

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้่วไตที่ได้รับมะนาวผง



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 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN TREATMENT IN KIDNEY STONE PATIENTS ON THE
ALTERATION OF URINARY PROTEIN

Miss Pimsuda Kulpradit



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ ไตที่ได้รับมะนาวผง
โดย	นางสาวพิมพ์สุดา กุลประดิษฐ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นายแพทย์ รุสสิณัส ดิษยบุตร ดร. นายแพทย์ ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. นายแพทย์ รุสสิณัส ดิษยบุตร)

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

..... กรรมการ
(ดร. นายแพทย์ อัษฎาศรี ลิ้มหวนิชกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ชาญณรงค์ธรรม)

พิมพ์สุตา กุลประดิษฐ์ : การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับมะนาวผง (EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN TREATMENT IN KIDNEY STONE PATIENTS ON THE ALTERATION OF URINARY PROTEIN) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. นพ. ฐสิณีส ดิษยบุตร, ดร. นพ. ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล, 81 หน้า.

สูตรมะนาวผง ซึ่งผลิตจากน้ำมะนาวที่ผ่านการเติมซิเทรตและโพแทสเซียม มีประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับซิเทรตและโพแทสเซียมในปัสสาวะ และลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วไต นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตได้ การศึกษานี้จึงต้องการทราบชนิดของโปรตีนในปัสสาวะที่เปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับสูตรมะนาวผง กลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษานี้ ได้แก่ ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการสลายนิ่วแล้ว จำนวน 10 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับสูตรมะนาวผง จำนวน 5 ราย และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก จำนวน 5 ราย ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่ก่อนเริ่ม และหลังรับสูตรมะนาวผง/ยาหลอก เป็นเวลา 6 เดือน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ และวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยแมสสเปคโตรเมทรี นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้พิจารณาและเลือกโปรตีนที่น่าสนใจจำนวน 3 ชนิด เพื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างปัสสาวะ ได้แก่ โปรตีนอัลบูมิน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี immunoturbidimetric assay โปรตีนทรานสเฟอร์ริน และโปรตีนแทม-ฮอร์สพอล ซึ่งวิเคราะห์ด้วย Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนรวมในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสูตรมะนาวผง ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ลดลงในกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ผลโปรตีนโอมิกส์พบว่าโปรตีน 17 ชนิดที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสูตรมะนาวผง โดยเป็นโปรตีนที่ลดลง 16 ชนิด และโปรตีนที่เพิ่มขึ้น 1 ชนิด โปรตีนนำมาวิเคราะห์ปริมาณซ้ำ ได้แก่ โปรตีนอัลบูมิน และทรานสเฟอร์ริน ซึ่งบ่งชี้ความเสียหายของโกลเมอรูลัส และโปรตีนแทม-ฮอร์สพอล ซึ่งมีบทบาทยับยั้งการเกิดนิ่วไต ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสูตรมะนาวผง มีปริมาณโปรตีนอัลบูมินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 91.63) และปริมาณโปรตีนทรานสเฟอร์รินลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ร้อยละ 58.44) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับยาหลอก นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวก ระหว่างปริมาณอัลบูมิน และทรานสเฟอร์รินในตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดอีกด้วย ($0.589, p = 0.006$) และในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสูตรมะนาวผง ยังพบปริมาณโปรตีนแทม-ฮอร์สพอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 1,470) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่ได้รับยาหลอกไม่มีการเปลี่ยนแปลง สรุปผลได้ว่าการให้สูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ช่วยลดปริมาณโปรตีนอัลบูมิน และเพิ่มปริมาณโปรตีนแทม-ฮอร์สพอลในปัสสาวะ ผู้วิจัยคาดว่าผลดังกล่าวเนื่องมาจากซิเทรตและสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของสูตรมะนาวผง

ภาควิชา ชีวเคมี

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5774059330 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: LIME POWDER REGIMEN (LPR) / KIDNEY STONE DISEASE / PROTEOME / URINARY PROTEIN
 PIMSUDA KULPRADIT: EFFECT OF LIME POWDER REGIMEN TREATMENT IN KIDNEY STONE
 PATIENTS ON THE ALTERATION OF URINARY PROTEIN. ADVISOR: PROF. PIYARATANA
 TOSUKHOWONG, CO-ADVISOR: THASINAS DISSAYABUTR, Ph.D., TRAIRAK PISITKUN, Ph.D.,
 81 pp.

Lime powder regmimen (LPR) produced by adding citrate and potassium into lime juice was proved to be able to increase urinary citrate and potassium excretion, which reduces risk of kidney stone formation. It also alleviated urinary protein loss. However, excretion of which urinary protein is not yet elucidated. This study aimed to identify a profile of urinary protein in kidney stone patients with LPR supplement. We recruited 10 immediate post-stone removed urolithiasis patients, and randomly allocated into LPR (n=5) and Placebo (n=5) supplement group. 24-hour urine samples were collected at the initiation and after 6-month of supplement. Total urinary protein was measured. Then, urinary proteins were identified by mass spectrometry. In addition, 3 interesting proteins were selected to validate the levels. Urinary albumin was measured by immunoturbidimetric assay, while serotransferrin (TF) and Tamm-Horsfall protein (THP) were measured by ELISA. We found that urinary protein excretion was significantly decreased after supplement in only LPR group. Proteomic profiles revealed 17 proteins exclusively altered after LPR supplement. Albumin and TF, which are glomerular markers, and THP-a stone inhibitory protein, were selected to be validated. According to the validation results, markedly decreased of albumin (91.63%) and slightly decreased of TF (58.44%) were observed, while, there was no significant change of these proteins found in Placebo group. Moreover, we found positive correlation between urinary albumin and TF excretion ($r = 0.589$, $p = 0.006$). And, urinary THP was significantly increased after LPR supplement (1,470%), but not that of placebo group. We can conclude that LPR supplement attenuated urinary albumin loss and increased THP excretion. We believed that these effects were mainly due to citrate and antioxidants which were highly rich in LPR.

Department: Biochemistry
 Field of Study: Medical Biochemistry
 Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยสมบูรณ์ ด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความกรุณาในการให้ความรู้ คำแนะนำอย่างเอาใจใส่ ตลอดจนความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร และ อาจารย์ ดร.นายแพทย์ ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ผู้เป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อัญญา ศิพนวนิชกุล อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิศิษฐ์ ทองบุญเกิด หัวหน้าหน่วยโปรตีนโอมิกส์ทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง และกรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในหน่วยวิจัย ที่ได้ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล หัวหน้าหน่วยวิจัยโปรตีนโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และนักวิทยาศาสตร์หน่วยวิจัยทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้และข้อแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณนายแพทย์วัฒนชัย อึ้งเจริญวัฒน์ คณะแพทย์ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ให้ความช่วยเหลือในการคัดกรองผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย และการเก็บสารตัวอย่าง และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ แก้ว อุดมศิริชาคร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาช่วยเหลือในการจัดเก็บและส่งสารตัวอย่างปัสสาวะ

ขอขอบพระคุณ นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์ Symtems Biology Center จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความเมตตา และกรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ คุณธรรม จริยธรรม ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ เช่น เอกสาร และการเตรียมสถานที่สำหรับสอบวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้อุปการะในทุกสิ่ง ขอขอบคุณญาติ พี่น้อง เพื่อน ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1	13
บทนำ.....	13
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางานวิจัย (Background and rationale).....	13
1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives).....	15
1.3. ข้อตกลงเบื้องต้น.....	15
1.4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations).....	15
1.5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Key words)	16
1.6. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย (Conceptual framework)	17
บทที่ 2	18
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
2.1. โรคนิ่วไต (Kidney stone disease).....	18
2.2. องค์ประกอบและชนิดของนิ่ว (Stone compositions and stone types).....	18
2.3 สารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว (Stone promoters and inhibitors).....	19
2.4. กระบวนการเกิดนิ่ว (Mechanism of renal stone formation).....	20
2.5. สูตรมะนาวผง กับบทบาทในการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ.....	20
2.6. โปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Urinary protein of kidney stone patient)	22
2.7. ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Microalbuminuria in kidney stone patients).....	24

2.8. โปรตีนทรานสเฟอร์ริน กับบทบาทในการเกิดนิ่ว (Transferrin and the role in stone formation).....	25
2.9. โปรตีนแทม ฮอร์สฟอลกับบทบาทในการเกิดนิ่ว (Tamm-Horsfall protein and the role in stone formation)	26
2.10. สูตรมะนาวผง สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ	27
2.11. เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์	29
บทที่ 3	33
วิธีดำเนินการวิจัย	33
3.1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population).....	33
3.2. ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	34
3.3. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	35
3.4. การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ	36
3.5. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	37
3.5.1. การตกตะกอนโปรตีนจากสารตัวอย่างปัสสาวะ.....	37
3.5.2. การวัดความเข้มข้นของโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธีของ Bradford.....	37
3.5.3. การแยกโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE	38
3.5.4. การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์	39
3.5.5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างปัสสาวะ	41
3.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical Analysis).....	43
บทที่ 4	44
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	44
4.1. ข้อมูลพื้นฐาน และองค์ประกอบในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ของกลุ่มตัวอย่าง.....	44
4.2. ผลการแยกโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE	46

4.3. ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Nano-liquid chromatography mass spectrometry	47
4.4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างปัสสาวะ	60
บทที่ 5	66
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	66
รายการอ้างอิง	74
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	81



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ชนิดโปรตีนที่พบเฉพาะในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตและก้อนนิ้ว	23
ตาราง 2 ชนิดของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไต และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ้ว	24
ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	35
ตาราง 4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	36
ตาราง 5 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง	45
ตาราง 6 ปริมาตร pH และองค์ประกอบในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ของกลุ่มตัวอย่าง ก่อนรับยา	46
ตาราง 7 โปรตีนในปัสสาวะ 17 ชนิด ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo	49
ตาราง 8 โปรตีนในปัสสาวะ 3 ชนิด ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo	50
ตาราง 9 โปรตีน 17 ชนิด ที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับ LPR	51
ตาราง 10 โปรตีน 23 ชนิด ที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับ placebo	53
ตาราง 11 ชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ LPR	55
ตาราง 12 ชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับ LPR	55
ตาราง 13 ชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ placebo	56
ตาราง 14 ชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับ Placebo	57
ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดนิ้ว ในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo	58
ตาราง 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่บ่งชี้ความผิดปกติของไต ในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo	59

สารบัญภาพ

หน้า

รูป 1 กรอบแนวคิดวิจัย.....	17
รูป 2 ผลของการให้มะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	21
รูป 3 ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต ก่อนและหลังรับมะนาวผง.....	28
รูป 4 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง Mass spectrometer	31
รูป 5 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS.....	32
รูป 6 ระดับโปรตีนในปัสสาวะที่เปลี่ยนแปลง ในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo เป็นเวลา 6 เดือน	44
รูป 7 ผลการแยกโปรตีนใน 12% SDS-PAGE ในตัวอย่างปัสสาวะ.....	47
รูป 8 ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo.....	60
รูป 9 ปริมาณโปรตีน transferrin ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo.....	61
รูป 10 ปริมาณโปรตีน THP ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo.....	62
รูป 11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณ albumin ในปัสสาวะของอาสาสมัคร	63
รูป 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะของอาสาสมัคร.....	63
รูป 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณ Tamm-Horsfall protein ในปัสสาวะของอาสาสมัคร.....	64
รูป 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ albumin และปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะของอาสาสมัคร	65



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางนวิจัย (Background and rationale)

โรคนิ่วไต (Kidney stone disease, Renal stone disease, Nephrolithiasis, Urolithiasis) คือภาวะที่มีก้อนนิ่ว (Stone) อุดกั้นทางเดินปัสสาวะ อันเป็นผลมาจากการสร้างผลึก และตกตะกอนของสารในปัสสาวะ ประมาณร้อยละ 80 มักพบที่ไต บริเวณ เนื้อไต กรวยไต และท่อไต ในประเทศไทยมีอัตราการเกิดโรคนิ่วสูง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (1) มีความชุกถึง ร้อยละ 16.9 (2) พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ประมาณ 1.6 เท่า และมักพบในวัยผู้ใหญ่ คืออายุ 30-70 ปี (3) เมื่อแบ่งชนิดนิ่วตามองค์ประกอบ นิ่วชนิดที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ พบร้อยละ 79.3 ในขณะที่นิ่วไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบพบประมาณร้อยละ 20.7 (4)

สาเหตุของโรคนิ่วไตมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ สิ่งแวดล้อม พันธุกรรม การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ความผิดปกติทางกายวิภาคของทางเดินปัสสาวะ และปัจจัยทางเมแทบอลิก คือ การมีระดับสารก่อนิ่ว (stone promoters) ในปัสสาวะสูง ซึ่งสารก่อนิ่วเหล่านี้ ได้แก่ แคลเซียมสูง ออกซาเลตสูง กรดยูริกสูง ฟอสเฟตสูง ร่วมกับการมีระดับสารยับยั้งนิ่ว (stone inhibitors) ต่ำในปัสสาวะ สารยับยั้งนิ่ว ได้แก่ ซีเทรตต่ำ โพแทสเซียมต่ำ แมกนีเซียมต่ำ โดยมีปริมาณปัสสาวะน้อยเป็นปัจจัยเสริมทำให้เกิดความอึดอึดยั้งยวด สารก่อนิ่วจะเกิดผลึกและสามารถกลายเป็นก้อนนิ่วได้ จากการศึกษาของ ศ.ปิยะรัตน์ และคณะ พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วในประเทศไทย มีภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำ (hypocitraturia) ถึงร้อยละ 84.66 และภาวะโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ (hypokaliuria) ร้อยละ 72.45 (5)

โรคนิ่วไตก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย ทำให้การทำหน้าที่ของไตลดลง เพิ่มโอกาสติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจากการที่มีก้อนนิ่วอุดตัน รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease) ในอนาคต (5) ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมักได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดหรือสลายนิ่ว แต่กลับพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดก้อนนิ่วออกไปแล้วมีอัตราการเกิดนิ่วซ้ำ (stone recurrent rate) ได้สูงถึงร้อยละ 39 ภายในระยะเวลา 2 ปี (2) ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ และคณะ ได้พัฒนาสูตรมะนาวผง (lime powder regimen: LPR) จากน้ำมะนาวเพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดโรคนิ่วกลับเป็นซ้ำ โดยมะนาวผงมีซีเทรตปริมาณสูง ซึ่งซีเทรตเป็นสารยับยั้งนิ่ว และมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ

(6) จากการศึกษาดังกล่าว พบว่าผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการสลายนิ้วแล้ว เมื่อรับยามะนาวผงโดยการกินเป็นเวลา 6 เดือน จะมีระดับซีเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น และมีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะลดลง เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับ placebo โปรตีนในปัสสาวะของคนปกติมีปริมาณ 40-80 มิลลิกรัมต่อวัน โปรตีนที่พบได้ในปัสสาวะมีหลายชนิด ทั้งโปรตีนที่มาจากพลาสมาโดยถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัส และโปรตีนที่สร้างจากหลอดเลือด โปรตีนในปัสสาวะมีบทบาทต่อการเกิดโรคนิ้วไต พบว่ามีทั้งโปรตีนที่มีบทบาทยับยั้งการเกิดนิ้ว เช่น nephrocalcin โปรตีนที่มีบทบาทกระตุ้นการเกิดนิ้วโดยตรง เช่น annexin II (7) รวมถึงโปรตีนที่ไม่ได้กระตุ้นการเกิดนิ้วโดยตรง แต่หากพบรั่วออกมาในปัสสาวะมาก จะส่งผลให้เซลล์บุหลอดเลือดเสียหาย ซึ่งเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเกิดนิ้วได้ เช่น อัลบูมิน จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าผู้ป่วยโรคนิ้วไตจะมีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติ (8) ซึ่งโปรตีนดังกล่าว มีทั้งจากพลาสมา และสร้างจากหลอดเลือด และส่วนมากมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น calgranulin (9) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าการมีนิ้วไตส่งผลให้เกิดการอักเสบและอาจทำประสิทธิภาพของไตลดลง

จากการศึกษาการใช้มะนาวผงในการป้องกันการเกิดโรคนิ้วไตกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับการผ่าตัดรักษาเทียบกับผู้ที่ได้ยาหลอก พบว่าผู้ที่ได้รับมะนาวผงมีระดับโปรตีนในปัสสาวะลดลงมากกว่ากลุ่มผู้ที่ได้ยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ (0.027) รวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงของสารก่อนนิ้ว สารยับยั้งนิ้ว ค่าความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ รวมถึงความเครียดทางออกซิเดชันในปัสสาวะ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปัสสาวะในผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่ได้รับมะนาวผงเปรียบเทียบกับยาหลอก ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยามะนาวผงต่อการป้องกันการเกิดโรคนิ้วไตกลับเป็นซ้ำได้มากขึ้น รวมถึงอาจนำไปสู่การค้นพบประโยชน์ของยามะนาวผงในแง่อื่นๆ ที่นอกเหนือไปจากการป้องกันการเกิดนิ้วเพียงอย่างเดียว

1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research objectives)

1. เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีนในปัสสาวะผู้ป่วยโรคนิ้วไต ที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงหลังได้รับ ยามะนาวผง เป็นระยะเวลา 6 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับกรให้ placebo
2. เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นของการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำของสูตรมะนาวผง โดยศึกษาจาก โปรตีนในปัสสาวะที่เปลี่ยนแปลงไป

1.3. ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำ ตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ
2. การศึกษาวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผง ในผู้ป่วยโรคนิ้วไต” โดยมี นพ.สุพจน์ รัชชานนท์ เป็นหัวหน้าโครงการ และ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ เป็นผู้อำนวยการโครงการ ตัวอย่างสารชีวภาพ ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ ได้จากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมใน โครงการดังกล่าว โดยผ่านการลงชื่อยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการ

1.4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitations)

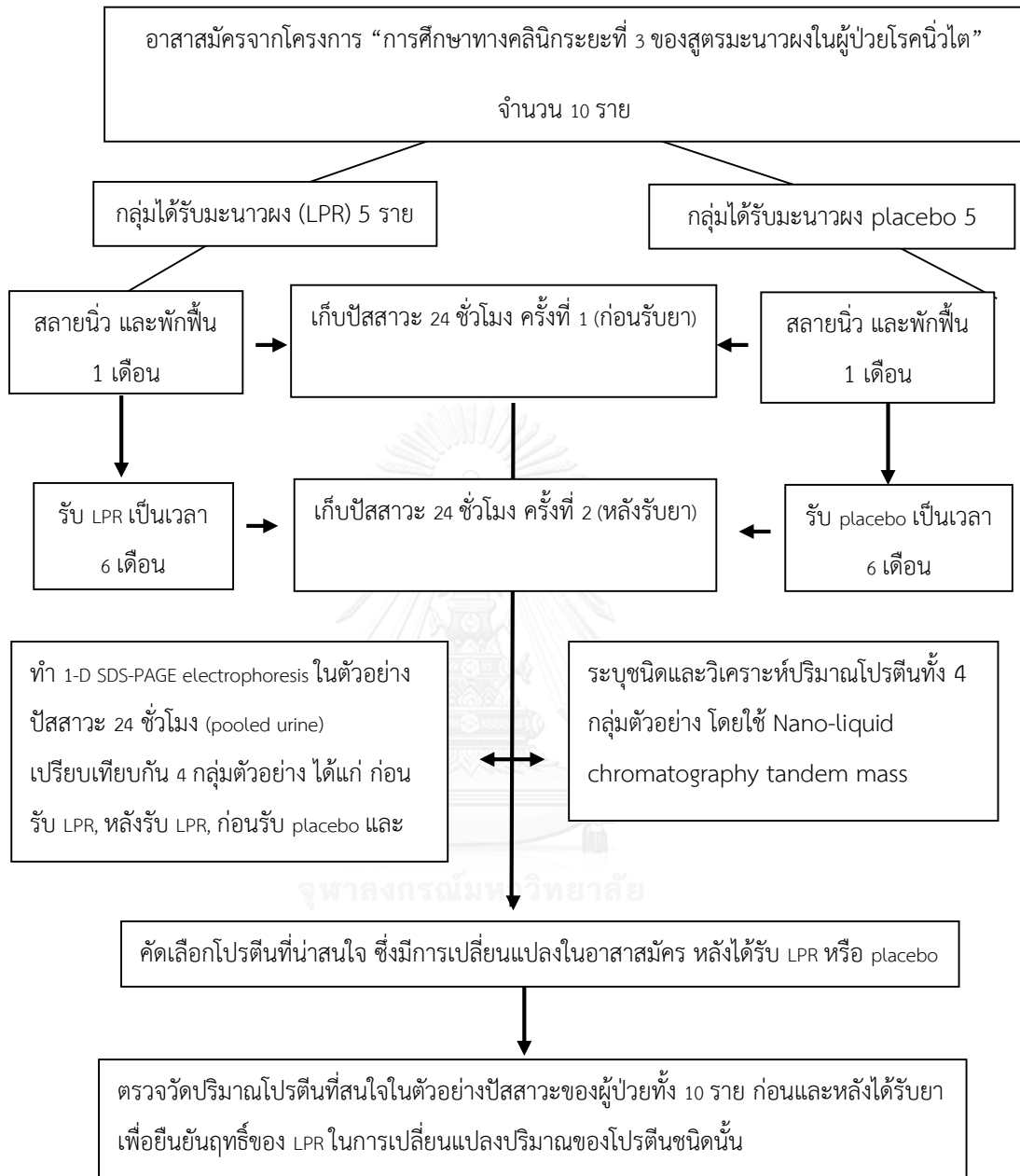
จากการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ้วไต พบว่า ยามะนาวผง หรือ lime powder regimen ทำให้ปริมาณซิเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น ซึ่งช่วยลดปัจจัยเสี่ยงการเกิดนิ่วซ้ำใน ผู้ป่วยได้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของสูตรยามะนาวผงต่อปริมาณโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรค นิ้วไต จึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนในปัสสาวะที่ลดลง อาจเป็นโปรตีนชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด นิ่ว รวมทั้งสารตัวอย่างที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกัน คือปัสสาวะของผู้ป่วยหลังรับการผ่าตัด เป็นเวลา 1 เดือน (U2) และหลังรับสูตรยามะนาวผง/ placebo เป็นเวลา 6 เดือน กล่าวคือเป็นระยะเวลา หลังจากผ่าตัดไปแล้ว 7 เดือน (U3) ดังนั้น โปรตีนในปัสสาวะที่ลดลง อาจเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ การอักเสบ (inflammatory protein) ซึ่งพบในปัสสาวะมากขึ้นเนื่องจากการผ่าตัด และมีปริมาณ ลดลงเมื่อร่างกายผู้ป่วยเกิดการรักษาแผลตามธรรมชาติ (wound healing) หรือการอักเสบลดลงตาม ระยะเวลา ซึ่งอาจไม่สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่ลดลงเป็นผลมาจากการได้รับสูตร ยามะนาวผง

1.5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Key words)

- 1.5.1. Urolithiasis คือ โรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ ไนไต ท่อไต กระเพาะปัสสาวะ และท่อปัสสาวะ
- 1.5.2. Kidney stone disease หรือ Renal stones คือ โรคนิ่วไต ซึ่งมีก้อนนิ่วอยู่บริเวณ ตำแหน่งที่กรวยไต (renal pelvis) และสูงกว่ากรวยไตขึ้นไป
- 1.5.3. Proteinuria ภาวะเมื่อโปรตีนรั่วในปัสสาวะมากกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน
- 1.5.4. Lime powder regimen สูตรระขามะนาวผงที่พัฒนาขึ้นเพื่อการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต
- 1.5.5. Proteome การศึกษาชนิด และหน้าที่ของโปรตีนในตัวอย่างทางชีวภาพที่ซับซ้อน ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจในธรรมชาติความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้น



1.6. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย (Conceptual framework)



รูป 1 กรอบแนวคิดวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. โรคนิ่วไต (Kidney stone disease)

โรคนิ่วไต เป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ ในประเทศไทยพบความชุกของโรคสูงสุด คือเกือบร้อยละ 17 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคเหนือ (1) การเกิดก้อนนิ่วอุดตันในทางเดินปัสสาวะก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดที่ท้องและสีข้าง ปัสสาวะเป็นเลือด เพิ่มโอกาสติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ รวมถึงการมีอัตราเกิดนิ่วซ้ำได้สูงหลังผ่าตัดหรือสลายนิ่ว (2) จึงเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease) ตามมา (5)

โรคนิ่วไตเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ซึ่งส่งผลให้ปัสสาวะเกิดความอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturation) และเกิดผลึกของสารเชิงซ้อนรวมตัวกันเป็นก้อนนิ่ว อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ทำให้เกิดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดนิ่ว (Lithogenic risk factors) ได้แก่ พันธุกรรม การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ความผิดปกติทางกายวิภาคของทางเดินปัสสาวะ การเกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างสารก่อนนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ เช่นมีสารก่อนนิ่วสูง ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต กรดยูริก ร่วมกับการมีระดับสารยับยั้งนิ่วต่ำ ได้แก่ ซิเตรต โพแทสเซียม แมกนีเซียม (10) การที่ปัสสาวะมีปริมาตรน้อย ความเป็นกรดหรือด่างที่ผิดปกติของปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มอาการทางเมแทบอลิก (metabolic syndrome) ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดนิ่วได้ เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) มีโอกาสเกิดนิ่วกรดยูริกและนิ่วแคลเซียมได้สูง จากการเกิดภาวะกรด (acidosis) ส่งผลให้ปัสสาวะเป็นกรดมากขึ้น จึงมีการเกิดนิ่วกรดยูริกได้ รวมถึงมีการสลายแคลเซียมจากกระดูกมากขึ้น ทำให้มีการขับแคลเซียมทางปัสสาวะสูง จึงเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วแคลเซียม (11)

2.2. องค์ประกอบและชนิดของนิ่ว (Stone compositions and stone types)

ก้อนนิ่วมีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน ได้แก่ 1) ส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ หรือแร่ธาตุ (mineral composition) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 95 ของน้ำหนัก และส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic matrix) คิดเป็นร้อยละ 2-5 ของน้ำหนัก ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้เป็นสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (12, 13)

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของก้อนนิ่วในส่วนแร่ธาตุ จะสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (calcium stones) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 80 และนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (non-calcium stone) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 20

นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ หรือนิ่วแคลเซียม ได้แก่ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate stone, CaOX) ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในประเทศไทยและทั่วโลก (14) และนิ่วแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate stone, CaP) ส่วนนิ่วชนิดที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วสตรูไวท์ (struvite stone) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินปัสสาวะ และนิ่วซิสตีน (cysteine stone) อย่างไรก็ตาม อาจพบนิ่วเนื้อผสมระหว่างนิ่วแคลเซียมและนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมได้เช่นกัน เช่น นิ่วแคลเซียมออกซาเลตผสมกรดยูริก เป็นต้น

2.3 สารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่ว (Stone promoters and inhibitors)

สารก่อนิ่ว (stone promoter) คือสารที่กระตุ้นการเกิดนิ่วในกระบอกไต เมื่อจับกันแล้วจะเกิดเป็นผลึกที่ไม่ละลายในปัสสาวะ ซึ่งผลึกดังกล่าวมีโอกาสที่จะรวมตัวกันเป็นก้อนนิ่วที่ขนาดใหญ่ขึ้นได้ สารก่อนิ่วในปัสสาวะ ได้แก่ แคลเซียม ซึ่งมีประจุบวก ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริกหรือยูเรต ซึ่งมีประจุลบ เป็นต้น (15) ปัจจัยที่ทำให้สารก่อนิ่วตกตะกอนในปัสสาวะ ได้แก่ ปริมาณสารก่อนิ่วมีมาก ปริมาตรปัสสาวะที่น้อย ทำให้สารก่อนิ่วมีความเข้มข้นสูง และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ของปัสสาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนของสารที่จำเพาะ เมื่อมีปัจจัยเหล่านี้ ปัสสาวะจะเกิดความอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ที่ส่งผลให้สารก่อนิ่วมีโอกาสตกผลึกได้มากขึ้น

สารยับยั้งนิ่วเป็นสารในปัสสาวะที่ช่วยป้องกันการเกิดนิ่วในกระบอกไตต่างๆ เช่น ยับยั้งการจับกันเป็นผลึกของสารก่อนิ่ว และทำให้สารก่อนิ่วนั้นละลายได้ดีในปัสสาวะ ลดความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ รวมถึงยับยั้งการเกาะของผลึกกับเซลล์เยื่อหุ้มหลอดไต สารยับยั้งนิ่วแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เป็นแร่ธาตุ เช่น ซิเตรต (citrate) แมกนีเซียม (magnesium) และโพแทสเซียม (potassium) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โพรตีนบางชนิด ไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans, GAGs) (16)

2.4. กระบวนการเกิดนิ่ว (Mechanism of renal stone formation)

เมื่อมีปริมาณไอออนในปัสสาวะมากเกินไปจนจุดอิ่มตัว จนปัสสาวะเกิดความอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) จะเกิดการจับกันของประจุเป็นสารเชิงซ้อนได้ในทันที หากสารเชิงซ้อนดังกล่าวมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ เช่น แคลเซียมออกซาเลต จะตกตะกอนเป็นผลึก เรียกว่า กระบวนการ ตกผลึก หรือ crystal nucleation เมื่อเกิดผลึกมากขึ้นจะสามารถรวมตัวกัน ทำให้ผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้น (crystal growth) ซึ่งอาจจะเกิดจากผลึกของสารชนิดเดียวกัน หรือผลึกของสารต่างชนิดกันก็ได้ ผลึกที่โตขึ้นนี้จะเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนนิ่วได้ (crystal aggregation) โดยมีสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โพรตีนหรือไกลโคโปรตีนบางชนิด ทำหน้าที่เป็นตัวยึดผลึกเหล่านี้เข้าด้วยกัน ร่วมกับประจุที่ต่างกันหรือไอออน ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุ ซึ่งจุดศูนย์กลางอาจเป็นกลุ่มของผลึกของสารก้อนนิ่วหรือสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีการเกาะของผลึกต่างๆ รอบๆ จุดศูนย์กลาง ทำให้ก้อนนิ่วขยายขนาดขึ้น (17, 18)

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา มีการสรุปทฤษฎี ที่ได้อธิบายกระบวนการที่ก้อนนิ่วนั้น จะเกิดการเกาะยึดติดอยู่ที่ส่วนต่างๆ ของไต (crystal retention) และอุดกั้นทางเดินปัสสาวะได้ โดยทฤษฎีแรก ได้แก่ **Fixed and free particle theory** โดยได้อธิบายว่า ผลึกของสารก้อนนิ่วสามารถรวมตัวจนมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ใน lumen ของท่อหน่วยไต หรือส่วนอื่นๆ ของไต จนมีขนาดใหญ่พอจะอุดกั้นท่อไตได้ หรือมีผลึกส่วนหนึ่งไปเกิดการยึดเกาะกับผิวของเซลล์บุหลอดไตก่อน จากนั้นจึงมีการรวมตัวของผลึกทำให้ก้อนนิ่วมีขนาดโตขึ้น เป็นผลให้มีแคลเซียมเกาะในบริเวณท่อไต ทฤษฎีที่ 2 ได้แก่ **Randall's plaque hypothesis** กล่าวว่า เมื่อเซลล์บริเวณ papilla ของไตเกิดการบาดเจ็บหรือบาดแผล จะเกิดการฝังตัวของตะกอนของผลึก calcium phosphate ที่ interstitium ซึ่งเรียกว่า "Randall's plaque" ในบริเวณบาดแผล (lesion) ดังกล่าว ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ผลึกของสารก้อนนิ่วสามารถมายึดเกาะที่บริเวณนั้น ชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โพรตีนคอลลาเจน จะทำหน้าที่ยึดสารต่างๆ ให้รวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนนิ่ว มีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดกั้นทางเดินปัสสาวะได้ (19)

2.5. สูตรระฆัง กีบบทบาทในการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำ

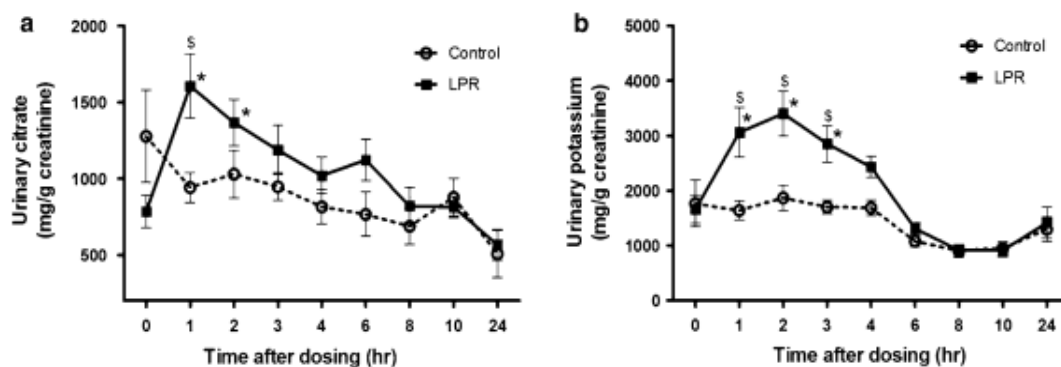
ปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดโรคนิ่วไตและการเกิดนิ่วซ้ำในคนไทย คือการมีระดับซีเทรตในปัสสาวะต่ำกว่า 200 mg ต่อวัน ซึ่งเป็นภาวะที่พบในผู้ป่วยนิ่วชาวไทยที่เกิดเป็นนิ่วซ้ำถึงร้อยละ 70 (20) การมีซีเทรตในปัสสาวะต่ำเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การบริโภคซีเทรตต่ำ การบริโภคคาร์โบไฮเดรตกับ

โปรตีนสูง และบริโภคน้ำมันต่ำ การมีระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะต่ำ รวมถึงการเกิด renal tubular acidosis (21)

ในมะนาว พบว่ามีปริมาณซิเตรตเป็นองค์ประกอบมาก มีการศึกษาพบว่าผู้ที่มีภาวะซิเตรตในปัสสาวะต่ำ เมื่อเพิ่มการบริโภคซิเตรตจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ในผลไม้ อันได้แก่ มะนาว ส้ม จะทำให้ปริมาณซิเตรตในปัสสาวะเพิ่มขึ้นได้ โดยปราศจากผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น อาการปวดแสบท้อง (22)

ศ.ปิยะรัตน์ และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ยามะนาวผงในการป้องกันการเกิดนิ่วซั้ยยามะนาวผงมีสารประกอบสำคัญ ได้แก่ กรดซิตริก ซึ่งมีผลในการเพิ่มระดับซิเตรตในปัสสาวะ และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีการศึกษาพบว่าซิเตรตสามารถยับยั้งการทำงานของ NF-kB ลดการแสดงออกของ iNOS, COX2 และ inflammatory cytokines ใน RAW 264.7 cells ได้ (23) อีกทั้งการศึกษาฤทธิ์ของซิเตรตในหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าการให้ซิเตรต 1-2 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถลด lipid peroxidation ความเสียหายของตับและ DNA fragmentation ได้ (24) นอกจากนี้ การให้กรดซิตริกจะช่วยเพิ่มอัตราการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis และการสร้างพลังงานทำให้ช่วยบรรเทาความเมื่อยล้าของร่างกายได้อีกด้วย

จากการศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 1 ของมะนาวผง เมื่อทดสอบกับ Calcium oxalate monohydrate-treated HK-2 cell พบว่ามะนาวผงสามารถยับยั้งการโตของผลึกแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต และยับยั้งการสร้าง reactive oxygen species ภายในเซลล์ได้ การทดสอบผลของมะนาวผงในหนูและอาสาสมัครสุขภาพดี ไม่พบผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย หลังจากได้รับประทานมะนาวผง 5 กรัม/dose และในอาสาสมัครที่ได้รับมะนาวผง พบว่ามีปริมาณซิเตรตและโพแทสเซียมในปัสสาวะเพิ่มขึ้น และมากกว่ากลุ่มควบคุม (25) (ภาพที่ 1)



รูป 2 ผลของการให้มะนาวผงในอาสาสมัครสุขภาพดี ต่อ a) ระดับซิเตรตในปัสสาวะ ในเวลา 24 ชั่วโมง และ b) ระดับโพแทสเซียมในปัสสาวะ ในเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้น ศ.ปิยะรัตน์ และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของมะนาวผงในการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไต ในโครงการเรื่อง “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนิ่วไต” โดยใช้กลุ่มตัวอย่างคือผู้ป่วยโรคนิ่วไต ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ได้รับการสลายนิ่วแล้ว เมื่อศึกษาทางคลินิกเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยามะนาวผง มีระดับซิเทรตในปัสสาวะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมากกว่าผู้ที่ได้รับ placebo ดังนั้น จึงสรุปได้ว่ายามะนาวผงสามารถเพิ่มระดับซิเทรตในปัสสาวะ ซึ่งเป็นสารยับยั้งนิ่วที่สำคัญได้

2.6. โปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Urinary protein of kidney stone patient)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบของ matrix ในก้อนนิ่ว ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 2-5 ของน้ำหนักรวมก้อนนิ่ว และมีความสำคัญในกระบวนการโตของผลึกและการก่อตัวของก้อนนิ่ว การศึกษาชนิดโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต โดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ โดย CA Wright et. al. พบว่ามีโปรตีนมากกว่า 350 ชนิด ที่พบเฉพาะในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ ส่วนมากเกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และสัมพันธ์กับอาการของโรค เช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และพบโปรตีน 34 ชนิดที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต สูงกว่าในปัสสาวะคนปกติมากกว่า 2 เท่า โปรตีนที่พบส่วนมากเป็นโปรตีนที่มาจากพลาสมา เช่น hemoglobin-alpha ซึ่งสอดคล้องกับอาการของผู้ป่วยที่มีเลือดปนในปัสสาวะ และโปรตีนอื่นๆ เช่น alpha-2-macroglobin, fibrinogen และ ceruloplasmin อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนเหล่านี้พบมากขึ้นเพราะมีบทบาทต่อการเกิดนิ่วโดยตรงหรือเป็นผลมาจากการบาดเจ็บของไต (26)

มีการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของปัสสาวะ รวมถึง stone matrix ซึ่งพบว่า ชนิดของโปรตีนที่จำเพาะในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต มักเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดพังผืด (inflammatory and fibrotic proteins) ในบรรดาโปรตีนเหล่านี้ มีทั้งที่ถูกกรองจากพลาสมา เช่น Haptoglobin และ α -1B-glycoprotein และสร้างจากไต เช่น Fibronectin เป็นต้น และมีโปรตีนในปัสสาวะ 18 ชนิด ที่จำเพาะกับผู้ป่วยโรคนิ่วไต และน่าจะใช้บ่งชี้การเกิดนิ่วได้ เช่น S100A8, lysozyme C และ serotransferrin ซึ่งส่วนมากเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (9) (ตารางที่ 1)

ตาราง 1 แสดงชนิดโปรตีนที่พบเฉพาะในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ้วไตและก้อนนิ้ว แต่ไม่พบในปัสสาวะคนปกติ

Protein name	Function/group	Freq. (n = 30)	Avg. score
S100A8	Inflammation	27	1151
Lysozyme C	Inflammation	24	105
Serotransferrin	Inflammation	21	401
S100A9	Inflammation	20	470
Hypothetical proteins		20	300
Lactotransferrin	Inflammation	18	1101
Myeloperoxidase	Inflammation	18	410
Hemoglobin subunits	Cellular protein	17	409
Haptoglobin and haptoglobin-related proteins	Plasma protein	17	129
Neutrophil defensin 3	Inflammation	15	88
Alpha-2-macroglobulin	Immunity	13	169
Neutrophil defensin 1	Inflammation	11	97
Fibrinogen beta chain	Coagulation	11	91
Fibronectins	Fibrosis	9	288
Fibrinogen gamma chain	Coagulation	9	90
Ceruloplasmin	Inflammation	5	119
Complement factor H	Immunity	5	76
Annexins (A2, A2P2, A3, A5)	Cellular protein	3	118

Freq.: Frequency, Avg.: Average.

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Boonla C, 2014)

เมื่อพิจารณาชนิดของโปรตีนในปัสสาวะ ตามบทบาทในการก่อโรค จะสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่กระตุ้นการเกิดโรค เช่น Annexin II และกลุ่มโปรตีนที่ยับยั้งการเกิดโรค เช่น Nephrocalcin ในขณะที่โปรตีนบางชนิดมีบทบาทเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นการเกิดโรคและตัวยับยั้งโรค ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ลักษณะปัสสาวะ เช่น Tamm-Horsfall protein แต่จากการศึกษาพบว่า มีบทบาทในการยับยั้งโรคที่เด่นชัดกว่า ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดจะพบบทบาทการกระตุ้น หรือยับยั้งการเกิดโรค ในขั้นตอนต่างๆ กัน (7, 27)

ตาราง 2 แสดงชนิดของโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว

ลำดับ	ชื่อโปรตีน	Molecular weight	บทบาทในกระบวนการเกิดนิ่ว (I : ยับยั้ง / P : กระตุ้น)			
			Nucleation	Growth	Aggregation	Adhesion
1	Nephrocalcin (NC)	14	I	I	I	-
2	Tamm-Horsfall Protein	4.8	P	-	I/P	-
3	Osteopontin (OPN)	42-80	I	I	I	I/P
4	Albumin	66.5	P	-	I	-
5	Prothrombin fragment 1	31	I	I	I	-
6	Annexin II	37	-	-	-	P
7	Myeloperoxidase	83.9	-	P	P	-
8	Fibronectin	230	-	-	I	I
9	Protein Wnt-2	42	-	I	I	-

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kanu Priya A.)

2.7. ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (Microalbuminuria in kidney stone patients)

อัลบูมิน (albumin) เป็นโปรตีนขนส่งที่มีมากที่สุดไหลในพลาสมา หรือประมาณร้อยละ 60-65 ของโปรตีนในเลือดทั้งหมด อัลบูมินมีน้ำหนักโมเลกุล 62-68 กิโลดาลตัน มีหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกในเลือด

ผนังส่วนโกลเมอรูลัสของไตซึ่งทำหน้าที่กรองเลือดจากร่างกาย จะให้โมเลกุลขนาดไม่เกิน 60 กิโลดาลตันเท่านั้นถูกกรองผ่านได้ ดังนั้นโปรตีนอัลบูมินจะถูกกรอง และพบในปัสสาวะเพียงปริมาณเล็กน้อย คือไม่เกิน 30 มิลลิกรัมต่อวัน หากเกิดความผิดปกติของโกลเมอรูลัส อาจพบอัลบูมินถูกขับออกทางปัสสาวะมากขึ้น การพบปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่อยู่ระหว่าง 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน เรียกว่า ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) และหากพบอัลบูมินในปัสสาวะ มากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวันขึ้นไป จัดเป็น ภาวะแมโครอัลบูมินูเรีย (macroalbuminuria) (28)

การพบอัลบูมินในปัสสาวะมากกว่าปกติ แสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของไตที่ลดลง ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะจึงถูกใช้ในการติดตามการทำงานของไตในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease) ร่วมกับการวัดประสิทธิภาพการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR)

ภาวะไม่โครอัลบูมินูเรียเรื้อรัง ใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ทำนายการเกิดโรคไตเสื่อมจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) (29) รวมถึงยังพบว่า ภาวะไม่โครอัลบูมินูเรียมีความสัมพันธ์กับภาวะความดันโลหิตสูง การตรวจพบภาวะไม่โครอัลบูมินูเรีย จึงบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) ได้อีกด้วย (30, 31)

ในผู้ป่วยโรคนี้ไต มีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดโรคไตเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่โรคไตระยะสุดท้าย (End stage renal disease, ESRD) ได้มากกว่าคนปกติ รวมถึงมีการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยโรคนี้ไตจะมีระดับโปรตีนในปัสสาวะสูงกว่าคนปกติอีกด้วย (9, 32) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการศึกษาที่ชี้ชัดว่าผู้ป่วยโรคนี้ไตจะมีโอกาสพบภาวะไม่โครอัลบูมินูเรียสูงขึ้นด้วยหรือไม่

โปรตีนอัลบูมิน เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในปัสสาวะที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว มีการศึกษาพบว่าอัลบูมินเป็นส่วนประกอบหนึ่งของก้อนนิ่ว และสามารถจับกับผลึกของแคลเซียมออกซาเลตและกรดยูริกได้ดี (33, 34) เมื่อปัสสาวะมีผลึกสารก่อนิ่วเพียงปริมาณน้อยๆ อัลบูมินจึงสามารถป้องกันการเกาะกันของผลึกแคลเซียมออกซาเลตได้ (35) แต่หากในปัสสาวะมีการร่วของโปรตีนอัลบูมินปริมาณมาก จะทำให้เซลล์บุหลอดเลือดเกิดการบาดเจ็บ เมื่อสัมผัสกับปัสสาวะที่มีผลึกของสารก่อนิ่วมากและมีความอึดตัวสูง จะกระตุ้นการเกิด crystal nucleation หรือทำให้ผลึกดังกล่าวมายึดติดกับเซลล์หรือนิเวเคลียสได้มากขึ้น (36) นอกจากนี้ อัลบูมินยังเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดอื่นๆ ในปัสสาวะมายึดเกาะและกลายเป็นส่วนหนึ่งของ stone matrix ทำให้ก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย (37)

2.8. โปรตีนทรานสเฟอร์ริน กับบทบาทในการเกิดนิ่ว (Transferrin and the role in stone formation)

ทรานสเฟอร์ริน (transferrin, TF) เป็นโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 80 กิโลดาลตัน ที่ทำหน้าที่จับและขนส่งเหล็ก (Fe^{2+}) ในพลาสมา เมื่อเกิด heme degradation TF จะเข้าจับกับเหล็กอิสระ TF จึงมีบทบาทในการควบคุมระดับธาตุเหล็กอิสระ (free iron) ในเลือดและของเหลวภายในร่างกาย ระดับของทรานสเฟอร์รินในเลือดที่สูงขึ้น จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะขาดธาตุเหล็กได้ (38) ทรานสเฟอร์รินเป็นโปรตีนขนาดใหญ่จึงมักไม่ถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัสของไต ดังนั้น การตรวจพบระดับทรานสเฟอร์รินในปัสสาวะสูง จึงบ่งบอกถึงความเสียหายของไตได้ ในปัจจุบัน พบว่าการขับออกของโปรตีนทรานสเฟอร์รินในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับการขับออกของอัลบูมิน โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่พัฒนาเป็นโรคไตเรื้อรัง เมื่อไตเกิดความเสียหาย โปรตีนขนาดใหญ่ในพลาสมาจะถูกกรองมาสู่ปัสสาวะได้มากขึ้น (39) แม้ทรานสเฟอร์รินจะมีขนาดใหญ่กว่าอัลบูมิน แต่มีประจุลบน้อย

กว่า ทำให้มีโอกาสดูกร่องผ่านโกลเมอรูลัสได้มากกว่า(40) ระดับทรานสเฟอรินในปัสสาวะ จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะไมโครอัลบูมินูเรียในผู้ป่วยโรคไตที่เกิดจากเบาหวานได้ (39)

บทบาทของโปรตีนทรานสเฟอรินในกระบวนการเกิดนิ่วยังไม่มีการศึกษามากนัก แต่มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคไตมีการขับทรานสเฟอรินออกทางปัสสาวะ ในขณะที่ปัสสาวะของกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีไม่พบการขับออกของทรานสเฟอริน หรือพบน้อยมาก (41, 42) โปรตีนทรานสเฟอรินจึงน่าจะมียบทบาทต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว

2.9. โปรตีนแทม ฮอร์สฟอลกับบทบาทในการเกิดนิ่ว (Tamm-Horsfall protein and the role in stone formation)

Tamm-Horsfall Protein (THP) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดที่ปัสสาวะของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ (43) และยังพบเป็นส่วนประกอบหนึ่งของแมทริกซ์ (matrix) ในก้อนนิ่ว (17) ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้และบทบาทต่อโรคไตอย่างกว้างขวาง Tamm-Horsfall Protein (THP) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 กิโลดาลตัน อาจพบการขับออกในปัสสาวะคนปกติได้มากถึง 20-100 มิลลิกรัมต่อวัน

THP ถูกสร้างและหลั่งโดยเซลล์บุหลอดไต บทบาทของโปรตีนชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าจะมีความสำคัญในการทำให้เกิดโครงสร้างลักษณะคล้ายเจลที่ apical membrane ของเซลล์บุหลอดไต บริเวณ thick ascending limb of Henle's loop ซึ่งจะควบคุมการแทรกผ่านของน้ำที่ท่อไต นอกจากนี้ยังพบว่า THP อาจมีบทบาทเป็นตัวรับ (receptor) ของ cytokines บางตัว เช่น IL-1, IL-2, TNF ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลผ่านเซลล์บุหลอดไต อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่า THP มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ เช่น เยื่อหลอดไตอักเสบ หรือโรคไตไต จากการศึกษาดังกล่าว จึงมีการตั้งสมมุติฐานว่า THP น่าจะเป็นด่านแรกในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียและกระบวนการเกิดนิ่วในไต (44, 45)

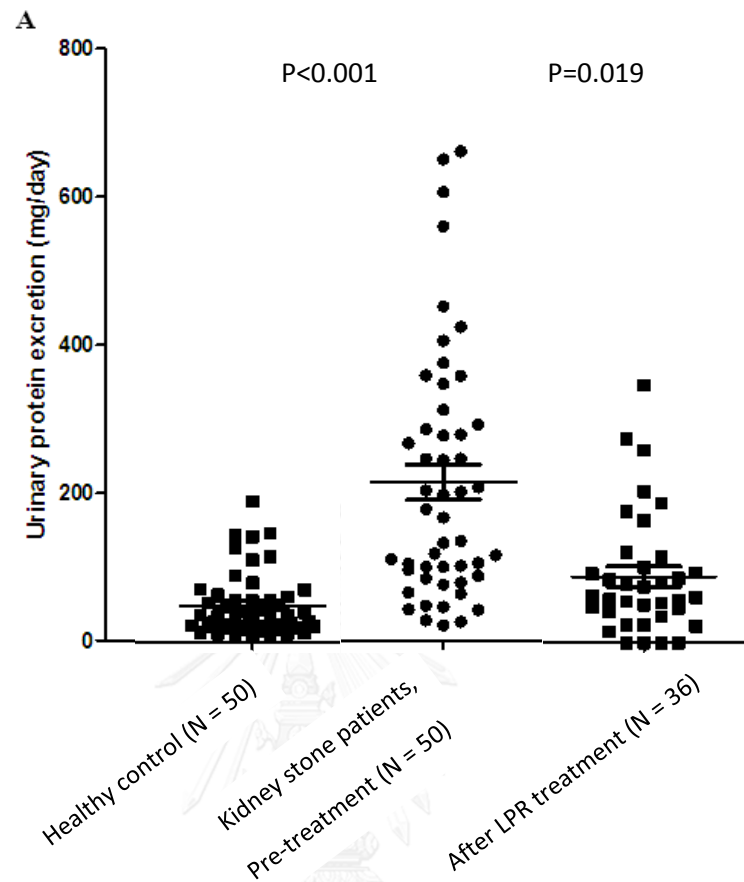
นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า THP มีบทบาทในการป้องกันการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) ได้ โดยการจับกับพื้นผิวของผลึกแคลเซียมออกซาเลต ขัดขวางไม่ให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของผลึก (crystal aggregation) (46, 47) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่พบว่า THP มีบทบาทกระตุ้นการเกิดนิ่วได้เช่นกัน โดยในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสารก่อกวนสูง (high osmolality) THP จะเป็นตัวเชื่อมผลึกแคลเซียมออกซาเลตเข้าด้วยกัน และทำให้ผลึกยึดเกาะกับนิ่วเคลือบได้ดีขึ้น (48) THP จึงน่าจะเป็นสารป้องกันการเกิดนิ่วที่มีประสิทธิภาพ ในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นปกติเท่านั้น

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่า ปริมาณ THP ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ชนิดแคลเซียมออกซาเลต มีระดับต่ำกว่าในคนปกติอีกด้วย (49) จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา จึงอาจสรุปได้ว่า THP มีทั้งบทบาทในการป้องกันและกระตุ้นการเกิดนิ่ว ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปัสสาวะ

2.10. สูตรมะนาวผง สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ

ในปัจจุบัน ยังไม่มีผลการศึกษาที่ระบุว่ามะนาว หรือสารสำคัญในมะนาว เช่น ซิเทรต สามารถลดระดับโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไตได้โดยกลไกที่จำเพาะ แต่จากผลการศึกษาของนางสาวธนิดา จิระมงคศิริ พบว่าผู้ป่วยโรคนี้ไตที่ได้รับสูตรยามะนาวผงหลังการผ่าตัดนิ่ว เป็นเวลา 6 เดือน จะมีระดับโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ลดลง (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาผลของการให้กรดซิตริกแก่หนูที่เป็นโรคเบาหวาน ชนิดที่ 1 พบว่าสามารถลดภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวาน ได้แก่ cataract ได้ (50)





รูป 3 แสดงปริมาณโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ว่า มีปริมาณสูงกว่าคนปกติ และมีระดับลดลงหลังจากได้รับสูตรยามะนาวผง

(ที่มา: ดัดแปลงจากงานวิจัยของ นางสาวธนิดา จิระมงคลศิริ – ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่)

ซิเทรต ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในสูตรมะนาวผง มีบทบาทโดยตรงต่อเมแทบอลิซึมของพลังงานภายในเซลล์ นอกจากซิเทรตจะมีบทบาทเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วแล้ว พบว่าซิเทรตยังยับยั้งกลไกการอักเสบ จาก lipid peroxidation โดยการลด reactive oxygen species (23) เพิ่มระดับของ antioxidant enzymes และยับยั้งการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ต่างๆ (5) เมื่อพิจารณาจากการศึกษาดังกล่าว ร่วมกับความสามารถของซิเทรตในการป้องกันการเกิดนิ่ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าซิเทรตสามารถลดระดับโปรตีนในปัสสาวะ อันเป็นผลมาจากความบาดเจ็บของไตในผู้ป่วยโรคนี้ รวมถึงโปรตีนที่บ่งชี้การอักเสบในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ว่าได้

2.11. เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์

โปรตีโอม (Proteome) คือ การศึกษาคุณลักษณะ รูปร่าง ปริมาณ บทบาท และหน้าที่ของโปรตีน ทั้งในเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือสารชีวภาพอื่นๆ ในระยะเวลา หรือภาวะใดภาวะหนึ่ง ครอบคลุม เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ในปัจจุบัน มีความสามารถสูงในการจำแนกชนิดของโปรตีนได้อย่างละเอียด ในสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (51) จึงมีความเหมาะสมที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ ทั้งในด้านการวินิจฉัย ตรวจติดตาม และการวิจัยทางการแพทย์

วัตถุประสงค์ของการใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ในทางการแพทย์ ได้แก่ การศึกษาปริมาณและรูปแบบของโปรตีนที่แสดงออกในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น โรคต่างๆ การได้รับยาบางชนิด การทราบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน ทำให้เราสามารถศึกษาไปถึงกลไกของเมแทบอลิซึมในเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย รวมทั้งการถอดรหัสและแปลรหัสของยีนในเซลล์นั้นๆ ได้ ซึ่งสามารถอธิบายความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการศึกษาจีโนม (genomic) เพียงอย่างเดียว (5)

งานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ แบ่งเป็น 2 ด้านหลักๆ คือ 1) Expression proteomics ทำเพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่มี หรือแสดงออกทั้งหมด ในเซลล์ อวัยวะ หรือสารชีวภาพต่างๆ ในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง เช่น การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนที่แสดงออกในเซลล์มะเร็งระดับ 2) Targeted proteomics ทำเพื่อศึกษา หรือวิเคราะห์บทบาท กลไกการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่ง ในระดับโปรตีน เช่น การศึกษา protein - protein interaction, post-translational modification และ protein localization เป็นต้น (52)

การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ มีกระบวนการตามลำดับ ได้แก่ 1) การเก็บตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาและรักษาคุณภาพสารตัวอย่าง 2) การแยกโปรตีนเพื่อนำมาวิเคราะห์ 3) การวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่าง และ 4) การนำผลที่ได้มาวิเคราะห์คุณลักษณะของโปรตีนในตัวอย่างที่ศึกษา

1. การเก็บสารตัวอย่างและการรักษาคุณภาพ

สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ในทางการแพทย์ ได้แก่ สารชีวภาพต่างๆ ที่เก็บจากร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น พลาสมา ซีรัม ปัสสาวะ เซลล์ต่างๆ เนื้อเยื่อ รวมถึงเซลล์ที่เลี้ยงเพื่อการทดลอง คุณภาพของโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างในธรรมชาติ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บ กลไกการแข็งตัวของเลือดและการสลายโปรตีนในสารตัวอย่างโดยเอนไซม์ protease (53, 54) ดังนั้น การเก็บรักษาสารตัวอย่างให้มีคุณภาพเหมาะสม จึงต้องควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม

2. การแยกโปรตีนที่สนใจจากตัวอย่าง (Protein separation : Pre-fractionation and fractionation)

ในสารตัวอย่างต่างๆ เช่น พลาสมา หรือเซลล์ มีโปรตีนจำนวนมาก โปรตีนที่สนใจนั้นมีปริมาณน้อย เมื่อเทียบเป็นสัดส่วนกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ด้วยเครื่อง Mass spectrometer โปรตีนที่มีปริมาณน้อยอาจถูกบดบังด้วยโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่มีปริมาณมาก ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้ เทคนิคการแยกโปรตีนมีหลายวิธีวิธีที่เป็นที่นิยม ได้แก่ Electrophoresis และ Liquid chromatography

- Gel electrophoresis เป็นวิธีการแยกโปรตีนภายในเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกันของโปรตีนแต่ละชนิด เช่น Isoelectric Focusing อาศัยความแตกต่างกันของ isoelectric point โดยใช้เจลที่มี pH แตกต่างกัน (pH gradient) ภายใต้กระแสไฟฟ้า โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปยัง pH ที่ทำให้โปรตีนมีประจุเป็น 0 (55) วิธีที่นิยมใช้ คือ 2D-gel electrophoresis เป็นการรันใน 2 ทิศทาง โดยโปรตีนจะถูกแยกคร่าวๆ ตามขนาดในทิศทางหนึ่ง และตาม isoelectric point ในอีกทิศทางหนึ่ง เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีโปรตีนปริมาณมาก หลากหลายชนิด และมีความซับซ้อนสูง

- Liquid chromatography เป็นการแยกโปรตีนที่อาศัยการแยกส่วนกันของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งทำให้ความสามารถในการละลายใน mobile phase และการเกาะกับ stationary phase ต่างกัน (56) เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาน้อยกว่าการแยกด้วย gel electrophoresis

3. การวิเคราะห์โปรตีนโดยหลักการแมสสเปกโตรเมทรี (Mass Spectrometry)

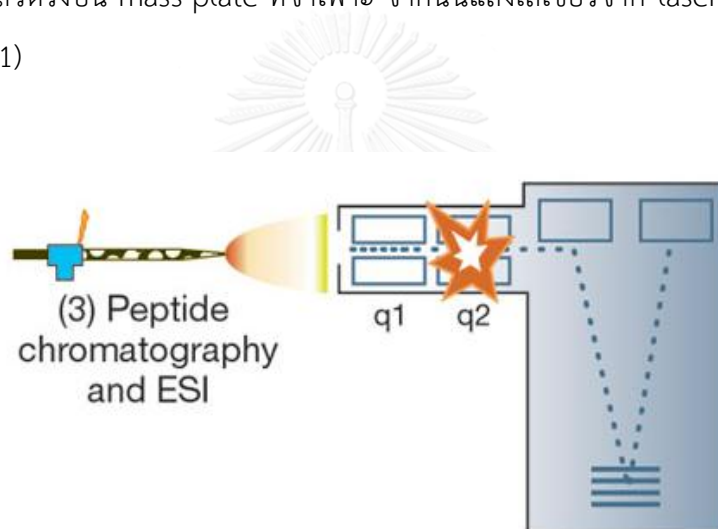
การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ Mass Spectrometry สามารถศึกษาโปรตีนได้ทั้งในเชิงปริมาณ คุณลักษณะของโปรตีน โครงสร้างเปปไทด์ และ post-translational modification โดยหลักการของ Mass Spectrometry คือ เมื่อฉีดสารตัวอย่าง ที่ถูกย่อยด้วยทริปซินแล้ว เข้าสู่เครื่อง Mass spectrometer เปปไทด์จะถูกทำให้เกิดประจุและแตกตัวเป็นไอออน จากนั้นจะถูกแปลงเป็นสัญญาณตรวจวัด และถูกวิเคราะห์ออกมาเป็น มวลต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ผลที่ได้ ออกมาเป็นรูปแบบ MS/MS spectra สามารถนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Protein database) เพื่อระบุชนิดของโปรตีน หรือหาความสัมพันธ์กับสภาวะต่างๆ ได้ (57)

เครื่อง Mass spectrometer ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่ 1) ion source ทำหน้าที่สร้างประจุให้เปปไทด์ 2) mass analyzer ซึ่งตรวจวัดมวลต่อประจุของเปปไทด์ และ 3) detector ซึ่งจะตรวจวัดจำนวนประจุในแต่ละค่ามวลต่อประจุของเปปไทด์ (58)

ส่วนของ Ion source การเติมประจุแก่เปปไทด์ ในปัจจุบันมี 2 เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ Electrospray ionization และ matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

- Electrospray ionization มักใช้กับตัวอย่างที่ละลายในของเหลว (liquid-based) เช่น เปปไทด์ที่แยกด้วย liquid chromatography

- Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) เปปไทด์จะถูกผสมกับ matrix ที่เหมาะสม แล้วตรึงบน mass plate ที่จำเพาะ จากนั้นแสงเลเซอร์จาก laser pulse จะทำให้เปปไทด์มีประจุ (51)



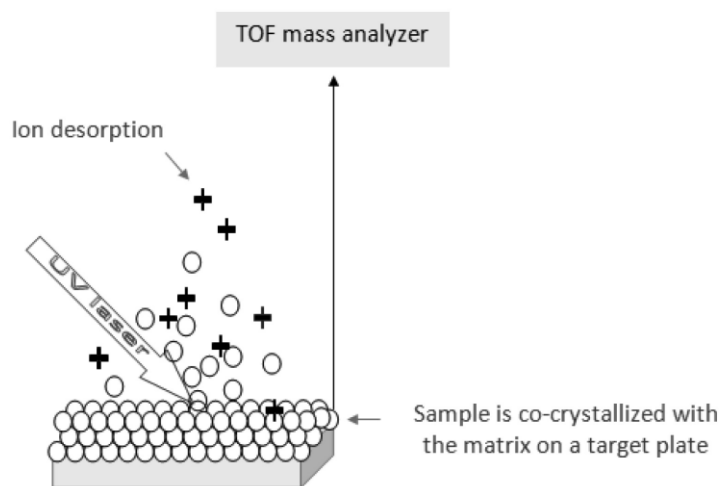
รูป 4 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง Mass spectrometer (23)

(ที่มา: Ruedi Aebersold and Matthias Mann, 2003)

การวิเคราะห์มวลต่อประจุ โดย mass analyzer ที่ใช้ในปัจจุบันมี 4 แบบ ได้แก่ ion trap, time-of-flight (TOF), quadrupole และ Fourier transform ion cyclotron (FT-MS) analyzers ซึ่งเครื่อง Mass spectrometer แต่ละเครื่อง จะมี mass analyzer เพียงแบบใดแบบหนึ่ง หรือมีมากกว่าหนึ่งแบบใช้ร่วมกันในเครื่องเดียวกันก็ได้ ซึ่ง mass analyzer แต่ละแบบจะมีหลักการแตกต่างกัน

ตัวอย่าง mass analyzer ที่นิยมใช้วิเคราะห์โปรตีนในทางการแพทย์ ได้แก่ time-of-flight (TOF) analyzer หลักการคือ เมื่อเปปไทด์แต่ละสายถูกทำให้มีประจุ จะเคลื่อนที่ผ่านหลอดไปสู่ส่วนตรวจวัดสัญญาณ (detector) เปปไทด์ที่มีมวลต่อประจุต่ำกว่า จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเปปไทด์ที่มีมวล

ต่อประจุสูง TOF มีข้อจำกัดคือหากเปปไทด์มีขนาดใหญ่จะใช้เวลาวิเคราะห์นาน TOF มักใช้ร่วมกับ Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) เรียกเครื่องตรวจวิเคราะห์โปรตีนแบบนี้ว่า MALDI-TOF Mass spectrometer (58)



รูป 5 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS

(ที่มา: Aebersold R, 2003)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

การวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรমনาวผงในผู้ป่วยโรคนิ้วไต” ซึ่งมี นพ.สุพจน์ รัชชานนท์ เป็นหัวหน้าโครงการ และ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ เป็นผู้อำนวยการโครงการ โดยในโครงการดังกล่าว ระบุไว้ว่าจะมีการเก็บสารตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ เพื่อตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะเบื้องต้น ปริมาณโปรตีน และชนิดโปรตีนในปัสสาวะ เพื่อดูการทำงานของไต ในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารตัวอย่างปัสสาวะดังกล่าวมาใช้ โดยไม่มีการเก็บปัสสาวะใหม่ ไม่ก่อให้เกิดความลำบากแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ และผลของการวิเคราะห์ปัสสาวะนี้ จะไม่มีหลักฐานหรือไม่สามารถบ่งชี้ถึงตัวตนของผู้เข้าร่วมโครงการได้

ในโครงการ การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรমনาวผงในผู้ป่วยโรคนิ้วไต มีเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการดังนี้

- ผู้ป่วยโรคนิ้วไตที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีความสมัครใจเข้าร่วมโครงการ
- อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
- มีก้อนนิ่วในไต กรวยไต หรือท่อไต
- มีภาพถ่ายทางรังสียืนยันการพบก้อนนิ่ว

ในขณะที่เกณฑ์การคัดออก ได้แก่

- เป็นหญิงตั้งครรภ์ หรืออยู่ระหว่างให้นมบุตร
- เป็นผู้พิการ ช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ ไม่สามารถเก็บปัสสาวะได้สะดวก
- เป็นผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายไต
- มีกายวิภาคไตผิดปกติ มีแคลเซียมสูงจากของฮอร์โมนส์ มีการติดเชื้อเรื้อรังในทางเดิน

ปัสสาวะ

- เป็นโรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นมะเร็งทุกชนิด
- ไม่สามารถลงนามในใบยินยอมได้

ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาใช้ ได้มาจากผู้เข้าร่วมโครงการสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยซึ่งเข้าร่วมโครงการและได้รับสูตรมะนาวผง (LPR group) และกลุ่มที่ได้ยาหลอก (Placebo group) โดยใช้ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่เก็บก่อนเริ่มรับยา และหลังจากรับยาโดยการรับประทานทุกวัน เป็นเวลา 6 เดือน

3.2. ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

ผู้วิจัยได้สุ่มเลือกตัวอย่างปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสูตรมะนาวผง จำนวน 5 ราย และปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ placebo จำนวน 5 ราย กลุ่มประชากรตัวอย่างในการศึกษานี้จึงมีทั้งสิ้น 10 ราย

เนื่องจากการศึกษาปริมาณและชนิดโปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับการบำบัดด้วยสูตรมะนาวผง เป็นการศึกษาใหม่ที่ยังไม่มีงานวิจัยเผยแพร่มาก่อน ประกอบกับเมื่อพิจารณาจากความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ความพร้อมของเครื่องมือ ค่าใช้จ่าย และจำนวนอาสาสมัครจากโครงการเดิมที่มีตัวอย่างปัสสาวะและข้อมูลที่ครบถ้วน ตัวอย่างที่คัดเลือกมาใช้สำหรับการศึกษานี้จึงมีจำนวนน้อย การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในระยะเริ่มต้นเท่านั้น

3.3. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipment)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1. Autoclave	HVE-25, Dublin, Ireland
2. Automatic adjustable micropipette 2, 20, 100, 200, 1000 µl and tips	Bio-rad, CA, USA
3. Centrifuge and Centrifuge tubes	CORNIG, NY, USA
4. Vortex	Scientific Industry, USA
5. Cuvettes (Plastic)	Thermo Scientific, Ohio, USA
6. Microtube 1.5 ml	CORNIG, NY, USA
7. ELISA plate reader	
8. PowerPac™ Mini power supply	Bio-rad, CA, USA
9. Precast gels and 10-well gel loading guild	Bio-rad, CA, USA
10. Molecular Imager, ChemiDoc 5.2	Bio-rad, CA, USA
11. Savant Speedvac AES1010 Vacuum	GMI, Minnesota, USA
12. Nano flow LC mass-spectrometer	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
13. Incubator	-
14. Parafilm	American National Can, USA
15. Multiskan EX microplate reader	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
16. Freezer (-80°C)	-

ตาราง 4 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1. Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
2. Coomassie brilliant blue G250 (Bradford dye reagent)	Bio-rad, CA, USA
3. Trypsin	Promega; Madison, WI
4. Acetonitrile (ACN)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
5. Formic acid	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
6. Protein electrophoresis size standard	Bio-rad, CA, USA
7. SDS solution	Bio-rad, CA, USA
8. Tris SDS running buffer	Bio-rad, CA, USA
9. Human THP ELISA Kit	Mybiosource, CA, USA
10. Human TRF ELISA Kit	Mybiosource, CA, USA

3.4. การเก็บสารตัวอย่างทางชีวภาพ

สารตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ที่ได้แก่ ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเก็บจากผู้ป่วยโรคนี้วไตที่เข้าร่วมโครงการ “การศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ของสูตรমনาพวงในผู้ป่วยโรคนี้วไต” โดยในโครงการดังกล่าว ได้ระบุว่า จะทำการเก็บปัสสาวะผู้ป่วย เพื่อตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะขั้นต้น ในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ หลังสลายนิ่วเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนเริ่มรับสูตรมนาพวง/placeholder และหลังรับสูตรมนาพวง/placeholder เป็นเวลาเวลา 6 เดือน ในแต่ละครั้ง ผู้ป่วยจะได้รับอุปกรณ์การเก็บปัสสาวะ ประกอบด้วยกระบอกเพื่อเก็บปัสสาวะ และขวดพลาสติกเพื่อตวงปริมาณปัสสาวะซึ่งมีสารยับยั้งการเติบโตเชื้อโรค (Thymol) เคลือบอยู่ การเก็บปัสสาวะทำโดยไม่ต้องแช่ตู้เย็นหรือน้ำแข็ง เมื่อการเก็บปัสสาวะเสร็จสิ้น ทีมแพทย์และพยาบาล ฝ่ายศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จะทำการรวบรวมตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด เพื่อตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะเบื้องต้น จากนั้นจึงส่งไปยังภาควิชาวิทยาศาสตร์

ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เพื่อวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะทั้งหมด แยกปัสสาวะออกมา 500 มิลลิลิตร และปั่นเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำปัสสาวะ ที่ความเร็ว 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บน้ำปัสสาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงส่งตัวอย่างปัสสาวะที่แช่แข็งมายังภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป โดยปัสสาวะก่อนตรวจวิเคราะห์ จะถูกเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างจากผู้เข้าร่วมโครงการ “การศึกษาทางคลินิก ระยะที่ 3 ของสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคนี้่วไต” จำนวน 10 ราย ซึ่งเป็นผู้ที่ได้รับมะนาวผง 5 ราย และรับ placebo 5 ราย จากนั้นแบ่งตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งเก็บหลังสลายนิวเป็นเวลา 1 เดือน และหลังได้รับสูตรมะนาวผง/Placebo เป็นเวลา 6 เดือน ของผู้ป่วยดังกล่าว เพื่อมาศึกษาปริมาณและชนิดของโปรตีนในปัสสาวะ โดยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

3.5. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.5.1. การตกตะกอนโปรตีนจากสารตัวอย่างปัสสาวะ

ทำการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะ โดยวิธี Ethanol precipitation

1. ใช้ตัวอย่างปัสสาวะปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมด้วย 100% เอทานอลที่แช่เย็น (ethanol) 3 มิลลิลิตร (เพื่อให้เป็น 75% ethanol)
2. บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000Xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. ดูดส่วนใสออก และเก็บตะกอนโปรตีนไว้ ละลายด้วย 0.5% SDS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
5. เก็บตะกอนโปรตีนที่ละลายแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างในขั้นต่อไป

3.5.2. การวัดความเข้มข้นของโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธีของ Bradford

ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะถูกวัดด้วยวิธีของ Bradford โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน หลักการคือ สารละลาย Coomassie brilliant blue G250 ซึ่งปกติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร แต่เมื่อสารละลายดังกล่าวจับกับโปรตีน

จะเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีแปรผันตามปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

วิธีการตรวจวัดความเข้มข้นโปรตีน มีดังนี้

1. เตรียมตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน (Standard BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
2. ใส่ตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน และตัวอย่างตะกอนปัสสาวะลงใน microplate หลุมละ 50 ไมโครลิตร
3. เติม Bradford dye reagent หลุมละ 250 ไมโครลิตร
4. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายใน 15 นาที
5. สร้างกราฟมาตรฐานจากความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างตะกอนปัสสาวะ

3.5.3. การแยกโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE

1) การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะสำหรับการแยกโปรตีน

ตัวอย่างปัสสาวะจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เก็บจากอาสาสมัครก่อนได้รับสูตรมะนาวผง หลังได้รับสูตรมะนาวผง ก่อนได้รับ placebo และหลังได้รับ placebo โดยแต่ละกลุ่มจะมีปัสสาวะจำนวน 5 ตัวอย่าง หลังจากตกตะกอนโปรตีนในปัสสาวะแล้ว ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างโปรตีนจากปัสสาวะของผู้เข้าร่วมวิจัยในแต่ละกลุ่มมารวมกัน (pooled samples) โดยให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาณโปรตีน 2 ไมโครกรัม ตัวอย่างที่ถูก pooled แล้วในแต่ละกลุ่มจึงมีปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม เท่าๆ กัน

ผู้วิจัยทำการปรับปริมาตรสารตัวอย่างให้เท่ากัน โดยการนำ pooled samples ทั้ง 4 ตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงระเหยแห้ง จากนั้นเติม 0.5% SDS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนโปรตีนทุกตัวอย่าง

2) การเตรียมเจลและการรันเพื่อแยกโปรตีนในตัวอย่าง

การเตรียม 12% separating gel สำหรับ 7.5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	3.225 ml
40% Acrylamide	2.25 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.875 ml
10% SDS	75 μ l
10% APS	75 μ l
TEMED	3 μ l

การเตรียม 4% stacking gel 3.5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	2.24 ml
40% Acrylamide	466.875 μ l
1.5M Tris-HCl pH 8.8	945 μ l
10% SDS	37.5 μ l
10% APS	37.5 μ l
TEMED	3.75 μ l

รันตัวอย่างโปรตีนในปัสสาวะทั้ง 4 กลุ่ม ควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน (10-250 kDa markers) โดยใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลออกมาย้อมสีด้วย Coomassie blue

3.5.4. การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์

1) การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะได้ตกตะกอนโปรตีนด้วย 75% เอทานอล ตาม 3.5.1. ละลายตะกอนโปรตีนใน SDT lysis buffer (4% SDS, 100 mM DTT, and 100 mM Tris-HCl; pH 7.6) และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford จากนั้นทำการรวมตัวอย่างปัสสาวะ (pool samples) ในแต่ละกลุ่ม โดยให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนเท่ากัน โปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ในแต่ละกลุ่ม กำหนดให้มีปริมาณ 5 ไมโครกรัมเท่ากัน

2) การ Reduction และ Alkylation สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่ถูกรวมปริมาตรแล้วในแต่ละกลุ่ม จะถูก reduced โดยการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายพันธะ disulfide bond ในสายเปปไทด์ จากนั้นจะทำการ alkylate โดยการเติม 50 mM iodoacetamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เพื่อป้องกันไม่ให้นสายเปปไทด์เกิดการสร้าง disulfide bridge อีกครั้ง

3) การย่อยโปรตีน (digestion)

ทำการย่อยโปรตีนในตัวอย่าง โดยเติมทริปซิน (sequencing grade modified trypsin) ปริมาตร 50 เท่าของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 5% formic acid ใน 80% acetonitrile เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ต่อกอนโปรตีนที่ถูกย่อยจะถูกทำให้แห้ง โดยการปั่นเหวี่ยงระเหยแห้งเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงละลายต่อกอนโปรตีนใน 0.1% formic acid โดยปรับให้ความเข้มข้นโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง เป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อเตรียมวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรมิเตอร์

4) การวิเคราะห์โปรตีนด้วย Nano-liquid chromatography mass spectrometer

เปปไทด์จะถูกแยกโดย nanoflow liquid chromatography โดยใช้เครื่อง nano-LC system, Thermo Fisher Scientific ซึ่งเป็นระบบ two-column system ประกอบด้วย pre-column และ analytical column เปปไทด์ที่ผ่านการแยกแล้วจะถูกฉีดเข้าเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ รุ่น LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific เพื่อทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีน โดยแต่ละตัวอย่าง จะถูกฉีดเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อนำ intensity ที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละครั้งมาหาค่าเฉลี่ย

เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์รุ่นดังกล่าว วิเคราะห์ด้วยหลักการ Ion trap – Orbitrap และทำการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกจะบอกขนาดของหรือมวลของสายเปปไทด์ ซึ่งทำให้ทราบข้อมูลเชิงปริมาณของเปปไทด์นั้น จากนั้นเปปไทด์จะเกิดการแตกตัวและเข้าสู่การวิเคราะห์ครั้งที่สอง ซึ่งจะทำให้ทราบลำดับของกรดอะมิโน และสามารถนำไปเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดโปรตีนต่อไป

5) การแปลผลข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย NanoLC-MS

ข้อมูลที่ได้จะนำมาเข้าสู่โปรแกรม MaxQuant software suite (version 1.5.3.30) เพื่อวิเคราะห์ชนิดโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล UniprotKB/Swiss-Prot Homo sapiens (downloaded on March 2016) สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ label-free quantification intensities จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Perseus software version 1.5.3.2

3.5.5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างปัสสาวะ

ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัคร ทั้ง 20 ตัวอย่าง ได้แก่ อัลบูมิน (albumin), ทรานสเฟอร์ริน (transferrin) และ ยูโรโมดูลิน (uromodulin) หรือ โปรตีนแทม ฮอร์สฟอล (Tamm-Horsfall protein)

1) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ

ความเข้มข้นของอัลบูมิน ทำการตรวจวิเคราะห์โดย ฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Architect 4000 8000 16000 analyzer มีหลักการตรวจวิเคราะห์คือ immunoturbidimetric assay

2) การตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนแทม ฮอร์สฟอล ในปัสสาวะ

ความเข้มข้นโปรตีนแทม ฮอร์สฟอล ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Human Tamm Horsfall Protein (THP) ELISA Kit ของบริษัท MyBiosource ชุดตรวจวัดดังกล่าวใช้หลักการ Quantitative Sandwich ELISA ในการวิเคราะห์ มีความไว (sensitivity) 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้) ช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม่นยำ คือ 3.12-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนในการวิเคราะห์

2.1) เตรียมสารมาตรฐาน (standards) ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างปัสสาวะที่ปั่นตกตะกอนแล้ว ในหลุมของชุดตรวจวัด หลุมละ 50 ไมโครลิตร และใช้ sample diluent 50 ไมโครลิตร เป็น blank

2.2) เติม HRP-conjugate reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลท 4 ครั้ง โดยใช้ wash solution (1x) และซับด้วยกระดาษชำระให้แห้ง

2.3) เติม Chromogen Solution 50 ไมโครลิตร และ Chromogen Solution B 50 ไมโครลิตร ในทุกหลุม ปิดด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4) เติม Stop Solution 50 ไมโครลิตร ในทุกหลุม สารละลายในหลุมจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง

2.5) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (O.D.) 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader ภายในเวลา 15 นาที

2.6) สร้างกราฟมาตรฐานจากความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน และใช้คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนแทม ฮอร์สพอล ในตัวอย่างปัสสาวะ

3) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทรานสเฟอร์รินในตัวอย่างปัสสาวะ

ความเข้มข้นโปรตีนทรานสเฟอร์ริน ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Human Transferrin (TRF) ELISA Kit ของบริษัท MyBiosource ชุดตรวจวัดดังกล่าวใช้หลักการ Double Antibody Sandwich Technique โดยในเพลทของชุดตรวจวัด แต่ละหลุมจะ coat ด้วย human TRF monoclonal antibody ช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้แม่นยำ คือ 0.1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนในการวิเคราะห์

3.1) เตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของทรานสเฟอร์ริน 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างปัสสาวะ ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร

(หลุมที่มีความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ standard diluent ปิดเพลทด้วย adhesive tape และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

3.2) ล้างเพลท 2 ครั้ง โดยใช้ washing solution (1x) และซับให้แห้ง

3.3) เติม biotinylated human TRF antibody liquid หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.4) ล้างเพลท 3 ครั้ง โดยใช้ washing solution (1x) และซับให้แห้ง

3.5) เติม enzyme-conjugate liquid หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.6) ล้างเพลท 5 ครั้ง โดยใช้ washing solution (1x) และซับให้แห้ง

3.7) เติม colour reagent liquid หลุมละ 100 ไมโครลิตร รวมทั้งหลุม blank บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีของสารละลายเข้มขึ้นจึงหยุด เวลาในการทำปฏิกิริยาไม่เกิน 30 นาที

3.8) เติม colour reagent C หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (O.D.) 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาที

3.9) สร้างกราฟมาตรฐานจากความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน และใช้คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนทรานสเฟอร์ริน ในตัวอย่างปัสสาวะ

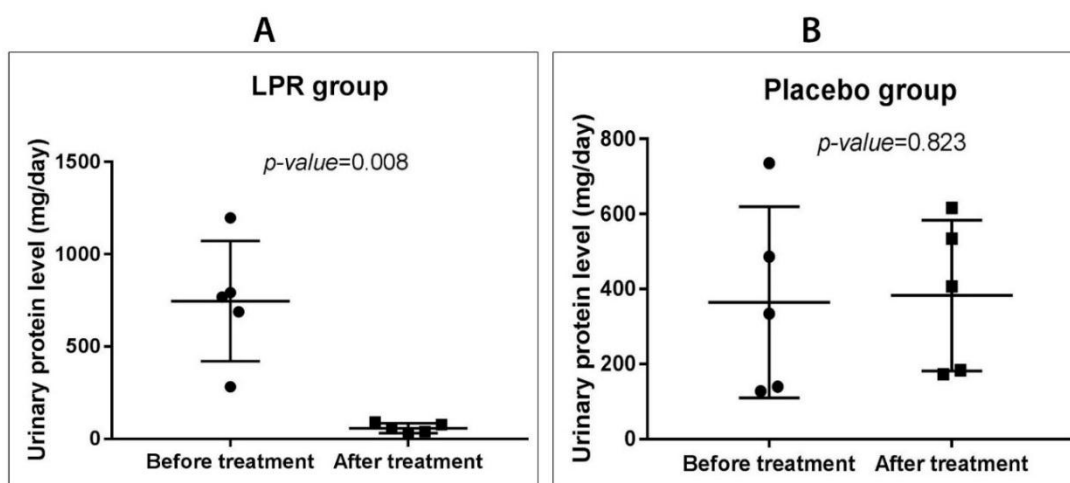
3.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical Analysis)

ใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., IBM, NY, USA) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอาสาสมัครทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่ม LPR ก่อนรับยา, กลุ่ม LPR หลังรับยา, กลุ่ม placebo ก่อนรับยา และกลุ่ม placebo หลังรับยา) โดยการเปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ในกลุ่มที่รับยาชนิดเดียวกัน ระหว่างก่อนและหลังรับยา ใช้สถิติ paired *t*-test ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่รับ LPR และ Placebo ใช้สถิติ non-parametric *t*-test และการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ใช้สถิติ Pearson's correlation โดยกำหนดค่านัยสำคัญอยู่ที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยได้ทำการสุ่มเลือกอาสาสมัครจากโครงการดังกล่าวจำนวน 10 ราย แบ่งเป็นผู้ที่ได้รับ LPR จำนวน 5 ราย และผู้ที่ได้รับ placebo จำนวน 5 ราย ในบรรดาอาสาสมัครที่ได้คัดเลือกในงานวิจัยนี้ กลุ่มที่ได้รับ LPR จำนวน 5 ราย มีระดับโปรตีนในปัสสาวะ ก่อนและหลังรับยา 6 เดือน เท่ากับ 746.67 ± 325.65 มิลลิกรัมต่อวัน และ 57.46 ± 26.31 มิลลิกรัมต่อวัน (p -value = 0.008) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ placebo จำนวน 5 ราย มีระดับโปรตีนในปัสสาวะ ก่อนและหลังรับยา 6 เดือน เท่ากับ 364.63 ± 254.97 มิลลิกรัมต่อวัน และ 382.89 ± 200.95 มิลลิกรัมต่อวัน (p -value = 0.823) ดังแสดงในภาพที่ 5



รูป 6 แสดงระดับโปรตีนในปัสสาวะที่เปลี่ยนแปลง ในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ LPR (ชาย) และได้รับ placebo (ขวา) หลังรับยาเป็นเวลา 6 เดือน

4.1. ข้อมูลพื้นฐาน และองค์ประกอบในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ได้ทำการคัดเลือกมา ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo มีเพศและอายุไม่แตกต่างกัน โดยสัดส่วนเพศ ชาย:หญิง ในกลุ่ม LPR และ placebo เท่ากับ 2:3 และ 3:2 ตามลำดับ อายุเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ LPR และ placebo เท่ากับ 46.2 ± 10.6 ปี และ 43.2 ± 6.7 ปี ตามลำดับ (p -value = 0.607) ค่าดัชนีมวลกาย (Body Mass Index, BMI) เฉลี่ยใน

กลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo ไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 22.23 ± 3.45 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และ 24.36 ± 2.69 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (p -value = 0.308) ดังแสดงใน **ตารางที่ 5**

นอกจากนี้ ชนิดนิ้วในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ LPR ทั้ง 5 ราย เป็นนิ้วแคลเซียมออกซาลาเลต บริสุทธิ์ จำนวน 3 ราย นิ้วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมทริปเปิลฟอสเฟต 1 ราย และนิ้วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมสตรูโวไรท์ 1 ราย ส่วนในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ placebo เป็นนิ้วแคลเซียมออกซาลาเลตบริสุทธิ์ จำนวน 4 ราย และนิ้วแคลเซียมออกซาลาเลตผสมกรดยูริก 1 ราย

ตาราง 5 แสดงข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ เพศ อายุ และดัชนีมวลกาย ในกลุ่มตัวอย่าง

รายละเอียด	กลุ่มที่ได้รับ LPR (N=5)	กลุ่มที่ได้รับ placebo (N=5)	p -value
เพศ (ชาย:หญิง)	2:3	3:2	
อายุ (ปี)	46.2 ± 10.6	43.2 ± 6.7	0.6073
ดัชนีมวลกาย (กก./ตร.ม.)	22.23 ± 3.45	24.36 ± 2.69	0.3082

ปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ที่เก็บในเวลาก่อนเริ่มรับยาในตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 1.66 ± 0.51 ลิตร และ 2.06 ± 1.13 ลิตร ตามลำดับ (p -value = 0.488) ค่า pH ในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับ LPR สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ placebo เล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ คือเท่ากับ 7.11 ± 1.25 และ 6.35 ± 0.40 ตามลำดับ (p -value = 0.232)

ระดับของสารประกอบในปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของตัวอย่างในกลุ่ม LPR และกลุ่ม placebo ที่ทำการวิเคราะห์ก่อนเริ่มรับยา พบว่า ระดับแคลเซียม ออกซาลาเลต ฟอสเฟต และกรดยูริก ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการเกิดนิ่วในปัสสาวะของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ระดับโซเดียมในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับ LPR สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ placebo อย่างมีนัยสำคัญ คือเท่ากับ 127.51 ± 54.28 mEq/day และ 63.74 ± 27.15 mEq/day ตามลำดับ (p -value = 0.047) ส่วนระดับซีเทรต และแมกนีเซียม ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะ รวมถึงระดับครีเอตินินในปัสสาวะของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ดังแสดงใน **ตารางที่ 6**

ตาราง 6 แสดงปริมาณ ค่า pH และองค์ประกอบในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ของกลุ่มตัวอย่าง ก่อนเริ่มรับยา

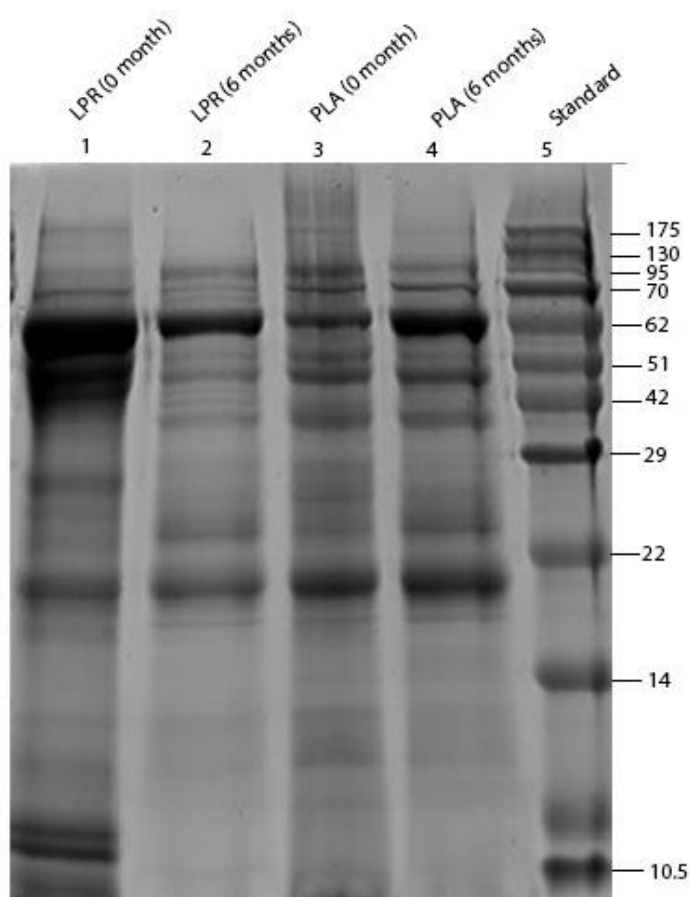
รายละเอียด	กลุ่มที่ได้รับ LPR (N=5)	กลุ่มที่ได้รับ placebo (N=5)	p-value
Urine volume (L)	1.66 ± 0.51	2.06 ± 1.13	0.4877
Urine pH	7.11 ± 1.25	6.35 ± 0.40	0.2319
Urine calcium (mg/day)	26.15 ± 7.62	100.47 ± 97.18	0.1266
Urine oxalate (mg/day)	32.48 ± 16.32	44.37 ± 27.89	0.4341
Urine sodium (mEq/day)	127.51 ± 54.28	63.74 ± 27.15	0.0467*
Urine phosphate (mg/day)	553.26 ± 308.47	326.83 ± 136.80	0.1719
Urine uric acid (mg/day)	651.44 ± 443.09	485.70 ± 146.73	0.4500
Urine citrate (mg/day)	160.53 ± 158.69	103.93 ± 76.48	0.4928
Urine magnesium (mg/day)	44.96 ± 31.98	33.59 ± 12.62	0.4810
Urine creatinine (g/day)	1.88 ± 1.15	0.96 ± 0.44	0.1322

4.2. ผลการแยกโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE

ผู้วิจัยได้ทำการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE ในปัสสาวะของผู้ที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo ดังนั้น การแยกโปรตีนจะทำการเปรียบเทียบกันในตัวอย่งปัสสาวะ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มก่อนได้รับ LPR, กลุ่มหลังได้รับ LPR 6 เดือน, กลุ่มก่อนได้รับ placebo และ กลุ่มหลังได้รับ placebo 6 เดือน โดยแต่ละกลุ่มจะมีตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 5 ตัวอย่างเท่ากัน ตัวอย่างที่นำมาแยกโปรตีนในแต่ละกลุ่ม คือปริมาณรวมของปัสสาวะทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยกำหนดให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนเท่าๆ กัน จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย เอทานอล 75% ละลาย

ตะกอนโปรตีนด้วย 0.5% SDS และปรับปริมาตรและความเข้มข้นของทุกตัวอย่างให้เท่ากัน ก่อนทำการแยกโปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ 1D-SDS-PAGE และย้อมสีเจลด้วย Coomassie blue

พบการกระจายตัวของโปรตีนในแต่ละกลุ่มดัง **ภาพที่ 6**



รูป 7 แสดงผลการแยกโปรตีนใน 12% SDS-PAGE ในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 4 กลุ่ม Lane 1 คือ กลุ่มก่อนได้รับ LPR Lane 2 คือ กลุ่มหลังได้รับ LPR 6 เดือน Lane 3 คือ กลุ่มก่อนได้รับ placebo Lane 4 คือ กลุ่มหลังได้รับ placebo 6 เดือน และ Lane 5 คือ prestained protein markers

4.3. ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Nano-liquid chromatography mass spectrometry

โปรตีนในปัสสาวะแต่ละตัวอย่างที่ถูกตกตะกอนแล้ว จะถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่ม เช่นเดียวกับในขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะมีปริมาณโปรตีนเท่ากัน คือ 5 ไมโครกรัม จากนั้นจะผ่านกระบวนการ In solution digestion เพื่อย่อยโปรตีน และวิเคราะห์ด้วย

เครื่อง Nano-LC MS หลังจากนั้นจะทำการเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนที่พบมีปริมาณเปลี่ยนแปลงระหว่างก่อนและหลังการรับยา ในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และ placebo

ผลการวิเคราะห์พบว่า มีโปรตีนจำนวน 37 ชนิด ที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มอาสาสมัครหลังได้รับ LPR และโปรตีน 44 ชนิด เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับ placebo เมื่อพิจารณาโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงแล้วพบว่า มีโปรตีนจำนวน 17 ชนิด ที่ลดลงในอาสาสมัครทั้งที่รับ LPR และ placebo และมีโปรตีนจำนวน 3 ชนิด ที่เพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้นในทั้ง 2 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8



ตาราง 7 แสดงโปรตีนในปัสสาวะ 17 ชนิด ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo

ลำดับ	ชื่อโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล(kDa)	%Sequence cov. ^a		% Decrease ^b	
			LPR	Placebo	LPR	Placebo
1	Serum albumin	69.37	66.70	57.60	87.50	30.91
2	Ig gamma-3 chain C region	41.29	39.50	32.40	84.70	77.53
3	Ig gamma-4 chain C region	35.94	29.10	29.10	100	100
4	Haptoglobin	45.21	28.10	32.50	100	91.15
5	Fibrinogen alpha chain	69.76	20.70	12.50	100	100
6	Ig mu chain C region	49.31	19.90	15.70	100	100
7	Fibrinogen gamma chain	49.50	19.20	26.50	100	100
8	Complement C3	187.15	17.60	13.60	100	100
9	Alpha-1-antitrypsin	46.74	17.20	30.10	100	100
10	Fibrinogen beta chain	55.93	16.30	15.30	100	100
11	Lactotransferrin	78.18	15.40	27.60	100	100
12	Alpha-2-macroglobulin	163.29	11.40	5.90	100	100
13	Beta-2-glycoprotein 1	38.30	10.40	11.30	100	100
14	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23.51	9.00	12.90	100	100
15	Complement C4-B	192.75	7.60	5.30	100	67.43
16	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	93.85	6.70	5.00	100	100
17	Ceruloplasmin	122.20	5.60	4.80	100	100

a; %Sequence coverage, (number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) x 100%

b; %Decrease was calculated from means of abundance level at before and after 6-month of treatment

100% decrease; The protein was absent after treatment.

ตาราง 8 แสดงโปรตีนในปัสสาวะ 3 ชนิด ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และกลุ่มที่ได้รับ placebo

ลำดับ	ชื่อโปรตีน	น้ำหนัก โมเลกุล(kDa)	%Sequence cov. ^a		% Increase ^b	
			LPR	Placebo	LPR	Placebo
1	Protein AMBP	39.00	44.30	44.30	248.17	81.95
2	Apolipoprotein D	21.28	31.20	37.00	29.84	27.34
3	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34.26	13.10	27.90	117.16	164.86

a; %Sequence coverage, (number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) x 100%

b; %Increase was calculated from means of abundance level at before and after 6-month of treatment

ในโปรตีนทั้ง 17 ชนิด ที่พบปริมาณลดลงในทั้ง 2 กลุ่ม ส่วนมากเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการซ่อมแซมบาดแผล ซึ่งได้แก่ fibrinogen alpha/beta/gamma chains, apolipoprotein H, alpha-2-macroglobulin, alpha-1-antitrypsin, complement C3, albumin และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ได้แก่ complement C3/C4-B, Ig gamma chains, alpha-1-antitrypsin, haptoglobin, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, fibrinogen alpha/beta/gamma chains, lactotransferrin ในบรรดาโปรตีนที่ลดลงดังกล่าว พบว่าโปรตีน albumin, Ig gamma chain, haptoglobin และ complement C4-B มีการลดลงในปัสสาวะอาสาสมัครกลุ่มที่รับ LPR มากกว่ากลุ่มที่รับ placebo เมื่อเทียบเป็นร้อยละของปริมาณโปรตีนตั้งต้น

ในโปรตีนทั้ง 3 ชนิดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าโปรตีน 2 ชนิดเกี่ยวข้องกับ lipid metabolism ได้แก่ apolipoprotein D และ zinc-alpha-2-glycoprotein ส่วน protein AMBP นั้นเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ และยับยั้งการตกผลึกของแคลเซียมออกซาเลต

มีโปรตีนจำนวน 17 ชนิดที่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR เท่านั้น โดยโปรตีน 16 ชนิด มีปริมาณลดลง และอีก 1 ชนิด มีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 9

ตาราง 9 แสดงโปรตีน 17 ชนิด ที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับ LPR

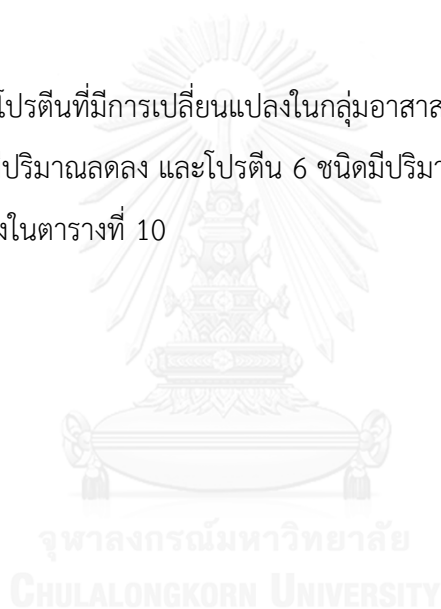
ลำดับ	ชื่อโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	Abundance level ($\times 10^7$ arbitrary unit)		การเปลี่ยนแปลง	p-value
			Before treatment	After treatment		
1	Hemoglobin subunit beta	16.00	12.042 \pm 1.620	0.000 \pm 0.000	ลด	0.005
2	Serotransferrin	77.06	5.171 \pm 0.984	0.483 \pm 0.076	ลด	0.014
3	Ig gamma-1 chain C region	36.11	1.053 \pm 0.157	0.000 \pm 0.000	ลด	0.011
4	Apolipoprotein A-I	30.78	0.461 \pm 0.035	0.000 \pm 0.000	ลด	0.002
5	Ig kappa chain V-I region	11.79	0.212 \pm 0.026	0.000 \pm 0.000	ลด	0.006
6	Ig heavy chain V-III region	11.61	0.091 \pm 0.047	0.000 \pm 0.000	ลด	0.004
7	Peroxiredoxin-2	21.89	0.162 \pm 0.030	0.000 \pm 0.000	ลด	0.018
8	Hemoglobin subunit alpha	15.26	7.934 \pm 1.478	0.000 \pm 0.000	ลด	0.022
9	Ig gamma-2 chain C region	35.90	6.009 \pm 0.988	0.317 \pm 0.317	ลด	0.019
10	Vitamin D-binding protein	52.96	0.432 \pm 0.075	0.000 \pm 0.000	ลด	0.022
11	Alpha-1-antichymotrypsin	47.65	0.221 \pm 0.055	0.000 \pm 0.000	ลด	0.049
12	Apolipoprotein A-II	11.18	0.049 \pm 0.030	0.000 \pm 0.000	ลด	0.048
13	Hemopexin	51.68	0.262 \pm 0.064	0.000 \pm 0.000	ลด	0.034
14	Complement factor H	139.09	0.070 \pm 0.029	0.000 \pm 0.000	ลด	0.029
15	Fibronectin	221.29	0.063 \pm 0.013	0.000 \pm 0.000	ลด	0.006
16	Apolipoprotein B-100	515.60	0.055 \pm 0.011	0.000 \pm 0.000	ลด	0.030
17	Uromodulin	67.42	0.488 \pm 0.171	1.822 \pm 0.010	เพิ่ม	0.006

ในโปรตีน 16 ชนิดที่ลดลงเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ LPR พบว่าโปรตีนส่วนมากเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การอักเสบและภาวะเครียด ได้แก่ Ig gamma/kappa chains,

complement factor H, peroxiredoxin และเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการซ่อมแซมบาดแผล ได้แก่ fibronectin, transferrin, hemoglobin subunits, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B-100 นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นโปรตีนขนส่ง (transport protein) ในเลือด ได้แก่ transferrin, hemoglobin subunits, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B-100, hemopexin และมีโปรตีน 3 ชนิด ที่มีบทบาทในการควบคุม lipoprotein ในพลาสมา ได้แก่ apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II, apolipoprotein B-100

ส่วนโปรตีนเพียง 1 ชนิดที่ลดลงเฉพาะในกลุ่มที่รับ LPR คือ uromodulin (Tamm-Horsfall protein) ซึ่งมีบทบาทในการควบคุม permeability ที่ ascending limb of Henle's loop ของท่อไต

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับ placebo จำนวน 24 ชนิด ซึ่งโปรตีน 18 ชนิดมีปริมาณลดลง และโปรตีน 6 ชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้น เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ placebo เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 10



ตาราง 10 แสดงโปรตีน 23 ชนิด ที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับ placebo

ลำดับ	ชื่อโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	Abundance level ($\times 10^7$ arbitrary unit)		การเปลี่ยนแปลง	p-value
			Before treatment	After treatment		
1	Ig lambda-7 chain C region	11.30	0.0724 \pm 0.0025	0.0000 \pm 0.0000	ลด	<0.0001
2	Protein S100-A8	10.83	0.8642 \pm 0.1202	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0020
3	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14.70	0.2157 \pm 0.0444	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0083
4	Trefoil factor 2	14.28	0.0999 \pm 0.0053	0.0000 \pm 0.0000	ลด	<0.0001
5	CD59 glycoprotein	14.18	2.2121 \pm 0.5213	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0132
6	WAP four-disulfide core domain protein	12.99	0.3120 \pm 0.0283	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0004
7	Kininogen-1	43.82	1.8206 \pm 0.4381	0.1158 \pm 0.0382	ลด	0.0179
8	Ig alpha-1 chain C region	37.65	2.1307 \pm 0.0465	0.7599 \pm 0.0448	ลด	<0.0001
9	Histone H4	11.37	0.0467 \pm 0.0057	0.0000 \pm 0.0000	ลด	<0.0001
10	Neutrophil defensin 3	10.25	1.4288 \pm 0.4985	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0456
11	Insulin-like growth factor-binding protein 7	28.86	0.0522 \pm 0.0032	0.0000 \pm 0.0000	ลด	<0.0001
12	Actin	41.79	0.4012 \pm 0.0348	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0003
13	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38.18	0.3022 \pm 0.0574	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0062
14	Lithostathine-1-alpha	18.73	0.3450 \pm 0.0278	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0002
15	Osteopontin	33.84	0.0555 \pm 0.0014	0.0000 \pm 0.0000	ลด	<0.0001
16	Cystatin-C	15.80	0.0302 \pm 0.0028	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0004
17	Prothrombin	70.04	0.9641 \pm 0.0455	0.2453 \pm 0.0046	ลด	<0.0001
18	Alpha-enolase	36.93	0.1115 \pm 0.0246	0.0000 \pm 0.0000	ลด	0.0105
19	Ig kappa chain C region	11.61	8.0758 \pm 1.1188	13.1653 \pm 1.1802	เพิ่ม	0.0352
20	Ig lambda-2 chain C region	11.29	9.3523 \pm 0.3290	35.1530 \pm 1.9749	เพิ่ม	0.0002
21	Serotransferrin	77.06	2.9912 \pm 0.3119	6.6892 \pm 0.4350	เพิ่ม	0.0023
22	Ribonuclease pancreatic	17.64	0.4729 \pm 0.0939	1.1405 \pm 0.0972	เพิ่ม	0.0078
23	Ig gamma-2 chain C region	35.90	0.0000 \pm 0.0000	3.3655 \pm 0.1957	เพิ่ม	<0.0001
24	Prostaglandin-H2 D-isomerase	21.03	2.7132 \pm 0.5157	9.0536 \pm 0.9194	เพิ่ม	0.0038

โปรตีนที่ลดลงเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ placebo ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ได้แก่ Ig lambda chain, cystatin C, CD59 glycoprotein, neutrophil defensin, protein S100-A8 และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการซ่อมแซมบาดแผล ได้แก่ kininogen, prothrombin, WAP four-disulfide core domain protein, protein S100-A8, actin, osteopontin, trefoil factor 2 และยังพบโปรตีนบางชนิดซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ได้แก่ ubiquitin-60S ribosomal protein, WAP four-disulfide core domain protein, histone H4, insulin-like growth factor-binding protein 7, alpha-enolase

โปรตีนที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ placebo ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Ig kappa/lambda-2/gamma-2 chains และยังพบโปรตีน Transferrin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ขนส่งเหล็กในพลาสมาเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มผู้ได้รับ LPR มีปริมาณโปรตีน transferrin ลดลง

เมื่อพิจารณาโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงเฉพาะในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR พบว่าโปรตีนที่ลดลงมีทั้งหมด 33 ชนิด เมื่อจำแนกตามบทบาทของโปรตีนที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ได้ พบว่ามีโปรตีน 12 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการซ่อมแซมบาดแผล โปรตีน 16 ชนิด เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบ และโปรตีน 3 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการ lipid metabolism (ตารางที่ 11) โปรตีนที่เพิ่มขึ้นทั้งหมดในกลุ่มที่รับ LPR มีจำนวน 4 ชนิด พบว่าโปรตีน 2 ชนิด เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดนิ่ว โดยเป็นตัวยับยั้งการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลต และโปรตีน 2 ชนิด เกี่ยวข้องกับการ lipid metabolism (ตารางที่ 12)

ตาราง 11 แสดงชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ LPR

Wound healing and blood coagulation		จำนวน 12 ชนิด
Fibrinogen alpha/beta/gamma chains ^(a)	Apolipoprotein A-I	
Fibronectin	Beta-2-glycoprotein 1	
Alpha-2-macroglobulin	Hemoglobin subunits	
Alpha-1-antitrypsin	Complement C3	
Albumin	Transferrin	
Immunity and inflammatory responses		จำนวน 16 ชนิด
Ig alpha/gamma/kappa/lambda/mu chains ^(b)	Inter-alpha-trypsin inhibitor	
Complement C3/C4-B/factor H ^(c)	heavy	
Haptoglobin	Fibronectin	
Alpha-1-antitrypsin	Lactotransferrin	
	Alpha-1-acid glycoprotein	
Lipid metabolism		จำนวน 3 ชนิด
Apolipoprotein A-I/A-II/B-100 ^(d)		
<p>(a) Fibrinogen; แยกตาม subunit ที่ต่างกันเป็น 3 ชนิด</p> <p>(b) Immunoglobulin; แยกตาม chain ที่ต่างกันเป็น 7 ชนิด</p> <p>(c) Complement; แยกตาม subunit ที่ต่างกันเป็น 3 ชนิด</p> <p>(d) Apolipoprotein; แยกตาม subunit ที่ต่างกันเป็น 3 ชนิด</p>		

ตาราง 12 แสดงชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับ LPR

Stone formation		จำนวน 2 ชนิด
Protein AMBP		
Uromodulin		
Lipid metabolism		จำนวน 2 ชนิด
Apolipoprotein D		
Zinc-alpha-2-glycoprotein		

เมื่อพิจารณาโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงเฉพาะในอาสาสมัครที่ได้รับ placebo พบว่าโปรตีนที่ลดลงทั้งหมด 35 ชนิด เมื่อจำแนกตามบทบาทของโปรตีนที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคหัวใจ พบว่ามีโปรตีน 16 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการซ่อมแซมบาดแผล และโปรตีน 16 ชนิด เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบ (ตารางที่ 13) โปรตีนที่เพิ่มขึ้นทั้งหมดในกลุ่มที่รับ LPR มีจำนวน 9 ชนิด พบว่าโปรตีน 1 ชนิด เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดหัวใจ โดยเป็นตัวยับยั้งการเกิดหัวใจแคลเซียมออกซาเลต โปรตีน 3 ชนิด เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และโปรตีน 2 ชนิด เกี่ยวข้องกับ lipid metabolism (ตารางที่ 14)

ตาราง 13 แสดงชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ placebo

Wound healing and blood coagulation		จำนวน 16 ชนิด
Fibrinogen alpha/beta/gamma chains ^(a)	Kininogen-1	
Prothrombin	Apolipoprotein H	
Alpha-2-macroglobulin	Complement C4-B	
Albumin	Trefoil factor 2	
Protein S100-A8	Actin	
Osteopontin	Alpha-1-antitrypsin	
Cystatin C	CD59 glycoprotein	
Immunity and inflammatory responses		จำนวน 16 ชนิด
Ig alpha/gamma/lambda/mu chains ^(b)	Inter-alpha-trypsin inhibitor	
Complement C3/C4-B ^(c)	heavy chain	
Haptoglobin	Prothrombin	
Alpha-1-antitrypsin	Protein S100-A8	
Neutrophil defensin	Alpha-1-acid glycoprotein	
CD59 glycoprotein	Lactotransferrin	

(a) Fibrinogen; แยกตาม subunit ที่ต่างกันเป็น 3 ชนิด

(b) Immunoglobulin; แยกตาม chain ที่ต่างกันเป็น 5 ชนิด

(c) Complement; แยกตาม subunit ที่ต่างกันเป็น 2 ชนิด

ตาราง 14 แสดงชนิดและบทบาทของโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับ Placebo

Stone formation	จำนวน 1 ชนิด
Protein AMBP	
Wound healing and blood coagulation	จำนวน 3 ชนิด
Ig kappa/lambda-2/gamma-2 ^(a)	
Lipid metabolism	จำนวน 2 ชนิด
Apolipoprotein D	
Zinc-alpha-2-glycoprotein	

(a) Immunoglobulin; แยกตาม chain ที่ต่างกันเป็น 5 ชนิด

เมื่อพิจารณาโปรตีนในปัสสาวะที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงจากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมทรี ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีโปรตีนจำนวน 9 ชนิด ที่มีการศึกษาพบว่ามึบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดนิ่ว (stone formation) คือเป็นตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิดนิ่วได้ และมีโปรตีนจำนวน 8 ชนิด ที่มีรายงานการศึกษาว่าปริมาณโปรตีนในปัสสาวะสามารถบ่งชี้ความผิดปกติของไตได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนดังกล่าวในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และ placebo แสดงในตารางที่ 15 และ 16

ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดนิ่ว ในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo

ลำดับ	ชนิดโปรตีน	บทบาทในการเกิดนิ่ว	การเปลี่ยนแปลง (% Changed)	
			LPR group	Placebo group
1	Uromodulin	- Inhibit crystal aggregation - Promote crystal nucleation in high osmolality urine	Increased (272.95%)	NF*
2	Protein AMBP	- Inhibit CaOx stone formation	Increased (248.17%)	Increased (81.95%)
3	Albumin	- Promote crystal nucleation	Decreased (87.50%)	Decreased (30.91%)
4	Prothrombin	- Inhibit CaOx crystal growth and aggregation	NF	Decreased (74.56%)
5	Trefoil factor 2	- Inhibit CaOx crystal growth and aggregation	NF	Decreased (100%)
6	Protein S100-A8	- Inhibit CaOx crystal growth and aggregation	NF	Decreased (100%)
7	Osteopontin	- Inhibit CaOx crystal nucleation, growth and aggregation - Promote crystal adhesion	NF	Decreased (100%)
8	Lithostathine-1	- Inhibit CaOx crystal growth	NF	Decreased (100%)
9	Inter-alpha-trypsin inhibitor	- Inhibit CaOx stone formation	Decreased (100%)	Decreased (100%)

* NF: Not found; ตรวจไม่พบในตัวอย่างปัสสาวะ จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมทรี หรือไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่บ่งชี้ความผิดปกติของไต ในอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo

ลำดับ	ชนิดโปรตีน	ข้อบ่งชี้ความผิดปกติของไต	การเปลี่ยนแปลง (% Changed)	
			LPR group	Placebo group
1	Albumin	- Glomerular and tubular dysfunction - Progression of CKD and ESRD - High risk diabetic nephropathy (DN)	Decreased (87.50%)	Decreased (30.91%)
2	Transferrin	- High risk of DN - Associated with microalbuminuria	Decreased (90.66%)	Increased (123.63%)
3	Cystatin C	- Acute kidney injury - Renal tubular dysfunction	NF*	Decreased (100%)
4	Insulin-like growth factor-binding protein 7	- Acute kidney injury	NF	Decreased (100%)
5	Osteopontin	- Early diagnosis of AKI	NF	Decreased (100%)
6	Ig gamma-4	- Associated with microalbuminuria	Decreased (100%)	Decreased (100%)
7	Ceruloplasmin	- High risk of DN	Decreased (100%)	Decreased (100%)
8	Fibronectin	- Renal fibrosis marker	Decreased (100%)	NF

* NF: Not found; ตรวจไม่พบในตัวอย่างปัสสาวะ จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี หรือไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

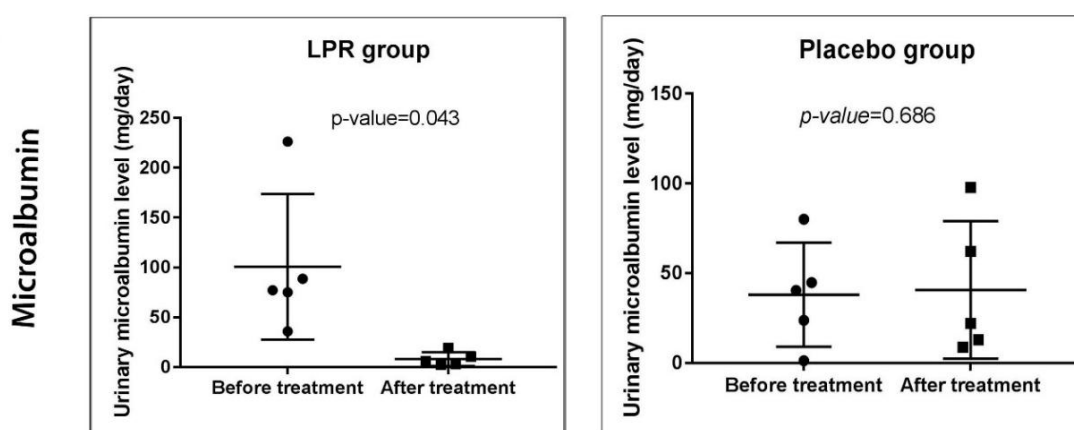
4.4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างปัสสาวะ

จากผลวิเคราะห์โปรตีนด้วยแมสสเปกโตรเมทรี ผู้วิจัยได้เลือกชนิดโปรตีนที่สนใจเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 20 ตัวอย่าง โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณในตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม และเป็นโปรตีนที่มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วหรือบ่งชี้ความผิดปกติของไต โปรตีนที่เลือกมาทำการวิเคราะห์ปริมาณ ได้แก่ ไมโครอัลบูมิน (microalbumin), ทรานสเฟอริน (transferrin, TF) และแทมฮอร์สฟอลโปรตีน (uromodulin or Tamm-Horsfall protein, THP)

ผลการวิเคราะห์ไมโครอัลบูมิน

ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) คือภาวะที่มีการขับโปรตีนอัลบูมินทางปัสสาวะ 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งบ่งชี้ถึงความผิดปกติของไต เช่น โรคไตเรื้อรัง หรือโรคไตจากเบาหวาน

ผลวิเคราะห์ในปัสสาวะของอาสาสมัครกลุ่มที่รับมะนาวผง พบว่ามีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 100.63 ± 82.92 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 8.22 ± 6.94 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งปริมาณหลังรับมะนาวผงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า $p\text{-value} = 0.043^*$ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในอาสาสมัครที่รับ placebo มีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 38.05 ± 29.04 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 40.73 ± 38.30 มิลลิกรัมต่อวัน ค่า $p\text{-value} = 0.686$ ดังแสดงในภาพที่ 7

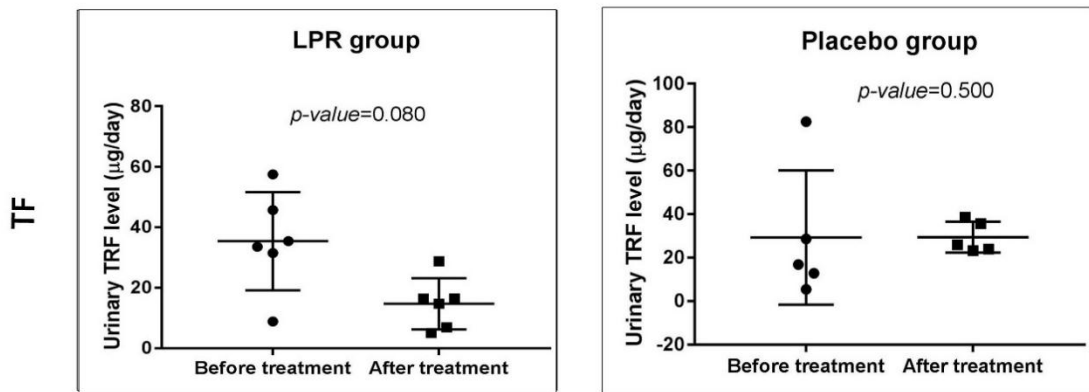


รูป 8 ปริมาณอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo

ผลการวิเคราะห์โปรตีน Transferrin

โปรตีน transferrin เป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ความผิดปกติของโกลเมอรูลัส และยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ microalbuminuria ในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานอีกด้วย

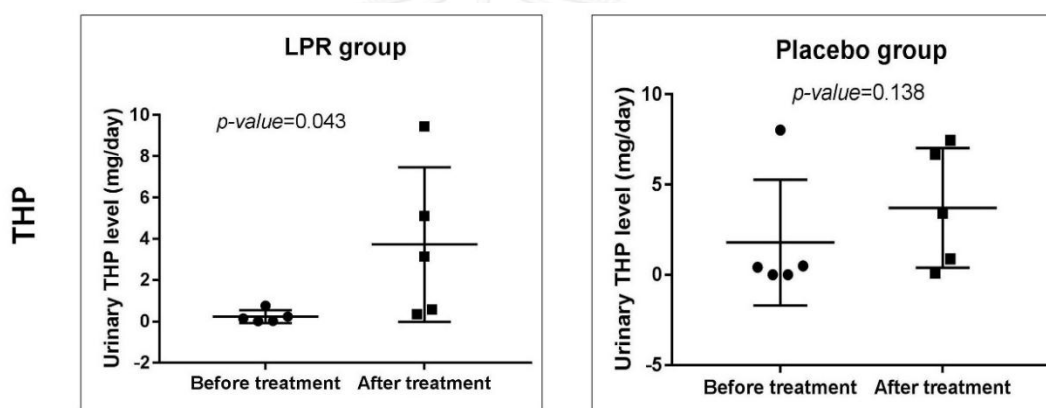
ผลวิเคราะห์ในปัสสาวะของอาสาสมัครกลุ่มที่รับมะนาวผง พบว่ามีปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 35.42 ± 18.14 ไมโครกรัมต่อวัน และหลังรับยา 14.72 ± 9.48 ไมโครกรัมต่อวัน ค่า p -value = 0.080 ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในอาสาสมัครที่รับ placebo มีปริมาณ transferrin ในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 29.26 ± 30.93 ไมโครกรัมต่อวัน และหลังรับยา 29.47 ± 7.11 ไมโครกรัมต่อวัน ค่า p -value = 0.500 ดังแสดงในภาพที่ 8



รูป 9 ปริมาณโปรตีน transferrin ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo

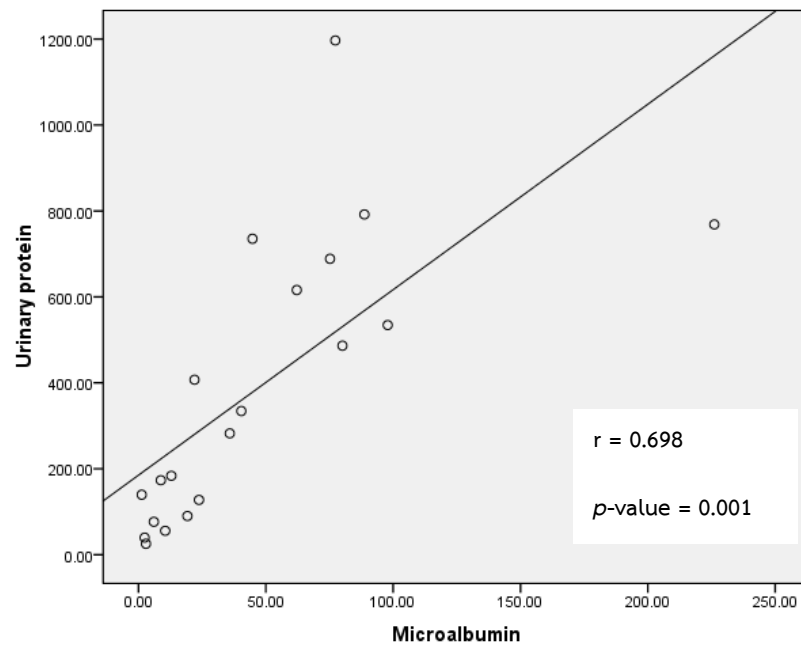
ผลการวิเคราะห์โปรตีน Uromodulin หรือ Tamm-Horsfal protein (THP)

THP เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในกระบวนการเกิดนิ่ว โดยอาจทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะปกติ หรืออาจเป็นตัวกระตุ้นการเกิดนิ่วในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสารก่อนิ่วสูง ผลวิเคราะห์ในปัสสาวะของอาสาสมัครกลุ่มที่รับมะนาวผง พบว่ามีปริมาณ Tamm-Horsfall protein ในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 0.237 ± 0.311 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 3.721 ± 3.747 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งปริมาณหลังรับมะนาวผงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า $p\text{-value} = 0.043^*$ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในอาสาสมัครที่รับ placebo มีปริมาณ Tamm-Horsfall protein ในปัสสาวะเฉลี่ย ก่อนเริ่มรับยา 1.787 ± 3.487 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 3.702 ± 3.314 มิลลิกรัมต่อวัน ค่า $p\text{-value} = 0.138$ ดังแสดงในภาพที่ 9

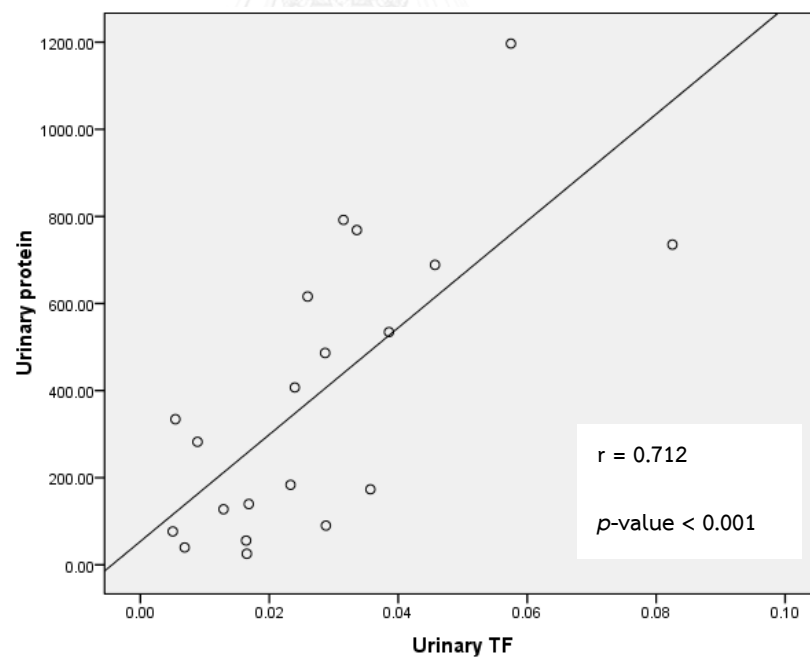


รูป 10 ปริมาณโปรตีน THP ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo

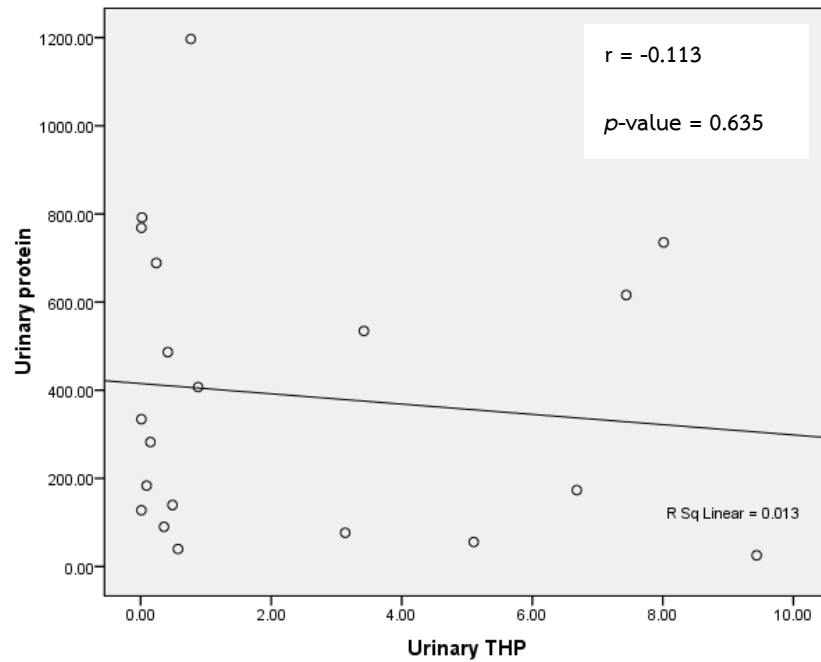
เมื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะกับปริมาณโปรตีนที่สนใจ ในตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บทั้งก่อนและหลังการรับมะนาวผงและ placebo พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณ albumin และโปรตีน transferrin ในปัสสาวะ โดยปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะกับปริมาณ albumin มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.698 และ $p\text{-value} = 0.001$ (ภาพที่ 10) ส่วนปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะกับปริมาณโปรตีน transferrin มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.712 และ $p\text{-value} < 0.001$ (ภาพที่ 11) ในขณะที่ปริมาณ Tamm-Horsfall protein ไม่พบความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ ($r = -0.113$, $p\text{-value} = 0.635$) (ภาพที่ 12)



รูป 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณ albumin ในปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง

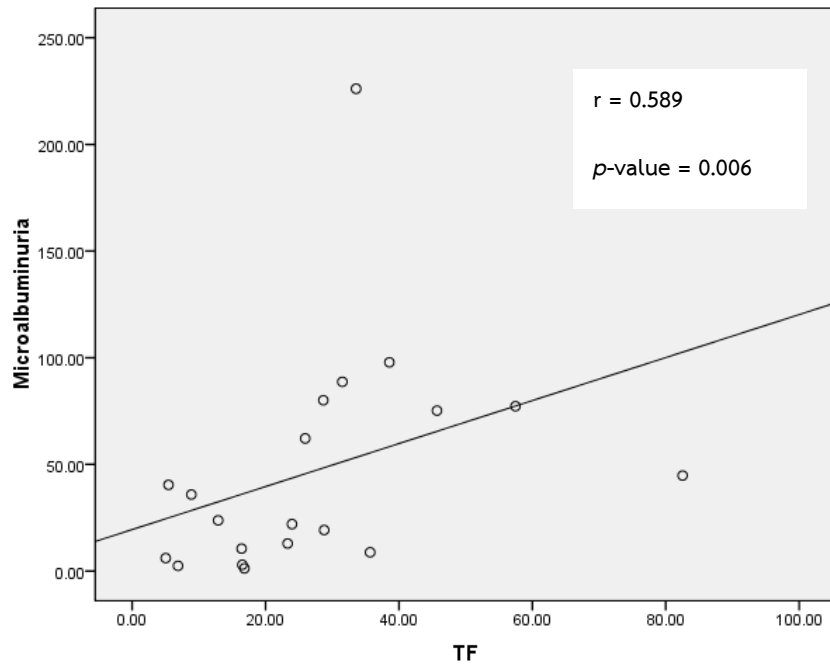


รูป 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง

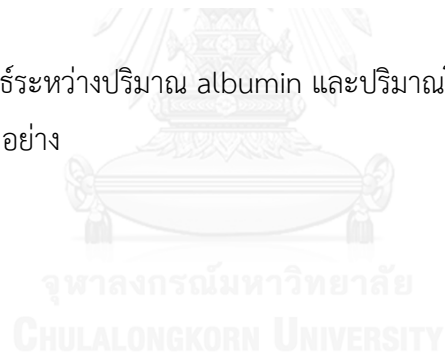


รูป 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และปริมาณ Tamm-Horsfall protein ในปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง

นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณ albumin และปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก โดยมีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.589 และ $p\text{-value} = 0.006$ (ภาพที่ 13) โดยทั้ง albumin และ transferrin ในปัสสาวะ สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของโกลเมอรูลัสได้ (glomerular marker)



รูป 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ albumin และปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทางคลินิกของสูตรมะนาวผงในผู้ป่วยโรคไตที่ผ่านมา พบว่าสูตรมะนาวผง หรือ LPR ซึ่งมีซิเทรตและโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณซิเทรต ซึ่งเป็นสารยับยั้งนิ้วในปัสสาวะ และยังทำให้โปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตลดลงได้ มีหลายการศึกษาที่พบว่า ผู้ป่วยโรคไตที่มีการขับออกของโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าคนปกติ (9, 20) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวส่วนมากเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การรักษาบาดแผล และกระบวนการทางภูมิคุ้มกัน (17, 20, 41, 46) การที่โปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไตมีปริมาณลดลง จึงอาจบ่งชี้ถึงการอักเสบที่ลดลง และการทำงานของไตที่ดีขึ้น งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรก ที่เน้นศึกษาผลของสูตรมะนาวผงต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปัสสาวะ โดยใช้วิธีทางโปรตีโอมิกส์ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีน

กลุ่มประชากรในการศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับมะนาวผง จำนวน 5 ราย และได้รับยาหลอก หรือ placebo จำนวน 5 ราย ทั้งสองกลุ่มมีเพศ อายุ และดัชนีมวลกายไม่แตกต่างกัน กลุ่มประชากรทั้ง 10 ราย มีนิ้วชนิดแคลเซียม โดยในกลุ่มที่รับ LPR มีนิ้วแคลเซียมฟอสเฟตบริสุทธิ์ 3 ราย นิ้วแคลเซียมออกซาเลตผสมทริปเปิลฟอสเฟต 1 ราย และนิ้วแคลเซียมออกซาเลตผสมสตรูโวท์ 1 ราย ส่วนกลุ่มที่รับ placebo มีนิ้วแคลเซียมออกซาเลตบริสุทธิ์ 4 ราย และนิ้วแคลเซียมออกซาเลตผสมกรดยูริก 1 ราย กลุ่มตัวอย่างทุกคนได้รับการสลายนิ้วจนไม่พบนิ้วเหลือก่อนการรับยาเป็นเวลา 1 เดือน การวิเคราะห์ค่าเริ่มต้นในปัสสาวะ ได้แก่ ปริมาตรปัสสาวะ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก ซิเทรต แมกนีเซียม และครีเอตินินในปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของประชากรทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน มีเพียงปริมาณโซเดียมที่ต่างกัน โดยกลุ่มที่รับ LPR มีปริมาณสูงกว่า (LPR vs Placebo : 127.51 ± 54.28 vs 63.74 ± 27.15 mEq/day, p -value = 0.047) ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อจำกัดของการงานวิจัย การมีการขับออกของโซเดียมในปัสสาวะสูงขึ้น อาจบ่งบอกถึงการบริโภคเกลือมาก ภาวะหัวใจวาย หรือความเสียหายที่ท่อไต (tubular damage) (59) อย่างไรก็ตาม ปริมาณโซเดียมในปัสสาวะของทั้งสองกลุ่มถือว่าอยู่ในช่วงปกติ (40-220 mEq/day) การที่ปริมาณโซเดียมระหว่าง 2 กลุ่มแตกต่างกัน จึงไม่น่าจะบ่งบอกถึงพยาธิสภาพของโรคใดๆ

เนื่องจากผู้วิจัยสนใจปริมาณและชนิดของโปรตีนในปัสสาวะที่เปลี่ยนแปลงไปหลังได้รับ LPR กลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ถูกคัดเลือกมาโดยพิจารณาจากปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ ก่อนและหลังได้รับยา ประชากรกลุ่มที่รับ LPR จึงมีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะก่อนและหลังรับยาแตกต่างกัน คือ เท่ากับ 746.67 ± 325.65 และ 57.46 ± 26.31 มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ (p -value = 0.008) ในขณะที่ประชากรกลุ่มที่รับ placebo มีปริมาณโปรตีนในปัสสาวะก่อนและหลังรับยาไม่แตกต่างกัน คือ เท่ากับ 364.63 ± 254.97 และ 382.89 ± 200.95 มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ (p -value = 0.823) (ภาพที่ 5)

จากผลการวิเคราะห์ 1D-SDS-PAGE เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยแยกตัวอย่างเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ ก่อนรับ LPR, หลังรับ LPR, ก่อนรับ placebo และหลังรับ placebo โดยทำการรวมปริมาตรตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อดูการกระจายตัวของชนิดโปรตีน เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มย่อย พบว่าแถบโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือโปรตีน ขนาดประมาณ 62-70 กิโลดาลตัน โดยในกลุ่มก่อนรับ LPR มีความเข้มของแถบมากที่สุด และในกลุ่ม หลังรับ LPR พบแถบจางลง ในขณะที่ กลุ่มก่อนรับ placebo มีแถบจางกว่าในกลุ่มหลังรับ placebo ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นอัลบูมิน โดยพิจารณาจากขนาด และเนื่องจากในปัสสาวะ ของผู้ป่วยโรคนี้ไตจะพบการขับออกของอัลบูมินได้สูงกว่าคนปกติ และอัลบูมินยังเป็นโปรตีนชนิด หนึ่งที่พบมากใน organic matrix ของก้อนนิ่ว (9, 60) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาด 10-14 กิโลดาลตัน และขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน เฉพาะในกลุ่มก่อนรับ LPR เท่านั้น โดยไม่พบในกลุ่มอื่นๆ และพบแถบโปรตีนขนาด 95-120 กิโลดาลตัน ที่คาดว่า เป็น uromodulin หรือ Tamm-Horsfall protein ในทุกกลุ่ม โดยแถบโปรตีนดังกล่าวมีความเข้มข้นในกลุ่มหลังรับ LPR เทียบกับก่อนรับ LPR และแถบโปรตีนจางลงในกลุ่มหลังรับ placebo เทียบกับกลุ่มก่อนรับ placebo โดย Tamm-Horsfall protein (THP) เป็นโปรตีนที่พบได้ในปัสสาวะคนปกติ และเป็นหนึ่งในโปรตีนที่พบมากใน organic matrix ของก้อนนิ่ว (17, 33, 43) และมีบทบาทในการยับยั้งการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (46, 60)

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีนด้วยแมสสเปกโตรเมทรี โดยแบ่งตัวอย่าง เป็น 4 กลุ่มย่อยและใช้ปริมาณรวมของปัสสาวะในแต่ละกลุ่มในการวิเคราะห์ ให้แต่ละกลุ่มย่อย มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น และเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ระหว่าง ก่อนและหลังรับ LPR และ ก่อนและหลังรับ placebo พบว่า มีโปรตีนในปัสสาวะจำนวน 37 ชนิด ซึ่งมีปริมาณเปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR และโปรตีนจำนวน 44 ชนิด ที่มีปริมาณ

เปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo โปรตีนที่พบมีปริมาณลดลงทั้งในกลุ่มประชากรที่รับ LPR และกลุ่มประชากรที่รับ placebo (ตารางที่ 7) ส่วนมากเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การรักษาบาดแผล การแข็งตัวของเลือด และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เช่น immunoglobulins และ fibrinogens โดยในการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ว่าไตทุกชนิด จะมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการแข็งตัวของเลือดหลายชนิด ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับปัสสาวะคนปกติ ซึ่งเนื่องมาจากการอักเสบและบาดเจ็บของเซลล์บุหลอดไตบริเวณที่เกิดก่อนนี้ (17, 61) ดังนั้น โปรตีนดังกล่าวที่ลดลงในประชากรทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo น่าจะเป็นกระบวนการปกติในการรักษาบาดแผล และเกิดจากการบาดเจ็บของเซลล์ที่ลดลงในผู้ป่วยที่ได้รับการนำก้อนนี้ออกแล้ว อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบว่าโปรตีนอัลบูมิน ซึ่งลดลงในทั้ง 2 กลุ่ม มีปริมาณลดลงมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ LPR (ร้อยละ 87.50) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo (ร้อยละ 30.91) ซึ่งปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายของไตทั้งส่วนโกลเมอรูลัสและท่อไตได้ (28) นอกจากนี้ ยังพบโปรตีน immunoglobulin gamma-3 chain และ complement C4-B ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน มีปริมาณลดลงในกลุ่มที่ได้รับ LPR มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ placebo

โปรตีนที่เพิ่มขึ้นทั้งในประชากรกลุ่มที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo มีจำนวน 3 ชนิด (ตารางที่ 8) โดย protein AMBP เป็นโปรตีนที่มีการศึกษาพบว่ามียับยั้งกระบวนการเกิดนิวชนิดแคลเซียมออกซาลेट (62) ซึ่งปริมาณ protein AMBP มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ LPR (ร้อยละ 248.17) เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo (ร้อยละ 81.95)

เมื่อพิจารณาโปรตีนในปัสสาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ LPR เท่านั้น (ตารางที่ 9) พบว่าโปรตีนที่ลดลงส่วนมากยังคงเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ได้แก่ โปรตีนขนส่งในพลาสมา และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ lipid metabolism โปรตีนที่ลดลงเฉพาะในกลุ่มที่รับ LPR ที่ผู้วิจัยให้ความสนใจ คือ serotransferrin หรือ transferrin (TF) ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งธาตุเหล็กในพลาสมา และปริมาณ transferrin ในปัสสาวะใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายของโกลเมอรูลัส โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานระยะแรก (39, 40) ส่วนโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ LPR เท่านั้น มีเพียงชนิดเดียว คือ uromodulin หรือ Tamm-Horsfall protein (THP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการศึกษาพบว่าทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดนิวชนิดแคลเซียมออกซาลेट (27, 45) ในขณะที่ประชากรกลุ่มที่ได้รับ placebo กลับพบการเพิ่มขึ้นของ

ปริมาณ transferrin ในปัสสาวะ รวมถึงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Ig kappa/lambda-2/gamma-2 chains

ผู้วิจัยพบว่า ในบรรดาโปรตีนในปัสสาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากร มีโปรตีนจำนวน 9 ชนิด ที่มีการศึกษารายงานว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว (ตารางที่ 15) จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปคโตรเมทรี พบว่าโปรตีน prothrombin, trefoil factor 2, protein S100-A8, osteopontin และ lithostathine-1 ซึ่งเป็นโปรตีนในปัสสาวะที่มีบทบาทยับยั้งกระบวนการเกิดนิ่ว โดยเฉพาะนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาเลต (27, 63-65) มีปริมาณลดลงในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลง หรือวิเคราะห์ที่ไม่พบด้วยแมสสเปคโตรมิเตอร์ในประชากรที่ได้รับ LPR ทั้งนี้ ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าในกลุ่มประชากรที่รับ LPR ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ยับยั้งการเกิดนิ่วเหล่านี้จริง หรือเพราะโปรตีนดังกล่าวมีปริมาณน้อยเกินกว่าความไวของแมสสเปคโตรมิเตอร์จะวิเคราะห์ได้ แต่เมื่อพิจารณาจากการพบโปรตีนที่มีบทบาทยับยั้งการเกิดนิ่ว protein AMBP มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR มากกว่า และการพบ Tamm-Horsfall protein เพิ่มขึ้นในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR เท่านั้น จึงอาจอนุมานได้ว่าสูตรมะนาวผง หรือ LPR มีผลในการรักษาระดับโปรตีนที่มีบทบาทยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ ซึ่งน่าจะเป็นผลดีในการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกของ LPR ที่มีต่อระดับโปรตีนดังกล่าวในปัสสาวะได้

นอกจากนี้ โปรตีนในปัสสาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากรหลายชนิด ยังมีบทบาทเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติและพยาธิสภาพต่างๆ ของไต (ตารางที่ 16) ผู้วิจัยพบว่า โปรตีนที่บ่งชี้ภาวะ acute kidney injury ได้แก่ cystatin C, insulin-like growth factor-binding protein 7 และ osteopontin (66-68) มีปริมาณลดลงในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo เท่านั้น คาดว่าอาจเนื่องมาจากมีอาสาสมัครบางคนในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo มีภาวะ acute kidney injury ร่วมด้วย และภาวะดังกล่าวดีขึ้นหลังการสลายนิ่ว ในขณะที่โปรตีนที่บ่งชี้ความผิดปกติของไกลเมอรูลัสและประสิทธิภาพของไตที่ลดลง ได้แก่ albumin และ transferrin (39, 40) มีปริมาณลดลงควบคู่กันในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR ส่วนในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo มีปริมาณ albumin ในปัสสาวะลดลง แต่ลดน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ LPR แต่ปริมาณ transferrin นั้นสูงขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวอาจแสดงให้เห็นว่า ผู้ที่ได้รับ LPR มีการฟื้นฟูประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ดีกว่า และอาจลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease, CKD) ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดขึ้นได้บ่อยในผู้ป่วยโรคไตที่เกิดนิ่วซ้ำบ่อยและไม่ได้รับการรักษา (6, 32)

ผู้วิจัยได้เลือกโปรตีนที่สนใจจากโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดมา 3 ชนิด โดยพิจารณาจากบทบาทของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่วและการบ่งชี้พยาธิสภาพของไต ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณที่แตกต่างกันระหว่างในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR และกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณซ้ำในทุกๆ ตัวอย่างปัสสาวะ โปรตีนดังกล่าวได้แก่ albumin, transferrin และ Tamm-Horsfall protein

ผลการวิเคราะห์ albumin หรือ microalbumin ในตัวอย่างปัสสาวะโดยหลักการ immunoturbidimetric assay (ภาพที่ 7) พบว่า ปริมาณ albumin เฉลี่ยในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ ก่อนเริ่มรับยา 100.63 ± 82.92 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 8.22 ± 6.94 มิลลิกรัมต่อวัน โดยมีค่า $p\text{-value} = 0.043^*$ ในขณะที่ปริมาณ albumin เฉลี่ยในกลุ่มประชากรที่ได้รับ placebo ระหว่างก่อนและหลังรับยาไม่แตกต่างกัน คือ ก่อนเริ่มรับยา 38.05 ± 29.04 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 40.73 ± 38.30 มิลลิกรัมต่อวัน ค่า $p\text{-value} = 0.686$ ทั้งนี้ ปริมาณโปรตีน albumin ในปัสสาวะคนปกติ คือต่ำกว่า 30 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนภาวะ microalbuminuria คือ ภาวะที่มีการขับโปรตีน albumin ออกทางปัสสาวะในช่วง 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งบ่งชี้ถึงความผิดปกติของไต เช่น โรคไตเรื้อรัง และระยะแรกของโรคไตจากเบาหวาน (30, 31) เนื่องจากโปรตีน albumin เป็นโปรตีนขนส่งในพลาสมาที่มีขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่กว่า slit diaphragm ของโกลเมอรูลัส รวมถึงโปรตีนมีประจุลบมาก ทำให้ในสภาวะปกติ โปรตีน albumin จะถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัสไม่เกิน 3 กรัมต่อวันเท่านั้น และเกินร้อยละ 90 ของโปรตีน albumin ที่ถูกกรอง จะถูกดูดกลับโดย proximal tubular epithelial cell ทำให้พบการขับออกของโปรตีน albumin ในปัสสาวะน้อยมาก การพบโปรตีน albumin ในปัสสาวะสูงกว่าปกติ จึงสามารถบ่งชี้ถึงความเสียหายของไตทั้งส่วนโกลเมอรูลัสและส่วนท่อไตได้ (28, 69) จะเห็นได้ว่า ปริมาณ albumin เฉลี่ยในประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ก่อนเริ่มรับยา สูงกว่า 30 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งมากกว่าค่าปกติ บ่งชี้ว่ากลุ่มประชากรตัวอย่างซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคไต มีความเสียหายของไต แต่หลังจากรับยาเป็นเวลา 6 เดือน ประชากรในกลุ่มที่ได้รับ LPR มีการขับออก albumin ในปัสสาวะลดลงมาอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ ในขณะที่ประชากรกลุ่มที่ได้รับ placebo ยังคงมีการขับออกของ albumin สูงกว่าปกติอยู่ ผลการวิเคราะห์ albumin นี้จึงอาจช่วยยืนยันได้ว่า LPR มีบทบาทช่วยให้ ความเสียหายของไตลดลง และรักษาการทำงานของไตในผู้ป่วยโรคไตให้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Nagai R. et al (70) ที่พบว่า การให้กรดซิตริก สามารถยับยั้งการเกิดโปรตีนรั่วในปัสสาวะของหนูที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ ซึ่งซิเทรตเป็นสารประกอบหลักใน LPR เช่นกัน

นอกจากนี้ LPR ยังประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น polyphenol และวิตามินซี มีการศึกษาของ Cynthia M.B. (71) พบว่าสาร polyphenol ในชาเขียว สามารถลด albuminuria ในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานได้ โดยการยับยั้งการเกิด apoptosis ของ podocyte ใน glomerular basement membrane

นอกจากนี้ มีการศึกษาบทบาทโปรตีน albumin ในการเกิดนิ่ว พบว่า albumin สามารถยึดจับกับพื้นผิวของเซลล์บุหลอดไต และกระตุ้นให้เกิด crystal nucleation ของผลึกแคลเซียมออกซาเลต (60) ดังนั้น การที่ LPR สามารถลดการขับออกของ albumin ในปัสสาวะได้ น่าจะเป็นผลดีในการป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วยโรคนี้

ผลการวิเคราะห์ albumin ในประชากรทั้ง 2 กลุ่ม มีแนวโน้มแตกต่างจากผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี ซึ่งพบว่าโปรตีน albumin ลดลงในทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรีได้ทำการรวมปริมาตรตัวอย่างปัสสาวะในกลุ่มเดียวกัน และตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์มีปริมาณโปรตีนเท่ากันทุกกลุ่ม ในขณะที่การวิเคราะห์ albumin ได้ทำการแยกวิเคราะห์รายคน และคำนวณผลในหน่วย มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งแสดงถึงการอัตราขับออกของ albumin รวมในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์โปรตีน transferrin ในตัวอย่างปัสสาวะด้วย Transferrin ELISA Kit พบว่าปริมาณ transferrin ในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญภายหลังการรับยา โดยปริมาณ transferrin ก่อนรับยา เท่ากับ 35.42 ± 18.14 ไมโครกรัมต่อวัน และหลังรับยา 14.72 ± 9.48 ไมโครกรัมต่อวัน ค่า p -value = 0.080 ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในอาสาสมัครที่รับ placebo มีปริมาณ transferrin ในปัสสาวะระหว่างก่อนและหลังรับยาไม่แตกต่างกัน โดยก่อนเริ่มรับยามีค่า 29.26 ± 30.93 ไมโครกรัมต่อวัน และหลังรับยามีค่า 29.47 ± 7.11 ไมโครกรัมต่อวัน ค่า p -value = 0.500 โดยโปรตีน transferrin หรือ serotransferrin เป็นโปรตีนขนส่งเหล็ก (Fe^{3+}) ในพลาสมา มีขนาดประมาณ 77 กิโลดาลตัน โปรตีน transferrin แม้จะมีขนาดใหญ่กว่า albumin เล็กน้อย แต่เนื่องจากมีประจุลบน้อยกว่า ทำให้มีโอกาสถูกกรองผ่านโกลเมอรูลัสและขับออกสู่ปัสสาวะในสัดส่วนที่มากกว่า โปรตีน transferrin จึงเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของไตที่สำคัญอีกตัวหนึ่ง ที่มักใช้ในการวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวานในระยะเริ่มต้น (38, 40) นอกจากนี้ยังพบว่า การขับโปรตีน transferrin มากขึ้นในปัสสาวะ ไม่เพียงบ่งบอกถึงความผิดปกติของโกลเมอรูลัสเท่านั้น แต่ยังบ่งชี้ภาวะ

interstitial fibrosis และ tubular atrophy (72) และยังสามารถทำนายการเกิดภาวะ microalbuminuria ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้อีกด้วย (39)

แม้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน transferrin ในปัสสาวะทุกตัวอย่าง จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในประชากรทั้งกลุ่มที่ได้รับ LPR และได้รับ placebo แต่ผู้วิจัยพบว่า ปริมาณโปรตีน transferrin และปริมาณ albumin ในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 2 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ($r = 0.589$, $p\text{-value} = 0.006$) ซึ่งนับเป็นการศึกษาแรกที่พบความสัมพันธ์ของ โปรตีน albumin และ transferrin ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ นอกจากนี่ยังพบว่า ทั้งปริมาณ albumin และ transferrin ยังมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะอีกด้วย (ภาพที่ 10 และ 11) ซึ่งจากผลการแยกโปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และการวิเคราะห์ด้วย แมสสเปคโตรเมทรี สามารถบ่งบอกได้ว่าปริมาณของโปรตีน albumin น่าจะมีสัดส่วนมากที่สุด ในปัสสาวะ จึงทำให้พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกของปริมาณโปรตีนรวมและ albumin ในปัสสาวะ

ผลการวิเคราะห์ Tamm-Horsfall protein (THP) ในปัสสาวะ โดยใช้ THP ELISA Kit พบว่า ในกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR มีปริมาณ THP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังการรับยา คือ ปริมาณก่อนเริ่มรับยา 0.237 ± 0.311 มิลลิกรัมต่อวัน และหลังรับยา 3.721 ± 3.747 มิลลิกรัมต่อวัน โดยมีค่า $p\text{-value} = 0.043^*$ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ในกลุ่มประชากรที่รับ placebo มีปริมาณ Tamm-Horsfall protein ในปัสสาวะไม่เปลี่ยนแปลงหลังการรับยา ในปัสสาวะคนปกติ มีการขับ THP ได้มากถึง 20-100 มิลลิกรัมต่อวัน THP สามารถจับกับพื้นผิวของผลึกแคลเซียมออกซาลेट และขัดขวางไม่ให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของผลึก (crystal aggregation) ได้ จึงมีบทบาทเป็นโปรตีนยับยั้งการเกิดนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลेट (CaOx) ชนิดหนึ่ง (46, 47) แต่ปัสสาวะมีความเข้มข้นของสารก่อนิ่วสูง (high osmolality) THP จะเป็นตัวเชื่อมผลึกแคลเซียมออกซาลेटเข้าด้วยกัน และทำให้ผลึกยึดเกาะกับนิ่วเคลือบได้ดีขึ้น จึงมีบทบาทเป็นโปรตีนกระตุ้นการเกิดนิ่วได้เช่นกัน (48) อย่างไรก็ตาม ในปัสสาวะของผู้ที่ได้รับ LPR ซึ่งมีซิเทรตเป็นสารประกอบหลัก ซิเทรตที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะจะจับกับแคลเซียมเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ดี ทำให้ปัสสาวะมีค่าความอึดตัวต่ำ THP จึงน่าจะเป็นทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดนิ่วที่มีประสิทธิภาพได้

การเพิ่มขึ้นของ THP ในปัสสาวะหลังได้รับ LPR สอดคล้องกับการศึกษาของ Harold A. et al (8) ซึ่งพบว่า การให้โพแทสเซียมซิเทรตในผู้ป่วยโรคนี้ไว้ จะทำให้มีการขับออกของ THP ในปัสสาวะสูงขึ้น และยังมีการศึกษาของ Ganter K. et al (73) ซึ่งพบว่า การขับออก THP ในปัสสาวะ

ของผู้ป่วยโรคไตมีความสัมพันธ์ของปริมาณซีเทรตในปัสสาวะ แต่ในงานวิจัยนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 20 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ในผู้ป่วยโรคไตจะมีการขับออกของ THP ในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติ ซึ่งอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยโรคไตเกิดการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณท่อไต ทำให้สร้าง THP ได้ลดลง (49) และนี่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กลุ่มประชากรในงานวิจัยนี้ มีปริมาณ THP ในปัสสาวะต่ำกว่าช่วงปกติ

งานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่า ในผู้ป่วยโรคไตที่ได้รับสูตรมะนาวผง (LPR) เป็นเวลา 6 เดือน มีปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะลดลง และ LPR น่าจะมีบทบาทในการลดความบาดเจ็บ ความเสียหายของไต ทั้งส่วนโกลเมอรูลัสและส่วนท่อไต โดยพิจารณาจากกลุ่มประชากรที่ได้รับ LPR มีโปรตีนที่บ่งชี้ความผิดปกติของไต อันได้แก่ albumin และ transferrin ลดลง การให้ LPR ในผู้ป่วยโรคไตจึงน่าจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไตเรื้อรัง (CKD) ซึ่งเป็นภาวะที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคไตได้ ผู้วิจัยคาดว่า การบาดเจ็บของไตที่ลดลง อาจเป็นผลมาจากซีเทรตที่องค์ประกอบหลักใน LPR จับกับแคลเซียม และยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งสามารถยึดจับกับเซลล์บุหลอดไต ทำให้เกิดความบาดเจ็บของเซลล์ได้ และสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น polyphenol ที่มีใน LPR น่าจะช่วยต้าน oxidative stress และลดการอักเสบในเซลล์บุหลอดไตได้ นอกจากนี้ LPR ยังช่วยให้โปรตีนที่ยับยั้งการเกิดนิ่ว ได้แก่ THP มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วซ้ำในผู้ป่วย นอกเหนือจากการเพิ่มปริมาณซีเทรตซึ่งเป็นสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของ LPR ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนชนิดดังกล่าวในปัสสาวะ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด บทบาทของ LPR ในผู้ป่วยโรคไต และอาจรวมถึงผู้ป่วยโรคไตชนิดต่างๆ จึงควรมีการศึกษาต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Yanagawa M, Kawamura J, Onishi T, Soga N, Kameda K, Sriboonlue P, et al. Incidence of urolithiasis in northeast Thailand. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 1997;4(6):537-40.
2. Tosukhowong P, Sriboonlue P, Tungsanga K, Bovornpadungkitti S, Chatuporn S, Muktahant B, et al. Potassium status of Northeast Thai constructors in three different geographic locations. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet*. 2001;84 Suppl 1:S163-72.
3. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis: an update. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008;5(2):101-6.
4. Nakagawa Y, Carvalho M, Malasit P, Nimmannit S, Sritippaywan S, Vasuvattakul S, et al. Kidney stone inhibitors in patients with renal stones and endemic renal tubular acidosis in northeast Thailand. *Urological research*. 2004;32(2):112-6.
5. Yungjermchan PPS R PP TP, Tungsanga K, Boon C. Hypocitraturia and hypokaliuria: major metabolic risk factors for kidney stone disease. *Chula Med J*. 2006;50:16.
6. Gambaro G, Favaro S, D'Angelo A. Risk for renal failure in nephrolithiasis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2001;37(2):233-43.
7. Iacobazzi V, Infantino V. Citrate--new functions for an old metabolite. *Biological chemistry*. 2014;395(4):387-99.
8. Fuselier HA, Ward DM, Lindberg JS, Allen JM, Husserl FE, Marcucci PA, et al. Urinary Tamm-Horsfall protein increased after potassium citrate therapy in calcium stone formers. *Urology*. 1995;45(6):942-6.
9. Boyce WH, Garvey FK, Norfleet CM, Jr. Proteins and other biocolloids of urine in health and in calculous disease. I. Electrophoretic studies at pH 4.5 and 8.6 of those components soluble in molar sodium chloride. *J Clin Invest*. 1954;33(10):1287-97.
10. Robertson WG, Peacock M. The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron*. 1980;26(3):105-10.
11. Kadlec AO, Greco K, Fridirici ZC, Hart ST, Velloso T, Turk TM. Metabolic syndrome and urinary stone composition: what factors matter most? *Urology*. 2012;80(4):805-10.
12. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet*. 2006;367(9507):333-44.

13. Davies RJ, Steele RD, Kourambas J. Management of kidney stone disease in New South Wales. *The Medical journal of Australia*. 2009;190(6):339.
14. Rivers K, Shetty S, Menon M. When and how to evaluate a patient with nephrolithiasis. *The Urologic clinics of North America*. 2000;27(2):203-13.
15. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney international*. 1978;13(5):361-71.
16. Worcester EM, Nakagawa Y, Wabner CL, Kumar S, Coe FL. Crystal adsorption and growth slowing by nephrocalcin, albumin, and Tamm-Horsfall protein. *The American journal of physiology*. 1988;255(6 Pt 2):F1197-205.
17. Boonla C, Tosukhowong P, Spittau B, Schlosser A, Pimratana C, Kriegelstein K. Inflammatory and fibrotic proteins proteomically identified as key protein constituents in urine and stone matrix of patients with kidney calculi. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;429:81-9.
18. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatric nephrology*. 2010;25(5):831-41.
19. Grases F, Costa-Bauza A, Garcia-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Advances in colloid and interface science*. 1998;74:169-94.
20. Sugimoto T, Funae Y, Rubben H, Nishio S, Hautmann R, Lutzeyer W. Resolution of proteins in the kidney stone matrix using high-performance liquid chromatography. *European urology*. 1985;11(5):334-40.
21. Stitchantrakul W, Kochakarn W, Ruangraksa C, Domrongkitchaiporn S. Urinary risk factors for recurrent calcium stone formation in Thai stone formers. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet*. 2007;90(4):688-98.
22. Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W. Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2006;48(4):546-54.
23. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T, Bianchi G, Borghi L, Caione P, et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU Working Group. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica / Associazione ricerche in urologia*. 2015;87(2):105-20.
24. Choi EY, Kim HJ, Han JS. Anti-inflammatory effects of calcium citrate in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappaB activation. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2015;39(1):27-34.
25. NW YH. Fatigue Alleviation-Mechanism of Citric Acid Determined by Gene Expression Analysis in the Mouse Liver. *FNS*. 2015;1:6.
26. Chariyavilaskul P, Pongpaiboj P, Chaisawadi S, Boonla C, Dissayabuttra T, Prapunwattana P, et al. In vitro anti-lithogenic activity of lime powder regimen (LPR) and the

effect of LPR on urinary risk factors for kidney stone formation in healthy volunteers. *Urolithiasis*. 2015;43(2):125-34.

27. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *BioMed research international*. 2013;2013:292953.
28. Kaysen GA, Yeun J, Depner T. Albumin synthesis, catabolism and distribution in dialysis patients. *Mineral and electrolyte metabolism*. 1997;23(3-6):218-24.
29. Mosora N. [Microalbuminuria in incipient diabetic nephropathy]. *Revista de medicina interna, neurologie, psihiatrie, neurochirurgie, dermato-venerologie Medicina interna*. 1986;38(6):549-54.
30. Chugh A, Bakris GL. Microalbuminuria: what is it? Why is it important? What should be done about it? An update. *Journal of clinical hypertension*. 2007;9(3):196-200.
31. Koroshi A. Microalbuminuria, is it so important? *Hippokratia*. 2007;11(3):105-7.
32. Rule AD, Bergstralh EJ, Melton LJ, 3rd, Li X, Weaver AL, Lieske JC. Kidney stones and the risk for chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2009;4(4):804-11.
33. Boyce WH. Organic matrix of human urinary concretions. *The American journal of medicine*. 1968;45(5):673-83.
34. Worcester EM. Urinary calcium oxalate crystal growth inhibitors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1994;5(5 Suppl 1):S46-53.
35. Hess B, Meinhardt U, Zipperle L, Giovanoli R, Jaeger P. Simultaneous measurements of calcium oxalate crystal nucleation and aggregation: impact of various modifiers. *Urological research*. 1995;23(4):231-8.
36. Pszona A, Sakowicz A. The influence of citrate ions on the radiochemical purity of ⁹⁹Tcm-human serum albumin. *The International journal of applied radiation and isotopes*. 1981;32(5):349-50.
37. Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, et al. Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation. *Kidney international*. 1999;55(5):1776-86.
38. Crichton RR, Charlotheaux-Wauters M. Iron transport and storage. *European journal of biochemistry*. 1987;164(3):485-506.
39. Kazumi T, Hozumi T, Ishida Y, Ikeda Y, Kishi K, Hayakawa M, et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1999;22(7):1176-80.
40. Wang C, Li C, Gong W, Lou T. New urinary biomarkers for diabetic kidney disease. *Biomarker research*. 2013;1(1):9.

41. Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;291(3):F530-6.
42. Asokan D, Kalaiselvi P, Muhammed Farooq S, Varalakshmi P. Calcium oxalate monohydrate binding protein: a diagnostic biomarker for calcium oxalate kidney stone formers. *Urological research*. 2004;32(5):357-61.
43. Gokhale JA, Glenton PA, Khan SR. Characterization of Tamm-Horsfall protein in a rat nephrolithiasis model. *The Journal of urology*. 2001;166(4):1492-7.
44. Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;42(4):658-76.
45. Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney international*. 2004;66(3):1159-66.
46. Drach GW, Thorson S, Randolph A. Effects of urinary organic macromolecules on crystallization of calcium oxalate: enhancement of nucleation. *The Journal of urology*. 1980;123(4):519-23.
47. Grover PK, Ryall RL, Marshall VR. Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1990;190(3):223-38.
48. Rose GA, Sulaiman S. Tamm-Horsfall mucoproteins promote calcium oxalate crystal formation in urine: quantitative studies. *The Journal of urology*. 1982;127(1):177-9.
49. Glauser A, Hochreiter W, Jaeger P, Hess B. Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2000;15(10):1580-7.
50. Wright CA, Howles S, Trudgian DC, Kessler BM, Reynard JM, Noble JG, et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins influencing urolithiasis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(8):M110 005686.
51. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998;19(11):1853-61.
52. V. T. *Proteomics of Human Body Fluids*. BKK: Siriraj Hospital, Mahidol University; 2007.
53. MR RM. *Harper's Biochemistry*. 25, editor. NY: McGraw-Hill; 2000.
54. BE YD. *Teitz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 5, editor. Philadelphia: Saunders; 2001.
55. Stochaj W BT LN. *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

56. S R. Purifying proteins for Proteomics. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY; 2004.
57. Weatherly DB, Atwood JA, 3rd, Minning TA, Cavola C, Tarleton RL, Orlando R. A Heuristic method for assigning a false-discovery rate for protein identifications from Mascot database search results. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2005;4(6):762-72.
58. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
59. Ferri F. *Ferri's Clinical Advisor*. 1, editor. RI: Alpert Medical School, Brown University; 2015;1(8):24-26
60. Dussol B, Geider S, Lilova A, Leonetti F, Dupuy P, Daudon M, et al. Analysis of the soluble organic matrix of five morphologically different kidney stones. Evidence for a specific role of albumin in the constitution of the stone protein matrix. *Urological research*. 1995;23(1):45-51.
61. Merchant ML, Cummins TD, Wilkey DW, Salyer SA, Powell DW, Klein JB, et al. Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(4):F1254-8.
62. Medetognon-Benissan J, Tardivel S, Hennequin C, Daudon M, Druke T, Lacour B. Inhibitory effect of bikunin on calcium oxalate crystallization in vitro and urinary bikunin decrease in renal stone formers. *Urological research*. 1999;27(1):69-75.
63. Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Semangoen T, Malasit P. Urinary trefoil factor 1 is a novel potent inhibitor of calcium oxalate crystal growth and aggregation. *The Journal of urology*. 2008;179(4):1615-9.
64. Pillay SN, Asplin JR, Coe FL. Evidence that calgranulin is produced by kidney cells and is an inhibitor of calcium oxalate crystallization. *The American journal of physiology*. 1998;275(2 Pt 2):F255-61.
65. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995;760:375-7.
66. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2006;44(3):288-91.
67. Huang H, Zhou J, Chen J. Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Kidney Injury: Current Progress and Clinical prospects. *Current protein & peptide science*. 2016;17:223-26
68. Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta physiologica*. 2016;1:1-19
69. Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, et al. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochemistry and cell biology*. 2001;116(3):269-76.

70. Nagai R, Nagai M, Shimasaki S, Baynes JW, Fujiwara Y. Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type 1) diabetic rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;393(1):118-22.
71. Borges CM, Papadimitriou A, Duarte DA, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. The use of green tea polyphenols for treating residual albuminuria in diabetic nephropathy: A double-blind randomised clinical trial. *Scientific reports*. 2016;6:28282.
72. Cohen-Bucay A, Viswanathan G. Urinary markers of glomerular injury in diabetic nephropathy. *International journal of nephrology*. 2012;2012:146987.
73. Ganter K, Bongartz D, Hesse A. Tamm-Horsfall protein excretion and its relation to citrate in urine of stone-forming patients. *Urology*. 1999;53(3):492-5.





ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	นางสาวพิมพ์สุดา กุลประดิษฐ์
(ภาษาอังกฤษ)	MISS PIMSUDA KULPRADIT
วัน เดือน ปีเกิด	18 กันยายน พ.ศ. 2533
เพศ	หญิง
อายุ	26 ปี
ที่อยู่	265/51 หมู่ 4 ตำบล ในเมือง อำเภอ เมืองชัยภูมิ จังหวัด ชัยภูมิ 36000
เบอร์โทรศัพท์	0819974390
E-mail	pimsudakulpradit@gmail.com
ประวัติการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย