal stone formers. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet.* 1990;73(12):684-9.
13. Sriboonlue P, Prasongwattana V, Sriboonlue M, Chata K, Tungsanga K, Sitprijia V. Low specific gravity urine with crystalluria as discriminant index for nephrolithiasis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet.* 1990;73(11):634-40.
14. Saepoo S, Adstamongkonkul D, Tosukhowong P, Predanon C, Shotelersuk V, Boonla C. Comparison of urinary citrate between patients with nephrolithiasis and healthy controls. *Chula Med J.* 2009;53(1):51 - 65.
15. Youngjermchan P, Pumpaisanchai S, Ratchanon S, Pansin P, Tosukhowong P, Tungsanga K, et al. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J.* 2006;50(9):605-21.
16. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W. Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2006;48(4):546-54.
17. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S. Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet.* 2007;90(4):688-98.
18. Yang B, Dissayabuttra T, Ungjaroenwathana W, Tosukhowong P, Srisa-Art M, Supaprom T, et al. Calcium Oxalate Crystallization Index (COCI): an Alternative Method for Distinguishing Nephrolithiasis Patients from Healthy Individuals. *Annals of clinical and laboratory science.* 2014;44(3):262-71.
19. Kenney PJ. CT evaluation of urinary lithiasis. *Radiologic clinics of North America.* 2003;41(5):979-99.
20. Rutjes AW, Reitsma JB, Vandenbroucke JP, Glas AS, Bossuyt PM. Case-control and two-gate designs in diagnostic accuracy studies. *Clinical chemistry.* 2005;51(8):1335-41.
21. Phillips KA, Van Bebbber S, Issa AM. Diagnostics and biomarker development: priming the pipeline. *Nature reviews. Drug discovery.* 2006;5(6):463-9.
22. Zhang CH, Zhang YP. Maximizing the commercial value of personalized therapeutics and companion diagnostics. *Nature biotechnology.* 2013;31(9):803-5.

23. Sakhaee K. Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(3):304-9.
24. Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. *Prim Care.* 2008;35(2):369-91, vii.
25. Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *Journal of nephrology.* 2000;13 Suppl 3(S45-50).
26. Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet.* 2001;358(9282):651-6.
27. Jungers P, Joly D, Barbey F, Choukroun G, Daudon M. ESRD caused by nephrolithiasis: prevalence, mechanisms, and prevention. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2004;44(5):799-805.
28. Worcester EM, Coe FL. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol.* 2008;28(2):120-32.
29. Boonla C. Oxidative Stress in Urolithiasis, Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells Filip Cristiana, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.75366. IntechOpen. 2018.
30. Verkoelen CF, van der Boom BG, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney international.* 2000;57(3):1072-82.
31. Borghi L, Guerra A, Meschi T, Briganti A, Schianchi T, Allegri F, et al. Relationship between supersaturation and calcium oxalate crystallization in normals and idiopathic calcium oxalate stone formers. *Kidney international.* 1999;55(3):1041-50.
32. Borghi L, Meschi T, Guerra A, Bergamaschi E, Mutti A, Novarini A. Effects of urinary macromolecules on the nucleation of calcium oxalate in idiopathic stone formers and healthy controls. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 1995;239(1):1-11.
33. Nicar MJ, Hill K, Pak CY. A simple technique for assessing the propensity for crystallization of calcium oxalate and brushite in urine from the increment in oxalate or calcium necessary to elicit precipitation. *Metabolism: clinical and experimental.* 1983;32(9):906-10.
34. Grases F, Garcia-Ferragut L, Costa-Bauza A, Conte A, Garcia-Raja A. Simple test to evaluate the risk of urinary calcium stone formation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 1997;263(1):43-55.
35. Sriboonlue P, Suwantrai S, Prasongwatana V. An indirect method for urinary oxalate estimation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 1998;273(1):59-68.

36. Laube N, Schneider A, Hesse A. A new approach to calculate the risk of calcium oxalate crystallization from unprepared native urine. *Urological research*. 2000;28(4):274-80.
37. Porowski T, Mrozek P, Sidun J, Zoch-Zwierz W, Konstantynowicz J, Kirejczyk JK, et al. Bonn Risk Index based micromethod for assessing risk of urinary calcium oxalate stone formation. *J Urol*. 2010;183(3):1157-62.
38. Porowski T, Kirejczyk JK, Zoch-Zwierz W, Konstantynowicz J, Korzeniecka-Kozerska A, Motkowski R, et al. Assessment of lithogenic risk in children based on a morning spot urine sample. *J Urol*. 2010;184(5):2103-8.
39. Berg W, Bechler R, Haas C, Laube N. Relevance of the BONN Risk Index for metabolic monitoring of patients with calcium oxalate urolithiasis: a clinical application study of the Urolizer. *Urological research*. 2009;37(2):55-62.
40. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine*. 2000;45(1-2):23-41.
41. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*. *Clinical chemistry*. 2003;49(1):1-6.
42. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Annals of internal medicine*. 2003;138(1):40-4.
43. Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, Bruns DE, Gatsonis CA, Hooft L, et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open*. 2016;6(11):e012799.
44. Bossuyt PM, Cohen JF, Gatsonis CA, Korevaar DA, group S. STARD 2015: updated reporting guidelines for all diagnostic accuracy studies. *Ann Transl Med*. 2016;4(4):85.
45. Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *Journal of clinical epidemiology*. 2005;58(8):859-62.
46. Hu M, Feng GQ. Highly selective and sensitive fluorescent sensing of oxalate in water. *Chem Commun*. 2012;48(55):6951-3.

47. Gasinska A, Gajewska D. Tea and coffee as the main sources of oxalate in diets of patients with kidney oxalate stones. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2007;58(1):61-7.
48. Taylor EN, Curhan GC. Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(7):2198-204.



## ภาคผนวก

## ประวัตินักวิจัย

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.ชาญชัย บุญหล้า  
 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chanchai Boonla  
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3460800070667  
 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4482 โทรศัพท์มือถือ 018-733-8700  
 โทรสาร 02-256-4482  
 e-mail: chanchai.b@chula.ac.th, cboonla@gmail.com

### ประวัติการศึกษา

Level	Field	Institution	Year
ปริญญาตรี	เทคนิคการแพทย์ (เกียรตินิยม)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2542
ปริญญาเอก (คปก.)	ชีวเคมีทางการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2547
Research training	Biological Science	University of Manchester, UK	2002
Research training	Biochemistry and Biophysics	University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA	2003
Postdoctoral Fellowship	Molecular Embryology (Humboldt Fellowship)	University of Freiburg, Germany	2009

### Awarded trainings

- 2016 Leaders in Innovation Fellowship (Newton Fund), Intensive course training on “Technology Commercialisation”, by the Royal Academy of Engineering, 14-27 Feb. 2016, London, UK
- 2016 Humboldt Renewed Research Stay in Germany, Jun. – Aug., 2016, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Germany

### Educational YouTube video: Kidney Stone Cause Risk and Prevention

<https://www.youtube.com/watch?v=sM3yJxePuBU>

## Patent pending

เครื่องดื่มสำหรับป้องกันการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะ (HydroZitLa: Innovative beverage for reducing risk of calcium oxalate stone formation) เลขที่คำขอ submission number: 1701007873

*h-index: 15*

## ผลงานวิจัย Publications

### International publications

- 1 Udomsilp P, Saepoo S, Ittiwut R, Shotelersuk V, Dissayabutra T, Boonla C and Tosukhowong P: rs11567842 SNP in SLC13A2 gene associates with hypocitraturia in Thai patients with nephrolithiasis. *Genes & Genomics*: 2018. First Online: 17 May, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s13258-13018-10702-13254>
- 2 Dissayabutra T, Kalponkul N, Rattanaphan J, **Boonla C**, Srisa-Art M, Ungjaroenwathana W and Tosukhowong P: Urinary stone risk factors in the descendants of patients with kidney stone disease. *Pediatr Nephrol*: 2018. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3927-1>
- 3 Whongsiri P, Pimratana C, Wijitsettakul U, Jindatip D, Sanpavat A, Schulz WA, Hoffmann MJ, Goering W and **Boonla C**: LINE-1 ORF1 Protein Is Up-regulated by Reactive Oxygen Species and Associated with Bladder Urothelial Carcinoma Progression. *Cancer Genomics Proteomics* 15: 143-151, 2018. (as corresponding author)
- 4 Whongsiri P, Phoyen S and **Boonla C**: Oxidative Stress in Urothelial Carcinogenesis: Measurements of Protein Carbonylation and Intracellular Production of Reactive Oxygen Species. *Methods Mol Biol*. 1655: 109-117, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0\_9. (as corresponding author)
- 5 Fukuda A, Usui M, Wakao H, **Boonla C** and Tamura Y: Stenotrophomonas maltophilia is highly prevalent among houseflies (*Musca domestica*). *J Med Microbiol*: 2017, Aug 4. doi: 10.1099/jmm.0.000556.
- 6 Sugimoto Y, Suzuki S, Nonaka L, **Boonla C**, Sukpanyatham N, Chou HY and Wu JH: The novel mef(C)-mph(G) macrolide resistance genes are conveyed in the environment on various vectors. *J Glob Antimicrob Resist*. 10: 47-53, 2017. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.015.
- 7 Ma-On C, Sanpavat A, Whongsiri P, Suwannasin S, Hirankarn N, Tangkijvanich P, **Boonla C**. Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol*. 2017; 34(4): 57. DOI: 10.1007/s12032-017-0914-5. (as corresponding author)
- 8 Masaru Usui, Chie Tagaki, Akira Fukuda, Torahiko Okubo, **Chanchai Boonla**, Satoru Suzuki, Kanako Seki, Hideshige Takada, Yutaka Tamura. Use of *Aeromonas* spp. as General Indicators of Antimicrobial Susceptibility among Bacteria in Aquatic Environments in Thailand. *Front. Microbiol*. 2016; 7: 710. | <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00710>.

- 9 Piyaratana Tosukhowong, **Chanchai Boonla**, Thasinas Dissayabuttra, Lalita Kaewwilai, Sasipa Muensri, Chanisa Chotipanich, Juho Joutsu, Juha Rinne, Roongroj Bhidayasiri. Biochemical and clinical effects of whey protein supplementation in Parkinson's disease: A pilot study. *J Neurol Sci* 2016; 367: 162-70.
- 10 Pongpairaj, P, Whongsiri, P, Suwannasin, S, Khlaiphuengsin, A, Tangkijvanich, P, **Boonla, C**. Increased Oxidative Stress and RUNX3 Hypermethylation in Patients with Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Induction of RUNX3 Hypermethylation by Reactive Oxygen Species in HCC Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 5343-5348 (as corresponding author)
- 11 Dissayabuttra, T. Rattanapan, J. Kalpongkukul, N. Mingmongkol, S. Ungchareonwattana, W. **Boonla, C**. Tosukhowong, P. Increased protein excretion, including albumin, by children of patients with urolithiasis. *Asian Biomedicine*. Vol 9(3), 1 June 2015, Pages 401-408.
- 12 Kloypan, C, Srisa-Art, M, Mutirangura, A, **Boonla, C**. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochem Funct* 2015; 33: 375–385. (as corresponding author)
- 13 Chariyavilaskul P, Pongpairaj P, Chaisawadi S, **Boonla C**, Dissayabuttra T, Prapunwattana P, Tosukhowong P. In vitro anti-lithogenic activity of lime powder regimen and the effect of lime powder regimen on urinary risk factors for kidney stone formation in healthy volunteers. *Urolithiasis* 2015;43(2):125-34.
- 14 Yang B, Dissayabuttra T, Ungjaroenwathana W, Tosukhowong P, Srisa-Art M, Supaprom T, Insin N, **Boonla C**. Calcium oxalate crystallization index (COCI): an alternative method for distinguishing nephrolithiasis patients from healthy individuals. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:262-271. (as corresponding author)
- 15 Kittikowit W, Waiwijit U, **Boonla C**, Ruangvejvorachai P, Pimratana C, Predanon C, Ratchanon S, Tosukhowong P. Increased oxidative DNA damage seen in renal biopsies adjacent stones in patients with nephrolithiasis. *Urolithiasis* 2014;42:387-394.
- 16 **Boonla C**, Tosukhowong P, Spittau B, Schlosser A, Pimratana C, Krieglstein K. Inflammatory and fibrotic proteins proteomically identified as key protein constituents in urine and stone matrix of patients with kidney calculi. *Clin Chim Acta*. 2014 Feb 15: 429:81-9.
- 17 Kloypan C, Mutirangura A, **Boonla C**. Hypomethylation of LINE-1 in bladder cancer cell lines under oxidative stress condition. *Proceedings of the 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference*. 2014. (as corresponding author)
- 18 Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabuttra T, Mutirangura A, **Boonla C**. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2013: 14:3773-8 (as corresponding author)

- 19 Chuaypen N, **Boonla C**, Dissayabutra T, Predanon C, Ruangvejvorachai P, Waiwijit U, Tosukhowong P. Increased intrarenal expression of sodium-dicarboxylate cotransporter-1 in nephrolithiasis patients with acidic urine pH. *Asian Biomedicine*. 2013 August 2013: 7:571-7 (as co-first authors).
- 20 Amornchaicharoensuk, Y, Werawatganon, T, Tohsukhowong, P, **Boonla, C**, Gengsakul, A, Tarunotai, T, Samankatiwat, P, Treewatchareekorn, M. Comparison of renal function between cyanotic and acyanotic congenital heart disease in children and adolescent. *J Med Assoc Thai* 2012; **95**: 1501-1508
- 21 Patchsung M, **Boonla C**, Amnattrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One*. 2012: **7**:e37009 (as co-first authors)
- 22 **Boonla C**, Youngjermchan P, Pumpaisanchai S, Tungsanga K, Tosukhowong P. Lithogenic activity and clinical relevance of lipids extracted from urines and stones of nephrolithiasis patients. *Urol Res*. 2011 Feb: **39**:9-19
- 23 **Boonla C**, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Spittau B, Predanon C, Tosukhowong P. Fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in the kidneys of patients with staghorn calculi. *BJU international*. 2011 Oct: **108**:1336-45
- 24 Poungpairoj P, Lilitkarntakul P, Chaisawadi S, **Boonla C**, Prapunwattana P, Tosukhowong P. Lime powder regimen is a safe medicinal product for kidney stone treatment: Pre-clinical and phase 1 clinical studies. *Proceedings of The 3<sup>rd</sup> International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. 2011: 173-7.
- 25 Patchsung M, Mutirangura A, Burami A, Tosukhowong P, **Boonla C**. Association of LINE-1 hypomethylation with increased oxidative stress in patients with bladder cancer. *Proceedings of The 3<sup>rd</sup> International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. 2011:52-6.
- 26 Srimahachota S, Wunsuwan R, Siritantikorn A, **Boonla C**, Chaiwongkarjohn S, Tosukhowong P. Effects of lifestyle modification on oxidized LDL, reactive oxygen species production and endothelial cell viability in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2010 Jul: **43**:858-62
- 27 Opanuraks J, **Boonla C**, Saelim C, Kittikowit W, Sumpatanukul P, Honglertsakul C, Tosukhowong P. Elevated urinary total sialic acid and increased oxidative stress in patients with bladder cancer. *Asian Biomedicine*. 2010 Oct: **4**:703-10
- 28 **Boonla C**, Krieglstein K, Bovornpadungkitti S, Strutz F, Predanon C, Tosukhowong P. Renal fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in patients with nephrolithiasis. *Febs J*. 2010 Jun: **277**:58- (only abstract, poster presentation in the FEBS conference)
- 29 Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, Ratchanon S, Chaisawasdi S, **Boonla C**, Tungsanga K. Citraturic, alkalizing and antioxidative effects of limeade-based regimen in nephrolithiasis patients. *Urol Res*. 2008 Aug: **36**:149-55

- 30 Tosukhowong P, **Boonla C**, Prapunwattana P, Supapong S, Tungsanga K, Mahasakpun P. Renal impairment and stone risk in inhabitants environmentally exposed to cadmium in Mae Sot District of Tak Province, Thailand. *Asian Biomedicine*. 2008 Feb: **2**:59-66
- 31 **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 kidneys. *BJU Int*. 2008 May: **101**:1170-7
- 32 Tosukhowong P, **Boonla C**, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, Dissayabuttra T, Tungsanga K. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand: update 2007. *Asian Biomedicine*. 2007 Jun: **1**:87-95
- 33 **Boonla C**, Wunsuwan R, Tungsanga K, Tosukhowong P. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine is elevated in patients with nephrolithiasis. *Urol Res*. 2007 Aug: **35**:185-91
- 34 Bamrunghon W, Prempracha N, Bunchu N, Rangdaeng S, Sandhu T, Srisukho S, **Boonla C**, Wongkham S. A new mucin antibody/enzyme-linked lectin-sandwich assay of serum MUC5AC mucin for the diagnosis of cholangiocarcinoma. *Cancer Lett*. 2007 Mar 18: **247**:301-8
- 35 Wongkham S, **Boonla C**, Sheehan JK, Wongkham C. Heterogeneity of MUC5AC mucins in serum of patients with bile duct cancer. *J Gastroen Hepatol*. 2006 Mar: **21**:A189-A
- 36 **Boonla C**, Sripa B, Thuwajit P, Cha-On U, Puapairoj A, Miwa M, Wongkham S. MUC1 and MUC5AC mucin expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 28: **11**:4939-46
- 37 Wongkham S, Sheehan JK, **Boonla C**, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, Sripa B, Wongkham C, Bhudhisawasdi V. Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett*. 2003 May 30: **195**:93-9
- 38 Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Chau-in S, **Boonla C**, Muisuk K, Kongkham S, Wongkham C, Boonsiri P, Thuwajit P. Clinical significance of serum total sialic acid in cholangiocarcinoma. *Clin Chim Acta*. 2003 Jan: **327**:139-47
- 39 **Boonla C**, Wongkham S, Sheehan JK, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Tepsiri N, Pairojkul C. Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2003 Oct 1: **98**:1438-43
- 40 Wongkham S, **Boonla C**, Kongkham S, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Sripa B. Serum total sialic acid in cholangiocarcinoma patients: an ROC curve analysis. *Clin Biochem*. 2001 Oct: **34**:537-41

#### National publications

- 1 Tosukhowong P, **Boonla C**, Tungsanga K. Hypocitraturia: Mechanism and Therapeutic and Strategies. *Thai J Urol* 2012; **33**: 98-105
- 2 Waiwijit U, **Boonla C**, Kittikowit W, Ratchanon S, Bovornpadungkitti S, Tosukhowong P. Expression of 8-hydroxydeoxyguanosine in nephrolithiatic renal tissues and toxicity of calcium oxalate monohydrate to human kidney cell line. *Thai J Urol*. 2010: **31**:137-46.

- 3 Muensri S, Tosukhowong P, Chanakul A, Ungjaroenwathana W, Shotelersuk V, **Boonla C**. Hypocitrauria as a major metabolic abnormality in pediatric urolithiasis and nephrocalcinosis. *Thai J Urol*. 2010; **31**:147-55.
- 4 Saelim C, Opanuraks J, **Boonla C**, Patchsung M, Tosukhowong P. Elevated Urinary Iron, Zinc and Nickel Associate with Increased Oxidative Stress in Bladder Cancer Patients. *Thai J Urol*. 2010: 52-62.
- 5 Saepoo S, Adstamongkonkul D, Tosukhowong P, Predanon C, Shotelersuk V, **Boonla C**. Comparison of urinary citrate between patientswith nephrolithiasis and healthy controls. *Chula Med J*. 2009 Jan - Feb: **53**:51 – 65.
- 6 Wayakkanont A, Opanuraks J, Kittikowit W, Pitiporn S, Chaisawadi S, **Boonla C**, Tosukhowong P. Efficacy of combined treatment between lime powder and curcumin supplementation on reduction of superficial bladder cancer recurrence : A preliminary randomized controlled trial. *Chula Med J*. 2009: **53**:199-214.
- 7 Youngjermchan P, Pumpaisanchai S, Ratchanon S, Pansin P, Tosukhowong P, Tungsanga K, **Boonla C**. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J*. 2006 September: **50**:605-21.
- 8 Tosukhowong P, Yachantha C, Sasivongsbhakdi T, **Boonla C**, Tungsanga K. Nephrolithiasis: Pathophysiology, therapeutic approach and health promotion. *Chula Med J*. 2006: **50**:104-23.
- 9 **Boonla C**, Thummaborworn T, Tosukhowong P. Urolithiasis in Udon Thani Hospital: A rising prevalence of uric acid stone. *Chula Med J*. 2006: **50**:77-90.

#### Presentations in international conferences/meetings

##### Oral presentation

1. **Chanchai Boonla**, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Pongsak Suttinon, Pimkanya Morekrong. Climate change and urolithiasis onset: a preliminary hospital-based study in Thailand. The 4<sup>th</sup> “Golden Bridge” International Urology Conference. 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> Oct., 2017. Kunming, Yunnan, China (Invited speaker)
2. Patcharawalai Whongsiri, Chiraphat Kloyphan, Wikrom Wongpaiboonwattana, Maturada Patchsung, Monpichar Srisa-Art, Thasinas Dissayabutra, Julin Opanuraks, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Piyaratana Tosukhowong, Apiwat Mutirangura, **Chanchai Boonla**. Oxidative stress epigenetically upregulates LINE-1 retrotransposon elements and induces tumor progression in bladder cancer. The 3<sup>rd</sup> CU-NIPS Symposium “Neuroscience meets cancer biology for a better life” January 6-7, 2017. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Invited speaker)
3. Chairman in the oral presentation session. The 3<sup>rd</sup> Golden Bridge International Urology Conference. 28 Oct. – 31 Oct. 2016. Kunming, China. (Invited chairperson)
4. **Chanchai Boonla**, Maturada Patchsung, Wikrom Wongpaiboonwattana, Chiraphat Kloyphan, Patcharawalai Whongsiri, Monpichar Srisa-Art, Thasinas Dissayabutra, Julin Opanuraks, Chaowat

- Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Piyaratana Tosukhowong, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 elements and promotes tumor progression in bladder cancer cells. The Research Group Meeting on Contamination with antibiotics and antibiotic resistant bacteria in Thai aquatic systems. Ehime University Joint Usage/Research Center LaMer, CMES. 25 – 28 Sep., 2016. Matsuyama, Japan (Invited speaker)
5. **Chanchai Boonla**, Sombat Bovornpadungkitti, Kriang Tungsanga, Piyaratana Tosukhowong. Intrarenal inflammation and presence of inflammatory proteins in urine and stone matrix of urolithiasis patients: Do these evidences give us a clue of how inflammation mediates the formation of urinary stones? The 13th International Symposium on Urolithiasis (ISU 2016) 19-22 Jul. 2016, Chiba, Japan (Invited speaker)
  6. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces global DNA hypomethylation in bladder cancer. The 2<sup>nd</sup> Golden Bridge International Urology Conference. 30 Oct. – 1 Nov. 2015. Kunming, China. (Invited speaker)
  7. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. Frontier in Cancer Research I: Systems Biology for Cancer Research 7-8 May, 2015. Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. (Invited speaker)
  8. **Chanchai Boonla** et al. Urolithiasis in Thailand: what we know about mechanism of stone formation and intrarenal pathological change. The 1<sup>st</sup> “Golden Bridge” International Urology Conference, Kunming, Yunnan, China, 4-6 Jul., 2014 (Invited speaker)
  9. Wikrom Wongpaiboonwattana, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Apiwat Mutirangura, **Chanchai Boonla**. Oxidative Stress Induces Hypomethylation of LINE-1 and Hypermethylation of the *RUNX3* Promoter in Bladder Cancer Cell Line. International Humboldt Kolleg on **Bench to Bedside Translational Research: Potential Benefits of Interdisciplinary collaboration**. 15 – 17 Nov. 2013, Manipal, India. (Invited speaker)
  10. Kiattisak Vanijajiva, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Wattanachai Ungjaroenwathana, Thavorn Supaprom, Kaew Udomsirichakorn, **Chanchai Boonla**. Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients before and after 6-months treatment with lime powder regimen. Proceedings of the 5th International Conference of Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. 16-18 Oct. 2013, Khon Kaen, Thailand. (presented by K.V.)
  11. **Chanchai Boonla**, Piyaratana Tosukhowong, Chanutra Hunapathed, Chagkrapan Predanon, Kriang Tungsanga. Intrarenal gene expression of monocyte chemoattractant protein-1, interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in kidney stone patients. The 11<sup>th</sup> International Symposium on Urolithiasis. 2-5 September 2008. Nice, France.
  12. **Chanchai Boonla**, Phantip Youngjermchan, Somkiat Pumpaisanchai, and Piyaratana Tosukhowong. Lithogenic Role of Lipids Isolated from Urine and Kidney Stone Matrix. **The 16<sup>th</sup>**



**Annual Meeting of The Japanese Society on Urolithiasis Research** “Calcium oxalate bridge extending to the world”. July 6-8, 2006, Okinawa, Japan. page 40.

Poster presentations

1. Patcharawalai Whongsiri, Chaowat Pimratana, Udomsak Wijitsettakul, Depicha Jindatip, Anapat Sanpavat, Wolfgang A. Schulz, Michèle J. Hoffmann, Wolfgang Goering, **Chanchai Boonla**. LINE-1 ORF1 protein is upregulated by reactive oxygen species and associated with bladder urothelial carcinoma progression. The 2<sup>nd</sup> EACR Conference Protecting the Code: Epigenetic Impact on Genome Stability. 27 Oct. – 3 Nov., 2017. Berlin, Germany
2. **Chanchai Boonla**, Kiattisak Vanijajiva, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Wattanachai Ungjaroenwathana, Thavorn Supaprom, Kaew Udomsirichakorn. Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients and healthy individuals. The 13th International Symposium on Urolithiasis (ISU 2016) 19-22 Jul. 2016, Chiba, Japan
3. **Chanchai Boonla**, Chiraphat Kloypan, Monpicha Srisa-art, Apiwat Mutirangura. Oxidative stress induces LINE-1 hypomethylation through depletion of S-adenosylmethionine. The 40<sup>th</sup> Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) congress. 4 – 9 Jul., 2015, Berlin, Germany.
4. Kiattisak Vanijajiva, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Wattanachai Ungjaroenwathana, Thavorn Supaprom, Kaew Udomsirichakorn, **Chanchai Boonla**. Oxidative stress and inflammatory activation in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3, 2014, Bangkok, Thailand.
5. Kiattisak Vanijajiva, Piyaratana Tosukhowong, Thasinas Dissayabutra, Wattanachai Ungjaroenwathana, Thavorn Supaprom, Kaew Udomsirichakorn, **Chanchai Boonla**. Oxidative stress, inflammation and sialic acid content in renal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients and healthy individuals. The 5th International Conference of Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. 16-18 Oct. 2013, Khon Kaen, Thailand.
6. Vanijajiva K, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Ungjaroenwathana W, Supaprom T, Udomsirichakorn K, **Boonla C**. Oxidative protein damage and NF-kappa B activation in renal proximal tubular cells exposed to urine from nephrolithiasis patients and healthy individuals. The 52th Annual Scientific Meeting 2013, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 18-21 Jun 2013.
7. **Chanchai Boonla**, Uraivan Waiwijit, Wipawee Kittikowit, Chaowat Pimratana, Preecha Ruangvejvorachai, Piyaratana Tosukhowong Increased oxidative DNA damage in stone-adjacent renal tissues of nephrolithiasis patients ในการประชุม **13<sup>th</sup> FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology ณ BITEC บางนา กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 25 - 29 พฤศจิกายน 2555.**
8. **Chanchai Boonla**, Piyaratana Tosukhowong, Chagkrapan Predanon, Andreas Schlosser, Björn Spittau, Kerstin Krieglstein. Inflammatory proteins constitute organic matrix of kidney stones and

- nephrolithiatic urines. Creativity and Innovation in Life Science Research, Enterprise and Education. 2011 Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Conference. 5-7 October 2011, Biopolis, Singapore.
9. **Chanchai Boonla**, Kerstin Kriegelstein, Sombat Bovornpadungkitti, Frank Strutz, Chagkrapan Predanon, Piyaratana Tosukhowong. Renal fibrosis and evidence for epithelial-mesenchymal transition in patients with nephrolithiasis. The 35<sup>th</sup> FEBS Congress : Molecules of Life. 26 Jun - 1 Jul, 2010, Göteborg (Gothenburg), Sweden.
  10. **Chanchai Boonla**, Kanitta Poonpirome, Chanutra Hunapathed, Sombat Bovornpadungkitti, Chagkrapan Predanon, **Supoj Ratchanon**, Kriang Tungsanga, Piyaratana Tosukhowong. Urinary mucins isolated from nephrolithiasis patients promote the aggregation of calcium oxalate crystals. the 5<sup>th</sup> eULIS Symposium (12<sup>th</sup> European Symposium on Urolithiasis). 4-7 July, 2007. Lisbon/Cascais, Portugal. page 34.
  11. **Chanchai Boonla**, Piyaratana Tosukhowong, Pisit Prapunwattana, Soontorn Supapong, Kriang Tungsanga, Pranee Mahasakpun. Dietary cadmium exposure and nephrotoxic effects in residents of cadmium-contaminated areas in Mae Sot District, Tak Province, Thailand. The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress “The Interface of Chemistry and Biology in the Omic Era: Environment & Health and Drug Discovery” 25-29 November, 2007. Bangkok, Thailand.
  12. **Chanchai Boonla**, Phantip Youngjermchan, Somkiat Pumpaisanchai, and Piyaratana Tosukhowong. Glycolipids and Phospholipids as Major Lipid Constituent in Kidney Stone Matrix Possess Promoting Activity in Lithogenic Process. The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress “Life: Molecular Integration and Biological Diversity”, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan. page 93.

#### Presentations in national conferences/meetings

1. Chanchai Boonla. Hypomethylation of LINE-1 induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. Joint Conference in Medical Sciences 2015. JCMS2015: Health Equity through Innovation and Collaboration. 4-6 June, 2015. Centara Grand and Bangkok Convention Center, Bangkok Thailand. (Oral presentation in research symposium)

#### Book Chapters

1. Chanchai Boonla (May 23rd 2018). Oxidative Stress in Urolithiasis, Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells Filip Cristiana, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.75366. Available from: <https://www.intechopen.com/books/reactive-oxygen-species-ros-in-living-cells/oxidative-stress-in-urolithiasis>
2. ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, พิสิฐรุจน์ ประพันธ์วัฒน์, สิทธิศักดิ์ ทรรษาเวก, ธนัญญา ทองตัน, **ชาญชัย บุญหล้า**, ฐิติณัฐ ดิษยบุตร บรรณาธิการ Medical Biochemistry: Review for Basic Medical Science จำนวน 363 หน้า โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร 2549 (1<sup>st</sup> Edition), 2552 (2<sup>nd</sup> Edition)

3. **ชาญชัย บุญหล้า**, ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, เกรียง ตั้งสง่า. “โรคนี้วัดไต: จากกลไกการเกิดนี้ระดับโมเลกุลสู่การป้องกัน” ใน สมชาย เอี่ยมอ่อง บรรณาธิการ Nephrology, 2550.
4. ก้าวทันชีวเคมีทางการแพทย์: สู่วัยห่างไกลโรค ใน ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ **ชาญชัย บุญหล้า** บรรณาธิการ จำนวน 247 หน้า ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร, 2549.
5. ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์, ฉัตรชัย ยาจันทร์ทา, **ชาญชัย บุญหล้า**, เกรียง ตั้งสง่า “ผลกระทบของสารอาหารต่อเมแทบอลิซึมในผู้ป่วยโรคนี้วัดไต” ใน สมชาย เอี่ยมอ่อง บรรณาธิการ Nephrology จำนวน 1564 หน้า บริษัทเท็กซ์แอนด์เจอร์นัลส์ จำกัด: กรุงเทพมหานคร, 2547, หน้า 824-843.