

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์เมตาโบโลมิกส์ในปัสสาวะของประชากรไทยที่อาศัยในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์	
ผู้เขียน	นางสาวดารารวรรณ นุปผา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. ศิริรัตน์ จันทจำรูญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษามетаโบโลมิกส์ (Metabolomics) เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลง metabolites ในกระบวนการทางชีวเคมีของร่างกายมนุษย์ในสภาวะจำเพาะ เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการค้นหา biomarker ใหม่ เพื่อใช้ประเมินการสัมผัสสารพิษ และช่วยอธิบายถึงกลไกการเกิดพิษได้ ด้วยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา metabolomics ในปัสสาวะของประชากรที่มีการสัมผัสแคดเมียมระยะเวลานาน โดยอาศัยอยู่ในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี Bruker Advance DRX 400 MHz NMR วิเคราะห์หาปริมาณ metabolites ต่าง ๆ และใช้ sodium 3-(trimethylsilyl)-[2,2,3,3-d4]-1-propionate เป็นสารมาตรฐานร่วมกับการใช้ชุดซอฟต์แวร์ Top-spin™ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก NMR spectra และประมวลผล metabolites ที่พบในปัสสาวะด้วยสถิติ Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) และ Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA)

ประชากรในการศึกษา มีอายุอยู่ระหว่าง 48-75 ปี โดยคัดเลือกจากปริมาณแคดเมียมในปัสสาวะ ประชากรในกลุ่มแคดเมียมสูงและแคดเมียมต่ำเป็นประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม ส่วนประชากรในกลุ่มเปรียบเทียบเป็นประชากรที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม ประชากรทั้งหมดไม่มีโรคความดันโลหิตสูง เบาหวาน และนี่ในทางเดินปัสสาวะ และทุกคนไม่ได้สูบบุหรี่เป็นประจำ การศึกษาได้แบ่งประชากรออกเป็น 3 กลุ่ม โดยมีชาย 4 คน หญิง 6 คนต่อกลุ่ม ตัวอย่างศึกษากลุ่มที่ 1 (กลุ่มเปรียบเทียบ เป็นประชากรที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม) มีปริมาณแคดเมียมในปัสสาวะต่ำกว่า 2 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน ($\mu\text{g/gCr}$) ซึ่งเป็น

ค่าที่ยอมรับได้ขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2002) และมีปริมาณ beta 2 – microglobulin (β_2 -MG) <300 $\mu\text{g/gCr}$ และ N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) <8 Unit/gCr กลุ่มที่ 2 (กลุ่มแคดเมียมต่ำ) มีปริมาณแคดเมียมในปัสสาวะ <2 $\mu\text{g/gCr}$ และมี β_2 -MG และ NAG <300 $\mu\text{g/gCr}$ และ <8 Unit/gCr ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 (กลุ่มแคดเมียมสูง) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการสัมผัสแคดเมียมสูงร่วมกับไตทำงานผิดปกติชัดเจน มีปริมาณแคดเมียมในปัสสาวะ >5 $\mu\text{g/gCr}$ มี β_2 -MG >1,000 $\mu\text{g/gCr}$ และ NAG >8 Unit/gCr

ผลการศึกษาพบ metabolites ในปัสสาวะของประชากรศึกษาทั้งหมดที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ และหาปริมาณได้ จำนวน 12 ชนิดได้แก่ threonine, lactate, alanine, N-acetylgalactosamine-4-sulphate, succinate, citrate, dimethylamine, trimethylamine oxide, taurine, glycine, phenylalanine และ hippurate

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ PLS-DA score plot พบว่า metabolites กลุ่มที่ 3 มีการแยกตัวออกจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน และมีเพียง citrate ชนิดเดียว ที่มีปริมาณในปัสสาวะของประชากรกลุ่มที่ 3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แตกต่างจากปริมาณ citrate ในปัสสาวะของประชากรกลุ่มที่ 1 และ 2 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ OPLS-DA S-plot ได้ citrate เป็นตัวแปรที่ถูกเลือกให้เป็น potential biomarker แตกต่างจาก metabolites ทั้งหมดที่ตรวจพบในประชากรศึกษา ซึ่งสามารถใช้เป็น biomarker บ่งชี้การสัมผัสแคดเมียมปริมาณสูงจนไตทำงานผิดปกติได้

สรุปผลการวิจัยได้ว่า ปริมาณ citrate ที่ลดลงในปัสสาวะ เป็น biomarker ที่สำคัญในการประเมินการสัมผัสแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายอย่างเรื้อรังจนมีภาวะไตทำงานผิดปกติ สันนิษฐานได้ว่า แคดเมียมมีส่วนเกี่ยวข้องหรือรบกวนกระบวนการ tricarboxylic acid (Krebs cycle) ที่เกิดขึ้นที่ mitochondria ทั้งนี้ควรต้องมีการศึกษาในเชิงลึกหรือในระดับโมเลกุลต่อไป

Thesis Title Analysis of Urinary Metabolomics in Thai Population Who Live in a Cadmium Contaminated Area by Nuclear Magnetic Resonance Technique

Author Miss Darawan Booppha

Degree Master of Science (Toxicology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn

Advisor

Asst. Prof. Dr. Sirirat Chuncharunee

Co-advisor

ABSTRACT

Metabolomics is a study pertaining to biochemical processes involving human metabolites under specific conditions. It is an important tool for discovery of novel biomarkers of toxin exposure and for identifying mechanisms of toxicity. The objective of this study was to study metabolomics in urine of subjects who had long term exposure to cadmium from living in Cd polluted areas in the Mae Sot district of Tak province. The metabolites were analysed using a Bruker advance DRX 400 MHz nuclear magnetic resonance spectrometer. Sodium 3-(trimethylsilyl)-[2, 2, 3, 3-d4]-1-propionate (TSP) was used as a reference standard and the Topspin™ NMR software package was used for processing and analysis of NMR spectra. The metabolites in urine were analyzed and assessed by Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA).

Trial subjects aged between 48-75 years were selected from Mae Sot district of Tak province as high, low and baseline levels of cadmium exposure. Subjects from the cadmium polluted areas were chosen for high and low exposure. Subjects living in non-polluted areas in the District were recruited as a control group. Subjects were screened to exclude hypertension, diabetes mellitus, urinary stones and regular smokers. The three groups each comprised four men and six women. Group 1 (control from the non-polluted area) all had normal renal function and

urinary cadmium concentrations below the World Health Organization recommended maximum level of 2 $\mu\text{g/g}$ creatinine (Cr) (WHO, 2002). Their urinary levels of beta 2 microglobulin ($\beta_2\text{-MG}$) and N-acetyl- β -D glucosaminidase (NAG) were below 300 $\mu\text{g/gCr}$ and <8 unit/gCr, respectively. Subjects with low cadmium exposure (Group 2) all had normal kidney function and urinary concentrations of cadmium, $\beta_2\text{-MG}$ and NAG <2 $\mu\text{g/gCr}$, <300 $\mu\text{g/gCr}$ and <8 unit/gCr, respectively. Subjects with high cadmium exposure (Group 3) had renal dysfunction and urinary concentrations of cadmium, $\beta_2\text{-MG}$ and NAG over 5 $\mu\text{g/gCr}$, $>1,000$ $\mu\text{g/gCr}$ and >8 unit/gCr, respectively.

The NMR results showed twelve metabolites that could be identified and quantified from the urine samples of all subjects. These were threonine, lactate, alanine, N-acetylgalactosamine-4 sulphate, succinate, citrate, dimethylamine, trimethylamine oxide, taurine, glycine, phenylalanine and hippurate.

The PLS-DA score plot clearly separated the urinary metabolites of the Group 3 subjects from those Groups 1 and 2. But only the citrate levels in urine from Group 3 subjects were significantly lower ($p<0.01$) than for Groups 1 and 2. Additionally, OPLS-DA S-plot identified citrate as significantly different from the other urinary metabolites found in all subjects. Therefore, citrate can be used as a biomarker for renal dysfunction in people caused by long term high exposure to environmental cadmium.

In conclusion, this study proposes low levels of urinary citrate as a biomarker of renal dysfunction due to chronic exposure to high concentrations of cadmium. As it is involved in the tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle) in mitochondria, further studies should be made at the molecular level to determine and understand the causes of citrate reduction.