

ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตและบุตร



นางสาวสุภาวดี มิ่งมงคล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PROTEINURIA IN UROLITHIASIS PATIENTS AND THEIR DESCENDANTS

Miss Supawadee Mingmongkol



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคหัวใจและบุตร
โดย	นางสาวสุภาวดี มิ่งมงคล
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์
	ดร. นายแพทย์ ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยภรณ์ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ดร. นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. นายแพทย์ ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล)

.....กรรมการ  
(ดร. นายแพทย์ อัมภาศ ลีพหวนิชกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุขเกษม โฆษิตเศรษฐ์)

สุภาวดี มิ่งมงคล : ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุตร (PROTEINURIA IN UROLITHIASIS PATIENTS AND THEIR DESCENDANTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. นพ. รุสมีธ ดิษยบุตร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์, ดร. นพ. ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล, 69 หน้า.

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลก และพบว่าสมาชิกในครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงกว่าประชากรปกติมาก การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าบุตรของผู้ป่วยมีภาวะสารก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ แคลเซียมสูง (hypercalciuria) สารยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ ซิเตรตต่ำ (hypocitraturia) และมีโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งความผิดปกติทั้งสามชนิดนี้สามารถพบได้ในผู้ป่วยเช่นกัน การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ยังไม่เป็นโรคนิ่วเมื่อเทียบกับคนปกติ และหาโปรตีนที่อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดนิ่วได้ โดยใช้ตัวอย่างจากปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วย 30 คน และกลุ่มบุตรคนปกติ (กลุ่มควบคุม) 30 คน ผ่านกระบวนการ 1D-SDS-PAGE และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์โดยใช้ nanoLC-MS/MS ผลการวิเคราะห์พบว่าพบโปรตีนในปัสสาวะจำนวนทั้งหมด 349 ชนิด ในตัวอย่างปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุตรคนปกติ โดยพบโปรตีน 18 ชนิด ที่พบสูงขึ้นในกลุ่มบุตรผู้ป่วยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนออกเป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิด คือ กลุ่มที่หลังจากเซลล์อื่นเข้าสู่กระแสเลือด 17 โปรตีน และโปรตีนที่สามารถหลังเข้าสู่กระแสเลือดรวมถึงหลังจากเซลล์ของตัวเองเข้าสู่ปัสสาวะโดยตรงอีก 1 ชนิด จากนั้นผู้วิจัยเลือกใช้โปรตีนอัลบูมินซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีน 18 ชนิดที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตเมื่อเปรียบเทียบกับบุตรคนปกติเป็นโปรตีนตัวอย่าง เมื่อวัดระดับของโปรตีนอัลบูมินในบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบว่าสูงกว่าบุตรกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $5.92 \pm 10.48$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $0.41 \pm 0.78$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p$ -value=0.006\*) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มคนปกติที่มีอายุและเพศสอดคล้องกัน พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับของโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $16.85 \pm 33.41$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $0.26 \pm 0.71$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p$ -value < 0.001) เช่นกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงการเกิดภาวะ supersaturation โดยอาศัย Ogawa's index ต่อระดับของโปรตีนอัลบูมินพบว่าไม่พบความสัมพันธ์กับระดับอัลบูมินในปัสสาวะในทุกกลุ่ม

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5674089030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: RENAL STONES / UROLITHIASIS / PROTEINURIA / ALBUMINURIA / PROTEOMICS

SUPAWADEE MINGMONGKOL: PROTEINURIA IN UROLITHIASIS PATIENTS AND THEIR DESCENDANTS. ADVISOR: THASINAS DISSAYABUTR, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, TRAIRAK PISITKUN, M.D., Ph.D.}, 69 pp.

Kidney stone disease or urolithiasis is a common urologic disease in elderly worldwide. It is well-recognized that familial members of urolithiasis patients have higher risk for stone development than normal population. Our previous study showed that the urolithiasis descendants had higher urinary lithogenic (calcium), lower anti-lithogenic (citrate) and elevated proteinuria level than normal population. These abnormalities were also observed in urolithiasis patients. The present study aimed to analyze the type of urinary proteins which were increased in urolithiasis descendants and identify a biomarker protein for the risk of stone development in urolithiasis family. Urine samples from 30 urolithiasis descendants (G1) and 30 descendant controls (G2) were used. The samples were separated by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) and the proteins were identified by nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Total 349 proteins were identified in the urine of urolithiasis and control descendants. Among these, 18 proteins were significantly higher (all 3-pair comparison between) urolithiasis than control descendants, including 17 proteins plasma-derived and only one protein that is plasma-derived and kidney-derived. We used the urinary albumin as a candidate protein for the increased risk of stone formation in urolithiasis family. G1 had higher albumin levels than G2 ( $5.92 \pm 10.48$  mg/day and  $0.41 \pm 0.78$  mg/day respectively,  $p$ -value=0.006\*). The levels of the urinary albumin in urolithiasis patients was also higher than normal ( $16.85 \pm 33.41$  mg/day and  $0.26 \pm 0.71$  mg/day respectively,  $p$ -value < 0.001). However, we could not identify the correlation between supersaturation levels, indicated by Ogawa's index, and the urinary albumin excretion in all groups.

Department: Biochemistry  
 Field of Study: Medical Biochemistry  
 Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จจุล่งไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนคำแนะนำ ในการรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ผู้เป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุขเกษม โฆษิตเศรษฐ์ อาจารย์ประจำภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อัษฎาศรี ลิฬหนิชกุล อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนายแพทย์วัฒน์ชัย อึ้งเจริญวัฒนา คณะแพทย์ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ผศ.ดร.ถาวร สุภาพรม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยเวชศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดร.ธรรมกร แซ่ตั้ง สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการคำนวณทางสถิติจากการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ นายกวิน วณิชชีวะ นายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ และ นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล ที่ให้ความกรุณาและความช่วยเหลือในการเก็บสารตัวอย่างของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเมตตา ประสิทธิภาพ ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณชนัญธิดา นกสกุล คุณกาญจนา เคาวสุต คุณจำรัส มณี และ คุณสนาน ละมาตร์ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนผู้ช่วยวิจัยสำหรับเงินทุนในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณของบิดา มารดา ที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้านของชีวิต ขอขอบคุณญาติ พี่ น้อง เพื่อน ๆ ระดับปริญญาตรี ปริญญาโท ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	10
สารบัญรูปภาพ.....	12
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย (background and rationale) .....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives).....	2
1.3. ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumptions).....	2
1.4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations).....	3
1.5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Key words).....	3
1.6. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย (Conceptual framework).....	4
บทที่ 2 .....	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1. โรคนิ่วไต (Kidney stone disease).....	5
2.2. ชนิดของนิ่วไต (Type of stones) .....	5
2.3. สารก่อนิ่ว (Stone promoters) .....	6
2.4. สารยับยั้งนิ่ว (Stone inhibitors) .....	7
2.5. ภาวะปัสสาวะมีความอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturations) .....	7
2.6. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่ว (Lithogenic risk factors).....	8

2.7. กระบวนการเกิดนิ่วไต (Mechanism of renal stone formation).....	11
2.8. บุตรของผู้ป่วยโรคนี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดนี้วมากกว่าคนปกติ .....	12
2.9. ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (Proteinuria) .....	19
2.10. กลไกการเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะ .....	19
2.11. อัลบูมินรั่วในปัสสาวะ (albuminuria) .....	21
2.12. ตัวอย่างการศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในปัสสาวะ.....	22
2.13. เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์ .....	24
บทที่ 3 .....	31
วิธีดำเนินการวิจัย .....	31
3.1. ระเบียบวิธีงานวิจัย (Research methodology).....	31
3.2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size).....	31
3.3. สถานที่ทำการวิจัย .....	32
3.4. การเก็บรักษาสารตัวอย่างทางชีวภาพ .....	32
3.5. การคัดเลือกตัวอย่างปัสสาวะ .....	33
3.6. การเตรียมปัสสาวะ .....	33
3.7. วิธีการตกตะกอนโปรตีน.....	34
3.8. วิธีการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ .....	35
3.8.1. การวัดความเข้มข้นโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธีของ Bradford .....	35
3.8.2. การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE.....	36
3.8.3. การ digest เจลสำหรับการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry (In gel digestion).....	36
3.8.4. การติดฉลากเปปไทด์ของโปรตีนด้วยวิธีการ In solution dimethyl labeling.....	38
3.8.5. การตกตะกอนแยกโปรตีนด้วยกระบวนการ Desalting.....	39



3.8.6. การวิเคราะห์ผลโปรตีนด้วย Nano-Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS).....	40
3.8.7. การแปลผลจากการวิเคราะห์ด้วย nanoLC-MS/MS.....	41
3.8. วิธีการวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะ .....	42
3.9. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis).....	43
บทที่ 4 .....	44
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	44
ผลการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE .....	46
ผลการวิเคราะห์ผลโปรตีนด้วย nano-Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) .....	47
ผลการตรวจ urinary albumin โดยวิธี electrochemiluminescence.....	50
ผลการศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ต่อระดับของโปรตีนอัลบูมิน.....	52
บทที่ 5 .....	57
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	57
รายการอ้างอิง .....	62
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	69

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต และกลุ่มคนปกติ .....	13
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และบุตรของคนปกติ .....	14
ตารางที่ 3 แสดงระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในปัสสาวะ และระดับโปรตีนคาร์บอนิลเฉลี่ยในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย .....	15
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต และกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาวิจัย .....	16
ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และบุตรกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาวิจัย .....	17
ตารางที่ 6 แสดงระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในปัสสาวะ และระดับโปรตีนคาร์บอนิลเฉลี่ยในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย .....	18
ตารางที่ 7 โปรตีนที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้่วไต (14 ราย) คนปกติ (3 ราย) และที่พบในปัสสาวะของทั้งผู้ป่วยโรคนี้่วไต และ คนปกติ .....	23
ตารางที่ 8 แสดงตัวอย่างการ pooled ปัสสาวะเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบทางโปรตีโอมิกส์.....	34
ตารางที่ 10 แสดงการติดฉลากสำหรับ stable light isotope dimethyl และ stable medium isotope dimethyl โดยใช้ Formaldehyde isotope และ Cyanoborohydride isotope .....	39
ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	45
ตารางที่ 12 แสดงระดับองค์ประกอบโดยรวมในปัสสาวะ และ ผลของ Urine strip test ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย .....	46
ตารางที่ 13 แสดงโปรตีน 19 ชนิดที่มีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต เมื่อเทียบกับบุตรของคนปกติ .....	48
ตารางที่ 14 แสดงระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และกลุ่มบุตรคนปกติ.....	51

ตารางที่ 15 แสดงระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตและกลุ่มคนปกติ .....	52
ตารางที่ 16 แสดงค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไตและบุตรคนปกติ (กลุ่มควบคุม).....	53
ตารางที่ 17 แสดงค่า Ogawa index ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไต และคนปกติ (กลุ่มควบคุม).....	55



## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงชนิดต่าง ๆ ของนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ .....	6
ภาพที่ 2 การเกิดภาวะ supersaturation .....	8
ภาพที่ 3 กระบวนการเกิดนิ่วไต (process of renal stone formation).....	12
ภาพที่ 4 แสดงจำนวนของโปรตีนที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต คนปกติ และที่พบใน ปัสสาวะของทั้งผู้ป่วยโรคนิ่วไต และ คนปกติ .....	23
ภาพที่ 5 องค์ประกอบของเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี.....	26
ภาพที่ 6 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS .....	27
ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบการติดฉลากของ stable isotope dimethyl ทั้ง 3 ชนิด คือ light intermediate และ heavy isotope .....	30
ภาพที่ 8 แสดงการตกตะกอนแยกโปรตีนโดยใช้ tip สำหรับ autopipette ขนาด 20-200.....	40
ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของโปรตีนที่ตกตะกอนจากปัสสาวะทั้ง 3 กลุ่มของ กลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต และของกลุ่มบุตรคนปกติ.....	47
ภาพที่ 10 แสดงจำนวนของโปรตีนที่พบในเลือด และที่พบทั้งในไตและเลือด .....	50
ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับอายุของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต และ กลุ่มบุตรคนปกติ .....	51
ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรผู้ป่วย โรคนิ่วไต .....	53
ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรคน ปกติ .....	54
ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มผู้ป่วยโรค นิ่วไต .....	55
ภาพที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มคนปกติ .....	56

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (background and rationale)

โรคนิ่วไต (Kidney stone disease หรือ urolithiasis) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่พบได้บ่อย และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก ในประเทศไทยโรคนิ่วพบได้ทั่วไป แต่พบความชุกของโรคสูงสุดในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ โดยมีรายงานความชุกตั้งแต่ 0.3-16.9 % <sup>(1)</sup> นอกจากนี้โรคนิ่วไตหลังได้รับการผ่าตัดเอานิ่วออกแล้วมีอุบัติการณ์การเกิดเป็นนิ่วซ้ำสูง เนื่องจากผู้ป่วยเหล่านี้ยังไม่ได้รับการแก้ไขความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่สัมพันธ์กับการเกิดนิ่ว

นิ่วไตเป็นโรคที่เกิดจากหลายสาเหตุ (multifactorial etiology) โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ของการเกิดนิ่วแบ่งได้เป็น (1) ปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรมตั้งแต่กำเนิด ระบบทางเดินปัสสาวะที่ผิดปกติ การมีประวัติครอบครัวเป็นโรคนิ่ว โรคที่เพิ่มการขับสารสารก่อนิ่วออกมาทางปัสสาวะ (2) ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors) เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ยา ความผิดปกติทางเมแทบอลิกในปัสสาวะ (urinary metabolic abnormalities) สุขนิสัยการบริโภคอาหาร รวมทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น สภาพภูมิอากาศ การประกอบอาชีพ และ (3) ไม่ทราบสาเหตุ (Idiopathic cause) การมีสมาชิกในครอบครัวป่วยด้วยโรคนิ่วถือเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่วที่สำคัญประการหนึ่ง รายงานการศึกษาหลายฉบับสนับสนุนว่าบุคคลที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกับผู้ป่วยโรคนิ่วจะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วสูงกว่าประชากรปกติ เช่นเดียวกับคนที่อาศัยในครัวเรือนเดียวกันกับผู้ป่วยโรคนิ่วได้มีโอกาสเป็นโรคนิ่วมากกว่าคนปกติด้วย <sup>(2, 3)</sup> การศึกษาของอาจารย์สุชาย ศรีทิพย์วรรณ และคณะ (รพ.ศิริราช) ศึกษาอุบัติการณ์การเกิดนิ่วโดยอาศัยแผนภูมิต้นไม้ครอบครัว (family tree) ในประชากรจังหวัดขอนแก่นและพบว่าสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยโรคนิ่วทางเดินปัสสาวะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วมากกว่าประชากรปกติถึง 3.18 เท่า <sup>(4)</sup> อาจารย์พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ <sup>(5)</sup> พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่ว 2 ใน 3 มีประวัติคนในครอบครัวป่วยด้วยโรค

นิ้วเช่นกัน เป็นหลักฐานทางกายภาพให้เชื่อได้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมน่าจะมีผลต่อการเกิดนิ้ว แม้จะยังไม่มีรายงานการศึกษาใดที่พบยีนใดยีนหนึ่งที่มีสัมพันธ์ต่อการเกิดนิ้วอย่างชัดเจน

การศึกษาของทีมวิจัย ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และ ดร.นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตร นำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ ได้เปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ้วไตรระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไตร บุตรของคนปกติ และบิดามารดา พบว่าบุตรของผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงในปัสสาวะที่สัมพันธ์กับการเกิดนิ้วคล้ายกับผู้ป่วยโรคนิ้วไตร คือ มีภาวะแคลเซียมสูง (hypercalciuria) ภาวะซีเทรตต่ำ (hypocitraturia) และมีไกลโคซออะมิโนกลัยแคน (GAG) ในระดับที่ต่ำ และยังพบว่าทั้งผู้ป่วยโรคนิ้วไตรและบุตรของผู้ป่วยมีระดับของโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะในระดับที่สูงกว่าบุตรกลุ่มควบคุม (บุตรคนปกติที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รายงานยังไม่ได้เผยแพร่)

จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้เกิดคำถามขึ้นว่า เพราะเหตุใดบุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไตรที่ยังไม่เกิดโรค กลับมีโปรตีนรั่วทางปัสสาวะมากกว่าคนปกติ และโปรตีนที่รั่วออกมานี้เป็นโปรตีนชนิดใด มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติหรือปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคนิ้วหรือไม่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วย และหาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่ผิดปกตินี้กับการเกิดโรคนิ้ว ผู้วิจัยเชื่อว่าความรู้นี้จะช่วยเป็นประโยชน์ในการศึกษาสาเหตุของความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ้วในสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วย และสามารถพัฒนาแนวทางการป้องกันการเกิดนิ้วในกลุ่มเสี่ยงเหล่านี้ได้

## 1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives)

1. เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ้วไตรเปรียบเทียบกับคนปกติ
2. เพื่อหาปริมาณตัวอย่างโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ้วไตรและในผู้ป่วยโรคนิ้วเปรียบเทียบกับคนปกติ

## 1.3. ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumptions)

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ
2. ตัวอย่างสารชีวภาพ ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ได้จากผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาเรื่อง “ภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ้วทางเดินปัสสาวะและปัจจัยยับยั้งนิ้วในผู้ป่วยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

และบุคคลในครอบครัว” โดยมี อ.ดร.นพ.ฐิติณัฐ ดิษยบุตรเป็นหัวหน้าโครงการ โดยไม่มีการเก็บ ตัวอย่างสารชีวภาพใดๆ เพิ่มเติมจากผู้เข้าร่วมโครงการ

#### 1.4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations)

เนื่องจากสมมุติฐานเรื่องความสัมพันธ์ของโปรตีนที่รั่วออกมาในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรค นีวไตเป็นแนวคิดใหม่ ซึ่งไม่เคยมีผู้ใดศึกษาค้นคว้ามาก่อน จึงมีความเป็นไปได้ที่ผลการทดลองจะไม่ เป็นไปตามที่ผู้วิจัยคาดหวังไว้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยคาดว่าโปรตีนที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นในปัสสาวะของบุตร ผู้ป่วยมีหลายชนิด ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถทำการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดได้ในระยะเวลาจำกัด รวมถึงการ เพิ่มขึ้นของโปรตีนบางชนิดอาจไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้วไต หรือไม่สามารถอธิบายได้

#### 1.5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Key words)

1.5.1. Renal stones คือ นีวไตในทางเดินปัสสาวะ เป็นนีวไตที่เกิดในไต ท่อไต กระเพาะ ปัสสาวะและท่อปัสสาวะ

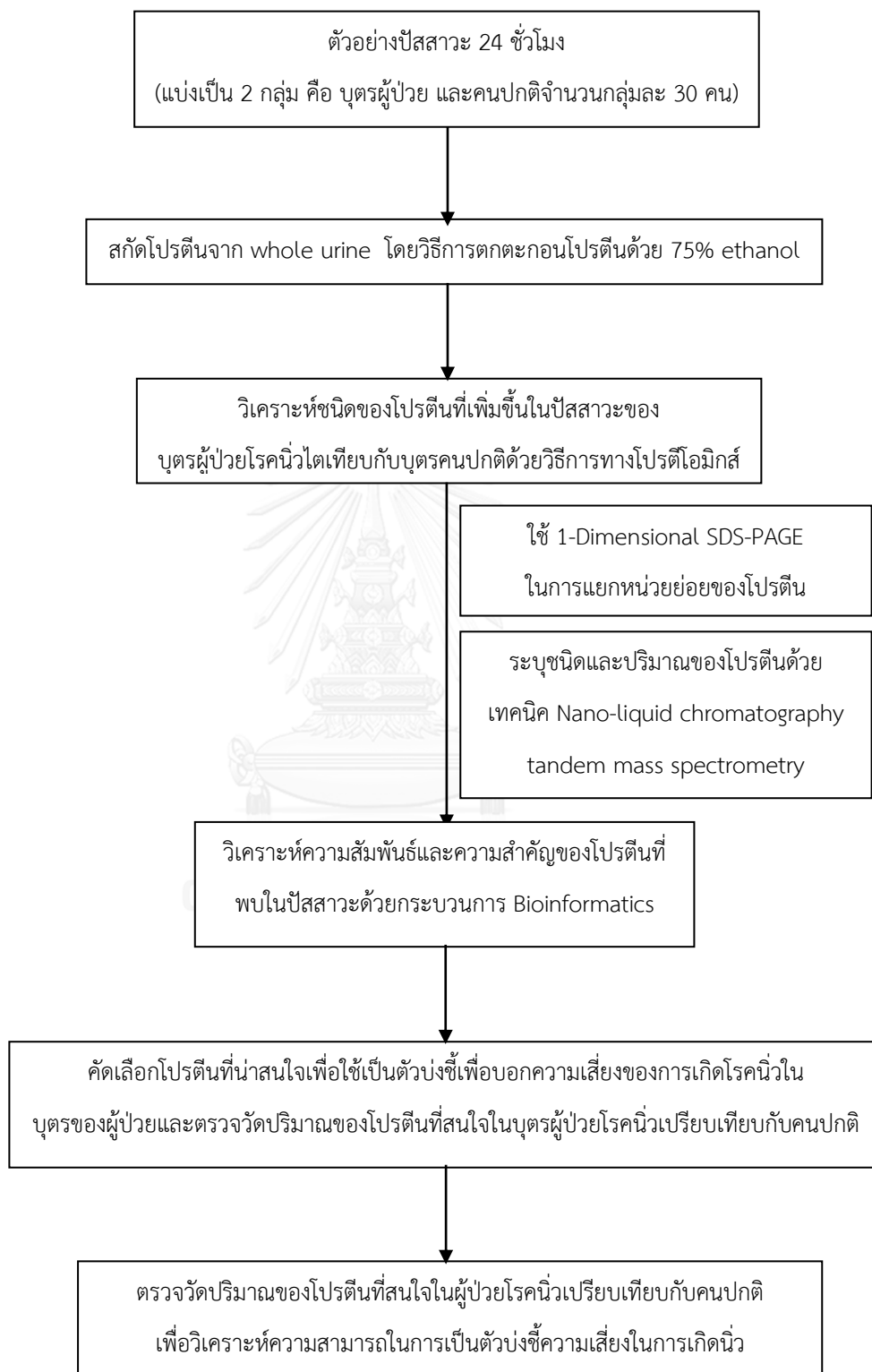
1.5.2. Kidney stone disease หรือ Urolithiasis คือโรคนีวไต ซึ่งมีก้อนนีวไตอยู่บริเวณ ตำแหน่งที่กรวยไต (renal pelvis) และสูงกว่ากรวยไตขึ้นไป

1.5.3. Proteinuria ภาวะเมื่อโปรตีนรั่วในปัสสาวะมากกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน

1.5.4. Albuminuria ภาวะที่มีโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน และโปรตีนที่ รั่วออกมาส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน

1.5.5. Proteomic การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนในตัวอย่างทางชีวภาพที่ ซับซ้อน ซึ่งจะช่วยให้ความเข้าใจในธรรมชาติความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้น

### 1.6. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย (Conceptual framework)





## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1. โรคนิ่วไต (Kidney stone disease)

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ใหญ่ ผู้สูงอายุ และเด็กทารกที่มีความผิดปกติแต่กำเนิด ความชุกของโรคนิ่วไตทั่วโลกอยู่ที่ประมาณร้อยละ 6-17 และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากหลายปัจจัย การศึกษาของ Yanagawa (1997) พบว่าประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีความชุกของโรคนิ่วไตสูงถึงร้อยละ 10-17<sup>(1)</sup> อาการของโรคนิ่วไตประกอบด้วยอาการเจ็บปวดที่บริเวณสีข้าง ปัสสาวะเป็นเลือด การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไตวายเรื้อรังตามมา อีกทั้งโรคนิ่วไตมีอัตราการเกิดซ้ำได้สูงภายหลังการรักษาด้วยการผ่าตัด ทำให้เป็นภาระของผู้ป่วยครอบครัวและประเทศชาติในการให้การดูแลรักษาในระยะยาว<sup>(6)</sup>

ปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมของการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นภาวะความไม่สมดุลระหว่างสารก่อนิ่วสูง หรือ สารยับยั้งนิ่วต่ำในปัสสาวะ ร่วมกับการมีปัจจัยส่งเสริมการเกิดนิ่วอื่น ๆ เช่น ปริมาณปัสสาวะน้อยทำให้ความเข้มข้นของสารก่อนิ่วในปัสสาวะ อันได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก เป็นต้น เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ซึ่งในภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดนี้ ตัวถูกละลายจะสามารถรวมตัวกันเป็นสารเชิงซ้อนได้ทันที หากสารก่อนิ่ว อาทิเช่น แคลเซียมจับกับออกซาเลตจะกลายเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความสามารถละลายน้ำต่ำ จึงเกิดเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำหากผลึกเหล่านี้มีในปัสสาวะมากจะรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในที่สุด<sup>(7)</sup>

#### 2.2. ชนิดของนิ่วไต (Type of stones)

ก้อนนิ่วมีองค์ประกอบ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นแร่ธาตุ (mineral composition) ประมาณ 95% และส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic matrix) ประมาณ 2.5-5% สารอินทรีย์ที่พบในปัสสาวะเหล่านี้เป็นสารโมเลกุลใหญ่ได้แก่ กลุ่มโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น<sup>(8, 9)</sup>

นิ่วไตสามารถจำแนกตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของผลึกในก้อนนิ่วได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 70 – 80 ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate, CaP) นิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต หรือ แคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก จากรายงานการวิจัยพบว่าชนิดของนิ่วที่พบมากที่สุดทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต<sup>(10, 11)</sup> นิ่วประเภทที่ 2 คือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non-calcium stones) พบประมาณร้อยละ 15-20 ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และนิ่วซิสตีน (cystine stone)<sup>(12)</sup> (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงชนิดต่าง ๆ ของนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ

(ที่มา: <http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/knrenal.htm>)

### 2.3. สารก่อนิ่ว (Stone promoters)

สารก่อนิ่วที่มีอยู่ในปัสสาวะตามปกติ ได้แก่ สารที่มีประจุบวก คือ แคลเซียม และ สารที่มีประจุลบ คือ ออกซาเลต ฟอสเฟต ยูเรต เป็นต้น ในภาวะที่สารเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงในปัสสาวะทำให้เกิดความเข้มข้นในปัสสาวะสูงจนถึงจุดที่มีความอิ่มตัวอย่างยิ่ง (supersaturation) ร่วมกับมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย สารเหล่านี้สามารถรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็งที่ละลายน้ำได้ยาก และเกาะกลุ่มรวมกันกลายเป็นก้อนผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่าง ๆ ของทางเดินปัสสาวะ<sup>(13)</sup> ดังนั้นองค์ประกอบที่พบส่วนใหญ่ในก้อนนิ่วจึงเป็นผลึกแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมออกซาเลต แคลเซียมฟอสเฟต ยูเรต เป็นต้น

## 2.4. สารยับยั้งนิ่ว (Stone inhibitors)

สารยับยั้งนิ่วเป็นสารที่ป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นแร่ธาตุ และสารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น แมกนีเซียม (magnesium) โพแทสเซียม (potassium) ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) และ ซิเตรท (citrate) เป็นต้น ส่วนอีกกลุ่มเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) หรือ GAGs โพรตีน Nephrocalcin<sup>(14)</sup> และ Uropontin<sup>(15)</sup> สารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเกิดนิ่วในทุกขั้นตอนของกระบวนการเกิดนิ่ว ตั้งแต่การลดระดับความอิ่มตัวของสารก่อนิ่ว ยับยั้งการเกิดผลึกนิ่วเคลือบยับยั้งการโตของผลึก ยับยั้งการรวมกลุ่มกันของผลึก ตลอดจนไปยับยั้งการจับของผลึกกับเซลล์บุผิวท่อไต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและธรรมชาติของสารยับยั้งนั้น ๆ ด้วย เป็นต้น นอกจากนี้บางการศึกษายังพบว่าสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดสามารถเป็นได้ทั้งสารยับยั้งนิ่วและสารส่งเสริมการเกิดนิ่วได้ในสภาวะที่แตกต่างกันในระบบทางเดินปัสสาวะในขณะนั้น อาทิเช่น ไกลโคโปรตีน ชนิด Tamm-Horsfall protein (THP)<sup>(16)</sup> เป็นต้น

## 2.5. ภาวะปัสสาวะมีความอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturations)

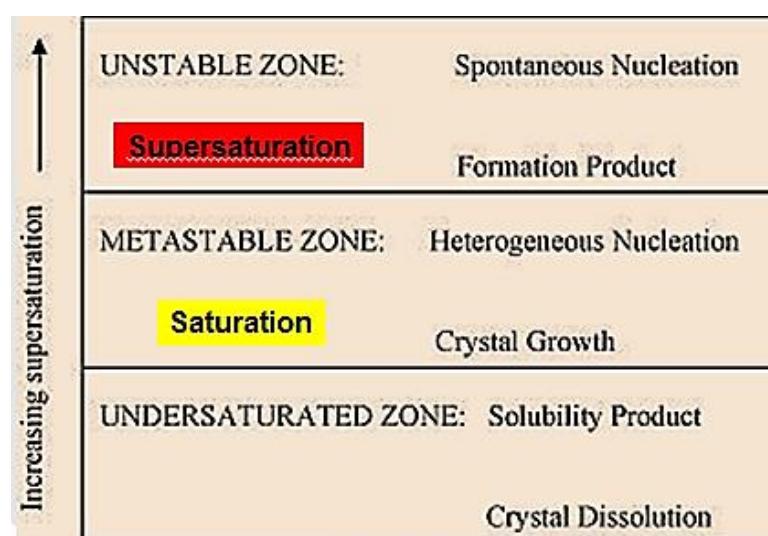
คือภาวะความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะเกิดเนื่องจากมีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงกว่าความสามารถในการละลายที่ตัวทำละลาย (น้ำปัสสาวะ) จะรับได้ อีออนต่างๆ ในปัสสาวะจึงรวมกันกลายเป็นสารเชิงซ้อนได้ในทันที หากในภาวะที่ปัสสาวะมีความอิ่มตัวยิ่งยวด และมีสารก่อนิ่วในปัสสาวะ เช่น แคลเซียมและออกซาเลตปริมาณมาก โมเลกุลของทั้งสองชนิดสามารถรวมตัวและจับกันเป็นผลึกที่ละลายน้ำได้ยาก และตกตะกอนได้ทันทีและถูกสะสมอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นก้อนนิ่ว แคลเซียมออกซาเลตที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2) โดยภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะสามารถคำนวณได้จากความเข้มข้นของสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ เพื่อนำมาคิดโดยใช้สมการที่สลับซับซ้อนหรืออาศัยโปรแกรม EQUIL2 โดยค่าที่น้อยกว่า 1 จะเป็นตะกอนที่สามารถละลายน้ำได้ ส่วนค่าที่มากกว่า 1 จะเป็นตะกอนที่สามารถรวมกลุ่มกันและโตขึ้นเป็นก้อนนิ่วได้ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม EQUIL2 ต้องอาศัยค่าของอีออนในปัสสาวะหลายตัว และสารบางตัวมีความไม่สะดวกในการวัด อาทิเช่น แอมโมเนีย จึงมีผู้พัฒนาสูตรคำนวณอื่นที่ใช้ได้สะดวกกว่าและมีความน่าเชื่อถือ อาทิ เช่น Ogawa index<sup>(17)</sup>

Ogawa index คือ สูตรการคำนวณอิเล็กทรอนิกส์ที่ส่งผลต่อกระบวนการเกิดผลึกนิ้ว แคลเซียมออกซาลेट ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ออกซาลेट และซิเตรตเพื่อหาภาวะ supersaturation

Ogawa index สามารถคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$AP(\text{CaOx})\text{EQ2} = 6.838 \times 10^{-5} \cdot [\text{Ca}]^{0.78} [\text{Mg}]^{-0.30} [\text{Ox}]^{0.91} [\text{Cit}]^{-0.17}$$

\*เมื่อความเข้มข้นของ Ca, Mg, Ox, Cit อยู่ในหน่วย mmol/L



ภาพที่ 2 การเกิดภาวะ supersaturation

(ที่มา: <http://www.hdcn.com/symp/02asn/asp2/asp2.htm>)

## 2.6. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ้ว (Lithogenic risk factors)

1. พันธุกรรม ผู้ป่วยที่มีพ่อแม่เป็นโรคนิ้วไตมีโอกาสที่จะเป็นโรคนิ้วไตได้เช่นกัน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รายงานว่าโรคนิ้วในไตมีความเกี่ยวข้องกับ พันธุกรรม และมีความเป็นไปได้ที่จะถ่ายทอดให้บุตรหลานได้เหมือนกับโรคทางพันธุกรรมอื่น ๆ โดยจากการลงพื้นที่ภาคอีสานเพื่อทำวิจัยเกี่ยวกับโรคทาง พันธุกรรม ร่วมกับกลุ่มวิจัยจากสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2547 จนถึงปัจจุบัน พบว่าโรคนิ้วในไตเป็นโรคอันดับต้น ๆ ที่คร่าชีวิตชาวอีสานในอัตราสูงถึง 1,000 รายต่อปี ผลจากการเก็บตัวอย่างเลือดและชักประวัติผู้ป่วย 1,000 ราย ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ชี้ให้เห็นชัดเจนว่าโรคนิ้วในไตมีการถ่ายทอดทาง พันธุกรรม และหาก

เป็นลูกหลานในครอบครัวเดียวกันจะมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้มากกว่าครอบครัวที่ไม่มีประวัติโรคนี้นมาก่อน ประมาณ 3.18 เท่า<sup>(4)</sup>

2. อายุและเพศ พบว่าในเพศชายมีโอกาสเป็นโรคนี้ไว้มากกว่าเพศหญิงประมาณ 2-3 เท่า และพบมากในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก<sup>(18)</sup> ความเสี่ยงของการเกิดนิ่วในตลอดช่วงอายุของผู้ใหญ่สำหรับอายุเฉลี่ยที่พบโรคนี้ไว้มากที่สุดในช่วง 30-60 ปี โดยอายุเฉลี่ยของเพศชายที่พบนิ่วมากที่สุดประมาณ 35 ปี และเพศหญิงมี 2 ช่วง คือ ที่อายุ 30 ปีและ 55 ปี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงที่เพิ่มการขับซิเตรตออกมาในปัสสาวะ<sup>(19)</sup> ส่วนฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเพศชายเพิ่มการสร้างออกซาเลตในตับทำให้ขับออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้นส่งผลให้พบเพศชายมีออกซาเลตในปัสสาวะสูงกว่าในเพศหญิง นอกจากนี้ยังพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดนิ่วในเด็กต่ำกว่าผู้ใหญ่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเด็กมีปริมาณสารยับยั้งการเกิดนิ่ว เช่น ซิเตรต หรือแมกนีเซียมในปัสสาวะสูงกว่า และมีการขับแคลเซียมในปัสสาวะต่ำกว่าในผู้ใหญ่<sup>(20)</sup>

3. ภาวะไม่สมดุลของระหว่างสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะทำให้เกิดภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิก แบ่งเป็น 2 กรณี คือ ภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิกที่มีสารก่อนิ่วในปัสสาวะมากเกินไป เช่น ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria) ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะ (hyperoxaluria) และ ภาวะกรดยูริกสูงในปัสสาวะ (hyperuricosuria) เป็นต้น<sup>(21)</sup> และมีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะน้อยเกินไป เช่น ภาวะซิเตรตต่ำในปัสสาวะ (hypocitraturia) ภาวะแมกนีเซียมต่ำในปัสสาวะ (hypomagnesiuria) และ ภาวะโพแทสเซียมต่ำในปัสสาวะ (hypokaliuria) เป็นต้น ความผิดปกติของสมดุลของสารเหล่านี้ในปัสสาวะ เป็นปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกที่สำคัญของการเกิดโรคนิ่วไต (lithogenic metabolic risk factors) ซึ่งทำให้ปัสสาวะมีความอึดตัวของสารก่อนิ่วสูงและเหนียวทำให้เกิดผลึกคริสตัลจนกลายเป็นก้อนนิ่วได้ในที่สุด<sup>(22)</sup>

4. ปัสสาวะมีความเข้มข้นสูงขึ้นเกิดเนื่องจากมีสารต่าง ๆ ถูกขับออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติหรือเกิดจากผู้ป่วยดื่มน้ำน้อยหรือสูญเสียน้ำออกจากร่างกายทางด้านอื่นมากกว่าปกติ โอกาสที่สารละลายในปัสสาวะจะตกผลึกจึงมีมากขึ้น และอาจเกี่ยวข้องกับเกลือแร่ที่ละลายอยู่ในน้ำที่ใช้ดื่ม การออกกำลังกายอย่างหนักหรือการทำงานกลางแจ้ง ทำให้มีการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ไปกับเหงื่อ

5. ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ จากการศึกษาของ W.G. Robertson, UK มีหลักฐานยืนยันชัดเจนว่าคนปกติและผู้ป่วยโรคนี้มีความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปความเป็นกรดต่างในปัสสาวะ มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างวันจึงมีโอกาสเกิดผลึกได้ทั้งผลึกกรดยูริก

และผลึกแคลเซียมแต่ผลึกเหล่านี้จะละลายเมื่อ pH เปลี่ยนไปหลังจากนั้นจึงมี การขับออกมากับ ปัสสาวะซึ่งความเป็นกรด-ด่างไม่สูงพอที่จะละลายผลึกได้จึงเกิดผลึกสะสมมากขึ้นและรวมตัวกัน ทำลายเซลล์บุท่อทางเดินปัสสาวะเกิดการเกาะติดและคั่งค้างในท่อทางเดินปัสสาวะที่ pH < 5.5 ปัสสาวะที่มีฤทธิ์เป็นกรด อาจเกิดตะกอนของกรดยูริกและที่ pH >7 ปัสสาวะที่มีฤทธิ์เป็นด่าง อาจ เกิดการตกตะกอนของผลึกแคลเซียมออกซาเลต แคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งคน ปกติในช่วง 06.00 น. ปัสสาวะจะมีความเป็นกรดสูงสุด (ประมาณ pH 5.2) และในช่วง 18.00 น. จะ มีค่าเป็นกลาง pH 7.0 จึงมีโอกาสเกิดผลึกได้ทั้งผลึกกรดยูริกและผลึกแคลเซียมซึ่งการรวมตัวกันของ ผลึกทำให้เกิดเป็นก้อนนิ่วในที่สุด

6. การรับประทานยาบางชนิดมีผลต่อการขับสารก่อนิ่วออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น ผู้ที่ได้รับ ยาขับปัสสาวะจะทำให้ขับแคลเซียมออกมาทางปัสสาวะมากขึ้น ยากลุ่ม Magnesium trisilicate, Ciprofloxacin, Sulfa antibiotics , Triamterene , Indinavir และ Ephedrine ทำให้เกิดนิ่วโดย การเกิด Drug crystallize and urinary supersaturation ยา Probenecid, Salicylates, และ Ablative chemotherapies ก็สามารถทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง และเกิดนิ่วแบบกรดยูริกได้เช่นเดียวกัน<sup>(23, 24)</sup>

7. Metabolic syndrome จากการศึกษาของ R. Siener พบว่าค่าความอึดตัวอ้วนของ แคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะแปรผันตรงกับค่า body mass index (BMI) ในขณะที่ความเป็น กรด-ด่างของปัสสาวะแปรผันกับค่า BMI<sup>(25)</sup> และจากการศึกษาของ B. Hess และอีกหลายงานวิจัย รายงานว่า ภาวะ metabolic syndrome และ obesity มีความสัมพันธ์กับโรคนี้และยังพบว่าผู้ป่วย โรคนี้กรดยูริกมักมีโรคเบาหวานร่วมด้วย กลไกเชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับภาวะ insulin resistance โดยภาวะอ้วนและการดื้อต่ออินซูลินส่งผลทำให้ปัสสาวะมีความเป็นกรด และการสลายแคลเซียมจาก กระดูกมากขึ้น ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดนิ่วแคลเซียมและนิ่วกรดยูริก<sup>(26)</sup>

8. ภูมิประเทศและภูมิอากาศ ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ในทางเดินปัสสาวะมักอยู่ในบริเวณที่ราบสูง ประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและในฤดูร้อน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจากเสียเหงื่อ มาก ทำให้ปัสสาวะเข้มข้นขึ้น ทำให้นิ่วโตเร็วจึงเกิดอาการขึ้น แต่ในฤดูหนาวเสียเหงื่อน้อย ปัสสาวะ เจือจางและมีปริมาณมาก

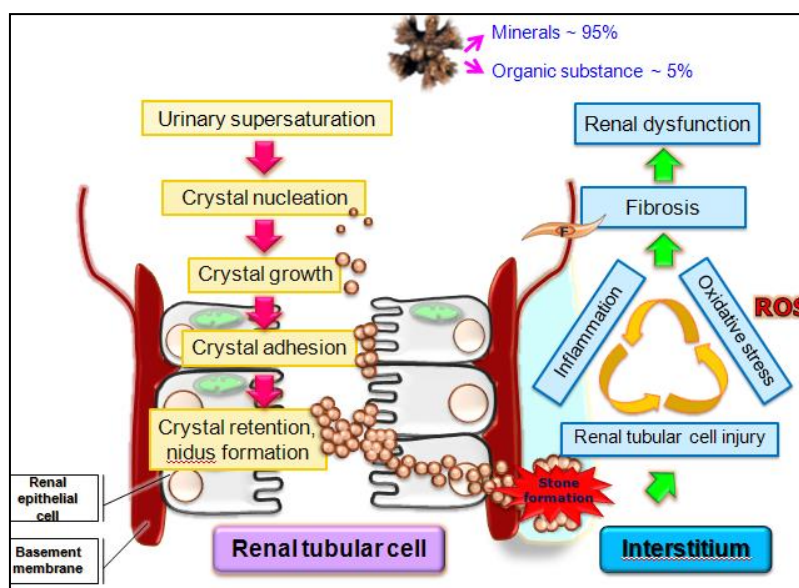
9. วิธีการดำเนินชีวิต โดยเฉพาะการบริโภคอาหารและการดื่มน้ำมีผลให้มีการเพิ่มหรือลด ของสารที่เป็นส่วนประกอบของก้อนนิ่ว<sup>(27)</sup> งานวิจัยรายงานว่า การดื่มน้ำอัดลมเป็นสาเหตุให้ระดับซี

เทรตและแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำและยังทำให้ปัสสาวะมีความเป็นกรดสูงมากขึ้น การบริโภคผักผลไม้จะทำให้ปริมาณปัสสาวะความเป็นด่างและซีเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น ขณะที่ระดับแคลเซียมในปัสสาวะลดลง<sup>(28)</sup> ผู้มีอาชีพเกษตรกร ทำงานกลางแจ้งจะมีการเสียเหงื่อมาก ร่วมกับการดื่มน้ำในปริมาณน้อยทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นอาจทำให้มีการตกผลึกของสารละลายในปัสสาวะเกิดขึ้นได้ หรือผู้ที่มีรายได้น้อยจะบริโภคอาหารจำพวกแป้งและผักมาก โปรตีนน้อย ทำให้เกิดนิ่วจำพวกออกซาเลตได้ง่าย ผิดกันกับผู้ที่มีรายได้สูงมีการบริโภค อาหารโปรตีน ไขมัน มากกว่าปกติ ทำให้เกิดเป็นนิ่วพวกกรดยูริกและนิ่วแคลเซียมสูง<sup>(29)</sup>

## 2.7. กระบวนการเกิดนิ่วไต (Mechanism of renal stone formation)

กลไกของการเกิดนิ่วเริ่มต้นจากภาวะปัสสาวะอิ่มตัวยิ่งยวด ส่งผลให้สารก่อนิ่วตกตะกอนเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำ (crystallization) อาทิเช่น แคลเซียมไอออนและออกซาเลตไอออนมารวมตัวกัน ซึ่งเป็นจุดแกนกลาง (nucleus) เพื่อดึงดูดให้คริสตัลมารวมตัวกัน เรียกว่า crystal nucleation ทำให้เกิดการโตขึ้นของผลึก (crystal growth) ก้อนคริสตัลที่มีขนาดใหญ่มากพอจะสามารถยึดเกาะกับผิวของเซลล์บุหลอดไต (crystal adhesion) จากนั้นจะเกิดกระบวนการเก็บกินคริสตัลเข้าสู่เซลล์ (endocytosis) โดยคริสตัลจะเคลื่อนไปสะสมที่ tubular basement membrane (TBM) เนื่องจากร่างกายไม่สามารถทำลายคริสตัลเหล่านี้ได้ จึงมีการสะสมของผลึกนิ่วเพิ่มมากขึ้นจะกลายเป็นก้อนนิ่วในเนื้อไต (stone) ในที่สุด<sup>(30)</sup>

ก้อนคริสตัลที่ติดค้างในเซลล์ท่อไตจะทำให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตได้รับบาดเจ็บ (renal tubular cell injury) เกิดการตายและหลุดร่วงของเซลล์ และก้อนนิ่วยังสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) หรือ การอักเสบในไต (inflammation) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เพิ่มขึ้นอีก หากเกิดวงจรมีซ้ำๆ โดยไม่ได้รับการรักษา จะทำให้เกิด renal tubular cell injury มากขึ้น ทำให้เกิด fibrosis และไตสูญเสียการทำงาน (renal dysfunction) ในที่สุด<sup>(31)</sup> (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กระบวนการเกิดนิ่วไต (process of renal stone formation)  
(ที่มา: ดัดแปลงภาพมาจากวิทยานิพนธ์ของพูนสิน พวงไพโรจน์)

## 2.8. บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วมากกว่าคนปกติ

เป็นที่ทราบเป็นอย่างดีว่าญาติใกล้ชิดของผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูงกว่าประชากรปกติ แต่ยังไม่มีความชัดเจนให้เห็นความผิดปกติทางชีวเคมีที่พบในญาติของผู้ป่วย การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ที่อินเดียพบว่า ญาติพี่น้องของผู้ป่วยโรคนิ่วมีลักษณะความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมของปัสสาวะไม่แตกต่างจากผู้ป่วยโรคนิ่ว<sup>(32)</sup> คณะผู้วิจัยนำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ได้ศึกษาปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิซึมในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ่ว โดยมีผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสิ้น 148 ราย แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยโรคนิ่ว จำนวน 28 ราย กลุ่มที่ 2 บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่ว จำนวน 46 ราย กลุ่มที่ 3 ประชากรปกติ จำนวน 40 ราย และบุตรของประชากรปกติ จำนวน 34 ราย โดยเก็บข้อมูลพื้นฐานทั่วไป และเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณของปัสสาวะ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และวัดสารอิเล็กโทรไลต์ต่างๆ ในปัสสาวะ ได้แก่ โปรตีน แคลเซียม ออกซาเลต ซิเตรต แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม และไกลโคอะมิโนกลัยแคนที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงผลไว้ในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) จากการวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ที่เป็นตัวบ่งชี้ระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน และวัดระดับ Total Antioxidant Status (TAS) ในปัสสาวะ ซึ่งบ่งบอกระดับของสารต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระโดยรวมดังแสดงข้อมูลไว้ในตารางที่ 1-3



**ตารางที่ 1** แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และกลุ่มคนปกติ

รายละเอียด	ผู้ป่วยโรคนิ่วไต	คนปกติ
จำนวนประชากร (คน)	28	40
อายุเฉลี่ย (mean±SD)	45.6±8.7	44.1±9.5
% เพศชาย	64.3%	46.3%
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	24.0±3.6	24.5±3.6
Urine volume (liters)	1.78±0.65	1.53±0.55
Urine pH	6.60±0.90	6.06±0.79 <sup>a</sup>
Calcium (mg/day)	119.87±17.37	96.39±13.01
Oxalate (mg/day)	46.13±5.49	12.59±1.84 <sup>a</sup>
Citrate (mg/day)	74.35±14.69	178.68±25.36 <sup>a</sup>
GAGs (mg/day)	6.27±1.11	46.17±6.33 <sup>a</sup>
Urinary protein (mg/day)	336.6±61.9	46.17±6.33 <sup>a</sup>

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SD, ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ <sup>a</sup>  $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไต และคนปกติ (ปรับปรุงจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

**ตารางที่ 2** แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต และบุตรของคนปกติ

รายละเอียด	บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต	บุตรของคนปกติ
จำนวนประชากร (คน)	46	34
อายุเฉลี่ย (mean±SD)	19.1±7.9	20.2±7.6
% เพศชาย	46.7%	43.8%
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	N/A	N/A
Urine volume (liters)	1.21±0.39	1.25±0.55
Urine pH	6.78±0.90	6.46±0.93
Calcium (mg/day)	59.15±6.24	45.38±5.39 <sup>b</sup>
Oxalate (mg/day)	14.70±2.53 <sup>c</sup>	22.02±9.87
Citrate (mg/day)	112.08±11.19 <sup>c</sup>	194.17±26.99 <sup>b</sup>
GAGs (mg/day)	24.35±1.53 <sup>c</sup>	43.77±3.96 <sup>b,d</sup>
Urinary protein (mg/day)	67.0±7.0 <sup>c</sup>	26.6±3.7 <sup>b</sup>

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SD, N/A คือ not applicable, <sup>b</sup>p<0.05 เปรียบเทียบระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และบุตรของคนปกติ (ปรับปรุงจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

**ตารางที่ 3** แสดงระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในปัสสาวะ และระดับโปรตีนคาร์บอนิลเฉลี่ยในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	ผู้ป่วยโรคหัวใจ	คนปกติ	บุตรของผู้ป่วย	บุตรของคนปกติ
Plasma protein carbonyl (nmol/mg-P)	0.065±0.009	0.053±0.008	0.039±0.005*	0.041±0.006
Urinary TAS (g/g creatinine)	0.65±0.04	0.64±0.04	0.68±0.05	0.78±0.05

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SD ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \*p <0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 หมายถึง หน่วยของสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAS) ในปัสสาวะ คือ กรัม ต่อ กรัมของ creatinine (g/g Creatinine) หน่วยของ Plasma protein carbonyl คือ นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีนในพลาสมา (nmol/mg-P) (ดัดแปลงจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคหัวใจมีระดับโปรตีนในปัสสาวะ และปริมาณออกซาลาเลตในปัสสาวะสูงกว่าประชากรปกติ ขณะที่ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนต่ำกว่าประชากรปกติ เช่นเดียวกับบุตรของผู้ป่วยโรคหัวใจที่มีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่าบุตรของประชากรปกติ ขณะที่ปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนต่ำกว่าบุตรของประชากรปกติ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคหัวใจและบุตร พบว่าบุตรของผู้ป่วยโรคหัวใจมีระดับแคลเซียมและออกซาลาเลตซึ่งเป็นสารก่อนิ่วในปัสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยโรคหัวใจ แต่มีระดับซีเทรตในปัสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วสูงกว่าในส่วนของความเครียดทางออกซิเดชัน พบว่าบุตรของผู้ป่วยมีระดับโปรตีนในปัสสาวะ และผลผลิตจากความเครียดทางออกซิเดชัน ที่เรียกว่า plasma protein carbonyl ต่ำกว่าผู้ป่วย ส่วนปัจจัยอื่นๆ รวมไปถึงระดับสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปัสสาวะ (urinary total antioxidant status) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าบุตรของผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงในปัสสาวะที่สัมพันธ์กับการเกิดนิ่วคล้ายกับผู้ป่วยโรคหัวใจ คือ ภาวะแคลเซียมสูง ภาวะซีเทรตต่ำ และมีไกลโคอะมิโนกลัยแคนในระดับที่ต่ำ คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า บุตรของผู้ป่วยโรคหัวใจมีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมในปัสสาวะที่สัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจสูงกว่าคนปกติที่มีเพศและอายุใกล้เคียงกัน แม้ความผิดปกตินั้นจะมีความรุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วยที่เป็นบิดาหรือมารดาก็ตาม (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิคของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต และกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยโรคนิ่วไต	กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม
จำนวนประชากร (คน)	28	40
อายุเฉลี่ย (mean±SD)	45.6±8.7	44.1±9.5
% เพศชาย	64.3%	46.3%
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	24.0±3.6	24.5±3.6
Urine volume (liters)	1.78±0.65	1.53±0.55
Urine pH	6.60±0.90	6.06±0.79 <sup>a</sup>
Calcium (mg/day)	5.83±0.90	4.29±0.49
Oxalate (mg/day)	43.70±4.83	11.91±1.90 <sup>a</sup>
Citrate (mg/day)	66.15±9.47	161.19±18.54 <sup>a</sup>
GAGs (mg/day)	6.27±1.11	44.82±6.27 <sup>a</sup>
Urinary protein (mg/day)	336.6±61.9	31.1±5.6 <sup>a</sup>

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูปแบบ mean + SD, ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ <sup>a</sup>  $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 (ปรับปรุงจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

**ตารางที่ 5** แสดงข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยเสี่ยงทางเมแทบอลิกของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และบุตรกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	กลุ่มที่ 3 บุตรของผู้ป่วย	กลุ่มที่ 4 บุตรกลุ่มควบคุม
จำนวนประชากร (คน)	46	34
อายุเฉลี่ย (mean±SD)	19.1±7.9	20.2±7.6
% เพศชาย	46.7%	43.8%
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	N/A	N/A
Urine volume (liters)	1.21±0.39	1.25±0.55
Urine pH	6.78±0.90	6.46±0.93
Calcium (mg/day)	3.01±0.31	1.11±0.14 <sup>b</sup>
Oxalate (mg/day)	14.70±2.59 <sup>c</sup>	14.09±2.14
Citrate (mg/day)	113.62±11.33 <sup>c</sup>	201.18±28.13 <sup>b</sup>
GAGs (mg/day)	24.55±1.55 <sup>c</sup>	46.84±4.37 <sup>b,d</sup>
Urinary protein (mg/day)	67.0±7.0 <sup>c</sup>	26.6±3.7 <sup>b</sup>

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SD, N/A คือ not applicable, <sup>b</sup>p<0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 (ภาพจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

**ตารางที่ 6** แสดงระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในปีสสาวะ และระดับโปรตีนคาร์บอนิลเฉลี่ยในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยโรคนี้วไต	กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ 3 บุตรของผู้ป่วย	กลุ่มที่ 4 บุตรกลุ่มควบคุม
Plasma protein carbonyl (nmol/mg-P)	0.065±0.009	0.053±0.008	0.039±0.005*	0.041±0.006
Urinary TAS (g/g creatinine)	0.65±0.04	0.64±0.04	0.68±0.05	0.78±0.05

\*ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SD ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \*p <0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 หมายถึง หน่วยของสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAS) ในปีสสาวะ คือ กรัม ต่อ กรัมของ creatinine (g/g Creatinine) หน่วยของ Plasma protein carbonyl คือ นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีนในพลาสมา (nmol/mg-P) (ภาพจากวิทยานิพนธ์ของนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่))

ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับโปรตีนในปีสสาวะ และปริมาณออกซาลาเตในปีสสาวะสูงกว่าประชากรปกติ ขณะที่ปริมาณซีเทรตในปีสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนต่ำกว่าประชากรปกติ เช่นเดียวกับบุตรของผู้ป่วยโรคนี้วไตที่มีระดับโปรตีนในปีสสาวะสูงกว่าบุตรของประชากรปกติ ขณะที่ปริมาณซีเทรตในปีสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนต่ำกว่าบุตรของประชากรปกติ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคนี้วไตและบุตร พบว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับแคลเซียมและออกซาลาเตซึ่งเป็นสารก่อนี้วในปีสสาวะต่ำกว่าผู้ป่วยโรคนี้วไต แต่มีระดับซีเทรตในปีสสาวะ และไกลโคอะมิโนกลัยแคนซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดนี้วสูงกว่าในส่วนของการคัดลอกออกซิเดชัน พบว่าบุตรของผู้ป่วยมีระดับโปรตีนในปีสสาวะ และผลผลิตจากความเครียดทางออกซิเดชัน ที่เรียกว่า plasma protein carbonyl ต่ำกว่าผู้ป่วย ส่วนปัจจัยอื่นๆ รวมไปถึงระดับสารต้านอนุมูลอิสระรวมในปีสสาวะ (urinary total antioxidant status) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าบุตรของผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงในปีสสาวะที่สัมพันธ์กับการเกิดนี้วคล้ายกับผู้ป่วยโรคนี้วไต คือ ภาวะแคลเซียมสูง ภาวะซีเทรตต่ำ และมีไกลโคอะมิโนกลัยแคนในระดับที่ต่ำ คณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า บุตรของผู้ป่วยโรคนี้วไตมีความผิดปกติทางเมแทบอลิกในปีสสาวะที่สัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้วสูงกว่าคนปกติที่มีเพศและอายุใกล้เคียงกัน แม้ความผิดปกตินี้จะมีอาการรุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วยที่เป็นบิดาหรือมารดาก็ตาม (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่)

## 2.9. ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะ (Proteinuria)

ภาวะโปรตีนรั่วในปัสสาวะเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคไตเรื้อรัง<sup>(33)</sup> โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคหลอดเลือดสมอง<sup>(34)</sup> โดยถือว่าเกิดความผิดปกติเมื่อโปรตีนรั่วในปัสสาวะมากกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน โปรตีนที่ตรวจพบในปัสสาวะมีที่มาจาก 2 แหล่ง ได้แก่ โปรตีนที่ถูกกรองจากเลือดผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular protein) ได้แก่ โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 60 กิโลดาลตัน จึงสามารถไหลผ่านช่องว่างโกลเมอรูลัสสู่ปัสสาวะได้ อาทิเช่น light chain immunoglobulin ส่วน albumin สามารถถูกกรองผ่านได้เพียงเล็กน้อย และโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์บุผิวหลอดไต (tubular protein) อาทิเช่น Tamm-Horsfall protein (THP), เอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ เช่น N-acetyl glucosaminidase (NAG) เป็นต้น ในภาวะปกติตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะเฉลี่ย 40-80 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนใหญ่เป็นชนิด THP ซึ่งหลั่งจากเซลล์ท่อไตส่วน thick ascending limb of Henle's loop ร้อยละ 40 เป็นโปรตีนชนิดอัลบูมินร้อยละ 20 - 40 โปรตีนชนิดอิมมูโนโกลบูลินและโปรตีนขนาดเล็กอื่นๆ ซึ่งหลั่งจากเซลล์เยื่อของทางเดินปัสสาวะร้อยละ 15<sup>(35)</sup>

## 2.10. กลไกการเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะ

การเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะแบ่งออกเป็น 3 กลไกหลัก<sup>(36-38)</sup> คือ

1) การเพิ่มอัตราการกรองของไต และ/หรือมีการเปลี่ยนแปลงของผนังโกลเมอรูลัส ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมและป้องกันโปรตีนรั่วจากกระแสโลหิต โดยผนังของโกลเมอรูลัสประกอบด้วย 3 ชั้น<sup>(39)</sup> คือ

1. เซลล์ endothelium เป็นส่วนของผนังชั้นในสุดของโกลเมอรูลัสสัมผัสกับเลือดโดยตรง เซลล์มีรูพรุนที่เรียกว่า fenestrae ช่วยป้องกันสารโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 60-80 นาโนเมตรไม่ให้กรองผ่านเซลล์ไปได้ และสร้างสาร endothelial glycoproteins และ proteoglycans ที่มีประจุลบไปสะสมที่ glomerular basement membrane จึงช่วยป้องกันโปรตีนที่มีประจุลบ (anionic charge) เช่น อัลบูมิน ไม่ให้รั่วออกไปในปัสสาวะ เรียกว่า charge perm-selectivity

2. Glomerular basement membrane (GBM) เป็นผนังชั้นกลางที่มีความหนาประมาณ 200-400นาโนเมตร ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ 1) lamina rara interna เป็นผนังชั้นใน 2) lamina densa เป็นผนังชั้นกลางและ 3) lamina rara externa เป็นชั้นนอกสุดทำหน้าที่ยึดติดกับเซลล์ podocyte โดยGBM ประกอบด้วย collagen type IV ชนิด alpha 3, 4, 5 และ alpha 1, 2, 1 สานกันเป็นร่างแห และ GAG ที่สร้างจาก endothelial cells และ podocyte ซึ่งมีประจุลบจำนวนมาก

มาก (GAG ชนิดที่พบมากที่สุดบริเวณนี้ ได้แก่ heparan sulfate) จึงช่วยป้องกันโปรตีนที่มีประจุลบเช่น อัลบูมิน ไม่ให้รั่วออกไปในปัสสาวะ เรียกว่า charge perm-selectivity ทำให้เกิดช่องขนาด 50-60 นาโนเมตร ที่ช่วยป้องกันโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะได้

3. เซลล์ podocyte เป็นเซลล์พิเศษที่พบเฉพาะที่โกลเมอรูลัสเท่านั้น มีไซโตพลาสซึมยื่นออกไปจนยาวกว่าตัวเซลล์ เรียกว่า foot process ซึ่งจะสอดประสานกันเป็นร่างแห และเกิดช่องว่างระหว่าง foot process เรียกว่า slit diaphragm ที่มีขนาดเล็กมากๆ และมีโปรตีนหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ เช่น nephrin, NEPH1 และ NEPH2 ทำหน้าที่ป้องกันการรั่วของสารที่มีขนาดใหญ่กว่า slit diaphragm ที่เรียกว่า size perm-selectivity

การเพิ่มอัตราการกรองของโกลเมอรูลัสเกิดจากความผิดปกติขององค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง หรือมากกว่าทำให้สารที่มีขนาดใหญ่ หรือโปรตีนที่มีประจุลบ อย่างเช่น อัลบูมิน สามารถถูกกรองออกไปยังปัสสาวะได้มากกว่าปกติ ดังนั้น ภาวะ glomerular proteinuria จึงมักจะตรวจพบ plasma protein โดยเฉพาะอัลบูมินในปัสสาวะมากที่สุด

2) Overflow proteinuria ในภาวะปกติโปรตีนที่ถูกกรองทางโกลเมอรูลัสจะถูกดูดกลับเข้าสู่เซลล์บุหลอดไตส่วนต้นบางส่วน แต่ถ้าโปรตีนที่รั่วออกมาทางปัสสาวะเป็นโปรตีนผิดปกติที่ไม่สามารถถูกดูดกลับได้ หรือมากเกินไปจะดูดกลับได้ เช่น light chain immunoglobulin ในโรค multiple myeloma, lysozyme ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myelomonocytic leukemia (AML) myoglobin จากภาวะ rhabdomyolysis หรือ hemoglobin จากภาวะ intravascular hemolysis จะถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัสอย่างอิสระผ่านมายังท่อไตส่วนต้น

3) Tubular proteinuria เกิดจากความผิดปกติเซลล์ท่อไตที่ไม่สามารถดูดกลับโปรตีน และกรดอะมิโนซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กซึ่งอาจเป็นผลจากการบาดเจ็บของเซลล์บุหลอดไตทำให้เซลล์ตาย เป็นผลให้ไม่สามารถดูดโปรตีนกลับ หรือทำให้โปรตีนตัวกลางการอักเสบและโปรตีนที่สะสมในเซลล์หลั่งออกมาในปัสสาวะ โดยพบในภาวะ acute tubular necrosis, acute interstitial nephritis, chronic tubulointerstitial nephritis และความดันโลหิตสูง ผู้ป่วยบางรายอาจพบความผิดปกติของท่อไตส่วนต้นในการดูดกลับสารอื่นๆ ร่วมด้วย เรียกว่า Fanconi syndrome ซึ่งมีความผิดปกติของ transport proteins หลายชนิด ทำให้ตรวจพบ glycosuria, phosphaturia, uricosuria และ bicarbonaturia<sup>(40)</sup> นอกจากนี้บางภาวะมีการสร้างโปรตีนชนิด Tamm-Horsfall glycoprotein จากเซลล์ท่อไตส่วน thick ascending limb of Henle's loop และ distal tubules จับกับโปรตีน



ชนิด light chain จำนวนมากจาก multiple myeloma เกิดการตกตะกอนในท่อปัสสาวะเป็น myeloma cast nephropathy ได้สภาวะนี้มักตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะน้อยกว่า 1-2 กรัมต่อวัน<sup>(41)</sup>

### 2.11. อัลบูมินรั่วในปัสสาวะ (albuminuria)

โปรตีนอัลบูมินเป็นโปรตีนหลักในเลือดมีประมาณ 60-65% ของโปรตีนทั้งหมด มีหน้าที่ในการสร้างและซ่อมแซมส่วนต่างๆ ของร่างกาย รักษา osmotic pressure ของเลือด ขนส่งสารต่าง ๆ ในเลือด มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ต่อสู้กับการติดเชื้อ โปรตีนอัลบูมินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,000 ดาลตัน ถูกสร้างขึ้นในตับซึ่งจะถูกเรียกว่า พร็โพรอัลบูมิน (preproalbumin) หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นพรอัลบูมิน (proalbumin) โดยสายเปปไทด์ทางด้านปลาย N จะถูกตัดออกก่อนที่จะถูกหลั่งออกจากร่างแหเอนโดพลาซิมซุซระ (rough endoplasmic reticulum: RER) เมื่อเข้าสู่กอลจิแอปพาราตัสจะถูกตัดสายเปปไทด์อีกครั้งได้เป็นอัลบูมินหลั่งออกมาในเลือด

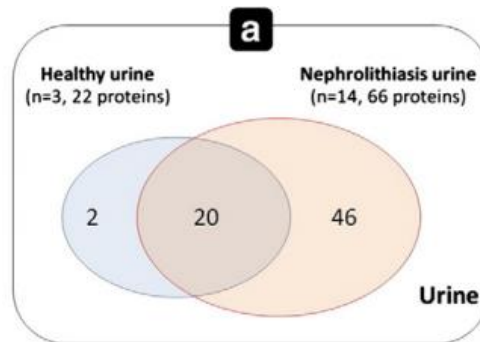
โดยปกติแล้วไตจะมีผนังโกลเมอรูลัสช่วยในการกรองโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ไม่เกิน 60,000 ดาลตัน ดังนั้นโปรตีนอัลบูมินจึงถูกพบกรองผ่านผนังโกลเมอรูลัสออกสู่ปัสสาวะปริมาณเล็กน้อยประมาณ 2-30 มิลลิกรัมต่อวัน แต่ถ้าหากมีการกรองโปรตีนอัลบูมินในระดับที่สูงขึ้นกว่าระดับปกติคือ อยู่ในช่วง 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน แสดงว่าเกิด ภาวะไมโครอัลบูมินยูเรีย (Microalbuminuria) เกิดขึ้น และ ถ้าระดับของโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะถูกตรวจพบมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน จะจัดว่าเป็น ภาวะแมโครอัลบูมินยูเรีย (Macroalbuminuria)<sup>(42, 43)</sup>

ภาวะอัลบูมินรั่ว (albuminuria) หมายถึง ภาวะที่มีโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน และ โปรตีนที่รั่วออกมาส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (มากกว่า 150 mg/day) สาเหตุของภาวะโปรตีนอัลบูมินรั่วในปัสสาวะสามารถเกิดได้จากทั้งโรคของโกลเมอรูลัสคือเป็น glomerular proteinuria และ การบาดเจ็บของท่อไตส่วนต้นเป็น tubular proteinuria ทำให้ไม่สามารถดูดกลับโปรตีนที่ออกมาได้ อย่างไรก็ตามภาวะอัลบูมินยูเรียที่ไม่เกี่ยวกับภาวะไตเสื่อมหน้าที่ อาจเกิดจากสาเหตุอื่น ได้ เช่น ภาวะไข้สูง ปัสสาวะมีเม็ดเลือดแดงปน การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ขณะมีประจำเดือน มีตกขาว การตั้งครรภ์ ภาวะหัวใจวาย การออกกำลังกายอย่างหนักและมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร<sup>(44)</sup>

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ภาวะ proteinuria เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการพยากรณ์ ความคืบหน้า (progression) ของโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงความคืบหน้าของโรคไตจาก เบาหวาน โดยพบว่าโรคไตจากเบาหวานเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย ซึ่งเป็นผล มาจากการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึม ของน้ำตาลกลูโคสในร่างกายนำไปสู่พยาธิสภาพในหลอดเลือดขนาดเล็กลงตามมา การเกิดพยาธิสภาพทางไตเริ่มจากอัตราการกรอง และขนาดไตเพิ่มขึ้น เรียกว่า glomerular hyperfiltration และ glomerular hypertrophy การหนาตัวของ glomerular basement membrane (GBM) การสะสมของ mesangial matrix และสุดท้ายเกิด glomerulosclerosis ส่วนใหญ่อาการทางคลินิกของโรคไตจากเบาหวานเกิดหลังจากวินิจฉัยว่าเป็น เบาหวานแล้วมากกว่า 10 ปี อาการทางคลินิกตรวจพบระยะแรก คือ microalbuminuria (microalbuminuria หมายถึง ตรวจพบค่า urinary albumin/creatinine ratio 30-300 มก./กรัม ของ creatinine) หรือเรียกว่า incipient stage ต่อมาเกิด macroalbuminuria (macroalbuminuria หมายถึง ตรวจพบค่า urinary albumin/creatinine ratio มากกว่า 300 มก./กรัม ของ creatinine) หรือเรียกว่า overt nephropathy มีการทำงานของไตเสื่อมลงแล้ว นำไปสู่ไตเรื้อรังระยะสุดท้ายในที่สุด<sup>(45, 46)</sup>

## 2.12. ตัวอย่างการศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในปัสสาวะ

วิธีการทางโปรตีนโอมิกส์ และ Western blot ได้ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคนี้ ไตมากมาย อาทิเช่น การศึกษาปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตในประเทศไทย โดย ผศ.ดร.ชาญชัย บุญ หล้า และ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ และคณะ พบว่าโปรตีนที่พบในปัสสาวะนั้นมีทั้งหมด 66 ชนิด จาก ผู้ป่วย 14 ราย ส่วนในปัสสาวะของคนปกตินั้นจะพบเพียง 22 ชนิด จากผู้ป่วย 3 ราย ซึ่งจะมีโปรตีน อยู่ 20 ชนิดที่พบทั้งในผู้ป่วยและคนปกติ<sup>(47)</sup> (ดังแสดงข้อมูลในกราฟภาพที่ 4 และ ตารางที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงจำนวนของโปรตีนที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต คนปกติ และที่พบในปัสสาวะของทั้งผู้ป่วยโรคนิ่วไต และ คนปกติ (ภาพจาก Boonla C, 2014)

ตารางที่ 7 โปรตีนที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (14 ราย) คนปกติ (3 ราย) และที่พบในปัสสาวะของทั้งผู้ป่วยโรคนิ่วไต และ คนปกติ

No.	IPI no.	Protein name	Freq. (n = 17)	Avg. score	Avg. #UqP	Avg. SC(%)
<b>Proteins found in both nephrolithiasis and healthy urines</b>						
1	IPI00216773, IPI00745872, IPI00384697, IPI00022434	Serum Albumin	17	3064	23	42.4
2	IPI00022426	AMBIP Protein	17	339	6	17.6
3	IPI00784885, IPI00845354, IPI00419424, IPI00430820, IPI00440577, IPI00784430, IPI00026197	Ig kappa chain (IGKC, V1-5)	17	740	4	48.6
4	IPI00386879, IPI00166866, IPI00061977, IPI00430842, IPI00448925, IPI00423463, IPI00784807, IPI00399007, IPI00827754, IPI00829940, IPI00550640, IPI00168728, IPI00816681, IPI00472610, IPI00477090, IPI00549291, IPI00761159, IPI00816314, IPI00418153, IPI00784842, IPI00783287, IPI00827627, IPI00827892, IPI00827892, IPI00829806, IPI00748998	Ig heavy chains (IGHA1, G1, G2, G2, G4, M, V)	16	1266	11	56.5
5	IPI00553177, IPI00305457, IPI00550991	Alpha-1-antitrypsin	16	260	4	13.5
6	IPI00382455, IPI00382480, IPI00382489, IPI00382478, IPI00382474, IPI00387024, IPI00387025, IPI00387026, IPI00003469, IPI00387110, IPI00387113, IPI00385252, IPI00387115, IPI00387120, IPI00382440	Putative Ig chains: heavy, kappa, lambda	15	241	3	47.0
7	IPI00013945, IPI00744076	Uromodulin	14	478	7	10.5
8	IPI00154742, IPI00719373, IPI00154742, IPI00382938	Ig lambda chain (IGL)	13	131	2	15.2
9	IPI00013179	Prostaglandin-H2 D-isomerase	13	129	2	13.0
10	IPI00166729	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc	12	177	4	16.2
<b>Proteins found only in nephrolithiasis urine</b>						
1	IPI00384952, IPI00784758, IPI00887739, IPI00426051, IPI00888191, IPI00736885, IPI00887113, IPI00739464, IPI00886843, IPI00739237, IPI00909837, IPI00787362,	Hypothetical proteins	12	432	4	36.7
2	IPI00022488	Hemopexin	12	94	2	4.17
3	IPI00007047	S100A8	11	151	2	22.3
4	IPI00022463	Serotransferrin	10	606	9	16.1
5	IPI00431645, IPI00478493, IPI00641737, IPI00477597	Haptoglobin and Haptoglobin-related proteins	9	145	3	11.4
6	IPI00299547	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	9	127	3	16.8
7	IPI00019038	Lysozyme C	8	95	2	16.7
8	IPI00216914	Vitellogenesis membrane outer layer protein 1 homolog	8	74	2	7.06
9	IPI00878729, IPI00478003, IPI00419215	Alpha-2-macroglobulin	7	82	2	0.9
10	IPI00022420	Retinol-binding protein 4	6	128	2	10.1
<b>Proteins found only in healthy urine</b>						
1	IPI00301143	Peptidase inhibitor 16	3	87	2	3.00
2	IPI00176427	Cell adhesion molecule 4	2	89	2	7.5

Freq.: Frequency, Avg.: Average, #UqP: Number of unique peptides, SC: Sequence coverage.

(ตารางจาก Boonla C, 2014)

ซึ่งจากการศึกษาพบว่า จะพบโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยนิ่วไตที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ กลุ่ม Inflammatory protein และ fibrotic-associated proteins

### 2.13. เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์

โปรตีโอมิกส์เป็นการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนในตัวอย่างทางชีวภาพที่ซับซ้อน ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจในธรรมชาติความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้น วิธีการดังกล่าวสามารถใช้ศึกษาโปรตีนได้คราวละจำนวนมาก ๆ และมีความสามารถสูงในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ช่วยในการตรวจพบ ระบุชนิด และหน้าที่ของโปรตีโอม (โปรตีนทั้งหมดที่มีในรหัสพันธุกรรม) นอกจากนี้โปรตีโอมิกส์ยังประกอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ post-translational modifications และเทคนิคสำหรับการเปรียบเทียบทางเชิงปริมาณของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย<sup>(48)</sup>

โปรตีโอมิกส์จะอธิบายถึงการศึกษาและคุณสมบัติของโปรตีนในเซลล์ อวัยวะ หรือ สิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปโปรตีโอมิกส์จะใช้สำหรับ (1) ทำ proteome profiling (2) วิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่สองตัวอย่างขึ้นไป (3) ศึกษาตำแหน่งของโปรตีน (localization) และตรวจสอบกระบวนการ post-translational modification และ (4) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) การใช้เทคโนโลยีใหม่ในการวิเคราะห์ส่วนผสมทางชีวภาพที่ซับซ้อน สามารถหาปริมาณสปีชีส์ของโปรตีนที่แยกออกมาได้ มีความไวเพียงพอต่อโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำได้ สามารถวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจำนวนมากได้ ในแต่ละครั้ง สามารถวิเคราะห์โปรตีนเชิงซ้อนได้ และมีการประยุกต์ใช้เป็นวิธีการแบบ high throughput ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อการวินิจฉัยการพยากรณ์และติดตามการรักษาโรค<sup>(49)</sup> การศึกษาด้านโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนมีความสำคัญต่อการพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เชิงประยุกต์และทางการแพทย์ สำหรับเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ที่มีความสำคัญและนิยมใช้ศึกษาอย่างแพร่หลาย ได้แก่ one dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE), two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และ mass spectrometry (MS)<sup>(50)</sup>

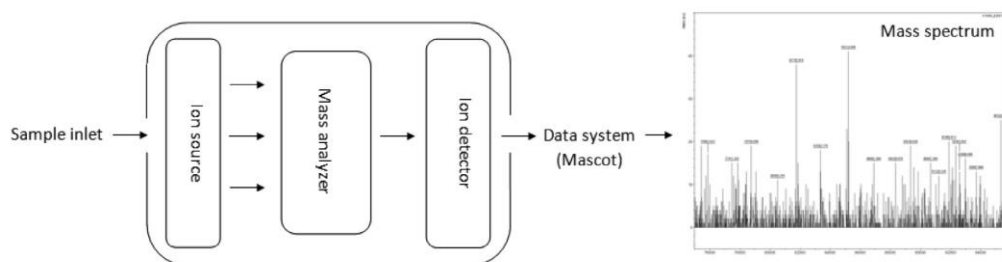
การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิค MS ที่มีประสิทธิภาพนั้น ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอนนอกจากการเตรียมสารตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนการแยกโปรตีนก่อนการตรวจวิเคราะห์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากเช่นกัน ซึ่งมี 2 วิธีหลักที่นิยมใช้ในงานวิจัย คือ วิธี gel-based และวิธี gel free โดยความแตกต่างระหว่าง 2 วิธี<sup>(51)</sup> มีรายละเอียด ดังนี้

1. Gel based เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนรวม อาศัยการแยกโปรตีนเบื้องต้นด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่น 1D-PAGE และ 2D-PAGE ซึ่งโปรตีนจะถูกแยกตาม

ขนาดและค่า isoelectric point (pI) เป็นต้น จากนั้นทำการย่อยโปรตีน แล้วเลือกตัดจุดโปรตีนที่ต้องการออกจากเจล ไปทำการศึกษา โดยโปรตีนที่ตัดแยกได้จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ได้เป็นสายเปปไทด์สั้นๆ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS วิธีนี้เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีความซับซ้อนสูง (high complexity) และตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนมาก ซึ่งจำเป็นต้องแยกโปรตีนด้วยเจลก่อนการวิเคราะห์เสมอ

2. Gel free เป็นทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์โปรตีนโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกโปรตีนด้วยเจลก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS ซึ่งมีข้อดีคือ ลดขั้นตอนและระยะเวลาได้ค่อนข้างมาก สามารถนำตัวอย่างที่อยู่ในสภาวะของเหลวมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินได้เป็นสายเปปไทด์ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS ได้ทันที โดยมากนิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ซึ่งมีการแยกสายเปปไทด์ด้วยเทคนิค liquid chromatography ก่อนการวิเคราะห์ mass- spectrometry

แมสสเปกโตรเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ<sup>(52)</sup> เช่น การระบุชนิดและขนาดโปรตีน การทำนายลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยอาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ที่จำเพาะของตัวอย่างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกทำให้เกิดประจุ โดยสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าช่องเติมสารตัวอย่างเข้าเครื่อง (sample inlet) แล้วทำให้แตกตัวเป็นประจุในส่วนผลิตไอออน (ion source) ประจุที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) เพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัด (ion detector) แล้วส่งสัญญาณไปยังส่วนประมวลผล (data system) ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลโปรตีน<sup>(53)</sup> (ภาพที่ 5) เทคนิคนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงและมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สามารถทำการศึกษาซ้ำได้ (high reproducibility) สามารถแยกโปรตีนได้ดี (high resolution) และทราบชนิดของโปรตีนคราวละจำนวนมาก (high throughput) จึงเป็นที่สนใจสำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย สำหรับเทคนิค MS ที่นิยมใช้ในงานวิจัยปัจจุบัน มี 2 เทคนิค คือ liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) และ matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)



ภาพที่ 5 องค์ประกอบของเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี เปปไทด์ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่เครื่อง ตัวอย่างจะเกิด ionization แล้ว ions จะถูกคัดเลือกและตรวจจับด้วยเครื่อง mass spectrometer จากนั้นจะอ่านค่าตาม mass/charge ( $m/z$ ) ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม mascot (ที่มา: ภาพมาจาก Aebersold R, 2003)

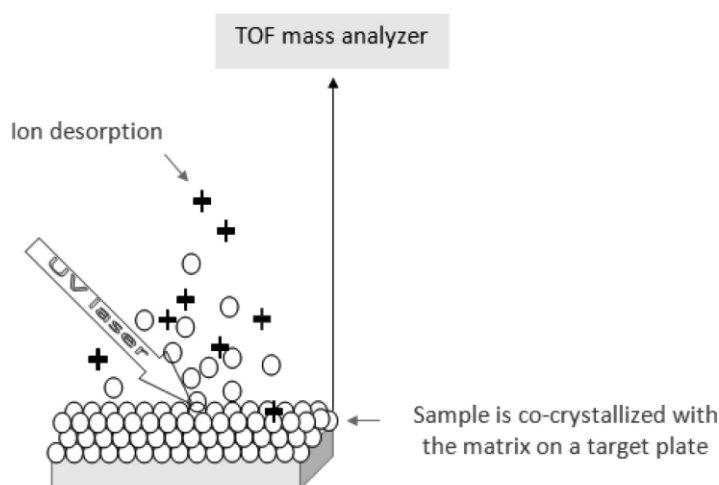
#### 1.1. เทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

LC-MS คือ การแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และมีการเกิด ion source แบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธี MS โดยมวลสารจะถูกตรวจวัดในส่วน mass analyzer นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถเปรียบเทียบในเชิงปริมาณได้ จึงมีประโยชน์ในด้านการเปรียบเทียบการแสดงออกโปรตีนในสถานะที่แตกต่างกัน เช่น ในคนปกติและผู้ป่วย<sup>(54)</sup> LC-MS เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะสูงปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ ในการศึกษาโปรตีนได้ใน 2 รูปแบบคือ label technique และ label free technique

#### 1.2. เทคนิค Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS คือ การทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนก่อนการวิเคราะห์ โดยผสมสารตัวอย่างกับสารเมทริกซ์ (matrix) ได้แก่  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) และ 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็นต้น สารดังกล่าวมีส่วนประกอบของกรดหรือด่างจะทำให้ตัวอย่างมีประจุ จากนั้นสารผสมจะถูกนำไปหยดลงบนแผ่นโลหะ (MALDI plate) ซึ่งจะทำให้ส่วนผสมระเหยกลายเป็นผลึกเมื่อสารเมทริกซ์ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุและแตกตัวเป็นไอออน ทำให้โปรตีนหรือเปปไทด์สามารถเคลื่อนที่ได้และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time-of-

flight (TOF) ซึ่งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมาก จึงเดินทางไปยังตัวรับ (detector) ได้เร็วกว่า ทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดมวลสารได้ (ภาพที่ 6) เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค LC-MS แต่ถูกจำกัดด้วยปริมาณของตัวอย่างในการศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งได้ เช่น โคลโลยีของเชื้อและชิ้นเนื้อเป็นต้น ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้หลากหลาย



**ภาพที่ 6** หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS เปปไทด์ตัวอย่างจะถูกผสมกับ matrix ที่เหมาะสม แล้วตรึงบน mass plate ที่จำเพาะ จากนั้นแสงเลเซอร์จะกระตุ้นให้เกิด ions เพื่อส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer (ที่มา: ภาพจาก Aebersold R, 2003)

การประยุกต์ใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีในงานวิจัยทางการแพทย์

1. การระบุชนิดและขนาดโปรตีน (protein identification) แบ่งเป็น 3 วิธีหลัก ดังนี้

1.1. Peptide mass fingerprints (PMF)

ตัวอย่างโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยโปรตีนจะถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิด เรียกลักษณะนี้ว่า peptide mass fingerprint (PMF) ดังนั้นขนาดเปปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีจึงมีความจำเพาะในโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อนำข้อมูลที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) จึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้<sup>(55)</sup>

### 1.2. MS/MS ion search

การระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกสามารถบอกขนาดมวลของสายเปปไทด์ทั้งหมด และทำการแตกตัวเปปไทด์แต่ละสายด้วยการวิเคราะห์ครั้งที่สอง ซึ่งจะทำให้ทราบขนาดมวลของเปปไทด์แต่ละสาย แล้วนำข้อมูลทั้งหมดเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนจึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถูกต้องและจำเพาะมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธี PMF

### 1.3. De novo peptide sequencing

เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ยังไม่ทราบลำดับกรดอะมิโนหรือยังไม่มีในฐานข้อมูลโปรตีน ซึ่งจะสามารถบอกองค์ประกอบของโปรตีนได้จากเปปไทด์ขนาดต่างๆ กันและทำนายชนิดกรดอะมิโนในสายเปปไทด์แต่ละสายได้ด้วยการวิเคราะห์แบบ MS/MS ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเฉพาะ เช่น โปรแกรม PepNovo

## 2. การค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ

ปัจจุบันมีหลายการศึกษาพยายามค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพในโรคต่างๆ ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษากลไกการเกิดโรคการวินิจฉัยและเป็นแนวทางในการรักษาโรคได้

การติดตาม multiplex peptide ด้วย stable isotope dimethyl สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณทางโปรตีโอมิกส์

การวิเคราะห์ปริมาณของระดับโปรตีนในระบบทางชีวภาพเป็นส่วนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเพิ่มขึ้นในงานวิจัยทางโปรตีโอมิกส์ การ Incorporate ของ stables isotopes ที่แตกต่างกันในตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเชิงปริมาณของโปรตีนได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง การ Incorporate ของ stables isotopes ที่ระดับ peptide โดยใช้ในการติดตาม dimethyl เป็นกระบวนการที่มีความน่าเชื่อถือ มีประสิทธิภาพสูง และเป็นวิธีการทางโปรตีโอมิกส์แบบ high-throughput แม้ว่าจะมีทางเลือกสำหรับการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณที่หลากหลาย เช่น การติดตาม isotope ที่ระดับสิ่งมีชีวิต (stable isotope labeling by amino acids in cell culture: SILAC) หรือ Isobaric tagging for relative and absolute quantification (iTRAQ) แต่สำหรับการติดตาม isotope dimethyl นั้นมีข้อได้เปรียบ คือ ใช้ reagent ที่ราคาไม่แพงและใช้ได้กับแทบ



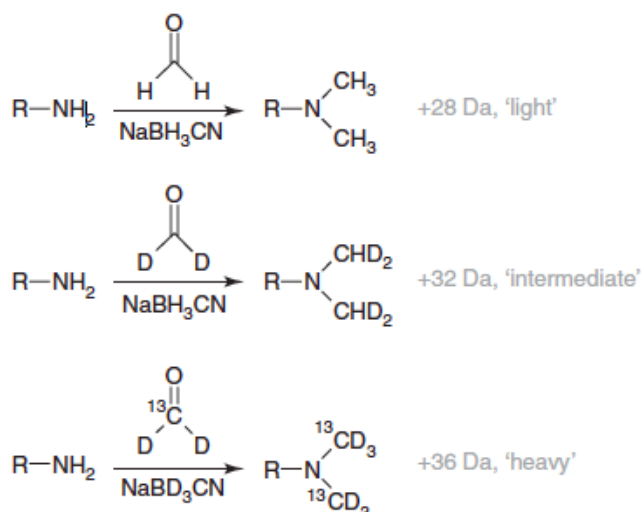
จะทุกตัวอย่าง สำหรับการติดตามด้วย stable isotope dimethyl สามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่มีระดับน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ถึง ระดับมิลลิกรัม ขั้นตอนการติดตามใช้เวลาประมาณ 60-90 นาที โดยที่ขั้นตอนทั้งหมดรวมทั้งกระบวนการย่อยเจล วิธีการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส และการวิเคราะห์ด้วย Liquid chromatography–mass spectrometry ด้วย

การวิเคราะห์เชิงปริมาณทางโปรตีโอมิกส์โดยใช้การติดตามด้วย isotope ที่แตกต่างกันเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเปรียบเทียบและการวิเคราะห์เชิงปริมาณระดับโปรตีน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การติดตามโดยใช้ไอโซโทปที่แตกต่างกัน สำหรับวิธีนี้การติดตามโปรตีนหรือเปปไทด์จากตัวอย่างที่แตกต่างจะใช้สารประกอบที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่เหมือนกันแต่แต่ละสารประกอบนั้นจะมีองค์ประกอบของ stable isotope ที่ไม่ซ้ำกันเป็นผลให้มีมวลที่แตกต่างกัน การ incorporate isotope สามารถสร้างดำเนินการได้ทั้งในระดับโปรตีนหรือเปปไทด์โดยใช้สาร isotope ตัวอย่าง เช่น  $^2\text{H}$   $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  หรือ  $^{18}\text{O}$  ซึ่งจัดเป็น heavy isotopes

การติดตาม stable isotope dimethyl โปรตีนตัวอย่างที่ใช้ติดตามจะต้องถูกย่อยด้วย เอนไซม์ โปรตีเอส เช่น เอนไซม์ทริปซิน สำหรับเปปไทด์ที่ได้มาจากตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกติดตามด้วย isotope dimethyl ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่ได้รับการติดตามแล้วจากตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกรวมเข้าด้วยกันและสามารถวิเคราะห์โดย LC-MS ไปพร้อม ๆ กันได้ เนื่องจากมวลที่ต่างกันของการติดตามด้วย isotope dimethyl ทำให้สามารถเปรียบเทียบเปปไทด์ที่มาจากตัวอย่างต่างกันได้ การติดตามด้วย stable isotope dimethyl เกิดจากการรีดิวซ์ของ primary amine ของเปปไทด์ด้วย formaldehyde เพื่อสร้าง schiff base และเติม cyanoborohydride เพื่อช่วยให้การรีดิวซ์เร็วขึ้นและปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีที่สุดในช่วง pH 5.0-8.5 วิธีนี้มักจะนิยมใช้การติดตามด้วย 3 stable isotope ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) ได้แก่ 1) การติดตามด้วย light isotope การจับกันของ formaldehyde และ cyanoborohydride กับเปปไทด์ทำให้มวลของเปปไทด์เพิ่มขึ้น 28 ดาลตัน ต่อ primary amine ในหนึ่งเปปไทด์ 2) การติดตามด้วย Intermediate หรือ medium isotope โดยใช้ deuterated formaldehyde ทำให้มีมวลเพิ่มขึ้น 32 ดาลตัน ต่อ primary amine ในหนึ่งเปปไทด์ และ 3) การติดตามด้วย heavy isotope ซึ่งทำให้มวลของเปปไทด์เพิ่มขึ้น 36 ดาลตัน มาจากการจับกันของ primary amine ของเปปไทด์กับ deuterated และ  $^{13}\text{C}$ -labeled formaldehyde ด้วย cyanoborodeuteride การติดตามด้วยวิธีนี้สามารถใช้ติดตามตัวอย่างที่

แตกต่างกันได้ถึง 3 ตัวอย่างและสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย LC-MS ไปพร้อม ๆ กันทั้ง 3 ตัวอย่างได้

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าการติดฉลาก stable isotope dimethyl เป็นการติดฉลากในระดับเปปไทด์ เมื่อโปรตีนตัวอย่างผ่านกระบวนการ In gel digestion แล้วจะได้ peptides ที่สามารถติดฉลาก stable isotope เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณโดย LC-MS ต่อไป โดยการติดฉลาก stable isotope จะติดฉลากได้ทั้งทางด้านปลาย N ของเปปไทด์ และที่ตำแหน่งกรดไลซีนของเปปไทด์ สำหรับเอนไซม์ที่ใช้อยู่โปรตีนนั้นสามารถใช้เอนไซม์ที่หลากหลาย เช่น trypsin Lys-C Lys-N Arg-C และ V8 โดยปกติแล้ววิธีการทางโปรตีโอมิกส์นั้นมักจะนิยมใช้เอนไซม์ทริปซินเป็นส่วนใหญ่ โดยเอนไซม์นี้จะย่อยเปปไทด์ทางด้านปลาย C ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน และอาร์จินีน ดังนั้นเมื่อติดฉลากเปปไทด์ที่ถูกย่อยด้วยทริปซินจะทำให้เปปไทด์มีมวลแตกต่างกัน 4 ดาลตัน (เมื่อย่อยหลังตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนจะสามารถติดฉลากได้เพียงทางด้านปลาย N อย่างเดียว) หรือ 8 ดาลตัน (เมื่อย่อยหลังตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีนจะสามารถติดฉลากได้ทั้งทางด้านปลาย N และ ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน) โดยการติดฉลากระหว่าง light isotope กับ medium isotope หรือ ระหว่าง medium isotope กับ heavy isotope<sup>(56)</sup>



ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบการติดฉลากของ stable isotope dimethyl ทั้ง 3 ชนิด คือ light intermediate และ heavy isotope

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1. ระเบียบวิธีงานวิจัย (Research methodology)

##### ประชากรในการศึกษา

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยเรื่อง หัวข้อ “การเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวไตระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิวไต บุตรของคนปกติ และบิดามารดา” ของ นายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ ซึ่งแบ่งประชากรออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ดังนี้

##### 1. ประชากรเป้าหมาย (target population)

กลุ่มประชากรตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือผู้ป่วยโรคนิวไตที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ บุตรของผู้ป่วยโรคนิวไตที่เข้าร่วมโครงการวิจัยซึ่งไม่ป่วยเป็นโรคนิวไต การคัดเลือกประชากรตัวอย่างเข้าโครงการวิจัยนั้น ทั้งผู้ป่วย (บิดาหรือมารดา) และบุตรจำเป็นต้องยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยร่วมกันด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัยและมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้านรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

##### 2. ประชากรควบคุม (control population)

ประชากรควบคุมแบ่งเป็น 2 กลุ่มเช่นกัน คือ กลุ่มควบคุมผู้ใหญ่ ได้แก่ ประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคนิวไต มีอายุและเพศใกล้เคียงกับประชากรตัวอย่างผู้ป่วย (gender- and age-matched) และมีที่พักอาศัยอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย เพื่อลดความแตกต่างของปัจจัยรบกวน อาทิเช่น สภาพภูมิอากาศ รูปแบบอาหารพื้นบ้านอาชีพ เป็นต้น กลุ่มที่ 2 คือ บุตรของกลุ่มควบคุมผู้ใหญ่ซึ่งไม่ป่วยเป็นโรคนิวไตเช่นกัน การคัดเลือกประชากรควบคุมเข้าโครงการวิจัยนั้น ทั้งบิดามารดาและบุตร จำเป็นต้องยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยร่วมกัน

#### 3.2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากผลงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยของ นายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ หัวข้อ “การเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวไตระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิวไต บุตรของคนปกติ และบิดามารดา” ซึ่งในงานวิจัยดังกล่าว มีผู้เข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น 148 คน ประกอบด้วย ผู้ป่วยโรค

นิว (กลุ่มที่ 1) 28คน บุตรของผู้ป่วยโรคนิว (กลุ่มที่ 2) 46 คน คนปกติ (กลุ่มที่ 3) 40 คน และบุตรคนปกติ (กลุ่มที่ 4) 34 คน และจากผลวิจัยของคณะผู้วิจัยพบว่า ระดับโปรตีนในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิวคิดเป็น  $78.4 \pm 8.6$  มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่บุตรของคนปกติที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกันเป็น  $23.2 \pm 3.7$  มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแทนในสูตรโดยแอปพลิเคชัน N4studies ดังนี้

$$n_1 = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2 [\sigma_1^2 + \frac{\sigma_2^2}{r}]}{\Delta^2}$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, \Delta = \mu_1 - \mu_2$$

จะพบว่าจะต้องใช้ประชากรตัวอย่างอย่างน้อย 1 คนในแต่ละกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพิจารณาว่าจำนวนประชากร 1 คนไม่เหมาะสม ในการศึกษาที่ผู้วิจัยจึงพิจารณาใช้จำนวนสารชีวภาพขั้นต่ำเท่ากับงานวิจัยข้างต้น คือ 30 รายในกลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิว และอีก 30 คนในกลุ่มบุตรคนปกติ

### 3.3. สถานที่ทำการวิจัย

การเก็บสารตัวอย่าง วิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึกรวบรวม วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยโรคนิวไตและโรคระบบทางเดินปัสสาวะ ภาคชีวเคมี ชั้น 7 ห้อง 717 หน่วย System Biology ชั้น 8 ห้อง 815 อาคารแพทยพัฒน์ และห้องปฏิบัติการ proteomic ตึก อปร.ชั้น 17 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.4. การเก็บรักษาสารตัวอย่างทางชีวภาพ

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ เมื่ออาสาสมัครตอบรับเข้าร่วมโครงการ และลงลายมือชื่อในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นที่เรียบร้อยแล้ว อาสาสมัครจะได้รับอุปกรณ์การเก็บปัสสาวะ ประกอบด้วยกระบอกเพื่อเก็บปัสสาวะ และขวดพลาสติกเพื่อตวงปริมาตรปัสสาวะซึ่งมีสารยับยั้งการเติบโตเชื้อโรค (Thymol) เคลือบอยู่ การเก็บปัสสาวะกระทำที่บ้านของผู้เข้าร่วมโครงการ โดยทำการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงโดยไม่ต้องแช่ตู้เย็นหรือน้ำแข็ง (แนะนำเริ่มเก็บตั้งแต่ 8.00 น. ของวันแรกไปจนถึง 8.00 น. ของวันที่สอง) จากนั้นให้วัดปริมาตรทั้งหมด ผสมปัสสาวะเข้าด้วยกันและเก็บตัวอย่างปัสสาวะประมาณ 500 มิลลิลิตรเพื่อนำส่งคณะผู้วิจัยและทีมแพทย์พยาบาลในวันถัดไปปัสสาวะจะได้รับการปั่นเพื่อแยกเซลล์และน้ำปัสสาวะออกจากกัน จากนั้นคณะผู้วิจัยจะนำปัสสาวะเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

### 3.5. การคัดเลือกตัวอย่างปัสสาวะ

เลือกปัสสาวะจากกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไตและบุตรกลุ่มควบคุมที่ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มละ 30 คนและกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่ว 28 คน กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุ เพศ และถิ่นพักอาศัยไม่แตกต่างกันจำนวน 28 คน โดยเลือกกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุที่สอดคล้องกับกลุ่มเป้าหมาย

### 3.6. การเตรียมปัสสาวะ

ผู้วิจัยทำการแบ่งปัสสาวะแต่ละกลุ่ม (30 ตัวอย่าง) ออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยแต่ละกลุ่มย่อยมีจำนวนปัสสาวะ 10 ตัวอย่างเท่า กัน จากยัยจียาปัสสาวะทั้ง 10 ตัวอย่างมา pool รวมกัน โดยใช้จำนวนปัสสาวะของอาสาสมัครแต่ละคนคิดเป็นจำนวนปัสสาวะที่ผลิตออกมาในเวลาทีเท่าๆ กัน (ml/min) เพื่อให้แน่ใจว่าปริมาณโปรตีนในปัสสาวะดังกล่าวแสดงถึงอัตราการขับโปรตีนออกทางปัสสาวะทีเวลาเท่าๆ กันจริง และมีปริมาตรรวมประมาณ 25 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ทั้งในกลุ่มบุตรของ ผู้ป่วยโรคนี้่วและบุตรคนปกติ ทำให้ได้ pooled urine กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง จากนั้นทำการจำคู่ pooled urine ระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนี้่วและบุตรของคนปกติได้เป็น 3 คู่ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบต่อไป

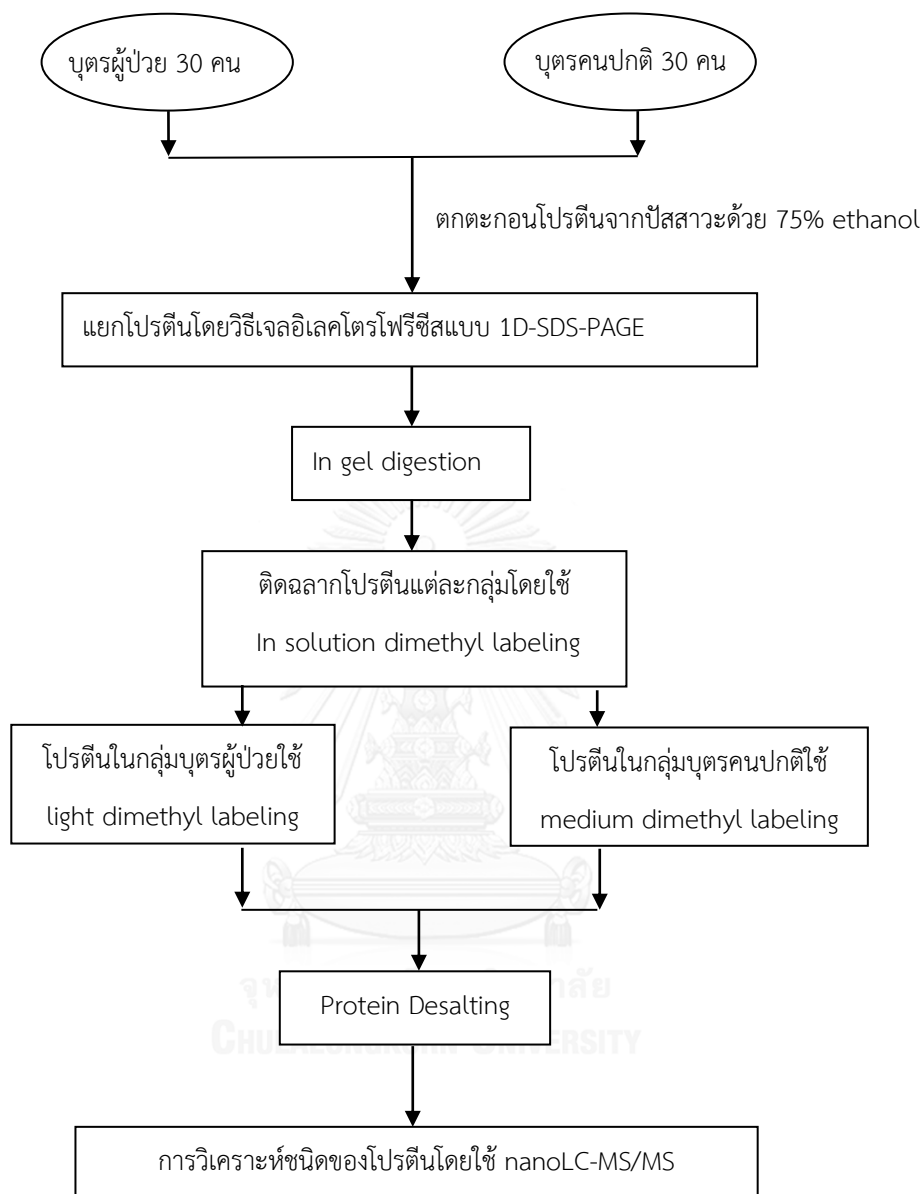
ตารางที่ 8 แสดงตัวอย่างการ pooled ปัสสาวะเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบทางโปรตีโอมิกส์

คนที่	ปริมาณปัสสาวะที่เก็บได้ใน 24 ชั่วโมง ของบุตรผู้ป่วยโรคนี้เวไต (ลิตร)		ปริมาณปัสสาวะที่เก็บได้ใน 24 ชั่วโมง ของบุตรคนปกติ (ลิตร)	
	จำนวนปัสสาวะที่ ผลิตได้ใน 1 นาที (ml/min)	ปริมาณปัสสาวะที่ นำมา pool (ml)	จำนวนปัสสาวะที่ ผลิตได้ใน 1 นาที (ml/min)	ปริมาณปัสสาวะที่ นำมา pool (ml)
1	0.33	1.64	0.39	1.88
2	0.18	0.89	0.17	0.80
3	0.48	2.38	0.29	1.41
4	0.35	1.74	0.56	2.68
5	0.66	3.27	0.56	2.68
6	0.24	1.19	0.42	2.04
7	0.72	3.57	0.83	4.02
8	0.36	1.79	0.47	2.28
9	0.78	3.87	1.10	5.30
10	0.94	4.66	0.40	1.91
รวม	-	25	-	25

### 3.7. วิธีการตกตะกอนโปรตีน

1. ตกตะกอนโปรตีนในปัสสาวะปริมาณ 1 ml ด้วย 75% ethanol (ใช้ 100% ethanol 3 ml)
2. บ่มเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 °C
3. Centrifuge 10 นาทีที่ 4 °C, 12,000xg
4. เทส่วนของ soluble ที่ทิ้งไปเก็บตะกอนโปรตีนไว้ละลายด้วย lysis buffer ประมาณ 30 µl
5. เก็บโปรตีนที่ละลายใน lysis buffer ที่ 4 °C

### 3.8. วิธีการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์



#### 3.8.1. การวัดความเข้มข้นโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธีของ Bradford

วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford ซึ่งจะใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นมาตรฐานของโปรตีน โดยจะใช้สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G250 ที่มีสีแดงออกน้ำตาล ซึ่งปกติจะมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดอยู่ที่ 465 nm แต่เมื่อมันจับกับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินที่มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดอยู่เป็น 595 nm ยังมีปริมาณโปรตีนมากที่เปลี่ยนไปก็จะยิ่งเข้มขึ้น โดยในการทดลองใช้ปริมาณของโปรตีนในปัสสาวะกลุ่มบุดรผู้ป่วยโรคนี้วัดและกลุ่มบุดรคนปกติรวมกับ DI-

water clave 100  $\mu$ l ทำปฏิกิริยากับ Bradford solution และบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

### 3.8.2. การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE

#### 10 % separating gel สำหรับปริมาตร 10 ml

DI-H <sub>2</sub> O	4.8 ml
40% acrylamide	2.5 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% Ammonium Persulfate (APS)	0.1 ml
TEMED	4 $\mu$ l

#### 4 % stacking gel สำหรับปริมาตร 5 ml

DI-H <sub>2</sub> O	3.65 ml
40% acrylamide	0.625 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.625 ml
10% SDS	0.05 ml
10% Ammonium Persulfate (APS)	0.05 ml
TEMED	5 $\mu$ l

### 3.8.3. การ digest เจลสำหรับการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry (In gel digestion)

#### การกำจัด Coomassie Stain และ SDS

1. ตัดแบนแต่ละแบนของโปรตีนจากเจลที่เลือกใส่ลงใน microtube โดยตัดเจลแต่ละเจลให้มีขนาดเล็กเท่าลูกเต๋าขนาด (~ 0.5-1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
2. ใส่ 200 ไมโครลิตร ของ 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ใน 50% ACN และ vortex ประมาณ 10 นาที เพื่อ wash เอาสีย้อมโปรตีนออกมา
3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วน supernatant ทิ้งให้เหลือแต่เจล
4. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 และ 3 ประมาณ 3-4 รอบจนกระทั่งเจลเหลือสีน้อยที่สุด



หมายเหตุ: ชี้นเจลสามารถทำได้ overnight ใน supernatant เพื่อหลีกเลี่ยงการ de-stain ที่ใช้ระยะเวลาสั้น สามารถเปลี่ยน supernatant จนกระทั่งไม่เป็นสีฟ้าและสามารถ vortex เจล แบบ overnight ได้ใน supernatant

5. ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วน supernatant ที่ใส่ 100% ACN ประมาณ 100 ไมโครลิตร หรือ จนคลุมเจลเพื่อดึงน้ำออกจากเจลอีกรอบ ที่ไว้ไม่กี่นาทีจนชี้นเจลหดตัวลงและเปลี่ยนเป็นสีขาว (สังเกตเจลที่ได้จะเป็นสีขาวขุ่นเจลหดเล็กน้อย)

6. ใช้ปิเปตดูด Acetonitrile ที่ หลังจากนั้นก็ให้นำเจลไปทำให้แห้งโดยใช้การปั่นในสุญญากาศ ประมาณ 10 นาทีจนกระทั่งเจลแห้งโดยสมบูรณ์

#### ขั้นตอนการ Reduction และ Alkylation

1. Re-hydrate เจลด้วย 60 ไมโครลิตร ของ 10 mM DTT (หรือในปริมาณที่แน่ใจว่าคลุม เจลทั้งหมด) vortex และ spin-down ในเวลาสั้น ๆ ต่อจากนั้นบ่มให้ทำปฏิกิริยาไว้ที่ 56 °C 45 นาที

2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วน supernatant ที่ แล้วใส่ 60 ไมโครลิตร ของ 55 mM iodoacetate vortex และ spin-down ในเวลาสั้น ๆ ต่อจากนั้นบ่มให้ทำปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มืด

3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วน supernatant ที่ แล้ว wash ชี้นเจลด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ใน 50% acetonitrile (ACN) แล้ว vortex 10 นาที และ spin-down (ประมาณ 2 รอบ)

4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วน supernatant ที่ ใส่ 100% ACN ประมาณ 200 ไมโครลิตร หรือ จนคลุมเจลเพื่อดึงน้ำออกจากเจลอีกรอบ ที่ไว้ไม่กี่นาทีจนชี้นเจลหดตัวลงและ เปลี่ยนเป็นสีขาว หากสังเกตเห็นว่าเจลยังมีลักษณะไม่ทึบแสงให้ ใช้ปิเปตดูด ACN ออก แล้วทำซ้ำ ขั้นตอนนี้ใหม่อีกครั้ง

5. ใช้ปิเปตดูด Acetonitrile ที่ หลังจากนั้นก็ให้นำเจลไปทำให้แห้งโดยใช้การปั่นในสุญญากาศ ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเจลแห้งโดยสมบูรณ์ หลังจากนั้นต่อด้วยขั้นตอนการย่อยด้วยทริปซินใน ขั้นตอนต่อไป

### ขั้นตอนการ Digestion

1. ใส่สารละลายทริปซิน ที่มากเกินไปให้คลุมเจลทั้งหมด ปริมาณที่ใส่จะขึ้นอยู่กับตัวอย่าง แต่โดยเฉลี่ย 25 ไมโครลิตรก็เพียงพอ

2. re-hydrate เจลด้วยทริปซินบนน้ำแข็ง หรือที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  60 นาที หลังจาก 60 นาที ดูดสารละลายทริปซินที่ไม่ถูกดูดซึมเข้าไปในเจลทิ้ง และใส่ 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ให้คลุมเจลทั้งหมด

หมายเหตุ: การบ่มควรใช้เวลาให้นานเพียงพอให้แน่ใจว่าทริปซินแทรกซึมเข้าไปในเจลอย่างสมบูรณ์ การดูดเอาทริปซินที่มากเกินไปออกจะช่วยลดการย่อยโปรตีนจากทริปซิน spin-down และ บ่มไว้ที่  $37^{\circ}\text{C}$  overnight (12-16 ชั่วโมง)

### การสกัดโปรตีนออกจากเจล

1. นำเจลที่บ่มด้วย 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  overnight ดูดสารละลายส่วน water soluble เก็บไว้ใน microtube อันใหม่ แล้วใส่ 50% acetonitrile (ACN)/Formic acid 0.1%

2. Vortex แล้วบ่มประมาณ 5 นาที แล้วดูดเอาส่วน water soluble เก็บไว้ใน microtube อันเดิมจากข้อแรก ทำซ้ำตามข้อแรกและข้อสองประมาณ 3 รอบ จนรอบสุดท้ายจะเหลือเพียงแคเจลอย่างเดียวนิ่ในหลอด

3. นำเจลในหลอดใส่ 50% ACN /Formic acid 0.1% แล้ว sonicate เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดเอาส่วน water soluble เก็บไว้ใน microtube เดิมอีกครั้ง

4. ระเหยตัวทำละลายโดยใช้การปั่นในสูญญากาศเพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีความเข้มข้นสูงพอที่จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometer

### 3.8.4. การติดฉลากเปปไทด์ของโปรตีนด้วยวิธีการ In solution dimethyl labeling

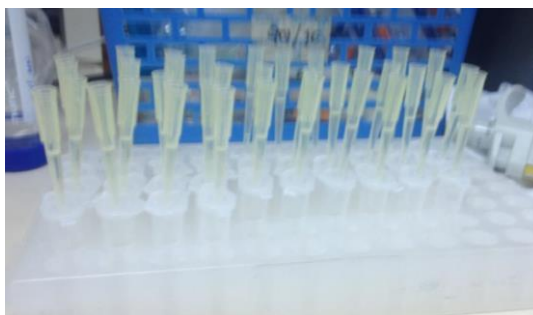
การเปลี่ยนแปลงมวลของเปปไทด์ของโปรตีนตัวอย่างเป็นผลมาจากการ combine ของ isotope-labeled formaldehyde และ cyanoborohydride เพื่อสร้างการติดฉลาก stable isotope dimethyl ให้กับเปปไทด์ของตัวอย่างที่ต่างกลุ่มกัน เพื่อใช้ในการแยกที่มาของโปรตีนที่ตรวจพบ

ตารางที่ 9 แสดงการติดฉลากสำหรับ stable light isotope dimethyl และ stable medium isotope dimethyl โดยใช้ Formaldehyde isotope และ Cyanoborohydride isotope

Label	Light	Medium
Mass increase per label	+28.0313 Da	+32.0564 Da
Formaldehyde isotope	CH <sub>2</sub> O	CD <sub>2</sub> O
Cyanoborohydride isotope	NaBH <sub>3</sub> CN	NaBH <sub>3</sub> CN

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยใช้ stable light isotope dimethyl สำหรับการติดฉลากโปรตีนในกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ัวไต และ stable medium isotope dimethyl สำหรับการติดฉลากโปรตีนในกลุ่มบุตรคนปกติ

1. สร้างตัวอย่างขึ้นใหม่โดยใช้ (ประมาณ 500 ไมโครกรัม) 100 ไมโครลิตร ของ 100 mM TEAB (\*ตัวอย่างควรปราศจากจาก amine ไต ๆ เช่น tris และค่า pH ควรอยู่ในช่วงประมาณ 5-8.5)
  2. เติม 4  $\mu$ l ของ 4% (vol/vol) ของ formaldehyde isotope สำหรับการติดฉลากด้วย stable light isotope dimethyl และ stable medium isotope dimethyl ตามตารางที่ 7 ต่อจากนั้น mix และ spin down (\*ควรทำในตู้ดูดควัน)
  3. เติม 4  $\mu$ l ของ 0.6 M NaBH<sub>3</sub>CN ในตัวอย่างที่ติดฉลากเปปไทด์ด้วย stable light isotope dimethyl และ stable medium isotope dimethyl
  4. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควัน 1 ชั่วโมง
  5. หยุดการติดฉลาก โดยเติม 16  $\mu$ l ของ 1% (vol/vol) ammonia solution ต่อจากนั้น mix และ spin down
  6. เติม 10  $\mu$ l ของ 100% FA เพื่อหยุดปฏิกิริยาเพิ่มเติม และใช้สำหรับการ desalting เพื่อนำไปวิเคราะห์โดย nanoLC-MS/MS ต่อไป
  7. mix ตัวอย่างและนำไป desalting
- 3.8.5. การตกตะกอนแยกโปรตีนด้วยกระบวนการ Desalting
- การทดลองนี้ใช้ tip สำหรับ autopipette ขนาด 20-200  $\mu$ l เป็น column สำหรับการ desalting โปรตีน โดยใช้ Solid Phase Extraction Disk เป็น Solid phase



**ภาพที่ 8** แสดงการตักตะกอนแยกโปรตีนโดยใช้ tip สำหรับ autopipette ขนาด 20-200

1. เพื่อรักษา column ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ใส่ 100  $\mu$ l ของ 100% ACN ใน column และ Centrifuge 1,500xg 5 นาที ที่ 4 °C
2. equilibrate column ด้วย 0.1% FA 100  $\mu$ l และ Centrifuge 1,500xg 5 นาที ที่ 4 °C
3. โหลดตัวอย่างช้า ๆ ลงใน column โดยจะต้องเปลี่ยน microtube เป็นอันใหม่เพื่อเก็บส่วนที่เป็น unbound โปรตีนไว้ (\*ตัวอย่างที่เก็บไว้ในชั้น In solution dimethyl labeling มีประมาณ 5  $\mu$ l ต้อง dilute ด้วย 0.1% FA ก่อนโหลดลงใน column) และ Centrifuge 1,500xg 5 นาที ที่ 4 °C ประมาณ 2 รอบ
4. wash column ด้วย 0.1% FA 100  $\mu$ l โดยจะต้องเปลี่ยน microtube เป็นอันใหม่เพื่อเก็บส่วนที่เป็น wash ไว้หรือจะใช้อันเดียวกับในข้อ 3 เก็บก็ได้ และ Centrifuge 1,500xg 5 นาที ที่ 4 °C ประมาณ 2 รอบ
5. เปลี่ยน microtube อันใหม่เพื่อเก็บโปรตีน โดย elute เปปไทด์ ด้วย 0.1% FA/50%ACN 100  $\mu$ l และ Centrifuge 1,500xg 5 นาที ที่ 4 °C ประมาณ 2-3 รอบ
6. นำตัวอย่างที่ได้ไป speed wax เพื่อให้ได้ตัวอย่างในการนำไปวิเคราะห์ nanoLC-MS/MS ต่อไป

3.8.6. การวิเคราะห์ผลโปรตีนด้วย Nano-Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)

การวิเคราะห์ผลโปรตีนจะใช้เครื่อง nanoLiquid chromatography–tandem mass spectrometer รุ่น Q-exactive plus ซึ่งใช้หลักการ MS/MS ion search ในการระบุชนิดโปรตีน โดยการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกสามารถ

บอกขนาดมวลของสายเปปไทด์ ทั้งหมด และทำการแตกตัวเปปไทด์แต่ละสายด้วยการวิเคราะห์ครั้งที่สอง ซึ่งจะทำให้ทราบขนาดมวลของเปปไทด์แต่ละสาย แล้วนำข้อมูลทั้งหมดเทียบกับฐานข้อมูล UniProtKB/Swiss-Prot – ExPASy ด้วยโปรแกรม MASCOT เพื่อระบุชนิดโปรตีน และแปลผลข้อมูลโดยใช้ Proteome Discoverer™ Software

### 3.8.7. การแปลผลจากการวิเคราะห์ด้วย nanoLC-MS/MS

จากกระบวนการ In gel digestion แต่ละเลนของโปรตีนในกลุ่มบุตรผู้ป่วยและบุตรคนปกติ ทั้ง 3 กลุ่มจะถูกตัดแบ่งเป็น 10 ส่วน (fraction) แต่ละเลนจะประกอบด้วยโปรตีนและเปปไทด์ที่หลากหลาย โดยเปปไทด์ของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิวไตจะถูกลดน้ำหนักด้วย stable light isotope dimethyl และ เปปไทด์ของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มบุตรคนปกติจะถูกลดน้ำหนักด้วย stable medium isotope dimethyl จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software จะสามารถระบุชนิดของเปปไทด์ โปรตีน และสามารถคำนวณ area ของการติดฉลากเปปไทด์ด้วย stable light isotope dimethyl และ stable medium isotope dimethyl ที่ติดฉลากแต่ละเปปไทด์ของโปรตีนในกลุ่มบุตรผู้ป่วยและบุตรคนปกติได้โดยใช้สูตรคำนวณดังต่อไปนี้

อัตราส่วน (ratio) ของแต่ละส่วน

$$Ratio_i = \frac{\sum_{j=1}^p MediumArea}{\sum_{j=1}^p LightArea}$$

เมื่อ  $i =$  ID ของโปรตีน (ของโปรตีนแต่ละชนิด)  
 $j =$  ID ของเปปไทด์ที่สอดคล้องกับโปรตีน  $i$   
 และ  $p =$  จำนวนของเปปไทด์ทั้งหมดที่สอดคล้องกับโปรตีน  $i$

เนื่องจากในแต่ละเวลจะมีทั้งหมด 10 ส่วนดังนั้น ratio ของแต่ละโปรตีนจึงมีทั้งหมด 10 ค่าในแต่ละกลุ่ม ดังนั้น สามารถคำนวณอัตราส่วนทั้ง 10 ส่วนได้ดังนี้

$$AVGRatio_i = \text{average}(\{Ratio_{(1,i)}, Ratio_{(2,i)}, Ratio_{(3,i)}, \dots, Ratio_{(10,i)}\})$$

$$MedianRatio_i = \text{median}(\{Ratio_{(1,i)}, Ratio_{(2,i)}, Ratio_{(3,i)}, \dots, Ratio_{(10,i)}\})$$

$$Weight_{(f,i)} = \frac{\sum_{k=1}^n MediumArea}{\sum_{k=1}^n LightArea}$$

เมื่อ  $f =$  แต่ละ fraction  
 $j =$  ID ของโปรตีน (ในแต่ละ fraction)  
 และ  $n =$  จำนวนของโปรตีนทั้งหมดที่เหมือนกันใน fraction  $f$

Average ratio (AVGRatio) คือ ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของ area ของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วย stable medium isotope dimethyl ต่อ stable light isotope dimethyl ของโปรตีนที่พบในแต่ละส่วน

Median ratio (MedianRatio) คือ มัชยฐานของอัตราส่วนของ area ของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วย stable medium isotope dimethyl ต่อ stable light isotope dimethyl ของโปรตีนที่พบในแต่ละส่วน

Weight ratio (WeightRatio) คือ ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของ area ของเปปไทด์ที่ติดฉลากด้วย stable medium isotope dimethyl ต่อ stable light isotope dimethyl ของโปรตีนแต่ละชนิดที่พบใน 10 ส่วน

ค่า  $p$ -value คำนวณจากโปรแกรม excel เป็น Student's  $t$ -test โดยใช้ two-tailed distribution และ two-sample equal variance ค่า  $p$ -value สำหรับ AVGRatio, MedianRatio, และ WeightRatio ถ้า  $p$ -value < 0.05 จะถือว่ามีความนัยสำคัญทางสถิติ ในการวิเคราะห์นี้ผู้วิจัยเลือกใช้  $p$ -value ของ WeightRatio เป็นตัวกำหนดค่า เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดเมื่อผ่านกระบวนการ In gel digestion แล้วจะให้เปปไทด์ของโปรตีนนั้นจำนวนมากและหลากหลายเปปไทด์ โดยเปปไทด์แต่ละตัวนั้นจะมีสัญญาณของ signal to noise ที่แตกต่างกัน เปปไทด์ที่มีสัญญาณของ signal to noise ที่ดีก็จะให้คุณภาพในการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่สูงกว่าเปปไทด์ที่มีสัญญาณ signal to noise ที่ต่ำกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้คุณภาพในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของโปรตีนแต่ละชนิดจึงมาจากเปปไทด์ การคำนวณนี้จึงให้ความสำคัญกับ signal to noise ของเปปไทด์แต่ละโปรตีนเป็นหลัก

### 3.8. วิธีการวิเคราะห์โปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะ

การวัดโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะทำโดยภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เทคนิค electrochemiluminiscence โดย COBAS C6000® (Roche) และมี limit of detection (LOD) ของโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะเป็น 0.001 mg/dl

### 3.9. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

ใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., IBM, NY, USA) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของผู้เข้าร่วมโครงการทั้ง 4 กลุ่ม โดยวิเคราะห์กลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติด้วย unpaired *t*-test และวิเคราะห์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติด้วย paired *t*-test และหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆด้วยการวิเคราะห์แบบ Pearson's chi-square และการหา adjusted odd ratio ของความเสี่ยงตัวแปรตามโดยใช้ binary logistic regression โดยให้ค่านัยสำคัญอยู่ที่  $p < 0.05$



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากผลงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยของ นายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ หัวข้อ “การเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวไตระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิวไต บุตรของคนปกติ และบิดามารดา” ซึ่งในงานวิจัยดังกล่าว มีผู้เข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น 148 คน ประกอบด้วย ผู้ป่วยโรคนิวไต (กลุ่มที่ 1) 28 คน บุตรของผู้ป่วยโรคนิวไต (กลุ่มที่ 2) 46 คน คนปกติ (กลุ่มที่ 3) 40 คน และบุตรคนปกติ (กลุ่มที่ 4) 34 คน และจากผลวิจัยของคณะผู้วิจัยพบว่า ระดับโปรตีนในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิวไตคิดเป็น  $78.4 \pm 8.6$  มิลลิกรัมต่อวัน ในขณะที่บุตรของคนปกติที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกันเป็น  $23.2 \pm 3.7$  มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแทนในสูตรโดยแอปพลิเคชัน N4studies จะพบว่าจะต้องใช้ประชากรตัวอย่างอย่างน้อย 1 คนในแต่ละกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพิจารณาว่าจำนวนประชากร 1 คนไม่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงพิจารณาจำนวนที่ใช้โดยคัดเลือกปัสสาวะจากกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิวไต และบุตรกลุ่มควบคุมที่ใช้เปรียบเทียบกลุ่มละ 30 คน และกลุ่มผู้ป่วยโรคนิวไตกับกลุ่มควบคุมจำนวนกลุ่มละ 28 คน โดยเลือกกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุที่สอดคล้องกับกลุ่มเป้าหมาย จากการคัดเลือกกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิวไต และบุตรกลุ่มควบคุมที่ใช้เปรียบเทียบกลุ่มละ 30 คน พบว่าเพศไม่มีความแตกต่างกันแต่อายุของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 6 ( $15.43 \pm 4.40$  ปี และ  $18.50 \pm 6.41$  ปี ตามลำดับ  $p\text{-value} = 0.035$ )



ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ ไต	กลุ่มที่ 2 บุตรของคนปกติ (กลุ่มควบคุม)	p-value
จำนวนประชากร (คน)	30	30	
% เพศชาย	56.67	53.33	0.438
อายุเฉลี่ย (mean ± SD) (ปี)	15.43±4.40 (9-25)	18.50±6.41 (7-29)	0.035*
การสูบบุหรี่ (%)	14.29	14.29	NS
การติดแอลกอฮอล์ (%)	10.71	14.29	NS
ประวัติการรักษาโรค			
- โรคเบาหวาน (%)	0	0	NS
- ความดันโลหิตสูง (%)	0	0	NS
- โรคอื่น ๆ (ลิ้นหัวใจ, หอบ หืด, ภาวะเบา) (%)	10.00	10.00	NS

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean ± SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม NS: ไม่มีความสำคัญทางสถิติ (not significant)

ในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าปริมาณปัสสาวะต่อวันของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้และบุตรกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ( $778.07 \pm 393.41$  มิลลิลิตรต่อวัน และ  $855.17 \pm 506.39$  มิลลิลิตรต่อวัน ตามลำดับ  $p\text{-value} = 0.513$ ) ในขณะที่ระดับโปรตีนในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้สูงกว่าบุตรกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $85.13 \pm 44.12$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $26.59 \pm 21.13$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p\text{-value} < 0.001^*$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้มีซีเตรตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ( $104.07 \pm 83.77$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $177.65 \pm 144.12$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p\text{-value} = 0.019^*$ ) และแคลเซียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $50.13 \pm 35.16$  mg/day และ  $21.71 \pm 16.24$  mg/day ตามลำดับ  $p\text{-value} < 0.001^*$ ) แต่ระดับของออกซาเลต โพแทสเซียม แมกนีเซียมของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 11** แสดงระดับบ่งชี้ประกอบโดยรวมในปัสสาวะ และ ผลของ Urine strip test ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ไต	กลุ่มที่ 2 บุตรของคนปกติ (กลุ่มควบคุม)	p-value
24-hour Urine volume (ml)	778.07±393.41	855.17±506.39	0.513
Urine strip test			
- Positive for sugar	0	0	
- Positive for protein	0	0	
- Positive for blood	0	0	
Total urine protein (mg/day)	85.13±44.12	26.59±21.13	<0.001*
Urine elements			
- Citrate (mg/day)	104.07±83.77	177.65±144.12	0.019*
- Oxalate (mg/day)	16.64±19.28	23.08±61.22	0.587
- Calcium (mg/day)	50.13±35.16	21.71±16.24	<0.001*
- Potassium (mg/day)	401.15±162.78	459.28±208.06	0.110
- Magnesium (mg/day)	51.64±28.63	55.63±23.76	0.560

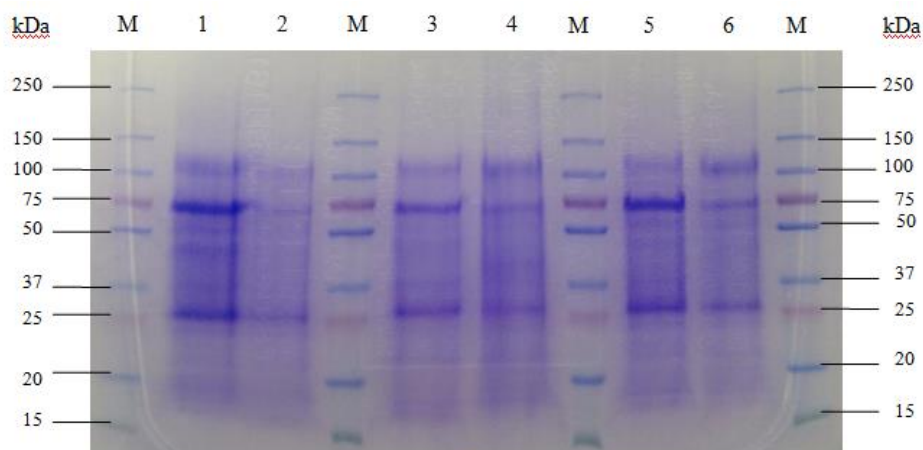
ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean ± SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม

#### ผลการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไต และของกลุ่มบุตรคนปกติซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุที่สอดคล้องกับกลุ่มเป้าหมาย กลุ่มละ 30 คน โดยได้มีการแบ่งกลุ่มของทั้งสองกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 คน โดยการคัดเลือกปัสสาวะของคน 10 คน ในแต่ละกลุ่มจะใช้ปริมาณรวมของปัสสาวะในแต่ละกลุ่มของบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไตและบุตรคนปกติที่แตกต่างกันน้อยที่สุด หลังจากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะของแต่ละกลุ่มมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 75% ethanol และละลายตะกอนด้วย lysis buffer เพื่อนำไปใช้ศึกษาทางโปรตีโอมิกส์ต่อไปโดยการรันเจล

ด้วยวิธีเจลอิลโคโทรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE และย้อมสีเจลดด้วยสี Coomassie blue พบรูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนในแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 9



**ภาพที่ 9** การวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของโปรตีนที่ตกตะกอนจากปัสสาวะทั้ง 3 กลุ่มของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และของกลุ่มบุตรคนปกติ เมื่อ Lane M คือ prestained protein marker (PageRuler™ Prestain protein ladder, Fermentas) Lane 1 และ 2 คือ กลุ่มที่ 1 ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และของกลุ่มบุตรคนปกติคู่ที่หนึ่ง Lane 3 และ 4 คือ กลุ่มที่ 2 ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และของกลุ่มบุตรคนปกติคู่ที่สอง และ Lane 5 และ 6 คือ กลุ่มที่ 3 ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และของกลุ่มบุตรคนปกติคู่ที่สาม

#### ผลการวิเคราะห์ผลโปรตีนด้วย nano-Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)

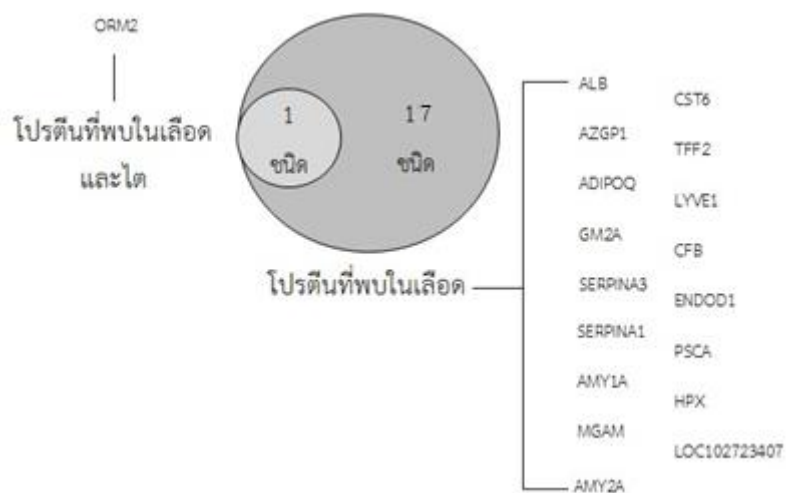
เจลดที่ได้จากการรันอิลโคโทรโฟรีซิสแบบ 1D-SDS-PAGE และย้อมสีเจลดด้วยสี Coomassie blue แล้วจะผ่านกระบวนการ In gel digestion และการติดฉลาก (Label) ด้วย dimethyl ที่มีไอโซโทปที่แตกต่างกันระหว่างเจลดของทั้งสองกลุ่ม และหลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง nanoLC-MS/MS ผลการวิเคราะห์พบว่าพบโปรตีนทั้งหมดจากทั้งสองกลุ่ม 349 ชนิด และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างโปรตีนทั้ง 3 กลุ่มจะพบว่าโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไตเมื่อเทียบกับบุตรคนปกติมีทั้งหมด 18 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 5.44 ของโปรตีนทั้งหมดที่พบ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 12 แสดงโปรตีน 18 ชนิดที่มีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตเมื่อเทียบกับบุตรของคนปกติ

No.	ชื่อโปรตีน	ยีน	จำนวนกรด อะมิโน	WeightRatio	p-value
1	serum albumin preproprotein	ALB	609	0.335134696	0.0007
2	pancreatic alpha-amylase precursor	AMY2A	511	0.332019415	0.0313
3	zinc-alpha-2-glycoprotein precursor	AZGP1	298	0.396664939	0.0232
4	cystatin-M precursor	CST6	149	0.334918196	0.0018
5	alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor	ORM2	201	0.205876839	0.0032
6	adiponectin precursor	ADIPOQ	244	0.329121229	0.0015
7	trefoil factor 2 precursor	TFF2	129	0.487943724	0.0486
8	ganglioside GM2 activator isoform 1 precursor	GM2A	193	0.459711532	0.0143
9	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 precursor	LYVE1	322	0.304899536	0.0031
10	alpha-1-antichymotrypsin precursor	SERPINA3	423	0.37293366	0.0022
11	complement factor B preproprotein	CFB	764	0.236383861	0.0054
12	endonuclease domain-containing 1	ENDOD1	500	0.342439862	0.0053

	protein precursor				
13	alpha-1-acid glycoprotein 1 precursor	SERPINA1	418	0.313615546	0.0099
14	prostate stem cell antigen preproprotein	PSCA	114	0.155434832	0.0077
15	PREDICTED: alpha-amylase 1 isoform X1	AMY1A	511	0.129831486	<0.0001
16	PREDICTED: hemopexin isoform X1	HPX	462	0.271881832	0.0168
17	PREDICTED: maltase-glucoamylase, intestinal isoform X1	MGAM	2753	0.602006603	0.0354
18	PREDICTED: putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV4OR15-8-like	LOC102723407	155	0.397082924	0.0381

ซึ่งเมื่อพิจารณาโปรตีนทั้ง 18 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนออกเป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิด คือ กลุ่มที่ถูกกรองจากเลือด 17 ชนิด ได้แก่ serum albumin preproprotein, pancreatic alpha-amylase zinc-alpha-2-glycoprotein, cystatin-M, adiponectin, trefoil factor 2, ganglioside GM2 activator isoform 1, lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1, alpha-1-antichymotrypsin, complement factor B preproprotein, endonuclease domain-containing 1 protein, alpha-1-acid glycoprotein 1, prostate stem cell antigen preproprotein, PREDICTED: alpha-amylase 1 isoform X1, PREDICTED: hemopexin isoform X1, PREDICTED: maltase-glucoamylase, intestinal isoform X1 และ PREDICTED: putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV4OR15-8-like โดยพบว่ามีโปรตีนที่พบทั้งในเซลล์ไตและเลือด 1 ชนิด คือ alpha-1-acid glycoprotein 2 ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงจำนวนของโปรตีนที่พบในเลือด และที่พบทั้งในไตและเลือด

จากการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ทำให้พบโปรตีน 18 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 3 กลุ่มในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไตเมื่อเทียบกับบุตรของคนปกติ สำหรับการเลือก candidate protein เพื่อใช้เป็น biomarker ในการวินิจฉัยผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ไต โปรตีนที่เหมาะสม คือ โปรตีนที่พบมากในผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดนี้วามากกว่าผู้ที่มีความเสี่ยงต่ำ โปรตีนควรมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของ renal tubular epithelium เนื่องจากโรคนี้ไตจัดเป็น tubulointerstitial disease เป็นโปรตีนที่สามารถตรวจวัดได้ง่าย ทราบระดับปกติในคนปกติ เมื่อใช้หลักเกณฑ์ดังกล่าว จะพบว่าโปรตีนอัลบูมินเข้ากับข้อกำหนดเบื้องต้นมากที่สุด การศึกษานี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ urinary albumin เป็น candidate protein เพื่อศึกษาต่อไป

#### ผลการตรวจ urinary albumin โดยวิธี electrochemiluminescence

ระดับโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไตสูงกว่าบุตรคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $5.92 \pm 10.48$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $0.41 \pm 0.78$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p\text{-value} = 0.006^*$ ) (ตารางที่ 9)

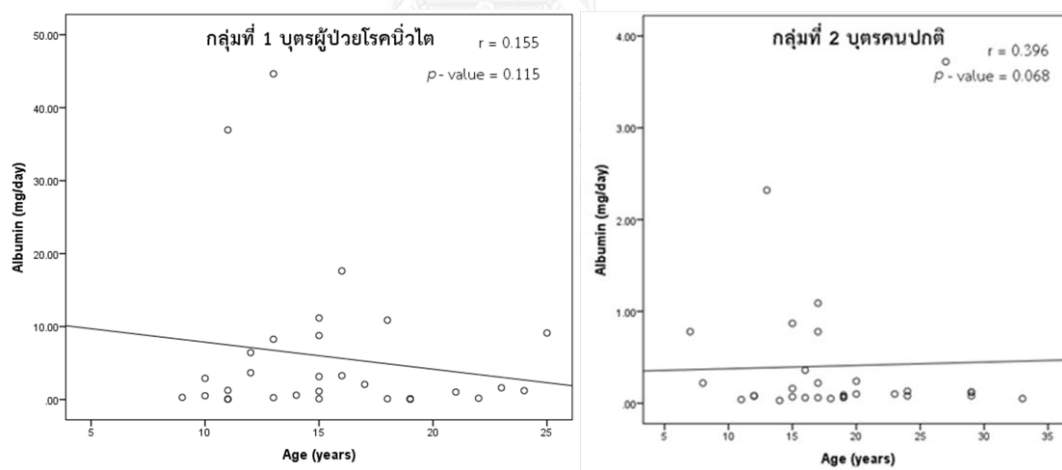
เนื่องจากพบว่าอายุของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไต และกลุ่มบุตรคนปกติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $15.43 \pm 4.40$  ปี และ  $18.50 \pm 6.41$  ปี ตามลำดับ  $p\text{-value} < 0.05$ ) จึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีนอัลบูมินกับอายุของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไต และกลุ่มบุตรคน

ปกติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ( $p$ -value=0.115 และ  $p$ -value=0.068 ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 11

**ตารางที่ 13** แสดงระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มบุตรคนปกติ

รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 บุตรของผู้ป่วยโรคไต	กลุ่มที่ 2 บุตรของคนปกติ (กลุ่มควบคุม)	$p$ -value
จำนวนประชากร (คน)	30	30	
อายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) (ปี)	15.43 $\pm$ 4.40 (9-25)	18.50 $\pm$ 6.41 (7-29)	0.035*
Albumin (มิลลิกรัม/วัน)	5.92 $\pm$ 10.48	0.41 $\pm$ 0.78	0.006*

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean  $\pm$  SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \* $p$ <0.05 เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม



**ภาพที่ 11** แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับอายุของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคไต และกลุ่มบุตรคนปกติ

จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคไตมีระดับ urinary albumin สูงกว่าบุตรของคนปกติจริง โดยมีค่า adjusted odd ratio คิดเป็น 2.149 (95% CI = 1.130 - 4.087,  $p$ -value = 0.020) เมื่อ adjusted age และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตและกลุ่มคนปกติที่มีอายุและเพศสอดคล้องกัน พบว่าผู้ป่วย

โรคนิ่วไตมีระดับของโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $16.85 \pm 33.41$  มิลลิกรัมต่อวัน และ  $0.26 \pm 0.71$  มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ  $p$ -value  $< 0.001$ ) โดยมีค่า adjusted odd ratio คิดเป็น 2.392 (95% CI = 1.353 – 4.229,  $p$ -value = 0.003) (ตารางที่ 10)

**ตารางที่ 14** แสดงระดับของโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มคนปกติ

รายละเอียด	กลุ่มที่ 3 ผู้ป่วยโรคนิ่วไต	กลุ่มที่ 4 คนปกติ (กลุ่มควบคุม)	$p$ -value
จำนวนประชากร (คน)	28	28	
% เพศชาย	35.71	46.43	0.166
อายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) (ปี)	46.11 $\pm$ 9.77 (32-69)	43.11 $\pm$ 9.96 (26-62)	0.493
Urinary albumin (มิลลิกรัม/วัน)	16.85 $\pm$ 33.41	0.26 $\pm$ 0.71	$<0.001^*$

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูปแบบ mean  $\pm$  SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้  $*p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม

### ผลการศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ต่อระดับของโปรตีนอัลบูมิน

เพื่อศึกษาว่าระดับ urinary albumin มีความสัมพันธ์กับค่าความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงที่จะเกิดผลึกนิ่วที่ดีที่สุดหรือไม่ ผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ urinary albumin และ Ogawa index โดยใช้ Pearson's correlation test ในประชากรตัวอย่างแต่ละกลุ่ม

เมื่อศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation โดยใช้สูตรคำนวณของ Ogawa index พบว่ากลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะ supersaturation (Ogawa index) สูงกว่ากลุ่มบุตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $22.56 \pm 29.71 (x10^{-6})$  และ  $0.41 \pm 0.78 (x10^{-6})$  ตามลำดับ  $p$ -value = 0.007\*) (ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยของนางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล) ดังแสดงในตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ supersaturation (Ogawa index) กับ ระดับของโปรตีนอัลบูมินในกลุ่ม



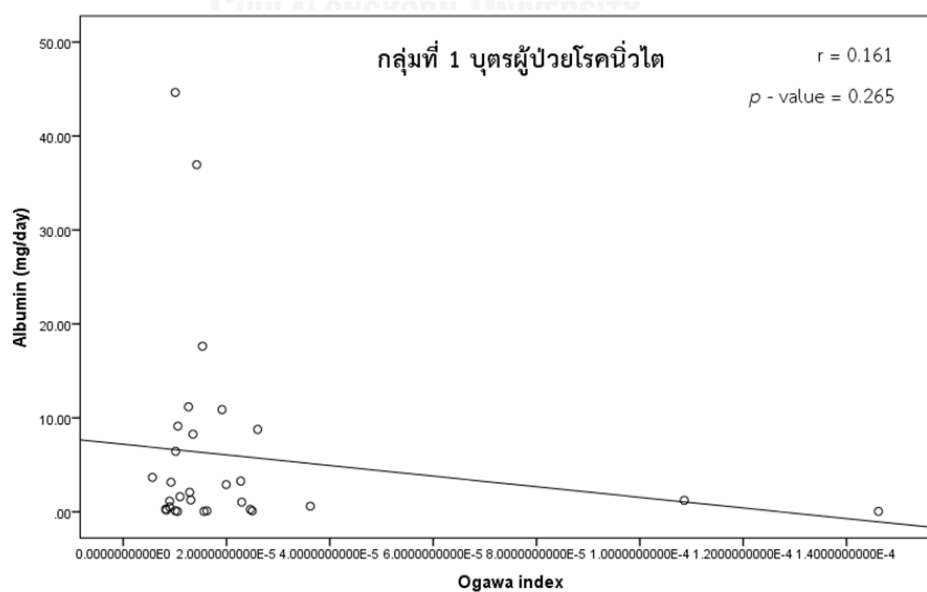
บุตรผู้ป่วยโรคนี้วไตและบุตรคนปกติไม่มีความสัมพันธ์กัน ( $p$ -value 0.265 และ  $p$ -value=0.329) ดังแสดงในภาพที่ 12 และภาพที่ 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 แสดงค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้วไตและบุตรคนปกติ (กลุ่มควบคุม)

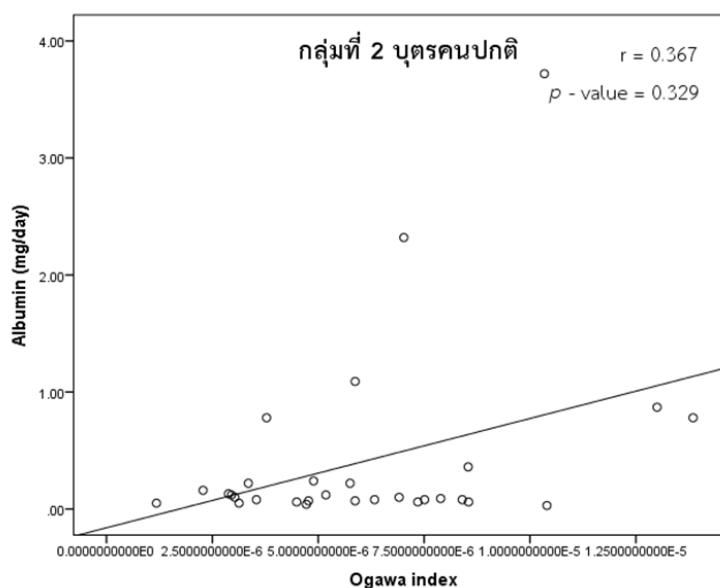
รายละเอียด	กลุ่มที่ 1 บุตรของผู้ป่วยโรคนี้วไต	กลุ่มที่ 2 บุตรคนปกติ (กลุ่มควบคุม)	$p$ -value
จำนวนประชากร (คน)	30	30	
% เพศชาย	0.57	0.53	0.438
อายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) (ปี)	15.43 $\pm$ 4.40 (9-25)	18.50 $\pm$ 6.41 (7-29)	0.035*
Ogawa index ( $\times 10^{-6}$ )	22.56 $\pm$ 29.71	0.41 $\pm$ 0.78	0.007*

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean  $\pm$  SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม

ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้วไต



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มบุตรคนปกติ



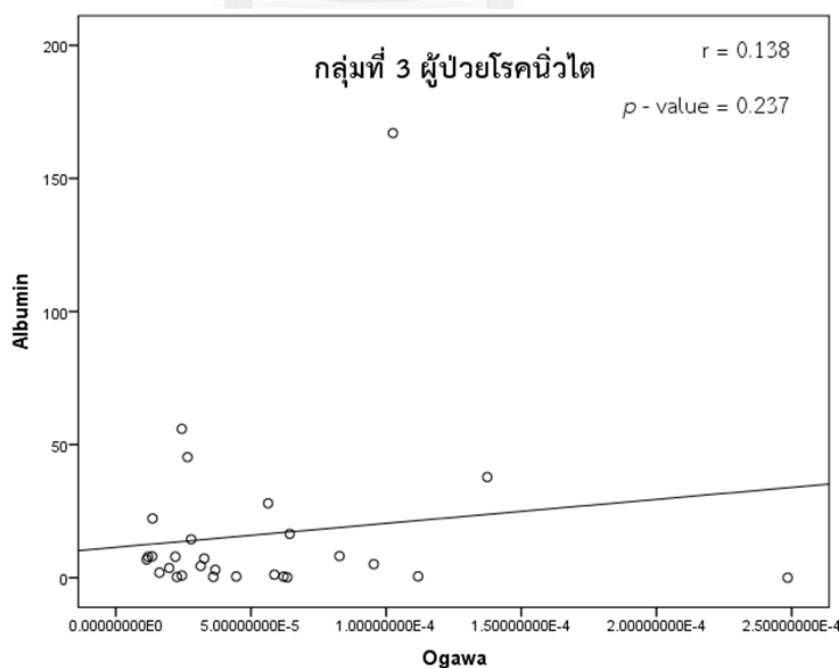
และเมื่อศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตและคนปกติ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตมีภาวะ supersaturation (Ogawa index) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $53.53 \pm 57.90 (\times 10^{-6})$  และ  $19.66 \pm 23.32 (\times 10^{-6})$  ตามลำดับ  $p\text{-value} < 0.001^*$ ) ดังแสดงในตารางที่ 12 ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างภาวะ supersaturation (Ogawa index) กับระดับของโปรตีน อัลบูมินทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตและคนปกติ ( $p\text{-value} 0.237$  และ  $p\text{-value}=0.325$ ) ดังแสดงในภาพที่ 14 และภาพที่ 15 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 แสดงค่า Ogawa index ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไต และคนปกติ (กลุ่มควบคุม)

รายละเอียด	กลุ่มที่ 3 ผู้ป่วยโรคนี้ไต	กลุ่มที่ 4 คนปกติ (กลุ่มควบคุม)	p-value
จำนวนประชากร (คน)	28	28	
% เพศชาย	35.71	46.43	0.166
อายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) (ปี)	46.11 $\pm$ 9.77 (32-69)	43.11 $\pm$ 9.96 (26-62)	0.493
Ogawa index ( $\times 10^{-6}$ )	53.53 $\pm$ 50.79	19.66 $\pm$ 23.32	0.007*

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean  $\pm$  SD และ ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ \* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม

ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนอัลบูมินกับค่า Ogawa index ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ไต





## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาข้อมูลทางด้านประชากรศาสตร์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และคนปกติจำนวนกลุ่มละ 30 คนพบว่า แม้จะมีเพศไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่มคนปกติกลับมีอายุที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6) ทั้งนี้เพราะอาสาสมัครแต่ละรายมีปริมาณปัสสาวะ 24 ชั่วโมงและปริมาณโปรตีนในปัสสาวะไม่เท่ากัน การพิจารณาว่าอาสาสมัครมีอัตราการขับโปรตีนออกทางปัสสาวะแตกต่างกันอย่างไรที่ดีที่สุด จึงต้องใช้การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ขับออกมาในหนึ่งหน่วยเวลาที่เท่ากัน วิธีที่ดีที่สุดจึงเป็นการเลือกอาสาสมัครที่มีปริมาณปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด เพราะเมื่อนำตัวอย่างปัสสาวะที่เวลาเท่าๆ กัน มาใช้ในการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ จะสามารถใช้ปริมาณปัสสาวะจากอาสาสมัครแต่ละคนในปริมาณที่แตกต่างกันน้อยที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงไม่อาจหลีกเลี่ยงความแตกต่างของอายุที่เกิดขึ้นระหว่างสองกลุ่มได้ อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาช่วงอายุที่แตกต่างกัน จะพบว่าค่าเฉลี่ยอายุของกลุ่มบุตรของผู้ป่วย คือ  $15.43 \pm 4.40$  ปี และกลุ่มบุตรคนปกติ คือ  $18.50 \pm 6.41$  ปี แม้จะมีความแตกต่างทางสถิติแต่ในทางคลินิกจะเห็นว่าไม่แตกต่างกันมาก อีกทั้งยังเป็นช่วงอายุที่มีโอกาสเกิดภาวะ proteinuria หรือ albuminuria น้อยมาก นอกเสียจากจะมีโรคประจำตัว อาทิเช่น กลุ่มอาการเนโฟรติก ความดันโลหิตสูงเรื้อรัง หรือเบาหวานชนิดที่ 1 แต่ในการศึกษานี้ไม่พบว่าอาสาสมัครคนใดมีโรคประจำตัวดังกล่าว (ตารางที่ 6)

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่รั่วออกมาทางปัสสาวะในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม จะพบว่า กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนี้่วไตยังคงมีโปรตีนรั่วทางปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มบุตรของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $85.13 \pm 44.12$  กับ  $26.59 \pm 21.13$  มิลลิกรัมต่อวัน,  $p < 0.001$ ) (ตารางที่ 7) แม้ปริมาณปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจะไม่แตกต่างกัน อีกทั้งยังพบว่ากลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนี้่วไตยังคงพบระดับซีเทรตในปัสสาวะต่ำ และแคลเซียมในปัสสาวะสูงไม่แตกต่างจากการศึกษาของนายจักรพันธ์ และคณะ ก่อนหน้าที่ใช้จำนวนตัวอย่างจากอาสาสมัครมากกว่านี้ ดังนั้น จึงน่าเชื่อได้ว่า ตัวอย่างจากอาสาสมัครที่คัดเลือกมาทั้งสิ้นกลุ่มละ 30 คนนี้ สามารถทดแทนอาสาสมัครทั้งหมดจากการวิจัยก่อนหน้านี้ได้เป็นอย่างดี

การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ มีข้อตกลงเบื้องต้น คือ การแบ่งกลุ่มบุตรผู้ป่วยและบุตรคนปกติในแต่ละกลุ่มที่มีปริมาณรวมของปัสสาวะ เพศ และอายุที่แตกต่างกันน้อยที่สุด จากนั้น ผู้วิจัยพิจารณาใช้สารตัวอย่างชีวภาพ ซึ่งได้แก่ ปัสสาวะ โดยใช้ปริมาณเท่ากับปริมาณปัสสาวะที่อาสาสมัครแต่ละคนขับออกมาในหน่วยเวลาเท่ากัน ดังนั้น ปริมาณโปรตีนที่อยู่ในปัสสาวะปริมาณดังกล่าว จะเป็นปริมาณโปรตีนที่อาสาสมัครแต่ละคนขับออกมาในระยะเวลาเท่าๆ กัน

ผลจากการรัน 1D-SDS-PAGE gel electrophoresis และย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อดูการกระจายของโปรตีน (ภาพที่ 9) จะพบว่ามีแถบของโปรตีนที่ติดสีเข้มอย่างเห็นได้ชัดประมาณ 3 แถบ คือ โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 25 kDa, 70 kDa และ 120 kDa ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้งสามชนิดนี้เห็นเด่นชัดทั้งในตัวอย่างปัสสาวะที่ได้จากกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิว และบุตรของคนปกติ แต่จะเห็นเด่นชัดในกลุ่มบุตรของผู้ป่วยมากกว่าบุตรของคนปกติ และโปรตีนทั้งสามชนิดนี้มีการเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มย่อยเป็นรูปแบบเดียวกัน ในเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามนี้น่าจะเป็นโปรตีนที่พบได้สูงในคนปกติทั่วไป แต่มีการรั่วออกมาทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มบุตรของผู้ป่วย ในเบื้องต้นผู้วิจัยสันนิษฐานว่า โปรตีนทั้งสาม น่าจะเป็น light chain immunoglobulin, albumin และ Tamm-horsfall protein ตามลำดับ โดยอ้างอิงมาจากผล pilot study ที่ผู้วิจัยได้ทำมาก่อนหน้านี้

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนที่พบในปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิวไตและกลุ่มควบคุมโดยใช้ nanoLC-MS/MS สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 349 ชนิด และพบว่ามีโปรตีน 18 ชนิดที่เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิวไตเมื่อเทียบกับบุตรกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยคิดเป็นร้อยละ 5.44 ของโปรตีนทั้งหมดที่สามารถระบุชนิดได้ รายละเอียดสำหรับโปรตีนแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 8 อย่างไรก็ตาม เรายังไม่สามารถใช้โปรตีนทั้ง 18 ชนิดนี้เป็น candidate protein เพื่อใช้เป็น biomarker ของความเสี่ยงการเกิดนิวไตได้ เนื่องจากโปรตีนที่พบในปัสสาวะมีที่มาจาก 2 แหล่ง คือ ถูกกรองมาจากเลือด และถูกขับออกมาจากเซลล์ของตัวเอง เมื่อพิจารณาโปรตีนทั้ง 18 ตัวสามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนออกเป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิด คือ กลุ่มที่หลังจากเซลล์อื่นเข้าสู่กระแสเลือด 17 โปรตีน และโปรตีนที่สามารถหลังเข้าสู่กระแสเลือด รวมถึงหลังจากเซลล์ของตัวเองเข้าสู่ปัสสาวะโดยตรงอีก 1 ชนิด จากผลการวิเคราะห์พบโปรตีนที่หลังจากเซลล์ไปยังเลือดมากกว่าโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ตัวเองเป็นเหตุการณ์ที่คาดหมายไว้ล่วงหน้าแล้ว เนื่องจากโปรตีนที่มีขนาดเล็กในเลือดทุกชนิดจะถูกกรองออกมาทางปัสสาวะได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สามารถสร้างได้จากเซลล์ไตเพียงเซลล์เดียวย่อมมีจำนวนชนิดมากกว่าเป็นเรื่องปกติ แต่

การรั่วของโปรตีนจากพลาสมาบางชนิดยังสามารถบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพของไตได้ หากโปรตีนดังกล่าว ถูกดูดกลับหรือขับออกเพิ่มเติมโดยเซลล์ไต ซึ่งความผิดปกติของเซลล์ไตที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อการเกิดโรคนี้ อาจมีผลทำให้การดูดกลับหรือการขับออกนี้ผิดปกติไป

การศึกษา candidate protein ผู้วิจัยเลือกใช้โปรตีนอัลบูมินซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีน 19 ชนิดที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ไว้ไตเมื่อเปรียบเทียบกับบุตรคนปกติ เนื่องจากอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีขนาดปานกลาง (ประมาณ 60 kDa) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของช่องทางการกรองของโกลเมอรูลัสที่เรียกว่า slit diaphragm ทำให้อัลบูมินถูกจำกัดการกรองออกสู่ปัสสาวะโดยประจุลบของ glomerular basement membrane และการดูดกลับโดย proximal tubular epithelial cells ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ภาวะอัลบูมินรั่วทางปัสสาวะสามารถเกิดได้จากโรคของ glomerular basement membrane และ proximal tubular cells อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มบุตรของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่เข้าร่วมการศึกษานี้ ซึ่งมีอายุน้อยและไม่มีประวัติผิดปกติของโรคไต ความดันโลหิตสูง หรือเบาหวาน และมีค่า estimated GFR อยู่ในเกณฑ์ปกติ ได้รับการอนุมานว่าเป็นผู้มีสุขภาพปกติดี ไม่ควรจะมีโรค glomerular disease หรือ tubular disease ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ปัจจัยเดียวที่แตกต่างกันควรจะเป็นการสืบทอดทางพันธุกรรมจากผู้ป่วยโรคนี้ไว้ไตเท่านั้น นอกจากนี้ การใช้อัลบูมินในปัสสาวะเป็น candidate protein ยังมีข้อดีเพิ่มเติม คือ มีค่ามาตรฐานในการบ่งชี้ความผิดปกติอย่างชัดเจน วิธีการตรวจที่เป็นมาตรฐานและมีความน่าเชื่อถือสูง และความผิดปกติที่พบอัลบูมินในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นพบได้ในโรคที่มีความผิดปกติของ proximal tubular cells จริง อาทิเช่น ในโรคที่มีการตายของเซลล์บุหลอดไต (acute tubular necrosis) หรือกลุ่มอาการ Fanconi syndrome ทว่าการพบภาวะ albuminuria มีความสัมพันธ์กับโรคอื่น เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคไตจากเบาหวาน เป็นทั้งข้อดีและข้อเสีย ในส่วนที่เป็นข้อดี คือ อาจเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างโรคนี้ไว้ไตกับโรคเหล่านี้ ซึ่งเป็นความจริงที่มีหลักฐานการศึกษาเชื่อมโยงการเกิดโรคนี้ไว้ไตกับโรคเบาหวาน โรคกลุ่มเมแทบอลิก และโรคหัวใจและหลอดเลือดจริง ในทางกลับกัน โรคเหล่านี้ อาจเป็น confounding factor ในการใช้อัลบูมินเป็น biomarker เมื่อใช้ในทางคลินิกจริง

การศึกษานี้พบว่าระดับของโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยสูงกว่าบุตรคนปกติ กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) โดยระดับอัลบูมินในปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กับอายุของอาสาสมัครแต่อย่างใด โปรตีนอัลบูมินจึงอาจเป็นโปรตีนที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความเสียหายของการเกิดนี้ไว้ไต

ในบุตรของผู้ป่วย โดยมาหลักฐานสนับสนุน คือ การพบระดับโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยและบุตรที่ยังไม่เป็นโรค จะพบว่าระดับอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยสูงกว่าในบุตรอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน จากการค้นพบนี้ ทำให้เชื่อได้ว่า อัลบูมินในปัสสาวะ อาจจะเป็นเหตุ หรือเป็นผล หรือแค่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับการพบว่าระดับอัลบูมินในปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กับค่าดัชนีความอึดตัวยิ่งยวดของโอกาว่า (Ogawa index) ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของปัสสาวะในการเกิดผลึกนี้ จึงเชื่อได้ว่าอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยและบุตรของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับโอกาสเสี่ยงของการเกิดนี้เท่านั้น โดยผู้วิจัยเชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของอัลบูมินในปัสสาวะน่าจะเป็นอาการหนึ่งของโรค hereditary proximal tubular disease ที่เป็นต้นเหตุของการเกิดนี้

การที่ผู้วิจัยสรุปว่าผู้ป่วยและบุตรของผู้ป่วยโรคนี้ น่าจะมีความผิดปกติในการทำงานของ proximal tubular epithelial cells เนื่องจากเหตุผล 3 ประการ (1) ทั้งผู้ป่วยและบุตรของผู้ป่วยโรคนี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดนี้สูงกว่าปกติ โดยพิจารณาจากค่าดัชนีความอึดตัวยิ่งยวดที่สูงกว่าในคนปกติอย่างชัดเจน แสดงว่าน่าจะมีความผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งที่สามารถพบได้ในสมาชิกครอบครัวผู้ป่วย (2) ผู้ป่วยและบุตรของผู้ป่วยโรคนี้มีระดับแคลเซียมในปัสสาวะสูง และซิเทรตในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเหมือนกัน ซึ่งการดูดกลับแคลเซียมและซิเทรตจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง proximal tubule ของหลอดไต และ (3) ภาวะอัลบูมินรั่วเพิ่มขึ้นในปัสสาวะที่พบได้ทั้งในผู้ป่วยและบุตรของผู้ป่วย มีการดูดกลับที่ตำแหน่ง proximal tubule ของหลอดไตเช่นเดียวกัน เนื่องจากภาวะอัลบูมินรั่วเป็นภาวะที่พบร่วมกับภาวะ hypercalciuria และ hypocitraturia ซึ่งทำให้คิดได้ว่าน่าจะมีความผิดปกติที่ proximal tubular cells ซึ่งเป็นตำแหน่งร่วมที่พบความผิดปกติทั้งสามอย่างได้ ทั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นโรคใด และเป็นผลมาจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม และไม่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยใดหนึ่งในสามเป็นสาเหตุหรือเป็นผลของความผิดปกตินี้

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนี้มีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ โดยตรวจพบโปรตีน 18 ชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งรวมถึง ระดับ albumin ในปัสสาวะที่พบเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคนี้ไตและบุตรเปรียบเทียบกับคนปกติเช่นเดียวกัน ผู้วิจัยเชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ albumin ในปัสสาวะเป็นอาการหนึ่งของโรคนี้ไตในคนไทย และน่าจะเป็นอาการที่เกิดขึ้นก่อนจะเกิดโรคนี้ไตเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากเป็นหนึ่งในอาการแสดงของความผิดปกติในการ



ทำงานของเซลล์บุหลอดไตส่วนต้น ซึ่งพบร่วมกับภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำและแคลเซียมในปัสสาวะสูงด้วย โดยพบว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนี้จะมีระดับอัลบูมินในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติประมาณ 2 เท่า (adjusted OR 2.149, 95% CI = 1.130 - 4.087) โดยที่ระดับอัลบูมินในปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กับโอกาสการเกิดผลึกนิ่วในปัสสาวะ (ความอึดตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ) การเพิ่มขึ้นของระดับอัลบูมินในปัสสาวะน่าจะเป็นอาการหนึ่งของความผิดปกติของ proximal tubular function ที่เพิ่มโอกาสเสี่ยงของการเกิดนิ่วและสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

#### การวิจารณ์ผลการทดลองเพิ่มเติม

จากการศึกษานี้ การพบระดับโปรตีนและอัลบูมินในปัสสาวะสูงในกลุ่มบุตรของผู้ป่วย มิได้ขัดแย้งกับข้อมูลทางด้านประชากรศาสตร์ของประชากรปกติที่มีช่วงอายุน้อยและไม่มีโรคประจำตัว ที่มีโอกาสเกิดภาวะ proteinuria หรือ albuminuria น้อยมาก เนื่องมาจากการศึกษาทั่วไป จะหมายถึงการมีระดับโปรตีนมากกว่า 300 mg/g creatinine และ อัลบูมินมากกว่า 150 mg/day ในปัสสาวะ แต่ในการศึกษานี้ แม้กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนี้จะมีระดับโปรตีนและอัลบูมินในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมก็ตาม แต่ค่าเฉลี่ยยังต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว คือ  $85.13 \pm 44.12$  และ  $5.92 \pm 10.48$  mg/day ตามลำดับ ซึ่งในทางคลินิกแล้วระดับโปรตีนและอัลบูมินที่เพิ่มสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยอาจไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวมแต่อย่างใด แต่สำหรับโรคนี้แล้ว การเพิ่มขึ้นของโปรตีนและอัลบูมินที่พบในการศึกษานี้น่าจะเป็นอาการเบื้องต้นที่ตรวจพบในระยะก่อนเกิดอาการทางคลินิก (subclinical presentation) ซึ่งถ้าเป็นจริง ภาวะ subclinical high albumin excretion rate นี้จะเป็น biomarker ที่ดีในการคาดการณ์การเกิดนิ่วในอนาคต อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ว่าภาวะการเพิ่มขึ้นของอัลบูมินในปัสสาวะบุตรสัมพันธ์กับการเกิดนิ่วจริงจำเป็นต้องทำการศึกษาแบบไปข้างหน้า (Cohort study) และมีระยะเวลาในการติดตามนานประมาณ 30 ปี หรือเท่ากับอายุห่างเฉลี่ยของผู้ป่วยและบุตร ซึ่งต้องอาศัยทรัพยากรกำลังคน และอาสาสมัครจำนวนมากเพื่อติดตามผล

## รายการอ้างอิง

1. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *Int J Urol.* 1997;4(6):537-40.
2. Edvardsson VO, Palsson R, Indridason OS, Thorvaldsson S, Stefansson K. Familiality of kidney stone disease in Iceland. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(5):420-4.
3. Ertan P, Tekin G, Oger N, Alkan S, Horasan GD. Metabolic and demographic characteristics of children with urolithiasis in Western Turkey. *Urol Res.* 2011;39(2):105-10.
4. Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemanee A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, et al. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res.* 2009;37(3):141-6.
5. Sriboonlue P, Prasongwatana V, Chata K, Tungsanga K. Prevalence of upper urinary tract stone disease in a rural community of north-eastern Thailand. *Br J Urol.* 1992;69(3):240-4.
6. Najem GR, Seebode JJ, Samady AJ, Feuerman M, Friedman L. Stressful life events and risk of symptomatic kidney stones. *Int J Epidemiol.* 1997;26(5):1017-23.
7. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(5):831-41.
8. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006;367(9507):333-44.
9. Miller NL, Lingeman JE. Management of kidney stones. *BMJ.* 2007;334(7591):468-72.
10. Rivers K, Shetty S, Menon M. When and how to evaluate a patient with nephrolithiasis. *Urol Clin North Am.* 2000;27(2):203-13.
11. Robinson MR, Norris RD, Sur RL, Preminger GM. Urolithiasis: not just a 2-legged animal disease. *J Urol.* 2008;179(1):46-52.
12. Preminger GM, Pak CY. The practical evaluation and selective medical management of nephrolithiasis. *Semin Urol.* 1985;3(3):170-84.
13. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int.* 1978;13(5):361-71.

14. Worcester EM, Nakagawa Y, Wabner CL, Kumar S, Coe FL. Crystal adsorption and growth slowing by nephrocalcin, albumin, and Tamm-Horsfall protein. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):F1197-205.
15. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(1):426-30.
16. Hess B. Tamm-Horsfall glycoprotein--inhibitor or promoter of calcium oxalate monohydrate crystallization processes? *Urol Res.* 1992;20(1):83-6.
17. Ogawa Y, Yonou H, Hokama S, Oda M, Morozumi M, Sugaya K. Urinary saturation and risk factors for calcium oxalate stone disease based on spot and 24-hour urine specimens. *Front Biosci.* 2003;8:a167-76.
18. Scales CD, Jr., Curtis LH, Norris RD, Springhart WP, Sur RL, Schulman KA, et al. Changing gender prevalence of stone disease. *J Urol.* 2007;177(3):979-82.
19. Heller HJ, Sakhaee K, Moe OW, Pak CY. Etiological role of estrogen status in renal stone formation. *J Urol.* 2002;168(5):1923-7.
20. Yoshioka I, Tsujihata M, Momohara C, Akanae W, Nonomura N, Okuyama A. Effect of sex hormones on crystal formation in a stone-forming rat model. *Urology.* 2010;75(4):907-13.
21. Robertson WG, Peacock M. The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron.* 1980;26(3):105-10.
22. Youngjermchan P PS, Ratchanon S, Tosukhowong P, Tungsanga K and Boonla C. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J.* 2006;50(9):605-21.
23. Matlaga BR, Shah OD, Assimos DG. Drug-induced urinary calculi. *Rev Urol.* 2003;5(4):227-31.
24. Saltel E, Angel JB, Futter NG, Walsh WG, O'Rourke K, Mahoney JE. Increased prevalence and analysis of risk factors for indinavir nephrolithiasis. *J Urol.* 2000;164(6):1895-7.
25. Siener R, Ebert D, Hesse A. Urinary oxalate excretion in female calcium oxalate stone formers with and without a history of recurrent urinary tract infections. *Urol Res.* 2001;29(4):245-8.

26. Kadlec AO, Greco K, Fridirici ZC, Hart ST, Vellos T, Turk TM. Metabolic syndrome and urinary stone composition: what factors matter most? *Urology*. 2012;80(4):805-10.
27. Fellstrom B. DBG, Britakarlstrom, Lithell H., Junghall S. and VessbyB. Dietary Habits in Renal Stone Patients Compared with Healthy Subjects Dietary Habits in Renal Stone Patients Compared with Healthy Subjects. *British Journal of Urology*. 1989;63:575-80.
28. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med*. 2002;346(2):77-84.
29. Bovornpadungkitti S, Sriboonlue P, Tavichakorntrakool R, Prasongwatana V, Suwantrai S, Predanon C, et al. Potassium, sodium and magnesium contents in skeletal muscle of renal stone-formers: a study in an area of low potassium intake. *J Med Assoc Thai*. 2000;83(7):756-63.
30. Sayer JA, Simmons NL. Urinary stone formation: Dent's disease moves understanding forward. *Exp Nephrol*. 2002;10(3):176-81.
31. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int*. 2013;2013:292953. กรมมหาวิทยาลัย
32. Rizvi SA, Naqvi SA, Hussain Z, Hashmi A, Hussain M, Zafar MN, et al. Pediatric urolithiasis: developing nation perspectives. *J Urol*. 2002;168(4 Pt 1):1522-5.
33. Agewall S, Wikstrand J, Ljungman S, Fagerberg B. Usefulness of microalbuminuria in predicting cardiovascular mortality in treated hypertensive men with and without diabetes mellitus. Risk Factor Intervention Study Group. *Am J Cardiol*. 1997;80(2):164-9.
34. Haffner SM, Stern MP, Gruber MK, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Microalbuminuria. Potential marker for increased cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects? *Arteriosclerosis*. 1990;10(5):727-31.
35. B. S. Proteinuria: A Comprehensive Approach to Diagnosis. *Royal Thai Army Medical Journal*. 2011;64:155-64.

36. Carroll MF, Temte JL. Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *Am Fam Physician*. 2000;62(6):1333-40.
37. Kashif W, Siddiqi N, Dincer AP, Dincer HE, Hirsch S. Proteinuria: how to evaluate an important finding. *Cleve Clin J Med*. 2003;70(6):535-7, 41-4, 46-7.
38. Naderi AS, Reilly RF. Primary care approach to proteinuria. *J Am Board Fam Med*. 2008;21(6):569-74.
39. Menon MC, Chuang PY, He CJ. The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. *Int J Nephrol*. 2012;2012:749010.
40. Bagga A, Sinha A. Evaluation of renal tubular acidosis. *Indian J Pediatr*. 2007;74(7):679-86.
41. Hoyer JR, Seiler MW. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int*. 1979;16(3):279-89.
42. Rothschild M OMaSS. Albumin Synthesis and Degradation. In: *Proceedings of the workshop on albumin*, Sgouris JT. 1975:57-4.
43. Kaysen GA, Yeun J, Depner T. Albumin synthesis, catabolism and distribution in dialysis patients. *Miner Electrolyte Metab*. 1997;23(3-6):218-24.
44. Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *Jama*. 2015;313(8):837-46.
45. Koroshi A. Microalbuminuria, is it so important? *Hippokratia*. 2007;11(3):105-7.
46. de Jong PE, Gansevoort RT, Bakker SJ. Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strength? *J Nephrol*. 2007;20(4):375-80.
47. 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;429:81-9.
48. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics*. 2009;2009.

49. Blonder J, Issaq HJ, Veenstra TD. Proteomic biomarker discovery: it's more than just mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2011;32(13):1541-8.
50. Siriporn Proungvitaya WK, Montira Janan, Tanakorn Proungvitaya. Proteomics tools for medical researches. *J Med Tech Phy Ther*. 2012;24(2):120-7.
51. Scherp P, Ku G, Coleman L, Kheterpal I. Gel-based and gel-free proteomic technologies. *Methods Mol Biol*. 2011;702:163-90.
52. Matta A, Ralhan R, DeSouza LV, Siu KW. Mass spectrometry-based clinical proteomics: head-and-neck cancer biomarkers and drug-targets discovery. *Mass Spectrom Rev*. 2010;29(6):945-61.
53. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
54. Becker CH, Bern M. Recent developments in quantitative proteomics. *Mutat Res*. 2011;722(2):171-82.
55. Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47.
56. Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJ. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc*. 2009;4(4):484-94.

## ภาคผนวก

### Reagent และ Solution สำหรับขั้นตอน In gel digestion

- 1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  stock (FW 79.06): 3.95 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  /50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .
  - 50 mM ammonium bicarbonate (0.5 mL ของ 1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 9.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
  - 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (ใส่ 5 mL ของ 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ต่อ 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
  - 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ใน 50% ACN (ใส่ 5 mL ของ 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ต่อ 5 mL acetonitrile)
  - 50% Acetonitrile/0.1%TFA ในน้ำ
  - 12.5 ng / $\mu\text{L}$  trypsin ( $\sim 0.5 \mu\text{M}$ ) in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (เตรียมทันทีก่อนที่จะใช้) อีกวิธีหนึ่งสร้างขึ้นมาใหม่โดยใช้ 20  $\mu\text{g}$  Promega trypsin ใน 1.6 mL ของ 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , aliquot และ freeze (แนะนำให้ใช้ -80 องศาเซลเซียส) หลีกเลียงการ freeze และ thawing เอนไซม์
  - Trifluoroacetic acid
  - Trypsin porcine
  - Ammonium Hydrogen Carbonate (Ammonium Bicarbonate)
  - DL-Dithiothreitol
  - Iodoacetamide
- การเตรียมสารละลายใหม่สำหรับขั้นตอนการ Reduction และ Alkylation

1. 10 mM DL-Dithiothreitol (DTT) ใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2. 55 mM iodoacetamide ใน 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (10 mg/ml) ต้องเตรียมโดยป้องกัน

ไม่ให้โดนแสงและควรเก็บไว้ในที่มืด

เอกสารตอบรับการเข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Burapha University  
International Conference 2015

Dear Thasinas Dissayabutra,

Congratulations! We are pleased to inform that your paper number 140 entitled Elevated urinary protein and albumin excretion rate in the descendants of renal stone patients has been OFFICIALLY ACCEPTED for presentation at Burapha University International Conference 2015 (BUU 2015).

This is an official notification.

We would like to invite you to present the aforementioned paper at BUU 2015 conference to be held at Bangsaen Heritage Hotel, Bangsaen Beach, Chonburi, Thailand on 10-12 July 2015. Please note that you must complete your registration by the deadlines announced in the conference website. Once registered, no-show policy will be applied. Please study the details of the policy and how to register in <http://www.buuconference.buu.ac.th> in 'Call for Papers' section.

The details of your presentation schedule and equipment will be updated on the website as soon as they are available.

For Thai participants, the official invitation letter including the conference documents can be downloaded from <http://www.buuconference.buu.ac.th/images/buu2015/letter220558.pdf>

Best wishes,

BUU 2015 Secretariat





**ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์**

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	นางสาว สุภาวดี มิ่งมงคล
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Supawadee Mingmongkol
วัน เดือน ปีเกิด	19 ตุลาคม พ.ศ. 2533
เพศ	หญิง
อายุ	24 ปี
โทรศัพท์	086-1549404
E-mail:	supawadee_mingmongkol@hotmail.com
ที่อยู่ปัจจุบัน	15 หมู่ 1 ตำบลบางบุตร อำเภอบ้านค่าย จังหวัดระยอง 21120
ประวัติการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย