

ปริมาณไกลโคสะมิโนไกลแคนแต่ละชนิด และค่าความอึดตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ
ในสมาชิกรอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ไต



นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

URINARY GLYCOSAMINOGLYCAN LEVELS AND SUPERSATURATION IN KIDNEY STONE
FAMILIAL MEMBERS

Miss Nuttiya Kalpongkul



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปริมาณไกลโคสะมิโนไกลแคนแต่ละชนิด และค่าความ อิมิตวียิงยวดของปัสสาวะ ในสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรค นิวไต
โดย	นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีรัชชัย ดิษจรเดช)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ทัศนพงศ์ธรรม)

นัฐธิญา กาลพงษ์นกุล : ปริมาณไกลโคสะมิโนไกลแคนแต่ละชนิด และค่าความอิ่มตัวยิ่งยวดของปัสสาวะ ในสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต. (URINARY GLYCOSAMINOGLYCAN LEVELS AND SUPERSATURATION IN KIDNEY STONE FAMILIAL MEMBERS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. นพ. ฐสิณัส ดิษยบุตร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ปิยะรัตน์ ไทสุโขวงศ์, ดร. มนพิชา ศรีสะอาด, 66 หน้า.

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบมากทั่วโลกและพบว่าสมาชิกในครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงกว่าประชากรปกติมาก โดยนิ่วเกิดจากการมีสารยับยั้งนิ่วในระบบปัสสาวะน้อย เช่น ซิเทรต แมกนีเซียม ซัลเฟต ไกลโคสะมิโนไกลแคน (GAGs) เป็นต้น ร่วมกับมีสารส่งเสริมการเกิดนิ่วสูง เช่น แคลเซียม ออกซาเลต ฟอสเฟต กรดยูริก เป็นต้น ทำให้สารเหล่านี้ในปัสสาวะมีความเข้มข้นสูงเกินค่าความอิ่มตัว เรียกว่า ภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ (supersaturation) เมื่อเกิดภาวะนี้ แคลเซียมและออกซาเลตจะจับกันแล้วตกตะกอนแล้วรวมกลุ่มกันกลายเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ยาก การวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุตรมีระดับ GAGs ทั้งหมดในปัสสาวะต่ำ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความค่าความอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุตรเปรียบเทียบกับคนปกติ และพัฒนาการวัดระดับ GAGs แต่ละชนิดด้วยเทคนิค capillary electrophoresis (CE) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษา GAGs ได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน มีความถูกต้องแม่นยำสูง และราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม และทำการศึกษาเปรียบเทียบความอิ่มตัวยิ่งยวดกับความสัมพันธ์กับการเกิดนิ่ว ผู้เข้าร่วมวิจัยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต (28 ราย) กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต (46 ราย) กลุ่มคนปกติ (40 ราย) และบุตรของกลุ่มคนปกติ (34 ราย) พบว่า ผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะ supersaturation สูงกว่าทุกกลุ่ม และบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีภาวะ supersaturation สูงกว่าบุตรของคนปกติที่มีอายุและเพศไม่ต่างกัน ในส่วนของการพัฒนาการวัดระดับของ GAG แต่ละชนิดโดยวิธี CE พบว่า ปริมาณ chondroitin sulfate และ dermatan sulfate ในปัสสาวะของทุกกลุ่มมีระดับต่ำกว่าที่จะสามารถตรวจพบได้ (25 และ 50 mg/L ตามลำดับ) ส่วน hyaluronic acid พบว่ามีระดับสูงสุดในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต และในบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับสูงกว่าบุตรของคนปกติ และค่า ระดับของ Hyaluronic acid ในกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ supersaturation ($r^2=0.140$, $p=0.05$) ซึ่งเชื่อว่า hyaluronic acid ในปัสสาวะเป็นตัวส่งเสริมการเกิดนิ่ว จากผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วสูงกว่าคนปกติ คือ มีระดับ supersaturation และระดับ hyaluronic acid ในปัสสาวะสูง จากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยสามารถแสดงให้เห็นว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูงกว่าคนปกติ จากมีภาวะ urinary supersaturation สูง จากภาวะออกซาเลตสูงและซิเทรตต่ำในปัสสาวะ และมีระดับ HA สูงในปัสสาวะ

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574201930 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: KIDNEY STONE DISEASE / CALCIUM OXALATE CRYSTALLIZATION /
GLYCOSAMINOGLYCANS / SUPERSATURATION

NUTTIYA KALPONGNUKUL: URINARY GLYCOSAMINOGLYCAN LEVELS AND SUPERSATURATION IN KIDNEY STONE FAMILIAL MEMBERS. ADVISOR: THASINAS DISSAYABUTRA, MD, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, MONPICCHAR SRISA-ART, Ph.D., 66 pp.

Urolithiasis or urinary stone disease is a common urologic disease in elderly worldwide. It is well-recognized that familial members of urolithiasis patients have higher risk for stone development than normal population. Urinary stone is formed when the level of anti-lithogenic factors (such as citrate, sulfate, magnesium and glycosaminoglycans or GAGs) in urine decrease, and the level of lithogenic elements (such as calcium, oxalate, phosphate uric acid) increase, until the urinary solute concentration exceeds the saturation state, which is called supersaturation. At this state, calcium oxalate spontaneously precipitates and forms insoluble crystal. As we reported previously that urolithiasis patients and their family members had diminished urinary GAGs compared to normal population. This study aimed to investigate to develop a capillary electrophoresis (CE) technique to identify and measure the level of each urinary GAG level. Since the CE could simultaneously identify several GAGs at the same time, with lower cost and high accuracy compared with classic gel electrophoresis or ELISA techniques. We also aimed to measure the level of urinary supersaturation compared between urolithiasis and control families. We enrolled and divided participants into 4 groups: urolithiasis patients (Group 1: n=28) and their children (Group 2; n=46), non-stone formers with age- and gender-matched (Group 3; n=40) and their children (Group 4; n=34). We found that Group 1 had highest urinary supersaturation level, and Group 2 had higher supersaturation level than Group 4 which had no statistical differences in age or gender. In the aspect of CE technique, we found that the urinary chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS) level were too low to be able to be measured by CE method (lower than 25 and 50 mg/L, respectively), while hyaluronic acid (HA) was highest in Group 1, and Group 2 was higher than Group 4. We found the association of Urolithiasis family between the level of HA and the urinary supersaturation ($r^2=0.140$, $p=0.05$), which supported the previous literature that HA is associated with stone formation. According this, we could demonstrate that urolithiasis descendants had high risk for stone development than normal population, as they had high urinary supersaturation due to hyperoxaluric and hypocitraturic state, and they also have high urinary HA .

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จจุล่งไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นายแพทย์ ฐิติณัฐ ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนคำแนะนำ ในการรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์ และ อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อแนะนำที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ที่ยินดีเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธวัชชัย ดิษฐเดช ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณะแพทย์ และพยาบาล หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ให้ความกรุณาและความช่วยเหลือในการเก็บสารตัวอย่างของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเมตตา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณกาญจนา เคาวสุต คุณจำรัส มณี และคุณสนาน ละมาตร์ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ขอกราบขอบพระคุณของบิดา มารดา ที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้านของชีวิต ขอขอบคุณญาติ พี่ น้อง เพื่อนๆระดับปริญญาตรี ปริญญาโท ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (background and rationale).....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (research objectives).....	2
3. ข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions).....	3
4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (limitations).....	3
5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
6. ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (anticipated outcomes).....	4
8. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ความสำคัญของโรคนี้ไว้ไต.....	6
2. ชนิดของนี้ไว้ไต.....	7
3. สารก่อนนี้ไว้ไต.....	7
4. สารยับยั้งนี้ไว้ไต.....	8
5. Supersaturation.....	9
6. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนี้ไว้ไต.....	10
7. กระบวนการเกิดนี้ไว้ไต.....	16
8. Glycosaminoglycans หรือ GAGs.....	17
9. เทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) สำหรับการวิเคราะห์ GAGs.....	22
10. อาการของนี้ไว้ไตหรือนี้ไว้ในท่อไต.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
1. ระเบียบวิธีงานวิจัย (research methodology).....	24

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size).....	24
3. สถานที่ทำการวิจัย.....	24
4. การเก็บรักษาตัวอย่างทางชีวภาพ.....	24
5. วิธีการวิเคราะห์ GAGs แต่ละชนิดด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE).....	25
5.1 วิธีการวิเคราะห์ hyaluronic acid (HA).....	25
5.2 วิธีการวิเคราะห์ chondroitin sulfate (CS) และ dermatan sulfate (DS)	25
6. วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการตกตะกอนของนิว.....	25
6.1 ตรวจวัดปริมาณแคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) ในปัสสาวะ.....	26
6.2 ตรวจวัดปริมาณซีเทรตและออกซาเลตในปัสสาวะ.....	26
6.3 ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตในปัสสาวะ.....	26
6.4 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟตในปัสสาวะ.....	26
6.5 ตรวจวัดปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะ.....	27
6.6 ตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุคลอไรด์ โซเดียม และโพแทสเซียม ในปัสสาวะ.....	27
7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis).....	27
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
1. ผลการศึกษาสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปัสสาวะ.....	30
1.1 ผลการวิเคราะห์ระดับแคลเซียมในปัสสาวะ.....	30
1.2 ผลการวิเคราะห์ระดับออกซาเลตในปัสสาวะ.....	32
1.3 ผลการวิเคราะห์ระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะ.....	34
1.4 ผลการวิเคราะห์ระดับซีเทรตในปัสสาวะ.....	35
1.5 ผลการวิเคราะห์ระดับคลอไรด์ในปัสสาวะ.....	37
1.6 ผลการวิเคราะห์ระดับฟอสเฟตในปัสสาวะ.....	38
1.7 ผลการวิเคราะห์ระดับกรดยูริกในปัสสาวะ.....	40
1.8 ผลการวิเคราะห์ระดับซัลเฟตในปัสสาวะ.....	41
2. ผลการศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ต่อการเกิดนิ่วไต.....	44
3. ผลจากการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis.....	46

4. ผลจากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ chondroitin sulfate, dermatan sulfate และ hyaluronic acid ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis..... 47

 4.1 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS).... 47

 4.2 การศึกษาผลของบัฟเฟอร์ต่อการแยกสาร Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA)..... 48

 4.3 ผลการศึกษาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA)..... 48

 4.4 ผลการวิเคราะห์ CS, DS และ HA ในสารตัวอย่างปัสสาวะ 49

 4.5 ผลการศึกษา CS และ DS ในสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมเอนไซม์ chondroitinase ABC (10 Unit/ml)..... 50

 4.6 ผลการศึกษาสารสกัดสารละลายมาตรฐาน CS และสารตัวอย่างปัสสาวะ 52

5. ผลการวิเคราะห์ Hyaluronic acid (HA) ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค capillary electrophoresis 53

6. ผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับ supersaturation กับ Hyaluronic acid (HA)..... 55

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 56

 รายการอ้างอิง 59

 ภาคผนวก..... 63

 ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 66

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางสรุปปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ้วไต.....	16
ตารางที่ 2 แสดงระดับสารก่อนิ้วและสารยับยั้งการเกิดนิ้วในปีสภาวะของครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ้วไต และครอบครัวคนปกติ.....	21
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	29
ตารางที่ 4 สรุปผลการศึกษาสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปีสภาวะ	43
ตารางที่ 5 แสดงค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน CS, DS และ HA.....	49
ตารางที่ 6 แสดงค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน CS และ DS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC	49
ตารางที่ 7 แสดงระดับ Hyaluronic acid ในปีสภาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	53

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ชนิดของนิวไต	7
ภาพที่ 2 แสดงผลของ citrate จับกับ Calcium ได้เป็นแคลเซียมซิเตรต หรือ Mammesium จับกับ Oxalate ได้เป็นแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ดี	8
ภาพที่ 3 แสดงผลของสารยับยั้ง (1) โดยดูดซับเข้าที่ผิวผลึก ตรงตำแหน่งที่กำลังมีการโตของผลึก ทำให้ผลึกไม่สามารถโตขึ้นได้อีก เพราะไอออนอิสระไม่สามารถเข้าไปจับตรงตำแหน่งนั้นได้ (2) เข้าไปจับบนผิวผลึกแล้วทำให้ผลึกมีประจุไฟฟ้าเหมือนกันจึงผลักรัน ทำให้รวมเป็นกลุ่มผลึกขนาดใหญ่ไม่ได้ ..	9
ภาพที่ 4 การเกิดภาวะ supersaturation.....	10
ภาพที่ 5 กลไกการรักษาสมดุลของแคลเซียม	11
ภาพที่ 6 การสร้างออกซาเลตในร่างกาย	12
ภาพที่ 7 กลไกการกำจัดกรดยูริกทางปัสสาวะ.....	13
ภาพที่ 8 กระบวนการเกิดนิวไต	ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า
ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Heparan sulfate (HS), Dermatan sulfate (DS), Keratan sulfate (DS), Chondroitin-4-sulfate (C4S), Chondroitin-6-sulfate (C6S) และ Hyaluronic acid (HA).....	ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า
ภาพที่ 10 การสังเคราะห์ chondroitin sulfate (CS) และ dermatan sulfate (DS).....	20
ภาพที่ 11 หลักการวิเคราะห์ GAGs ด้วยเทคนิค capillary electrophoresis.....	22
ภาพที่ 12 แสดงระดับของแคลเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง.....	30
ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของระดับแคลเซียมในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิวไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ.....	31
ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับแคลเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า
ภาพที่ 15 แสดงระดับออกซาเลตในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	32
ภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ของระดับออกซาเลตกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิวไตและกลุ่มครอบครัวคนปกติ	33
ภาพที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับออกซาเลตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า
ภาพที่ 18 แสดงระดับของแมกนีเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	34
ภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ของระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิวไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ.....	34
ภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า
ภาพที่ 21 แสดงระดับของซิเตรตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	35

ภาพที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ของระดับซิเทรตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 36

ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับซิเทรตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่ม . **ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า**

ภาพที่ 24 แสดงระดับของคลอไรด์ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 37

ภาพที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ของระดับคลอไรด์ในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 37

ภาพที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับคลอไรด์ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 38

ภาพที่ 27 แสดงระดับฟอสเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง..... 38

ภาพที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ของระดับฟอสเฟตกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 39

ภาพที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับฟอสเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 39

ภาพที่ 30 แสดงระดับกรดยูริกในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 40

ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ของระดับกรดยูริกในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 40

ภาพที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับกรดยูริกในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 41

ภาพที่ 33 แสดงระดับของซัลเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง..... 41

ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ของระดับซัลเฟตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 42

ภาพที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับค่าซัลเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง 42

ภาพที่ 36 แสดงระดับ supersaturation A : ด้วยสูตร Ogawa index B : แสดงระดับ supersaturation ด้วยสูตร Tiselius risk index..... 44

ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ supersaturation กับช่วงอายุ โดยวิธี pearson correlation จากการคำนวณด้วย Ogawa index ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไตและครอบครัวคนปกติ..... 45

ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศชายและเพศหญิงกับระดับ supersaturation 45

ภาพที่ 39 แสดงผลเจลจาก Gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย 0.1% alcian blue 46

ภาพที่ 40 แสดงลักษณะ electropherogram ที่เหมาะสมซึ่งเปรียบเทียบระหว่าง intensity กับช่วงเวลา..... 47

ภาพที่ 41 แสดง electropherogram ของสารตัวอย่างปัสสาวะ 50

ภาพที่ 42 แสดง electropherogram A : CS และ DS ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC, B: CS หลังตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC C: DS หลังตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC..... 51

ภาพที่ 43 แสดง electropherogram ของสารตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน CS และ DS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC 51

ภาพที่ 44 แสดง electropherogram A: Extracted CS ในสารละลายมาตรฐาน CS 200 mg/L โดยมีความเข้มข้นหลังสกัด 8000 mg/L , B: Extracted CS ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่าง, C: Extracted CS ในปัสสาวะเก็บใหม่ที่เติมสารละลายมาตรฐาน CS 200 mg/L โดยมีความเข้มข้นหลังสกัด 4000 mg/L และ D: Extracted CS ในปัสสาวะที่เก็บใหม่ 24 ชั่วโมง..... 52

ภาพที่ 45 แสดงระดับของ HA ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง..... 53

ภาพที่ 46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HA ในปัสสาวะกับอายุ ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไตและกลุ่มครอบครัวคนปกติ..... 54

ภาพที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผู้ที่มีภาวะ urinary supersaturation สูง (ครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต กลุ่มที่ 1 และ 2) กับผู้ที่มีภาวะ supersaturation ต่ำ (กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 3 และ 4) กับระดับ HA ในปัสสาวะ 55



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (background and rationale)

โรคนิ่วไต (Kidney stones disease) ถือได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบบ่อยทั่วโลกและอุบัติการณ์โรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งประเทศไทยจัดเป็นปัญหาสุขภาพของประชากรไทยเป็นอย่างยิ่ง โดยพบความชุกของประชากรที่เป็นโรคนิ่วไตสูงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณร้อยละ 0.42-16 (2) โรคนิ่วไตสามารถก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ ได้ อาทิเช่น การอุดตันทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และถ้าเกิดนิ่วเต็มไต จะทำให้ไตเสียการทำงาน ส่งผลให้เกิดภาวะโรคไตเรื้อรังตามมา นอกจากนี้โรคนิ่วไตมีอุบัติการณ์การเป็นนิ่วซ้ำสูงมาก ทำให้ทั้งผู้ป่วยและภาครัฐต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและป้องกันการเกิดนิ่วซ้ำเป็นจำนวนมาก (3)

นิ่วไต เกิดจากการตกผลึกของสารก่อนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ แบ่งตามองค์ประกอบของนิ่วได้เป็นสองประเภท คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ พบได้ประมาณร้อยละ 80 ของนิ่วที่พบทั้งหมด ประกอบด้วย นิ่วแคลเซียมออกซาเลต แคลเซียมฟอสเฟต และนิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ เช่น นิ่วยูริก นิ่ว struvite เป็นต้น

อายุเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคนิ่วไต จากการศึกษาของศ.ปิยะรัตน์ (2550) พบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วคนไทยมีความชุกสูงที่สุดในช่วงอายุระหว่าง 40-50 ปี ในขณะที่มีผู้ป่วยที่เป็นเด็กและเยาวชนน้อยมาก นักวิทยาศาสตร์ทั่วไปเชื่อว่า เด็กจะมีระดับสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะสูงกว่าในผู้ใหญ่ ซึ่งสารยับยั้งนิ่ว คือ สารที่ป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะ ในคนปกติที่มีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะสูงเพียงพอจะสามารถยับยั้งการก่อตัวของผลึกนิ่วได้ โดยสารเหล่านี้จะไปแย่งจับกับสารก่อนิ่ว ทำให้เกิดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและขับออกไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะ โดยสามารถจำแนกสารยับยั้งนิ่วออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกเป็นแร่ธาตุและสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ซิเตรต แมกนีเซียม โพแทสเซียม ไพรอเฟออสเฟต เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) หรือ GAGs โปรตีน เช่น nephrocalcin uropontin และ Tamm-Horsfall protein (THP) เป็นต้น

กลไกการเกิดนิ่วไต เริ่มจากการเกิดภาวะการอิ่มตัวของสารในปัสสาวะ และสารจะไม่สามารถละลายได้ต่อไป (saturation) ต่อมาเมื่อมีปริมาณสารมากเกินจุดอิ่มตัวจนเกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) จะส่งผลให้เกิดการเกิดผลึกนิ่วขนาดเล็ก (nucleation/ crystallization) ต่อมาเมื่อผลึกรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นอันตราย อาจเป็นปฏิกิริยาระหว่างผลึกกับผลึก (crystal aggregation) หรือปฏิกิริยาระหว่างผลึกกับโมเลกุลต่างๆ ในปัสสาวะ (crystal growth) จนมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะจับกับเซลล์บุผิวท่อไตได้โดยไม่หลุดออกไปได้โดยง่าย (crystal retention) จากนั้นเซลล์บุผิวท่อไตจะมีการเก็บผลึกนิ่วเข้าสู่เซลล์ (endocytosis) และส่งออก

ไปยังฐานของเซลล์เข้าสู่เนื้อไต นิวที่เนื้อไตสามารถโตเพิ่มขึ้นจนก่อให้เกิดโรคไตในที่สุด ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ภาวะ supersaturation เป็นจุดที่สำคัญของกลไกการเกิดนิวไต

GAGs เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีประจุลบเป็นองค์ประกอบปริมาณมาก เชื่อว่า GAGs จะจับกับสารก่อนิวไตที่มีประจุบวก เช่น แคลเซียม และยับยั้งการรวมตัวเข้ากับออกซาเลต หรือจับกับผลึกนิวไตโดยตรง เพื่อกันมิให้ผลึกอื่นมารวมตัวให้นิวไตมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ (inhibit crystal growth and aggregation) GAGs สามารถพบได้ในปัสสาวะอันเป็นผลมาจากการสลายของ proteoglycans ใน glomerular basement membrane ของโกลเมอรูลัส หรือสร้างและขับออกจากเซลล์บุท่อไต นอกจากนี้ เมื่อผลึกถูกจับและเก็บเข้าไปยังเนื้อไต (4)

การศึกษาหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า สมาชิกในครอบครัวผู้ป่วยโรคไตจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงกว่าประชากรปกติมาก (5) โดยไม่พบความผิดปกติทางพันธุกรรมที่สามารถอธิบายได้ การศึกษาของคณะผู้วิจัย นำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ พบว่าแม้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคไตซึ่งไม่ได้เป็นโรค แต่มีความเสี่ยงในการเกิดนิวไตสูงกว่าบุตรของครอบครัวปกติ เนื่องจากมีระดับสารยับยั้งนิวไต ได้แก่ ชิเทรต และ sulfated GAGs ต่ำกว่าเด็กปกติที่มีอายุและเพศไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังคงสูงกว่าผู้ป่วยซึ่งเป็นบิดาหรือมารดา นอกจากนี้ ยังพบระดับโปรตีนในปัสสาวะของบุตรของผู้ป่วยมีระดับสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นไปได้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคไตมีความผิดปกติที่ทำให้เกิดคริสตัลของนิวไต แต่ยังไม่เกิดการรวมตัวเป็นก้อนนิวไตเนื่องจากมีสารยับยั้งการเกิดนิวไตสูงเพียงพอที่จะยับยั้งการเกิดก้อนนิวไต

ด้วยเหตุนี้ การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาการศึกษาระดับของ GAGs แต่ละชนิดในแต่ละกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค capillary electrophoresis เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษา GAGs ได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน มีความถูกต้องแม่นยำสูง และราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม และทำการศึกษาเปรียบเทียบความอึดตัวยิ่งยวดกับความสัมพันธ์กับการเกิดนิวไต โดยมีสมมุติฐานว่าบุตรของผู้ป่วยมีระดับความอึดตัวยิ่งยวด ในปัสสาวะสูงกว่าเด็กปกติ แต่น้อยกว่าผู้ป่วย และกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มมีระดับ GAGs แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดนิวไต

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (research objectives)

2.1 เพื่อศึกษาความแตกต่างของปริมาณ GAGs แต่ละชนิดในปัสสาวะของสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคไตและครอบครัวปกติ

2.2 เพื่อศึกษาความแตกต่างของค่าความอึดตัวยิ่งยวดในปัสสาวะของสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคไตและครอบครัวปกติ

2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GAGs แต่ละชนิดกับค่าความอึดตัวยิ่งยวดในปัสสาวะของสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคไตและครอบครัวปกติ

2.4 เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ GAGs ชนิดต่างๆ ในปัสสาวะโดยวิธี capillary electrophoresis

3. ข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions)

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ

3.2 กลุ่มอาสาสมัครคนปกติที่เข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้คัดกรองจากประชากรไทยทั่วไป ซึ่งจะต้องมีสุขภาพดี และไม่มีประวัติป่วยด้วยโรคนี้ไว้ และผลการตรวจ urine strip test ไม่มี significant hematuria (erythrocyte 1+ หรือมากกว่า)

3.3 ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย และมีการลงลายมือชื่อของผู้ปกครองในใบยินยอมด้วยความสมัครใจ ภายหลังจากชี้แจงให้ทราบในทุกกรณีรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

4. ข้อจำกัดของงานวิจัย (limitations)

การศึกษาเป็นแบบ cross-sectional study ทำให้ไม่สามารถดูแนวโน้มของการศึกษาในระยะยาวได้ และได้มีการศึกษาก่อนหน้าถึงระดับ sulfated-GAGs ทั้งหมด ด้วยเทคนิค colorimetric พบว่ามีอยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งการศึกษาเป็นการวิเคราะห์ปริมาณของ GAGs แต่ละชนิดเท่านั้น มิใช่การดูคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดนิ่วโดยตรง จึงอาจไม่พบความสัมพันธ์กับความสามารถในการเกิดนิ่วได้อย่างชัดเจน

นอกจากนี้ การวิเคราะห์ระดับ GAGs ในปัสสาวะโดยวิธี capillary electrophoresis เป็นวิธีที่พัฒนามาจากการวิเคราะห์ GAGs โดย capillary electrophoresis ซึ่งมีข้อจำกัดที่ GAGs ดูดกลืนแสงได้ต่ำ ทำให้ต้องพัฒนาวิธีพิเศษขึ้น อาทิเช่น การใช้ reverse medium technique เป็นต้น นอกจากนี้ ในปัสสาวะยังมีสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เป็นจำนวนมาก ซึ่งน่าจะมีผลต่อการวัด GAGs โดยวิธีนี้ นอกจากนี้ ปริมาณ sulfated GAGs ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ และบุตรมีระดับต่ำกว่าคนปกติมาก อาจจะไม่สามารถวัดได้โดยวิธี capillary electrophoresis

5. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

5.1 Kidney stone disease คือ โรคนี้ไว้ที่เกิดจากการที่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ในภาวะความอึดตัวยิ่งยวดเป็นเวลานานทำให้เกิดการติดค้างของผลึกในท่อไต

5.2 Calcium oxalate crystallization คือ ผลึกของแคลเซียมออกซาเลต ที่เกิดจากแคลเซียมอิสระและออกซาเลตที่มีมากในปัสสาวะรวมตัวกันเกิดเป็นตะกอน calcium oxalate ที่ไม่ละลายน้ำ

5.3 Glycosaminoglycans คือ เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ประเภทคาร์โบไฮเดรต สร้างจากเซลล์ที่บุตามท่อหลอดฝอยไตหรือท่ออื่นๆของไตและทางเดินปัสสาวะ มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่ว

5.4 Supersaturation คือ ภาวะความอึดตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ เกิดเนื่องจากสารก่อนนิ่วในปัสสาวะมีปริมาณมากสามารถรวมตัวและจับกันอย่างถาวรแล้วตกตะกอนสะสมจนกลายเป็นก้อนนิ่วได้

5.5 chondroitin sulfate คือ GAGs ชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย Glucuronic acid ต่อสลับกับ N-acetyl glucosamine มีหมู่ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้าง พบมากที่สุดในปัสสาวะประมาณ 60% ของ GAGs ทั้งหมด และมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดนิ่วไต

5.6 Hyaluronic acid คือ GAGs ชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย Glucuronic acid ต่อสลับกับ N-acetyl glucosamine พบในก้อนนิ่วและในผลึกแคลเซียมออกซาเลต มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดโรคนิ่วไต

5.7 Ogawa index คือ สูตรการคำนวณอิเล็กทรอนิกส์ที่ส่งผลต่อกระบวนการเกิดผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ออกซาเลต และซิเตรต เพื่อหาภาวะ supersaturation

5.8 Tiselius risk index คือ สูตรการคำนวณอิเล็กทรอนิกส์ที่ส่งผลต่อกระบวนการเกิดผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ออกซาเลต และซิเตรต รวมถึง creatinine เพื่อหาภาวะ supersaturation

6. ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (anticipated outcomes)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณ GAGs แต่ละชนิดกับค่าความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะของครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและครอบครัวปกติ สามารถอธิบายถึงปัจจัยที่ช่วยป้องกันการเกิดโรคนิ่วไตในเด็ก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วไตและสมาชิกในครอบครัวได้

7. วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างปัสสาวะได้มาจากการวิจัยก่อนหน้า “โครงการวิจัยเรื่องภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วกลุ่มอาการเมแทบอลิกกับโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุคคลในครอบครัว” และคัดเลือกมาโดยใช้หลักเกณฑ์ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี
2. กลุ่มที่ 2 คือ บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตกลุ่มที่ 1 ที่อาศัยอยู่ในบ้านหรือพื้นที่ใกล้เคียงกัน
3. กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มคนปกติ ซึ่งเป็นประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคนิ่วไต อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน และมีเพศ อายุ ใกล้เคียงกับผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 (gender- and age-matched)
4. กลุ่มที่ 4 คือ บุตรของคนปกติกลุ่มที่ 3 ที่อาศัยอยู่ในบ้านหรือพื้นที่ใกล้เคียงกัน

การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึก วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บรักษาสารตัวอย่างทางชีวภาพ

ตัวอย่างปัสสาวะของทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างข้างต้น เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์

8. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์ จัดทำโปสเตอร์ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014 “Bridging ASEAN Biochemical Research Communities” วันที่ 2-3 เมษายน 2557

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความสำคัญของโรคนิ่วไต

โรคนิ่วไต (kidney stone disease) จัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรโลก ความชุกของโรคนิ่วมีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วทุกภูมิภาคของโลก พบอุบัติการณ์การเป็นโรคนิ่วสูงมากในประเทศแถบเขตร้อน สำหรับประเทศไทยมีความชุกของการเป็นโรคนิ่วไตสูงมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณร้อยละ 10-16 (2) อีกทั้งยังเป็นโรคที่มีอัตราการเกิดซ้ำสูง ภายหลังจากการรักษา เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อไต เช่น พบการอักเสบ บวม บาดเจ็บภายในเนื้อไต และไม่ได้รับการแก้ไขความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่ก่อให้เกิดนิ่วชนิดนั้นๆ หรือขาดการสร้างเสริมสุขภาพที่เหมาะสมหลังการสลายนิ่วหรือผ่าตัดเอานิ่วออก นอกจากนี้การมีนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะจะส่งผลให้เกิดอาการแทรกซ้อน เป็นโรคไตวายเรื้อรังจนถึงขั้นเสียชีวิต

เมื่อแบ่งโรคนิ่วตามตำแหน่ง พบว่าในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (6) ในปี พ.ศ. 2528 มีรายงานโรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะส่วนบน (โรคนิ่วที่พบในไตและท่อไต) ประมาณร้อยละ 80 และเป็นโรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง (โรคนิ่วที่พบในกระเพาะปัสสาวะและท่อทางเดินปัสสาวะ) ประมาณร้อยละ 20 โดยนิ่วในทางเดินปัสสาวะส่วนบน มักพบในวัยแรงงานอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป พบมากที่สุดในช่วงอายุ 40 -49 ปี พบมากในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง 2 เท่า (7) และหลังผ่าตัดหรือสลายนิ่วออกแล้วมีอัตราเกิดเป็นซ้ำสูงถึงร้อยละ 50 ภายใประยะเวลา 10 ปี (8)

การศึกษาส่วนใหญ่เชื่อว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดนิ่วไต เนื่องจากพบผู้ป่วยโรคนิ่วไตหลายคนในครอบครัวเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีผู้ใดสามารถบ่งชี้ได้ว่ามียีนเดี่ยวยีนใดที่เป็นสาเหตุจำเพาะ แม้ว่าจะพบโรคทางพันธุกรรมที่มียีนผิดปกติ ซึ่งทำให้เกิดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว อาทิเช่น idiopathic oxaluria, hereditary hypercalciuria, idiopathic hyperuricosuria เป็นต้น

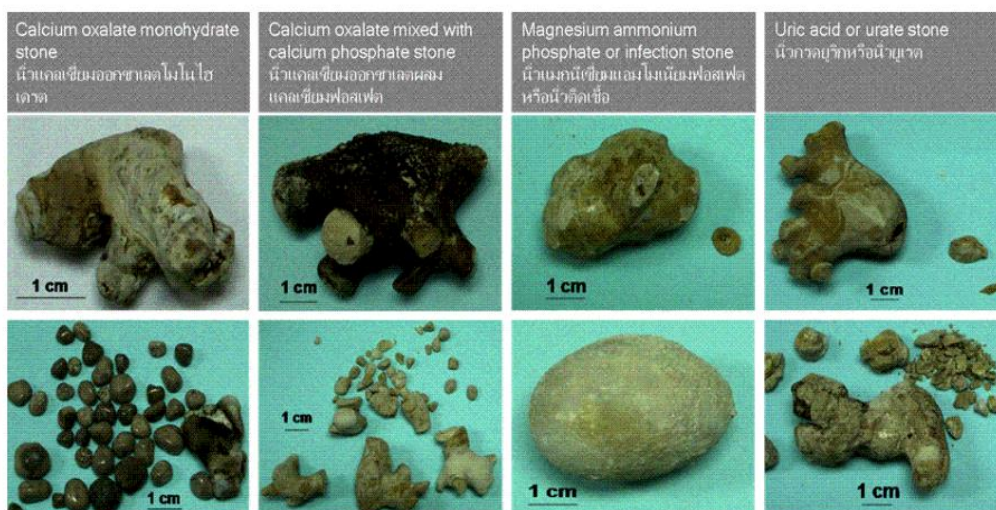
Intrinsic factors ที่สัมพันธ์กับถึงปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว ได้แก่ เพศ อายุ สิ่งแวดล้อม ฮอร์โมน ผลทางเมแทบอลิซึม และโรคที่เกี่ยวข้องได้แล้วก็ตาม ฮอร์โมน ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม และโรคที่เกี่ยวข้องอื่นๆ แต่ปัจจัยภายในทั้งหมดสามารถพบได้ในบุคคลทั่วไป และไม่สามารถทำนายการเกิดและการดำเนินโรคได้อย่างแม่นยำ

อายุและเพศเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดโรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ จากการศึกษาของ ศ. ปิยะรัตน์ และคณะในปี พ.ศ.2550 จากผู้ป่วยโรคนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะที่เข้าร่วมการวิจัยทั้งหมด พบว่าเป็นประชากรเด็กและเยาวชนน้อยมาก โดยมีจำนวนผู้ป่วยที่อายุไม่เกิน 20 ปีน้อยกว่า 1% และอายุไม่เกิน 30 ปี รวมแล้วไม่ถึง 5% ทั้งที่เด็กและเยาวชนเหล่านี้มีรูปแบบการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกัน และอยู่อาศัยในบริเวณพื้นที่เดียวกับผู้ป่วยที่สูงวัยกว่า แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าอายุมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยใดที่มีผลต่อการเกิดนิ่วในระบบทางเดินปัสสาวะ

2. ชนิดของนิ่วไต

ก้อนนิ่วมีองค์ประกอบ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นแร่ธาตุ (mineral composition) และส่วนที่เป็นสาร อินทรีย์ (organic matrix) ซึ่งมีประมาณ 5-10% (9) สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่พบในปัสสาวะ ได้แก่ กลุ่มโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น

นิ่วไตมีหลายชนิด จำแนกตามสารเคมีหรือแร่ธาตุที่ประกอบเป็นผลึกในก้อนนิ่ว สามารถแบ่งได้ เป็น 2 ประเภทใหญ่คือ นิ่วที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (calcium stones) ซึ่งเป็นนิ่วที่พบบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 80 ซึ่งอาจเป็นนิ่วแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate, CaOx) หรือ นิ่วแคลเซียม ฟอสเฟต (calcium phosphate, CaP) หรือนิ่วเนื้อผสมของแคลเซียมออกซาเลตกับฟอสเฟต หรือแคลเซียมออกซาเลตกับกรดยูริก ประเภทที่สองคือ นิ่วที่ไม่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ (non- calcium stones) ได้แก่ นิ่วกรดยูริก (uric acid stone) นิ่วจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือนิ่วสตรูไวท์ (infection stone หรือ struvite) และนิ่วซิสทีน (cystine stone) เป็นต้น (10) นิ่วที่พบบมากที่สุดทั่วโลกคือ นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต รองลงมาคือ นิ่วกรดยูริก (7)



ภาพที่ 1 ชนิดของนิ่วไต (<http://www.bmbmd.research.chula.ac.th/knrenal.htm>)

3. สารก่อนิ่ว

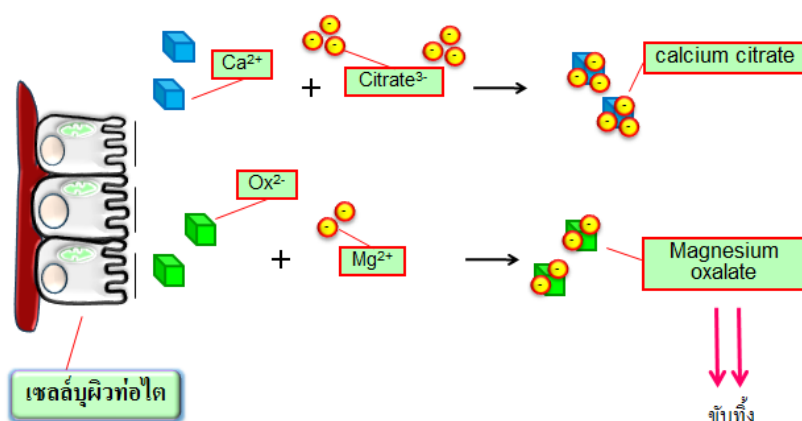
สารก่อนิ่วที่มีอยู่ในปัสสาวะตามปกติ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต ออกซาเลต ยูเรต ในภาวะที่สารเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงในปัสสาวะร่วมกับมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย สารเหล่านี้สามารถรวมตัวกันจนกลายเป็นก้อนผลึกแข็งที่ละลายน้ำได้ยากและเกาะกลุ่มรวมกันกลายเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนกลายเป็นนิ่วอุดตันที่บริเวณต่างๆของทางเดินปัสสาวะ (11) องค์ประกอบส่วนใหญ่ในก้อนนิ่วเป็นผลึกแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมออกซาเลต แคลเซียมฟอสเฟต ยูเรต แมกนีเซียม แอมโมเนียม ฟอสเฟต เป็นต้น นิ่วที่พบบมากที่สุดทั่วโลกคือ นิ่วแคลเซียมฟอสเฟต รองลงมาคือ นิ่วกรดยูริก

4. สารยับยั้งนิ่ว

สารยับยั้งนิ่วเป็นสารที่ป้องกันการก่อผลึกในปัสสาวะ อาจเป็นแร่ธาตุและสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ซิเทรต แมกนีเซียม โปแทสเซียม ไพรอเฟอสเฟต เป็นต้น หรือเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น GAGs โปรตีน เช่น Nephrocalcin และ Uropontin เป็นต้น บางการศึกษาพบว่าสารชนิดหนึ่ง ได้แก่ โกลโคโปรตีน ชนิด Tamm-Horsfall protein (THP) เป็นได้ทั้งสารยับยั้งนิ่วและสารส่งเสริมการเกิดนิ่วได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน (12)

กลไกการทำงานของสารยับยั้งการเกิดนิ่ว มีกลไกที่สำคัญ 2 กลไก คือ

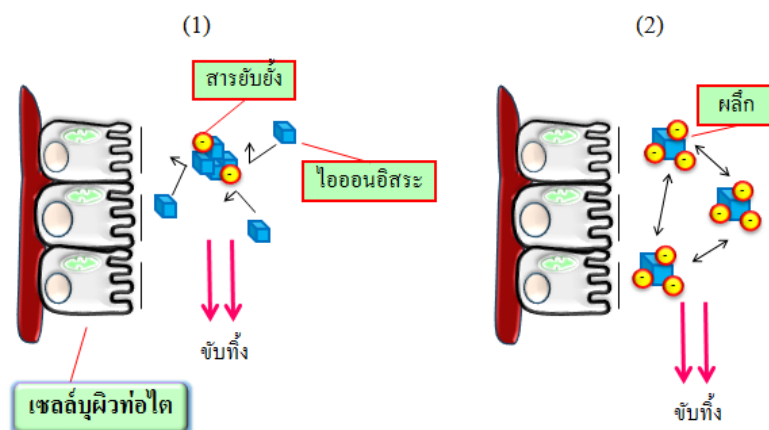
1) การลดระดับไอออนอิสระในปัสสาวะ โดยเฉพาะไอออนของสารก่อนิ่ว เช่นการลดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมและออกซาเลตในปัสสาวะ หลักการสำคัญของการทำงานของสารยับยั้งจะต้องเป็นสารที่มีประจุไฟฟ้าตรงข้ามกับไอออนที่จับ และเมื่อจับแล้วจะต้องได้สารประกอบที่สามารถละลายได้ดีและไม่มีประจุ และเช่น citrate²⁻ หรือ citrate³⁻ จะไปจับกับ Ca²⁺ ได้เป็นแคลเซียมซิเทรตที่ละลายได้ดีมาก หรือ Mg²⁺ ไปจับกับ Ox²⁻ ได้เป็นเกลือแมกนีเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ดี ทำให้ไอออนอิสระแคลเซียมและออกซาเลตลดลง จึงลดโอกาสการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำยาก



ภาพที่ 2 แสดงผลของ citrate จับกับ Calcium ได้เป็นแคลเซียมซิเทรต หรือ Magnesium จับกับ Oxalate ได้เป็นแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ดี

2) การดูดซับเข้าที่ผิวผลึก (adsorption) เมื่อเกิดผลึกขึ้น ผลึกนั้นจะทำหน้าที่เป็นแกนกลาง (nucleus) เพื่อให้ผลึกอื่นเข้ามาจับ สารยับยั้งนิ่วจะทำหน้าที่เข้าจับบริเวณดังกล่าวและเปลี่ยนให้ผิวผลึกมีประจุลบ ทำให้ไอออนประจุบวกไม่สามารถมาจับเพิ่มได้ หรือ ลดพื้นที่ผิวที่ผลึกอื่นจะมาจับ ทำให้ผลึกไม่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะเกิด retention และถูกขับออกมาในปัสสาวะ

ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ การศึกษาของ Lieske JC และคณะ (13) ซึ่งพบว่า ในภาวะที่มีความอิมตัวยิ่งยวดของแคลเซียมและออกซาเลต chondroitin sulfate จะทำหน้าที่ยับยั้งการโตของผลึกนิ่ว แต่ไม่ยับยั้งการเกิดผลึก



ภาพที่ 3 แสดงผลของสารยับยั้ง (1) โดยดูดซับเข้าที่ผิวผลึก ตรงตำแหน่งที่กำลังมีการโตของผลึก ทำให้ผลึกไม่สามารถโตขึ้นได้อีก เพราะไอออนอิสระไม่สามารถเข้าไปจับตรงตำแหน่งนั้นได้ (2) เข้าไปจับบนผิวผลึกแล้วทำให้ผลึกมีประจุไฟฟ้าเหมือนกันจึงผลึกกัน ทำให้รวมเป็นกลุ่มผลึกขนาดใหญ่ไม่ได้

5. Supersaturation

คือภาวะความอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะ ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อไอออนของสารอิเล็กโทรไลต์ในปัสสาวะเข้มข้นถึงจุดอิ่มตัว (saturation) แต่ตัวทำละลาย คือ น้ำ ยังคงลดลงจากการถูกดูดกลับเข้าสู่เซลล์บุผิวท่อไตอย่างต่อเนื่อง ทำให้ไอออนมีความสามารถในการจับกันเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน ในกรณีนี้หากมีสารก่อเนื้องานจำนวนมาก หรือสารยับยั้งเนื้องานไม่เพียงพอ จะทำให้เกิดการสร้างผลึกที่ไม่ละลายน้ำอย่างมาก และเป็นจุดกำเนิดก้อนนิ่วไตที่สำคัญ โดยภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดในปัสสาวะสามารถวิเคราะห์ได้จากการคำนวณตามหลักการของ Ogawa index และ Tiselius risk index (RI) (14)

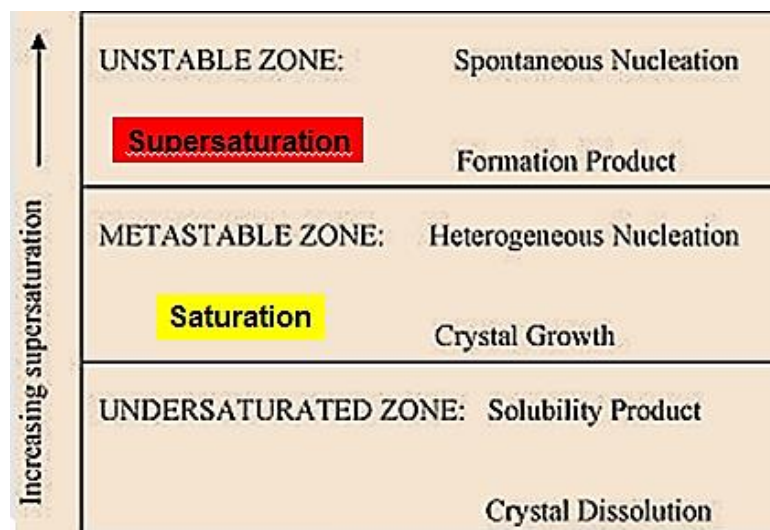
Ogawa index

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

Tiselius risk index (RI)

$$\text{RI} = (\text{Ca}/\text{Cr})^{0.71} (\text{Ox}/\text{Cr}) (\text{Mg}/\text{Cr})^{-0.24} (\text{Cit}/\text{Cr})^{-0.10}$$

*เมื่อความเข้มข้นของ Ca, Mg, Ox, Cit อยู่ในหน่วย mmol/L และ Cr ในหน่วย mol/L



ภาพที่ 4 การเกิดภาวะ supersaturation (<http://www.hdcn.com/symp/02asn/asp2/asp2.htm>)

6. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่ว ได้แก่

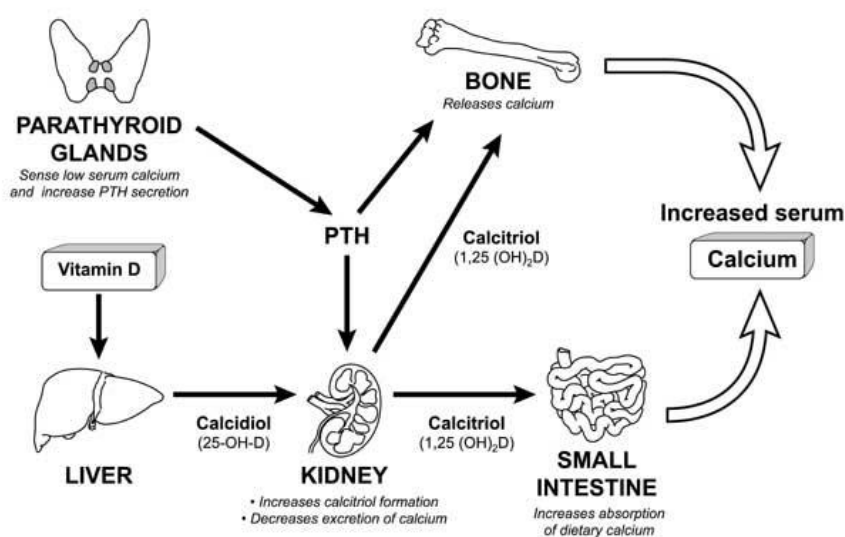
6.1 พันธุกรรม ผู้ป่วยที่มีพ่อแม่เป็นโรคนิ่วไตมีโอกาสที่จะเป็นโรคนิ่วไตได้เช่นกัน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รายงานว่าโรคนิ่วในไตมีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมและมีความเป็นไปได้ที่จะถ่ายทอดให้บุตรหลานได้เหมือนกับโรคกรรมพันธุ์อื่นๆ โดยมีการลงพื้นที่ภาคอีสานเพื่อทำวิจัยเกี่ยวกับโรคทางพันธุกรรม ร่วมกับกลุ่มวิจัยจากสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2547 จนถึงปัจจุบัน พบว่าโรคนิ่วในไตเป็นโรคอันดับต้นๆที่คร่าชีวิตชาวอีสานในอัตราสูงถึง 1,000 รายต่อปี ผลจากการเก็บตัวอย่างเลือดและซักประวัติผู้ป่วย 1,000 รายในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นและอุบลราชธานี ชี้ให้เห็นชัดเจนว่าโรคนิ่วในไตมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม หากคนในครอบครัวเป็นลูกหลานจะมีโอกาสเป็นโรคนิ่วได้มากกว่าครอบครัวที่ไม่มีประวัติโรคนิ่วมาก่อน ประมาณ 3.18 เท่า (15)

6.2 อายุและเพศ พบว่าในเพศชายมีโอกาสเป็นโรคนิ่วไตมากกว่าเพศหญิงประมาณ 2-3 เท่า และพบมากในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก (16) พบความเสี่ยงของการเกิดนิ่วในตลอดช่วงอายุของผู้ใหญ่ สำหรับอายุเฉลี่ยที่พบโรคนิ่วไตอยู่ในช่วง 30-60 ปี โดยอายุเฉลี่ยของเพศชายที่พบนิ่วมากที่สุดประมาณ 35 ปี และเพศหญิงมี 2 ช่วง คือที่อายุ 30 ปี และ 55 ปี พบอุบัติการณ์ของนิ่วในเด็กต่ำกว่าผู้ใหญ่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเด็กมีปริมาณสารยับยั้งการเกิดนิ่ว เช่น ซีเทรต แมกนีเซียม ในปัสสาวะสูงกว่าและมีการขับแคลเซียมในปัสสาวะต่ำกว่าในผู้ใหญ่ หรือส่วนหนึ่งเนื่องมาจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศหญิงที่เพิ่มการขับซีเทรตออกมาในปัสสาวะ (17) ส่วนฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเพศชายเพิ่มการสร้างออกซาเลตในตับทำให้ขับออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้พบเพศชายมีออกซาเลตในปัสสาวะสูงกว่าในเพศหญิง (18)

6.3 ภาวะไม่สมดุลของระหว่างสารก่อนินูวและสารยับยั้งนินูวในปัสสาวะ ทำให้เกิดภาวะผิดปกติทางเมแทบอลิซึม แบ่งเป็น 2 กรณีคือ

6.3.1 มีสารก่อนินูวในปัสสาวะมากเกินไป

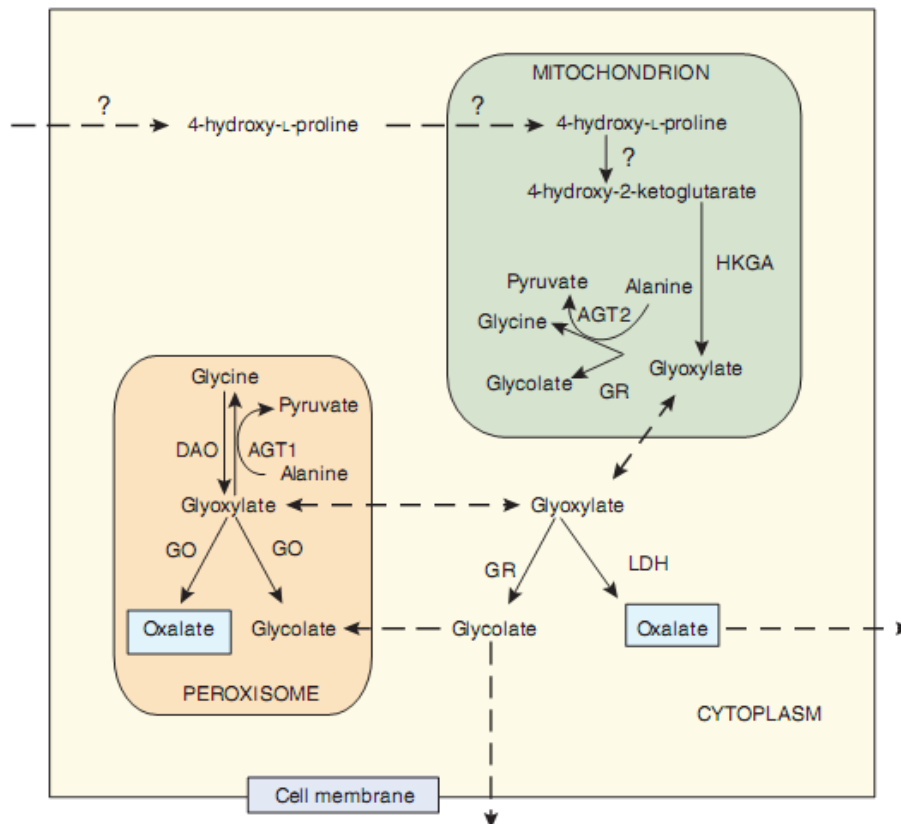
- ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (Hypercalciuria) จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่พบมากที่สุดในการผู้ป่วยขาดวิตามินดี กลไกพื้นฐานที่ทำให้เกิดภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง คือ การเพิ่มการสลายแคลเซียมจากกระดูก และความบกพร่องในการทำหน้าที่ของเซลล์หลอดฝอยไตในการดูดซึมเอาแคลเซียมกลับ โดยระดับแคลเซียมในเลือดถูกควบคุมให้คงที่ตลอดเวลาด้วยฮอร์โมนสามชนิด คือ วิตามินดี ฮอร์โมน Parathyroid จากต่อมพาราไทรอยด์และฮอร์โมนแคลซิโทนิน (calcitonin) จากต่อมไทรอยด์ จึงจะทำให้ร่างกายรักษาสสมดุลของแคลเซียมได้ ดังนั้นในกรณีที่มีความผิดปกติบางอย่างเกิดขึ้นกับระบบควบคุมเหล่านี้ อาจนำไปสู่การขับออกของแคลเซียมในปัสสาวะสูงได้ โดยปริมาณแคลเซียมขับทิ้งออกมาในปัสสาวะมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะอิมตั่วยั้งยวดของแคลเซียม ทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือแคลเซียมออกซาเลตและแคลเซียมฟอสเฟตเป็นผลึก และก้อนนินูวในที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะขาดสารยับยั้งการเกิดนินูว เช่น ซีเทรต และ GAGs จึงไม่สามารถขัดขวางการรวมตัวกับออกซาเลต ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งลดลง ส่งผลให้เกลือแคลเซียมตกตะกอนได้ง่ายและเกิดเป็นผลึกนินูวได้ (19)



ภาพที่ 5 กลไกการรักษาสมดุลของแคลเซียม (http://www.optimalhealthpartner.com/A_Archive/05_07NL.html)

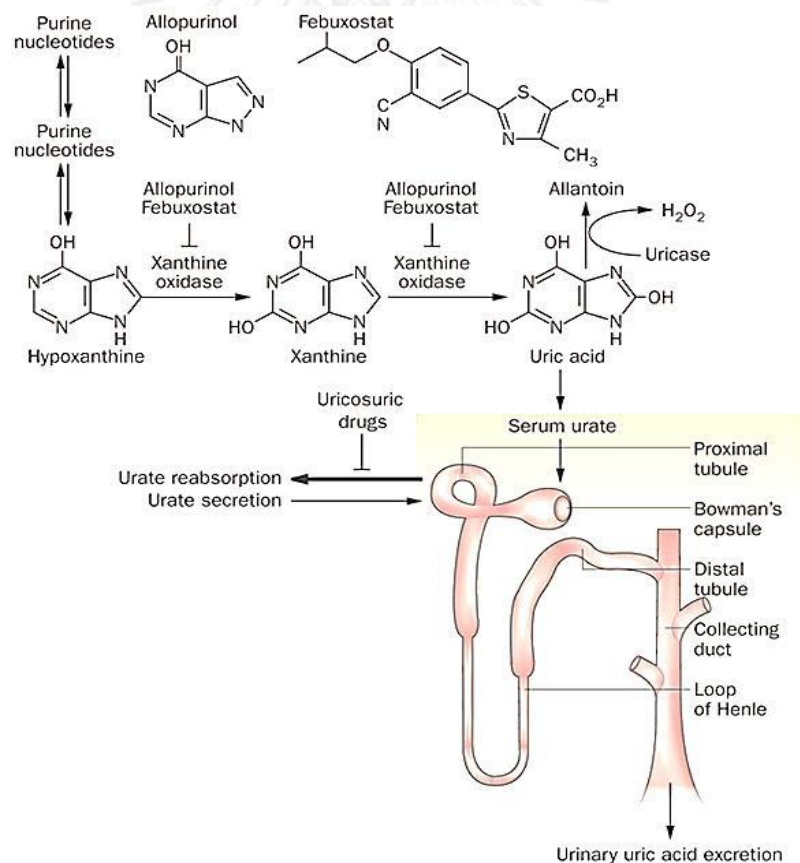
- ภาวะออกซาเลตสูงในปัสสาวะ (Hyperoxaluria) สารก่อนินูวที่มีความสำคัญหลักในก้อนนินูว เนื่องจากในคนไม่มีเอนไซม์ในการย่อยสลายออกซาเลต จึงต้องขับออกทางปัสสาวะ การมีออกซาเลตในปัสสาวะสูงเกิน 40 มิลลิกรัมต่อวัน (20) ส่วนใหญ่เกิดจากสองปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยภายใน (endogenous oxalate synthesis) เช่น ร่างกายมีการสังเคราะห์ออกซาเลตจากสารต้นกำเนิดต่างๆ ภายในร่างกายมากเกินไป ได้แก่ วิตามินซี เอทิลีนไกลคอล โซลิตอล คาร์โบไฮเดรตหรือ

โปรตีนสูง ซึ่งจะถูกออกซิไดส์หรือเปลี่ยนเป็นไกลคอลแอลดีไฮด์ ไกลคอลเลต หรือไกลออกซิเลต และปัจจัยภายนอก เช่น ขาดแบคทีเรียในกลุ่ม *Oxalobacter spp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในลำไส้ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายออกซาเลตในผัก เนื่องจากมีออกซาเลตในเลือดสูงหรือเกิดจากการได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน แบคทีเรียชนิดนี้จะตายทำให้ออกซาเลตถูกดูดซึมมากขึ้น หรือการบริโภคอาหารที่มีออกซาเลตสูง เช่น ผักโขม งาดำ ชา ช็อกโกแลต และผักที่นิยมบริโภคในชนบทภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ผักต้ว ผักชะพลู ผักหนาม เป็นประจำ แต่ขาดการบริโภคอาหารที่มี แคลเซียมสูงในมื้ออาหารเดียวกัน รวมทั้งความผิดปกติที่เกิดจากโรคบางอย่างที่ทำให้ลำไส้ดูดซึมออกซาเลตได้มากผิดปกติ เช่น การตัดลำไส้เล็กท่อนปลายออกเพียงบางส่วนหรือการตัดต่อลำไส้เล็กทำให้ดูดซึม ออกซาเลตได้มากขึ้น เพราะวาล์วร่างกายไม่สามารถดูดซึมไขมันได้เหมือนปกติ ทำให้กรดไขมันจับกับ แคลเซียมมาก ขาดแคลเซียมอิสระในการจับตัวกับออกซาเลตเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลตในอุจจาระ ส่งผลให้มีการดูดซึมออกซาเลตเพิ่มขึ้นและนำไปสู่ภาวะมีออกซาเลตสูงในปัสสาวะ นอกจากนี้ภาวะที่ร่างกายมีความผิดปกติทางพันธุกรรมก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการสังเคราะห์ออกซาเลตมาก การขาดเอนไซม์ Alanine-glyoxalate aminotransferase (AGT) ซึ่งเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive จะมีอัตราการขับทิ้งของออกซาเลตสูงมากในปัสสาวะ และอาจสะสมตามเนื้อเยื่อต่างๆ ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเกิดภาวะไตวาย ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังไม่มากนัก (21, 22)



ภาพที่ 6 สร้างออกซาเลตในร่างกาย (Coulter-Mackie MB., Kidney International, 2006)

- ภาวะกรดยูริกสูงในปัสสาวะ (Hyperuricosuria) กรดยูริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการสลายสารประเภทพิวรีนที่ร่างกายต้องกำจัดออกทางไต โดยกรดยูริกเป็นสารที่ละลายน้ำยาก การละลายขึ้นอยู่กับค่า pH โดยจะตกตะกอนเมื่อปัสสาวะมีความเป็นกรด ($\text{pH} < 5.5$) การที่ปัสสาวะมีระดับของกรดยูริกมากกว่า 700-800 มิลลิกรัมต่อวันในเพศชาย และ 600-750 มิลลิกรัมต่อวันในเพศหญิงตามลำดับ (23) ซึ่งมีสาเหตุจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในการสังเคราะห์กรดยูริก ซึ่งมักเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับเอนไซม์ของขั้นตอนสำคัญๆ ในวิถีเมแทบอลิซึมของพิวรีนและกรดยูริก เช่น ภาวะพร่องเอนไซม์ Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HGPRT) ที่ใช้ในขั้นตอนการรวมตัวกันระหว่างเบสกวานีน (G) และไฮโปแซนทีน กับ phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) ในวิถีก็์คีน ส่งผลให้การทำงานของกระบวนการผลิตกรดยูริกมีความบกพร่อง ทำให้มีการผลิตกรดยูริกมากขึ้นหรือมีการกำจัดกรดยูริกได้น้อยลง หรือเกิดภาวะยูริกสูงในปัสสาวะเนื่องจากการเป็นโรคอื่นหรือได้รับสารที่เป็นต้นกำเนิดการสังเคราะห์ยูริกจากอาหารมากเกินไป รวมทั้งการมีความผิดปกติของการทำงานของไต



ภาพที่ 7 กลไกการกำจัดกรดยูริกทางปัสสาวะ (Robert T., Nature Reviews Rheumatology, 2010)

6.3.2 มีสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะน้อยเกินไป

- ภาวะซีเทรตต่ำในปัสสาวะ (Hypocitraturia) ซีเทรตมีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิดนิ่วมาก เนื่องจากเป็นสารยับยั้งการเกิดผลึกและการเกิดก้อนนิ่ว ทำหน้าที่ลดระดับขี้ผึ้งตัวของไอออนแคลเซียม โดยการรวมตัวกันเป็นเกลือแคลเซียมซีเทรตที่การละลายน้ำได้ดี ผู้ที่มีซีเทรตต่ำในปัสสาวะ ทำให้แคลเซียมรวมกับออกซาเลตเป็นแคลเซียมออกซาเลต หรือรวมกับฟอสเฟตเป็นแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งละลายน้ำได้ยาก จึงมีความเสี่ยงที่จะเกิดนิ่วได้ง่าย ภาวะปัสสาวะมีซีเทรตต่ำ ได้แก่ การขับซีเทรตน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อวัน จากการศึกษาของ ศ. ปิยะรัตน์และคณะพบว่า ภาวะซีเทรตในปัสสาวะต่ำเป็นภาวะที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยโรคนิ่วคนไทย ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ประมาณ 90 % ของผู้ป่วยทั้งหมด (2)

ปัจจัยหลายประการที่ทำให้ซีเทรตต่ำในปัสสาวะ ได้แก่ การรับประทานซีเทรตไม่เพียงพอ ภาวะร่างกายมีกรดเพิ่ม ภาวะอดอาหารและพร่องโพแทสเซียม กลุ่มอาการท้องร่วงเรื้อรัง การได้รับยาขับปัสสาวะบางชนิด มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carbonic anhydrase เป็นต้น ส่วนปัจจัยที่เพิ่มซีเทรตได้ในปัสสาวะ คือภาวะมีด่างเพิ่ม วิตามินดี เพิ่มขึ้น รวมทั้งการได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมของซีเทรตในไมโทคอนเดรีย เช่น fluorocitrate และ hydroxycitrate เป็นต้น

- ภาวะแมกนีเซียมต่ำในปัสสาวะ (Hypomagnesiuria) และภาวะโพแทสเซียมต่ำในปัสสาวะ (Hypokaliuria) แมกนีเซียมและโพแทสเซียมเป็นสารยับยั้งนิ่วที่สำคัญ มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกสามารถจับกับประจุลบของออกซาเลต ได้เป็นเกลือแมกนีเซียมออกซาเลต หรือเกลือโพแทสเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำได้ดี ถ้ามีปริมาณแมกนีเซียมหรือโพแทสเซียมในปัสสาวะน้อย ไม่สามารถจับกับออกซาเลตได้ ประจุบวกของแคลเซียมสามารถจับกับประจุลบของออกซาเลตได้มากขึ้น จึงช่วยเพิ่มโอกาสการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่ละลายน้ำยาก

6.4 ปัสสาวะมีความเข้มข้นสูง เกิดเนื่องจากมีสารต่างๆถูกขับออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติ หรือเกิดจากผู้ป่วยดื่มน้ำน้อยหรือสูญเสียน้ำออกจากร่างกายทางด้านอื่นมากกว่าปกติ โอกาสที่สารละลายในปัสสาวะจะตกผลึกจึงมีมากขึ้น และอาจเกี่ยวข้องกับเกลือแร่ที่ละลายอยู่ในน้ำที่ใช้ดื่ม การออกกำลังกายอย่างหนักหรือการทำงานกลางแจ้ง ทำให้มีการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ไปกับเหงื่อ ทำให้เกิดเป็นนิ่วขึ้นได้

6.5 ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ จากการศึกษาของ W.G. Robertson, UK มีหลักฐานยืนยันชัดเจนว่าคนปกติและผู้ป่วยโรคนิ่วมีความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปความเป็นกรดต่างในปัสสาวะ มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างวัน จึงมีโอกาสเกิดผลึกได้ทั้งผลึกกรดยูริก และผลึกแคลเซียม แต่ผลึกเหล่านี้จะละลายเมื่อ pH เปลี่ยนไปหลังจากนั้นจึงมี การขับออกมากับปัสสาวะ ซึ่งความเป็นกรด-ด่างไม่สูงพอที่จะละลายผลึกได้ จึงเกิดผลึกสะสมมากขึ้นและรวมตัวกันทำลายเซลล์บุท่อทางเดินปัสสาวะ เกิดการเกาะติดและคั่งค้างในท่อทางเดินปัสสาวะ ที่ pH < 5.5 ปัสสาวะที่มีฤทธิ์เป็นกรด อาจเกิดตะกอนของกรดยูริก และที่ pH > 7 ปัสสาวะที่มีฤทธิ์เป็นด่าง อาจเกิดการตกตะกอนของผลึกออกซาเลต ฟอสเฟตและคาร์บอเนต ซึ่งคนปกติในช่วง 06.00 น. ปัสสาวะจะมีความเป็นกรดที่ pH 5.2 ในช่วง 18.00 น. จะมีความเป็นกลาง pH 7.0 จึงมีโอกาสเกิดผลึกได้ทั้งผลึกกรดยูริกและผลึกแคลเซียม

6.6 การรับประทานยาบางชนิดมีผลต่อการขับสารก่อนิ่วออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น ผู้ที่ได้รับยาเม็ดแคลเซียม และบริโภคนอนนอน หรือได้รับร่วมกับวิตามินดี ซึ่งจะส่งเสริมการดูดซึมแคลเซียมทางลำไส้ ทำให้ขับแคลเซียมออกมาทางปัสสาวะมากขึ้น ยาขับปัสสาวะ ยาระบาย หรือ ยาลดกรดที่กินอยู่เป็นเวลานานๆ ทำให้เกิดนิ่วด้วยกลไกผ่านทางเมแทบอลิก ส่วนยากลุ่ม Magnesium trisilicate , Ciprofloxacin , Sulfa medications , Triamterene , Indinavir และ Ephedrine ทำให้เกิดนิ่วผ่านกลไก Drug crystallize and urinary supersaturation หรือยา Probenecid, Salicylates, และ Ablative chemotherapies ก็สามารทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในปัสสาวะสูง และเกิดนิ่วแบบกรดยูริก ได้เช่นเดียวกัน (24, 25)

6.7 Metabolic syndrome จากการศึกษาของ R. Siener, DE พบว่าค่าความอ้วนตัวยิ่งยวดของแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะแปรผันตรงกับค่า body mass index (BMI) ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ แปรผันกับค่า BMI และจากการศึกษาของ B. Hess, CH และอีกหลายงานวิจัยรายงานว่า ภาวะ metabolic syndrome และ obesity มีความสัมพันธ์กับโรคนี้ และยังพบว่าผู้ป่วยโรคนี้กรดยูริกมักมีโรคเบาหวานร่วมด้วย กลไกเชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับภาวะ insulin resistance โดยภาวะอ้วนและการดื้ออินซูลินส่งผลทำให้ปัสสาวะมีความเป็นกรดมากขึ้น และเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วกรดยูริก (26)

6.8 ภูมิประเทศและภูมิอากาศ ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ในทางเดินปัสสาวะมักอยู่ในบริเวณที่ราบสูงประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และในฤดูร้อนจะพบผู้ป่วยเป็นโรคนี้ในทางเดินปัสสาวะมาก อาจเนื่องจากเสียเหงื่อมากทำให้ปัสสาวะเข้มข้นขึ้น ทำให้นิ่วโตเร็วจึงเกิดอาการขึ้น แต่ในฤดูหนาวเสียเหงื่อน้อยปัสสาวะเจือจางและปัสสาวะมีปริมาณมาก

6.9 วิธีการดำเนินชีวิต โดยเฉพาะการบริโภคอาหารและการดื่มน้ำมีผลให้มีการเพิ่มหรือลดของสารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของก้อนนิ่ว (27) งานวิจัยรายงานว่า การดื่มน้ำอัดลมเป็นสาเหตุให้ระดับซีเทรตและแมกนีเซียมในปัสสาวะต่ำ และยังทำให้ปัสสาวะมีความเป็นกรดสูงมากขึ้น การบริโภคผักผลไม้จะทำให้ปริมาณปัสสาวะ ความเป็นด่างและซีเทรตในปัสสาวะสูงขึ้น ขณะที่ระดับแคลเซียมในปัสสาวะลดลง (28) ผู้มีอาชีพเกษตรกร ทำงานกลางแจ้งจะมีการเสียเหงื่อมาก ร่วมกับการดื่มน้ำในปริมาณน้อย ทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้น อาจทำให้มีการตกผลึกของสารละลายในปัสสาวะ เกิดเป็นนิ่วขึ้นได้ หรือผู้ที่มีการได้น้อยจะบริโภคอาหารจำพวกแป้งและผักมาก โปรตีนน้อย ทำให้เกิดนิ่วจำพวกออกซาเลตได้ง่าย ผิดกันกับผู้ที่มีการได้น้ำสูงมีการบริโภคอาหาร โปรตีน ไขมันมากกว่าปกติ ทำให้เกิดเป็นนิ่วพวกกรดยูริกและนิ่วแคลเซียมสูง (29)

ตารางที่ 1 ตารางสรุปปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไต

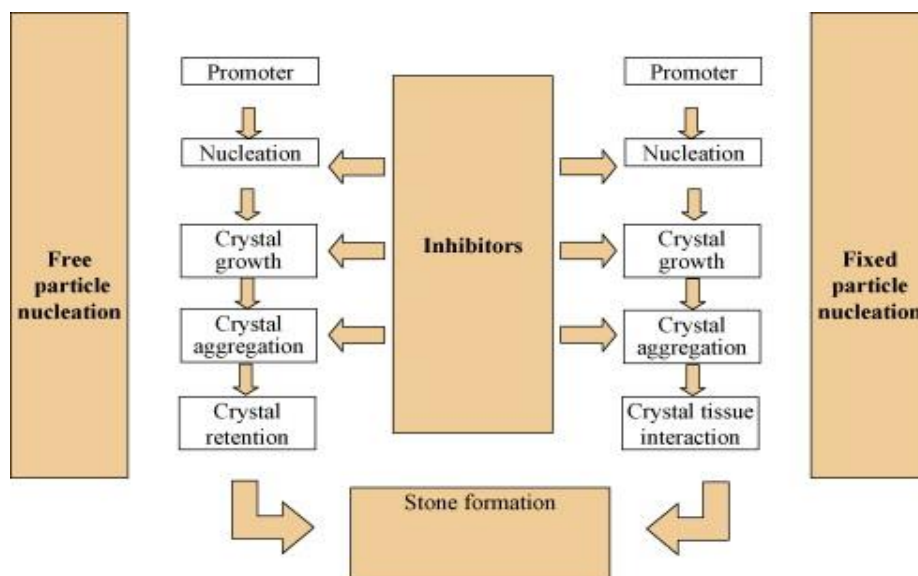
สรุปปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคนิ่วไต
1. ระดับ supersaturation และปริมาณปัสสาวะ
2. ภาวะไม่สมดุลของระหว่างสารก่อนิ่วและสารยับยั้งนิ่วในปัสสาวะ
3. ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ
4. ปัจจัยภายใน อาทิเช่น พันธุกรรม อายุ เพศ
5. การรับประทานยาบางชนิด
6. Metabolic syndrome
7. ภูมิประเทศและภูมิอากาศ
8. วิธีการดำเนินชีวิต

7. กระบวนการเกิดนิ่วไต

กลไกการเกิดนิ่วเกิดจากการที่ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วอยู่ในภาวะความอิ่มตัวยิ่งยวดเป็นเวลานาน (chronic persistent supersaturation) เมื่อเกิดภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดของสารก่อนิ่ว (stone promoters/ lithogenic substances) ได้แก่ แคลเซียม (Ca) ออกซาเลต (Ox) ฟอสเฟต (P) และกรดยูริก ทำให้เกิดผลึกในปัสสาวะ ถ้าก้อนนิ่วที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก จะสามารถหลุดลอดผ่านท่อไตออกนอกร่างกายได้ แต่ถ้าก้อนนิ่วนั้นมีขนาดใหญ่มากจะไปจะเกิดการติดค้างของผลึกในท่อไต หรือ ไม่สามารถผ่านออกมาได้ จึงทำให้เกิดอาการของโรคนิ่วขึ้น (30) แต่เนื่องจากในปัสสาวะมีสารอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ การเกิดผลึกจึงต้องขึ้นอยู่กับสารที่สามารถจับหรือมีปฏิสัมพันธ์กับสารก่อนิ่วเหล่านี้ได้ด้วยเช่นกัน ผลึกบางส่วนสามารถขับออกไปพร้อมกับปัสสาวะได้ ขณะที่ส่วนหนึ่งถูกนำเข้าสู่เซลล์บุท่อไต (internalization/ endocytosis) แล้วกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อไตสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่ง reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย

7.1 กลไกการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลต

การตกตะกอนเป็นผลึกจะเริ่มจากมีแคลเซียมไอออนและออกซาเลตไอออนมารวมตัวกันทำให้ผลึกมารวมตัวกัน (crystallization) จากนั้นผลึกจะมีเกาะรวมกัน (crystal growth/aggregation) จนมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นก้อนนิ่วที่มีขนาดใหญ่พอและติดค้างในเซลล์ท่อไต (crystal retention) จากนั้นจะเกิดกระบวนการเก็บกินผลึกเข้าสู่เซลล์ (endocytosis) โดยผลึกจะเคลื่อนไปอยู่ที่ tubular basement membrane (TBM) เมื่อมีการสะสมของผลึกนิ่วเป็นเวลานาน จะกลายเป็นก้อนนิ่วในเนื้อไตได้ในที่สุด และก้อนผลึกที่ติดค้างในเซลล์ท่อไตจะทำให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อไตโดนทำลายมากขึ้น กระตุ้นให้เกิดอักเสบในไต ซึ่งหากเกิดวงจรมันซ้ำๆ โดยไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิด fibrosis และไตสูญเสียการทำงาน (renal dysfunction) ในที่สุด (31)

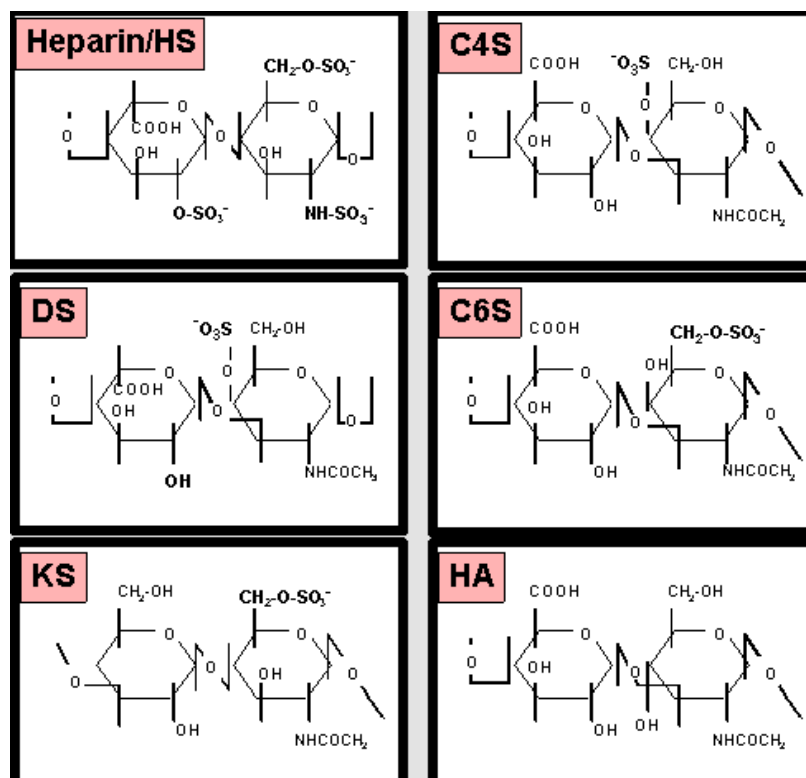


ภาพที่ 8 กระบวนการเกิดนิ่วไต (Basavaraj DR et al., EAU-EBU Update Series, 2007)

8. Glycosaminoglycans หรือ GAGs

GAGs เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ประเภทคาร์โบไฮเดรต มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2×10^3 ถึง 3×10^6 ดาลตัน สร้างจากเซลล์ที่บุตามท่อหลอดฝอยไตหรือท่ออื่นๆของไตและทางเดินปัสสาวะ GAGs มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับพันธะไกลโคซิดิก และชนิดของ hexosamine hexose หรือกรด hexuronic ที่เป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิดใหญ่ๆตามชนิดของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Hyaluronic acid (HA), Chondroitin sulfate (CS), Keratan sulfate (KS), Heparan sulfate (HS) และ Dermatan sulfate (DS) ซึ่ง DS พบน้อยมากที่เนื้อเยื่อไต

GAGs ถูกสร้างขึ้นวันละ 250 มิลลิกรัม ร้อยละ 10 จะถูกขับออกมาในปัสสาวะ (33) เกิดจากสมบัติทางเคมีของ GAGs ที่มีประจุลบเป็นจำนวนมากจึง สามารถดูดซับเอาผลึกขนาดเล็กๆ หรือตัวมันเองถูกดูดซับติดเข้าไปกับผิวด้านนอก ของผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแล้วมีผลยับยั้งไม่ให้ผลึกเล็กๆ นั้นโตขึ้นหรือมารวมกันเป็นกลุ่มผลึกขนาดใหญ่จนกลายเป็นก้อนนิ่วในที่สุด



ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Heparan sulfate (HS), Dermatan sulfate (DS), Keratan sulfate (KS), Chondroitin-4-sulfate (C4S), Chondroitin-6-sulfate (C6S) และ Hyaluronic acid (HA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>)

โครงสร้างทางเคมีเกิดจากน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด โดยโมโนแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งจะต้องเป็นน้ำตาลที่มีหมู่เอมิโน (amino group: $-NH_2$) เสมอ ส่วนอีกชนิดเป็นกรดอน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group : $-COOH$, ยกเว้น keratan sulfate) นอกจากนี้ GAGs ทุกชนิด ยกเว้น HA จะมีหมู่ซัลเฟต (sulfate group : SO_4^{2-}) อยู่ในโครงสร้าง ต่อสลับกันเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวแบบไม่แตกแขนง

GAGs ที่ขั้วออกมาในปัสสาวะ ส่วนใหญ่ได้จากการสลายโปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) ขนาดใหญ่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ จากการวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของ GAGs ในปัสสาวะ พบว่าในผู้ใหญ่ปกติพบ CS มากที่สุด ประมาณร้อยละ 60 รองลงมา ได้แก่ HS ประมาณร้อยละ 15-20 KS ร้อยละ 15 และ HA ร้อยละ 4-10 (34) อีกทั้ง GAGs ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบอยู่ด้านนอกของเซลล์ทุกชนิดอีกด้วยโดยเฉพาะ GAGs ที่อยู่ตามผิวด้านนอกของเซลล์บุภายในของท่อกลางต่างๆ นั้น มีสมบัติป้องกันไม่ให้สิ่งต่างๆ มายึดเกาะ เช่น กรณีสลัดฟอยไตหรือท่อทางเดินปัสสาวะจะป้องกันแบคทีเรีย หรือผลึกนิ่วเล็กๆไม่ให้มาเกาะ ทำให้ไม่ติดเชื้อ หรือเกิดนิ่วได้ง่าย

หลายการศึกษาพบว่า GAGs มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารยับยั้งการเกิดนิ่วโดยเฉพาะในขั้นตอนที่สำคัญ คือ การรวมกลุ่มกันของผลึก (crystal aggregation or crystal growth) และการ

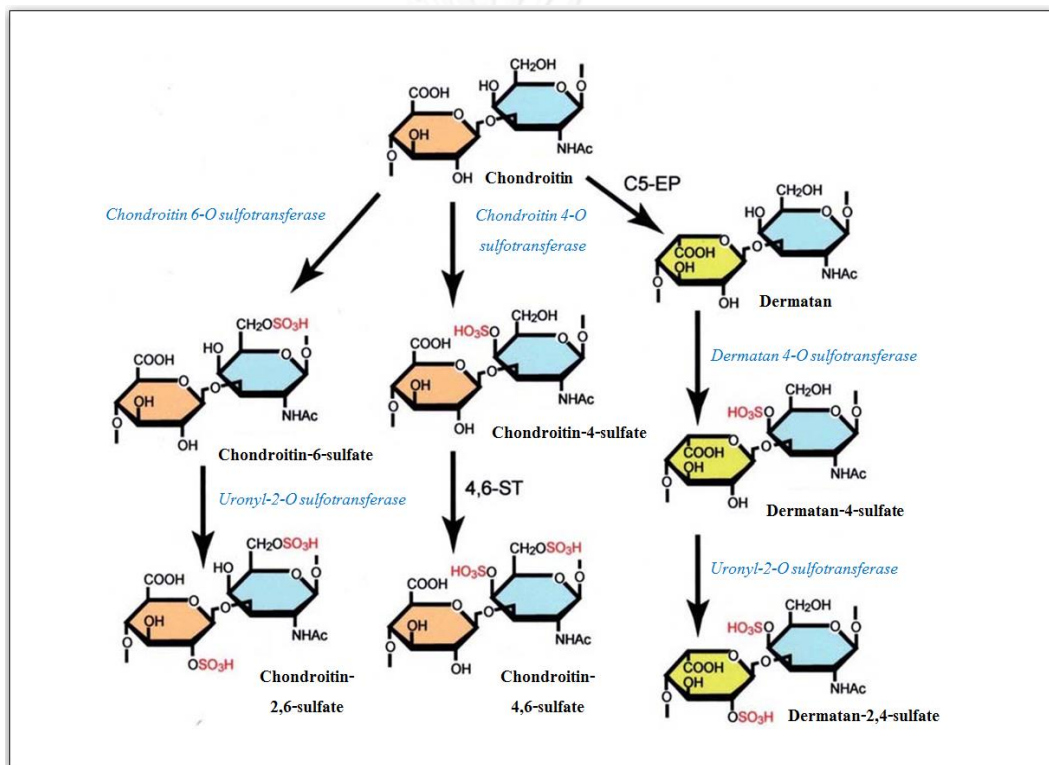
ยึดติดของผลึกกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ท่อไต (stone retention) ซึ่ง GAGs ที่ถูกขับออกมาในปัสสาวะจะมีปริมาณสูงสุดในเด็กแล้วลดลงตามช่วงอายุที่เพิ่มขึ้น (35) และมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า GAGs ชนิด HA และ CS สามารถยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेटได้ดี (36)

Suzuki และคณะได้ศึกษา GAGs ในปัสสาวะ พบว่าเมื่อชักนำให้เกิดแคลเซียมออกซาลेट จะมีเพียง GAGs บางชนิดเท่านั้นที่รวมเข้าไปในโครงสร้างของผลึกได้ (37) และการศึกษาผลของการยับยั้งการเกิดผลึกแคลเซียมออกซาลेटจากสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ในปัสสาวะ โดย Rodgers และคณะแสดงให้เห็นว่า CS มีผลต่อการยับยั้งการเกิดนิ่วมากกว่าสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่อื่นๆ ที่มีอยู่ในปัสสาวะ (38) การทดลองทั้งสองนี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดของ GAGs มีความสำคัญในการยับยั้งการก่อผลึก และในคนที่เป็นนีวจะมี GAGs ในเนื้อเยื่อของเซลล์หลอดไตหรือเนื้อไต (tubular basement membrane และ globular basement membrane) มีปริมาณลดลง เพราะเอนไซม์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวจะไปย่อยสลาย GAGs ที่ต่ออยู่กับโปรตีนโกลแคน ส่งผลให้โครงสร้างและประจุของโปรตีนโกลแคนเสียไป หรือสัดส่วนของ GAGs ชนิดต่างๆเปลี่ยนแปลงไป (32) ทำให้สมบัติในการป้องกันการยึดเกาะเสียไป ผลึกนิ่วขนาดเล็กที่เกิดขึ้นใหม่สามารถเข้ามายึดเกาะติดได้ง่าย เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะทำให้ผลึกขนาดเล็กนี้สามารถโตขึ้นกลายเป็นก้อนนิ่วได้

8.1. Hyaluronic acid (HA) ประกอบด้วย Glucuronic acid ต่อสลับกับ N-acetyl glucosamine เป็นสายยาว พบมากใน interstitium ของ renal medulla และยังพบในก้อนนิ่วและในผลึก CaOx จึงมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดโรคนิ่วไต เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีประจุลบมากจึงสามารถจับกับประจุบวกของสารก่อนิ่ว เกิดการเกาะติดของผลึก (crystal retention) ที่เซลล์ท่อไต ส่งผลให้เกิดก้อนนิ่วในไตได้ ในทางกลับกันถ้ามี HA มากจะสามารถยับยั้งการเกิดผลึกได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปัสสาวะ คือ ถ้าเกิดภาวะ diuresis HA มีปริมาณสูง สามารถขัดขวางการดูดซึ่มกลับของน้ำได้ แต่เมื่อเกิดภาวะ anti-diuresis HA มีปริมาณต่ำจึงมีการดูดซึ่มกลับของน้ำสูงทำให้เกิด supersaturation เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของเกลือแคลเซียม (39) นอกจากนี้ Charles-Antoine Lamontagne และคณะ ปี 2011 (40) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ Hyaluronic acid (HA) ต่อการจับกับผลึกแคลเซียมออกซาลेट พบว่า HA จะมีอยู่บริเวณเซลล์บุผิวท่อไต และสามารถเข้าจับกับบริเวณผิวของผลึกแคลเซียมออกซาลेट (COM crystals) และจะถูกดูดซับกับผิวของผลึกเมื่ออยู่ในสภาวะที่ pH ต่ำ เพิ่มการติดค้างของผลึกในเซลล์ท่อไต (crystal retention) ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว (stone formation)

8.2 Chondroitin sulfate (CS) มีโครงสร้างประกอบด้วย Glucuronic acid ต่อสลับกับ N-acetyl glucosamine มีหมู่ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้าง ถูกสร้างพบมากที่สุดในปัสสาวะประมาณ 60% ของ GAGs ทั้งหมด แต่ไม่พบในก้อนนิ่ว ถูกกรองที่โกลเมอรูลัส มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดนิ่วไต ช่วยลดการเกิด supersaturation ของแคลเซียม ลดระดับออกซาลेटซึ่งเป็นสารก่อนิ่วในปัสสาวะ โดยยับยั้งการโตและการรวมกลุ่มของผลึก CaOx (41)

8.3 Dermatan sulfate (DS) ประกอบด้วยกรด Iduronic ต่อกับ N-Acetyl galactosamine มีหมู่ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้าง โดยกลไกการสร้าง DS เริ่มต้นจากสารตั้งต้น chondroitin ซึ่งเป็นตัวเดียวกันกับ CS แต่แตกต่างกันตรงตำแหน่งที่ถูกเติมหมู่ซัลเฟต จึงทำให้ DS และ CS มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน พบ DS ในปัสสาวะค่อนข้างน้อย ประมาณ 1% ถึง 2% และบางการศึกษาพบว่า DS ถูกสร้างจากไตหรือระบบทางเดินปัสสาวะ (42) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดผลึกและการรวมกลุ่มของผลึกที่ก่อให้เกิดนิ่วได้



ภาพที่ 10 การสังเคราะห์ chondroitin sulfate (CS) และ dermatan sulfate (DS) ที่เริ่มจากสารตั้งต้น chondroitin โดย CS ถูกเติมหมู่ sulfate ที่ตำแหน่ง 6 ของ N-Acetyl galactosamine (NHAc) ด้วยเอนไซม์ chondroitinase 6-O sulfotransferase และ ตำแหน่งที่ 4 ด้วยเอนไซม์ chondroitinase 4-O sulfotransferase ส่วน DS จะถูกเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำตาล uronic ให้เป็นแบบ cis ด้วยเอนไซม์ chondroitin-glucuronate C5 epimerase (C5-EP) ก่อนแล้วจึงเติมหมู่ซัลเฟตที่ตำแหน่งที่ 4 ด้วยเอนไซม์ Dermatan 4-O sulfo transferase (Adapted from Nibuaki M. *et al*, Frontier in Bioscience 2010; 15, 626-644)

8.4 Heparan sulfate (HS) ประกอบด้วย Glucuronic acid ต่อกับ Glucosamine และมีหมู่ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้าง เป็นองค์ประกอบสำคัญของ glomerular basement membrane ส่วนใหญ่ HS พบมากในก้อนนิ่ว และมีรายงานว่า HS แสดงออกเพิ่มขึ้นระหว่างการเกิด CaOx ในหนูที่เป็นโรคนิ่วไต แม้ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนแต่ถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการเกิดผลึกของ CaOx (43) และพบว่า HS ที่เยื่อหุ้มผิวโกลเมอรูลัสและผนังท่อไตลดลงในผู้ป่วยนิ่วแคลเซียมเมื่อเทียบกับคนปกติ เนื่องจากสูญเสียความต่างศักย์ของประจุจึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสะสมของสารก่อนิ่วและทำให้เกิดการยึดเกาะของผลึกที่กระเพาะปัสสาวะ (44)

8.5 Keratan sulfate (KS) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลกโทส และ N- acetyl galactosamine มีหมู่ซัลเฟตอยู่ในโครงสร้าง พบ KS ในปัสสาวะค่อนข้างน้อย ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดผลึกและการรวมกลุ่มของผลึกที่ก่อให้เกิดนิ่วได้ดีเช่นเดียวกับ CS และ HS

การศึกษาของทีมวิจัย นำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ พบว่าระดับของ sulfated GAGs (GAGs ทุกชนิดยกเว้น hyaluronic acid) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับต่ำกว่าคนปกติมาก นอกจากนี้ ทายาทของผู้ป่วยก็มีระดับ sulfated GAGs ต่ำกว่าคนปกติเช่นกัน (ตารางที่ 2) จึงเป็นที่มาของคำถามการวิจัยว่า GAGs ชนิดใดบ้างที่พบต่ำลงในสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต และมีความสำคัญต่อการเกิดนิ่วอย่างไร

ตารางที่ 2 แสดงระดับสารก่อนิ่วและสารยับยั้งการเกิดนิ่วในปัสสาวะของครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต และครอบครัวคนปกติ นำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ (ยังไม่ได้เผยแพร่ผลงานวิจัย)

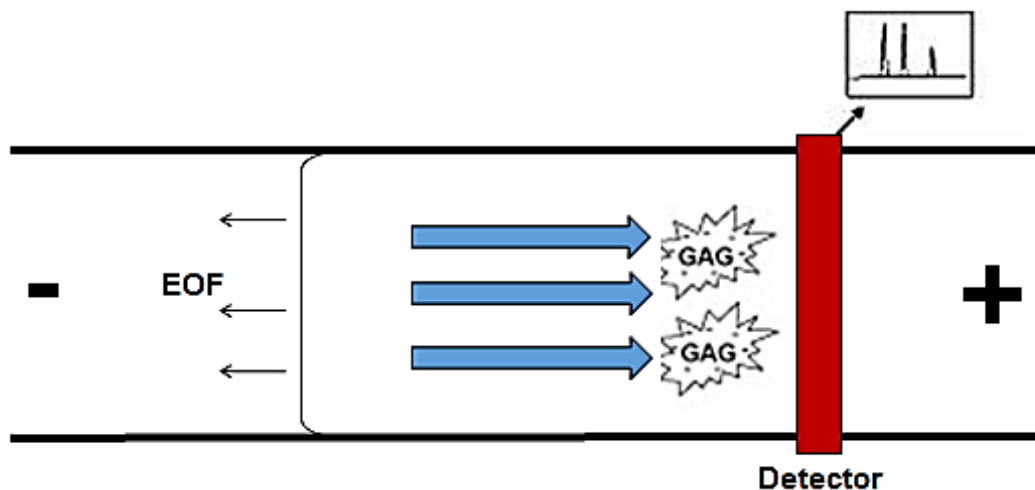
Characteristics	Urolithiasis family		Control family	
	Patients	Descendants	Healthy volunteers	Descendants
No. of participants	28	46	40	34
Age(years old)	46.11±1.85	19.17±1.15	44.70±1.48	19.85±1.27
Gender(%Male)	64.29%	45.65%	50.00%	47.06%
BMI (kg/m ²)	24.12±0.68	N/A	24.71±0.58	N/A
Urinary components				
Urine pH	6.60±0.17	6.79±0.13	6.05±0.13*	6.39±0.15
Protein (mg/day)	436.56±117.88	65.97±6.93 [§]	34.52±5.91*	25.87±3.52 [#]
Calcium(mg/day)	119.87±17.37	59.15±6.24 [§]	96.39±13.01	45.38±5.39 [§]
Oxalate(mg/day)	46.13±5.49	14.70±2.53 [§]	12.59±1.84*	22.02±9.87
Citrate(mg/day)	74.35±14.69	112.08±11.19 [§]	178.68±25.36*	194.17±26.99 [#]
Magnesium(mg/day)	52.96±8.71	53.44±4.93	62.16±4.46	56.65±4.20
Potassium(mg/day)	987.87±84.93	771.05±50.33 [§]	1102.13±61.49	973.45±77.17 [#]
Sodium(mg/day)	2363.31±256.77	2135.78±169.10	2239.88±170.90	1982.58±140.11
sGAGs(mg/day)	6.27±1.11	24.35±1.53 [§]	46.17±6.33*	43.77±3.96 [#]

Variables were showed in mean ±SEM, N/A is for not available, Significant differences are as follows: * $p<0.05$ comparing between KSD patients and Healthy volunteers, [#] $p<0.05$ comparing between KSD descendants and Healthy descendants, [§] $p<0.05$ comparing between KSD patients and KSD Descendants, [§] $p<0.05$ comparing between Healthy volunteers and Healthy descendants.

9. เทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) สำหรับการวิเคราะห์ GAGs

Capillary Electrophoresis คือเทคนิคแยกสารด้วยหลักการเคลื่อนที่ของสารในหลอดคัพพิลลารี ที่บรรจุด้วยสารละลาย อิเล็กโทรไลต์ภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้สารละลายที่เป็นน้ำเป็นองค์ประกอบ โดยไอออนบวกวิ่งไปทางขั้วลบ ส่วนไอออนลบวิ่งไปทางขั้วบวก ไอออนบวกจะสามารถเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับที่อยู่ทางขั้วลบ ส่วนไอออนลบจะเคลื่อนที่มายังเครื่องตรวจจับได้เนื่องจาก electro-osmotic flow (EOF) ซึ่ง EOF จะช่วยให้สารเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและเป็นตัวนำพาไอออนลบเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับได้

หลักการของอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบคัพพิลลารี จะมีการผ่านศักย์ไฟฟ้าสูง 10 – 30 kV ผ่านไปยังหลอดคัพพิลลารีซึ่งมีขนาด 25 – 100 μm ซึ่งภายในหลอดคัพพิลลารีจะประกอบไปด้วยสารอิเล็กโทรไลต์ที่จะนำไฟฟ้าได้ ปลายทั้งสองข้างของคัพพิลลารีจุ่มอยู่ในที่บรรจุสารอิเล็กโทรไลต์ และจะมีอิเล็กโทรดที่ทำจากโลหะแพลทินัมจุ่มในสารอิเล็กโทรไลต์ด้วย หลอดคัพพิลลารีจะมีส่วนหนึ่งที่ต่อกับดีเทคเตอร์ ส่วนใหญ่เป็นแบบตรวจจับด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เมื่อฉีดสารผ่านไปตามด้านหนึ่งของหลอดคัพพิลลารี ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ไอออนของสารเคลื่อนที่และเกิดการแยก ผลที่ได้จากดีเทคเตอร์เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) ซึ่งจะแสดงผลกราฟระหว่างเวลากับค่า intensity



ภาพที่ 11 หลักการวิเคราะห์ GAGs ด้วยเทคนิค capillary electrophoresis

Govert W. Somsen และ คณะ ปี 2009 ได้ทำการศึกษา Chondroitin sulfate (CS) และ Dermatan sulfate (1) ใน สารละลายมาตรฐาน heparin ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis (CE) โดยพบว่า เมื่อใช้บัฟเฟอร์ Tris phosphate ความเข้มข้น 850 mM pH 3.0 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน capillary กว้าง 25 μm . ความยาวคอลัมน์ 60 cm. ความต่างศักย์ไฟฟ้า -30 kV. สามารถแยกโมเลกุลของ CS และ DS ออกจาก heparin ได้ % recovery ของ CS และ DS เท่ากับ 1.9×10^{-2} และ 2.6×10^{-1} (mg/ml) ตามลำดับ (45) นอกจากนี้ Xiumei Liu และคณะ ปี 2012 ได้ทำการศึกษา Heparin, Chondroitin Sulfate และ Hyaluronic

Acid จากน้ำไขข้อ ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis (CE) โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris phosphate ความเข้มข้น 600 mM pH 3.0 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน capillary กว้าง 50 μm . ความยาวคอลัมน์ 60 cm. และความต่างศักย์ -20 kV. พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ Heparin, CS และ HA ได้ คือ 0.91, 0.12 และ 9.04×10^{-3} mg/ml และ % recovery ของ CS และ HA อยู่ในช่วง 95.9 -107.0% (46)

10. อาการของนิ่วในไตหรือนิ่วในท่อไต

นิ่วอุดตันที่ท่อไต (ureter) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดแหว เป็นระยะๆในข้างที่มีนิ่ว หรือมีอาการปวดท้องเมื่อนิ่วอุดตัน ปัสสาวะเป็นเลือด ชून หรือ บางครั้งอาจมีนิ่วก้อนเล็กๆปนมากับปัสสาวะ และติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเรื้อรัง ถ้ามีการอุดตันนานจะทำให้เกิดการเสื่อมของไตในภายหลังได้ ในกรณีที่มีการติดเชื้อแทรกซ้อนจะมีอาการไข้ร่วมด้วย หากปล่อยให้เป็นนิ่วไปนานๆ โดยไม่ได้รับการรักษาจะทำให้ไตบาดเจ็บเรื้อรัง ส่งผลให้ไตมีรูปร่างและทำงานผิดปกติมากขึ้นและนำไปสู่ภาวะไตวายในที่สุด (47)

การเอานิ่วออกจากไต โดยใช้ยาช่วยละลายนิ่วหรือผ่าตัดนิ่วออกเมื่อก่อนนิ่วขนาดโตมาก สลายนิ่วไม่ได้ หรือ ผ่าตัดไตเมื่อไตอักเสบเรื้อรังและไม่สามารถทำงานได้แล้ว ขึ้นกับขนาดก้อนนิ่ว เช่น ถ้าก้อนนิ่วขนาดเล็ก เล็กกว่า 5 มิลลิเมตร นิ่วมักหลุดออกได้เองจากตึมน้ำมากๆ อย่างน้อยวันละ 8-10 แก้ว หรือตามแพทย์แนะนำ (48)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีงานวิจัย (research methodology)

1.1 การคัดเลือกอาสาสมัคร

ตัวอย่างปัสสาวะได้มาจากการวิจัยก่อนหน้า “โครงการวิจัยเรื่องภาวะเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วกลุ่มอาการเมแทบอลิกกับโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุคคลในครอบครัว” และคัดเลือกมาใช้หลักเกณฑ์ดังนี้

- 1.1.1 กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี
- 1.1.2 กลุ่มที่ 2 คือ บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตกลุ่มที่ 1 ที่อาศัยอยู่ในบ้านหรือพื้นที่ใกล้เคียงกัน
- 1.1.3 กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นประชากรปกติที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคนิ่วไต อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน และมีเพศ อายุ ใกล้เคียงกับผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 (gender- and age-matched)
- 1.1.4 กลุ่มที่ 4 คือ บุตรของประชากรปกติกลุ่มที่ 3 ที่อาศัยอยู่ในบ้านหรือพื้นที่ใกล้เคียงกัน

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการวิเคราะห์ระดับ GAGs ระหว่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติมาก่อนการศึกษานี้จึงอาศัยจำนวนประชากรจากการศึกษาก่อนหน้า ที่ทำโดยนายจักรพันธ์ รัตนพันธ์ ซึ่งได้ทำการศึกษาความแตกต่างระหว่างระดับ sulfated glycosaminoglycans ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม และพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3. สถานที่ทำการวิจัย

การวิเคราะห์สารตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ บันทึก วิเคราะห์และแปลผล ดำเนินการที่ภาคชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเก็บรักษาสารตัวอย่างทางชีวภาพ

ตัวอย่างปัสสาวะของทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างข้างต้น เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์

5. วิธีการวิเคราะห์ GAGs แต่ละชนิดด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE)

ทำการตัดคอลัมน์ที่จะใช้ โดยใช้คะพิลลารีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ความยาวคอลัมน์ถึงตัวดีเทคเตอร์ 30 cm. ความยาวคอลัมน์ทั้งหมด 40.2 cm. และปรับ condition ก่อนนำมาใช้ แล้วล้างคอลัมน์ก่อนใช้ทุกครั้งด้วย 0.1% phosphoric acid และ 50 mM monosodium phosphate 20 mM butylamine buffer และล้างคอลัมน์หลังใช้ทุกครั้งด้วย 0.1% phosphoric acid และ น้ำที่ปราศจากไอออน

5.1 วิธีการวิเคราะห์ hyaluronic acid (HA)

นำสารละลายมาตรฐาน hyaluronic acid (Sodium Hyaluronate from Cockscomb; TCI Europe N.V.) ความเข้มข้น 1000 ppm และตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาณ 500 μl ใส่ในขวดขนาด 500 μl ใช้บัฟเฟอร์ 50 mM monosodium phosphate (NaH_2PO_4) และ butylamine ประมาณ 3 ใน 4 ส่วน ของขวดปริมาตร 1.5 ml โดยใช้ตัวคอลัมน์ที่มีความยาว 40.2 cm. เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน fused-silica capillary กว้าง 50 μm ศักย์ไฟฟ้า -15 kV ใช้กระแสแบบ reversed-polarity mode แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 195 nm

5.2 วิธีการวิเคราะห์ chondroitin sulfate (CS) และ dermatan sulfate (DS)

นำสารละลายมาตรฐาน CS (Chondroitin sulfate sodium salt from shark cartilage; Sigma-Aldrich) และ DS (Dermatan Sulfate Sodium Salt; TCI Europe N.V.) ความเข้มข้น 500 ppm และตัวอย่างปัสสาวะปริมาณ 500 μl ใส่ 50 mM tris hydroxymethyl aminomethane เอนไซม์ chondroitinase ABC 10 U/ml x ปริมาณ 1 μl และ 60 mM sodium acetate และ 0.01% BSA จากนั้นนำไปบ่มข้ามคืนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลาย CS และ DS มาตรฐานและสารตัวอย่างปัสสาวะใส่ในขวดขนาด 500 μl ใช้บัฟเฟอร์ 50 mM monosodium phosphate (NaH_2PO_4) และ butylamine ประมาณ 3 ใน 4 ส่วน ของขวดปริมาตร 1.5 ml โดยใช้ตัวคอลัมน์ที่มีความยาว 40 cm. หน้าตัด fused-silica capillary กว้าง 50 μm ศักย์ไฟฟ้า 15 kV ใช้กระแสแบบ reversed-polarity mode แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 195 nm

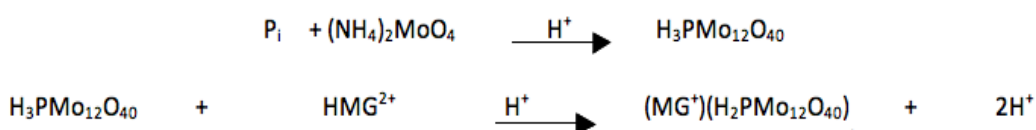
6. วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการตกตะกอนของน้ำ

วิธีวิเคราะห์ค่าความอิมิตวียังยวดที่ทำให้เกิดการตกตะกอน โดยคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่อยู่ในรูปไอออนอิสระ ซึ่งอาศัยความมากน้อยในการรวมตัวกันของคู่อิออนเป็นสารประกอบที่คงตัว คำนวณจาก activity product (AP) ของคู่อิออน 2 ชนิด ได้แก่ เกลือแคลเซียมออกซาลेट และเกลือแมกนีเซียมฟอสเฟต โดยใช้สูตรการคำนวณของ คำนวณด้วยสูตร Ogawa index และ Tiselius risk index (RI) รวมทั้งวัดค่า pH ของปัสสาวะ และวัดความเข้มข้นของสารอิเล็กโทรไลต์ ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

6.1 ตรวจวัดปริมาณแคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) ในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ชื่อเครื่อง ICP-OES) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น (ความเข้มข้นของ standard) และนำตัวอย่างปัสสาวะมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาเจือจางในอัตราส่วน 1:9 ใช้หลักการวัดพลังงานแสงที่เกิดจากการคายพลังงานในช่วงคลื่นรังสีอัลตราไวโอเล็ต เฉพาะตัวของอะตอมของธาตุที่ถูกทำให้อยู่ในสภาวะกระตุ้นจากความร้อนจาก plasma ซึ่งเป็นเปลวไฟที่ให้ความร้อนสูงกว่าเปลวไฟปกติ ปริมาณของธาตุแต่ละชนิดจะถูกวัดที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะของแต่ละอะตอมและถูกคำนวณร่วมกับโปรแกรม winlab32

6.2 ตรวจวัดปริมาณซิทเรตและออกซาเลตในปัสสาวะ ด้วยเทคนิคคัพเพิลลาไรอิเล็คโทรโพรโฟรีซิส โดยใช้หลักการหลักการเคลื่อนที่ของสารในหลอดคัพเพิลลารี ที่บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยนำปัสสาวะไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสปริมาณ 1 ml ใส่ในขวดทดลองขนาด 1.5 ml ใช้ 40 mM borate , 100 mM phosphate และ 0.5 mM tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB) ที่ pH 3.0 เป็นบัฟเฟอร์ ใช้โหมด reversed-polarity ความต่างศักย์ -15 kV วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 195 nm

6.3 ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตในปัสสาวะ ด้วยวิธีทางเคมี โดยใส่บัฟเฟอร์ 500 μ l และ monolybdate 100 μ l ในหลอดทดลอง จากนั้นใส่ปัสสาวะ 5 μ l และ reducer 100 μ l โดยไอออนฟอสเฟตจะทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมโมโนลิบเดต ได้เป็นสารประกอบฟอสโฟโมโนลิบเดต แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน sulfie-cabornate 1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 nm



6.4 ตรวจวัดปริมาณซัลเฟตในปัสสาวะ ด้วยวิธีทางเคมี โดยเตรียมสารละลายซัลเฟตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 mM, 1 mM, 0.5 mM และ 0 mM ตามลำดับ และนำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:9 จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานและปัสสาวะมา 200 μ l แล้วเติม TCA 100 μ l นำเฉพาะตัวอย่างปัสสาวะไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างปัสสาวะ 200 μ l ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate เติมน working reagent (acid barium chloride solution และ sodium carbonate solution) ที่บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิไว้ 10 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนขาวขุ่น ทิ้งไว้

นาน 5 นาที นำไปวัดปริมาณ Sulfate ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm และคำนวณปริมาณซัลเฟตจากสูตรดังนี้

$$[\text{Sulfate}] = \frac{\text{OD sample} - \text{OD H}_2\text{O}}{\text{Slope}} \times 10 \quad (31)$$

6.5 ตรวจวัดปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะ โดยตัวอย่างปัสสาวะ 20 μl ผสมกับ phosphotungstic acid 2 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 10% sodium carbonate 2 ml และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาอีก 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกรดยูริกในปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกับกรดยูริกมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น

6.6 ตรวจวัดปริมาณแร่ธาตุคลอไรด์ โซเดียม และโพแทสเซียม ในปัสสาวะ โดยนำปัสสาวะที่แบ่งไว้ส่งห้องปฏิบัติการ หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ด้วยวิธี Ion Selective Electrode ด้วยเครื่อง COBAS INTEGRA 400 plus (PerkinElmer) โดยเครื่องจะทำการเจือจางปัสสาวะก่อนทำการวิเคราะห์ เรียกว่าวิธี ISE indirect โดยอาศัยคุณสมบัติของเยื่อกั้นและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในอิเล็กโทรด เป็นตัวช่วยในการตรวจวัดปริมาณของคลอไรด์ไอออนในปัสสาวะ

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

ใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., IBM, NY, USA) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของผู้เข้าร่วมโครงการ โดยเปรียบเทียบข้อมูลของทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง ด้วย oneway-ANOVA posthoc แบบ LSD วิเคราะห์กลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติด้วย unpaired *t*-test และหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆด้วยการวิเคราะห์ด้วย Pearson's correlation โดยให้ค่านัยสำคัญอยู่ที่ $p < 0.05$

8. ปัญหาทางจริยธรรม (ethical consideration)

งานวิจัยนี้ จะขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข (ที่ RLC0029/55) ลงวันที่ 16 พฤษภาคม 2555 กำหนดระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี การดำเนินงานวิจัยจะปฏิบัติตามเกณฑ์การปฏิบัติการวิจัยที่ดี (Good Clinical Practice-GCP) สิทธิความปลอดภัยและความเป็นอยู่ที่ดี อาสาสมัครจะได้รับความคุ้มครองตามหลักการแห่งคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) โครงร่างการวิจัยต้องผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมก่อนเริ่มดำเนินการศึกษา และคณะผู้วิจัยจะปฏิบัติตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคนทั้ง 3 ข้อ คือ (1) หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) (2) หลักการให้ประโยชน์ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/non-

beneficence) และ (3) หลักความยุติธรรม (Justice) โดยจะขอความยินยอมจากอาสาสมัคร โดยอาสาสมัครทุกคนจะได้รับคำชี้แจงถึงประโยชน์และความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการวิจัยอย่างครบถ้วน เป็นที่พอใจและเข้าใจดี อาสาสมัครมีเวลาเพียงพอในการตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความเต็มใจ โดยลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม

ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลการวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาสาสมัครไว้เป็นความลับ ในกรณีที่มีการรายงานผลการวิจัย ข้อมูลของอาสาสมัครจะแสดงในรูปของรหัสของการวิจัย โดยที่ไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลหรือสืบค้นย้อนกลับไปตัวอาสาสมัครได้โดยบุคคลผู้ที่ไม่มีส่วนร่วมในคณะผู้วิจัยชุดนี้

9. ทุนวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ประจำปี พ.ศ. 2555 และได้รับทุนสนับสนุนเพิ่มเติมจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย 90 พรรษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Conflict of interests

ผู้วิจัยและคณะวิจัยทุกคนในโครงการวิจัยนี้ ไม่มีส่วนได้ส่วนเสียในรูปของผลประโยชน์ใดๆ

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ประชากรเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 173 คน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยโรคไต จำนวน 28 คน กลุ่มที่ 2 คือ บุตรของผู้ป่วยโรคไตกลุ่มที่ 1 จำนวน 50 คน กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มคนปกติ จำนวน 54 คน และกลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มบุตรของคนปกติกลุ่มที่ 3 จำนวน 41 คน ซึ่งทุกกลุ่มมีการเก็บเลือดและปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ต่อมาผู้เข้าร่วมโครงการส่วนหนึ่งซึ่งเข้าข่ายเก็บปัสสาวะไม่ครบ 24 ชั่วโมง จะถูกคัดออกจากการวิจัย โดยอาศัยเกณฑ์ปริมาณปัสสาวะไม่น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม/ชั่วโมง หรือไม่น้อยกว่า 500 มิลลิลิตรในผู้ใหญ่ และไม่น้อยกว่า 250 มิลลิลิตรในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 18 ปี และเกณฑ์ปริมาณ creatinine ที่ขับออกมาทางปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยเพศชายต้องมี creatinine ไม่น้อยกว่า 14 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และเพศหญิงต้องมี creatinine ไม่น้อยกว่า 11 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน

ด้วยเหตุนี้ จึงมีผู้เข้าร่วมโครงการที่ผ่านการคัดกรองทั้งสิ้น 148 คน แบ่งออกเป็น

กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยโรคไต จำนวน 28 คน

กลุ่มที่ 2 บุตรของผู้ป่วยโรคไต (กลุ่มที่ 1) จำนวน 46 คน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มคนปกติ จำนวน 40 คน

กลุ่มที่ 4 บุตรของคนปกติ (กลุ่มที่ 3) จำนวน 34 คน

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ข้อมูลพื้นฐาน	ครอบครัวผู้ป่วยโรคไต		ครอบครัวประชากรปกติ	
	กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยโรคไต	กลุ่มที่ 2 บุตรของผู้ป่วยโรคไต	กลุ่มที่ 3 กลุ่มคนปกติ	กลุ่มที่ 4 กลุ่มบุตรคนปกติ
จำนวนประชากร (คน)	28	46	40	34
อายุเฉลี่ย (mean±SEM)	46.11±1.85	19.17±1.15	44.70±1.48	19.85±1.27
% เพศชาย	64.29%	45.65%	50.00%	47.06%
Urinary components				
Calcium(mg/day)	119.87±17.37 ^c	59.15±6.24 ^b	96.39±13.01 ^d	45.38±5.39
Oxalate(mg/day)	46.13±5.49 ^{a c}	14.70±2.53	12.59±1.84	22.02±9.87
Magnesium(mg/day)	52.96±8.71	53.44±4.93	62.16±4.46	56.65±4.20
Citrate(mg/day)	74.35±14.69 ^{a c}	112.08±11.19 ^b	178.68±25.36	194.17±26.99
Chloride (mg/day)	115.62±12.28	93.65±7.34	92.84±6.24	90.21±8.24
Phosphate (mg/day)	326.71±29.04 ^{a c}	240.05±18.18 ^b	191.92±16.88 ^d	132.52±15.66
Uric acid (mg/day)	377.14±33.05 ^c	235.97±19.31	371.25±22.77 ^d	325.79±26.70
Sulfate (mg/day)	1024.86±128.24 ^{a c}	740.93±66.57 ^b	1002.24±96.12	1159.19±114.98

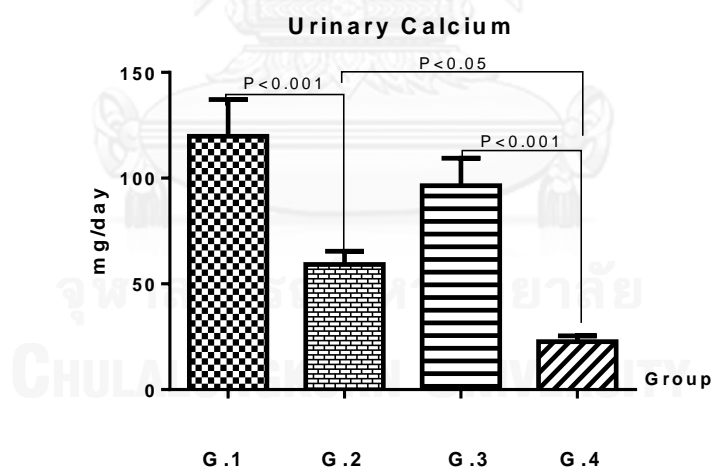
ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SEM, N/A คือ not available, ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ ^ap<0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3, ^bp <0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4, ^cp <0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2, ^dp <0.05 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4

1. ผลการศึกษาสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปัสสาวะ

เนื่องจากในเบื้องต้น ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะใช้โปรแกรม EQUIL2 ซึ่งเป็นโปรแกรมมาตรฐานในการคำนวณระดับค่า supersaturation ในปัสสาวะ และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ซึ่งการคำนวณค่า supersaturation โดยโปรแกรมนี้ต้องอาศัยค่าความเข้มข้นของ calcium, oxalate, citrate magnesium, chloride, sodium, potassium, ammonia, sulfate และ phosphate ในการคำนวณ แต่เนื่องจากโปรแกรมที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ Yoshihide Ogawa เกิดความบกพร่องไม่สามารถใช้งานได้ จึงได้ปรับเปลี่ยนมาใช้ Ogawa index และ Tiselius risk index ในภายหลัง

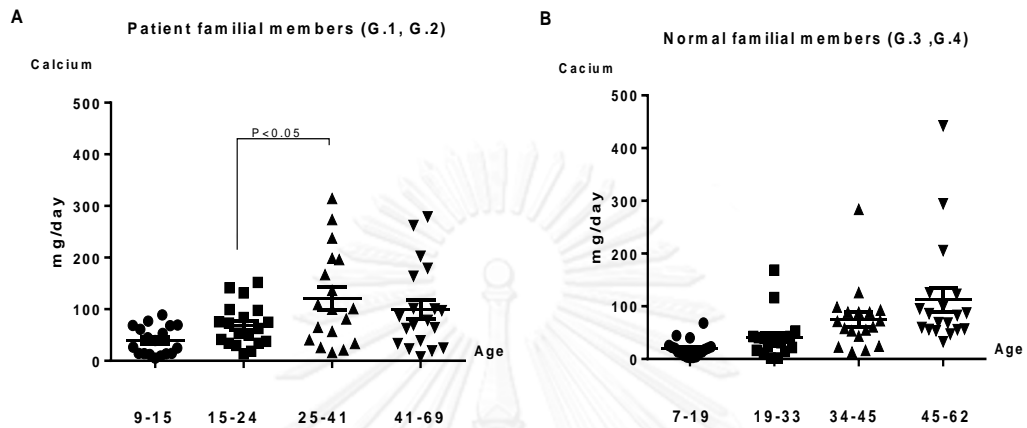
1.1 ผลการวิเคราะห์ระดับแคลเซียมในปัสสาวะ

ระดับแคลเซียมในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ และสูงกว่าบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($119.87+17.37$, $59.15+6.24$ mg/day, $p<0.001$) และแคลเซียมในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติสูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($96.39+13.01$, $22.69+15.71$ mg/day, $p<0.001$) รวมถึงกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตพบว่า มีระดับแคลเซียมในปัสสาวะสูงกว่าบุตรคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน ($2.96+0.31$, $1.14+0.14$ mg/day, $p<0.05$)



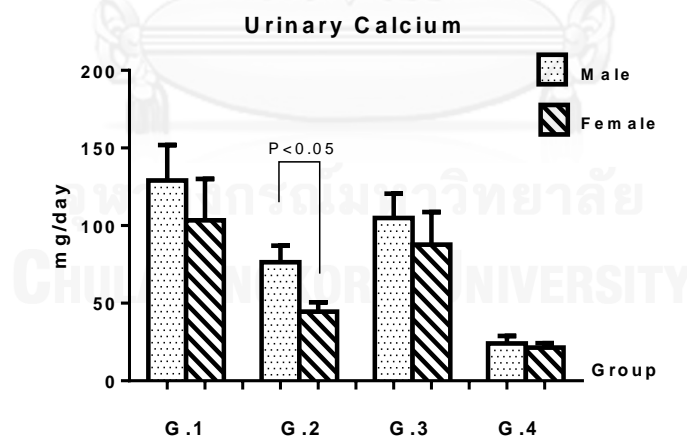
ภาพที่ 12 แสดงระดับของแคลเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแคลเซียมในปัสสาวะกับอายุโดยแบ่งอายุตามช่วงควอไทล์ พบว่าแคลเซียมในปัสสาวะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น ทั้งกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ้วไต และกลุ่มครอบครัวคนปกติ



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของระดับแคลเซียมในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ

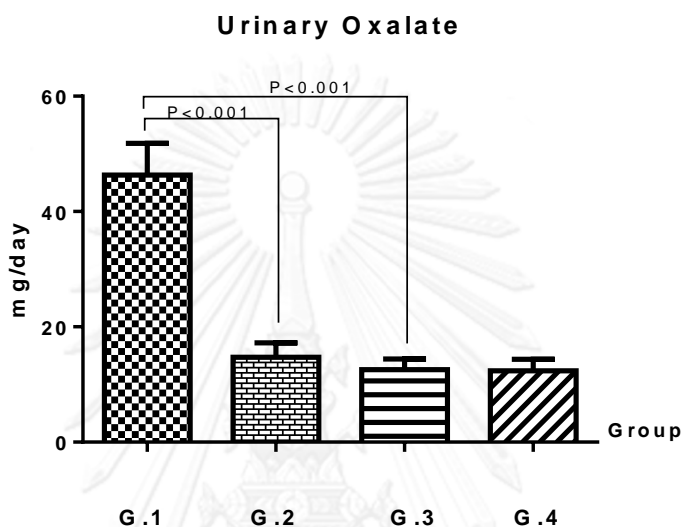
เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับแคลเซียมในปัสสาวะ พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยระดับแคลเซียมในปัสสาวะของเพศชายมีแนวโน้มสูงกว่าเพศหญิงในทุกกลุ่ม



ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับแคลเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง
G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ้วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

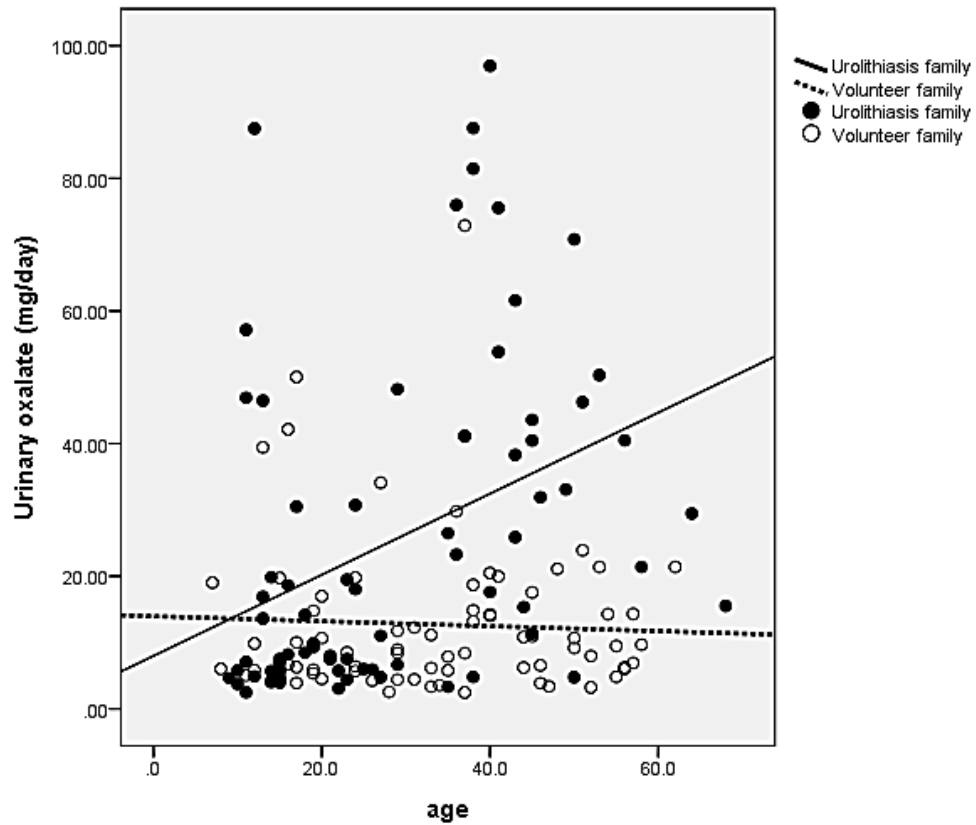
1.2 ผลการวิเคราะห์ระดับออกซาเลตในปัสสาวะ

ระดับออกซาเลตของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีค่าเท่ากับ 46.31 ± 5.49 mg/day ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (14.71 ± 2.53 , 12.59 ± 1.84 , 12.35 ± 2.03 mg/day ตามลำดับ, $p < 0.001$) และระดับออกซาเลตของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติ

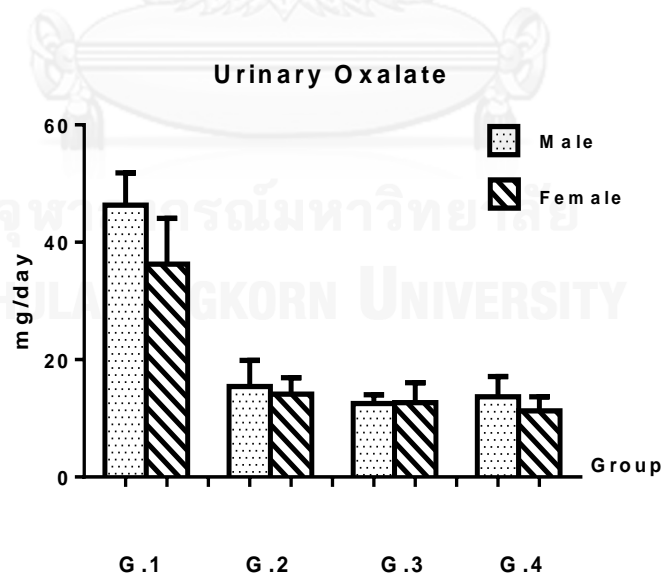


ภาพที่ 15 แสดงระดับออกซาเลตในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับออกซาเลตในปัสสาวะกับอายุ ด้วย pearson correlation พบว่า ออกซาเลตในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับช่วงอายุเฉพาะกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต ($R^2=0.104$, $p=0.154$) และกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับออกซาเลตในปัสสาวะสูงกว่าครอบครัวคนปกติ (ภาพที่16) แต่พบว่กับออกซาเลตในปัสสาวะและเพศไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 17)



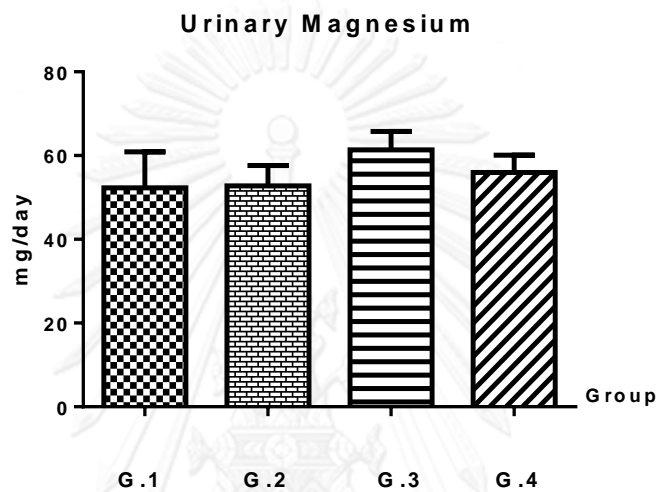
ภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ของระดับออกซาเลตกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มครอบครัวควบคุม



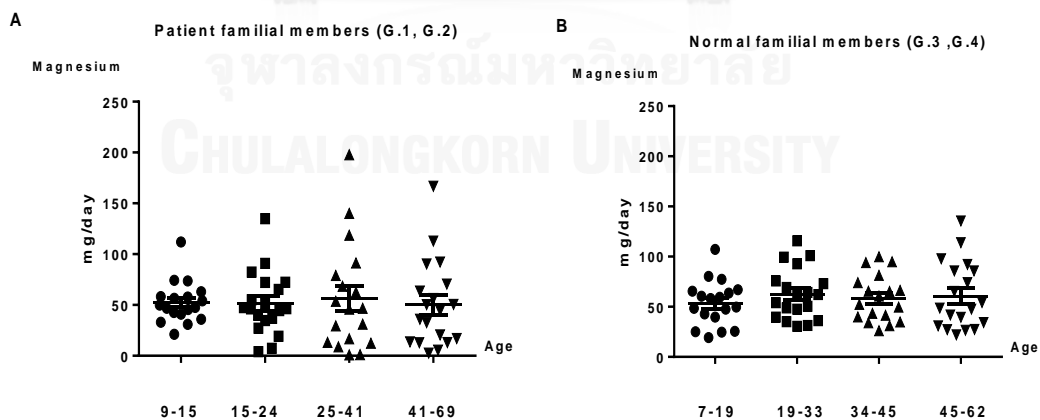
ภาพที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับออกซาเลตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

1.3 ผลการวิเคราะห์ระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะ

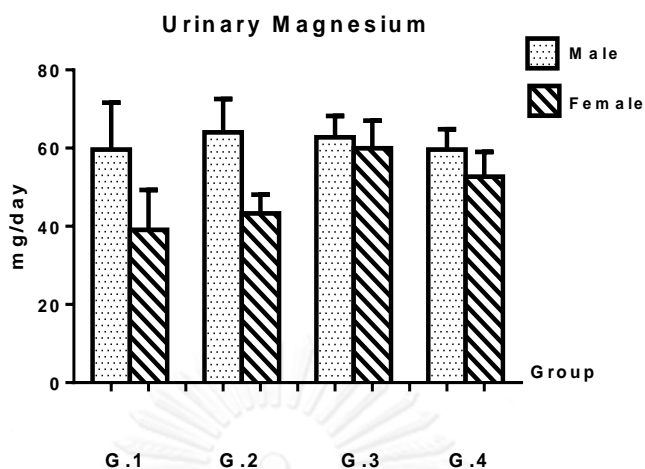
ระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ัวไต กลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้ัวไต กลุ่มคนปกติ และกลุ่มบุตรคนปกติ ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 18) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะกับอายุโดยแบ่งอายุตามช่วงควอไทล์ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์เช่นเดียวกัน (ภาพที่19) ส่วนความสัมพันธ์ของระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะกับเพศ พบว่า มีความสัมพันธ์กัน โดยเพศชายมีระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะสูงกว่าเพศหญิง (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 18 แสดงระดับของแมกนีเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนี้ัวไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนี้ัวไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ



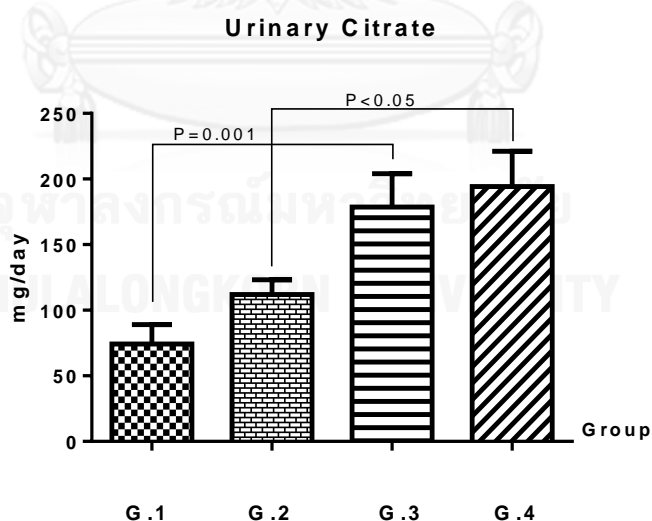
ภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ของระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้ัวไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ



ภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับแมกนีเซียมในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

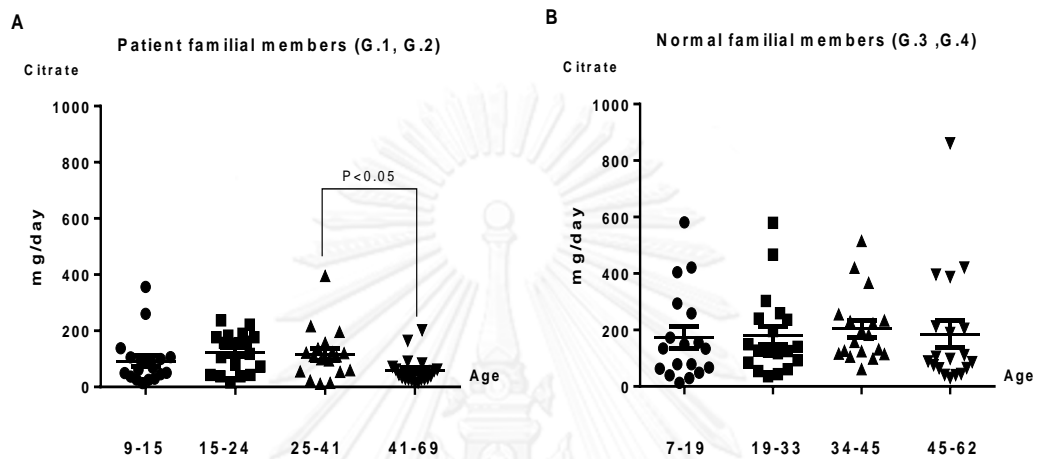
1.4 ผลการวิเคราะห์ระดับซีเทรตในปัสสาวะ

ระดับซีเทรตที่ขับออกมาในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่าทุกกลุ่มและต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($74.35+14.69$ และ $178.68+25.36$ mg/day, $p < 0.05$) และระดับซีเทรตของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่ากลุ่มบุตรคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($112.08+11.19$ และ $194.17+26.99$ mg/day, $p < 0.05$)

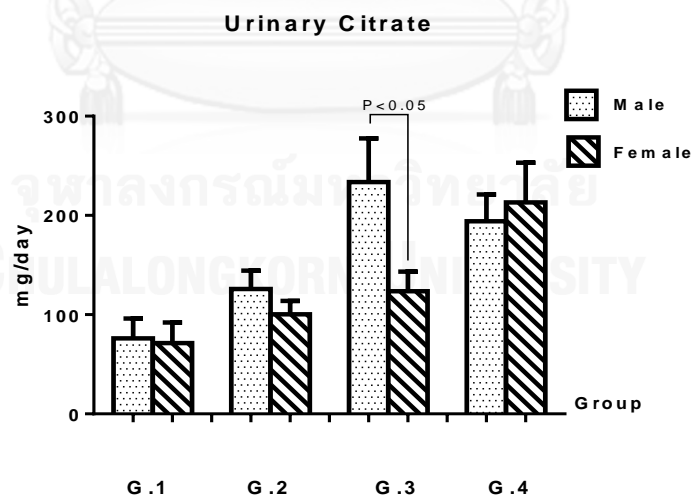


ภาพที่ 21 แสดงระดับของซีเทรตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างซีเทรตในปัสสาวะกับช่วงอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ พบว่าระดับซีเทรตในปัสสาวะกับช่วงอายุไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับซีเทรตในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มครอบครัวคนปกติ (ภาพที่ 22) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างระดับซีเทรตในปัสสาวะกับเพศ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 23)



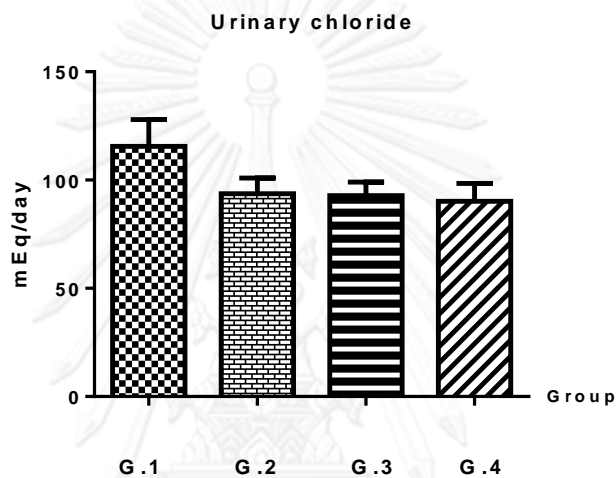
ภาพที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ของระดับซีเทรตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ



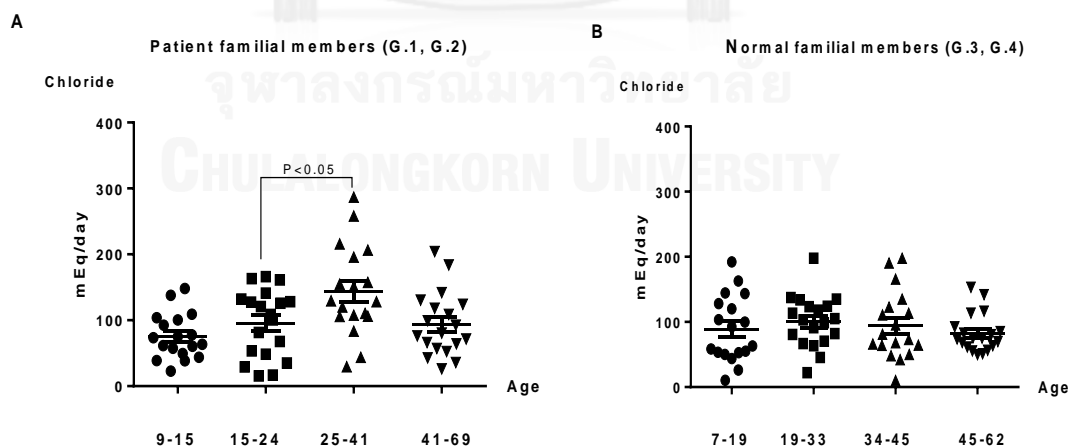
ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับซีเทรตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง
G.1 : ผู้ป่วยโรคนี้วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนี้วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

1.5 ผลการวิเคราะห์ระดับคลอไรด์ในปัสสาวะ

การวิเคราะห์ระดับคลอไรด์ที่ขับออกมาในปัสสาวะ พบว่า ระดับคลอไรด์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไต มีค่าเท่ากับ 115.62 ± 12.28 mEq/day ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่คลอไรด์ในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต กลุ่มคนปกติ และกลุ่มบุตรคนปกติ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (93.65 ± 7.34 , 92.84 ± 6.24 และ 90.21 ± 8.24 mEq/day ตามลำดับ) (ภาพที่ 24) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างระดับคลอไรด์ในปัสสาวะทั้งกับอายุและเพศ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 25 และ 26)

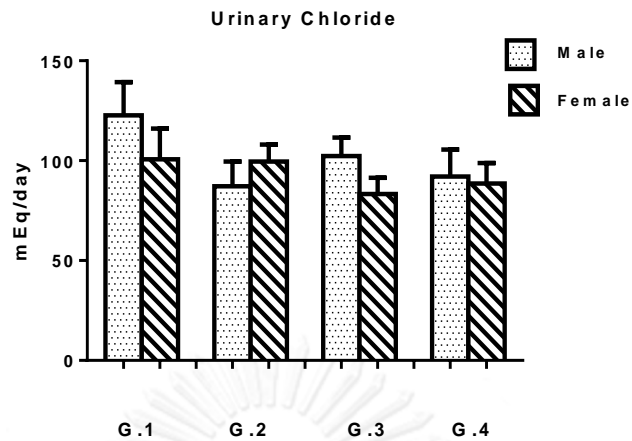


ภาพที่ 24 แสดงระดับของคลอไรด์ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ



ภาพที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ของระดับคลอไรด์ในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์

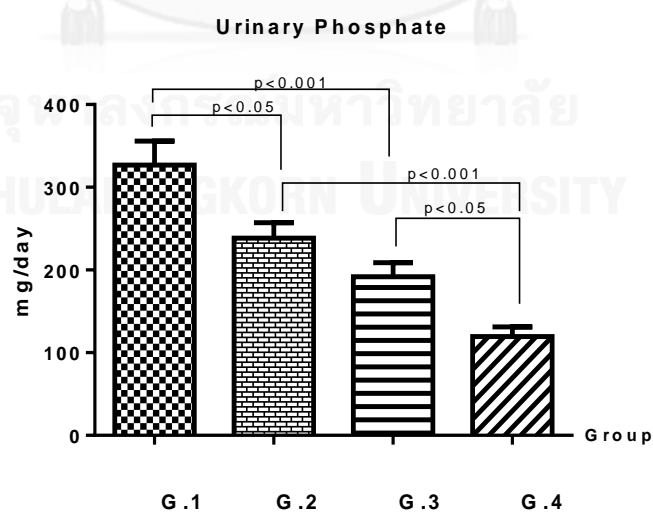
A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้่วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ



ภาพที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับคลอไรด์ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคหัวใจ, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคหัวใจ, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

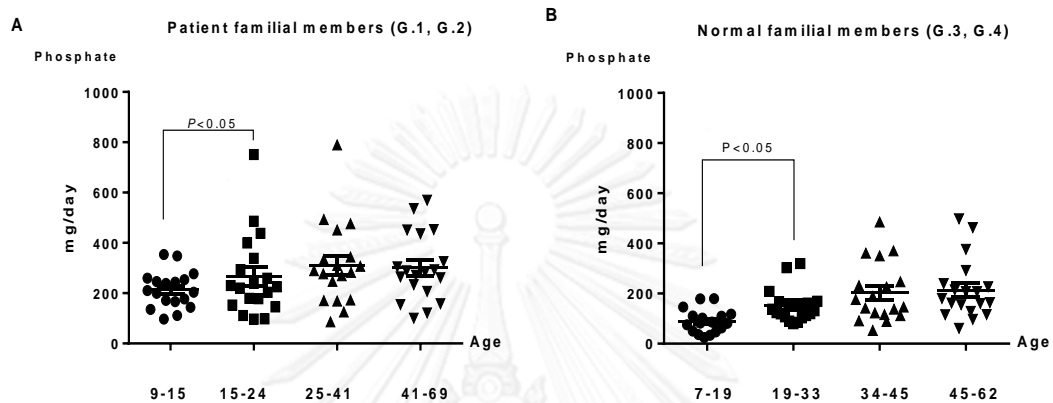
1.6 ผลการวิเคราะห์ระดับฟอสเฟตในปัสสาวะ

ระดับฟอสเฟตของกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจมีค่าเท่ากับ 326.71 ± 29.04 mg/day ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระดับฟอสเฟตของกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (191.92 ± 16.88 และ 119.66 ± 11.63 mg/day, $p < 0.05$) และระดับฟอสเฟตของกลุ่มบุตรผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (238.66 ± 18.48 และ 119.66 ± 11.63 mg/day, $p < 0.001$)



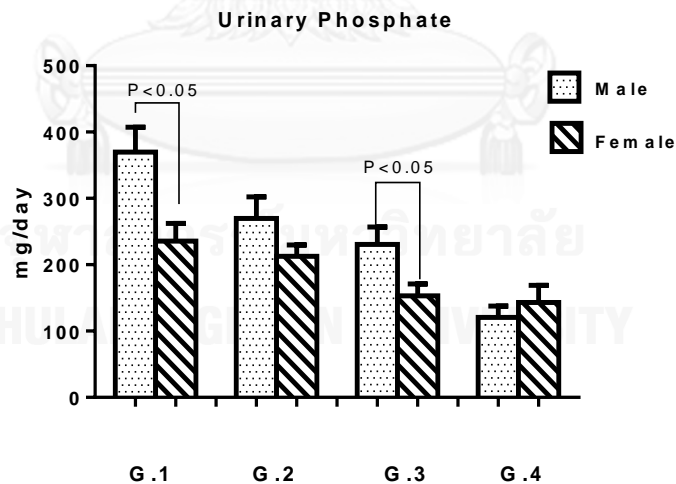
ภาพที่ 27 แสดงระดับฟอสเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคหัวใจ, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคหัวใจ, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับฟอสเฟตในปัสสาวะกับอายุโดยแบ่งช่วงอายุตามช่วงควอไทล์พบว่า มีความสัมพันธ์กัน โดยระดับฟอสเฟตในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นตามช่วงอายุ และกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไตมีระดับฟอสเฟตในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มครอบครัวคนปกติ (ภาพที่ 28) แต่ระดับฟอสเฟตในปัสสาวะกับเพศไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ของระดับฟอสเฟตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์

A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ

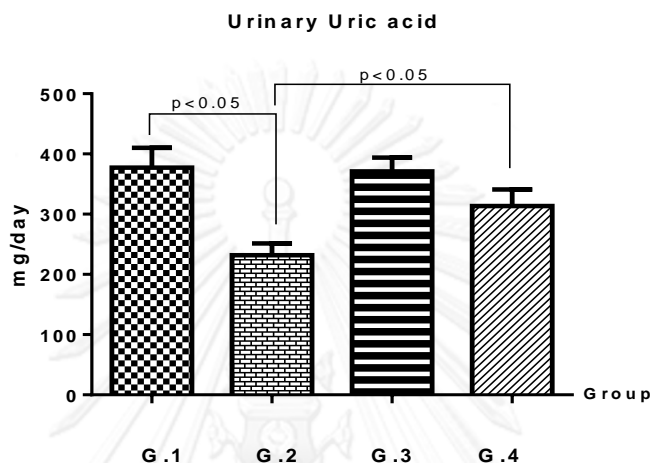


ภาพที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศชายและเพศหญิงกับระดับฟอสเฟตในปัสสาวะของแต่ละ

กลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคนี้วไต, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคนี้วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

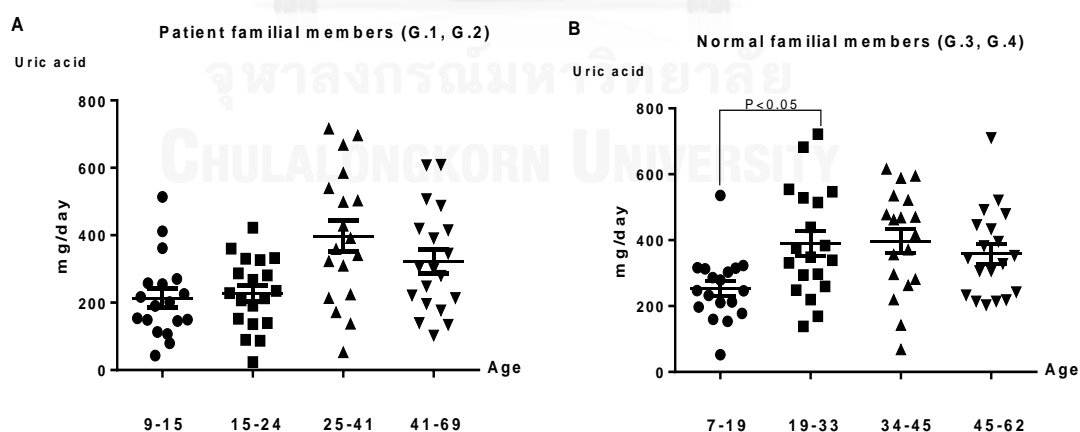
1.7 ผลการวิเคราะห์ระดับกรดยูริกในปัสสาวะ

การวิเคราะห์ระดับกรดยูริกที่ขับออกมาในปัสสาวะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มผู้ใหญ่ (กลุ่ม 1 และ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเด็ก (กลุ่ม 2 และ 4) และพบว่าระดับกรดยูริกในปัสสาวะของกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้วัดต่ำกว่ากลุ่มบุตรคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($1131.47+119.07$ และ $1002.24+96.12$ mg/day, $p < 0.05$)



ภาพที่ 30 แสดงระดับกรดยูริกในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคนี้วัด, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคนี้วัด, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

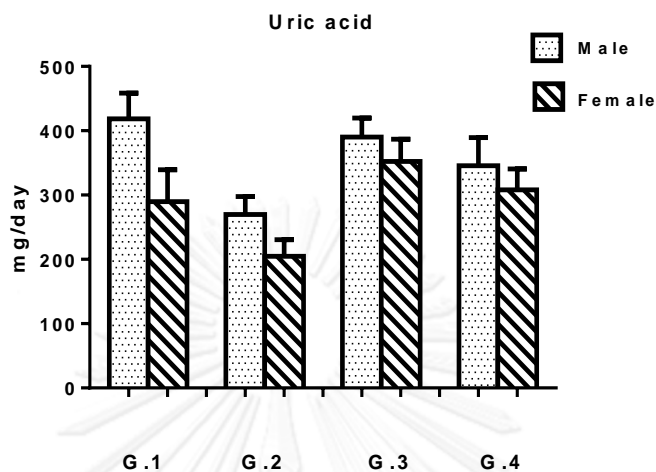
ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับกรดยูริกในปัสสาวะกับอายุโดยแบ่งช่วงอายุตามช่วงควอไทล์ พบว่า ระดับกรดยูริกในปัสสาวะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นหลังช่วงอายุ 20 ปี



ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ของระดับกรดยูริกในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์

A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนี้วัด B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ

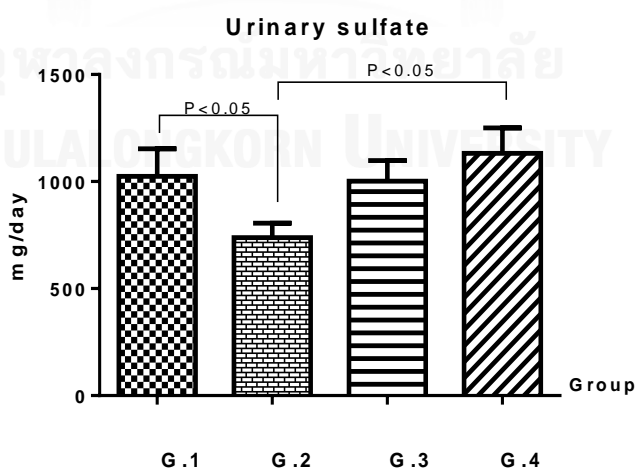
ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับกรดยูริกในปัสสาวะ พบว่า ระดับกรดยูริกมีความสัมพันธ์กับเพศ โดยในเพศชายมีแนวโน้มสูงกว่าเพศหญิง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับกรดยูริกในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

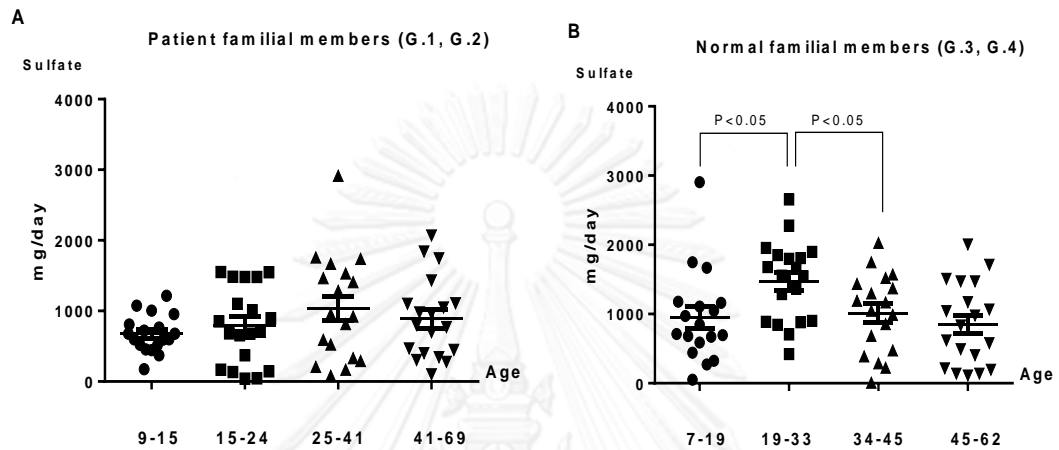
1.8 ผลการวิเคราะห์ระดับซัลเฟตในปัสสาวะ

การวิเคราะห์ระดับซัลเฟตที่ขับออกมาในปัสสาวะ พบว่า ระดับซัลเฟตในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้่วไตสูงกว่ากลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต และกลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไตมีระดับซัลเฟตต่ำกว่ากลุ่มบุตรคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

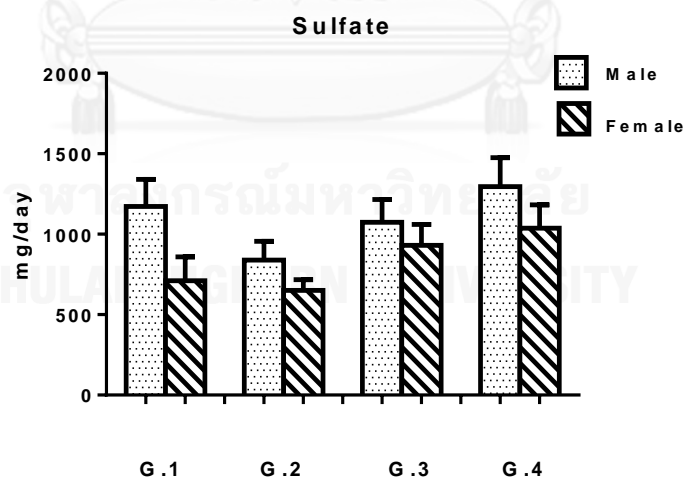


ภาพที่ 33 แสดงระดับของซัลเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 : ผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคนี้่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างซัลเฟตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์ พบว่าซัลเฟตในปัสสาวะไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ (ภาพที่ 34) แต่เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับระดับซัลเฟตในปัสสาวะพบว่า มีความสัมพันธ์กับเพศ โดยในเพศชายมีแนวโน้มสูงกว่าเพศหญิงในทุกกลุ่ม (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ของระดับซัลเฟตในปัสสาวะกับอายุที่แบ่งตามช่วงควอไทล์
 A : กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต B: กลุ่มครอบครัวคนปกติ



ภาพที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับค่าซัลเฟตในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง
 G.1 : ผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.2 : บุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

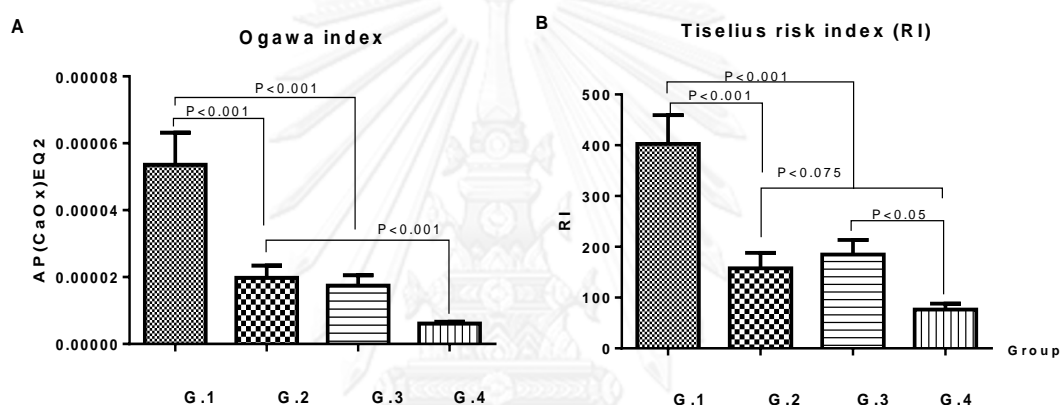
ตารางที่ 4 สรุปผลการศึกษาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปีสสาวะ

Elements	Group1 (stone patient)	G2 vs G4	Age- dependent	Gender- dependent
Calcium	Highest	Higher	Higher	Male (higher)
Oxalate	Highest	Higher	Higher in renal stone family	-
Citrate	Lowest	Lower	-	-
Magnesium	-	-	-	Male (higher)
Chloride	Highest	-	-	-
Phosphate	Highest	Higher	Higher	-
Uric acid	-	Lower	Higher after 20	Male (higher)
Sulfate	-	Lower	-	Male (higher)

สรุปได้ว่ากลุ่มที่ผู้ป่วยโรคนิ่วไต มีระดับของสารส่งเสริมการเกิดนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และฟอสเฟต สูงที่สุด และมีระดับของสารยับยั้งนิ่ว ได้แก่ ซีเทรตในปีสสาวะต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตและบุตรของคนปกติแล้ว พบว่า บุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับของสารส่งเสริมการเกิดนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม ออกซาเลต และฟอสเฟต สูงกว่า และมีระดับสารยับยั้งนิ่วได้แก่ ซีเทรต ต่ำกว่า บุตรของคนปกติ ซึ่งเป็นรูปแบบความผิดปกติที่เหมือนกับผู้ป่วยโรคนิ่วไต ดังนั้นการศึกษานี้เป็นหลักฐานยืนยันได้ว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีความผิดปกติขององค์ประกอบในปีสสาวะ ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่ว และพบว่าสารส่งเสริมการเกิดนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม และฟอสเฟต และออกซาเลต มีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจอธิบายถึงได้ว่า บุตรของผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วมากเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าในเพศชายมีการขับแคลเซียม แมกนีเซียม กรดยูริก และซัลเฟต ในปีสสาวะ มากกว่าเพศหญิง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า เพศชายมีความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วสูงกว่าเพศหญิง

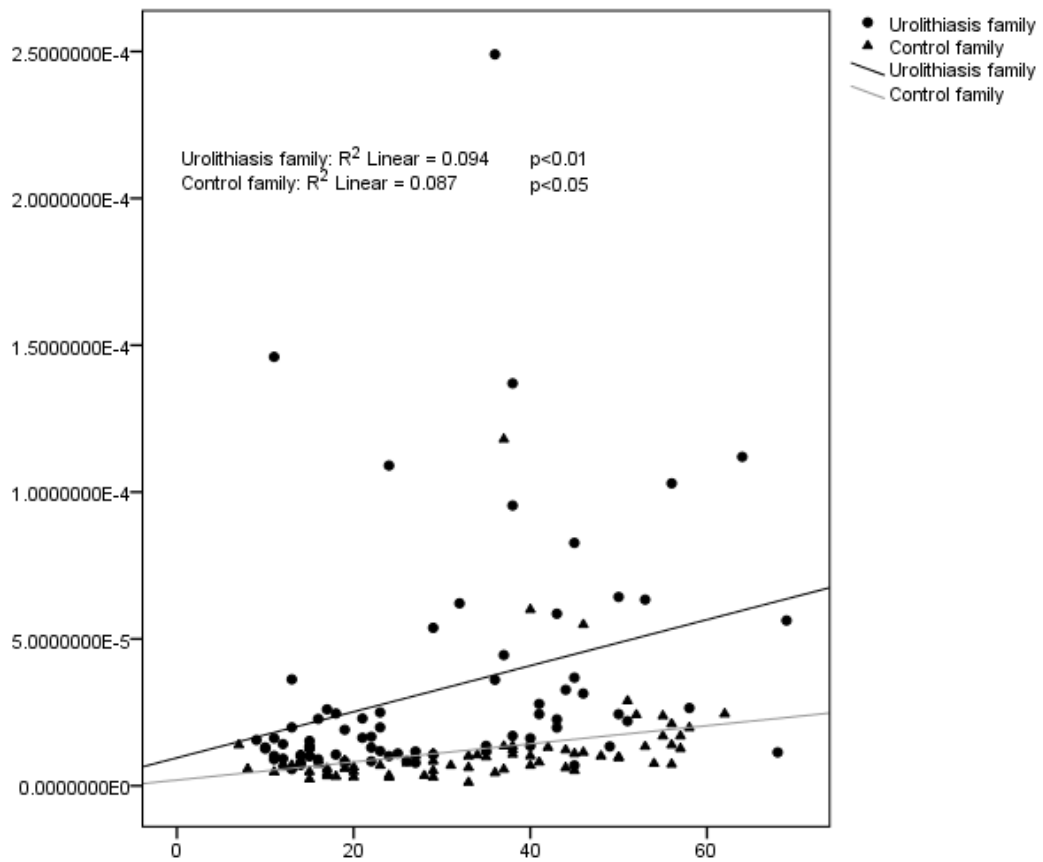
2. ผลการศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ต่อการเกิดนิ่วไต

ศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation โดยใช้สูตรคำนวณของ Ogawa index พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับการเกิด supersaturation สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และพบว่า กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ยังไม่เป็นโรคนิ่วไตมีภาวะ supersaturation สูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สูตรคำนวณของ Tiselius risk index พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน แต่กลุ่มบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตซึ่งยังไม่เป็นโรคนิ่วไตมีภาวะ supersaturation มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มบุตรคนปกติ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มคนปกติมีภาวะ supersaturation สูงกว่ากลุ่มบุตรของคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

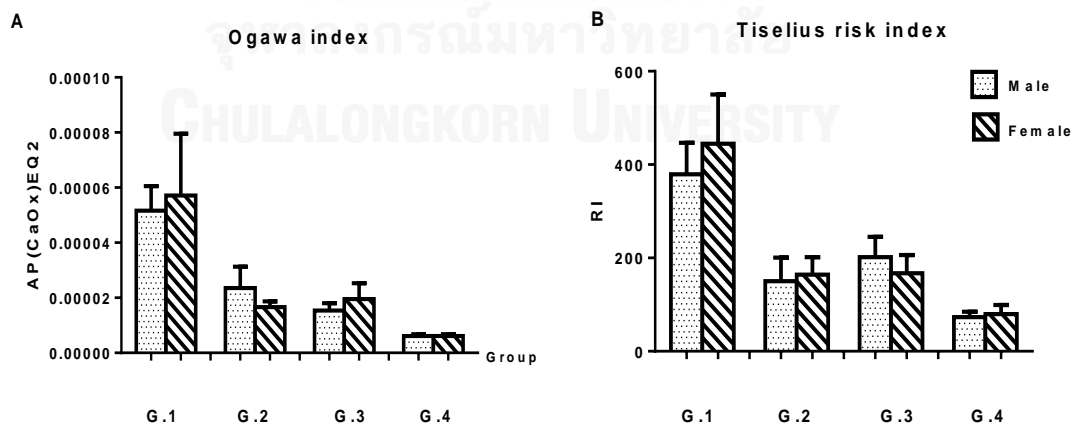


ภาพที่ 36 : แสดงระดับ supersaturation A : ด้วยสูตร Ogawa index B : แสดงระดับ supersaturation ด้วยสูตร Tiselius risk index

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ supersaturation กับอายุ โดยวิธี pearson correlation พบว่า พบว่าทั้งกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มครอบครัวคนปกติ มีความสัมพันธ์เชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 = 0.094$, $p < 0.01$ และ $R^2 = 0.087$, $p < 0.05$ ตามลำดับ) และกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ supersaturation สูงกว่าครอบครัวคนปกติตลอดทุกช่วงอายุ (ภาพที่ 37) และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ supersaturation กับเพศ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 38)



ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ supersaturation กับช่วงอายุ โดยวิธี pearson correlation จากการคำนวณด้วย Ogawa index ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและครอบครัวคนปกติ

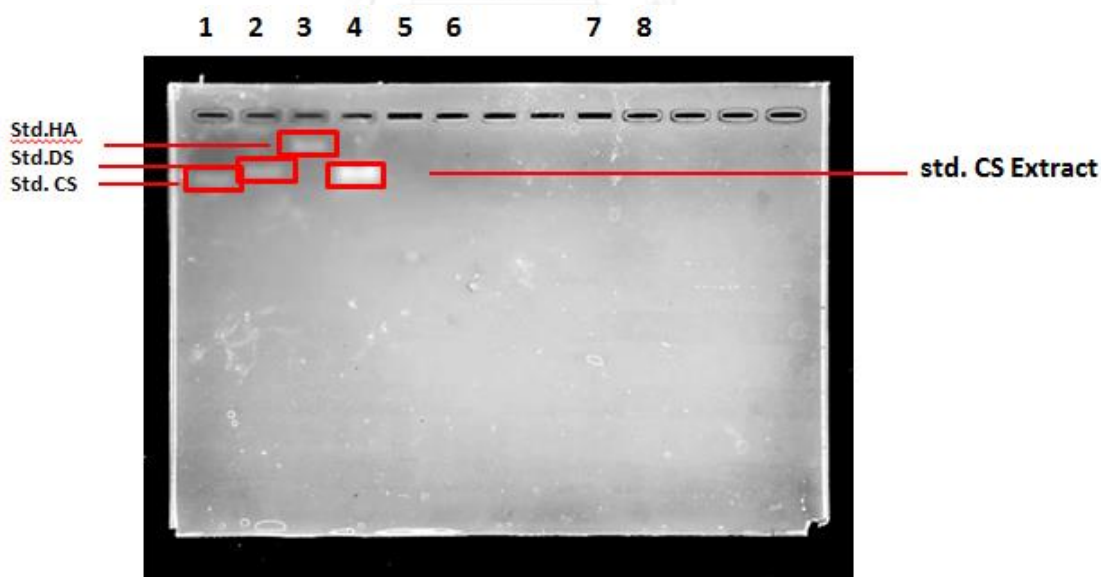


ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศชายและเพศหญิงกับระดับ supersaturation
A: Ogawa index B: Tiselius risk index

สาร GAGs ที่พบมากที่สุดในปีสภาวะทั่วไป ได้แก่ CS และ HA ตามลำดับ และสารทั้งสองตัวนี้มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ให้เชื่อได้ว่ามีความสำคัญในกระบวนการการเกิดนิ้ว ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาระดับของ CS และ HA ในปีสภาวะของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบกัน ทว่าในปัจจุบัน วิธีการตรวจหา HA และ CS มาตรฐานยังคงอาศัยการตรวจด้วยวิธี ELISA, หรือ HPLC ซึ่งทั้งสองวิธีมีค่าใช้จ่ายสูงและต้องอาศัยชุดตรวจหรือแอนติบอดีจากต่างประเทศ คณะผู้วิจัยจึงตั้งใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความแม่นยำ ราคาถูก และใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีอยู่ในประเทศ ขึ้นมาทดแทนวิธีเดิม ในรายงานการวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอเสนอวิธีการพัฒนาการตรวจหา CS และ HA ในปีสภาวะโดยวิธี capillary electrophoresis แต่เนื่องจากโครงสร้างของ DS มีความคล้ายคลึงกับ CS เป็นอย่างมากและมักจะเกาะรวมกันอยู่เป็นสารเชิงซ้อนร่วมกัน จึงจะทำการวิเคราะห์ DS ร่วมไปด้วย

3. ผลจากการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

จากการศึกษา CS, DS และ HA ของสารละลายมาตรฐานและในสารตัวอย่างปีสภาวะด้วยเทคนิค Gel electrophoresis แล้วย้อมด้วยสีย้อม alcian blue ซึ่งเป็นเทคนิคดั้งเดิม และใช้เวลานาน พบว่า สังเกตเห็นเฉพาะแถบของสารละลายมาตรฐาน CS, DS และ HA ที่ความเข้มข้น 1000 mg/L และสารสกัด CS ที่ความเข้มข้น 8000 mg/L

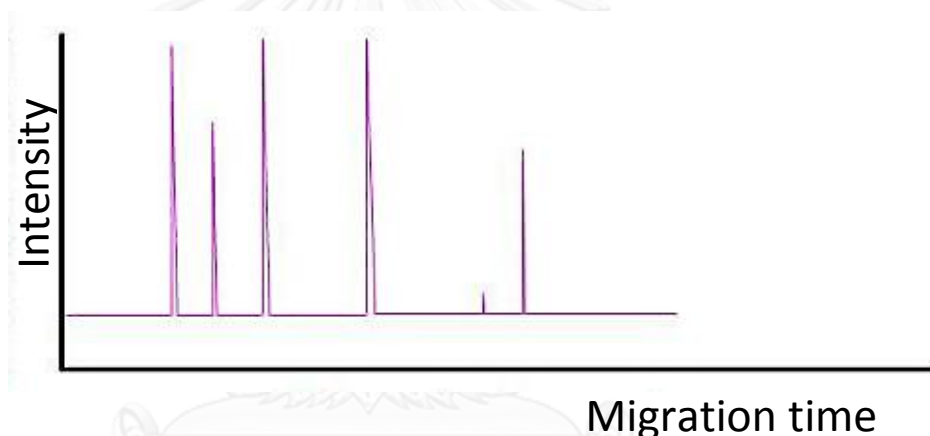


ภาพที่ 39 แสดงผลเจลจาก Gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย 0.1% alcian blue ช่องที่ 1 คือ CS 1000 mg/L 2. DS 1000 mg/L 3. HA 1000 mg/L 4. Extracted CS 8000 mg/L 5. Extracted CS จากตัวอย่างปีสภาวะ 6. Extracted CS จากปีสภาวะเก็บใหม่ 7. สารละลายมาตรฐาน CS 1000 mg/L ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC 8. สารละลายมาตรฐาน DS 1000 mg/L ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC

จะเห็นได้ว่าวิธี Gel electrophoresis with alcian blue staining นี้ มีความไวในการตรวจระดับ GAGs ในปัสสาวะต่ำ เห็นได้จากไม่สามารถตรวจพบ GAGs จาก urine extract ได้เลย วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

4. ผลจากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ chondroitin sulfate, dermatan sulfate และ hyaluronic acid ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis จะอยู่ในรูปของ electropherogram ซึ่งจะแสดงลักษณะของ peak ระหว่างช่วงเวลา (แกน X) กับ intensity (แกน Y) ลักษณะของ electropherogram ที่ดี คือ ควรมี base line เรียบตรง ลักษณะของ peak ควรแหลมสูงมีฐานแคบ และแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 41



ภาพที่ 40 แสดงลักษณะ electropherogram ที่เหมาะสมซึ่งเปรียบเทียบระหว่าง intensity กับช่วงเวลา

4.1 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS)

เริ่มจากวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน CS ที่ความเข้มข้น 1000 mg/L ที่ความยาวคลื่น 195 nm. เริ่มจากวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน CS ที่ความเข้มข้น 1000 mg/L ที่ความยาวคลื่น 195 nm. จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ borate บัฟเฟอร์ pH 9.0 ไม่พบ peak ของ CS จึงทำการผสม TTAB ซึ่งเป็น reagent ที่ช่วยกลับทิศ electro-osmotic flow (EOF) และนำพาโมเลกุลของสารไปยัง detector ได้เร็วขึ้น แต่ยังไม่พบ peak ของ CS เช่นเดียวกัน และเมื่อทดลองผสมระหว่าง 25 mM borate กับ 25 mM sodium phosphate ($\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$) pH 3.0 พบว่า สารเคลื่อนที่ไปยัง detector ได้ แต่ peak มีฐานกว้าง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 mM borate กับ 50 mM sodium phosphate pH 3.0 ได้ peak ที่

ออกเร็วขึ้น สูงขึ้น และฐานแคบลง ต่อมาจึงเลือกใช้ sodium phosphate เพียงชนิดเดียว พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ peak สูงและฐานแคบลงยิ่งขึ้น ส่งผลให้การตรวจวัดมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (ภาคผนวก ภาพที่ 1)

4.2 การศึกษาผลของบัฟเฟอร์ต่อการแยกสาร Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน CS, DS และ HA ความเข้มข้น 1000 mg/L เนื่องจากสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ sodium phosphate เพียงอย่างเดียว peak ของ CS และ DS เกิดการซ้อนทับและไม่แยกออกจากกัน จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ซึ่งมีการศึกษาของ Thomas N. และคณะ รายงานว่า การเติมสารกลุ่ม polyamine จะช่วยให้โมเลกุลของ CS และ DS แยกออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น ในการทดลองนี้ เลือกใช้ buthylamine, tri-ethylamine และ ethylenediamine ผสมกับ sodium phosphate พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ buthylamine จะทำให้การแยก CS กับ DS ดียิ่งขึ้น (49) ส่วนสารละลายมาตรฐาน HA นั้น เมื่อใช้บัฟเฟอร์ Sodium phosphate เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับ buthylamine พบว่าสามารถตรวจวัดได้และให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ บัฟเฟอร์ sodium phosphate 50 mM กับ buthylamine 200 mM pH 3.0 ความต่างศักย์ 15 kV. สำหรับการทดลองครั้งนี้ (ภาคผนวก ภาพที่ 2)

4.3 ผลการศึกษาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA)

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่อง CE สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection หรือ LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่อง CE สามารถตรวจวัดได้และอ่านค่าได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (Limit of Quantitation หรือ LOQ) รวมทั้งหาค่า % recovery เพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นที่ได้กลับมาจากการตรวจวัดด้วยเครื่อง CE เมื่อเทียบกลับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายมาตรฐาน CS, DS และ HA ทั้งก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ Chondroitinase ABC ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ พบว่า ซึ่งจากการหา % recovery พบว่าสูงกว่า 90% และเมื่อใช้เอนไซม์ Chondroitinase ABC กับสารละลายมาตรฐาน CS, DS พบว่า มีค่า LOD และ LOQ ที่ต่ำลง และมี % recovery เพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 5 แสดงค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน CS DS และ HA

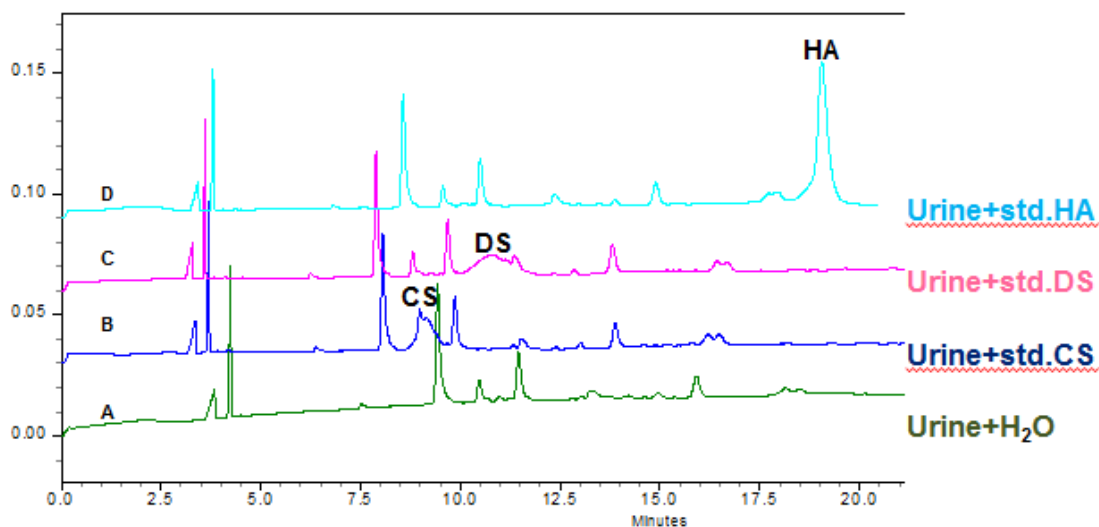
standard	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery
Chondroitin sulfate	25	75	94.67
Dermatan sulfate	50	100	93.07
Hyaluronic acid	15	50	99.92

ตารางที่ 6 แสดงค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ) และ % recovery ของสารละลายมาตรฐาน CS และ DS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC

standard	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery
Chondroitin sulfate	3	10	99.96
Dermatan sulfate	3	10	97.21

4.4 ผลการวิเคราะห์ CS, DS และ HA ในสารตัวอย่างปัสสาวะ

เมื่อนำปัสสาวะตัวอย่างมาวิเคราะห์หา CS, DS และ HA โดยใช้ บัฟเฟอร์ sodium phosphate 50 mM กับ buthylamine 200 mM pH 3.0 ความต่างศักย์ 15 kV พบลักษณะ electropherogram ดังเส้นสีเขียว เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐาน CS, DS และ HA ดังภาพที่ 41 เพื่อแยกแยะ เป็น peak ของ GAGs ชนิดใด จะเห็นได้ว่าปัสสาวะตัวอย่างในเส้นสีเขียวไม่พบ peak ของ GAGs ชนิดใดๆ เลย ผู้วิจัยเชื่อว่าเป็นผลมาจาก GAGs ในปัสสาวะมีปริมาณต่ำมากเกินกว่าที่วิธีนี้จะวัดได้หรือเป็นเพราะ CS และ DS เป็น พอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้การดูดแสงลดลงจึงอาจทำให้มองไม่เห็น peak ในสารตัวอย่างปัสสาวะ ส่วน HA พบว่ามีปริมาณน้อยเช่นเดียวกันแต่ยังสูงกว่าระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีนี้

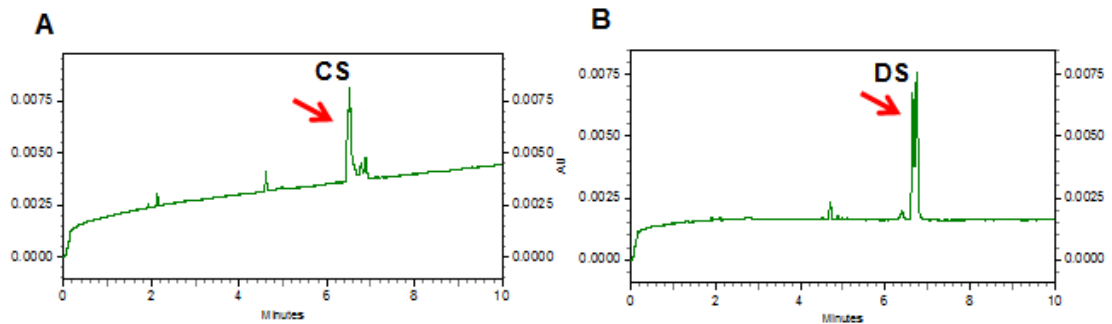


sodium phosphate buffer 50 mM and buthylamine 200 mM, -15 kV. 50 μ m ID, 40 cm. to detector

ภาพที่ 41 แสดง electropherogram ของสารตัวอย่างปัสสาวะ A : สารตัวอย่างปัสสาวะที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน 1:1 เท่า, B : คือ สารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐาน CS, C : คือ สารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐาน DS และ D : คือสารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐาน HA

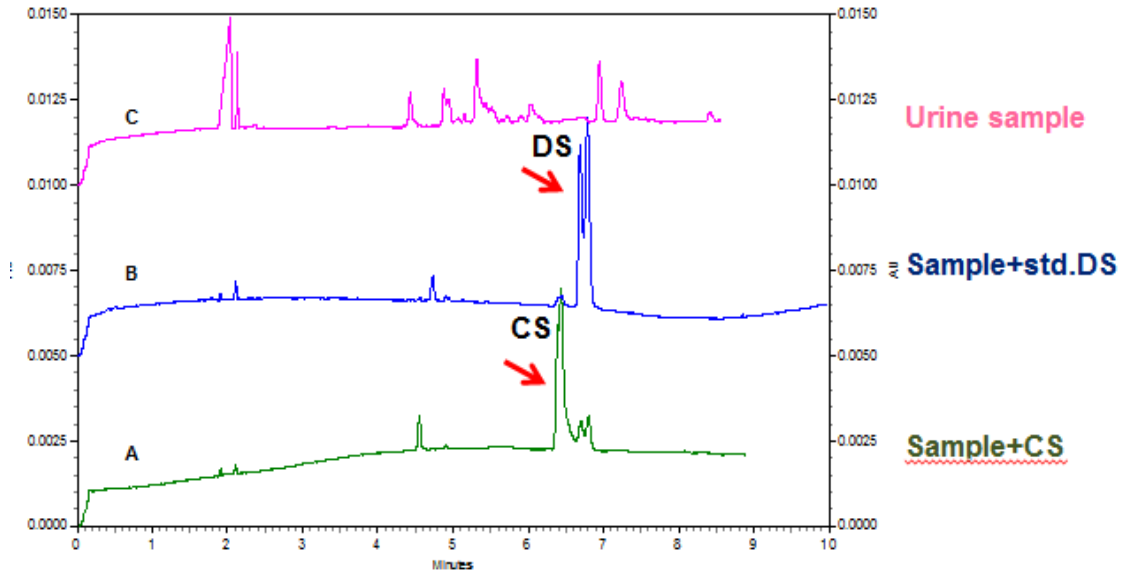
4.5 ผลการศึกษา CS และ DS ในสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างปัสสาวะที่เติมเอนไซม์ chondroitinase ABC (10 Unit/ml)

จากการทดลองก่อนหน้านี้ยังไม่พบ CS และ DS ในสารตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งอาจเป็นเพราะ CS และ DS มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้ฐานของ peak ต่ำและกว้างจนไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ได้กล่าวไปข้างต้น จึงได้มีการเติมเอนไซม์ chondroitinase ABC 10 unit/ml (50) ซึ่งจะตัดอย่างจำเพาะต่อโมเลกุลของ CS และ DS เพื่อให้ได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงและสามารถแยก peak ออกจากกันได้ดีจากการทดลองพบว่า เมื่อเติมเอนไซม์ chondroitinase ABC ในสารละลายมาตรฐาน พบว่า peak ของ CS และ DS สูงขึ้นและฐานแคบมากขึ้น ทำให้มี sensitivity ในการวัดที่สูงขึ้น (ภาพที่ 42 A และ B ตามลำดับ)



ภาพที่ 42 แสดง electropherogram A : CS และ DS ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC, B: CS หลังตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC C: DS หลังตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC

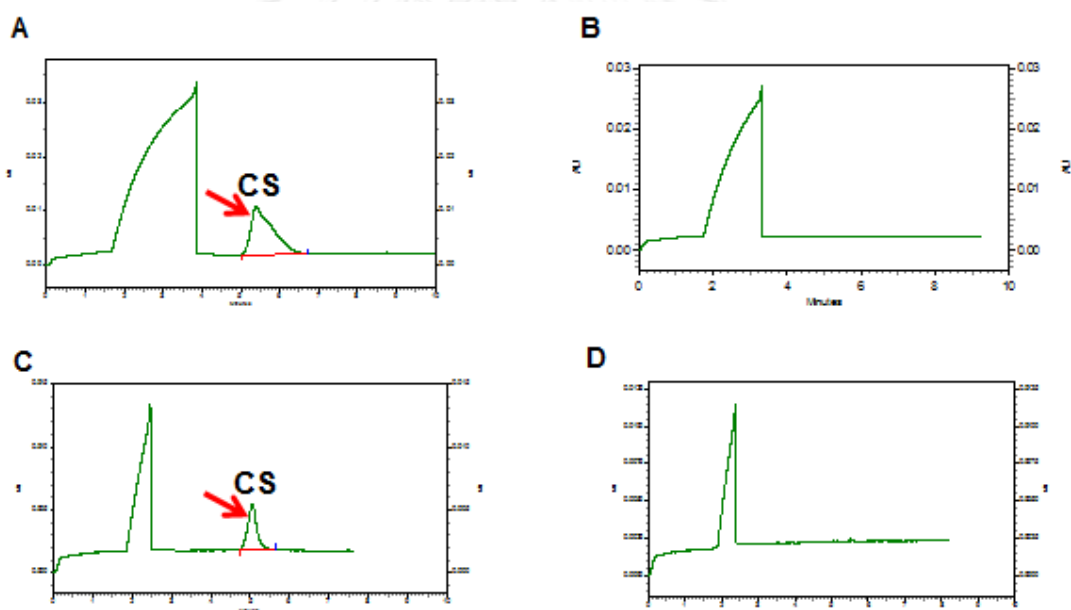
เมื่อเติมเอนไซม์ chondroitinase ABC ในสารตัวอย่างปัสสาวะ เปรียบเทียบกับ std. CS และ DS ไม่พบ peak ของ CS และ DS เช่นเดิม ดังนั้นสมมติฐานที่ว่า CS และ DS ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้การดูดกลืนแสงลดลงไม่เป็นจริง (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 แสดง electropherogram ของสารตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน CS และ DS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC A: สารละลายมาตรฐาน CS, B: สารละลายมาตรฐาน DS, C: สารตัวอย่างปัสสาวะ

4.6 ผลการศึกษาสารสกัดสารละลายมาตรฐาน CS และสารตัวอย่างปัสสาวะ

จากการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยยังไม่สามารถวัดระดับ CS และ DS จากตัวอย่างปัสสาวะได้ หนึ่งในเหตุที่ทำให้ไม่สามารถวัดได้อาจเป็นผลมาจาก CS และ DS ในปัสสาวะต่ำ หรือการที่ปัสสาวะมีสารอื่นๆ ที่สามารถรบกวนการดูดกลืนแสงของ CS และ DS ได้ เพื่อกำจัดสารรบกวนอื่นๆ ในปัสสาวะ ผู้วิจัยจึงทำการสกัดแยก CS และ DS ออกจากปัสสาวะโดยใช้วิธีของ Shizuka Iida (51) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นรวมถึงกำจัดสารอื่นๆที่รบกวน โดยทำการสกัดจาก artificial urine และสารตัวอย่างปัสสาวะจริง ที่เติมสารละลายมาตรฐาน CS จากสารตัวอย่างปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการ และจากสารตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บใหม่ 24 ชม. พบว่า กลับไม่สามารถตรวจพบ peak ของ CS ผู้วิจัยเชื่อว่าว่าปริมาณสาร CS และ DS ในปัสสาวะมีปริมาณต่ำกว่าที่สามารถตรวจวัดได้ และในปัสสาวะอาจมีสารอื่นรบกวนขั้นตอนการสกัด ทำให้ได้ % recovery ของสารเพียงร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับการการสกัดจาก artificial urine เพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ ผู้วิจัยมีแผนที่จะวัดปริมาณ CS และ DS ในปัสสาวะ โดยใช้วิธี elisa เพื่อยืนยันปริมาณที่แท้จริงในปัสสาวะ



ภาพที่ 44 แสดง electropherogram A: Extracted CS ในสารละลายมาตรฐาน CS 200 mg/L โดยมีความเข้มข้นหลังสกัด 8000 mg/L , B: Extracted CS ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่าง, C: Extracted CS ในปัสสาวะเก็บใหม่ที่เติมสารละลายมาตรฐาน CS 200 mg/L โดยมีความเข้มข้นหลังสกัด 4000 mg/L และ D: Extracted CS ในปัสสาวะที่เก็บใหม่ 24 ชม.

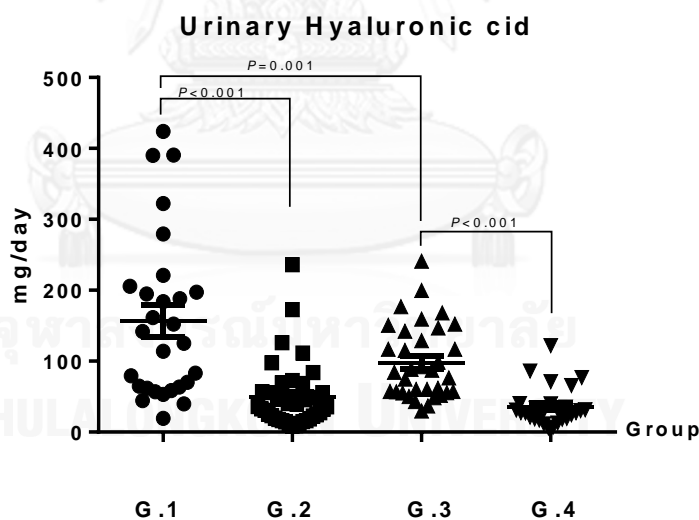
5. ผลการวิเคราะห์ Hyaluronic acid (HA) ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค capillary electrophoresis

สาร HA ในปัสสาวะมีระดับสูงเพียงพอที่จะสามารถวัดได้โดยวิธี capillary electrophoresis ที่พัฒนาขึ้น การศึกษา HA ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตมีระดับของ HA สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และพบว่ากลุ่มควบคุมมีระดับของ HA สูงกว่ากลุ่มบุตรของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 7 แสดงระดับ Hyaluronic acid ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

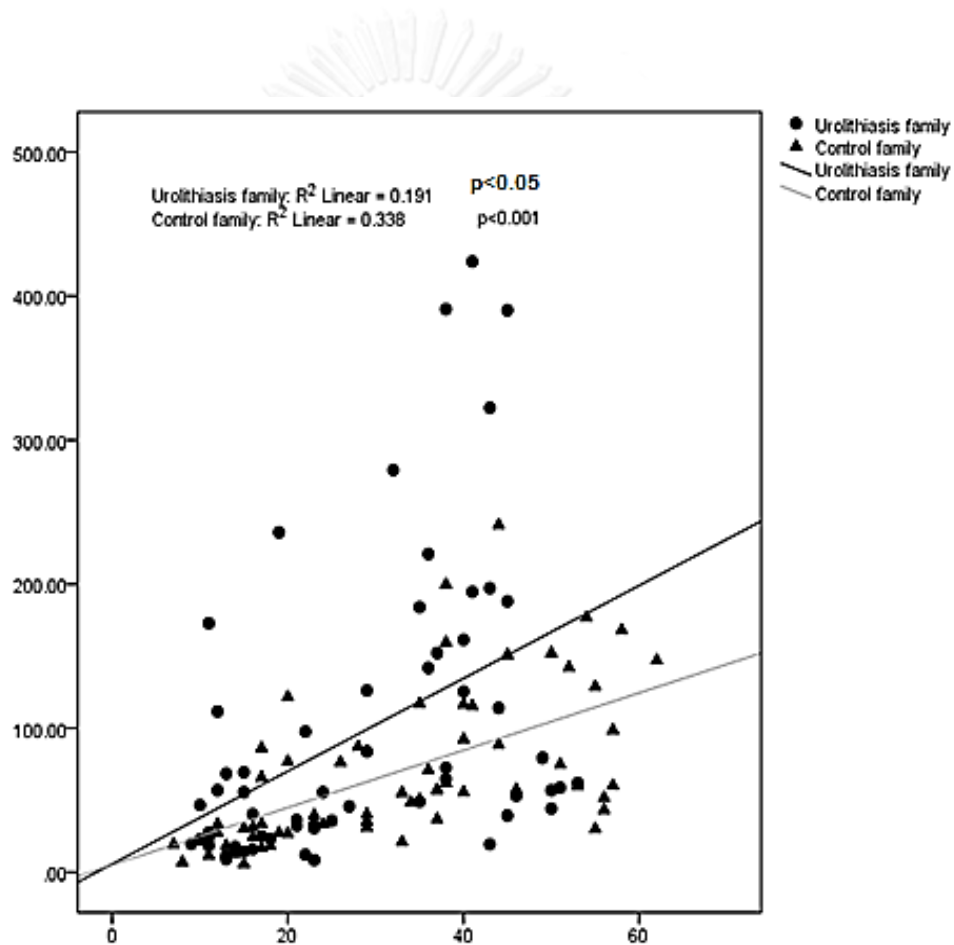
ข้อมูล	ครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ้วไต		ครอบครัวประชากรปกติ	
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
	ผู้ป่วยโรคนิ้วไต	บุตรของผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	กลุ่มบุตรคนปกติ
จำนวนประชากร (คน)	28	46	40	34
Urinary Hyaluronic acid	156.69±21.76 ^{ab}	49.38±7.68	98.37±8.97 ^c	35.79±5.14

ตัวแปรต่างๆ แสดงค่าในรูป mean + SEM, ค่าทางสถิติแสดงด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ ^a $p < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3, ^b $p < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2, ^c $p < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4



ภาพที่ 45 แสดงระดับของ HA ในปัสสาวะของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง G.1 :ผู้ป่วยโรคนิ้วไต, G.2 : บุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไต, G.3 : คนปกติ, G.4 : บุตรของคนปกติ

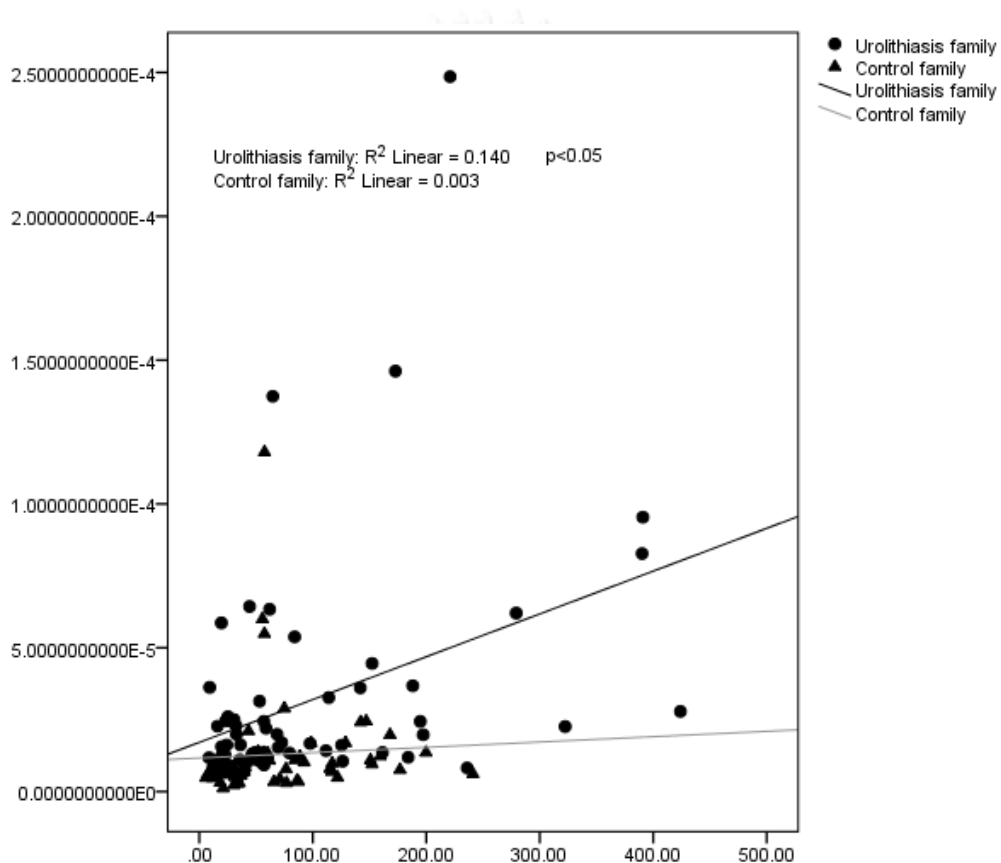
เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HA ในปัสสาวะกับช่วงอายุ ด้วย pearson correlation ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต และกลุ่มครอบครัวคนปกติ พบว่า ระดับ HA ในปัสสาวะกับช่วงอายุของทั้งสองกลุ่ม มีความสัมพันธ์เชิงบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 = 0.191$, $p < 0.05$ และ $R^2 = 0.338$, $p < 0.001$ ตามลำดับ) เป็นไปได้ว่าอายุเพิ่มขึ้น ร่างกายจะมีการขับ HA ทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด นอกจากนี้ยังพบว่า ในครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต มี HA สูงกว่ากลุ่มครอบครัวคนปกติในทุกช่วงอายุ



ภาพที่ 46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HA ในปัสสาวะกับอายุ ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มครอบครัวคนปกติ

6. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ supersaturation กับ Hyaluronic acid (HA)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด supersaturation กับ HA ในกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต พบว่า มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ($R^2 = 0.140$, $p < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในครอบครัวควบคุม ผู้วิจัยเชื่อว่าปริมาณ HA ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดนิ่วไต ซึ่งน่าที่จะทำศึกษาในอนาคตต่อไป



ภาพที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผู้ที่มีภาวะ urinary supersaturation สูง (ครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มที่ 1 และ 2) กับผู้ที่มีภาวะ supersaturation ต่ำ (กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 3 และ 4) กับระดับ HA ในปัสสาวะ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปัสสาวะ ได้แก่ คลอไรด์ แคลเซียม ฟอสเฟต กรดยูริก และออกซาเลต ที่ขับออกมาในปัสสาวะ ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ และบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับสารก่อนิ่ว ได้แก่ แคลเซียม ฟอสเฟต และออกซาเลต สูงกว่าบุตรคนปกติ แต่มีระดับกรดยูริกต่ำกว่า ในขณะที่ระดับสารยับยั้งนิ่ว ได้แก่ ซัลเฟต และ ซิเทรต ของกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตต่ำกว่ากลุ่มครอบครัวคนปกติ และบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับต่ำกว่าบุตรของคนปกติเช่นเดียวกัน ส่วนระดับของแมกนีเซียม ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มบุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไต กลุ่มคนปกติ และกลุ่มบุตรคนปกติ ไม่มีความแตกต่างกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุหรือเพศกับระดับสารในปัสสาวะ พบว่า แคลเซียม และฟอสเฟต ของกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มครอบครัวคนปกติ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอายุที่เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ผู้เข้าร่วมโครงการเพศชายจะมี แคลเซียม แมกนีเซียม กรดยูริก และซัลเฟต ในปัสสาวะสูงกว่าเพศหญิง

จากการศึกษาสารที่เกี่ยวข้องกับภาวะ supersaturation ในปัสสาวะ เป็นไปดังที่คาดหมาย คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับ urinary supersaturation สูงที่สุด และสูงกว่ากลุ่มคนปกติ (กลุ่มที่ 3) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังพบว่าบุตรของผู้ป่วยโรคนิ่วไตยังมีค่า supersaturation สูงกว่าบุตรคนปกติ (กลุ่มที่ 4) เช่นกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่บุตรผู้ป่วยโรคนิ่วไตมีระดับออกซาเลตสูง และซิเทรตต่ำในปัสสาวะเมื่อเทียบกับกลุ่มบุตรของคนปกติ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า บุตรหรือเด็กที่มีครอบครัวเป็นโรคนิ่วไตจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิ่วไตสูงกว่าเด็กทั่วไป นอกจากนี้ ยังพบว่าค่า urinary supersaturation ยังสูงขึ้นในกลุ่มผู้ใหญ่เมื่อเทียบกับบุตรในครอบครัวเดียวกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากระดับแคลเซียมในปัสสาวะสูงขึ้นเป็นหลัก ซึ่งผู้วิจัยเชื่อว่าการเพิ่มการขับแคลเซียมในผู้ใหญ่เป็นผลมาจากการเพิ่มการสลายกระดูก (52) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการขาดวิตามินดี ฮอโมน หรือโรคประจำตัวบางชนิด

การศึกษาการเกิดภาวะ supersaturation ในปัสสาวะ ซึ่งใช้สูตรการคำนวณของ Ogawa index เพราะเป็นสูตรดัดแปลงมาจากโปรแกรม Equil2 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ได้รับความนิยมและมีความน่าเชื่อถือสูง โดยโปรแกรม equil2 จะใช้สารอิเล็กโทรไลต์ต่างๆที่ส่งผลต่อการเกิดนิ่ว 10 ชนิด ได้แก่ โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ กรดยูริก ฟอสเฟต ออกซาเลต ซัลเฟต ซิเทรต และแอมโมเนียม แต่ผู้วิจัยไม่สามารถวัดระดับของแอมโมเนียมได้เพราะเป็นสารที่ระเหยง่ายและต้องวัดทันทีกับปัสสาวะที่เก็บใหม่ ในที่นี้จึงใช้สูตร Ogawa index โดยพิจารณาจาก สารอิเล็กโทรไลต์ 4 ตัว ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ออกซาเลต และ ซิเทรต ร่วมไปกับ Tiselius risk index เนื่องจากเป็น

สูตรที่นิยมใช้ในหลายการศึกษาและใช้สารอิเล็กโทรไลต์เหมือนกับสูตร Ogawa index โดยทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน

การศึกษาก่อนหน้าโดย นายจักรพันธ์ รัตนพันธุ์ ได้ศึกษา Sulfated GAGs คือผลรวมของ GAGs ทุกชนิดที่มีหมู่ซัลเฟต (ไม่รวม Hyaluronic acid) พบว่า ระดับของ sulfated GAGs ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนิ้วไตมีระดับต่ำกว่าคนปกติมาก อีกทั้งบุตรของผู้ป่วยก็มีระดับ GAGs ต่ำกว่าคนปกติเช่นกัน ทำให้ยังไม่ทราบว่า GAGs ชนิดใดที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดนิ้วไต

ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการวัด GAGs แต่ละชนิด ได้แก่ Chondroitin sulfate , Dermatan sulfate และ Hyaluronic acid ในปัสสาวะด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis (CE) ซึ่งไม่มีใครศึกษามาก่อนในมนุษย์ โดยอาศัยเอนไซม์ chondroitinase ABC ร่วมด้วย รวมถึงทดลองสกัด GAGs ในปัสสาวะก่อนวิเคราะห์ด้วย CE จากการศึกษาไม่สามารถตรวจวัดระดับของ CS และ DS ได้ จึงเชื่อได้ว่าระดับ CS และ DS ในปัสสาวะมนุษย์มีค่าต่ำกว่าค่า LOD ของ capillary electrophoresis (ต่ำกว่า 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) หรืออาจเป็นผลมาจากการมีสารอื่นในปัสสาวะที่รบกวนการดูดกลืนแสงของ CS และ DS หรืออาจเป็นผลมาจากการที่ CS และ DS จับกับโมเลกุลอื่นเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างจาก CS และ DS อิสระ โดยผู้วิจัยได้ทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ซ้ำโดยการสกัด CS และ DS ออกจากปัสสาวะก่อนนำมาตรวจสอบ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CS และ DS ซึ่งยังคงให้ผลเป็นลบอยู่ นอกจากนี้ ผู้ป่วยยังได้ตรวจวัด CS และ DS จากในปัสสาวะใหม่เพื่อพิสูจน์ว่าการที่ตรวจไม่พบ CS หรือ DS ไม่ได้เป็นผลมาจากการเก็บปัสสาวะตัวอย่างเป็นเวลานาน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี CE ก็ไม่สามารถตรวจพบ CS และ DS ในปัสสาวะใหม่เช่นกัน ด้วยเหตุนี้ เพื่อพิสูจน์ว่าในปัสสาวะผู้เข้าร่วมโครงการมีระดับ CS ต่ำกว่าค่าที่ควรตรวจวัดได้ ผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อทำการวัดระดับ CS ในปัสสาวะซ้ำอีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันระดับ CS ในปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์ CS และ DS ด้วยวิธี CE นี้สามารถพัฒนาเพื่อให้ใช้ตรวจ CS และ DS ในสารตัวอย่างที่มีปริมาณมากพอเกินระดับของ LOD เช่น ในน้ำไขข้อ (synovial fluid) หรือผู้ป่วย Hunter syndrome ซึ่งมีภาวะที่มีการขับ GAGs ในปัสสาวะมากผิดปกติ ส่วนการวิเคราะห์ Hyaluronic acid (HA) ในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค CE พบว่าผู้ป่วยโรคนิ้วไตมีระดับ HA ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ และกลุ่มคนปกติมีระดับของ HA สูงกว่าบุตรคนปกติ รวมถึงระดับของ HA ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับระดับ urinary supersaturation เป็นหลักฐานทางอ้อมที่บ่งชี้ว่า HA มีความสัมพันธ์กับการเกิดนิ้วไต

จากผลการวิเคราะห์สารในปัสสาวะ อันประกอบด้วยสารอิเล็กโทรไลต์ชนิดต่างๆ กรดยูริก และ GAGs จะพบว่า บุตรของผู้ป่วยโรคนิ้วไต จะมีความผิดปกติที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนิ้วไตสูงกว่าบุตรของคนปกติ อาทิเช่น ภาวะ hyperoxaluria, hypocitraturia, low urinary GAG, และ high urinary supersaturation

กล่าวโดยสรุป การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ชี้ให้เห็นการเกิดภาวะ supersaturation ใน ปัสสาวะของบุตรผู้ป่วยโรคนิ้วไต และระดับของ Hyaluronic acid ที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิด supersaturation ซึ่งจะเป็นแนวทางที่สำคัญต่อความเข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคนิ้วไต รวมถึงสามารถหาทางป้องกันการเกิดโรคนิ้วไตที่มีประสิทธิภาพได้ เพื่อให้ทราบถึงกลไกของสารยับยั้งนี้ได้ดียิ่งขึ้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการศึกษาหรือใช้เทคนิคอื่นที่สามารถตรวจวัดระดับของ Dermatan sulfate, Keratan sulfate, Chondroitin sulfate และ Heparan sulfate ในปัสสาวะได้ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของสารเหล่านี้ต่อการเกิดนิ้ว ซึ่งทำให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของสารเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

1. Edvardsson VO, Palsson R, Indridason OS, Thorvaldsson S, Stefansson K. Familiality of kidney stone disease in Iceland. *Scand J Urol Nephrol*. 2009;43(5):420-4.
2. Boonla C, Tosukhowong P, Tungsanga K. *Kidney Stone- From Molecular Lithogenesis to Stone Prevention*. 2007.
3. Chanapa P. The Risk Factors of Kidney Stones Focusing on Calcium and Oxalate. *Songkla Med J*. 2011;29(6):299-308.
4. Basavaraj DR, Biyani CS, Browning AJ, Cartledge JJ. The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones. *EAU-EBU Update Series*. 2007;5(3):126-36.
5. Bergsland KJ, Coe FL, White MD, Erhard MJ, DeFoor WR, Mahan JD, et al. Urine risk factors in children with calcium kidney stones and their siblings. *Kidney international*. 2012;81(11):1140-8.
6. Sriboonlue P PV, Chata K, Tungsanga K. Prevalence of Upper Urinary Tract Stone Disease in a Rural Community of North-eastern Thailand. *British Journal of Urology*. 1992;69(3):240-4.
7. Tosukhowong P, Boonla C, Ratchanon S, Tanthanuch M, Poonpirome K, Supataravanich P, et al. Crystalline composition and etiologic factors of kidney stone in Thailand. 2007;1.
8. Trinchieri A OF NR, Rovera F, Montanari, E ZG. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol*. 1999;162:27-30.
9. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The Lancet*. 367(9507):333-44.
10. Coe FL. Kidney stone disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2598-608.
11. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *kidney International*. 1978;13:361-71.
12. EM. W. Inhibitors of stone formation. *Semin Nephrol*. 1996;16 (5):474-86.
13. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *The American journal of physiology*. 1995;268(4):604-12.
14. Ogawa Y, Yonou H, Hokama S, Oda M, Morozumi M, Sugaya K. Urinary saturation and risk factors for calcium oxalate stone disease based on spot and 24-hour urine specimens. *Front Biosci*. 2003;8:a167-76.

15. Sritippayawan S BS, Paemanee A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, et al. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urological Research*. 2009;37(3):141-6.
16. Scales Jr CD, Curtis LH, Norris RD, Springhart WP, Sur RL, Schulman KA, et al. Changing Gender Prevalence of Stone Disease. *The Journal of Urology*. 2007;177(3):979-82.
17. Heller HJ, Sakhaee K, Moe OW, Pak CY. Etiological role of estrogen status in renal stone formation. *J Urol*. 2002;168(5):1923-7.
18. Yoshioka I, Tsujihata M, Momohara C, Akanae W, Nonomura N, Okuyama A. Effect of sex hormones on crystal formation in a stone-forming rat model. *Urology*. 2010;75(4):907-13.
19. Robertson WG, Peacock M. The Cause of Idiopathic Calcium Stone Disease: Hypercalciuria or Hyperoxaluria? *Nephron*. 1980;26(3):105-10.
20. Siener R, Ebert D, Nicolay C, Hesse A. Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. *Kidney Int*. 2003;63(3):1037-43.
21. Lange JN, Wood KD, Knight J, Assimos DG, Holmes RP. Glyoxal Formation and Its Role in Endogenous Oxalate Synthesis. *Advances in Urology*. 2012;2012:1-5.
22. Ross P, Holmes JK, Dean G, Assimos DG. Origin of Urinary Oxalate. *Annual International Urolithiasis Research Symposium*. 2007:176-82.
23. Coe FL. Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int*. 1978;13(5):418-26.
24. Matlaga BR SO, Assimos DG. Drug-induced urinary calculi. *Rev Urol*. 2003;5(4):227-31.
25. Saltel E, Angel JB, Futter NG, Walsh WG, O'Rourke K. Increased prevalence and analysis of risk factors for indinavir nephrolithiasis. *J Urol*. 2000;164(6):1895-7.
26. Taylor En SMJCGC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA*. 2005;293(4):455-62.
27. Fellstrom B. ea. Dietary Habits in Renal Stone Patients Compared with Healthy Subjects *British Journal of Urology*. 1989;63:575-80.
28. Loris Borghi ea. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercaliuria. *N Engl J Med*. 2002;346:77-84.
29. Bovornpadungkitti S SP, Tavichakorntrakool R, Prasongwatana V, Suwantrai S, Predanon C, Tosukhowong P, Suntarapa S. Potassium, sodium and magnesium contents in skeletal muscle of renal stone-formers: a study in an area of low potassium intake. *J Med Assoc Thai*. 2000;83(7):756-63.

30. Sellaturay S, Fry C. The metabolic basis for urolithiasis. *Surgery (Oxford)*. 2008;26(4):136-40.
31. A. J, Nicholas S, Simmons L. Urinary Stone Formation: Dent's Disease Moves Understanding Forward. *Exp Nephrol*. 2002;10:176–81.
32. Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. Lysosomal Storage Disease: Revealing Lysosomal Function and Physiology. *Physiology*. 2010;25(2):102-15.
33. JF K. Chemical and Biochemical Aspects of the Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Health and Disease. *Advan Clin Chem*. 1976:1-101.
34. Michelacci YM, Glashan RQ, N. S. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. *Kidney Int* 1989;36(6):1022-8.
35. Piraud M BS, Mathieu M, Maire I. Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta*. 1993;221(1-2):171-81.
36. Poon NW GM. Urinary glycosaminoglycans and glycoproteins in a calcium oxalate crystallization system. *Carbohydr Res*. 2012;347(1):64-8.
37. Suzuki K MK, Doyle IR, Ryall RL. Urinary glycosaminoglycans are selectively included into calcium oxalate crystals precipitated from whole human urine. *Scanning Microsc*. 1994;8(3):523-30.
38. Rodgers AL BD, Harper W. . Effect of urinary macromolecules and chondroitin sulphate on calcium oxalate crystallization in urine. *Scanning Microsc*. 1994;8(1):71-7.
39. Verkoelen CF. Crystal Retention in Renal Stone Disease: A Crucial Role for the Glycosaminoglycan Hyaluronan? *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(6):1673-87.
40. Lamontagne CA, Plante GE, Grandbois M. Characterization of hyaluronic acid interaction with calcium oxalate crystals: implication of crystals faces, pH and citrate. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2011;24(4):733-40.
41. Jawalekar S, Surve V, Bhutey A. Urinary Excretion of Glycosaminoglycans in Patients with Urolithiasis. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 2013;3(1):74-81.
42. Pereira DA, Aguiar JAK, Hagiwara MK, Michelacci YM. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2004;1672(1):1-11.
43. Chikama S, Iida S, Inoue M, Kawagoe N, Tomiyasu K, Matsuoka K, et al. Role of heparan sulfate proteoglycan (syndecan-1) on the renal epithelial cells during

calcium oxalate monohydrate crystal attachment. *The Kurume medical journal*. 2002;49(4):201-10.

44. Chan VSW, Tan ECY, Li MK. Determination of heparan sulphate in kidney tissues of patients with calcium nephrolithiasis. *Urological Research*. 1995;23(5):339-42.

45. Somsen GW, Tak YH, Toranzo JS, Jongen PMJM, de Jong GJ. Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(18):4107-12.

46. Liu X, Sun C, Zang H, Wang W, Guo R, Wang F. Capillary electrophoresis for simultaneous analysis of heparin, chondroitin sulfate and hyaluronic acid and its application in preparations and synovial fluid. *Journal of chromatographic science*. 2012;50(5):373-9.

47. Andrew J. ea. Diagnosis and Initial Management of Kidney Stones. *American family physician*. 2001;63:1329-38.

48. Pie PK, Karellas ME. Medical management of common urinary calculi. *SA fam pract*. 2007;49(3):44-8.

49. Loegel TN, Trombley JD, Taylor RT, Danielson ND. Capillary electrophoresis of heparin and other glycosaminoglycans using a polyamine running electrolyte. *Analytica Chimica Acta*. 2012;753(0):90-6.

50. Kodama C, Ototani N, Isemura M, Aikawa J, Yosizawa Z. Liquid-chromatographic determination of urinary glycosaminoglycans for differential diagnosis of genetic mucopolysaccharidoses. *Clinical chemistry*. 1986;32(1 Pt 1):30-4.

51. S. Iida IT, K. Suzuki, A. Shimada, J. Yahara, S. Yoshii, K. Matsuoka, S. Noda. Analysis of Matrix Glycosaminoglycans (GAGS) in Urinary Stones by High-Performance Liquid Chromatography Scanning Microscopy International. 1999;13:173-81.

52. Tasca A, Dalle Carbonare L, Nigro F, Giannini S. Bone Disease in Patients With Primary Hypercalciuria and Calcium Nephrolithiasis. *Urology*. 2009;74(1):22-7.

ภาคผนวก

1. ขั้นตอนการปรับ condition ของคอลัมน์ของเครื่อง Capillary Electrophoresis (CE)

สารที่ใช้ในการปรับ condition	
1.	1M H ₃ PO ₄
2.	0.1 H ₃ PO ₄
3.	Methanol
4.	1 NaOH
5.	0.1 NaOH
6.	น้ำปราศจากไอออน
7.	50mM H ₂ NaPO ₄ และ 200 mM butylamine (buffer)
8.	น้ำปราศจากไอออน

จากนั้นเลือกใช้ method สำหรับปรับ condition ก่อนนำคอลัมน์ใหม่หรือคอลัมน์ที่ไม่ได้ใช้งานเป็นเวลานานมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Capillary Electrophoresis (CE)

2. การเตรียม 50mM monosodium phosphate 200mM butylamine บัฟเฟอร์

- ชั่ง monosodium phosphate (NaH₂PO₄) 0.3 กรัม
- ปิเปต butylamine 1 มิลลิลิตร
- ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (DI)
- ปรับ pH 3.0 ด้วย phosphoric acid แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 ml
- เตรียมบัฟเฟอร์ที่ได้ปริมาณ 3 ใน 4 ส่วน ของขวดขนาด 1.5 ml ทั้งหมด 4 ขวด

3. ขั้นตอนการเตรียม สารละลายมาตรฐาน Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ Hyaluronic acid (HA)

3.1 เตรียม stock สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000 ppm

- ชั่งสารละลายมาตรฐาน 25 mg
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 25 ml

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500 ppm

- ปิเปตจาก stock 1000 ppm มา 5 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml

3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 250 ppm

- ปิเปิดจาก stock 500 ppm มา 5 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml

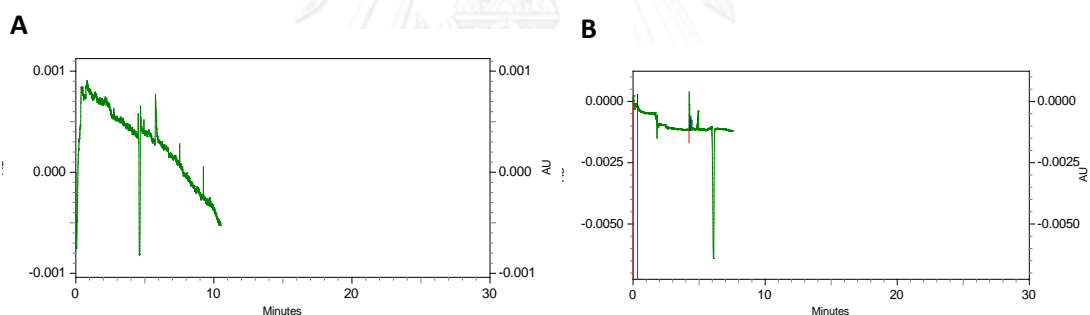
3.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ppm

- ปิเปิดจาก stock 1000 ppm มา 1 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml

3.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 ppm

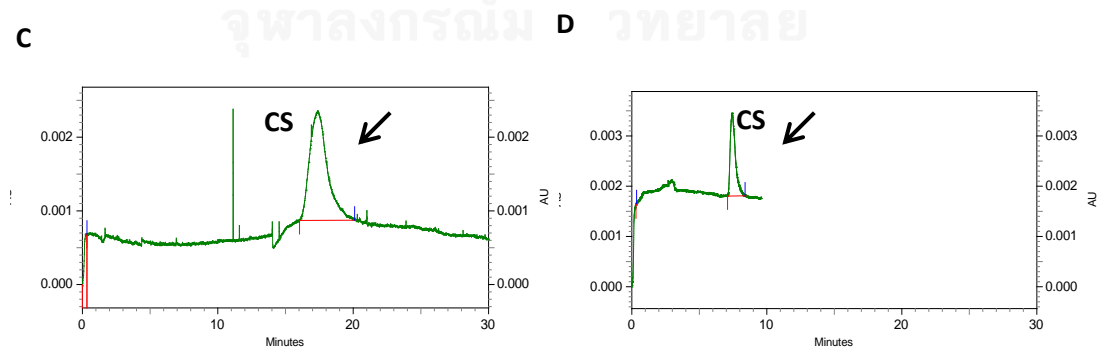
- ปิเปิดจาก stock 100 ppm มา 1 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml

4. ผลของบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS) โดยวิธี capillary electrophoresis



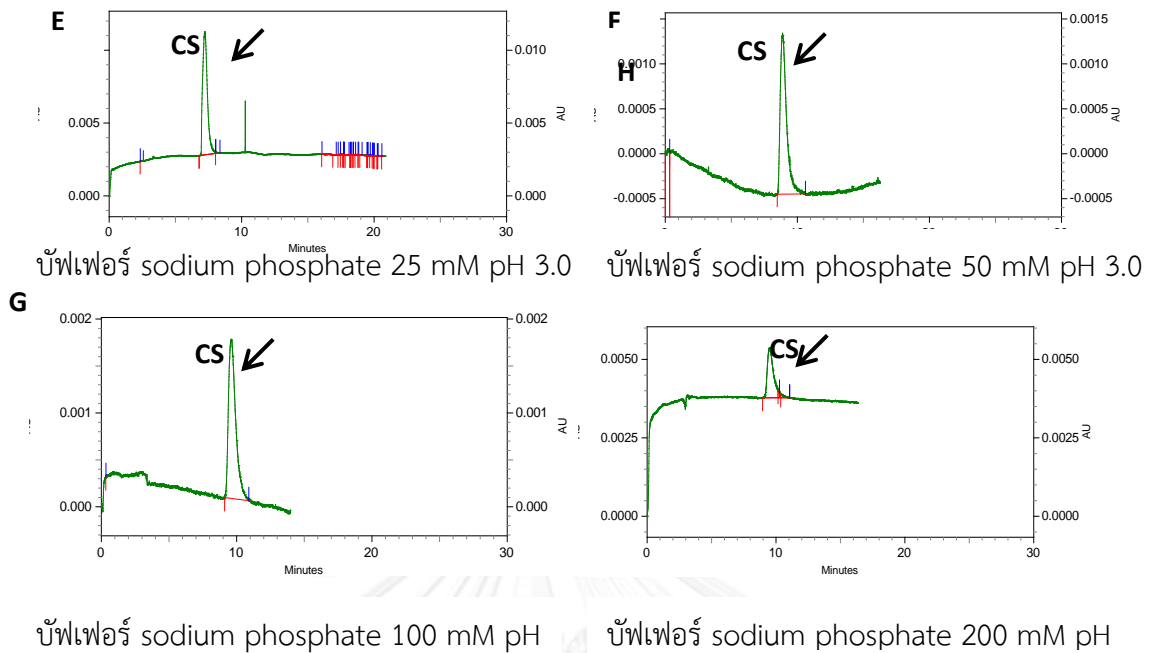
บัฟเฟอร์ borate 20 mM pH 3.0

บัฟเฟอร์ borate 25 mM และ TTAB 5 mM pH3.0



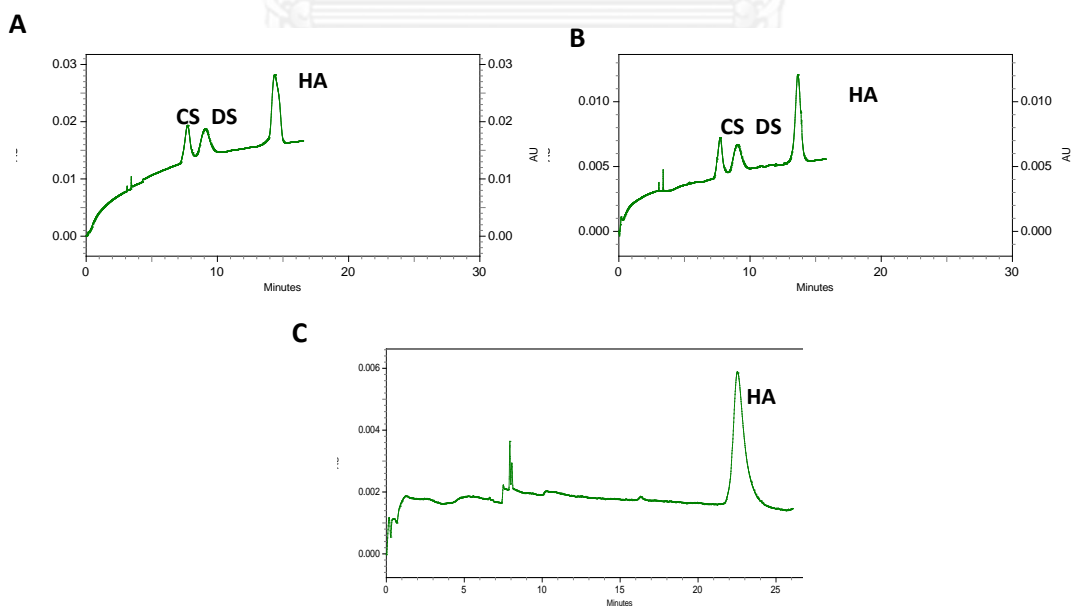
บัฟเฟอร์ sodium phosphate
และ borate 25mM pH 3.0

บัฟเฟอร์ sodium phosphate
และ borate 50 mM pH 3.0



ภาพที่ 1 แสดง electropherogram ของ Chondroitin sulfate (CS) ต่อบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

5. ผลของ sodium phosphate buffer ที่เติม polyamine ชนิดต่างๆ ต่อการวิเคราะห์ Chondroitin sulfate (CS), Dermatan sulfate (DS) และ hyaluronic acid (HA) โดยวิธี capillary electrophoresis



ภาพที่ 2 แสดง electropherogram ของ CS, DS และ HA ต่อบัฟเฟอร์ sodium phosphate buffer ที่เติม A : triethylamine, B: butylamine, C: ethylenediamine

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	นางสาวนัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Nuttiya Kalpongkukul
วัน เดือน ปีเกิด	13 ตุลาคม พ.ศ. 2532
เพศ	หญิง
อายุ	24 ปี
โทรศัพท์	085-1350902
E-mail	Nuttiya.nkal@gmail.com
ที่อยู่ปัจจุบัน	107/82 ม.8 ถ.พหลโยธิน ต.ห้วยทราย อ.หนองแค จ.สระบุรี 18230
ประวัติการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY