

Thesis Title	Use of the Kidney Injury Molecule-1 as a Specific Biomarker for Detection of Renal Dysfunction in a Human Population with Chronic Cadmium Exposure	
Author	Acting. 2Lt. Amnart Panyamoon	
Degree	Master of Science (Toxicology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Muneko Nishijo	Member
	Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul	Member
	Mr. Witaya Swaddiwudhipong, M.D.	Member

ABSTRACT

Cadmium (Cd) has been reported at elevated levels in soils, rice and water in the Mae Sot district of Tak province. Local inhabitants exposed to this high level of cadmium have an increased risk of renal dysfunction.

A new biomarker of renal tubular dysfunction, the kidney injury molecule-1 (KIM-1), was evaluated as an indicator of Cd induced renal dysfunction. The concentration of KIM-1 measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was compared to two conventional renal biomarkers, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and β_2 -microglobulin (β_2 -MG) in the urine of 700 inhabitants of Mae Sot (260 men and 440 women).

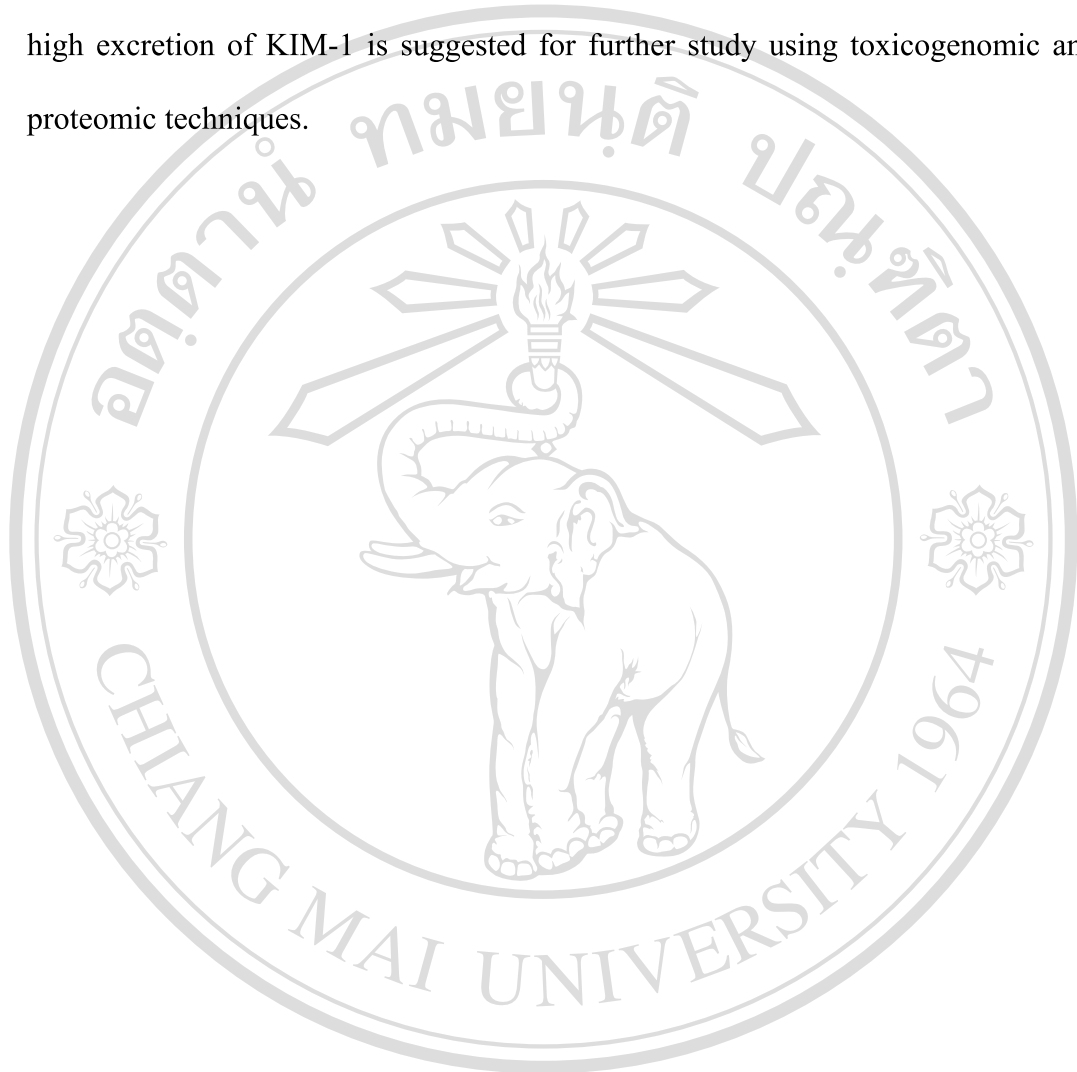
The level of Cd in whole blood and the level of Cd, copper (Cu) and zinc (Zn) in urine were also quantified. A qualitative analysis of urobilinogen, albumin, blood, ketone and glucose in the urine was performed by urine strip at the collection site. No subjects had clinical symptoms of Cd toxicity. However, 392 subjects tested positive for urinary albumin and 326 subjects tested positive for urinary blood.

The developed ELISA shows that standard KIM-1 concentrations provided good linearity ($r = 0.998$) with limit of detection and quantification values of 33.20 $\mu\text{g/ml}$ and 110.68 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The coefficient variation (CV) for intra-day and inter-day precisions for 3 levels of KIM-1 (200, 800 and 3,000 $\mu\text{g/ml}$) were at 6.87, 2.38, and 0.71% CV and 2.14, 1.16, and 0.83% CV, respectively. The accuracy of the assay was found with 89-101% recovery. Moreover, KIM-1 was stable in urine when frozen and thawed for 4 cycles and also stable for short-term storage at 4°C for 5 days. These results indicated that the in house ELISA technique was highly sensitive and specific for KIM-1 in urine.

The KIM-1 concentration in the urine of 700 Mae Sot inhabitants ranged between 60 - 15,330 $\mu\text{g/g}$ Creatinine (gCr.) with a mean \pm standard error of 1,347 \pm 49 $\mu\text{g/gCr}$. Three hundred and fifty-five subjects (117 men and 238 women) had KIM-1 greater than 988 $\mu\text{g/gCr}$., a recommended maximum level for normal kidney function. The mean KIM-1 concentration in subjects ≥ 50 years old was significantly higher than for subjects < 50 years of age at $p < 0.001$. Using Sperman's rho analysis, a strong positive correlation ($p < 0.001$) between the concentrations of KIM-1 and Cd, Cu and Zn in urine was found.

The dose response relationship between Cd and the renal biomarkers was more pronounced for hyperKIM-1uria than for hyperNAGuria and hyper β_2 -MGuria.

Thus, urinary KIM-1 is a very sensitive and specific biomarker for the early detection of renal tubular dysfunction induced by Cd. The mechanism for Cd induced high excretion of KIM-1 is suggested for further study using toxicogenomic and/or proteomic techniques.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การใช้คตินี้อินจัวร์โมเลกุล- 1 เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพจำเพาะสำหรับการตรวจหาภาวะไตทำงานผิดปกติ ในประชากรที่สัมผัสแคดเมียมแบบเรื้อรัง
ผู้เขียน	ว่าที่ร้อยตรีอำนาจ ปัญญามูล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ เรืองบุทธิकरण์ ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. พ.ญ. มุณีโกะ นิชิโจะ กรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล นธการกิจกุล กรรมการ น.พ. วิทยา สวัสดิคุณพิงส์ กรรมการ

บทคัดย่อ

มีรายงานพบแคดเมียม (Cd) ปริมาณสูงในดิน ข้าว และน้ำในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก เป็นเหตุให้ประชากรในท้องถิ่นที่สัมผัสแคดเมียมปริมาณสูงนี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตทำงานผิดปกติ

คตินี้อินจัวร์โมเลกุล-1 (KIM-1) เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพตัวใหม่ ได้ถูกนำมาประเมินเป็นสารบ่งชี้ภาวะไตทำงานผิดปกติเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยตรวจวัดความเข้มข้นของ KIM-1 ในปัสสาวะของประชากรแม่สอดจำนวน 700 คน (ชาย 240 และหญิง 440) ด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนแอสเสย์ (ELISA) ที่พัฒนาขึ้นเอง เปรียบเทียบกับสารบ่งชี้ภาวะไตทำงานผิดปกติที่ใช้กันเป็นประจำอีก 2 ชนิดคือ *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) และ β_2 -microglobulin (β_2 -MG)

ได้ทำการวัดปริมาณแคดเมียมในเลือด และปริมาณแคดเมียม ทองแดง (Cu) และ สังกะสี (Zn) ในปัสสาวะ และวิเคราะห์คุณภาพปัสสาวะโดยตรวจหา ยูโรบิลิโนเจน อัลบูมิน เลือด ทีโตน และกลูโคส ในปัสสาวะของประชากรกลุ่มนี้โดยใช้กระดาษแถบสี ณ บริเวณที่เก็บตัวอย่าง แม้ว่าจำนวนประชากรทั้งหมดไม่มีอาการแสดงของการเกิดพิษเนื่องจากแคดเมียมเลย แต่ผลการวิเคราะห์พบว่า มีประชากรจำนวน 392 คน มีอัลบูมินในปัสสาวะ และ 326 คน มีเลือดออกในปัสสาวะ

เทคนิค ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้แสดง ค่าความเป็นเส้นตรง ($r=0.998$) ของกราฟมาตรฐานที่ดี โดยค่าต่ำสุดของ KIM-1 ที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ (LOQ) คือ 33.20 และ 110.68 pg/ml ตามลำดับ ค่าความแม่นยำในการทดสอบปริมาณ KIM-1 ภายในวันเดียวกัน และต่างวันกันที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (200, 800 และ 3,000 pg/ml) เท่ากับ 6.87, 2.38 และ 0.71%CV กับ 2.14, 1.16 และ 0.83%CV ตามลำดับ ค่าความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์แสดงเป็นค่า % recovery มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 89-101 นอกจากนี้พบว่า KIM-1 มีความคงทนต่อการแช่แข็งและการทำให้ละลายได้ถึง 4 รอบ และคงทนต่อการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความไวและความจำเพาะที่สูงมากสำหรับการตรวจวัดระดับ KIM-1 ในปัสสาวะ

ความเข้มข้นของ KIM-1 ในปัสสาวะของประชากรจำนวน 700 คนที่อาศัยในอำเภอแม่สอด มีค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 61-15,330 pg/g Creatinine (gCr.) โดยมีค่าเฉลี่ย \pm ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน เท่ากับ $1,347 \pm 49$ $pg/gCr.$ โดยประชากรจำนวน 355 คน (ชาย 117 หญิง 238) มีค่า KIM-1 เกิน 988 $pg/gCr.$ ซึ่งเป็นค่าสูงสุดที่ใช้ระบุว่าไตทำงานปกติและพบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ KIM-1 ในประชากรที่มีอายุ ≥ 50 ปี สูงกว่ากลุ่มประชากรที่มีอายุน้อยกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ความเข้มข้นของ KIM-1 มีความสัมพันธ์เชิงบวก ($p < 0.001$) กับระดับแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีในปัสสาวะ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Spearman's rho

การขับออกของ KIM-1 ในปัสสาวะ (hyperKIM-1uria) มีความสัมพันธ์กับปริมาณแคดเมียมที่ร่างกายได้รับ มากกว่าการขับออกของ NAG (hyperNAG-uria) และ β_2 -MG (hyper β_2 -MG-uria).

ดังนั้น KIM-1 เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความไวและความจำเพาะสูงมากสำหรับการตรวจวัดภาวะท่อไตทำงานผิดปกติระยะเริ่มต้นที่ถูกเหนี่ยวนำโดยแคดเมียม การศึกษาต่อไปควรลงลึกด้านกลไกการขับออกของ KIM-1 ในปริมาณสูงที่เกิดจากแคดเมียมโดยใช้เทคนิค toxicogenomics และ/หรือ proteomics