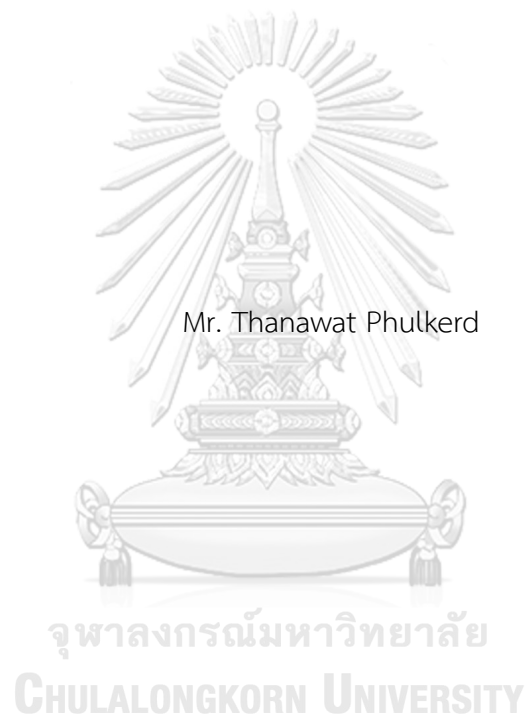


โครงการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อทำนายภาวะการฟื้นตัวจากภาวะไตวาย  
เฉียบพลัน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Determination Of Using MicroRNAs For Predicting Recovery From Acute Kidney Injury



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	โครงการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อ ทำนายภาวะการฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน
โดย	นายธนวรรษ พูลเกิด
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	นายแพทย์สฤติ พิรพรรัตน์ นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจตทะนง แก้วสงคราม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์สฤติ พิรพรรัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กำพล สุวรรณพิมลกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(นาวาอากาศตรี นายแพทย์อนันต์ เชื้อสุวรรณ)

ธนวรรษ พูลเกิด : โครงการศึกษาการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอเพื่อทำนายภาวะการฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน. ( Determination Of Using MicroRNAs For Predicting Recovery From Acute Kidney Injury) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นายแพทย์สุดดี พิพรรัตน์, นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

ความเป็นมา: การฟื้นตัวของไตมีความสำคัญต่อผลลัพธ์ของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน จากข้อมูลปัจจุบันกล่าวถึงไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกยีน โดยส่งผลกระทบต่อสร้างโปรตีนซึ่งจะสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในการตอบสนองภาวะไตวายเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดของไมโครอาร์เอ็นเอกับการฟื้นตัวของไต

วัตถุประสงค์: เพื่อค้นหาและทดสอบไมโครอาร์เอ็นเอในปัสสาวะและเลือดเพื่อใช้ทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันแบบรุนแรง

วิธีการ: การศึกษาการสังเกตแบบไปข้างหน้าในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือนมิถุนายน 2020 ถึงเดือนมกราคม 2021 โดยนำตัวอย่างจากปัสสาวะและซีรัมที่เก็บจากผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันขั้นที่ 3 หลังจากนั้นติดตาม 28 วันได้แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไม่ฟื้นตัว โดยคำจำกัดความของภาวะการฟื้นตัวของไตมี 2 ข้อคือ ระดับครีเอตินินในเลือดกลับสู่ปกติและถ้ามีประวัติเดิมได้รับการล้างไตมาก่อนจะต้องหยุดล้างไตเป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน ซึ่งในขั้นตอนค้นพบได้ใช้นาโนสตริงเพื่อวิเคราะห์หาไมโครอาร์เอ็นเอที่ต้องการ หลังจากนั้นทำการทดสอบโดยการวัดหาระดับไมโครอาร์เอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบย้อนกลับ (Real-time polymerase chain reaction)

ผลลัพธ์: ในระยะค้นพบได้นำปัสสาวะ 10 ตัวอย่างและเลือด 9 ตัวอย่างโดยเก็บวันแรกของการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันขั้นที่ 3 ซึ่งนำมาวิเคราะห์เพื่อค้นหาไมโครอาร์เอ็นเอด้วยนาโนสตริง พบว่าระดับไมโครอาร์เอ็นเอในกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ไม่ฟื้นตัว โดยการศึกษาในปัสสาวะพบการเพิ่มขึ้นของ miR-556-3p (5.96, p=0.004), miR-1915-3p (5.87, p=0.02), miR-4284 (8.88, p=0.04) และการลดลงของ miR-32-5p (-2.29, p=0.005), miR-96-5p (-2.14, p=0.02), miR-556-5p (-5.61, p=0.04) ขณะที่ในเลือดพบการเพิ่มขึ้นของ miR-499b-5p (3.6, p=0.04) และการลดลงของ miR-30a-3p (-2.18, p=0.002), miR-92b-3p (-6.29, p=0.001) และ miR-770-5p (-7.88, p=0.001) หลังจากนั้นนำไมโครอาร์เอ็นเอดังกล่าวเข้าสู่ขั้นตอนการทดสอบในผู้ป่วย 95 คน พบว่า miR-556-3p ในปัสสาวะมีค่าสูงชันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไม่ฟื้นตัว โดย miR-556-3p ในปัสสาวะมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.63 (95%CI; 0.51-0.76, p = 0.04) และรูปแบบทางคลินิกเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไตโดยมีการใช้คะแนนชีพาที่ไม่ใช้ค่าที่เกี่ยวข้องกับไตมาคำนวณ ค่าความเข้มข้นเลือด และค่าครีเอตินินวันแรกของการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันขั้นที่ 3 มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.78 (95%CI; 0.68-0.89, p <0.01) และเมื่อเรานำรูปแบบทางคลินิกร่วมกับ miR-556-3p ในปัสสาวะพบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.82 (95%CI; 0.72-0.91, p <0.01)

สรุป: งานวิจัยนี้ได้ศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันเป็นครั้งแรกในกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฟื้นตัว พบว่า miR-556-3p ในปัสสาวะสามารถช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา           อายุรศาสตร์  
ปีการศึกษา         2563

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6270036930 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: MicroRNAs Renal recovery Renal non-recovery Acute kidney injury

Thanawat Phulkerd : Determination Of Using MicroRNAs For Predicting Recovery From Acute Kidney Injury. Advisor:  
Assoc. Prof. Dr. NATTACHAI SRISAWAT Co-advisor: Dr. SADUDEE PEERAPORN RATANA, Dr. TRAIRAK PISITKUN

Background: Recent data showed that microRNAs (miRNAs) play an essential role in the posttranscriptional regulation of gene expression and cell differentiation in response to kidney injury. However, its contribution to the recovery from AKI is not well understood.

Objective: To discover and validate miRNAs profile in urine and serum for predicting renal recovery from severe AKI.

Method: A prospective observational study was conducted at King Chulalongkorn Memorial hospital between June 2020 to January 2021. Urine and serum samples of participants with AKI stage 3 were collected. The participants were divided into two groups at day 28: patients with renal recovery and patients with renal non-recovery. Transcriptomic analysis was performed using the NanoString miRNA Expression Assay. Then the expression level of candidate miRNAs was tested using quantitative real-time polymerase chain reaction in Validation phase.

Results: In Discovery phase, 10 urine samples and 9 blood samples on the first day of enrollment (the first day of AKI stage 3) were randomly selected. Based on nCounter miRNA Expression Assay, the transcriptomic profile of the renal recovery group found to be significantly different from the renal non-recovery group. The study discovered the upregulation of miR-556-3p, miR-1915-3p, miR-4284 and downregulation of miR-32-5p, miR-96-5p, miR-556-5p in the urine samples while the upregulation of miR-499b-5p and down regulation of miR-30a-3p, miR-92b-3p and miR-770-5p was discovered in the serum samples. Ninety-five participants were enrolled in the Validation phase. Urine miR-556-3p was significantly higher in the renal recovery group compared to the renal non-recovery group. Urine miR-556-3p alone predicted renal recovery with an area under the curve (AUC) of 0.63 (95%CI; 0.51-0.76,  $p=0.04$ ). A clinical model using non-renal SOFA score, hematocrit and creatinine on the first day of AKI stage 3 predicted renal recovery with AUC 0.78 (95%CI; 0.68-0.89,  $p < 0.01$ ). Combining this clinical model with urine miR-556-3p predicted renal recovery with AUC 0.82 (95%CI; 0.72-0.91,  $p < 0.01$ ).

Conclusion: This data provides the first evidence that the microtranscriptome profiles of patients with renal recovery were different from non-recovery group. Urine miR-556-3p might be novel a biomarker for predicting renal recovery.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2020

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความเมตตาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากรศ.ดร.นพ. ญัฐชัย ศรีสวัสดิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก โดยให้คำปรึกษาและแนะนำการทำวิจัยอย่างถูกต้อง ร่วมกับเสนอแนวคิดที่เป็นส่วนช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการวิจัยมาโดยตลอดจนโครงการเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณพยาบาลในแต่ละแผนกได้แก่ แผนกอายุรกรรม แผนกศัลยกรรม แผนกศัลยกรรมทรวงอก และแผนกผู้ป่วยระยะวิกฤต รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคไตในภาวะวิกฤตแห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูลและเก็บตัวอย่างเลือดอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ดูแลทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการครั้งนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมาตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ และน้องอายุรแพทย์โรคไตที่ช่วยหาอาสาสมัครทำให้งานวิจัยลุล่วงด้วยดี รวมทั้งกราบขอบพระคุณมารดาที่เป็นกำลังใจให้เสมอมาครับผม

ธนวรรษ พูลเกิด



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
บทที่ 1 .....	1
บทที่ 2 .....	5
บทที่ 3 .....	18
บทที่ 4 .....	21
บทที่ 5 .....	30
บทที่ 6 .....	35
บรรณานุกรม.....	36
ประวัติผู้เขียน.....	41

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ระยะความรุนแรงของภาวะไตวายเฉียบพลัน (Staging severity of AKI) <sup>3</sup> .....	5
ตารางที่ 2 ระยะความรุนแรง AKD (acute kidney disease) .....	6
ตารางที่ 3 คำจำกัดความของการฟื้นตัวของไตในแต่ละการศึกษา .....	9
ตารางที่ 4 คำจำกัดความของตัวชี้วัดที่ทำนายการฟื้นตัวของไตโดยใช้ปัสสาวะเป็นเกณฑ์ในแต่ละการศึกษา .....	11
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของ miRNAs กับภาวะไตวายเฉียบพลันในแต่ละการศึกษา.....	15
ตารางที่ 6 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรศึกษาระหว่าง 2 กลุ่มในระยะค้นพบ miRNAs .....	22
ตารางที่ 7 ผลลัพธ์การฟื้นตัวของไตในโรงพยาบาล.....	24
ตารางที่ 8 จุดตัดของค่า miR556-3p ในปัสสาวะที่แตกต่างกันเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต.....	27
ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ตัวแปรเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต .....	27
ตารางที่ 10 การวิเคราะห์เป็นลำดับเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต .....	28
ตารางที่ 11 การจัดประเภทใหม่ตามความเสี่ยง (Risk reclassification) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการทำนายการฟื้นตัวของไตจากโมเดลทางคลินิกกับกลุ่มที่มีการทำนายการฟื้นตัวของไตโดยใช้ miRNA 556-3p ร่วมกับโมเดลทางคลินิก.....	29



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดแนววิจัย.....	2
รูปภาพที่ 2 ภาวะการอักเสบของไตวายเฉียบพลัน .....	6
รูปภาพที่ 3 กลไกพยาธิสรีระวิทยาของภาวะไตวายเฉียบพลัน <sup>7</sup> .....	7
รูปภาพที่ 4 กลไกการฟื้นตัวของไต จาก David A. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney aging and CKD. <sup>4</sup> กล่าวถึงกลไกการฟื้นตัวของไตโดยเริ่มตั้งแต่การกำจัดเซลล์ที่ตายและการเปลี่ยนแปลงแมโครฟาจ ถัดมาเป็น epithelial dedifferentiation และสุดท้ายเกิดภาวะ proliferation ร่วมกับ redifferentiation ของเนื้อเยื่อที่ไต .....	8
รูปภาพที่ 5 แสดงถึงตัวชี้วัดทางชีวภาพจากอดีตสู่ปัจจุบัน.....	12
รูปภาพที่ 6 ขั้นตอนการเกิดและหน้าที่ของ miRNAs ในเซลล์ .....	14
รูปภาพที่ 7 แผนภูมิของผู้เข้าร่วมการศึกษาแบบไปข้างหน้าที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3 .....	21
รูปภาพที่ 8 การวิเคราะห์ด้วย volcano plot และ heatmap ในระยะทดสอบพบการแสดงออกของ miRNA ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญ .....	25
รูปภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ microRNAs ด้วยวิธี Real time PCR ทั้งในปัสสาวะและเลือดระหว่างกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว (ตามลำดับ) .....	26

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไตวายเฉียบพลันเป็นภาวะที่เกิดจากการสูญเสียความสามารถของไตอย่างเฉียบพลันในการขจัดของเสีย เช่นยูเรีย รวมทั้งการสูญเสียความสามารถในการควบคุมสารน้ำและเกลือแร่ ซึ่งภาวะนี้พบบ่อยมากขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยระยะวิกฤตจากรายงานพบประมาณ 20% - 50% ของผู้ป่วยระยะวิกฤตทั่วโลก<sup>1</sup> โดยเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันตาม KDIGO 2012 ดูจากการเปลี่ยนแปลงของค่าครีเอตินินในเลือดที่เพิ่มขึ้นหรือจากปัสสาวะที่ลดลง และการเพิ่มขึ้นของระยะของไตวายเฉียบพลันสัมพันธ์กับอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น<sup>1</sup> จากการศึกษาที่ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัวหลังจากเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันพบว่ากลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัวเพิ่มอัตราการเป็นไตวายเรื้อรังและอัตราการตายอย่างชัดเจน<sup>2</sup> นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัวเพิ่มอัตราการตายถึง 59% จึงเป็นที่มาของการสนใจในเรื่องการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน

กลไกพยาธิสรีระวิทยาของภาวะไตวายเฉียบพลันในกรณีที่มีการอักเสบของเซลล์ในท่อไตไม่รุนแรง ร่างกายจะปรับตัวโดยการเกิดภาวะสูญเสียการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ชั่วคราว หลังจากนั้นมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและการเปลี่ยนสภาพกลับของเซลล์เยื่อบุท่อไตให้เหมือนเดิม แต่ถ้ายังคงมีภาวะการอักเสบดำเนินต่อไปหรือรุนแรงมากขึ้นจะกระตุ้นการตายของเซลล์ท่อไตและกระตุ้นการเกิดพังผืดของไตมากขึ้น ส่งผลให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังหรือภาวะไตวายที่ต้องล้างไตตลอดชีวิตได้ การทำนายในเรื่องการฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลันจากอดีตถึงปัจจุบันแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะแรกนั้นดูจากปริมาณปัสสาวะที่ออก (Urine output) และระดับครีเอตินินที่ลดลงเป็นตัวช่วยในการทำนายการฟื้นตัวของไต แต่อย่างไรก็ตามการใช้ตัวชี้วัดไม่ว่าจะเป็นปัสสาวะที่ออกหรือระดับครีเอตินินที่ลดลงนั้นล้วนแต่เป็นปลายทางที่บอกว่าไตฟื้นตัวหรือไม่ จึงเป็นที่มาของการสนใจหาตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จะใช้ทำนายการฟื้นตัวของไตตั้งแต่เริ่มต้นได้

ระยะต่อมาเป็นยุคที่เริ่มมีการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพในการทำนายการเกิดภาวะฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลันเช่น urine NGAL เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก็พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC: area under the curve) ประมาณ 0.70-0.87 ซึ่งยังน้อยกว่าค่าที่ต้องการคือมากกว่า 0.9

เมื่อก้าวเข้าสู่ยุคปัจจุบันได้เริ่มมีการศึกษาระดับโมเลกุลของเซลล์ในไตมากขึ้นรวมทั้งมีการศึกษาเกี่ยวกับระดับโมเลกุลหลายตัวที่สัมพันธ์กับเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันเช่น miRNA21, miR-

200c, miR-423 เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาไหนที่พูดถึงระดับโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน

ดังนั้นจากที่ไม่มีตัวชี้วัดทางชีวภาพไหนที่สามารถทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้อย่างแม่นยำพอร่วมกับยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับระดับโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน จึงเป็นที่มาของวิจัยนี้ที่สนใจระดับโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์ว่ามีตัวไหนบ้างที่จะสามารถทำนายการฟื้นตัวของไตได้

## 1.2 คำถามของการวิจัย

การตรวจการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ในปัสสาวะสามารถช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้หรือไม่

## 1.3.วัตถุประสงค์ของการวิจัย

### วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในปัสสาวะเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไตในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน

### วัตถุประสงค์รอง

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในเลือดสามารถทำนายการฟื้นตัวของไตในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน

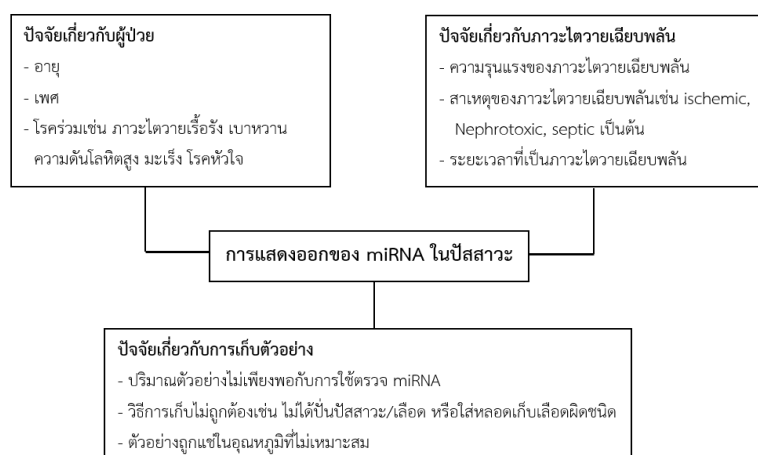
## 1.4 สมมติฐานของการวิจัย

การแสดงออกของ miRNA ในปัสสาวะสามารถช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน

## 1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

## 1.6 กรอบความคิดแนววิจัย



รูปภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดแนววิจัย

## 1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

### 1.7.1 คำจำกัดความของภาวะไตวายเฉียบพลัน<sup>(3)</sup>

- มีระดับครีเอตินินในเลือดเพิ่มขึ้น 0.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตรใน 48 ชม. หรือเพิ่มขึ้น 1.5 เท่าจากของเดิม (โดยเกิดขึ้นใน 7 วัน) หรือมีปัสสาวะออกน้อยกว่า 0.5 มิลลิตร/กิโลกรัม/ชั่วโมงในเวลา 6 ชม.

- สำหรับในกรณีผู้ป่วยไม่มีค่าระดับครีเอตินินในเลือดเดิม ให้คิดจากสูตรคำนวณ 2010 MDRD back bone<sup>(31)</sup>

### 1.7.2 ภาวะฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน (Renal recovery)<sup>(7)</sup>

โดยนับวันแรกเป็นวันที่เริ่มเข้าการศึกษาและติดตามผู้ป่วยถึงวันที่ 28 โดยมี

- ระดับครีเอตินินในเลือด < 1.5 เท่าของค่าระดับครีเอตินินเดิมผู้ป่วย และ
- มีชีวิตอยู่ และ
- ถ้าผู้ป่วยมีประวัติล้างไตในขณะนั้น ต้องหยุดล้างไตอย่างน้อย 2 สัปดาห์

### 1.7.3 ภาวะไม่ฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน (Renal non-recovery)<sup>(7)</sup>

โดยนับวันแรกเป็นวันที่เริ่มเข้าการศึกษาและติดตามผู้ป่วยถึงวันที่ 28 โดยมี

- ภาวะที่ผู้ป่วยยังคงมีระดับครีเอตินินในเลือดมากกว่า 1.5 เท่าของค่าระดับครีเอตินินเดิมผู้ป่วย หรือ
- จำเป็นต้องมีการล้างไตในขณะนี้ หรือ
- เสียชีวิต

## 1.8 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

### 1.8.1 ในด้านหลักความเคารพในบุคคล

- อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาจะต้องสมัครใจยินยอมเข้าร่วมดำเนินโครงการด้วยตนเองหรือผู้แทนโดยชอบธรรม โดยต้องได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยและแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด

- อาสาสมัครมีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัย เมื่อใดก็ได้โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ส่งผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะพึงได้รับต่อไป

- อาสาสมัครจะถูกเก็บข้อมูลส่วนตัวเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากอาสาสมัครเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและ

ประมวลข้อมูลของอาสาสมัคร ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ทางอาสาสมัครได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ได้

### 1.8.2 ในด้านหลักการให้ประโยชน์/ไม่ก่อให้เกิดอันตราย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่มีการวิเคราะห์ข้อมูลจากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ โดยอาสาสมัครที่สมัครใจยินยอมเข้าร่วมดำเนินโครงการจะได้รับการเจาะเลือดจำนวน 15 ซีซีและเก็บปัสสาวะจำนวน 50 ซีซีโดยจะทำการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันระดับที่ 3 โดยนำตัวอย่างเลือดและปัสสาวะไปวิเคราะห์หาตัวชี้วัดทางชีวภาพซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเกิดประโยชน์ต่ออาสาสมัครโดยตรงในการช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตวายเฉียบพลัน

### 1.8.3 ในด้านหลักความยุติธรรม

การศึกษานี้ได้กำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าและออกจากการศึกษาที่ชัดเจน

## 1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยและอุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

### 1.9.1 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

- ค้นพบตัวชี้วัดทางชีวภาพทั้งในปัสสาวะและเลือดที่สามารถทำนายการฟื้นตัวของภาวะไตวายเฉียบพลัน
- ในอนาคตสามารถนำตัวชี้วัดทางชีวภาพดังกล่าวมาช่วยในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยเพื่อลดภาวะที่จะเกิดไตวายเรื้อรังซึ่งจะส่งผลให้รายจ่ายของระดับประเทศที่ลดลง จากการที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในปริมาณมากของกลุ่มไตวายเรื้อรัง
- สามารถนำตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ค้นพบมาใช้ทำนายสาเหตุการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันที่ถูกต้องและแม่นยำได้มากขึ้น ซึ่งมีผลต่อการรักษาที่ถูกต้องและทำให้ลดภาวะแทรกซ้อนที่ตามมาจากภาวะไตวายเฉียบพลัน

### 1.9.2 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรฐานการแก้ไข

- ไม่สามารถหาอาสาสมัครได้ครบตามจำนวนในระยะเวลาที่กำหนดไว้
  - ภาวะสิ่งแวดล้อมอื่นที่มากกระทบต่อการฟื้นตัวของไต เช่น ยาที่ใช้ในระหว่างการศึกษา การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณชีพ และภาวะแทรกซ้อนจากตัวโรคของผู้ป่วยหรือจากการรักษา เป็นต้น
- แนวทางป้องกันและแก้ไข**
- วางแผนและสร้างเครือข่ายกับแพทย์ที่ดูแลผู้ป่วยในหอผู้ป่วย เพื่อให้สามารถได้พบเคสและนำเข้าการศึกษาได้มากขึ้น หรือสุดท้ายอาจขยายเวลาหากมีความจำเป็น

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ภาวะไตวายเฉียบพลัน<sup>3</sup> คือ ภาวะที่มีระดับครีเอตินินในเลือดเพิ่มขึ้น 0.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตรใน 48 ชม. หรือเพิ่มขึ้น 1.5 เท่าจากของเดิม (โดยเกิดขึ้นใน 7 วัน) หรือมีปัสสาวะออกน้อยกว่า 0.5 มิลลิิตร/กิโลกรัม/ชั่วโมงในเวลา 6 ชม. โดยภาวะนี้ได้แบ่งระยะความรุนแรงเป็น 3 ระดับคือ

ตารางที่ 1 ระยะความรุนแรงของภาวะไตวายเฉียบพลัน (Staging severity of AKI)<sup>3</sup>

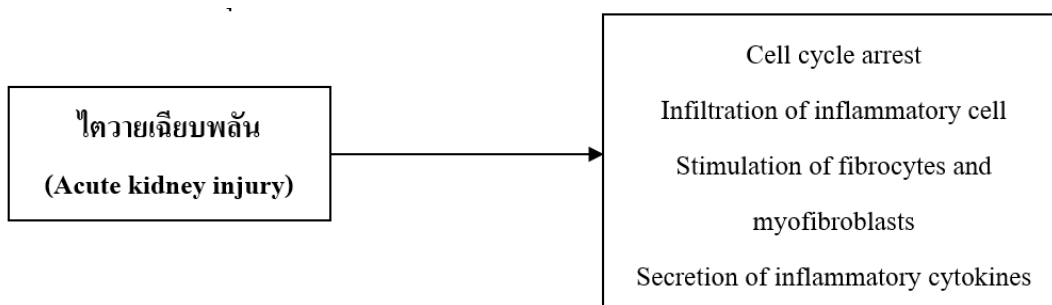
ระยะไตวาย	ระดับครีเอตินินในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	ปริมาณปัสสาวะ (มิลลิิตร)
1	1.5-1.9 เท่าจากของเดิมหรือเพิ่มขึ้น $\geq 0.3$ มก./ดล.	< 0.5 มล./กก./ชม. ใน 6-12 ชม.
2	2.0-2.9 เท่าจากของเดิม	< 0.5 มล./กก./ชม. มากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชม.
3	3.0 เท่าจากของเดิม หรือ serum creatinine $\geq 4$ มก./ดล. หรือผู้ป่วยที่เริ่มล้างไต	< 0.3 มล./กก./ชม. มากกว่าหรือเท่ากับ 24 ชม. หรือ ปัสสาวะไม่ออก (anuria) มากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชม.

ภาวะการอักเสบของไตวายเฉียบพลัน<sup>4</sup> จะเกิดกลไกดังต่อไปนี้

- Endothelial injury and oxygen delivery จากที่มีภาวะของการอักเสบทำให้มีผลต่อการหดตัวของเส้นเลือดแดงซึ่งส่งผลต่อความดันและแรงต้านทานของเส้นเลือดแดงทำให้การขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อที่ไหลด้น้อยลง เป็นเหตุให้เนื้อเยื่อดังกล่าวขาดออกซิเจนและปล่อยสาร transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าวนี้จะสัมพันธ์กับการทำนายการฟื้นตัวของไตในอนาคต โดยภาวะดังกล่าวส่งผลต่อการหยุดของวัฏจักรของเซลล์ที่ได้รับการอักเสบ

- The cellular immune response การตอบสนองนี้จะมีการเคลื่อนย้ายของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเม็ดเลือดขาวที่มีการตอบสนองก่อนคือ นิวโทรฟิลโดยจะมารวมกันที่บริเวณ interstitial ของไตและมีการหลั่งสารกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบเช่น IL-7 หลังจากนั้นเม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนย้ายในลำดับถัดมาคือ โมโนไซด์และแมคโครฟาจ (macrophages) โดยเฉพาะ Ly6Chi subset โดยหน้าที่ของ macrophages นั้นจะช่วยในการกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลและกำจัดเซลล์เยื่อบุท่อไตที่ตายซึ่ง Ly6Chi M1 inflammatory subset เป็นแมคโครฟาจที่อยู่ในเนื้อเยื่อไตที่อักเสบ เมื่อมีการ

หายไปของ Ly6Chi และ M1 กลายเป็น M2 (จะเกิดเมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 5 วัน)<sup>5</sup> โดยที่ Macrophages of the Ly6Clo M2 subtype เชื่อว่า สัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตในผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน หลังจากนั้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จะมาในลำดับถัดไปทั้งเป็นตัวช่วยในการกำจัดเซลล์ที่ตายและควบคุมในกลไกการอักเสบ



รูปภาพที่ 2 ภาวะการอักเสบของไตวายเฉียบพลัน

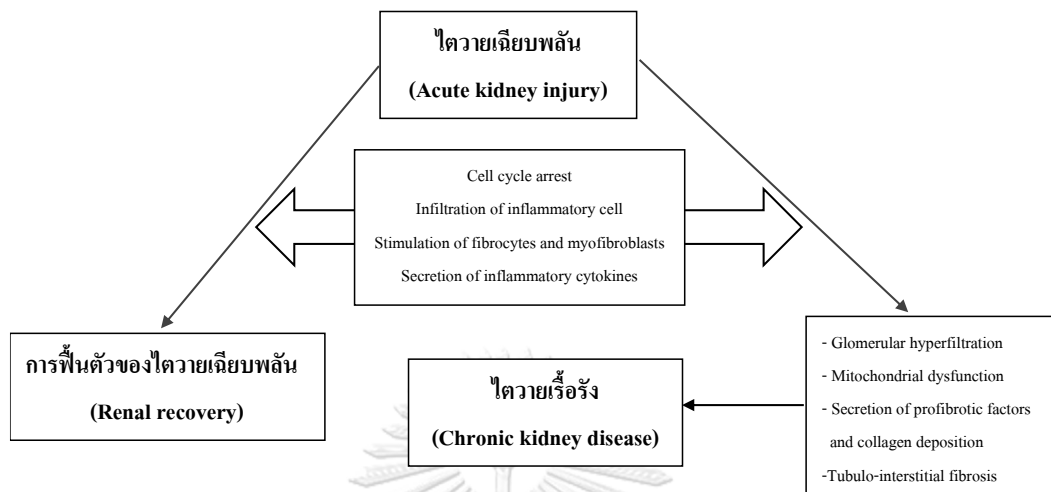
อย่างไรก็ตามถ้าภาวะการอักเสบดังกล่าวนั้นยังคงดำเนินต่อเนื่องโดยใช้ระยะเวลามากกว่า 1 สัปดาห์แต่ไม่เกิน 3 เดือนจะเรียกค่านิยามภาวะ AKD (acute kidney disease)<sup>6</sup>

ตารางที่ 2 ระยะเวลาความรุนแรง AKD (acute kidney disease)

ระยะ ความรุนแรง	คำจำกัดความ
0	A: ไม่มีหลักฐานของภาวะการอักเสบอยู่ แต่ยังมีปัจจัยเสี่ยงของภาวะไตวายเฉียบพลัน B: มีหลักฐานว่ายังมีภาวะการอักเสบอยู่โดยดูจากตัวชี้วัดทางชีวภาพหรือจากตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงการหายไปของเนื้อเยื่อที่ไต โดยที่ระดับครีเอตินินในเลือดกลับสู่ค่าปกติแล้ว C ระดับครีเอตินินในเลือด < 1.5 เท่าจากของเดิม แต่ไม่กลับสู่ค่าปกติ
1	ระดับครีเอตินินในเลือด 1.5-1.9 เท่าจากของเดิม
2	ระดับครีเอตินินในเลือด 2.0-2.9 เท่าจากของเดิม
3	ระดับครีเอตินินในเลือด $\geq 3.0$ เท่าจากของเดิมหรือระดับครีเอตินินในเลือด $\geq 4$ มก./ดล. หรือยังมีภาวะต้องล้างไตอยู่ในขณะนี้

เมื่อภาวะการอักเสบนั้นยังคงดำเนินต่อไปโดยระยะเวลาเกิน 3 เดือนก็จะนำไปสู่การกลายเป็นไตวายเรื้อรังและอาจนำไปสู่การล้างไตในอนาคตหรือแบบตลอดชีวิตซึ่งบ่งบอกถึงอัตราการตายที่เพิ่ม

ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีคนอีกกลุ่มหนึ่งที่เมื่อมีภาวะไตวายเฉียบพลันแล้วสามารถมีการฟื้นตัวของไตกลับมาโดยภาวะนี้จะส่งผลต่อการทำนายในเรื่องอัตราการตายและการล้างไตในอนาคตที่ลดลงได้



รูปภาพที่ 3 กลไกพยาธิสรีระวิทยาของภาวะไตวายเฉียบพลัน<sup>7</sup>

### การฟื้นตัวของไต

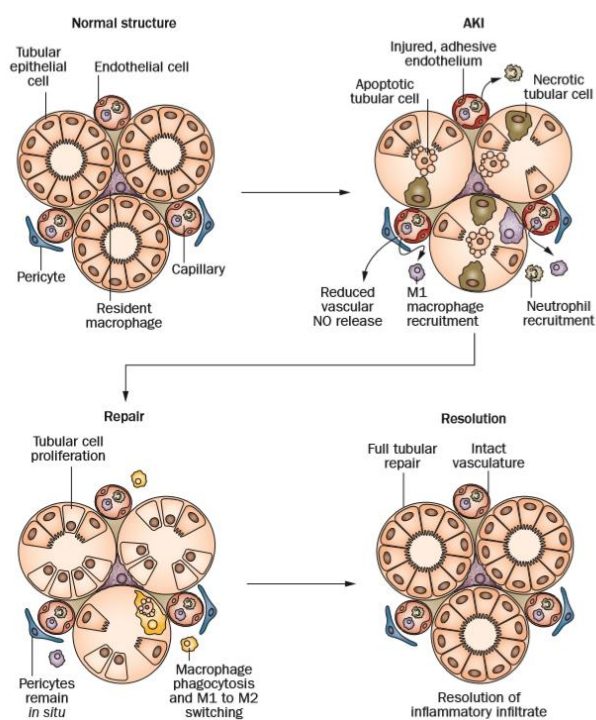
พยาธิวิทยาของภาวะไตวายเฉียบพลันนั้นประกอบไปด้วยบทบาทของการอักเสบที่ท่อไต การไหลเวียนของโลหิตที่คงที่และการอักเสบที่เนื้อเยื่อไตโดยที่การรอดของ proximal tubular epithelial cells เป็นบทบาทเด่นในขบวนการฟื้นตัวของไต

อันดับแรก proximal tubular epithelial cells ของไตจะปรากฏภาวะ dedifferentiation คือ การหายไปของ apical basal polarity และการหายไปของ tight junctions มีการลดการแสดงออกของ epithelial cell markers และเพิ่มการแสดงออกของ mesenchymal cell หรือ fibroblast markers

หลังจากนั้นก็จะเกิดภาวะ proliferation และ redifferentiation ก็คือมีการลดลงของ mesenchymal cell markers และมีการเพิ่มขึ้นของ epithelial cell markers และนำไปสู่การกลับมาทำหน้าที่ของ proximal tubular epithelial cells<sup>8</sup> ตามปกติ



สารที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ เช่น hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), bone morphogenic protein-7 และ transforming growth factor- $\beta$  ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ไตโดยการทำงานร่วมกับ transmembrane receptors ของ tubular epithelial cells<sup>9,10</sup>



รูปภาพที่ 4 กลไกการฟื้นตัวของไต จาก David A. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney aging and CKD.<sup>4</sup> กล่าวถึงกลไกการฟื้นตัวของไตโดยเริ่มตั้งแต่การกำจัดเซลล์ที่ตายและการเปลี่ยนแปลงแมคโครฟาจ ถัดมาเป็น epithelial dedifferentiation และสุดท้ายเกิดภาวะ proliferation ร่วมกับ redifferentiation ของเนื้อเยื่อที่ไต

จากหลายการศึกษาที่กล่าวถึงภาวะการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้ให้คำนิยามที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 3 คำจำกัดความของการฟื้นตัวที่ไตในแต่ละการศึกษา

การศึกษา	ผู้เข้าร่วมวิจัย	ตัวชี้วัดชีวภาพ (biomarkers)	คำจำกัดความของการฟื้นตัวที่ไต	ผลลัพธ์
Srisawat et al. <sup>11</sup> A multicenter, prospective, Cohort study 2011	181 คนที่เป็น community-acquired pneumonia และAKI ตาม RIFLE	เลือด: NGAL และ IL-6	ยังมีชีวิตและไม่ต้องล้างไตในระหว่างนอนรพ. และค่าครีเอตินิน < 1.5 เท่าของค่าเดิม	- pNGAL สามารถทำนายการไม่ฟื้นของไต โดยระดับมากกว่า 257 ng/mL
Srisawat et al. <sup>12</sup> Cohort study 2011	ผู้ป่วยระยะวิกฤต 76คนที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันและต้องการล้างไต	ปัสสาวะ: NGAL, HGF, cystatin C, IL-18, NGAL/matrix, metalloproteinase protein-9 และ Creatinine	มีชีวิตและสามารถหยุดล้างไตมากกว่า 2เดือน	- ระดับ uNGAL ที่ลดลงเมื่อเกิน14 วัน ช่วยทำนายการฟื้นตัวของไต -ระดับ Uhgf ลดลงเมื่อเกิน 14 วัน ช่วยทำนายการฟื้นตัวของไต
Moon et al. <sup>13</sup> 2015	66 คนที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน	ปัสสาวะ: NGAL และ cystatin C	มีระดับครีเอตินินในเลือดลดลงมากกว่า 50%เมื่อเทียบกับตอนสูงสุด	ระดับ uNGAL วันที่ 0 ใช้ในการทำนายฟื้นของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน
Meersch et al. <sup>14</sup> Prospective study 2015	26 คนที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันหลังจากผ่าตัดหัวใจ	ปัสสาวะ: TIMP-2*IGFBP7	-ระดับครีเอตินินสูงหรือต่ำกว่าค่าเดิมเมื่อคิดช่วงตอนกลับบ้าน	- การลดลงของ TIMP2 *IGFBP7 ระหว่าง 4 และ 24 ชั่วโมงหลังผ่าตัด ช่วยทำนายการฟื้นตัวของไต

### ปัจจัยที่มีผลต่อการไม่ฟื้นตัวของไตในผู้ป่วยที่มีไตวายเฉียบพลัน มีดังนี้

- **อายุ** โดยมักสัมพันธ์ในผู้ป่วยที่มีอายุมากโดยกลไกนั้นยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Srisawat et al. ได้กล่าวถึงความสัมพันธ์ในผู้ป่วยที่อายุมากกับการไม่ฟื้นตัวของไตในกลุ่มผู้ป่วย 181 คน ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันร่วมกับปอดติดเชื้อแบบ community-acquired pneumonia<sup>11</sup> และในกลุ่มผู้ป่วยระยะวิกฤต 76 คนที่มีการล้างไต<sup>12</sup> แต่อย่างไรก็ตามบางการศึกษาพบว่าอายุไม่ได้สัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตเช่น จาก Schiff et al. ได้ศึกษาผู้ป่วยระยะวิกฤต 226 คนที่มีไตวายเฉียบพลันและต้องล้างไตพบว่าอายุไม่ได้สัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไต<sup>15</sup> หรือ การศึกษาของ Moon's study ที่ทำในผู้ป่วยจำนวน 66 คนที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันพบว่า อายุไม่ได้มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ไตฟื้นตัวกับกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว<sup>16</sup>

- **ประวัติไตวายเรื้อรัง** ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีต่อการฟื้นตัวของไตได้ถึงแม้ในเรื่องนี้จะมี การศึกษาน้อย โดยมีการศึกษาของ Susan H.<sup>17</sup> ที่ศึกษาผู้ป่วยที่มีภาวะไตเสื่อมอยู่เดิม 2,262 คน ที่มานอนรพ.ทั้งของอายุรกรรมและศัลยกรรม มีอัตราการเกิดไตวายเฉียบพลันที่สูงกว่าคนทั่วไป

- **ความรุนแรงของไตวายเฉียบพลัน** จากการศึกษาของ Benjamin J. ได้ทำการสังเกตผู้ป่วย ระยะวิกฤตตั้งแต่เดือนกันยายน 2000 จนถึงธันวาคม 2001 ของ 54 โรงพยาบาลใน 23 ประเทศว่า ความรุนแรงของไตขณะนั้นอาจจะสามารถช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตได้ แต่อย่างไรก็ตามการ ประเมินคะแนนของความรุนแรงที่ต่างกันในแต่ละการศึกษาก็ย่อมมีผลต่อการทำนายการฟื้นตัวของ ไตที่ต่างกัน โดยได้มีบางการศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวเช่น Uchino S.<sup>18</sup> เป็นต้น

- **สาเหตุของไตวายเฉียบพลัน** จากการศึกษาของ Fan Yang<sup>19</sup> ที่ศึกษาผู้ป่วย 271 คนที่มีไต วายเฉียบพลันตั้งแต่ธันวาคม 2008 ถึง 2011 พบว่า สาเหตุของไตวายเฉียบพลันมีความสัมพันธ์กับ การฟื้นตัวของไต

### การทำนายการฟื้นตัวของไต (Clinical predictors of renal recovery)

เนื่องจากการทำนายการฟื้นตัวของไตนั้นจะสามารถช่วยบ่งบอกถึงโอกาสการเป็นไตวาย เรื้อรังที่มาจากไตวายเฉียบพลัน รวมทั้งอัตราการตายที่สูงขึ้นในกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว ทำให้ในปัจจุบันมี ตัวชี้วัดที่ช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตอย่างหลากหลายดังนี้

- **ตัวชี้วัดทั่วไปหรือดั้งเดิม (Conventional marker)**

การทำนายการฟื้นตัวของไตในสมัยก่อนได้มีการใช้เครื่องมือโดยประเมินเป็นคะแนนเช่น APACHE II และ SOFA score แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษา<sup>18</sup> โดยการใช้เครื่องมือดังกล่าวบอกถึง อัตราการตายที่สูงขึ้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับคะแนนที่สูงขึ้น แต่ในเรื่องการประเมินการฟื้นตัวของไต พบว่ายังไม่แน่นอนและไม่สามารถยืนยันถึงระดับคะแนนที่เหมาะสมต่อการทำนายการฟื้นตัวของไต จากภาวะไตวายเฉียบพลันได้ ทำให้ในสมัยนั้นยังนิยมใช้เรื่องปริมาณปัสสาวะที่ออก (Urine output)

เป็นตัวช่วยในการทำนายการฟื้นตัวของไต และถึงแม้ว่าเรื่องปริมาณปัสสาวะที่ออกจะอยู่ในข้อบ่งชี้ของการวินิจฉัยเรื่องไตวายเฉียบพลันรวมทั้งใช้ในการแบ่งระยะของภาวะไตวายเฉียบพลันร่วมด้วย แต่ก็พบว่า มีการศึกษาค่อนข้างน้อยในการใช้ปริมาณปัสสาวะมาทำนายการฟื้นตัวของไตซึ่งได้มีการศึกษา Macedo et al.<sup>20</sup> ได้กล่าวถึงปริมาณปัสสาวะที่ออกน้อยลงนั้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการตาย การเพิ่มขึ้นของระยะเวลาการนอนในหอผู้ป่วยวิกฤต การเพิ่มขึ้นในเรื่องการล้างไต และการเพิ่มขึ้นของการนอนโรงพยาบาลที่นานขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ BEST kidney study<sup>21</sup> เป็นแบบการสังเกตไปข้างหน้าโดยทำ 54 ยูนิทของหอผู้ป่วยระยะวิกฤตใน 23 ประเทศซึ่งพบว่า ปริมาณปัสสาวะที่ออกนั้นโดยที่ไม่ได้ยาขับปัสสาวะจะช่วยในการทำนายการหยุดล้างไตได้ ซึ่งต่อมาได้มี 3 การศึกษาที่กล่าวถึงปริมาณปัสสาวะที่สัมพันธ์กับการหยุดการล้างไต และนำไปสู่การทำนายของการฟื้นตัวของไตในกลุ่มผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน

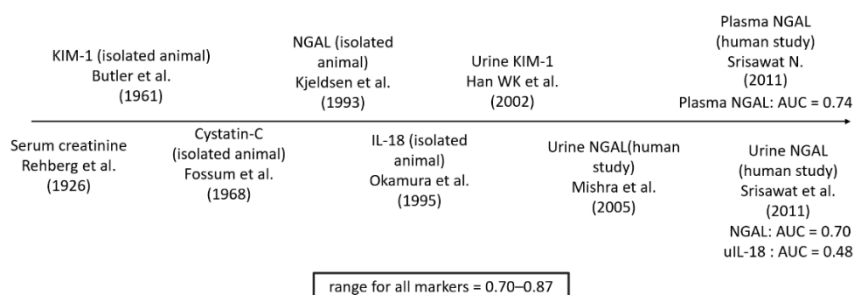
ตารางที่ 4 คำจำกัดความของตัวชี้วัดที่ทำนายการฟื้นตัวของไตโดยใช้ปัสสาวะเป็นเกณฑ์ในแต่ละการศึกษา

การศึกษา	คำจำกัดความ
AKIKI study <sup>22</sup>	ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 2,000 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง หรือ ไม่ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 1,000 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง
ELAIN study <sup>23</sup>	ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 2,100 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง หรือ ไม่ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 400 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง และต้องมีค่า urine creatinine clearance มากกว่า 20 มิลลิลิตร/นาที
IDEAL-ICU study <sup>24</sup>	ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 2,000 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง หรือ ไม่ได้ยาขับปัสสาวะ : ปัสสาวะออกมากกว่า 1,000 มิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง และมีการลดลงของค่าครีเอตินินในเลือด

#### ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker)

ในยุคถัดมาเป็นยุคของตัวชี้วัดชีวภาพ (biomarkers) ที่ช่วยในการทำนายการฟื้นตัวของไต เนื่องจากเริ่มมีการศึกษาถึงการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันมากขึ้นซึ่งจากพยาธิสภาพและกลไกการฟื้นตัวของไตนั้นทำให้มีการค้นพบตัวชี้วัดชีวภาพ (biomarker) หลายตัวเช่น Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) เป็นตัวที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในบริบทของภาวะไตวายเฉียบพลันหรือแม้แต่ในกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตซ้ำจากภาวะไตวายเฉียบพลัน การส่งตรวจ

NGAL ก็ยังพอมีประโยชน์ในการช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตได้นอกจาก NGAL ยังมีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ตัวอื่นอีกหลายตัว เช่น KIM-1 เป็นต้น



รูปภาพที่ 5 แสดงถึงตัวชี้วัดทางชีวภาพจากอดีตสู่ปัจจุบัน

จากการศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพตั้งแต่ปี 1961 ใน KIM-1 และปี 1993 ใน NGAL ที่ทำในหลอดทดลองโดยพบว่า สูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันและเป็นที่มาของการเริ่มมาตรวจในมนุษย์ในการวินิจฉัยภาวะไตวายเฉียบพลันและทำนายการฟื้นตัวของไตนั้นมาสู่ปัจจุบันที่มีการศึกษาของ Srisawat et al.<sup>11</sup> ได้กล่าวถึงการเพิ่มขึ้นของระดับ pNGAL ในเลือดมีความสัมพันธ์กับการไม่ฟื้นตัวของไต ถึงแม้เมื่อนำมาคิดค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the receiver operating characteristics curve = 0.74) จะไม่สูงมากแต่ก็สามารถนำมาใช้ร่วมทำนายการฟื้นตัวของไตได้ นอกจากนี้ก็การศึกษาหนึ่งของ Srisawat et al. ที่เกี่ยวกับการตรวจสอบชีวภาพในปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยระยะวิกฤตที่มีการล้างไต<sup>12</sup> โดยเก็บปัสสาวะในวันที่ 1, 7, 14 ในผู้ป่วยทั้งหมด 76 คนและนำมาตรวจหา ระดับของ NGAL, HGF, Cystatin C, uIL-18, uNGAL/MMP-9 เพื่อนำมาใช้ในการทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันพบว่า ในผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตจะมีระดับ Cystatin C ในปัสสาวะที่สูงในวันที่ 1 และระดับ HGF ในปัสสาวะที่ต่ำในวันที่ 7 และ 14 ส่วนในเรื่องการทำนายการฟื้นตัวของไตนั้นพบว่า การลดลงของระดับ NGAL และ uHGF ในปัสสาวะที่ 14 วันแรกสัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไต นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอื่น เช่น KIM-1 โดยจากการศึกษา Wenqing Yin<sup>12</sup> คือการนำชิ้นเนื้อที่ไตในผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันมาหาค่า KIM-1 ร่วมกับการวัดหาความสัมพันธ์กับระดับครีเอตินินในเลือด พบว่า KIM-1 มีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the receiver operating characteristics curve = 0.87 ในผู้ใหญ่) ซึ่งแสดงถึงความไวและจำเพาะต่อภาวะการอักเสบของท่อไต นอกจากนี้เมื่อนำสัดส่วนของ KIM-1/sCr สามารถนำมาใช้ในการทำนายการฟื้นตัวของไตได้ถึงแม้ว่าขณะนั้นค่าครีเอตินินยังไม่กลับมาปกติ

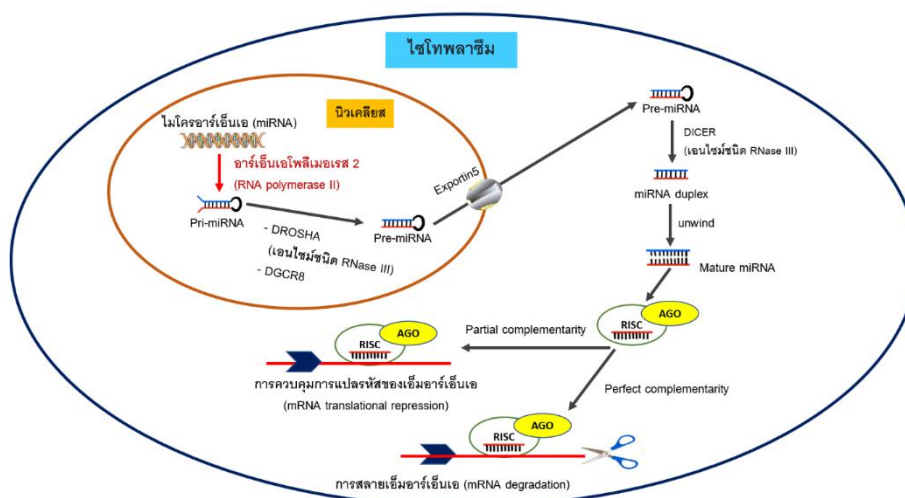
ดังนั้นจากข้อมูลการศึกษาทั้งหมดในเรื่องตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) พบว่า ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the receiver operating characteristics curve) เฉลี่ยอยู่ที่ 0.70-0.87 ซึ่งก็ยังไม่ดีพอที่จะนำมาใช้ในการทำนายการฟื้นตัวของไต

## ทรานสคริปโตมิกส์ (Transcriptomics)

เมื่อก้าวเข้าสู่ยุคปัจจุบันได้เริ่มมีการสนใจเกี่ยวกับระดับโมเลกุลของเซลล์เพิ่มมากขึ้นในการดูภาวะการพันตัวของไตโดยสมัยก่อนนั้นได้มีการศึกษาถึงความผิดปกติของระดับเซลล์ แต่ก็ไม่สามารถใช้บ่งบอกว่าถึงสาเหตุที่แท้จริงของภาวะไตวายเฉียบพลันรวมทั้งการพันตัวของไตทำให้เริ่มมีการสนใจถึงคำว่า epigenetics ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนเพราะในมนุษย์เรามีพื้นฐานลำดับของ DNA เหมือนกันแต่สิ่งที่ทำให้เราแตกต่างกันในแต่ละคนนั้นคือ การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโครมาตินโดยเอนไซม์จะทำให้ transcription factor และโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องสามารถเข้ามาทำปฏิกิริยาและเกิดผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกันออกไป โดยภาวะ epigenetics แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

- **การเกิด DNA methylation** จะเป็นการปรับเปลี่ยนตำแหน่ง cytosine ให้เป็น 5-methylcytosine (5mC) โดยการเติมกลุ่ม methyl ที่ตำแหน่ง C-5 ของ cytosine residue ซึ่งอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) หลังจากนั้น CpG island ที่ถูก methylation แล้วจะเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมที่ methylated DNA binding proteins เช่น MECP2 มาจับซึ่งโปรตีนเหล่านี้มักจะมีคุณสมบัติที่หยุดการเกิด transcription
- **การเกิด Histone modification** โดย Histone H3 และ H4 จะมีส่วนที่ยื่นออกจากแกนกลางเรียกว่า tail ซึ่งจะมี amino acid จำเพาะเพื่อที่จะเกิดกระบวนการได้แก่ methylation, phosphorylation ซึ่งเมื่อเกิด แล้วจะมีปฏิกิริยาต่อโปรตีนเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน การเกิด histone modification จะต้องมีการเปลี่ยน histone ให้เกิดเป็นรหัสของ histone (histone code) และถูกอ่านโดยโปรตีนเพื่อควบคุมการ transcription ดังนั้นนอกจากขบวนการ DNA methylation แล้วต้องอาศัยการเกิด histone modification ร่วมด้วยในการควบคุมการ transcription โดยทั่วไปตำแหน่งที่มีการ transcription ของยีนอย่างต่อเนื่องจะมีระดับของ DNA ที่เกิดการ methylation ต่ำและมี histone ที่เกิดการ acetylation ในระดับที่สูง ในทางตรงกันข้ามยีนที่มีการทำงานน้อยหรือมีการ transcription น้อยจะมีระดับของ DNA ที่เกิดการ methylation สูงและมี histone ที่เกิดการ acetylation ใน ระดับที่ต่ำถึงแม้ว่าขบวนการ DNA methylation และ histone modification จะมีการควบคุมที่แยกกันไปแล้วทั้ง 2 ส่วนก็ยังคงมีความสัมพันธ์กัน
- **MicroRNA (miRNA) regulation** ไมโครอาร์เอ็นเอเป็น RNA ขนาดเล็กที่ไม่ได้ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน แต่มีผลต่อการแสดงออกของยีน โดยการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นในนิวเคลียสจากการ transcription ของ miRNA gene ต่อมาเอนไซม์ RNA polymerase II ทำการสร้างโมเลกุลที่เป็น precursor ได้แก่ pri-miRNA ซึ่งมีขนาดยาว หลังจากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNA polymerase III ได้แก่ Drosha เป็น pre-miRNA และถูกส่งออกมายังไซโตพลาสซึมโดยโปรตีน exportin-5 ต่อมาเอนไซม์ RNA polymerase III ชื่อ Dicer จะทำหน้าที่ตัด pre-miRNA เป็น

ไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่เรียกว่า miRNA-miRNA duplex และจะถูกแยกโดยเอนไซม์ RNA helicase โดยสาย miRNA หนึ่งจะไปรวมกับโปรตีนในกลุ่ม Argonaute family เกิดเป็น miRNA-induced silencing complex (miRISC) โดยจะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของแอสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) ส่วน miRNA อีกสายจะสลายไป การยับยั้งการสร้างโปรตีนโดย miRNA เกิดจากการจับกันของเบสคู่ระหว่าง miRNA และ mRNA ซึ่งเมื่อจับโดยสมบูรณ์ จะมีการสลายของ mRNA โดยการ endonucleolytic cleavage



รูปภาพที่ 6 ขั้นตอนการเกิดและหน้าที่ของ miRNAs ในเซลล์

Pri-miRNA (primary-miRNA ประมาณ 1,000 นิวคลีโอไทด์), Pre-miRNA (precursor-miRNA ประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์), Mature miRNA (ประมาณ 20-25 นิวคลีโอไทด์), DGCR8 (cofactor DiGeorge syndrome critical region gene 8), RISC (RNA-induced silencing complex), AGO (Argonaute) family

### ไมโครอาร์เอ็นเอที่อยู่นอกเซลล์ (Circulating miRNAs)<sup>25</sup>

ไมโครอาร์เอ็นเอส่วนมากพบในไซโทพลาซึมของเซลล์ แต่ก็สามารถพบนอกเซลล์ได้ซึ่งจะพบในของเหลวในร่างกายคือเลือด หรือของเหลวที่หลั่งออกมาจากร่างกายเช่น ปัสสาวะ น้ำนม เป็นต้น อย่างไรก็ตามไมโครอาร์เอ็นเอที่อยู่นอกเซลล์ (circulating microRNAs) มีลักษณะที่เสถียร ไม่สลายง่าย ซึ่งแตกต่างกับเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA: mRNA) ที่จะไม่เสถียรเมื่อถูกหลั่งออกมาจากร่างกาย เพราะมีเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonucleases) ที่อยู่ทั้งในเลือดและของเหลวที่หลั่งออกมาจากร่างกายซึ่งสามารถย่อยเอ็มอาร์เอ็นเอได้

ไมโครอาร์เอ็นเอในไซโทพลาซึมบางส่วนจะจับกับโปรตีนอโรนาอท์ (argonaute) ซึ่งอยู่ในกลุ่มโปรตีน RISC (RNA-induced silencing complex) และถูกนำออกจากเซลล์เป็นลักษณะแบบถุงน้ำ ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันเช่น ถุงน้ำขนาดเล็ก (microvesicles) มีขนาดตั้งแต่ 50 ถึง 1,000 นาโนเมตร และถุงน้ำเอกโซโซม (exosomes) มีขนาดตั้งแต่ 30 ถึง 100 นาโนเมตร ปัจจุบันจากการศึกษามีการ

สนใจดูน้ำเอ็กโซโซมมากขึ้นเนื่องจากประกอบด้วย เอ็มอาร์เอ็นเอ ไมโครอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ โปรตีน และสารชีวโมเลกุลต่างๆ ซึ่งจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยดูน้ำเอ็กโซโซมจะถูกหลั่งมาจากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก เซลล์ต้นกำเนิดของไต เซลล์บุผนังหลอดเลือด และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) เป็นต้น

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของหลายการศึกษาที่จะแยกสารไมโครอาร์เอ็นเอออกจากเอ็กโซโซมที่ถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ การแยกสารไมโครอาร์เอ็นเอในเลือดโดยใช้ชุดตรวจมีหลายแบบเช่น miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen), Total RNA isolation kit (Norgen) และ TRIzol Reagent เป็นต้น ส่วนในกรณีที่ต้องการแยกสารไมโครอาร์เอ็นเอจากปัสสาวะซึ่งมาจากไตหรือทางเดินปัสสาวะก็มีชุดตรวจหลายแบบเช่น Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในเลือดและของเหลวที่หลั่งออกมาจากร่างกายจะมีชนิดและปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งในสภาวะปกติและผิดปกติเช่น ภาวะไตวายเฉียบพลัน เป็นต้น นอกจากนี้มีบางการศึกษากล่าวถึงปริมาณไมโครอาร์เอ็นเอที่พบในเลือดพบว่าปริมาณลดลงในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังแบบรุนแรงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีการทำหน้าที่ของไตลดลงเล็กน้อย<sup>26</sup> ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ต่าง ๆ ในภาวะไตวายเฉียบพลันดังนี้

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของ miRNAs กับภาวะไตวายเฉียบพลันในแต่ละการศึกษา

การศึกษา	รูปแบบการศึกษา	ประชากร	ตัวอย่างตรวจ miRNA	ผลลัพธ์
Ramachandran K and et al. <sup>27</sup> 2013	Cross-sectional cohort	<b>ระยะค้นพบ</b> - ไตวายเฉียบพลัน 6 คน - คนสุขภาพดี 6 คน <b>ระยะทดสอบ</b> -ผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันทั้งหมด 98 คน: ผู้ป่วยในไอซียู 71 คน และผู้ป่วยปลุกถ่าย อวัยวะที่ไต 27 คน -บุคคลที่ไม่มีไตวายเฉียบพลันทั้งหมด 97 คน: คนสุขภาพดี 74 คนและผู้ป่วยไอซียูที่ไม่มีไตวายเฉียบพลัน 23 คน	ปัสสาวะ	ค้นพบ 4 miRNAs - miR-21 - miR-200c - miR-423 - miR-4640



การศึกษา	รูปแบบการศึกษา	ประชากร	ตัวอย่างตรวจ	ผลลัพธ์
Du et al. <sup>28</sup> 2013	Cohort	ผู้ป่วยหลังผ่าตัดหัวใจ จำนวน 120 คน - มีไตวายเฉียบพลัน 80 คน - ไม่มีไตวายเฉียบพลัน 40 คน	ปัสสาวะ เลือด	พบระดับmiR-21สูงทั้งในเลือดและปัสสาวะ โดยสัมพันธ์กับภาวะไตวายเฉียบพลัน
Lan et al. <sup>29, 30</sup> 2012	cross-sectional cohort	- ผู้ป่วยในไอซียูที่มีไตวายเฉียบพลัน 16 คน - ผู้ป่วยในไอซียูที่ไม่มีไตวายเฉียบพลัน 10 คนและคนสุขภาพดี 14 คน	ปัสสาวะ	miR-494 สัมพันธ์กับไตวายเฉียบพลัน
Saikumar et al. <sup>31</sup> 2012	cross-sectional cohort	- ผู้ป่วยในไอซียูที่มีไตวายเฉียบพลัน 22 คน - คนสุขภาพดี 25 คน	ปัสสาวะ	มีการเพิ่มของ miR-21 และ miR-155 สัมพันธ์กับไตวายเฉียบพลัน
Lorenzen et al. 2011	cross-sectional cohort	- ผู้ป่วยในไอซียูที่มีไตวายเฉียบพลัน 77 คน - ผู้ป่วยในไอซียูที่ไม่มีไตวายเฉียบพลัน 18คน (MI) และคนสุขภาพดี 30 คน	เลือด	ในผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันพบว่า miR-16, miR-320 ลดลง แต่พบmiR-210 เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาเหล่านี้จึงเป็นที่มาของการสนใจใน miRNAs เพื่อนำไปสู่การค้นหาความสัมพันธ์ที่ใช้ในการทำนายการฟื้นตัวของไตได้ วิธีการค้นหา miRNA มีหลายวิธี เช่น qPCR assays (quantitative real time PCR), miRNA arrays, RNA-Seq เป็นต้น ในที่นี้จะพูดถึงวิธีการหาไมโครอาร์เอ็นเอที่เรียกว่า prebuilt miRNA assays ซึ่งในงานวิจัยนี้เราจะใช้ nCounter miRNA expression assay

โดยจะสามารถนับจำนวนของโมเลกุลทางชีวภาพได้อย่างแม่นยำด้วยวิธีบาร์โคดเรืองแสง (Fluorescent Barcodes) ทำให้เราสามารถได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูงสำหรับการแสดงออกของยีน

**nCounter miRNA expression assay** ประกอบไปด้วย

- 1 The nCounter Analysis System เป็นระบบประกอบไปด้วย 2 อย่าง คือ
  - The Prep Station เป็นอุปกรณ์ automated fluidic instrument โดยจะนำ CodeSet complexes เข้ามาประมวลผล
  - The Digital Analyzer ใช้วิเคราะห์ข้อมูลโดยจากการนับ fluorescent barcodes
- 2 Code Sets เป็น sets of color-coded probes pre-mixed with a set of system controls

**ขั้นตอนการทำด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay**

1. นำ miRNA ที่ได้มาจากปัสสาวะ, เลือด, และเนื้อเยื่อมาเข้าสู่กระบวนการไฮบริดเซชัน (Hybridization) โดยการเลือก reporter probe และ capture probe มาใส่เพื่อจับกับ miRNA เป็น target-probe complex
2. หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยบัฟเฟอร์และไปใส่ในคาร์ทริดจ์ (cartridge) เพื่อเตรียมนำไปนับจำนวนตามบาร์โคดที่ติด (fluorescent barcodes)
3. นำคาร์ทริดจ์ (cartridge) ที่ได้ไปใส่ในเครื่อง nCounter miRNA expression assay เพื่อนับจำนวน miRNA ในแต่ละกลุ่มตาม fluorescent barcodes

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษาแบบ Prospective observational Study

#### 3.2. ระเบียบวิธีการวิจัย

##### ประชากรที่ศึกษา

ผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันอยู่ในระยะที่ 3 ตามคำจำกัดความของ KDIGO AKI 2012<sup>(3)</sup>

##### เกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมงานวิจัย

- อายุตั้งแต่ 18 ปี
- ผู้ป่วยมีภาวะไตวายเฉียบพลันอยู่ในระยะ 3 คือ
  - มีค่าระดับครีเอตินินในเลือด  $\geq 3.0$  เท่าจากของเดิมหรือระดับครีเอตินินในเลือด  $\geq 4$  มิลลิกรัม/เดซิลิตรหรือผู้ป่วยที่เริ่มล้างไต หรือปริมาณปัสสาวะ  $< 0.3$  มล./กก./ชม. มากกว่าหรือเท่ากับ 24 ชม. หรือปัสสาวะไม่ออก (anuria) มากกว่าหรือเท่ากับ 12 ชม.
- ผู้ป่วยที่ปัสสาวะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 3 เซลล์ต่อเลนส์วัตถุกำลังขยายสูง ( $< 3/HPF$ ) หรือถ้าพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแต่ไม่พบภาวะเม็ดเลือดแดงผิดปกติ

##### เกณฑ์การคัดเลือกรอกจากการศึกษา

- โรคไตเรื้อรังที่มีอัตราการกรองของไตน้อยกว่า 60 มล./นาที/1.73 ตารางเมตร
- มีภาวะตั้งครรภ์
- มะเร็งในระยะลุกลาม
- ผู้ป่วยที่มีไตข้างเดียว
- ผู้ป่วยที่มีประวัติล้างไตในช่วง 30 วันก่อนเข้ารับการวิจัย
- มีประวัติปลูกถ่ายอวัยวะที่ไตมาก่อน

#### 3.3 ขนาดตัวอย่าง

แบ่งเป็น 2 ระยะคือ

##### ระยะค้นพบ (Discovery phase)

- ผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน 5 คน
- ผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน 5 คน

### ระยะทดสอบ (Validation)

- จากการศึกษา Srisawat N, Wen X, Lee M, Kong L, Elder M, Carter M, et al.

Urinary biomarkers and renal recovery in critically ill patients with renal support. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6(8):1815-23.(12) พบว่า ได้จำนวนขนาดตัวอย่างเป็น 100 คน  
Drop out rate 20% alpha( $\alpha$ ) = 0.05 beta( $\beta$ ) = 0.2

$$n = \frac{\left[ z_{\alpha} \sqrt{(1 + 1/m)\bar{p}(1 - \bar{p})} + z_{\beta} \sqrt{p_0(1 - p_0)/m + p_1(1 - p_1)} \right]^2}{(p_0 - p_1)^2}$$

$$\bar{p} = \frac{p_1 + mp_0}{m + 1}$$

$$n_c = \frac{n}{4} \left( 1 + \sqrt{1 + \frac{2(m + 1)}{nm|p_0 - p_1|}} \right)^2$$

### 3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ

#### 1. ระยะค้นพบ miRNAs (Discovery phase) จะแบ่ง 2 กลุ่มคือ

- ผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน 5 คน
- ผู้ป่วยที่ไม่ฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน 5 คน

ตัวอย่างปัสสาวะ (จากงานวิจัยเลข IRB 794/62)

- ปริมาณ 50 มิลลิลิตร วิธีการเก็บปัสสาวะในกรณีปัสสาวะเองให้เก็บแบบ midstream
- เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนเข้าสู่กระบวนการแยกเซลล์

#### วิธีการ

- นำปัสสาวะไปปั่นที่ 3,000g ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาทีในหลอดปลอดเชื้อ (Falcon 50 มิลลิลิตร)
- ดูดส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ประมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดขนาดเล็กปลอดเชื้อ
- ดูด phosphate buffered saline (PBS) ปริมาณ 500 ไมโครลิตรผสมเข้าไปในหลอดปลอดเชื้อ
- หลังจากผสมเสร็จให้ดูดออกมา 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดขนาดเล็กปลอดเชื้ออีกหลอดและนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80° C

ตัวอย่างเลือด (จากงานวิจัยเลข IRB 794/62)

- ปริมาณ 15 มิลลิลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนเข้าสู่กระบวนการแยกเซลล์

#### วิธีการ

- ดูดเลือดจากผู้ป่วยใส่หลอด EDTA หรือ Clotted blood
- นำเลือดไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3. หลังจากนั้นดูส่วนที่เป็นซีรัม (liquid component) ลงในหลอดขนาดเล็กปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเก็บในอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

ปัสสาวะและเลือดจะเก็บวันแรกที่ผู้ป่วยเข้าวิจัย ซึ่งปัสสาวะและเลือดตัวอย่างที่เก็บนั้นจะถูกเก็บไว้ที่ตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$  ณ ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังจากนั้นจะนำมาค้นหา miRNAs ด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay

**2. ระยะทดสอบ (Validation phase)** คือการนำ miRNAs ที่ค้นพบมาทดสอบทั้งในปัสสาวะและเลือดที่เก็บไว้ตั้งแต่เริ่มต้นใน 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว โดยทดสอบด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real time PCR)

### 3.5 การรวบรวมข้อมูล

- มีทั้งแบบข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative data) และข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative Data)
- แหล่งข้อมูลนั้นมาจากปัสสาวะและเลือดของผู้ป่วย
- สถานที่เก็บข้อมูลคือ หอผู้ป่วยทั่วไปและหอผู้ป่วยระยะวิกฤต (ICU) ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยผู้วิจัยจะดำเนินการเก็บข้อมูลและบันทึกข้อมูล ซึ่งดูรายละเอียดได้จากแบบเก็บข้อมูลที่ได้จัดทำไว้

### 3.6 การเปิดเผยข้อมูลแสดงตัวตนของผู้ป่วย

ข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยจะถูกเก็บไว้เป็นความลับและจะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด สำหรับการนำข้อมูลไปวิเคราะห์จะใช้รหัสแทนตัวผู้ป่วยในแต่ละราย ส่วนในกรณีที่จะมีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยหรือนำเสนอผลงานวิชาการจะเสนอในภาพรวมของผลการวิจัยโดยจะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด หากมีความจำเป็นต้องแสดงข้อมูลที่เป็นตัวตนของผู้ป่วยจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเป็นลายลักษณ์อักษรเท่านั้น

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

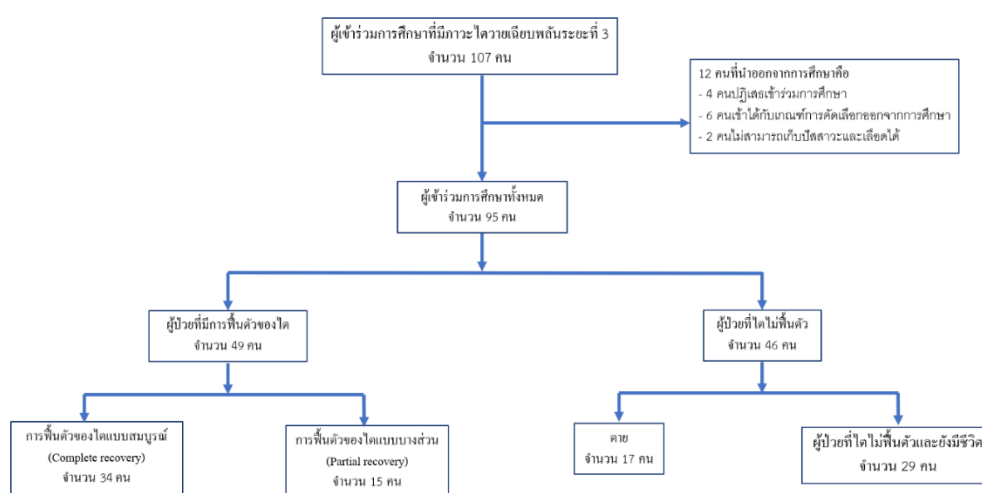
- ข้อมูลที่ได้จากปัสสาวะและเลือดของการศึกษาจะแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ยเลขคณิต  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในกรณีข้อมูลเชิงปริมาณและมีการกระจายตัวแบบปกติ
- ข้อมูลที่ได้จากปัสสาวะและเลือดของการศึกษาจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ยมัธยฐาน  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในกรณีข้อมูลกระจายตัวไม่ปกติ
- เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่เป็นตัวแปรจัดกลุ่ม (Categorical variable) โดยใช้ Chi-square test และเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่เป็นตัวแปรต่อเนื่อง (Continuous Variables) โดยใช้ unpaired t-test
- ค่า  $p < 0.05$  ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ
- โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ SPSS for window version 22

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 ประชากรศึกษาและข้อมูลพื้นฐาน

ผู้เข้าร่วมการศึกษาที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3 มีทั้งหมด 107 คน โดย 6 คนเข้าได้กับเกณฑ์การคัดเลือกออกจากการศึกษา และ 2 คนไม่สามารถเก็บปัสสาวะและเลือดได้ นอกจากนี้ 4 คนปฏิเสธเข้าร่วมการศึกษา ดังรูป



รูปภาพที่ 7 แผนภูมิของผู้เข้าร่วมการศึกษาแบบไปข้างหน้าที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3

ดังนั้นจึงเหลือผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 95 คน โดยหลังจากติดตามครบ 28 วันได้แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตจำนวน 49 คนและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ฟื้นตัวจำนวน 46 คน โดยอายุเฉลี่ยของผู้เข้าร่วมการศึกษาประมาณ 62 ปีและข้อมูลพื้นฐานของประชากรศึกษาระหว่าง 2 กลุ่มทั้งในระยะค้นพบและระยะทดสอบของ miRNAs ดังตารางที่ 6 โดยระยะค้นพบนั้นในปัสสาวะมีทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไต 5 ตัวอย่างและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ฟื้นตัว 5 ตัวอย่าง) และในเลือดมีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง (กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไต 4 ตัวอย่างและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ฟื้นตัว 5 ตัวอย่าง) ซึ่งจะถูกนำมาใช้วิเคราะห์หา miRNAs ด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay โดยข้อมูลพื้นฐานในระยะค้นพบของทั้งสองกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นเมื่อได้ miRNA ที่ต้องการแล้วก็จะนำไปสู่ระยะทดสอบต่อไป โดยข้อมูลพื้นฐานในระยะทดสอบของทั้งสองกลุ่มพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตมีค่า Non-renal SOFA ลดลงและมีค่า MAP เพิ่มขึ้นซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ฟื้นตัว แต่ในด้านอายุ เพศ น้ำหนัก โรคที่ปรากฏร่วมและสาเหตุหลักของไตวายเฉียบพลันไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรศึกษาระหว่าง 2 กลุ่มในระยะค้นพบ miRNAs

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย	ระยะค้นพบ (Nanostring)			ระยะทดสอบ (RT-qPCR)		
	ไตพื้นตัว (N = 5)	ไตไม่พื้นตัว (N = 5)	P value	ไตพื้นตัว (N = 49)	ไตไม่พื้นตัว (N = 46)	P value
<b>ข้อมูลพื้นฐานประชากร</b>						
อายุ (ปี)	72.4 ± 9.96	80.2 ± 8.87	0.22	59 ± 19	65 ± 15.68	0.09
เพศชาย (%)	1 (20)	2 (40)	1.00	32 (65.31)	26 (56.52)	0.38
น้ำหนัก (กิโลกรัม)	52.1 ± 8.68	55.7 ± 9.05	0.29	61 ± 14	59 ± 14.98	0.54
ส่วนสูง (เซนติเมตร)	157.8 ± 7.33	161.2 ± 6.30	0.45	163 ± 7.69	163 ± 7.19	0.87
BMI (กิโลกรัม/ตารางเมตร)	26.79 ± 6.51	20.90 ± 7.23	0.21	22.90 ± 4.66	22.27 ± 5.30	0.57
กินสมุนไพร/ยาที่มีผลต่อไต (%)	1 (20)	0	1.00	4 (8.16)	5 (10.87)	0.65
<b>โรคที่ปรากฏร่วม</b>						
เบาหวาน (%)	3 (60)	2 (40)	1.00	16 (32.65)	21 (45.65)	0.19
ความดันโลหิตสูง (%)	3 (60)	4 (80)	1.00	23 (46.94)	29 (63.04)	0.12
ไขมันในเลือดสูง (%)	2 (40)	2 (40)	1.00	16 (32.65)	20 (43.48)	0.28
หัวใจขาดเลือด (%)	2 (40)	2 (40)	1.00	5 (10.20)	9 (19.57)	0.20
มะเร็ง (%)	1 (20)	2 (40)	1.00	4 (8.16)	7 (15.22)	0.28
หลอดเลือดสมอง (%)	0	1 (20)	1.00	6 (12.24)	4 (8.70)	0.57
สูบบุหรี่ (%)	0	0		2 (4.08)	1 (2.17)	0.60
<b>สาเหตุหลักของไตวายเฉียบพลัน</b>						
Pre-renal/Ischemic ATN, (N, %)	0	0		18 (36.73)	15 (32.61)	0.67
Nephrotoxic AKI, (N, %)	0	0		5 (10.20)	2 (4.35)	0.27
Contrast induce AKI, (N, %)	0	0		0	2 (4.35)	
Septic AKI, (N, %)	5 (100)	5 (100)		25 (51.02)	25 (54.35)	0.75
Cast nephropathy, (N, %)	0	0		0	1 (2.17)	
Multifactorial, (N, %)	0	0		1 (2.04)	1 (2.17)	0.96
<b>การตรวจร่างกาย</b>						
อุณหภูมิ (°C)	36.94 ± 0.47	37.44 ± 0.94	0.32	36.97 ± 0.68	37.30 ± 0.73	0.03
SBP (mmHg)	123.6 ± 10.78	122.4 ± 19.22	0.91	133 ± 22.13	117 ± 19.08	<0.01
MAP (mmHg)	83.8 ± 9.63	86 ± 9.35	0.72	96 ± 15.87	85 ± 13.63	<0.01

ตารางที่ 6 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรศึกษาระหว่าง 2 กลุ่มในระยะค้นพบ miRNAs (ต่อ)

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย	ระยะค้นพบ (Nanostring)			ระยะทดสอบ (RT-qPCR)		
	ไตฟื้นตัว (N = 5)	ไตไม่ฟื้นตัว (N = 5)	P value	ไตฟื้นตัว (N = 49)	ไตไม่ฟื้นตัว (N = 46)	P value
<b>ผลทางห้องปฏิบัติการ</b>						
ฮีโมโกลบิน (กรัม/เดซิลิตร)	9.42 ± 0.62	9.12 ± 1.76	0.73	9.70 ± 2.11	9.06 ± 1.42	0.09
ฮีมาโทคริต (%)	28.12 ± 3.03	27.88 ± 6.54	0.94	29.47 ± 6.37	26.92 ± 4.76	0.03
เม็ดเลือดขาว (x10 <sup>3</sup> ไมโครลิตร)	12.46 (7.01, 16.51)	10.02 (8.44, 15.49)	0.75	11.89 (8.59, 16.86)	12.98 (7.87, 17.2)	0.84
เกล็ดเลือด (x10 <sup>3</sup> ไมโครลิตร)	61 (22, 310.5)	247 (123.5, 274.5)	0.25	155 (65.50, 255)	158.15 (79.75, 249)	0.90
BUN (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	36 (35, 47.5)	52 (43.5, 99.5)	0.11	57 (42, 88)	52 (39, 74)	0.32
ค่าครีเอตินินเดิม (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	0.72 (0.70, 1.04)	1.00 (0.80, 1.06)	0.12	0.87 (0.75, 1.00)	0.93 (0.70, 1.20)	0.75
Baseline GFR (มิลลิลิตร/นาที)	74.85 ± 15.27	64.58 ± 13.03	0.29	79.23 ± 19.11	76.84 ± 27.03	0.64
ค่าครีเอตินินแรกรับในโรงพยาบาล (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	1.40 (0.99, 4.65)	1.6 (1.26, 4.05)	0.75	3.69 (2.35, 5.13)	2.94 (2.29, 4.13)	0.27
โทแทสเซียม (มิลลิอิกวาเลนต์/ลิตร)	3.46 ± 0.34	4 ± 0.70	0.16	3.98 ± 0.89	3.98 ± 0.72	0.97
ไบคาร์บอเนต (มิลลิอิกวาเลนต์/ลิตร)	18 ± 5.20	20.6 ± 4.98	0.44	20.11 ± 6.69	19.96 ± 6.36	0.91
ค่า APACHE II	16 ± 1.92	18 ± 3.51	0.34	15 ± 5.47	16 ± 5.02	0.21
ค่า Non-renal SOFA	5 ± 4.56	5 ± 2	0.86	3 ± 2.66	6 ± 3.87	0.01

หมายเหตุ ATN: Acute tubular necrosis, SBP: Systolic blood pressure; MAP: Mean arterial pressure, BUN: Blood urea nitrogen, GFR: Glomerular filtration rate, NGAL: Neutrophil gelatinase associated lipocalin, APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

จากตารางที่ 7 แสดงผลลัพธ์การฟื้นตัวของไตในโรงพยาบาลโดยในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตพบว่าการใช้เครื่องช่วยหายใจ (34.69% และ 65.22%,  $p < 0.01$ ), การใช้ยากระตุ้นความดันโลหิต (30.61% และ 60.87%,  $p < 0.01$ ) และการล้างไตในโรงพยาบาล (44.89% และ 71.74%,  $p < 0.01$ ) น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตยังพบว่าระยะเวลาที่นอนในหอผู้ป่วยวิกฤต (11 และ 19 วัน,  $p = 0.02$ ) ระยะเวลาที่นอนในโรงพยาบาล (13 และ 23 วัน,  $p < 0.01$ ) และอัตราการตายในโรงพยาบาล (2.04% และ 50%,  $p < 0.01$ ) น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน



ตารางที่ 7 ผลลัพธ์การฟื้นตัวของไตในโรงพยาบาล

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย	จำนวน (%)		P-value
	ไตฟื้นตัว (N = 49)	ไตไม่ฟื้นตัว (N = 46)	
การใช้เครื่องช่วยหายใจ (Mechanical ventilation, %)	17 (34.69)	30 (65.22)	<0.01
การใช้ยากระตุ้นความดันโลหิต (Inotrope, %)	15 (30.61)	28 (60.87)	<0.01
มีการล้างไตในโรงพยาบาล (RRT, %)	22 (44.89)	33 (71.74)	<0.01
ระยะเวลาที่นอนในหอผู้ป่วยวิกฤต (วัน)	11 (6, 20)	19 (12, 40)	0.02
ระยะเวลาที่นอนในโรงพยาบาล (วัน)	13 (8, 24)	23 (14, 45)	<0.01
อัตราการตายในโรงพยาบาล (วัน)	1 (2.04)	23 (50)	<0.01

หมายเหตุ RRT: renal replacement therapy

#### 4.2 ระยะเวลาฟื้นตัว: การแสดงออกของ miRNAs ในปัสสาวะและเลือด

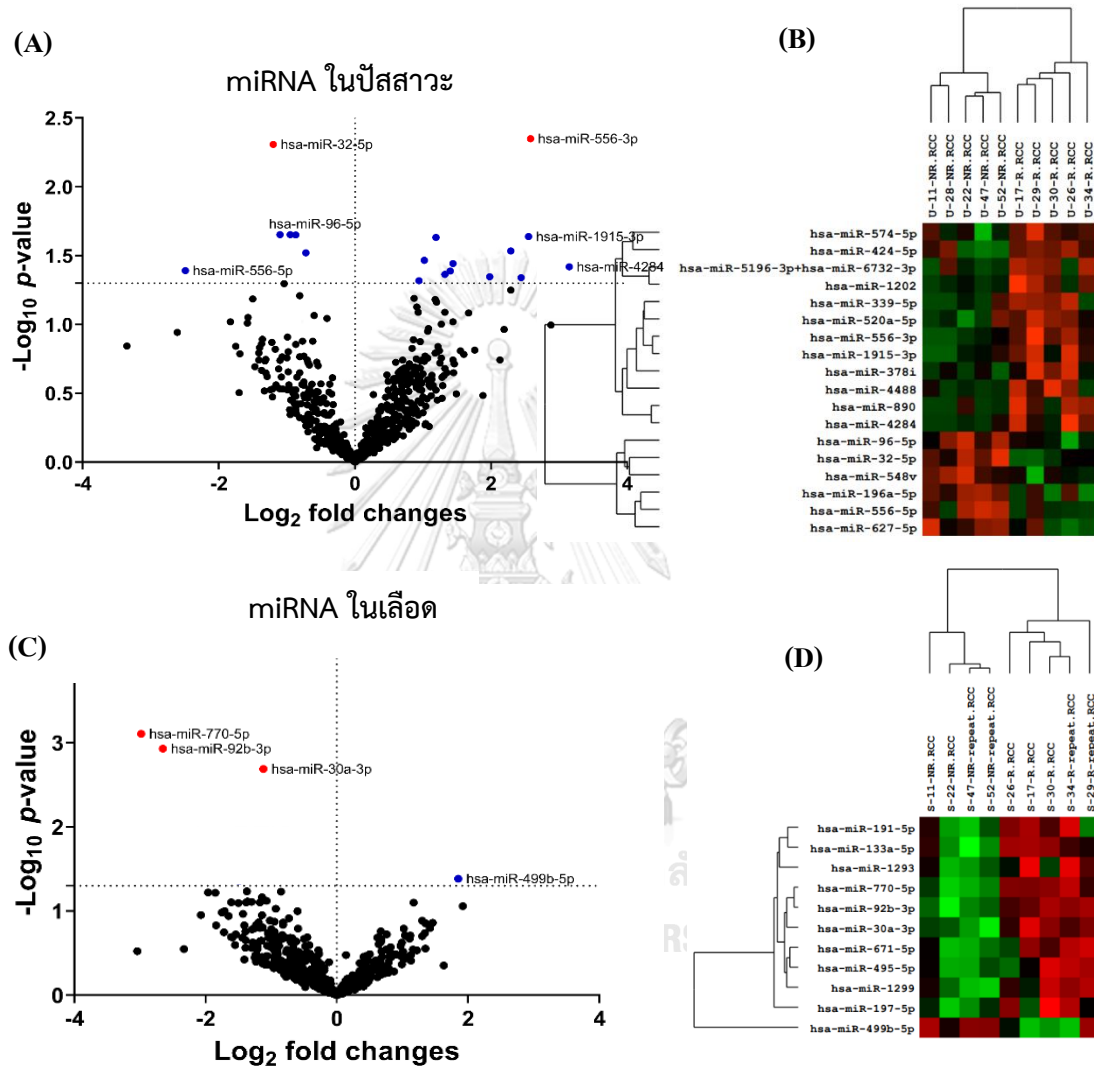
เมื่อนำปัสสาวะและเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3 มาตรวจด้วย nCounter system assays โดยจากรูปที่ 8 มีการวิเคราะห์ด้วย volcano plot และ heatmap ในปัสสาวะพบการแสดงออกของ miRNAs ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 18 ชนิด (รูปที่ 8A และ 8B ตามลำดับ) หลังจากนั้นคัดเลือด miRNAs โดยมีค่า p value < 0.05 และ fold change > 1.5 ซึ่งได้มาทั้งหมด 6 ชนิดคือ has-miR-1915-3p, has-miR-32-5p, has-miR-556-3p, has-miR-556-5p, has-miR-4284, has-miR-96-5p

นอกจากนี้ในรูปที่ 8 มีการวิเคราะห์ด้วย volcano plot และ heatmap ในเลือดพบการแสดงออกของ miRNAs ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 11 ชนิด (รูปที่ 8C และ 8D ตามลำดับ) หลังจากนั้นคัดเลือก miRNAs โดยมีค่า p value < 0.05 และ fold change > 1.5 ซึ่งได้มาทั้งหมด 4 ชนิดคือ has-miR-30a-3p, has-miR-92b-3p, has-miR-499b-5p, has-miR-770-5p

#### 4.3 ระยะเวลาทดสอบ miRNAs โดยวิธี Real time PCR

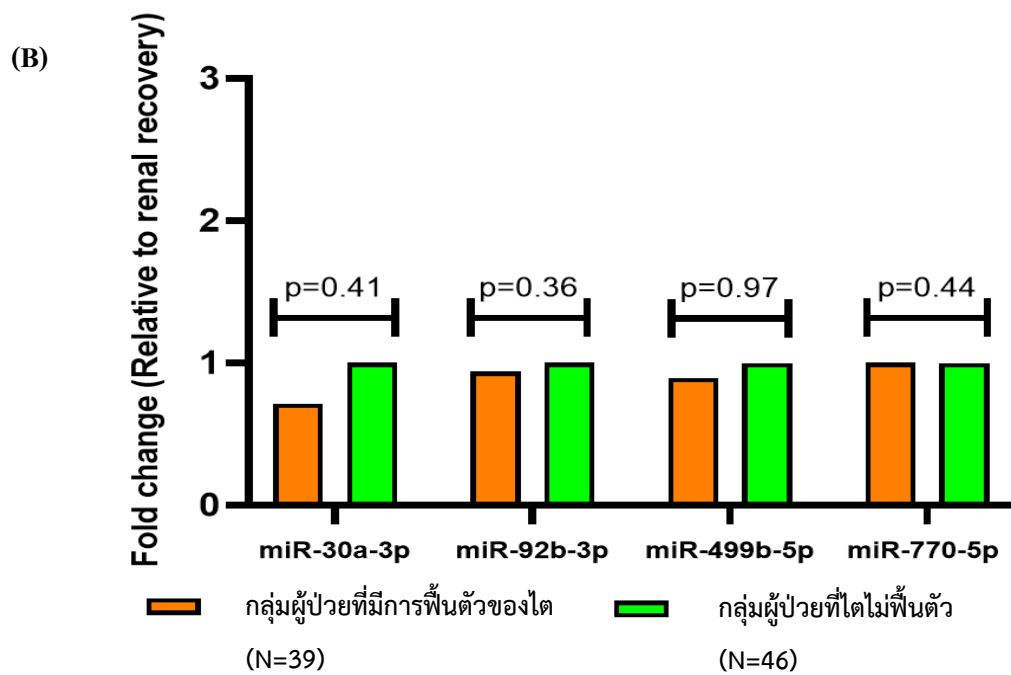
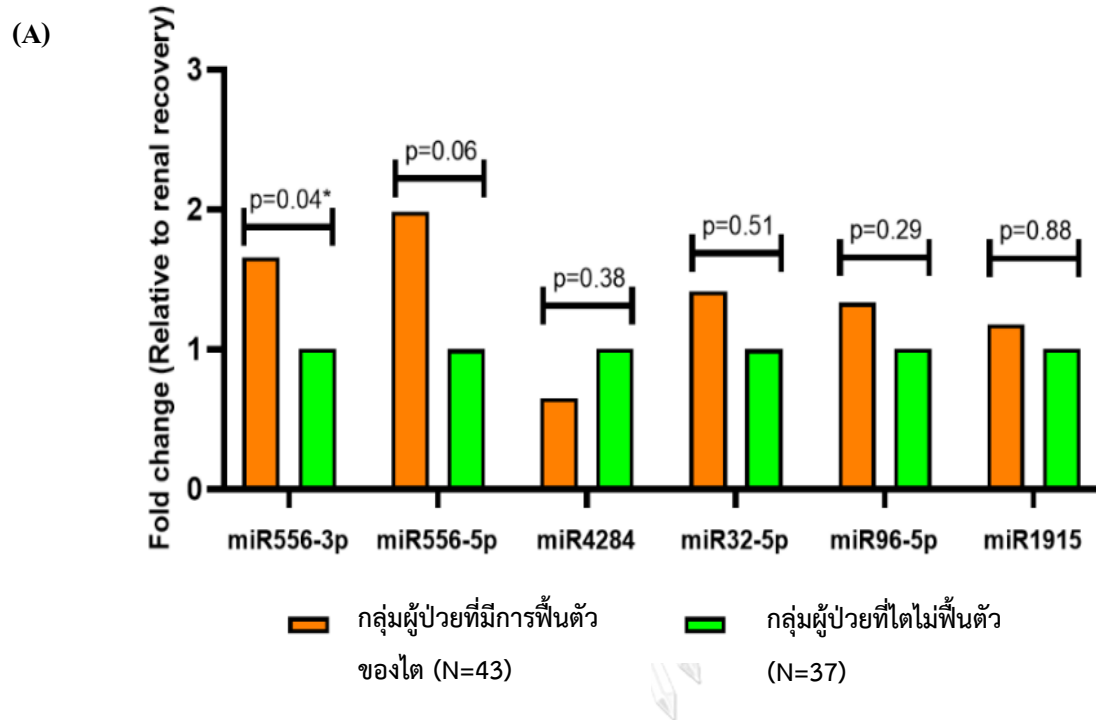
เมื่อนำ miRNAs ในปัสสาวะที่เลือกไว้ทั้งหมด 6 ชนิดจากระยะค้นพบมาทดสอบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวดังรูปที่ 9 โดยจะเห็นว่าค่า miR556-3p มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.04) แต่ miRNA ตัวอื่นเช่น miR556-5p (p=0.06), miR4284 (p=0.38), miR32-5p (p=0.51), miR96-5p (p=0.29) และ miR1915 (p=0.88) ไม่พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญดังรูป 9A

รูปภาพที่ 8 การวิเคราะห์ด้วย volcano plot และ heatmap ในระยะทดสอบพบการแสดงออกของ miRNA ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญ



และเมื่อนำ miRNAs ในเลือดที่เลือกไว้ทั้งหมด 4 ชนิดจากระยะค้นพบมาทดสอบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ผ่าตัดโดยวิธี Real time PCR พบว่าค่า miR30a-3p ( $p=0.41$ ), miR92b-3p ( $p=0.36$ ), miR499b-5p ( $p=0.97$ ) และ miR770-5p ( $p=0.44$ ) ซึ่งไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสองกลุ่มดังรูป 9B

รูปภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ microRNAs ด้วยวิธี Real time PCR ทั้งในปัสสาวะและเลือดระหว่างกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว (ตามลำดับ)



#### 4.4 การทำนายภาวะการฟื้นตัวของไต

จากตารางที่ 8 แสดงความไวและความเฉพาะเจาะจงของ miR556-3p ในปัสสาวะโดยพบค่าที่ 1.7 (ความไว 50% ความเฉพาะเจาะจง 72%) และ 2.1 (ความไว 48% ความเฉพาะเจาะจง 75%) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสองกลุ่ม ตารางที่ 8 จุดตัดของค่า miR556-3p ในปัสสาวะที่แตกต่างกันเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต

จุดตัด (Cut-off)	ความไว	ความเฉพาะเจาะจง	Odd ratio	95%CI	P-value
2.2	0.45	0.75	2.48	0.94-6.53	0.06
2.1	0.48	0.75	2.73	1.04-7.18	0.04*
1.7	0.50	0.72	2.60	1.01-6.71	0.04*
0.8	0.74	0.44	2.01	0.77-5.23	0.15
0.7	0.79	0.42	2.29	0.87-6.04	0.09
0.6	0.81	0.39	2.40	0.86-6.71	0.09

เมื่อเรานำ miR556-3p และปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการทำนายการฟื้นตัวของไตมาวิเคราะห์แบบตัวแปรเดียว (univariate analyses) และแบบหลายตัวแปร (multivariate analyses) ดังตารางที่ 9 ซึ่งตัวแปรอื่นที่มีผลต่อการทำนายการฟื้นตัวของไตเช่น ฮีมาโทคริต<sup>32</sup>, non-renal SOFA และค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม<sup>33</sup> โดยเมื่อทำ multivariate analyses กับ miR556-3p ในปัสสาวะพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (95%CI; 1.02-1.35, p=0.02) ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ตัวแปรเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต

ลักษณะของตัวแปร	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Odd ratio (95% CI)	P-value	Odd ratio (95% CI)	P-value
miRNA 556-3p (จุดตัดที่ 2.1)	2.73 (1.04-7.18)	0.04	1.17 (1.02-1.35)	0.02
เบาหวาน	1.76 (0.70-4.41)	0.23		
อายุ (ทุก 5 ปี)	0.89 (0.77-1.02)	0.08		
ค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3	1.01 (0.89-1.15)	0.83	0.95 (0.81-1.12)	0.53
MAP	1.03 (1.01-1.06)	0.04		
non-renal SOFA score (ทุก 2 คะแนน)	0.54 (0.36-0.81)	<0.01	0.69 (0.55-0.87)	<0.01
ฮีมาโทคริต	1.09 (1.01-1.19)	0.04	1.09 (0.99-1.21)	0.09

หมายเหตุ: miRNA, microRNA; MAP, mean arterial pressure; SOFA, sequential organ failure assessment

การทำนายการฟื้นตัวของไตด้วย miR556-3p ในปัสสาวะพบมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) 0.63 (95%CI; 0.51-0.76),  $p = 0.04$ . ขณะที่โมเดลทางคลินิกซึ่งประกอบด้วย ฮีมาโทคริต, non-renal SOFA และค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม มีค่า AUC 0.78 (95%CI; 0.68-0.89),  $p < 0.01$  และเมื่อเพิ่ม miR556-3p ในปัสสาวะร่วมกับโมเดลทางคลินิกพบว่ามีค่า AUC 0.82 (95%CI; 0.72-0.91),  $p < 0.01$  ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์เป็นลำดับเพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต

ลักษณะของตัวแปร	โมเดล (Model)	AUC (95%CI)
miRNA 556-3p		0.63 (0.51-0.76)
ค่า Non-renal SOFA	A	0.22 (0.12-0.32)
ฮีมาโทคริต	B	0.62 (0.50-0.74)
ค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม	C	0.55 (0.43-0.68)
A+B		0.77 (0.68-0.88)
A+B+C		0.78 (0.68-0.89)
A + miRNA 556-3p		0.79 (0.69-0.89)
B + miRNA 556-3p		0.67 (0.55-0.79)
C + miRNA 556-3p		0.65 (0.52-0.77)
A + B + C + miRNA 556-3p		0.82 (0.72-0.91)

หมายเหตุ: AUC, area under the curve; CI, confidence interval; SOFA, sequential organ failure assessment; miRNA, microRNA.

#### 4.5 การจัดประเภทใหม่ (Reclassification) เพื่อทำนายการฟื้นตัวของไตโดยใช้ miRNA 556-3p

กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยในแต่ละกลุ่มตามความเสี่ยงคือ ความเสี่ยงสูง ปานกลาง และต่ำ ดังตารางที่ 11 และเมื่อมีการใช้ miRNA 556-3p ร่วมทำนายการฟื้นตัวของไตหลังจากนั้นนำมาแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่มดังตารางที่ 11 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัว [ Net Reclassification Index(NRI) = 55.19%,  $p = 0.006$ ] นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ miRNA 556-3p ร่วมด้วยนั้น สามารถช่วยในการทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันได้ [Integrated Discrimination Index(IDI) = 7.07%,  $p = 0.009$ ]

ตารางที่ 11 การจัดประเภทใหม่ตามความเสี่ยง (Risk reclassification) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการทำนายการฟื้นตัวของไตจากโมเดลทางคลินิกกับกลุ่มที่มีการทำนายการฟื้นตัวของไตโดยใช้ miRNA 556-3p ร่วมกับโมเดลทางคลินิก

โมเดลทางคลินิกเพื่อใช้ทำนายการฟื้นตัวของไต <sup>a</sup>	miR556-3p ร่วมกับโมเดลทางคลินิกเพื่อใช้ทำนายการฟื้นตัวของไต			ทิศทางหลังจากจัดกลุ่มใหม่	
	< 30%	30-60%	>60%	ปัจจัยเสี่ยงเพิ่ม	ปัจจัยเสี่ยงลด
<b>กลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไต (N=43)</b>					
< 30%	2	1	0	5 (11.63)	7 (16.28)
30-60%	0	7	4		
>60%	0	7	22		
<b>กลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว (N=37)</b>					
<30%	7	2	0	2 (5.41)	7 (18.92)
30-60%	4	15	0		
>60%	0	3	6		

<sup>a</sup>โมเดลทางคลินิก ประกอบด้วย ฮีมาโทคริต, non-renal SOFA และค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม

NRI = 55.19% ([95% CI: 0.16 - 0.94], p = 0.006)

IDI = 7.07% ([95% CI: 0.02 - 0.12], p = 0.009)

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย จุดเด่นและข้อจำกัดของการศึกษา

#### 5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาข้อมูลแบบ Prospective observational Study ของผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่ 3 ที่ติดตามครบ 28 วันและแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตมีจำนวนทั้งสิ้น 49 คน (ประกอบด้วยกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตแบบสมบูรณ์ 34 คนและกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตแบบบางส่วน 15 คน โดยทั้งสองกลุ่มย่อยนี้จะถูกนำมาคิดในทางสถิติทั้งหมด) และกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวพบมีจำนวนทั้งสิ้น 46 คน (ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวและยังมีชีวิต 29 คนและกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิต 17 คนโดยสาเหตุของผู้ป่วยที่เสียชีวิตคือ การติดเชื้อในกระแสเลือด 9 คน ปอดติดเชื้อ 5 คน มีภาวะเลือดออกผิดปกติ 2 คน และภาวะไตวายแบบฉับพลัน 1 คน โดยผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้ง 17 คนนี้อยู่ในขณะติดตามการฟื้นตัวของไตและจะถูกนำมาคิดรวมในทางสถิติ)

ผลลัพธ์การฟื้นตัวของไตในโรงพยาบาลระหว่างผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวพบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตจะมีการใช้เครื่องช่วยหายใจ การใช้ยากระตุ้นความดันโลหิต ระยะเวลาที่นอนในหอผู้ป่วยวิกฤตและนอนในโรงพยาบาล การล้างไตในโรงพยาบาล รวมทั้งอัตราการตายในโรงพยาบาลน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่กล่าวถึงกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัวสัมพันธ์กับความรุนแรงของไตและนำไปสู่การเพิ่มอัตราการเป็นไตวายเรื้อรังและอัตราการตายอย่างชัดเจน<sup>2</sup> นอกจากนี้จากตารางที่ 7 กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตที่มีเสียชีวิตในโรงพยาบาล 1 คนมาจากภาวะเลือดออกมากผิดปกติ โดยสาเหตุนั้นมาจากการได้รับยาละลายลิ่มเลือดทางเส้นเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจ ซึ่งขณะนั้นผู้ป่วยมีค่าครีเอตินินกลับมาปกติและเสียชีวิตหลังจากครบการติดตามเรื่องการฟื้นตัวของไต 28 วันแล้ว

เมื่อได้มีการนำปัสสาวะและเลือดมาทำการค้นหา miRNA ด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay โดยใช้ชุดตรวจ Human V3 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ค้นหา miRNA ในมนุษย์พร้อมกันทั้งหมด 800 ตัวอย่าง โดยได้นำตัวอย่างทั้งปัสสาวะและเลือดจากคนเดียวกัน ซึ่งการค้นหา miRNA ในปัสสาวะมีทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไต 5 ตัวอย่างและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัว 5 ตัวอย่าง) และค้นหา miRNA ในเลือดมีทั้งหมด 9 ตัวอย่าง (กลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไต 4 ตัวอย่างและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัว 5 ตัวอย่าง ซึ่งเหตุผลที่เลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตมีเพียง 4 ตัวอย่างเพราะเมื่อนำเลือดตัวอย่างมาทำวิธี nCounter miRNA expression assay พบว่ามี 1 ตัวอย่างในกลุ่มนี้ที่ไม่สามารถแปลผลไมโครอาร์เอ็นเอได้) และเมื่อได้นำข้อมูลพื้นฐานของประชากรทั้ง 2 กลุ่มนี้มาวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาเหตุของ

ภาวะไตวายเฉียบพลันในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มนี้คือ septic AKI ทุกราย และผลลัพธ์จากการศึกษาในปัสสาวะของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันเมื่อนำมาวิเคราะห์เพื่อหา miRNAs ในระยะค้นพบด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-556-3p, miR-1915-3p, miR-4284 และการแสดงออกที่ลดลงของ miR-32-5p, miR-96-5p, miR-556-5p อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การศึกษาในเลือดของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันเมื่อนำมาทำด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-499b-5p และการแสดงออกที่ลดลงของ miR-30a-3p, miR-92b-3p and miR-770-5p อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเรานำ miRNAs ในปัสสาวะที่ได้จากในระยะค้นพบด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay และมีนัยสำคัญทางสถิติมาหาความสัมพันธ์กับโปรตีนต่างๆที่สัมพันธ์กับกลไกการอักเสบและฟื้นตัวของไต โดยค้นหาจากฐานข้อมูลของ miRDB, miRbase และTargetScan Human พบว่า ในปัสสาวะ miR-556-3p สัมพันธ์กับการควบคุมโปรตีนหลายชนิดเช่น DAB2IP (DAB2 interacting protein) โดยโปรตีนนี้มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) ผ่าน Ras-ERK pathway<sup>34</sup> และควบคุมกระบวนการที่เซลล์บุผิวเกิดการสูญเสียความมีชีวิตทำให้ลดความสามารถในการยึดเกาะกับ basement membrane และลดความสามารถในการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เซลล์ที่สร้างพังผืดเข้ามาในบริเวณดังกล่าวมากขึ้น (EMT หรือ epithelial-mesenchymal transition)<sup>35</sup> ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ miR-556-3p ส่งผลต่อการลดลงของโปรตีน DAB2IP นอกจากนี้ยังสัมพันธ์กับโปรตีน Calpains (calcium-dependent cysteine proteases) โดยมีหน้าที่กระตุ้นการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis)<sup>36</sup> ลำดับถัดมาในกรณี miR-556-5p มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis และการอักเสบของเซลล์ผ่านทาง Homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2)<sup>37</sup> ส่วนของ miR-32-5p สัมพันธ์กับกลไกการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell proliferation) และการเพิ่มขึ้นของการสร้างหลอดเลือดของเซลล์ (angiogenesis) โดยการเพิ่มขึ้น miR-32-5p เป็นเวลานานสัมพันธ์กับการเกิด EMT ซึ่งส่งผลต่อการเกิดภาวะพังผืดและนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังได้<sup>38, 39</sup> ส่วน miR-4284 พบว่าสัมพันธ์กับกระบวนการ apoptosis ผ่านทาง cullin 3<sup>40</sup> นอกจากนี้ miR-1915-3p ยังสัมพันธ์กับโปรตีน Bcl-2 โดยการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Bcl-2 นั้นสัมพันธ์กับการยับยั้งภาวะ apoptosis และเพิ่มอายุของเซลล์ให้มากขึ้นกว่าเดิม<sup>41, 42</sup> ซึ่ง miR-1915-3p จะยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งมีผลต่อกลไกการฟื้นตัวของไตได้ นอกจากนี้แล้วเมื่อนำ miRNA ในเลือดที่ได้จากในระยะค้นพบด้วยวิธี nCounter miRNA expression assay และมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค้นหาจากฐานข้อมูลของ miRDB, miRbase และTargetScan Human เพื่อหาความสัมพันธ์กับโปรตีนที่สัมพันธ์กับกลไกการอักเสบและฟื้นตัวของไตพบว่า miR-499b-5p และ miR-92b-3p สัมพันธ์กับ TSC1 (human



tuberous sclerosis complex genes) โดย TSC1 มีหน้าที่ควบคุมหรือยับยั้งการทำงาน mTORC1 (mammalian target of rapamycin 1) ซึ่งปรกติแล้ว mTORC1 มีหน้าที่ยับยั้งการตายของเซลล์ เยื่อหุ้มไตหลังจากเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งส่งผลต่อการฟื้นตัวของไตได้ และพบว่าเมื่อ miR-92b-3p มีการแสดงออกที่ลดลงสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ TSC1และนำไปสู่การลดลงของ mTORC1 ได้<sup>43</sup> ส่วน miR-30a-3p นั้นสัมพันธ์กับการยับยั้งการแสดงออกของ  $\beta$ -catenin ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมซึ่งมีผลต่อการกระตุ้น apoptosis เซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นเมื่อ miR-30a-3p มีแสดงออกที่ลดลงส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์และยับยั้งเซลล์เกิด apoptosis โดยผ่านทาง  $\beta$ -catenin และ PRDM1<sup>44</sup> นอกจากนี้แล้วยังมี MiR-770-5p ซึ่งสัมพันธ์กับ MEG8 (Maternally Expressed 8)<sup>45</sup> โดยเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดภาวะ apoptosis ซึ่งสัมพันธ์ต่อกระบวนการฟื้นตัวของไต

เมื่อเข้าสู่ระยะทดสอบจากข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยกเว้น Non-renal SOFA score และค่า MAP ที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสามารถอธิบายได้จากความรุนแรงที่มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไต นอกจากนี้ในข้อมูลพื้นฐานของทั้งสองกลุ่มพบว่าสาเหตุของภาวะไตวายเฉียบพลันส่วนมากมาจาก septic AKI โดยลำดับรองลงมาเป็นจากภาวะ Pre-renal/Ischemic ATN หลังจากนั้นเมื่อได้นำ miRNAs ในปัสสาวะทั้ง 6 ตัวที่ได้จากระยะค้นพบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวเข้าสู่ระยะทดสอบโดยทำวิธี Real time PCR พบว่า miR-556-3p ในปัสสาวะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่ม miRNAs อื่นเช่น miR-32-5p, miR-96-5p, miR-556-5p, miR-1915-3p, miR-4284 ไม่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีของ miR-556-5p พบว่ามีค่า p value ที่เกือบจะมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.06$ ) และ miRNA ดังกล่าวนี้อาจมีความสัมพันธ์กับกลไกการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นตัวของไต จึงเป็นตัวที่น่าสนใจในลำดับถัดมานอกจาก miR-556-3p นอกจากนี้เมื่อได้นำ miRNAs ในเลือดทั้ง 4 ตัวที่ได้จากระยะค้นพบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มผู้ป่วยที่ไตไม่ฟื้นตัวเข้าสู่ระยะทดสอบโดยทำวิธี Real time PCR พบว่า miR-30a-3p, miR-92b-3p, miR-499b-5p และ miR-770-5p ไม่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และจากรูปที่ 9 จะเห็นว่าจำนวนผู้ป่วยของทั้ง 2 กลุ่มในปัสสาวะและเลือดไม่เท่ากันเพราะในกลุ่มผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันบางคนไม่มีปัสสาวะจึงตรวจได้แค่เลือดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในผู้ป่วยบางรายเมื่อนำทั้งปัสสาวะและเลือดมาทำ Real time PCR พบว่าบางตัวอย่างตรวจไม่พบค่า PCR

ดังนั้นจากการศึกษาในระยะทดสอบทั้งในปัสสาวะและเลือดพบว่า miR-556-3p ในปัสสาวะนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติจึงเป็นตัวที่น่าสนใจและนำมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไต

ในกลุ่มผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน ซึ่งได้นำ miR-556-3p ในปัสสาวะมาหาค่าจุดตัดเพื่อดูความไวและความเฉพาะเจาะจงเพื่อใช้ทำนายการฟื้นตัวของไตโดยได้ค่าจุดตัดต่าง ๆ ตามตารางที่ 8 ซึ่งจะเห็นว่า ในค่าจุดตัดที่ 1.7 และ 2.1 ที่ได้ผลมาจาก Real time PCR พบมีค่านัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อดูค่าความไวอาจจะไม่สูงมากนัก (50% และ 48% ตามลำดับ) แต่ก็มีค่าความเฉพาะเจาะจงที่สูง (72% และ 75% ตามลำดับ) ซึ่งสามารถที่จะนำ miRNA ดังกล่าวมาช่วยประเมินการฟื้นตัวของไตได้ แต่อย่างไรก็ตามในขณะนี้ยังไม่มีค่าเกณฑ์จุดตัดที่วัดได้เป็นหน่วยแนวซ์ตของ miR-556-3p ในการทำนายภาวะการฟื้นตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน นอกจากนี้แล้วเมื่อได้นำ miR-556-3p ในปัสสาวะมาวิเคราะห์ร่วมกับตัวแปรอื่น ๆ เพื่อทำนายการฟื้นตัวของไตดังตารางที่ 9 โดยตัวแปรในแต่ละตัวเมื่อนำมาวิเคราะห์แยกและดูความสัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตพบว่า miR-556-3p ที่มีค่าจุดตัดมากกว่า 2.1 จะช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตได้ 2.73 เท่า ส่วนค่า MAP และฮีมาโทคริตที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการฟื้นตัวของไต 1.03 และ 1.09 เท่าตามลำดับในขณะที่อายุที่เพิ่มขึ้นทุก 5 ปีมีผลต่อการฟื้นตัวของไตที่ลดลง 0.89 เท่า นอกจากนี้ในค่าของ non-renal SOFA score ที่มีการเพิ่มขึ้นทุก 2 คะแนนมีผลต่อการฟื้นตัวของไตที่ลดลง 0.54 เท่า หลังจากนั้นได้นำตัวแปรดังกล่าวที่มีนัยสำคัญทางสถิติมาวิเคราะห์ร่วมกับ miR-556-3p เพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต ซึ่งพบว่า miR-556-3p ยังมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้นำตัวแปรทางคลินิกแต่ละตัวที่มีความสัมพันธ์กับการฟื้นตัวของไตคือ ฮีมาโทคริต<sup>32</sup>, ค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม<sup>33</sup> ซึ่งทั้งสองตัวแปรนี้ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่ามีความสำคัญและมีผลต่อการฟื้นตัวของไตในภาวะไตวายเฉียบพลัน และค่า non-renal SOFA ซึ่งได้มีการศึกษาจากตารางที่ 9 ว่ามีผลต่อภาวะการฟื้นตัวของไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นเมื่อได้นำแต่ละตัวแปรมาดูค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) พบว่าไม่สูงมากนัก แต่เมื่อนำตัวแปรทางคลินิกที่คัดเลือกมารวมกัน 2 ตัวพบว่ามีค่า AUC ที่สูงขึ้นและเมื่อนำตัวแปรทั้งสามตัวนี้มารวมเป็นโมเดลทางคลินิกพบว่ามีค่า AUC ที่สูงเพิ่มขึ้นอีก (AUC=0.78 ดังตารางที่ 10) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่วิพพอในการช่วยทำนายการฟื้นตัวของไต ซึ่งเมื่อนำ miR-556-3p มาวิเคราะห์เพื่อทำนายการฟื้นตัวของไต โดยถึงแม้ว่าค่า AUC ของ miR-556-3p คือ 0.63 แต่เมื่อนำมาคิดร่วมกับตัวแปรทางคลินิกแต่ละตัวพบว่ามีค่า AUC สูงขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อนำ miR-556-3p มาคิดร่วมกับโมเดลทางคลินิก (ได้แก่ ฮีมาโทคริต, non-renal SOFA score และค่าครีเอตินินในวันแรกของภาวะไตวายเฉียบพลันระยะที่สาม) พบมีค่า AUC ที่เพิ่มมากขึ้นและวิพพอในการช่วยทำนายการฟื้นตัวของไต (AUC=0.82) ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวเป็นตัวสนับสนุนว่า miR-556-3p มีส่วนช่วยสนับสนุนการทำนายการฟื้นตัวของไตได้ดียิ่งขึ้น

เมื่อได้มีการจัดประเภทใหม่ตามความเสี่ยง (Risk reclassification) คือ น้อย ปานกลางและมาก (<30%, 30-60%, >60% ตามลำดับ) ทั้งในกลุ่มที่มีการฟื้นตัวของไตและกลุ่มที่ไตไม่ฟื้นตัว โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการทำนายการฟื้นตัวของไตจากโมเดลทางคลินิกกับกลุ่มที่มีการทำนาย

การฟื้นฟูตัวของไตโดยใช้ miRNA 556-3p ร่วมกับโมเดลทางคลินิกพบว่า เมื่อมีการใช้ miRNA 556-3p ร่วมด้วยนั้นมีการเปลี่ยนแปลงในการจัดกลุ่มใหม่ตามความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูตัวของไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่า miRNA 556-3p ดังกล่าวนั้นช่วยในการทำนายการฟื้นฟูตัวของไตได้จริงและเพิ่มประสิทธิภาพในการทำนายการฟื้นฟูตัวของไตได้ดียิ่งขึ้น (NRI = 55.19%, p = 0.006 และ IDI=7.07%, p = 0.009 ตามลำดับ ดังตารางที่ 11)

## 5.2 จุดเด่นของการศึกษา

ประการแรกคือเป็นการศึกษาแรกที่ไม่เคยมีมาก่อนเกี่ยวกับการใช้ miRNAs เพื่อทำนายการฟื้นฟูตัวของไตในผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน ประการที่สองคือข้อมูลที่ได้นั้นเป็นข้อมูลที่สมบูรณ์และมีการติดตามผู้ป่วย 28 วันร่วมกับมีคำจำกัดความของความหมายการฟื้นฟูตัวของไตชัดเจน ประการที่สามคือการศึกษานี้เป็นการใช้ NanoString platform ซึ่งเป็น high output ที่ทำการค้นหา miRNA พร้อมกันทั้งหมด 800 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง ประการที่สี่คือการศึกษานี้เป็นการใช้ปัสสาวะและเลือดมาจากคนเดียวกันและเวลาเดียวกันทำให้ผลน่าเชื่อถือมากขึ้น ประการที่ห้าคือตรวจพบความสัมพันธ์ของ miR-556-3p ในปัสสาวะกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการฟื้นฟูตัวของไต ซึ่งเป็นเหตุผลช่วยสนับสนุนความสำคัญของไมโครอาร์เอ็นเอดังกล่าว

## 5.3 ข้อจำกัดของการศึกษา

ประการแรกคือปัสสาวะและเลือดที่เก็บในวันแรกของการเข้างานวิจัย อาจจะได้เป็นวันแรกที่เกิดไตวายเฉียบพลันระยะที่สามจริง ประการที่สองคือเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเก็บเพียงแค่วันแรกเท่านั้น ซึ่งถ้ามีภาวะแทรกซ้อนระหว่างนอนโรงพยาบาลอาจจะทำให้การทำนายการฟื้นฟูตัวของไตไม่ดีพอเช่น มีติดเชื้อ ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง เป็นต้น ประการที่สามคือยังไม่มีค่าเกณฑ์จุดตัดที่วัดได้เป็นหน่วยแน่ชัดของ miR-556-3p ในการทำนายภาวะการฟื้นฟูตัวจากภาวะไตวายเฉียบพลัน ประการที่สี่คือไม่ได้มีการเปรียบเทียบระหว่าง miR-556-3p กับค่าบ่งชี้ทางชีวภาพตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูตัวของไตเช่น NGAL เป็นต้น

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า miRNAs อาจจะมีบทบาทสำคัญในการทำนายการฟื้นตัวของไตหลังจากภาวะไตวายเฉียบพลัน โดยการศึกษานี้ได้พบ miR-556-3p ในปัสสาวะสามารถช่วยทำนายการฟื้นตัวของไตจากภาวะไตวายเฉียบพลันแบบรุนแรงได้

#### 6.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการเก็บตัวอย่างในวันแรกของการเข้าวิจัยเพียงครั้งเดียว จึงแนะนำให้เก็บในวันอื่นเพิ่มขึ้นเช่น วันที่ 7 และวันที่ 14 ของการศึกษาเพื่อหาระดับ miRNA แบบไดนามิกทำให้สามารถช่วยในการทำนายการฟื้นตัวของไตได้แม่นยำมากขึ้น

การนำ miR-556-3p ไปทดสอบในเลือดเพิ่มเติมเพื่อหาความสัมพันธ์กับการทำนายการฟื้นตัวของไตรวมทั้งดูการเปลี่ยนแปลงเทียบกับระหว่างในเลือดและปัสสาวะว่าไปในทิศทางเดียวกันไหม เพื่อนำไปสู่การสร้างสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) ที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น

## บรรณานุกรม

1. Srisawat N, Kulvichit W, Mahamitra N, Hurst C, Praditpornsilpa K, Lumlertgul N, et al. The epidemiology and characteristics of acute kidney injury in the Southeast Asia intensive care unit: a prospective multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2019.
2. Pannu N, James M, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Alberta Kidney Disease N. Association between AKI, recovery of renal function, and long-term outcomes after hospital discharge. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(2):194-202.
3. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*. 2012;120(4):c179-84.
4. Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(5):264-76.
5. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):317-26.
6. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM, et al. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(4):241-57.
7. Forni LG, Darmon M, Ostermann M, Oudemans-van Straaten HM, Pettila V, Prowle JR, et al. Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2017;43(6):855-66.
8. Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal-epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2. *Oncogene*. 2010;29(7):1031-40.
9. Liu KD, Brakeman PR. Renal repair and recovery. *Crit Care Med*. 2008;36(4 Suppl):S187-92.
10. Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int*. 2012;81(9):819-25.
11. Srisawat N, Murugan R, Lee M, Kong L, Carter M, Angus DC, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts recovery from acute kidney injury following community-acquired pneumonia. *Kidney Int*. 2011;80(5):545-52.
12. Srisawat N, Wen X, Lee M, Kong L, Elder M, Carter M, et al. Urinary biomarkers

and renal recovery in critically ill patients with renal support. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(8):1815-23.

13. Chawla LS, Goldstein SL, Kellum JA, Ronco C. Renal angina: concept and development of pretest probability assessment in acute kidney injury. *Crit Care*. 2015;19:93.

14. Gocze I, Koch M, Renner P, Zeman F, Graf BM, Dahlke MH, et al. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120863.

15. Schiff H. Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(5):1248-52.

16. Moon SJ, Park HB, Yoon SY, Lee SC. Urinary biomarkers for early detection of recovery in patients with acute kidney injury. *J Korean Med Sci*. 2013;28(8):1181-6.

17. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT. Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. *Am J Med*. 1983;74(2):243-8.

18. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, et al. External validation of severity scoring systems for acute renal failure using a multinational database. *Crit Care Med*. 2005;33(9):1961-7.

19. Yang F, Zhang L, Wu H, Zou H, Du Y. Clinical analysis of cause, treatment and prognosis in acute kidney injury patients. *PLoS One*. 2014;9(2):e85214.

20. Macedo E, Malhotra R, Bouchard J, Wynn SK, Mehta RL. Oliguria is an early predictor of higher mortality in critically ill patients. *Kidney Int*. 2011;80(7):760-7.

21. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, et al. Discontinuation of continuous renal replacement therapy: a post hoc analysis of a prospective multicenter observational study. *Crit Care Med*. 2009;37(9):2576-82.

22. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *N Engl J Med*. 2016;375(2):122-33.

23. Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Pavenstadt H, et al. Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial.

JAMA. 2016;315(20):2190-9.

24. Barbar SD, Clere-Jehl R, Bourredjem A, Hernu R, Montini F, Bruyere R, et al. Timing of Renal-Replacement Therapy in Patients with Acute Kidney Injury and Sepsis. *N Engl J Med*. 2018;379(15):1431-42.
25. Schena FP, Serino G, Sallustio F. MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(4):755-63.
26. Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, Yong TY, Li JY, Gleadle JM. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):3794-802.
27. Ramachandran K, Saikumar J, Bijol V, Koyner JL, Qian J, Betensky RA, et al. Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin Chem*. 2013;59(12):1742-52.
28. Du J, Cao X, Zou L, Chen Y, Guo J, Chen Z, et al. MicroRNA-21 and risk of severe acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *PLoS One*. 2013;8(5):e63390.
29. Liu Z, Wang S, Mi QS, Dong Z. MicroRNAs in Pathogenesis of Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2016;134(3):149-53.
30. Lan YF, Chen HH, Lai PF, Cheng CF, Huang YT, Lee YC, et al. MicroRNA-494 reduces ATF3 expression and promotes AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):2012-23.
31. Jones TF, Bekele S, O'Dwyer MJ, Prowle JR. MicroRNAs in Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2018;140(2):124-8.
32. Gameiro J, Lopes JA. Complete blood count in acute kidney injury prediction: a narrative review. *Ann Intensive Care*. 2019;9(1):87.
33. Neyra JA, Mescia F, Li X, Adams-Huet B, Yessayan L, Yee J, et al. Impact of Acute Kidney Injury and CKD on Adverse Outcomes in Critically Ill Septic Patients. *Kidney Int Rep*. 2018;3(6):1344-53.
34. Feng C, Sun P, Hu J, Feng H, Li M, Liu G, et al. miRNA-556-3p promotes human bladder cancer proliferation, migration and invasion by negatively regulating DAB2IP expression. *Int J Oncol*. 2017;50(6):2101-12.
35. Liu L, Xu C, Hsieh JT, Gong J, Xie D. DAB2IP in cancer. *Oncotarget*. 2016;7(4):3766-76.

36. Liu Z, Ji J, Zheng D, Su L, Peng T, Tang J. Protective role of endothelial calpain knockout in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury via attenuation of the p38-iNOS pathway and NO/ROS production. *Exp Mol Med.* 2020;52(4):702-12.
37. Fan Y, Wang N, Chuang P, He JC. Role of HIPK2 in kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* (2011). 2014;4(1):97-101.
38. Dai Y, Yan T, Gao Y. Silence of miR-32-5p promotes endothelial cell viability by targeting KLF2 and serves as a diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Diagn Pathol.* 2020;15(1):19.
39. Wang HJ, Liu H, Lin YH, Zhang SJ. MiR-32-5p knockdown inhibits epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SMAD7 in diabetic nephropathy. *Hum Exp Toxicol.* 2020:960327120952157.
40. Anderica-Romero AC, Gonzalez-Herrera IG, Santamaria A, Pedraza-Chaverri J. Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biol.* 2013;1:366-72.
41. Paraf F, Gogusev J, Chretien Y, Droz D. Expression of bcl-2 oncoprotein in renal cell tumours. *J Pathol.* 1995;177(3):247-52.
42. Song XF, Ren H, Andreasen A, Thomsen JS, Zhai XY. Expression of Bcl-2 and Bax in mouse renal tubules during kidney development. *PLoS One.* 2012;7(2):e32771.
43. Wang C, Uemura M, Tomiyama E, Matsushita M, Koh Y, Nakano K, et al. MicroRNA-92b-3p is a prognostic oncomiR that targets TSC1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2020;111(4):1146-55.
44. Jiang LH, Zhang HD, Tang JH. MiR-30a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *J Oncol.* 2018;2018:5167829.
45. Zhang J, Song L, Ma Y, Yin Y, Liu X, Luo X, et al. lncRNA MEG8 Upregulates miR-770-5p Through Methylation and Promotes Cell Apoptosis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:2477-83.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายแพทย์ ธนวรรธ พูลเกิด
วัน เดือน ปี เกิด	17 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดเพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	-ปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ - ปริญญาแพทย์ผู้มีความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	105 ถนน บางแวก แขวง คลองขวาง เขต ภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160
ผลงานตีพิมพ์	-
รางวัลที่ได้รับ	-

